

T 9/31

CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS

ESTACIÓN EXPERIMENTAL DEL ZAIDÍN



UNIVERSIDAD DE GRANADA
Facultad de Ciencias
Fecha ...15/12/03...
ENTRADA NUM. ...4957...

UNIVERSIDAD DE GRANADA

FACULTAD DE CIENCIAS

BIBLIOTECA UNIVERSITARIA
GRANADA
N.º Documento 615033740
N.º Copia 216265993



UNIVERSIDAD DE GRANADA
21 NOV. 2003
COMISION DE DOCTORADO

TOLERANCIA A DISOLVENTES ORGÁNICOS EN LA CEPA *Pseudomonas putida* DOT-T1E (IMPLICACIÓN DE LA BOMBA DE EFLUJO TtgGHI) Y SU UTILIZACIÓN EN BIOTRANSFORMACIONES EN SISTEMAS DE DOBLE FASE

TESIS DOCTORAL

ANTONIA M. ROJAS MARTÍNEZ

2004

TOLERANCIA A DISOLVENTES ORGÁNICOS EN LA CEPA *Pseudomonas putida* DOT-T1E (IMPLICACIÓN DE LA BOMBA DE EFLUJO TtgGHI) Y SU UTILIZACIÓN EN BIOTRANSFORMACIONES EN SISTEMAS DE DOBLE FASE

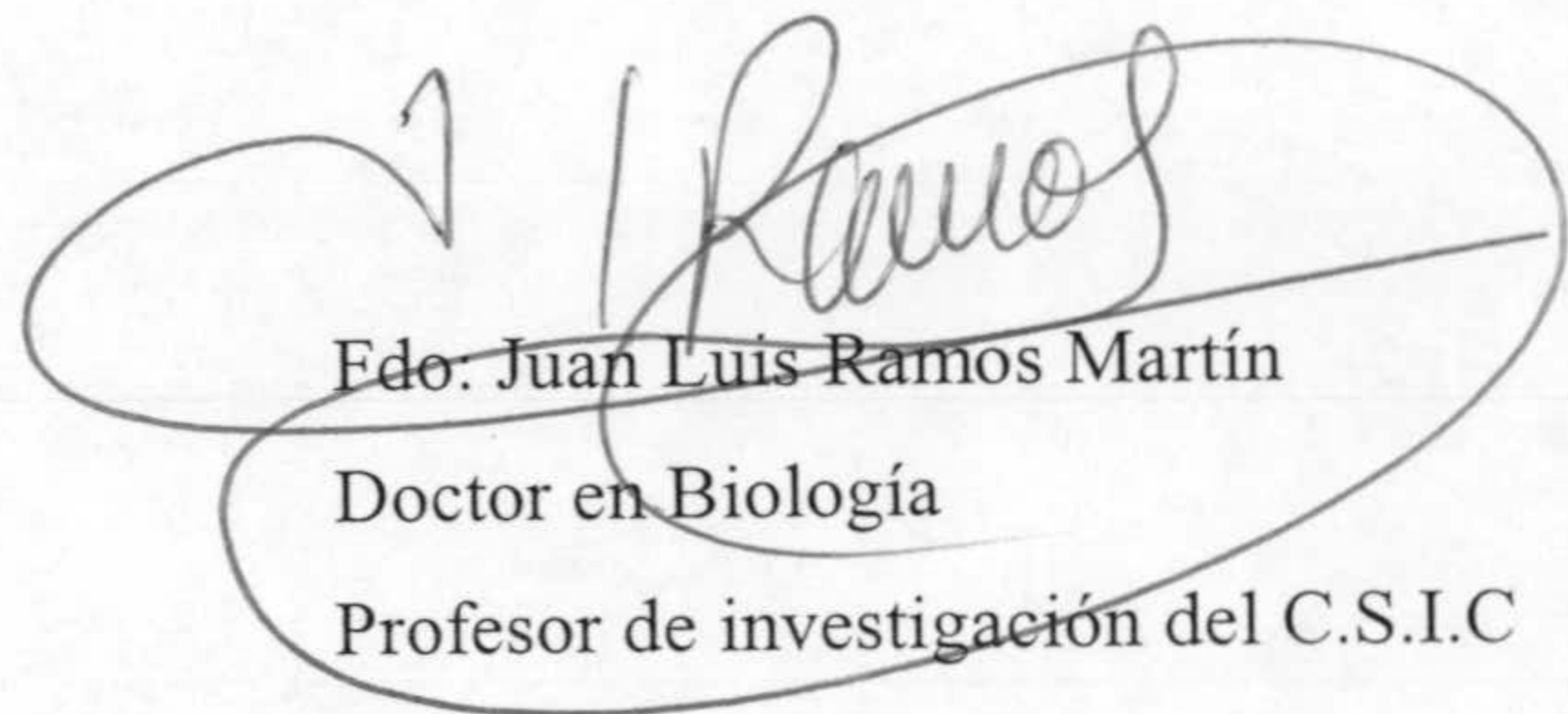
Memoria que presenta la licenciada en
Ciencias Químicas, Antonia M. Rojas Martínez,
para aspirar al Título de Doctora



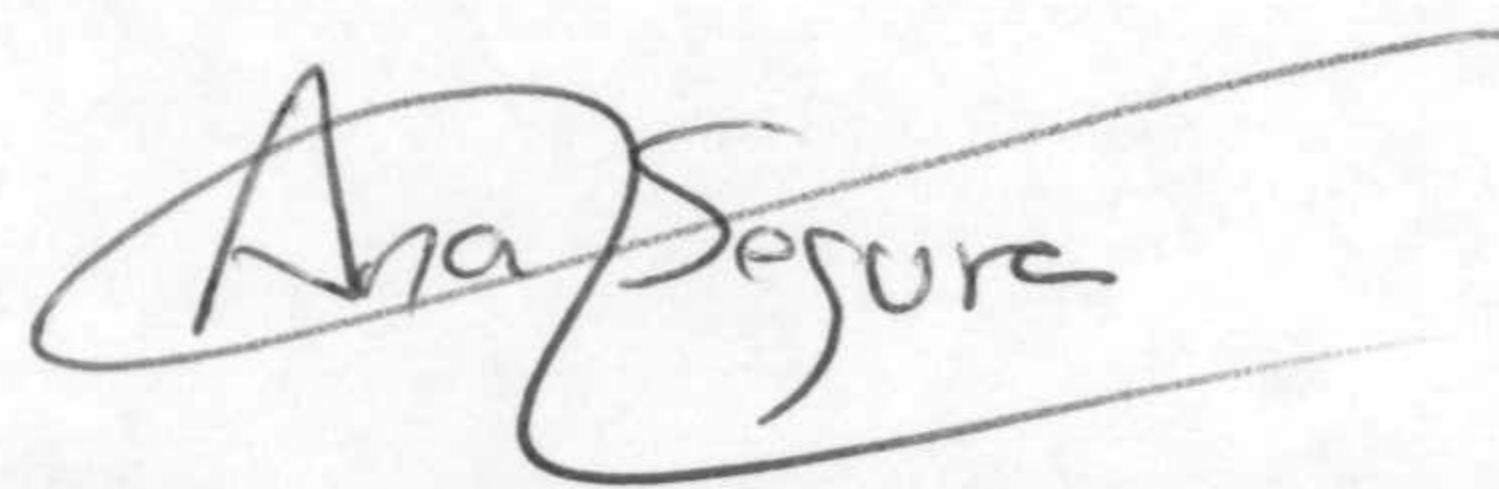
Fdo.: Antonia M. Rojas Martínez

Vº Bº

Los directores



Edo. Juan Luis Ramos Martín
Doctor en Biología
Profesor de investigación del C.S.I.C



Fdo.: Ana Segura Carnicero
Doctora en Biología
Contratada Ramón y Cajal

Universidad de Granada

2004

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

A mis padres

A mis hermanas

Antes se cansará la razón de imaginar
que el Universo de maravillarnos.

BLAISE PASCAL

Agradecimientos

Estos cuatro años en el laboratorio han sido muy importantes para mí, no sólo a nivel profesional, sino fundamentalmente a nivel personal. Ha habido buenos momentos, momentos excelentes, y alguna vez que otra no tan buenos, pero que gracias a las personas que te rodean consigues superar e incluso aprender de ellos. Hay mucha gente a la que agradecer y reconocer su ayuda, su profesionalidad y en muchos casos su amistad.

En primer lugar quisiera agradecer a mis directores de tesis, al Dr. Juan Luis Ramos y a la Dra. Ana Segura, su excelente supervisión. Al Dr. Juan Luis Ramos, director del grupo de Degradación de Tóxicos Orgánicos de la Estación Experimental del Zaidín, por su confianza, y por ser un modelo de trabajador infatigable y brillante. Muchas gracias por permitirme formar parte de tu equipo. A la Dra. Ana Segura, por su confianza, sus inteligentes consejos, su calidad humana y su amistad. Muchas gracias por haber compartido estos cuatro años de trabajo conmigo y enseñarme todo lo necesario para poder llevar a cabo esta Tesis Doctoral.

Thank you very much to Prof. Søren Molin, head of the Molecular Microbiology Group at DTU in Denmark, for the months I spent in his laboratory. Thank you very much for your support, your hospitality, your advices, and that very good wine. I also would like to thank to the whole laboratory for their help and the good times, specially to Janus and Susse, who taught me a lot about the noble art of making biofilms to grow. To Morten and Jens, for their good advices and for the strains and constructions they provided me. To Paula, who sheltered me for some days at her home, I will never forget this. To Tove, and all the technicians for their kindness and help. To Anders, Thomas, Marie, Martin, Arne, Frank, Eva, Allan,.....for the very good moments.

Thank you very much to Dr. Andreas Schmid and Prof. B. Wiltholt for giving me the opportunity to work during one month in their laboratory of Technical Enzymology, at the Institute of Biotechnology ETH in Zürich. Andreas, thank you very much for your hospitality, and although we never had much time for discussion, it was a great experience. I wish to thank to Georgios and Dani for their help in the lab and also for the good times in the BARTOLO meetings. Thank you specially to Georgios for providing me a place to live and taking care of me during that month in Zürich. Thank you also to Frank and Selçuk, my lab room mates, and to Jochen for his help with HPLC. Sorry to the whole lab for the stink of octanol and thank you for being so patient.

Gracias al Dr. Antonio Luis Extremera de la Universidad de Granada por interesarse por mi trabajo y por ser mi tutor durante el período de Investigación Tutelada.

Gracias al Ministerio de Educación, Cultura y Deportes por la beca FPU que he disfrutado estos 4 años y por las becas para estancias en el extranjero que me han permitido completar mi formación en Dinamarca y Suiza.

A la Estación Experimental del Zaidín en su conjunto, a su administración, a los de mantenimiento, a los de la biblioteca y a los de compras, por hacernos el trabajo más fácil.

Muchísimas gracias a Ana Hurtado. Has sido mi segundo par de manos en muchas ocasiones, y además muchas gracias por tu amistad. La verdad es que hemos formado un buen equipo, Ana Segura, tú y yo.

Gracias a Marichu, por dejarme usar tus Goodies y tu SOC, por ser mi amiga, y por los buenos ratos de terapia.

A Patri Godoy, por pincharme los lípidos y enseñarme a utilizar el GC-MS. A Raquel Ruiz, por introducirme en el mundo de la β -gal, del que siempre serás la campeona. A Mar, por todos los buenos consejos. Además, gracias a las tres por vuestra amistad.

A Wilson, por tu ayuda en la purificación de TtgV, que más de un disgusto nos dio. A Raquel Tobes y Manolo por su ayuda con los programas informáticos. A Antonio Caballero por su ayuda con el HPLC. A Estrella Duque, por sus cepas y por cuidar de todos nosotros. A M. Eugenia, la cuarta habitante del chalet del jardín (o sea de la caseta), por aguantar mi caos y por ser tan buena compañera. A M. Angustias y M. Carmen, que hacen que todo el trabajo sea más fácil. A Mai, Carmen, Marian e Inés, por su eficiencia en las labores administrativas y de coordinación, clave en el buen funcionamiento del grupo. A los informáticos Javi y César por sacarme de más de un apuro.

A Lázaro, que cuidó tan bien de mí en Zürich. Muchas gracias por las excursiones de fin de semana, los cafés y las cervezas, y los paseos a buscar libros en español.

Como no me quiero dejar a nadie en el tintero, mejor no sigo nombre por nombre. Gracias a todos mis compañeros del laboratorio, a los nuevos, a los de siempre y a los que ya han buscado otro camino. Además quiero aprovechar estos agradecimientos para recordar a nuestro compañero Gilberto Mosqueda, al que también tengo que agradecer su ayuda con las *primer extension* y por tener siempre una palabra amable y un bombón a mano.

Gracias al Dr. José Antonio Gómez Capilla y a su laboratorio de la Facultad de Medicina de la Universidad de Granada por permitirme realizar algunos ensayos en su laboratorio. Agradezco especialmente a Carolina Gómez por permitirme "abusar" de ella cuando le mandaba las muestras. Muchas gracias por ser mi amiga durante todos estos años (nos quedan muchos carros que montar).

Muchas gracias a mis amigos M. Carmen, Sebas, Pedro José y Cati, por recordarme que hay cosas importantes fuera del laboratorio. Muchas gracias por vuestro cariño.

A mis hermanas, de las que poco a poco me voy librando (es broma, nenas). Muchas gracias por aguantarme estos años y por vuestro apoyo y ayuda incondicionales.

A mis padres, a los que les debo todo.

Gracias a todos.
Antonia

ÍNDICE

ÍNDICE	xiii
ABREVIATURAS	xxiii
ÍNDICE DE FIGURAS	xxv
ÍNDICE DE TABLAS	xxix
SUMMARY	1
INTRODUCCIÓN	11
1. BIOLOGÍA DE <i>Pseudomonas</i>	13
2. HIDROCARBUROS AROMÁTICOS	15
3. PRINCIPIOS GENERALES DE LAS RUTAS DE DEGRADACIÓN AEROBIAS PARA EL METABOLISMO DE AROMÁTICOS	17
3.1. Formación de derivados dihidroxilados	18
3.2. Rotura del anillo aromático	19
3.3. Degradación de los productos resultantes de la fisión del anillo aromático hasta intermediarios del ciclo de Krebs	22
4. RUTAS DESCRITAS PARA LA BIODEGRADACIÓN AEROBIA DE TOLUENO	23
4.1. Ruta TOL	25
4.1.1. Reacciones enzimáticas codificadas por el plásmido TOL	25
4.1.2. Organización física de los genes catabólicos del plásmido TOL y su regulación	27
4.2. Ruta TOD	29
4.2.1. Reacciones enzimáticas catalizadas por los genes de la ruta TOD	29
4.2.2. Organización génica de los genes de la ruta TOD y regulación	30
5. MECANISMOS DE TOLERANCIA A DISOLVENTES ORGÁNICOS	32
5.1. Alteración de la composición de fosfolípidos de las membranas debido a la exposición a disolventes orgánicos	35
5.1.1. Cambios en la composición de los ácidos grasos	35
5.1.1.1 Isomerización <i>cis/trans</i> de ácidos grasos	36
5.1.1.2. Razón ácidos grasos saturados/insaturados	39

5.1.2. Cambios en los grupos de cabeza de los fosfolípidos	40
5.1.3. Cambios en la velocidad de síntesis de ácidos grasos	41
5.1.4. Alteración de lipopolisacáridos	42
5.2. Bombas de eflujo y expulsión de disolventes	42
5.2.1. Bombas de eflujo de la familia RND en <i>Escherichia coli</i>	45
5.2.1.1. La bomba AcrAB-TolC como modelo de bomba de eflujo de la familia RND	45
5.2.1.2. Bomba AcrEF-TolC	46
5.2.2. Bombas RND de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	48
5.2.3. Regulación de las bombas de eflujo de la familia RND de <i>E. coli</i> y <i>P. aeruginosa</i>	49
5.3. Bombas de eflujo en cepas de <i>Pseudomonas putida</i> tolerantes a compuestos altamente tóxicos	55
5.4. Regulación de la expresión de las bombas de eflujo en <i>Pseudomonas putida</i>	58
5.5. Funciones inesperadas relacionadas con la tolerancia a disolventes orgánicos	59
5.5.1. Papel de las proteínas de transporte de flagelos en la tolerancia a disolventes orgánicos	60
5.5.2. ¿Transfiere energía el sistema TonB a las bombas de eflujo RND?	61
5.5.3. Vesículas membranosas como un mecanismo activo de eliminación de disolventes	62
6. UTILIZACIÓN DE MICROORGANISMOS TOLERANTES A DISOLVENTES ORGÁNICOS COMO FACTORÍAS CELULARES	63
6.1. Biotecnología	63
6.2. Sistemas de producción de dos fases	64
OBJETIVOS	67
MATERIALES Y MÉTODOS	71
1. CEPAS BACTERIANAS	73
2. CONDICIONES Y MEDIOS DE CULTIVO	74

2.1. Medios ricos	75
2.2. Medio mínimos	75
2.3. Condiciones de cultivo	76
2.4. Antibióticos	76
2.5. Sales metálicas	76
2.6. Conservación de cepas bacterianas	76
3. PLÁSMIDOS	76
4. AISLAMIENTO DE ADN TOTAL	84
5. AISLAMIENTO DE ADN PLASMÍDICO	85
6. PREPARACIÓN DE CÉLULAS COMPETENTES	85
7. TRANSFERENCIA DE PLÁSMIDOS	85
7.1. Por conjugación	85
7.2. Por transformación mediante choque térmico	86
7.3. Por electroporación	86
8. MANIPULACIÓN DE ADN Y ARN	87
8.1. Determinación de la concentración de ADN y ARN	87
8.2. Restricción de ADN	87
8.3. Electroforesis de ADN y ARN en geles de agarosa	88
8.4. Recuperación de fragmentos de ADN de agarosa	89
8.5. Ligación de ADN	89
8.6. Reacción de amplificación en cadena con ADN polimerasa termorresistente (PCR)	89
8.7. Secuenciación de ADN	91
8.8. Aislamiento y purificación de ARN	92
8.9. RT-PCR (Reacción de amplificación en cadena con ADN polimerasa termorresistente acoplada a una reacción de transcripción reversa)	93
9. EXTENSIÓN A PARTIR DE CEBADOR	93
9.1. Marcaje de cebadores	93
9.2. Reacción de extensión	93
9.3. Separación de las cadenas extendidas de ADNc lineal mediante electroforesis	94
10. TRANSFERENCIA DE ADN A MEMBRANA POR EL MÉTODO	

“SOUTHERN BLOT E HIBRIDACIÓN”	95
10.1. Transferencia de ADN por capilaridad	95
10.2. Marcaje no radiactivo de ADN lineal	96
10.3. Prehibridación e hibridación	97
10.4. Sondas utilizadas en las hibridaciones ADN-ADN	97
10.5. Detección inmunológica	98
11. MEDIDA DE LA ACTIVIDAD β -GALACTOSIDASA	98
12. CONSTRUCCIÓN DE MUTANTES POR INTERCAMBIO ALÉLICO	100
13. ENSAYOS DE RESISTENCIA/SENSIBILIDAD	100
13.1. Ensayos de tolerancia a tolueno	100
13.2. Ensayos de resistencia/sensibilidad a antibióticos	101
14. PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS	102
14.1. Preparación de lisado celular	102
14.2. Separación de proteínas por electroforesis desnaturizante en gel de poliacrilamida en presencia de SDS (EGPA-SDS)	102
14.3. Tinción de proteínas con azul de Coomassie	103
15. ANÁLISIS INFORMÁTICO DE SECUENCIAS	103
16. ESTUDIO DE INTERACCIONES ADN-PROTEÍNA: retardos en gel	105
16.1. Sobreexpresión y purificación de (His) ₆ -TtgV	105
16.2. Ensayos de retardo en gel o de cambio de movilidad electroforética	106
17. BIOFILMS	107
17.1. Marcaje de las cepas	107
17.2. Condiciones de cultivo	107
17.3. Captación de imágenes	108
17.4. Determinación de la viabilidad en los ensayos de resistencia a tetraciclina	109
18. FERMENTADORES	109
18.1. Condiciones de cultivo	109
18.2. Fermentación de <i>m</i> -xileno en fase acuosa	110
18.3. Fermentación de <i>m</i> -xileno en un sistema de doble fase octanol:agua y decanol:agua	110
18.4. Métodos analíticos aplicados al sobrenadante	111
18.5. Análisis de lípidos de membrana	112

RESULTADOS	115
Capítulo I: CARACTERIZACIÓN DE LA BOMBA DE EXPULSIÓN DE DISOLVENTES <i>ttgGHI</i> EN <i>Pseudomonas putida</i> DOT-T1E	117
RESUMEN	117
I.1. Identificación y clonaje de una tercera bomba en <i>Pseudomonas putida</i> DOT-T1E con una alta similitud con la bomba SrpABC de <i>P. putida</i> S12	118
I.2. Secuenciación de los genes que codifican la bomba TtgGHI	119
I.3. Análisis comparativo con otras secuencias	125
I.4. Organización de los genes <i>ttgGHI</i>	133
I.5. Inactivación del gen <i>ttgH</i>	134
I.6. Identificación de un fenotipo asociado a la mutación en <i>ttgH</i>	138
I.7. Estudio de la expresión del operón <i>ttgGHI</i> y determinación del punto de iniciación de la transcripción	139
I.8. Construcción de un triple mutante en las bombas de expulsión de tolueno	141
DISCUSIÓN	143
Capítulo II: ANÁLISIS GENÓMICO COMPARATIVO DE LAS BOMBAS DE TRANSPORTE DE DISOLVENTES EN DISTINTAS CEPAS DE <i>Pseudomonas</i>, CON DISTINTOS GRADOS DE TOLERANCIA A DISOLVENTES	153
RESUMEN	153
II.1. Estudio de la tolerancia a disolventes orgánicos en distintas cepas del género de <i>Pseudomonas</i>	154
II.2. Análisis genómico comparativo de las bombas de expulsión de disolventes en distintas cepas de <i>Pseudomonas</i>	156
DISCUSIÓN	161
Capítulo III: IDENTIFICACIÓN DEL PERFIL DE SUBSTRATO DE LAS BOMBAS TtgABC, TtgDEF y TtgGHI, BASADO EN EL ESTUDIO DE LA TOLERANCIA A DISTINTOS COMPUESTOS TÓXICOS	165
RESUMEN	165
III.1. Construcción de los mutantes dobles TtgABC ⁻ TtgGHI ⁻ y TtgDEF ⁻ TtgGHI ⁻	166

III.2. Contribución de las bombas de eflujo a la eliminación de otros disolventes	167
III.3. Contribución de las bombas de transporte de disolventes a la expulsión de antibióticos	171
III.4. Expresión del operón <i>ttgGHI</i> ante diferentes compuestos	173
III.5. Papel de las bombas Ttg en la resistencia a antibióticos en biofilms	174
DISCUSIÓN	182
Capítulo IV: REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LA BOMBA TtgGHI	189
RESUMEN	189
IV.1. Identificación de un operón corriente arriba de los genes <i>ttgGHI</i> que se transcribe divergentemente con respecto a los genes de la bomba de eflujo	190
IV.2. Organización de los genes <i>ttgV</i> y <i>ttgW</i>	196
IV.3. Análisis transcripcional del operón <i>ttgVW</i>	197
IV.4. Análisis de la inducción del operón <i>ttgVW</i>	199
IV.5. Inactivación de los genes <i>ttgV</i> y <i>ttgW</i>	200
IV.6. Efecto de las mutaciones en <i>ttgV</i> y <i>ttgW</i> sobre la expresión de los operones <i>ttgGHI</i> y <i>ttgVW</i>	207
IV.7. Fenotipo de los mutantes en los reguladores TtgV y TtgW	209
IV.8. Purificación de (His) ₆ -TtgV	210
IV.9. Estudio <i>in vitro</i> de las interacciones entre las zonas promotoras de <i>ttgGHI</i> y <i>ttgVW</i> con la proteína TtgV	211
IV.10. Búsqueda de secuencias de inserción que puedan estar implicadas en la regulación de la bomba <i>ttgGHI</i>	212
DICUSIÓN	214
Capítulo V: UTILIZACIÓN DE LA CEPA TOLERANTE A DISOLVENTES ORGÁNICOS <i>Pseudomonas putida</i> DOT-T1E EN BIOTRANSFORMACIONES EN SISTEMAS DE DOBLE FASE	221
RESUMEN	221
V.1. Tolerancia de <i>Pseudomonas putida</i> DOT-T1E a alcoholes alifáticos de cadena de longitud media	222

V.2. Transporte de los alcoholes alifáticos por las bombas TtgABC, TtgDEF y TtgGHI de <i>P. putida</i> DOT-T1E	224
V.3. Las bombas de eflujo Ttg se inducen en presencia de alcoholes alifáticos	226
V.4. Cambios en la composición de los ácidos grasos de las membranas	226
V.5. Crecimiento de <i>P. putida</i> DOT-T1E en presencia de octanol, nonanol y decanol	227
V.6. Producción de 3-metilcatecol por la cepa <i>P. putida</i> DOT-T1E Δ todC1C2:: <i>kilAB</i> (pWW0:: <i>xylE</i> ::Km) en fase acuosa	229
V.7. Producción de 3-metilcatecol en un sistema de dos fases (fase acuosa:alcohol alifático) con <i>P. putida</i> DOT-T1E Δ todC1C2:: <i>kilAB</i> (pWW0:: <i>xylE</i> ::Km) como biocatalizador	232
DISCUSIÓN	235
DISCUSIÓN GENERAL	241
CONCLUSIONES	247
BIBLIOGRAFÍA	251
<i>APÉNDICE</i> -Alineamientos de secuencias	279
A.1. TtgGHI y proteínas homólogas	281
A.2. TtgVW y proteínas homólogas	287

ABREVIATURAS

ADNasa	desoxinucleasa	LPS	lipopolisacárido
cADN	ADN complementario	mg	miligramo
AMV	virus de la mieloblastosis de ave	MIC	concentración mínima inhibitoria
Ap	ampicilina	min	minuto
APS	persulfato amónico	mL	mililitro
ARNasa	ribonucleasa	mm	milímetro
ATP	adenosín trifosfato	µg	microgramo
BCIP	5-bromo-4-cloro-3-indolilfosfato	µL	microlitro
Cb	carbenicilina	Nal	ácido nalidíxico
Cm	cloramfenicol	p/vol	relación peso/volumen
CTAB	bromuro de cetiltrimetilamonio	pb	par (es) de bases
DEPC	dietilpirocarbonato	PCR	reacción en cadena de la polimerasa
DMSO	dimetilsulfóxido	Pip	piperacilina
dNTPs	desoxinucleótidos	Rif	rifampicina
DO₆₆₀	turbidez medida a $\lambda = 660$ nm	RT-PCR	reacción en cadena de la polimerasa acoplada a una reacción de transcripción reversa
DTT	ditiotreitól	SDS	dodecil sulfato sódico
EDTA	ácido etilendiaminotetraacético	Sm	estreptomina
Gm	gentamicina	Tc	tetraciclina
H₂O_d	agua destilada	TEMED	N,N,N,N,-tetrametiletildiamina
IPTG	isopropil- β -D-galactopiranosido	U	unidades enzimáticas
Kpb	kilo par de bases	CFU	unidades formadoras de colonias
kDa	kilodalton	vol/vol	relación volumen/volumen
Km	kanamicina	X-gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D- galactopiranosido
MATAB	bromuro de alquiltrimetilamonio		
LB	Luria-Bertani		

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ruta de degradación de nitrobenceno en <i>Pseudomonas alcaligenes</i> JS45	18
Figura 2. Formación de derivados hidroxilados	19
Figura 3. Fisiones <i>orto</i> y <i>meta</i> del catecol	20
Figura 4. Esquema de la ruta <i>orto</i> para la degradación de catecol	22
Figura 5. Esquema de la ruta <i>meta</i> para la degradación de catecol	23
Figura 6. Esquema de las rutas de degradación aerobia de tolueno en bacterias	24
Figura 7. Degradación de tolueno y derivados por el plásmido TOL pWW0 de <i>Pseudomonas putida</i> mt-2	26
Figura 8. Red de regulación del plásmido TOL	28
Figura 9. Flujo de electrones en el sistema TOD	29
Figura 10. Degradación de tolueno a través de la ruta codificada por el operón TOD	30
Figura 11. Organización genética del operón TOD y sus genes reguladores de <i>P. putida</i> F1	31
Figura 12. Esquema de la organización de las bombas Mex y de sus reguladores	53
Figura 13. Árboles filogenéticos en los que se muestra la relación entre los sistemas de bombas de distintas especies	57
Figura 14. Organización de los operones <i>ttgABC</i> y <i>ttgDEF</i>	58
<hr/>	
Figura M.1. Interposón Ω -Km del plásmido pHP45 Ω Km	78
Figura M.2. Esquema del plásmido pMP220	79
Figura M.3. Esquema del plásmido pUC18	80
Figura M.4. Mapa del vector de expresión de proteínas pET-28a(+)	81
Figura M.5. Esquema del plásmido pSBaphA	82
Figura M.6. Esquema del dispositivo experimental utilizado para la incubación de biofilms	108
Figura M.7. Dispositivo experimental utilizado para las biotransformaciones	111
<hr/>	
Figura I.1. Secuencia de los genes <i>ttgGHI</i> de <i>P. putida</i> DOT-T1E y su traducción en aminoácidos	124
Figura I.2. Estructura primaria del péptido señal hipotético en el extremo amino terminal de TtgG de <i>P. putida</i> DOT-T1E	126
Figura I.3. Esquema del alineamiento de TtgG con otras proteínas similares	127
Figura I.4. Esquema del alineamiento de TtgH con otras proteínas similares	129
Figura I.5. Modelo de la topología de TtgH, basado en el modelo de proteínas RND	130
Figura I.6. Extremo amino terminal de TtgI y proteínas homólogas	132
Figura I.7. Esquema del alineamiento de TtgI con otras proteínas similares	133
Figura I.8. Análisis mediante RT-PCR de la organización transcripcional de los genes <i>ttgGHI</i> en <i>P. putida</i> DOT-T1E	134

Figura I.9. Estrategia seguida para la construcción del mutante <i>P. putida</i> DOT-T1E-PS28 y comprobación mediante hibridación de ADN de la interrupción del gen <i>ttgH</i>	137
Figura I.10. Ensayos de supervivencia al choque con tolueno (cinéticas de muerte) de la cepa silvestre <i>P. putida</i> DOT-T1E y el mutante PS28	138
Figura I.11. Patrón de expresión del operón <i>ttgGHI</i> en la cepa silvestre bajo diferentes condiciones de cultivo	140
Figura I.12. Supervivencia al choque con 0,3% de la cepa <i>P. putida</i> DOT-T1E-82 (<i>ttgB::phoA-Km; ttgD::kilAB</i>)	142
Figura I.13. Modelización de la estructura de TtgH sobre la estructura conocida de AcrB	145
Figura I.14. Esquema de la localización y organización de la bomba TtgGHI	147
Figura II.1. Hibridaciones <i>southern</i> del ADN cromosómico de diferentes cepas de <i>Pseudomonas</i> sp. frente a una sonda del gen <i>ttgB</i> y <i>ttgE</i> de <i>P. putida</i> DOT-T1E	157
Figura III.1. Análisis mediante hibridación de la región de ADN donde se encuentra el gen <i>ttgH</i>	166
Figura III.2. Estructura de los disolventes probados como posibles sustratos de las bombas RND de <i>P. putida</i> DOT-T1E	168
Figura III.3. Estructura de los antibióticos probados como posibles sustratos de las bombas RND de <i>P. putida</i> DOT-T1E	172
Figura III.4. Papel de las bombas Ttg en la resistencia a antibióticos en biofilms	174
Figura III.5. Control de viabilidad de células en biofilms de 2 días de antigüedad	176
Figura III.6. Viabilidad de los biofilms tras añadir al medio de cultivo distintas concentraciones de tetraciclina	178
Figura III.7. Imágenes obtenidas mediante microscopía confocal de los biofilms formados por <i>P. putida</i> DOT-T1E, <i>P. putida</i> DOT-T1E-18 y <i>P. putida</i> DOT-T1E-PS34	179
Figura III.8. Imágenes ampliadas de los biofilms 6 días después de su inoculación	179
Figura III.9. Análisis mediante COMSTAT de la estructura de los biofilms	181
Figura III.10. Estructura de 3-oxo-C12 HSL	187
Figura IV. 1. Localización y secuencia de los genes <i>ttgV</i> y <i>ttgW</i> de <i>P. putida</i> DOT-T1E	192
Figura IV.2. Dominios conservados de la familia IclR en TtgV	193
Figura IV.3. Dominios conservados de la familia TetR en TtgW	194
Figura IV.4. Alineamiento de la secuencia de aminoácidos de TtgW y SrpR	195
Figura IV.5. Organización física del agrupamiento génico <i>ttgGHI-ttgVW</i> y le evidencia de que <i>ttgV</i> y <i>ttgW</i> forman un operón	197
Figura IV. 6. Punto de inicio de la transcripción del gen <i>ttgV</i> de <i>P. putida</i> DOT-T1E cultivada con y sin tolueno	198
Figura IV.7. Expresión del operón <i>ttgVW</i> con distintos efectores	199
Figura IV.8. Estrategia seguida para la construcción del mutante <i>P. putida</i> DOT-T1E-PS52 y comprobación mediante hibridación de ADN de la interrupción del gen <i>ttgW</i>	202

Figura IV.9. Estrategia seguida para la construcción del mutante <i>P. putida</i> DOT-T1E-PS61 y comprobación mediante hibridación de ADN de la interrupción del gen <i>ttgV</i>	204
Figura IV.10. Estrategia seguida para la construcción del mutante no polar <i>P. putida</i> DOT-T1E-PS62 y comprobación mediante hibridación de ADN de la interrupción del gen <i>ttgV</i>	206
Figura IV.11. Supervivencia al choque con 0,3% (vol/vol) de tolueno	210
Figura IV.12. Sobreexpresión y purificación de His ₆ -TtgV	211
Figura IV.13. Interacción de His ₆ -TtgV con la región intergénica <i>ttgV-ttgG</i>	212
Figura IV.14. Posible sitio de unión de TtgV en la región intergénica <i>ttgV-ttgG</i>	217
Figura V.1. Crecimiento de <i>P. putida</i> DOT-T1E en medio mínimo M9 (glucosa 0,5% [p/vol]) y medio mínimo con glucosa (glucosa 0,5% [p/vol]) y 1mM de octanol, en presencia de octanol	228
Figura V.2. Ruta de degradación de tolueno del plásmido TOL, mutada en <i>xylE</i> para la acumulación de catecoles	230
Figura V.3. Viabilidad y producción de 3-metilcatecol en la fermentación de <i>m</i> -xileno en fase acuosa por <i>P. putida</i> DOT-T1E Δ <i>todC1C2</i> (pWW0:: <i>xylE</i> ::Km)	231
Figura V.4. Viabilidad y producción de 3-metilcatecol en un sistema de doble fase	234
Figura V.5. Biorreactor de <i>P. putida</i> DOT-T1E Δ <i>todC1C2</i> (pWW0:: <i>xylE</i> ::Km) con decanol como segunda fase a las 28 horas	234

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Cepas de <i>Pseudomonas putida</i> tolerantes a disolventes orgánicos y sus características	34
Tabla 2. Ácidos grasos presentes en la membrana de <i>P. putida</i> DOT-T1E	37
Tabla 3. Porcentaje de los grupos de cabeza de los fosfolípidos de membrana de <i>P. putida</i> DOT-T1E	41
Tabla 4. Bombas de expulsión de disolventes de la familia RND en bacterias gram-negativas	44
Tabla 5. Substratos de las bombas de eflujo RND de <i>E. coli</i> , <i>P. aeruginosa</i> y <i>P. putida</i>	47
Tabla 6. Reguladores transcripcionales que controlan la expresión de las bombas de eflujo RND	54
Tabla M.1. Cepas bacterianas utilizadas en este trabajo	73
Tabla M.2. Plásmidos utilizados en este trabajo	77
Tabla M.3. Plásmidos que se han construido en este trabajo	83
Tabla M.4. Oligonucleótidos utilizados para secuenciación	91
Tabla M.5. Direcciones de internet de algunos de los programas informáticos utilizados	104
Tabla I.1. Homólogos de TtgG en distintas especies bacterianas	127
Tabla I.2. Homólogos de TtgH en distintas especies bacterianas	129
Tabla I.3. Conservación de los residuos de unión a sustrato entre las bombas de la familia RND	131
Tabla I.4. Homología de TtgI con proteínas de distintas especies bacterianas	133
Tabla II.1. Grado de supervivencia de las diferentes cepas de <i>Pseudomonas</i> ante choques de tolueno	156
Tabla II.2. Amplificación de genes homólogos de las bombas en diferentes cepas de <i>P. putida</i>	159
Tabla II.3. Identidad entre los genes <i>ttgB</i> , <i>ttgE</i> y <i>ttgH</i> de <i>P. putida</i> DOT-T1E y los genes correspondientes en otras cepas de <i>P. putida</i>	159
Tabla III.1. Colección de mutantes en las bombas de <i>P. putida</i> DOT-T1E	167
Tabla III.2. Supervivencia de <i>P. putida</i> DOT-T1E y sus mutantes derivados a los choques con disolventes	169
Tabla III.3. MICs para <i>P. putida</i> DOT-T1E y sus mutantes	172
Tabla III.4. Conservación de los residuos de unión a sustrato entre las bombas de la familia RND	184
Tabla IV.1. Proteínas con las que TtgV comparte identidad en otras especies y cepas bacterianas	193

Tabla IV.2. Proteínas con las que TtgW comparte identidad en otras especies y cepas bacterianas	195
Tabla IV.3. Mutantes de <i>P. putida</i> DOT-T1E en los genes reguladores <i>ttgV</i> y <i>ttgW</i>	207
Tabla IV.4. Transcripción desde los promotores de los operones <i>ttgVW</i> y <i>ttgGHI</i>	208
Tabla V.1. Características de los alcoholes alifáticos utilizados en los ensayos y que son susceptibles de ser utilizados como segunda fase en los procesos de biotransformación	222
Tabla V.2. Supervivencia de <i>P. putida</i> DOT-T1E tras el choque con disolventes orgánicos	223
Tabla V.3. Supervivencia a los 10 minutos de <i>P. putida</i> DOT-T1E y de los mutantes en las bombas de eflujo ante la adición de 0,3% (vol/vol) de 1-octanol, 1-nonanol y 1-decanol	225
Tabla V.4. Expresión de las bombas de eflujo <i>ttg</i> en respuesta a alcoholes alifáticos	226
Tabla V.5. Composición en ácidos grasos de la membrana de <i>P. putida</i> DOT-T1E en presencia de alcoholes alifáticos	227

SUMMARY

Pseudomonas putida DOT-T1E is a highly solvent tolerant strain isolated from a water treatment plant in Granada (Ramos et al., 1995). The mechanisms involved in solvent tolerance in this strain are being extensively studied in Dr. Ramos' laboratory. This strain achieves its high tolerance by means of two main mechanisms: *cis/trans* isomerization of membrane unsaturated fatty acids (Ramos et al., 1997) and active removal of solvents by proton-motiv-force-driven efflux pumps (Ramos et al., 1998; Mosqueda and Ramos, 2000).

The interest of the study on solvent tolerant bacteria lies in its potential utility in bioremediation of highly contaminated sites and in biocatalytic processes in which substrates and/or products are toxic and non-water soluble.

In this Ph.D. Thesis we have focused on the identification and characterization of a new efflux pump involved in toluene and other organic solvents tolerance in *P. putida* DOT-T1E, and on the utilization of the tolerance capabilities of the strain in the production of highly added value compounds. The results of this Ph.D. Thesis are organized into five chapters which will be summarized in the following sections. Most of these results are already published, so we will emphasize those results or important comments for the discussion that are not included in the publications.

Chapter I

In *Pseudomonas putida* DOT-T1E multidrug efflux pumps of the resistance-nodulation-division family make a major contribution to solvent resistance. Two efflux pumps had been identified previously in our laboratory: TtgABC, expressed constitutively (Ramos et al., 1998), and TtgDEF, induced by aromatic hydrocarbons (Mosqueda and Ramos, 2000). A double mutant lacking both efflux pumps was able to survive a sudden toluene shock if and only if preinduced with small amounts of toluene supplied via de gas phase. In this chapter we report the identification and characterization in this strain of a third efflux pump, named TtgGHI. The DNA sequence of this new efflux pump is included in chapter I (Figure I.1). We described the genes and the putative ORFs comparing them with other proteins of the same family (sequence alignments are shown in *Apéndice A.1* and homologous proteins in

other organisms are collected in Table I.1, I.2 and I.4 in chapter I. TtgG is a membrane fusion protein that shares high identity with TtgA and TtgD of *P. putida* DOT-T1E, with MexA of *P. aeruginosa* and AcrA of *E. coli*. Comparing AcrA and TtgG sequences we can predict a probably signal peptide of 32 aminoacids, being Gly32 the most probable cleavage site. TtgG topology analysis predict the existence of a transmembrane helix (between Ile22 and Pro44), whereas the rest of the protein would span the periplasmic space. TtgH shares identity with members of the RND family of efflux pumps, with TtgB and TtgE of *P. putida* DOT-T1E, MexB of *P. aeruginosa* and AcrB of *E. coli*, among others. These proteins contain 12 transmembrane α -helices (TMS) and 2 large domains projecting into the periplasm. By computer analysis we have found this topology also in TtgH (Figure I.5). AcrB of *E. coli* has been crystallized by Murakami et al., (2002) and Yu et al.(2003 [a]). AcrB crystal is a trimer with a big central cavity of 5000 Å³. It has been shown that the main interactions between substrates and the central cavity are hydrophobic and that different substrates bind different residues in the active sites of the protein. The system is also very flexible due to the probable participation of bilayer lipids. By this model Yu et al. (2003 [a, b]) explain the wide range of substrates of AcrB. Residues at the binding site of AcrB are well conserved among several homologs of this protein. Only 1 out 8 of the conserved residues changes in TtgH with respect to AcrB (Leu in TtgH instead of Phe388 in AcrB; Table I.3 of chapter I). Regarding the third component of the TtgGHI efflux pump, TtgI belongs to the OMP family of proteins (outer membrane protein), and shares identity with TtgC and TtgF of *P. putida* DOT-T1E, as well as with OprM and OprK of *P. aeruginosa*. TolC of *E. coli* is the only member of the OMP family that has been crystallized (Koronakis et al., 2000) and it has been shown that the essential residues for structure are conserved among the family members. However, identity of TtgI with TolC of *E. coli* is rather low (only 19%). OprM, unlike TolC is a lipoprotein (Nakajima et al., 2000), and we have found high identity between the N-terminal sequence of OprM and TtgI, where Cys17 could be the acylation site of TtgI (Figure I.6).

The *ttgGHI* genes form an operon that is expressed constitutively. In the presence of toluene the operon is expressed at an even higher level from two promoters. By site-directed mutagenesis we constructed a single *ttgH* mutant which was shown to be unable to survive sudden 0,3% (vol/vol) toluene shocks regardless of the preculture

conditions. The double mutant *P. putida* DOT-T1E-82 (*ttgB*⁻/*ttgD*⁻) constructed by Ramos and Mosqueda (2000) was used as the parental strain to construct a triple mutant (*ttgB*⁻/*ttgD*⁻/*ttgH*⁻). The triple mutant was hypersensitive to toluene, as shown by its inability to grow with toluene supplied via the vapor phase, conditions in which other strains considered as “sensitive” are able to survive (i.e. *Escherichia coli*).

In the discussion of this chapter we point out the similarities in structure of the TtgGHI components with those described in other organisms and show the docking of the inner membrane component of the pump, TtgH, with the crystal structure of AcrB described by Murakami et al., (2000) (Figure I.13). We compare the operon organization of the Ttg pumps with the organization of the Mex systems of *P. aeruginosa* and the AcrAB-TolC and AcrEF-TolC pumps of *E. coli*. Both in *P. putida* and *P. aeruginosa* the three components of the efflux pumps are together in the same operon, whereas in *E. coli*, TolC is located in a different region in the chromosome, probably because of the participation of TolC in many other cellular functions (Wandersman, 1992; Nikaido, 1996). However, it seems that the other two components of the efflux pumps, both in the Mex and Acr pumps, interact permanently with each other (Poole and Srikumar, 2001; Zgurskaya and Nikaido, 2000), but the outer membrane protein is recruited only transiently (Thanabalu et al., 1998). We think that these features are shared by the Ttg pumps of *P. putida* DOT-T1E, based on sequence and structure similarities.

Most of the information contained in this chapter is described in references 1 and 2 (see above).

Chapter II

Organic solvents are inherently toxic for microorganisms. Their effects depend not only on the nature of the compound, but also on the intrinsic tolerance of the bacterial species and strains. The three efflux pumps belonging to the RND family of efflux pumps are the main factor involved in the high tolerance to toluene of *Pseudomonas putida* DOT-T1E. We have analyzed the tolerance to toluene shocks (0,1% and 0,3% [vol/vol]) of a number of strains belonging to different species of the genus *Pseudomonas* upon growth in the absence and in the presence of sublethal concentrations of toluene. The strains can be grouped in three categories: 1) highly-

resistant strains, in which almost 100% of the cells precultured in the presence of sublethal concentrations of toluene withstood a 0.3% (vol/vol) toluene shock; 2) moderately-resistant strains, in which only a fraction (10^{-4} -1) of the cells withstood a 0.1% (vol/vol) toluene shock, but fewer than 1 in 10^7 cells survived a sudden 0.3% (vol/vol) toluene shock regardless of the growth conditions; and 3) sensitive strains, in which regardless of the growth conditions, fewer than 10^{-5} cells survived a 0.1% (vol/vol) toluene shock. We also studied the number and type of efflux pumps in different strains in comparison with the *P. putida* DOT-T1E strain. Our results show that only the strains belonging to the species *putida* have efflux pumps very similar to the ones of *P. putida* DOT-T1E. We found positive correlation between the number and kind of efflux pumps and solvent tolerance in these strains.

The results of this chapter regarding the TtgGHI pump (it is present in all the highly resistant *Pseudomonas putida* strains), together with the results of mutant *P. putida* DOT-T1E –PS28 (*ttgH*) described in the former chapter, allow us to conclude that the TtgGHI pump is one of the main determinants of tolerance in *Pseudomonas putida*.

Chapter III

Previous work in our laboratory had shown that the TtgABC efflux pump was important for the antibiotic resistance, but this efflux pump was also able to expel toluene (Ramos et al., 1998). It was shown that TtgDEF was induced by toluene and styrene, but not by antibiotics (Mosqueda and Ramos, 2000), being involved in the inducible tolerance toward toluene. The TtgGHI efflux pump is essential for the tolerance toward toluene, as has been demonstrated in chapter I, but its implication in the tolerance toward other organic solvents and antibiotics was unexplored. To go deeply into the role of each efflux pump, both in antibiotics and organic solvents tolerance, a collection of double mutants was used. We have constructed the double mutants in pumps TtgABC/TtgGHI and TtgDEF/TtgGHI, which together with the three single mutants (Ramos et al., 1998; Mosqueda and Ramos, 2000; Rojas et al., 2001), the double mutant *P. putida* DOT-T1E 82 (Mosqueda y Ramos, 2000), and the triple mutant (Chapter I, Rojas et al., 2001), allowed us to ascertain the substrate profile of each pump: TtgABC and TtgGHI expel toluene, styrene, *m*-xylene,

ethylbenzene, propylbenzene, and antibiotics (ampicillin, chloramphenicol, tetracycline and nalidixic acid); whereas TtgDEF only expels toluene and styrene.

We constructed a transcriptional fusion of *ttgGHI* promoter region to the promoterless *'lacZ* in vector pMP220 (Spaink et al., 1987) and measure the expression the pump in different medium conditions. We found that the expression of P_{ttgGHI} increased between 2 and 3 fold with sublethal concentrations of toluene, benzene, styrene, *p*-xylene, ethylbenzene and propylbenzene in the medium; but expression was similar to the basal level with the antibiotics tested (chloramphenicol and ampicillin) (Figure III.4).

As biofilms are the predominant way of life of microorganisms in nature, and they are thought to become recalcitrant to antimicrobials, we decided to study the resistance to antibiotics of *P. putida* DOT-T1E growing in a biofilm. To this end, we contacted with Prof. S. Molin of DTU (Denmark) to perform in his laboratory the biofilms assays. First of all, the strains were tagged with the green fluorescent protein (GFP) by using Tn5 transposons derivatives containing GFP gene. Phenotype regarding growth rate, and antibiotics and solvents tolerance was checked to be sure that non important functions were affected by the insertion of GFP. Antibiotic resistance assays in biofilms were performed with *P. putida* DOT-T1E and the mutant in the principal antibiotic efflux pump, *P. putida* DOT-T1E-18 (*ttgABC*). Biofilms were grown in flow cells supplied with FAB minimal medium, as described by Christensen et al., (1999); citrate 0,1 mM was used as the carbon source. All microscopic observations and image acquisition were performed by confocal scanning microscopy (CSLM). Cell viability in biofilms was assayed with LIVE/DEAD *BacLight* staining kit, that stains non viable cells in red. As it is shown in pictures in Figure III.5, the biofilms of the two strains growing during two days without antibiotics are mostly green (the pictures on the left collect both green and red signal; the pictures on the right collect only red light). Then we shifted the medium to the same FAB medium but with different concentrations of tetracycline (Tc). After 1 day growing with 15 or 50 $\mu\text{g/mL}$ of Tc, cell viability was still very high (Figure III.6) for both strains. Note that the minimum inhibitory concentrations of Tc in planktonic cells was 4 $\mu\text{g/mL}$ for the wild type and 0.25 $\mu\text{g/mL}$ for the *ttgABC* mutant. By this assays we concluded that the efflux pumps are not responsible for the high antibiotic resistance of *P. putida* DOT-T1E in biofilms. Our

results coincide with the ones presented by De Kievit et al.(2001) who found that the four (until that moment) characterized efflux pumps do not play a role in the antibiotic-resistant phenotype of *P. aeruginosa* biofilms. We found one intriguing feature in biofilms structure: the wild type and the mutants in TtgDEF and TtgGHI efflux pumps developed biofilms with the same structure (with microcolonies and wide empty canals in between), whereas the TtgABC and the triple mutant developed a much flatter and undifferentiated biofilm (we show in Figure III.7 and Figure III.8 the biofilms of the wild type, the TtgABC and the triple mutant). We followed the development of these biofilms during 8 days and quantified the structure characteristics by the COMSTAT program (Heydorn et al., 2000). By this quantitative analysis we found that the surface to volume ratio was higher in the wild type biofilm than in the single and triple mutant biofilms (the surface to volume ratio reflects what fraction of the biofilm is exposed to the nutrient flow, and thus may indicate how the biofilm adapts to the environment). These data are shown in Figure III.9: mean thickness (it provides a measure of the spatial size of the biofilm) is in the upper left corner; roughness (it is a measure of how much the thickness of the biofilm varies, and it is an indicator of biofilm heterogeneity) is in the right upper corner; surface to volume ratio is in the left bottom corner; and substratum coverage (it provides information about the organization of the biofilm) is in the right bottom corner. Although it is not an objective of this Ph. D. Thesis to go further into this question, we suspect that the differences found in biofilms structure are due to the lack of certain signalling molecule transported by the TtgABC pump. Davies et al. (1998) demonstrated the implication of quorum sensing molecules in the development of *P. aeruginosa* biofilms, and several efflux pumps with high identity with TtgABC have been involved in the export of these kind of molecules (Evans et al., 1998; Pearson et al., 1999).

In the discussion of this chapter we speculate about the natural role of efflux pumps: whether their main function is to confer resistance toward antibiotics and solvents, or whether this capacity is only an opportunistic exploitation of the transport systems evolved for other physiological functions, facilitated by the flexibility of the substrate binding site of the RND transporters. Our results about antibiotic resistance and structure of biofilms agree with the latest possibility.

Some of the results of this chapter are reported in reference 1 and 2.

Chapter IV

Adjacent to the *ttgGHI* operon is the divergently transcribed *ttgVW* operon. The sequence of this operon is shown in Figure (V.1). By sequence analysis we found that TtgV shares similarity with transcriptional regulators belonging to the IclR family (Sunnarborg et al., 1990). The alignment of TtgV with proteins of this family is shown in *Apéndice 2*, and the identity percentage with some of these proteins is in Table V.1. We identified a probable helix-turn-helix (HTH) motif for DNA binding in the N-terminal region highly homologous with the IclR HTH motif (Figure IV.2). TtgW shares similarity with proteins of the TetR family of transcriptional regulators (Baumeister et al., 1991; Hillen and Berens, 1994) (Table IV.2). The probable HTH motif of TtgW is highly homologous to the HTH motif described for TetR and AcrR. However, TtgW seems to be a truncated member of the family (see the length of other homologous proteins in Table IV.2 and Figure IV.4).

In TtgV-deficient backgrounds, although not in a TtgW-deficient background, expression of the *ttgGHI* and *ttgVW* operons increased fourfold. This suggests that TtgV represses expression from the *ttgG* promoters and controls its own. TtgW plays no major role in the regulation of expression of these promoters. Primer extension revealed that the divergent *ttgG* y *ttgV* promoters overlap, and probably this is the reason why the expression profile of *ttgVW* and *ttgGHI* coincide in the fact that both operons are induced by sublethal concentrations of organic solvents, but not by the antibiotic tested (Figure IV.7).

To go further in the study of the regulation of the expression of *ttgGHI* and *ttgVW* operons we decided to purify TtgV. We cloned *ttgV* in a pET expression vector and overexpressed the protein with a (His)₆-tag. The protein overexpression and purification by nickel affinity chromatography is explained in this chapter (Figure IV.12). With (His)₆-TtgV purified we performed mobility shift assays that indicated that TtgV binds specifically to this region.

We also searched for insertion sequences that could be involved in the regulation of *ttgGHI*, as it has been reported for the highly homologous efflux pump *srpABC* of *P. putida* S12 (Wery et al., 2001). There are 7 copies of the insertion sequence *ISS12* in the chromosome of *P. putida* S12 under normal culture conditions. However, the toluene resistant cells that survived the 1% (vol/vol) shock carried 8 copies. The extra copy was inserted in the *srpS* gene (SrpS shares 96% identity with TtgV). We

did not find an insertion sequence similar to *ISS12* in the chromosome of *P. putida* DOT-T1E, and did not observe the interruption of the *ttgV* gene in cells growing in the presence of toluene, despite the high overall sequence similarity of these systems in both strains S12 and DOT-T1E.

In the discussion of this chapter we speculate with a model for the regulation of the TtgGHI efflux pump in which the binding of TtgV to the intergenic region blocks the entry of the RNA polymerase in the absence of the effector (toluene), and when toluene is in the medium, there is a modification on TtgV structure that avoids blocking the RNA polymerase binding site.

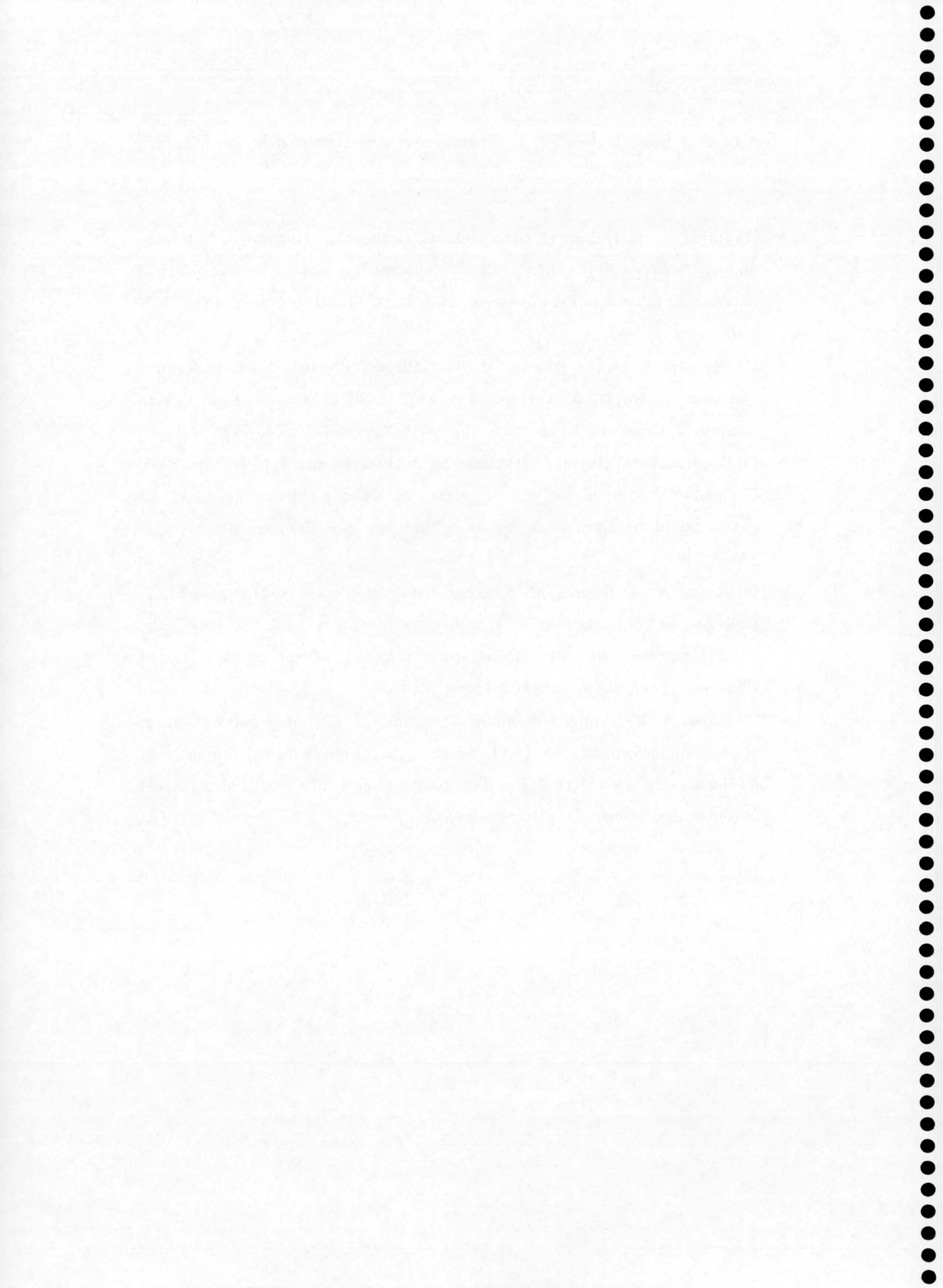
These results are published in reference 4.

Chapter V

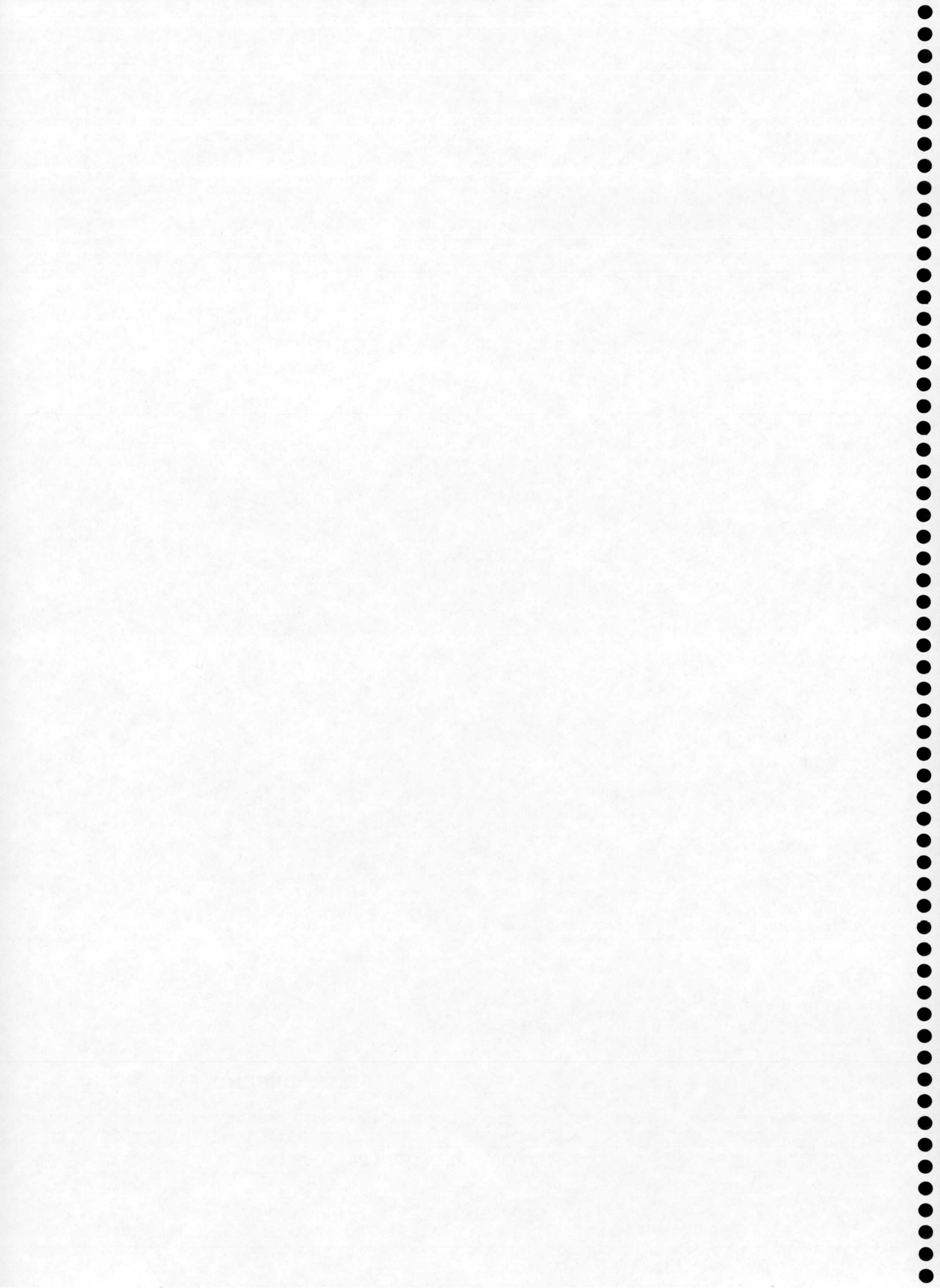
Tolerance to organic solvents can be exploited to develop double-phase (organic solvent/water) biotransformation systems in which toxic substrates or products are kept in the organic phase. *Pseudomonas putida* strain DOT-T1E is highly tolerant to organic solvents with a $\log P_{ow} \geq 2.5$, hence this strain could be an ideal biocatalyst for these systems. We tested the strain's tolerance to different aliphatic alcohols with a $\log P_{ow}$ value between 2 and 4, such as decanol, nonanol and octanol, which are potentially useful in biotransformations in double-phase systems in which compounds with a $\log P_{ow}$ around 1.5 are produced. *Pseudomonas putida* DOT-T1E responds to aliphatic alcohols as the second phase through *cis* to *trans* isomerization of unsaturated *cis* fatty acids, and through efflux of these aliphatic alcohols via a series of pumps that also extrude aromatic hydrocarbons. *Pseudomonas putida* strain DOT-T1E survived well in the presence of high concentrations of the aliphatic alcohols, and growth with nonanol or decanol occurred at a high rate, whereas in the presence of an octanol double-phase growth was compromised. Our results support that the $\log P_{ow}$ of aliphatic alcohols correlates with their toxicity, as octanol ($\log P_{ow}$ 2.9) is more toxic to *P. putida* cells than 1-nonanol ($\log P_{ow}$ 3.4), which in turn is more toxic than 1-decanol ($\log P_{ow}$ 4). *Pseudomonas putida* DOT-T1E bearing the plasmid pWW0-*xylE*::Km transforms *m*-xylene into 3-methylcatechol ($\log P_{ow}$ 1.5). The amount of 3-methylcatechol produced in an aliphatic alcohol/water bioreactor was 20-fold higher than in an aqueous medium, demonstrating the usefulness of double-phase systems for biotransformation.

Most of the results of this Ph. D. Thesis have been reported in the following publications:

- (1) Rojas, A., E. Duque, G. Mosqueda, G. Golden, A. Hurtado, J. L. Ramos and A. Segura. 2001. Three efflux pumps are required to provide efficient tolerance to toluene in *Pseudomonas putida* DOT-T1E. *J. Bacteriol.* **183**: 3967-3973.
- (2) Ramos, J. L., E. Duque, M. T. Gallegos, P. Godoy, M. I. Ramos-González, A. Rojas, W. Terán and A. Segura. 2002. Mechanisms of solvent tolerance in Gram-negative bacteria. *Ann. Rev. Microbiol.* **56**: 743-748.
- (3) Segura, A., A. Rojas, A. Hurtado, M. J. Huertas, and J. L. Ramos. 2003. Comparative genomic analysis of solvent extrusion pumps in *Pseudomonas* strains exhibiting different degrees of solvent tolerance. *Extremophiles.* **7**: 371-376.
- (4) Rojas, A., A. Segura, M. E. Guazzaroni, W. Terán, A. Hurtado, M. T. Gallegos, and J. L. Ramos. 2003. In vivo and in vitro evidence that TtgV is the specific regulator of the TtgGHI multidrug and solvent efflux pump of *Pseudomonas putida*. *J. Bacteriol.* **185**: 4755-4763.
- (5) Rojas, A., E. Duque, A. Schmid, A. Hurtado, J. L. Ramos and A. Segura. 2004. Biotransformation in double phase systems: physiological responses of *Pseudomonas putida* DOT-T1E to a double phase made of aliphatic alcohols and biosynthesis of substituted catechols. *In preparation.*



INTRODUCCIÓN



1. BIOLOGÍA DE *Pseudomonas*

El género *Pseudomonas* fue descrito por primera vez por Migula (1894) en un simple párrafo de dos líneas cuya traducción sería: “Células con órganos polares para su movilidad. Algunas especies forman esporas, aunque en general es un evento raro (por ejemplo, *Pseudomonas violacea*)”. Esta definición fue generalmente aceptada y algunas bacterias, muchas de las cuales habían sido asignadas a otros géneros, fueron rebautizadas en años posteriores como pertenecientes al género *Pseudomonas*.

A principios del siglo XX los microbiólogos, en particular la escuela de Delft, establecieron que las cepas de *Pseudomonas* eran muy comunes en hábitats naturales, particularmente en suelo, agua, alimentos y plantas enfermas. La ubicuidad de estas bacterias y la capacidad para crecer en medios de cultivo muy simples hicieron que se consideraran a las bacterias de este género como protagonistas en el proceso de mineralización de materia orgánica en la Naturaleza, un papel que fue claramente demostrado por den Dooren de Jong (1926).

En 1986 Palleroni, en base a análisis de hibridación ADN-ADN, propuso cinco grupos taxonómicos (ARN-I a ARN-V) dentro del género *Pseudomonas* (Palleroni et al., 1973; Palleroni, 1986). Posteriormente la secuenciación de los ARNr 16S reflejó la diversidad entre grupos y el grupo denominado ARN-I dentro la subclase- γ de *Proteobacteria* (De Vos et al., 1989; Woese et al., 1985), que fue reorganizada como la clase “*Grammaproteobacteria*” se considera hoy en día como verdaderas *Pseudomonas* (Krieg y Garrity, 2001). A las especies incluidas en este grupo se las llama con frecuencia *Pseudomonas* “verdaderas” e incluye a las especies *P. aeruginosa*, *P. fluorescens*, *P. putida* entre otras (Palleroni y Moore, 2004).

La actual definición de *Pseudomonas* que aparece en la edición del Manual de Bergey de Bacteriología Sistemática define éste género como: “células en forma de bastón, curvadas o derechas, pero no helicoidales, de entre 0,5-1,0 μm de diámetro por 1,5-5,0 μm de longitud. La mayoría de las especies no aculuma gránulos de poli- β -hidroxibutirato, pero se pueden formar poli-hidroxicanoatos cuya longitud es mayor de cuatro carbonos cuando las células se cultivan en alcanos o gluconato. No se conocen estados de células viables pero no cultivables. Son gram-negativas. Son generalmente móviles y presentan uno o varios flagelos polares; aunque se han descrito flagelos laterales más cortos. Son aeróbicas, con un tipo de

metabolismo respiratorio estricto con oxígeno como el aceptor terminal de electrones; en algunos casos el nitrato puede ser usado como un aceptor de electrones alternativo, lo que permite en estos casos el crecimiento anaerobio. No se producen xantomonadinas. La mayoría, si no todas las especies, no puede crecer bajo condiciones ácidas ($\text{pH} \leq 4,5$). La mayoría de las especies no requiere factores de crecimiento orgánicos. Pueden ser oxidasa positiva o negativa, y son catalasa positiva y quimiorganotróficas. Las cepas de las especies de este género incluyen en su composición los ácidos grasos hidroxilados 3-OH 10:0 y 12:0, y 2-OH 12:0, y ubiquinona Q-9. Están ampliamente distribuidas en la naturaleza. Algunas especies son patógenas de humanos, animales o plantas. El porcentaje de contenido en G+C del ADN está entre 58-69%.”

El uso de medios químicamente definidos con compuestos orgánicos simples ha revelado que una de las propiedades más notables de los miembros del género *Pseudomonas* es su versatilidad nutricional (den Dooren de Jong, 1926; Palleroni, 1986; Stainer et al., 1966). El espectro nutricional de cada especie es característico y, en general, la variabilidad entre las cepas de una misma especie es menor. En contraste con muchos otros grupos bacterianos, muchas *Pseudomonas* no se pueden distinguir mediante la utilización de azúcares. De hecho, las cepas de la especie *P. palleronii* no utilizan estos compuestos como fuentes de carbono, y algunas cepas de *P. putida* sólo pueden utilizar los azúcares glucosa y sacarosa. Los compuestos orgánicos empleados como fuentes de carbono y energía por muchas especies de *Pseudomonas* incluyen hidrocarburos lineales y aromáticos, ácidos alifáticos, aminas, amidas, aminoácidos, alcoholes y compuestos aromáticos. De estos grupos químicos, los compuestos aromáticos son particularmente interesantes, dadas las implicaciones bioquímicas de las distintas rutas por las cuales *Pseudomonas* es capaz de metabolizarlos, y su posible utilización en procesos de descontaminación y biocatálisis.

El género *Pseudomonas* incluye cepas patógenas oportunistas de animales, como *P. aeruginosa*, patógenos de plantas como *P. syringae*, y cepas que estimulan el crecimiento de plantas actuando como fungicidas, como *P. fluorescens* (Lugtenberg, 1999). En los últimos cinco años se ha secuenciado el genoma de las cepas *P. aeruginosa* PAO1 (Stover et al., 2000), *P. putida* KT2440 (Nelson et al., 2003), *P. syringae* pv. tomatoe DC3000 (<http://pseudomonas-syringae.org/>) y *P.*

fluorescens Pf-5 (<http://pseudomonas-fluorescens.org/>). El análisis de sus genomas ha revelado que comparten cerca del 70% de los genes. Estas bacterias presentan como media 5500 genes en sus genomas, la mitad de ellos sin función conocida.

1. HIDROCARBUROS AROMÁTICOS

Como ya se ha mencionado, las bacterias del género *Pseudomonas* tienen la capacidad de romper el anillo bencénico y utilizar muchos compuestos aromáticos como fuentes de carbono. En las siguientes secciones de esta introducción se analizan las propiedades de los hidrocarburos aromáticos y su origen en la naturaleza, así como las rutas más frecuentes de degradación. El benceno y los compuestos derivados de él se caracterizan por tener una gran energía de resonancia, lo cual se manifiesta en su estabilidad termodinámica y en sus propiedades químicas, que son radicalmente diferentes a las observadas para otros hidrocarburos insaturados. En general, los compuestos químicos que presentan estas propiedades se conocen como aromáticos y éstos pueden contener uno o más anillos bencénicos y presentar o no distintas sustituciones.

Los estudios sobre la distribución ambiental de hidrocarburos aromáticos policíclicos se iniciaron en 1947 cuando Kern demostró la presencia de criseno en muestras de suelo (Kern, 1947) y durante los siguientes 20 años fueron detectados entre 10 y 15 poliarenos diferentes. El desarrollo de nuevo métodos analíticos, como la cromatografía de gases acoplada a la espectrometría de masas, y los empleados para la extracción y aislamiento de hidrocarburos policíclicos aromáticos condujeron a la detección de cientos de estos compuestos en el medio ambiente (Blumer y Rudrum, 1970).

Se puede decir que los hidrocarburos aromáticos son ubicuos en la Naturaleza. Aunque su origen en el medio ambiente es discutido, es aceptado que la mayoría no son de origen industrial, sino derivados de la pirólisis natural de los compuestos orgánicos (Gibson y Subramanian, 1984). Los tipos de hidrocarburos aromáticos formados dependen de la temperatura de pirólisis. A altas temperaturas (2000°C) los productos principales son los hidrocarburos aromáticos sin sustituciones; a temperaturas intermedias (400-800°C) se forman moléculas

sustituidas con grupos alquílicos. El petróleo, que se forma a bajas temperaturas, contiene hidrocarburos aromáticos policíclicos con dos o tres sustituyentes alquilos (Blumer, 1976). En muchos suelos se han detectado hidrocarburos aromáticos monocíclicos como benceno, tolueno, etilbenceno y xilenos (Dagley, 1981). Éstos últimos se encuentran entre los 50 productos sintetizados industrialmente en mayor volumen (millones de toneladas por año). Son ampliamente usados como combustibles y disolventes de uso industrial. También constituyen la materia prima para la producción de compuestos farmacéuticos, agroquímicos, polímeros, explosivos y muchos otros. El uso masivo de los hidrocarburos aromáticos de síntesis industrial ha conducido inevitablemente a su liberación accidental en el medio ambiente. El control de este problema ha provocado cada vez más interés en algunos sectores de la población o agencias institucionales al cuidado del medioambiente, ya que estos hidrocarburos aromáticos son extremadamente tóxicos para los seres vivos. La razón estriba en que se disuelven en las membranas celulares y las desorganizan, produciendo la muerte celular.

La capacidad de las bacterias para utilizar hidrocarburos aromáticos fue demostrada por primera vez en 1908 por Stormer, quien aisló una cepa de *Bacillus hexacarbovorum* gracias a su capacidad de utilizar tolueno y xileno como fuente de carbono. En 1913 Söhngen describió la utilización de benceno por microorganismos, y un año más tarde Wagner aisló dos organismos, *Bacterium benzoli a* y *b*, los cuales eran capaces de crecer en benceno, tolueno y xileno. La existencia universal de bacterias de suelo capaces de metabolizar compuestos aromáticos fue demostrada por Gray y Thornton (1928), ya que observaron que de 245 muestras de suelo analizadas, 146 contenían bacterias capaces de oxidar naftaleno, fenol o cresol. Esto fue el comienzo de un estudio más detallado acerca de la degradación de este tipo de compuestos, que se inicia de una manera sistemática a finales de la década de los 40 del siglo XX. La biodegradación de los hidrocarburos aromáticos puede considerarse como parte de un proceso normal del ciclo del carbono y la amplia distribución de microorganismos capaces de degradarlos es probablemente debida a que durante miles de años los microorganismos han estado expuestos a bajas concentraciones de estos compuestos provenientes de procesos naturales tales como la combustión de maderas (Gibson y Subramanian, 1984; Ramos y Rojo, 1990).

El interés por la degradación de hidrocarburos aromáticos se ha acentuado en los últimos años como consecuencia, por un lado, de una mayor educación ambiental de la población y por otro, del aumento de “derrames” de hidrocarburos en el medio ambiente. El reto para muchos investigadores es por tanto estudiar y encontrar la manera de eliminar este tipo de compuestos nocivos para el medio ambiente. Las soluciones abarcan desde la utilización de microorganismos ya caracterizados (Alexander, 1981), la identificación y utilización de microorganismos con mejores capacidades (Roberts, 1987), así como la posibilidad de desarrollar en el laboratorio nuevas vías metabólicas mediante ingeniería genética (Timmis et al., 1988).

Se ha avanzado mucho en la comprensión de los mecanismos que utilizan los microorganismos para superar la energía de activación necesaria para romper el anillo aromático (ver siguiente sección) y generar estructuras carbonadas lineales, que son las únicas asimilables por los seres vivos. Se han descrito numerosas rutas de degradación de hidrocarburos aromáticos por microorganismos pertenecientes a diferentes géneros de bacterias tanto gram-negativas como gram-positivas, que podrían ser utilizadas en el tratamiento biológico para eliminar compuestos nocivos (Ramos et al., 1994). Sin embargo, la toxicidad química puede dificultar el uso de microorganismos para la eliminación de contaminantes, cuando éstos están presentes en concentraciones elevadas por ejemplo en corrientes de desecho industriales y en vertederos, controlados o incontrolados, muy contaminados (Atlas et al., 1995). Éste es un gran problema para la biorremediación microbiana en reactores, biofiltros y suelos.

2. PRINCIPIOS GENERALES DE LAS RUTAS DE DEGRADACIÓN AEROBIAS PARA EL METABOLISMO DE AROMÁTICOS

Una característica común de los mecanismos de degradación de compuestos aromáticos, por bacterias y hongos, es la canalización de substratos hasta un número limitado de productos, que posteriormente, son catabolizados por las rutas centrales del metabolismo celular. Existe un gran número de enzimas que catalizan las reacciones iniciales de las rutas catabólicas en los distintos microorganismos. El

perfil de sustrato de estas enzimas es generalmente amplio, y los tipos de reacciones que llevan a cabo están encaminados a la activación del anillo aromático. En general, para la desestabilización del anillo aromático los microorganismos han desarrollado una estrategia común, que es la activación del anillo mediante la introducción de dos grupos hidroxilo (Dagley, 1986).

Las rutas descritas en bacterias para la asimilación aeróbica de sustratos aromáticos se pueden considerar divididas en tres partes: la formación de derivados dihidroxilados, la rotura de éstos por dioxigenasas y la conversión del producto de ruptura en compuestos que puedan entrar directamente al metabolismo central de la célula (Dagley, 1986; Harayama y Timmis, 1992). Una excepción a esta regla ocurre en una cepa de *Pseudomonas* (*P. pseudoalcaligenes* JS45) que crece a expensas de nitrobenceno. Éste es transformado en 2-aminofenol, el cual es atacado por la enzima 2-aminofenol-1,6-dioxigenasa, que rinde el semialdehído del ácido 2-aminomucónico (Nishino y Spain, 1993; Lendenmamm y Spain, 1996) (Figura 1).

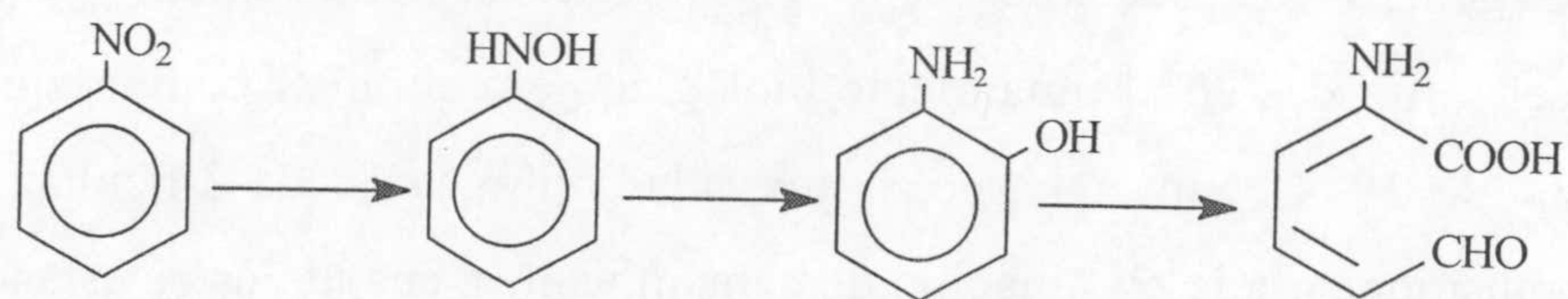


Figura 1. Ruta de degradación de nitrobenceno en *Pseudomonas alcaligenes* JS45.

3.1. Formación de derivados dihidroxilados

Uno de los primeros pasos en la degradación de compuesto aromáticos implica la introducción de dos grupos hidroxilo en el anillo aromático de manera simultánea o secuencial (Harayama y Timmis, 1989). Un mismo compuesto puede sufrir distintos tipos de ataque que conduzca a la forma activada con los dos grupos hidroxilo. La introducción de uno o de dos grupo hidroxilo (mono o dihidroxilación), es llevada a cabo por enzimas denominadas oxigenasas que catalizan la incorporación del oxígeno a sustratos orgánicos en forma de grupos hidroxilo. Las oxigenasas que catalizan la incorporación de un solo átomo de oxígeno en el

substrato se denominan monooxigenasas, siendo el segundo átomo de oxígeno reducido a H₂O. El compuesto fenólico resultante es de nuevo oxidado hasta catecol (Figura 2.A). Las oxigenasas que catalizan la incorporación simultánea de los dos átomos de oxígeno se denominan dioxigenasas. Éstas incorporan dos grupos hidroxilo en el anillo aromático a expensas de O₂ y NAD(P)H (Harayama, 1992) (Figura 2.B).

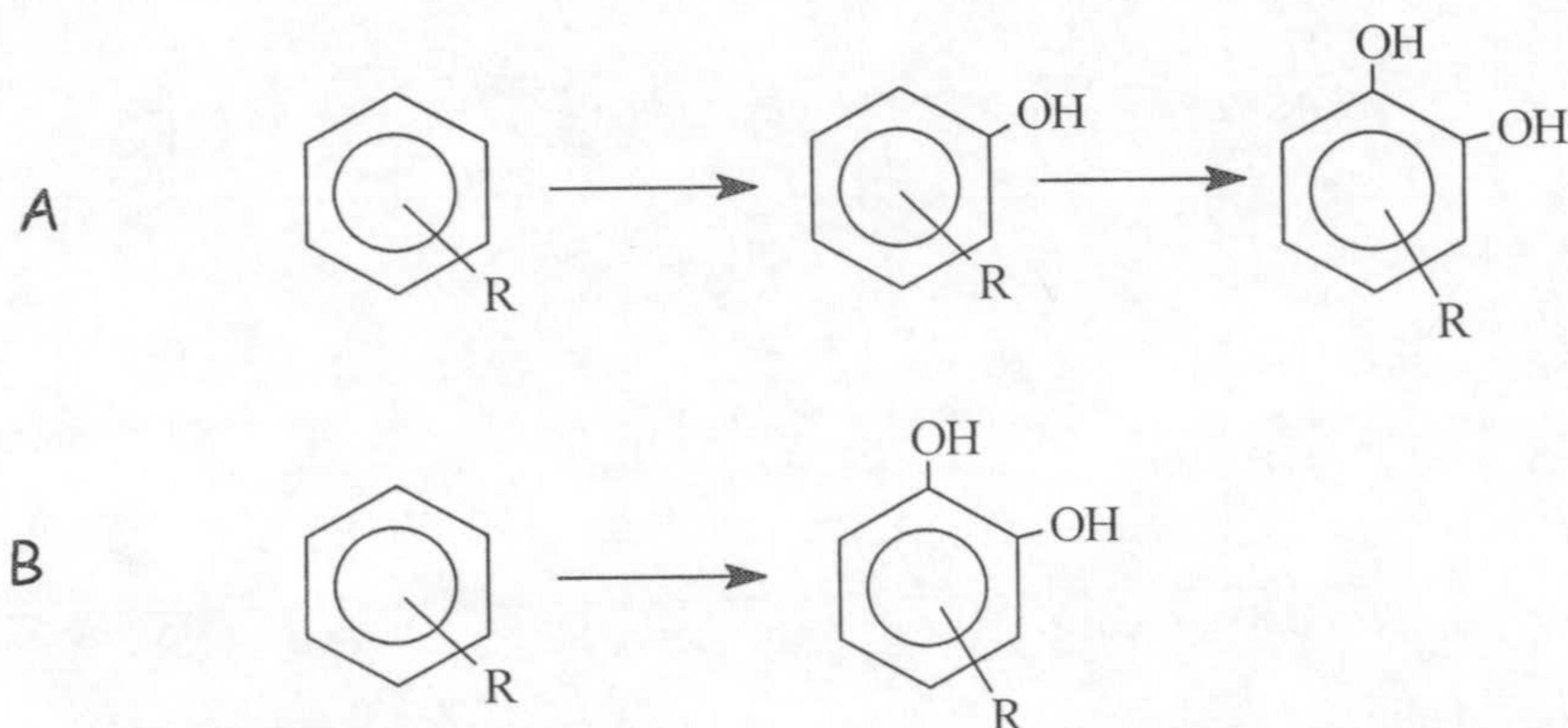


Figura 2. Formación de derivados hidroxilados, mediante monooxigenasas (A) o dioxigenasas (B).

3.2. Rotura del anillo aromático

Tras la formación de los derivados dihidroxilados, distintas dioxigenasas se encargan de la ruptura del anillo aromático (Harayama y Reki, 1989). Se han descrito dos tipos de fisión, rotura *orto* y *meta* (Figura 3). Cuando la fisión ocurre entre un átomo de carbono con un grupo hidroxilo y el adyacente sin hidroxilo (extradiólica), se produce un semialdehído, y a este tipo de ruptura se le conoce como fisión *meta* (Dagley et al., 1965). Una de las dioxigenasas de ruptura *meta* más estudiadas es la catecol-2,3-dioxigenasa, codificada por el gen *xylE* del plásmido catabólico TOL (Nakai et al., 1983). Esta enzima está formada por cuatro subunidades idénticas de 32 kDa que contienen un átomo de Fe²⁺ como grupo prostético por cada subunidad, el cual es esencial para la catálisis enzimática. El producto derivado de la acción de esta dioxigenasa es el semialdehído del ácido 2-hidroximucónico (o el derivado sustituido) que es de color amarillo. Debido a la

producción de color, el gen estructural para esta enzima se ha utilizado como gen reportero en biología molecular (Hanh et al., 1991). El perfil de substratos de esta enzima es muy amplio, siendo capaz de oxidar: catecol, 3-metil-, 3-etil- y 4-metilcatecol. El 3-clorocatecol y 4-etilcatecol inhiben irreversiblemente la actividad de esta enzima (Bartels et al., 1984, Ramos et al., 1987).

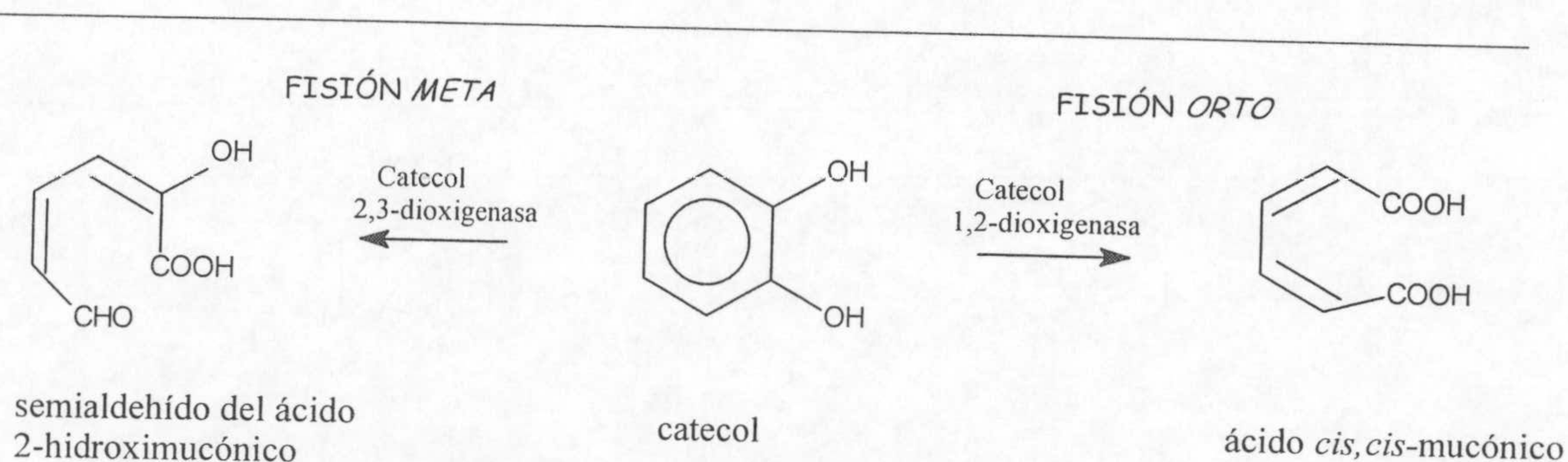


Figura 3. Fisiones *orto* y *meta* del catecol.

Cuando la ruptura se lleva a cabo entre los dos grupos hidroxilo (intradiólica) se produce un derivado del ácido *cis,cis*-mucónico y a este tipo de reacción se le conoce como fisión *orto* (Ornston, 1966). Las enzimas más estudiadas que llevan a cabo fisiones *orto* son la catecol-1,2-dioxigenasa y la protocatecuato-3,4-dioxigenasa. Estas enzimas se diferencian de las de rotura *meta* en que contienen Fe^{3+} como grupo prostético. Las enzimas de ruptura de anillo son generalmente proteínas multiméricas compuestas por un solo tipo de protómero, aunque la protocatecuato-3,4-dioxigenasa de varias especies de *Pseudomonas* está compuesta por diferentes polipéptidos (Ludwig et al., 1984).

El que ocurra una fisión *orto* o *meta* está directamente relacionado con dos factores fundamentales. En primer lugar, depende de las sustituciones del anillo. A pesar de que las enzimas iniciales de estas rutas de fisión, con frecuencia, muestran una especificidad de sustrato relajada, y son capaces de transformar sustratos con diferentes sustituyentes, las rutas *meta* se utilizan generalmente en el metabolismo de aromáticos con sustituyentes alquílicos; mientras que las rutas *orto* utilizan, normalmente, como sustratos anillos no sustituidos o con halógenos como sustituyentes. Como hemos mencionado con anterioridad, las enzimas de la ruta *meta*

pierden su actividad catalítica en presencia de substratos clorados. Pese a ello se han descrito dos cepas de *Pseudomonas putida* que crecen a expensas de clorobenceno a través de una ruta *meta* (Mars et al., 1997; Riegert et al., 1998).

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

El segundo factor del que depende que un compuesto se degrade por una ruta u otra es la regulación a la que éstas se encuentran sometidas, que es a su vez, consecuencia del precursor del derivado dihidroxilado presente en el medio (Feist y Hegeman, 1969).

Muchos microorganismos del suelo tienen varias rutas para la degradación de un compuesto, y la vía que utiliza es la que se induce por los compuestos presentes en el medio. En *Pseudomonas putida* el benzoato es descarboxilado y oxidado hasta catecol, que es degradado por las enzimas de la ruta *orto* (Johnson y Stainer, 1971). El producto de ruptura producido por la catecol-1,2-dioxigenasa (ácido *cis,cis*-mucónico) actúa como inductor de la ruta *orto* (Ornston, 1966; Murray y Williams, 1974). Sin embargo, cuando el substrato es 3-metilbenzoato o fenol, que son también degradados a catecol, éste se degrada por la vía *meta*, debido a que ambos son inductores de la ruta *meta* (Feist y Hegeman, 1969; Sala-Trepat et al., 1972).

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

3.3. Degradación de los productos resultantes de la fisión del anillo aromático hasta intermediarios del ciclo de Krebs

Los productos de la fisión *orto* de anillos aromáticos, el ácido *cis,cis*-mucónico o sus derivados, son transformados hasta un intermediario común, el β -cetoadipato, y éste hasta succinato y acetil-CoA, que se incorporan a las rutas centrales del metabolismo celular (Figura 4).

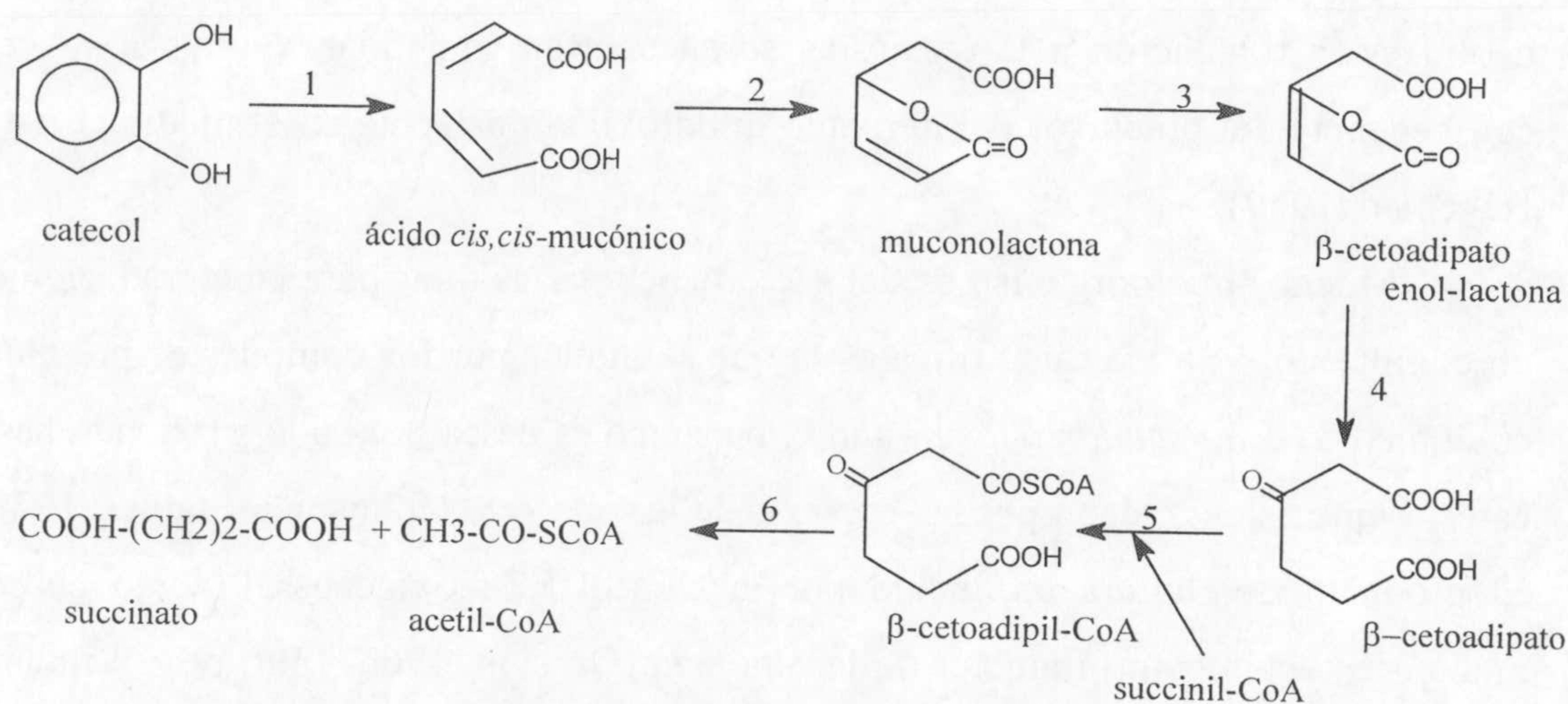


Figura 4. Esquema de la ruta *orto* para la degradación de catecol. Las enzimas implicadas son: (1) catecol-1,2-dioxigenasa; (2) enzima lactonizante del *cis,cis*-muconato; (3) muconolactona isomerasa; (4) β -cetoadipato-enol-lactona hidrolasa; (5) succinil-CoA- β -cetoadipil-CoA transferasa; y (6) β -cetoadipil-CoA tiolasa.

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

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

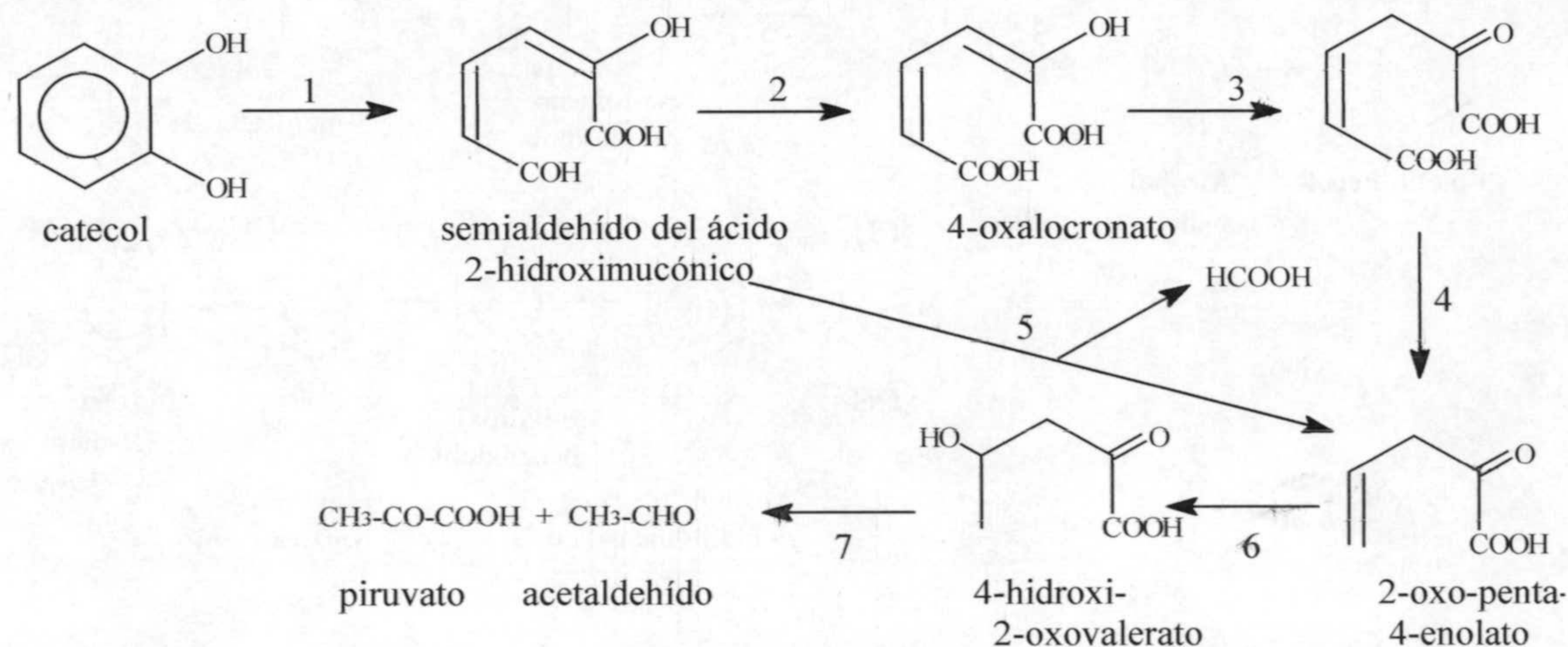


Figura 5. Esquema de la ruta *meta* para la degradación de catecol. Las enzimas implicadas son: (1) catecol 2,3-dioxigenasa; (2) 2-hidroxi-2-imucónico semialdehído deshidrogenasa; (3) 4-oxalocronato tautomerasa; (4) 4-oxalocronato descarboxilasa; (5) 2-hidroxi-2-imucónico semialdehído hidrolasa; (6) 2-oxopenta-4-enolato hidratasa; y (7) 4-hidroxi-2-oxo-2-valerato aldolasa.

4. RUTAS DESCRITAS PARA LA BIODEGRADACIÓN AEROBIA DE TOLUENO

En la Figura 6 se presenta un esquema de las cinco rutas caracterizadas en *Pseudomonas* para la degradación de tolueno, tres de las cuales se han identificado en distintas especies de *Pseudomonas*. El ataque inicial sobre el tolueno se puede llevar a cabo sobre la cadena alquílica (ruta 1) o directamente sobre el anillo aromático (rutas 2 a 5), bien por monooxigenasas o por dioxigenasas.

En la ruta 1 (ruta TOL de *P. putida* mt-2) la cadena alquílica lateral del tolueno es atacada por una monooxigenasa que la oxida hasta grupo alcohol; el alcohol bencílico es sustrato de una deshidrogenasa, que rinde benzaldehído, que se oxida hasta ácido benzoico. Posteriormente, éste es descarboxilado y oxigenado para producir catecol (Worsey y Williams, 1975).

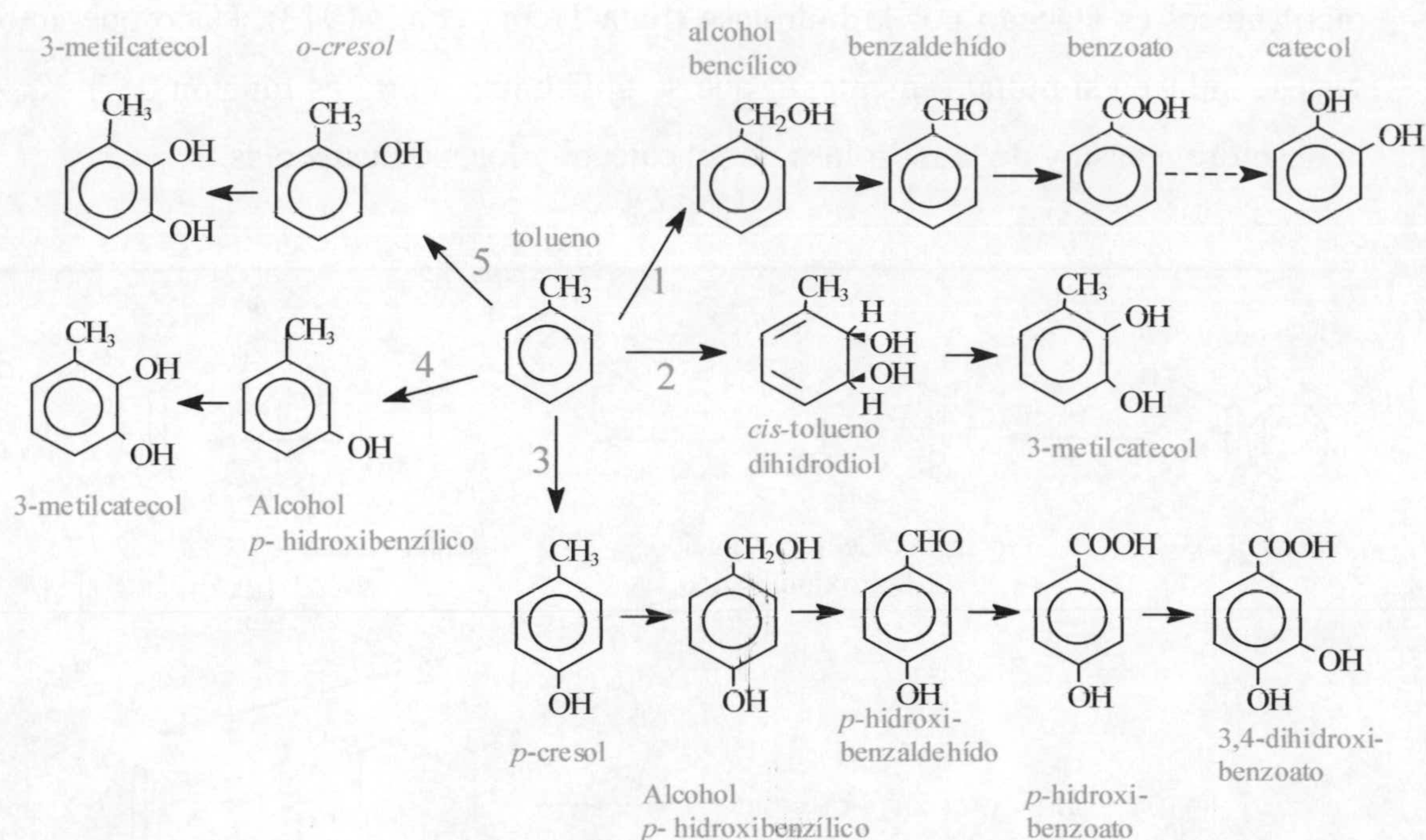


Figura 6. Esquema de las rutas de degradación aerobia de tolueno en bacterias. (1) Ruta TOL codificada por el plásmido pWW0 de *P. putida* mt-2 (Worsey y Williams, 1975); (2) ruta TOD, descrita por primera vez en *P. putida* F1 (Gibson et al., 1970); (3) ruta de la tolueno-4-monooxigenasa de *Pseudomonas mendocina* KR1 (ruta TMO) (Whited y Gibson, 1991); (4) ruta de la tolueno-3-monooxigenasa de *Ralstonia pickettii* (ruta TBU de *toluene/benzene utilization*) (Gibson et al., 1988); (5) ruta de la tolueno 2-monooxigenasa descrita en *Burkholderia cepacia* G4 (ruta TOM: *toluene ortho monooxygenase*) (Shields et al., 1989; Olsen et al., 1994).

En las rutas 3, 4 y 5, distintas monooxigenasas son capaces de hidroxilar inicialmente las posiciones *orto*, *meta* o *para* del anillo aromático (Shields et al., 1989; Olsen et al., 1994; Whited y Gibson, 1991; Yen et al., 1991). Mientras que los *o*- y *m*-cresol formados son de nuevo hidroxilados para rendir 3-metilcatecol (ruta TBU de *Ralstonia pickettii* [4 en la Figura 6] y ruta TOM de *Burkholderia cepacia* G4 [5 en la Figura 6]), la oxidación de *p*-cresol sigue un mecanismo distinto. Se trata de la ruta TMO de *P. mendocina* KR1 (ruta 3 de la Figura 6): el *p*-cresol es oxidado secuencialmente hasta *p*-hidroxibenzoato y éste es hidroxilado a 3,4-dihidroxibenzoato, que es el sustrato para la ruptura del anillo en la posición *orto*, que así puede entrar en la ruta del β -cetoadipato

En la ruta 2 (ruta TOD de *P. putida* F1) el anillo aromático es sustrato de una dioxigenasa que forma primero un *cis*-diol que es, posteriormente, oxidado hasta 3-metilcatecol (Gibson et al., 1970).

Por último, se ha descrito recientemente otra ruta ligeramente diferente en *P. stutzeri* OX1, una cepa capaz de degradar tolueno y *o*-xileno a través de un paso inicial que supone dos monooxigenaciones sucesivas del anillo aromático llevadas a cabo por una misma enzima, tolueno-*o*-monooxigenasa (ToMO) (Baggi et al., 1987; Bertoni et al., 1996, 1998).

Nosotros nos vamos centrar en dos de estas rutas, que son la ruta TOL del plásmido pWW0 de *P. putida* (Figura 6, ruta 1), porque utilizaremos esta ruta para la bioproducción de catecoles (Capítulo V); y la ruta de la tolueno dioxigenasa (TOD) (Figura 6, ruta 2), presente en *P. putida* DOT-T1E, que es la cepa objeto de estudio en esta Tesis Doctoral.

4.1 Ruta TOL

4.1.1. Reacciones enzimáticas codificadas por el plásmido TOL

La ruta de degradación de tolueno mejor caracterizada desde el punto de vista bioquímico y molecular es la ruta codificada en el plásmido catabólico pWW0 de *Pseudomonas putida* mt-2 (Worsey y Williams, 1975). La primera enzima de la ruta es la denominada tolueno/xileno monooxigenasa que oxida tolueno, *m*- y *p*-xileno hasta alcohol (metil)bencílico. Esta enzima consta de dos subunidades codificadas por los genes *xyIA* y *xyIM*, cuyos productos, de 35 y 40 kDa respectivamente, son necesarios para la actividad enzimática (Harayama et al., 1989).

El gen *xyIB* codifica la enzima alcohol bencílico deshidrogenasa, que cataliza la oxidación de alcohol bencílico a benzaldehído con la reducción concomitante de NAD^+ a NADH (Worsey y Williams, 1975). La oxidación de benzaldehído a benzoato la lleva a cabo la enzima benzaldehído deshidrogenasa, que está codificada por el gen *xyIC*. Esta serie de reacciones constituyen la denominada ruta *upper*.

Una vez formados los ácidos carboxílicos aromáticos correspondientes, actúan las enzimas codificadas en la ruta *meta* de TOL (Figura 7). Así, el ácido benzoico o los derivados correspondientes de la oxidación de toluenos y xilenos por enzimas de la ruta *upper*, son transformados en los compuestos activados dihidroxilados que son sustrato de la enzima catecol-2,3-dioxigenasa, codificada por el gen *xyIE*, que abre

el anillo aromático para dar lugar al semialdehído del ácido mucónico (o al derivado alquílico correspondiente). El metabolismo de los semialdehídos se lleva a cabo por dos vías alternativas, pero que van hacia un compuesto intermedio común, el 2-oxopenta-4-enoato. El semialdehído que proviene del ácido 3-metilbenzoico (de *m*-xileno) es metabolizado a través de una enzima hidrolítica (XylF), mientras que los semialdehídos que provienen de benzoato ó 4-metilbenzoato (de tolueno o *p*-xileno) son metabolizados a través de la rama del oxalocrotonato, que incluye al menos tres reacciones enzimáticas, catalizadas por XylG, XylH y XylI (Harayama et al., 1987 [b]).

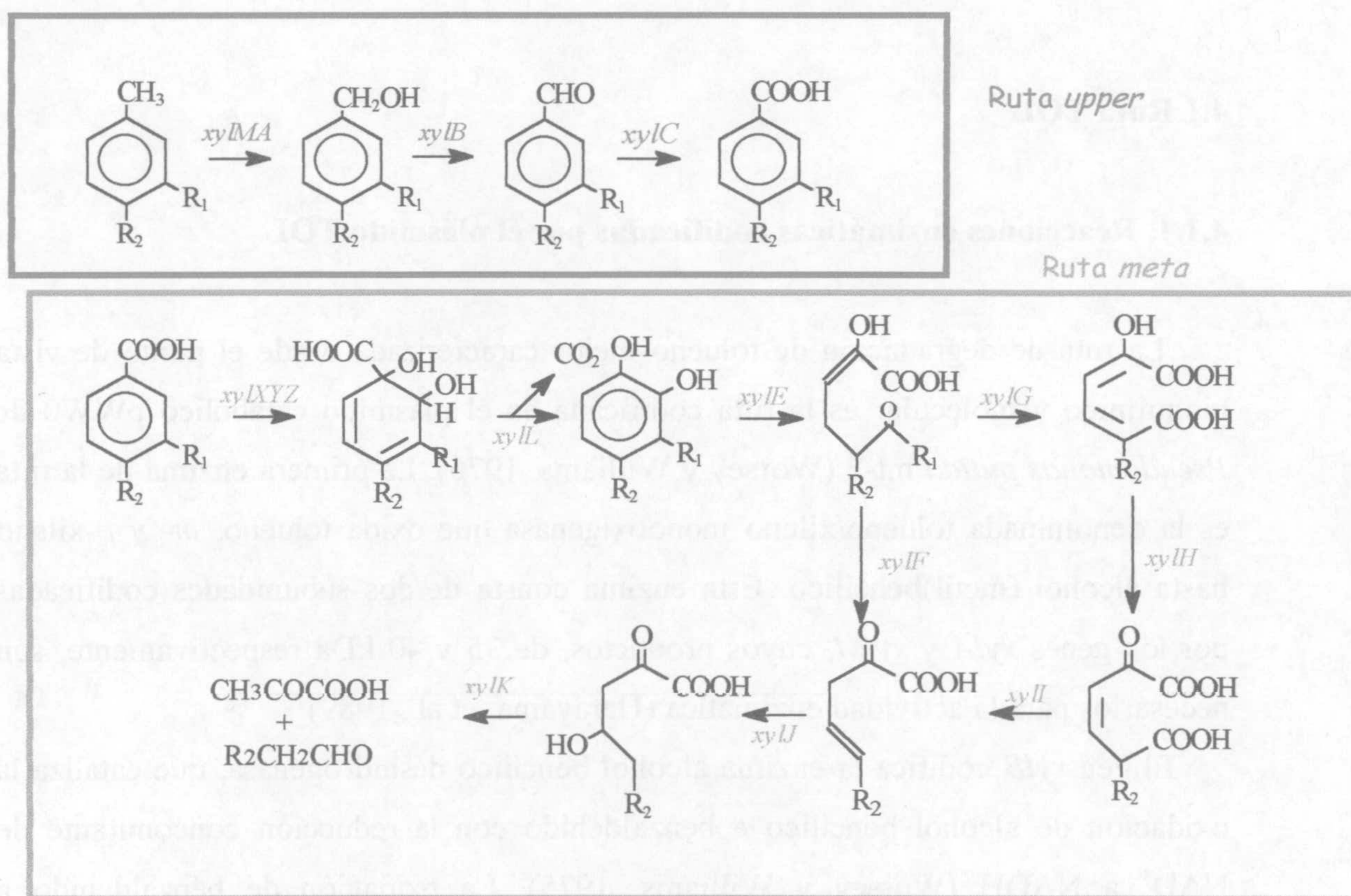


Figura 7. Degradación de tolueno y derivados por el plásmido TOL pWW0 de *Pseudomonas putida* mt-2. Las enzimas que intervienen son XylMA, tolueno dioxigenasa; XylB, alcohol bencílico deshidrogenasa; XylC, benzaldehído deshidrogenasa; XylXYZ, toluato-1,2-dioxigenasa; XylL, 1,2-dihidroxi-3,5-ciclohexadien-1-carboxilo deshidrogenasa; XylE, catecol-2,3-dioxigenasa; XylF, hidrolasa del semialdehído del ácido hidroximucónico; XylG, deshidrogenasa del semialdehído del ácido hidroximucónico; XylH, 4-oxalacronato tautomerasa; XylI, 4-oxalocrotonato descarboxilasa; XylJ, 2-oxopent-4-enoato hidratasa; y XylK, 2-oxo-4-hidroxi-5-pentenoatoaldolasa. Las reacciones en el cuadrado rojo son llevadas a cabo por las enzimas de la ruta *upper*, mientras que las de la ruta *meta* están recogidas en el recuadro azul. R₁=R₂=H; R₁= CH₃, R₂=H; R₁=H, R₂= CH₃; y R₁= CH₂-CH₃, R₂=H.

4.1.2. Organización física de los genes catabólicos del plásmido TOL y su regulación

Los genes catabólicos del plásmido TOL pWW0 se encuentran organizados en dos unidades transcripcionales denominadas *upper* y *meta*. El operón *upper*, *xylUWCMABN*, codifica las enzimas implicadas en la conversión de tolueno a benzoato (Harayama et al., 1986). Los productos de los genes *xylU*, *xylW* y *xylN*, no son necesarios para el crecimiento en tolueno (Harayama et al., 1989; Williams et al., 1991). La información para la transformación de benzoato hasta intermediarios del ciclo de Krebs está codificada en el operón *meta*. Éste tiene un tamaño de 11 Kpb y contiene la información de 13 genes (*xylXYZLTEGFJQKIH*), siendo uno de los operones de mayor tamaño entre los descritos en procariotas (Harayama y Reikik, 1990). El operón codifica la información genética necesaria para la degradación de los benzoatos y metilbenzoatos hasta acetaldehído y piruvato (Harayama, 1984). Abajo del operón *meta* existen dos genes reguladores, *xylS* y *xylR*, que están implicados en el control transcripcional de los operones *upper* y *meta* (Inoue et al., 1981, 1983 y 1986; Ramos et al., 1987, 1997; Marqués y Ramos, 1993). Estos genes reguladores se transcriben desde promotores independientes y divergentes. En la Figura 8 se muestra la organización genética en el plásmido catabólico, así como la regulación a la que está sometido.

El modelo general de regulación aceptado hoy en día, está compuesto por dos circuitos (Ramos et al., 1997): uno que funciona cuando las células se cultivan con (metil)benzoatos (circuito *meta*) y otro más complejo que funciona cuando las células utilizan tolueno o xilenos como fuente de carbono (sistema en cascada):

- En células cultivadas en ausencia de efectores, el gen *xylS* se expresa a bajo nivel desde el promotor P_{S2} que es dependiente de σ^{70} y se produce la proteína XylS en forma inactiva. En presencia de efectores en el medio (por ejemplo, metilbenzoatos) éstos interaccionan con la proteína XylS activándola; en estas condiciones XylS estimula la transcripción de la ruta *meta* desde el promotor P_m . La expresión desde P_m requiere la RNA polimerasa con el factor σ^{32} en la fase exponencial temprana y con el σ^{38} en las restantes fases de crecimiento. Diversos benzoatos sustituidos pueden ser

efectores de XylS, pero no todas las posiciones son equivalentes: la posición 3 es muy permisiva, siendo inductores benzoatos con grupos metilo, etilo, o átomos de F, Cl, Br e I; mientras que las posiciones 2 y 4 son más restrictivas y sólo permiten un grupo metilo, ó átomos de F y Cl, pero no permiten un grupo etilo, ni átomos de Br o I.

- En células en presencia de xilenos/tolueno, el regulador que controla la transcripción es XylR. La proteína XylR controla su propia síntesis desde dos promotores dependientes de σ^{70} . XylR en presencia de tolueno/xilenos se activa y estimula la transcripción del operón *upper* desde el promotor P_u , dependiente de σ^{54} . La proteína activada también estimula la expresión del gen *xylS* desde el promotor P_{S1} dependiente de σ^{54} , dando lugar a la hiperproducción de XylS que incluso en ausencia de efectores estimula la transcripción de la ruta *meta*; así se consigue una cascada que permite la inducción simultánea de las rutas *upper* y *meta* (Ramos et al., 1997, Ruíz et al., 2004).

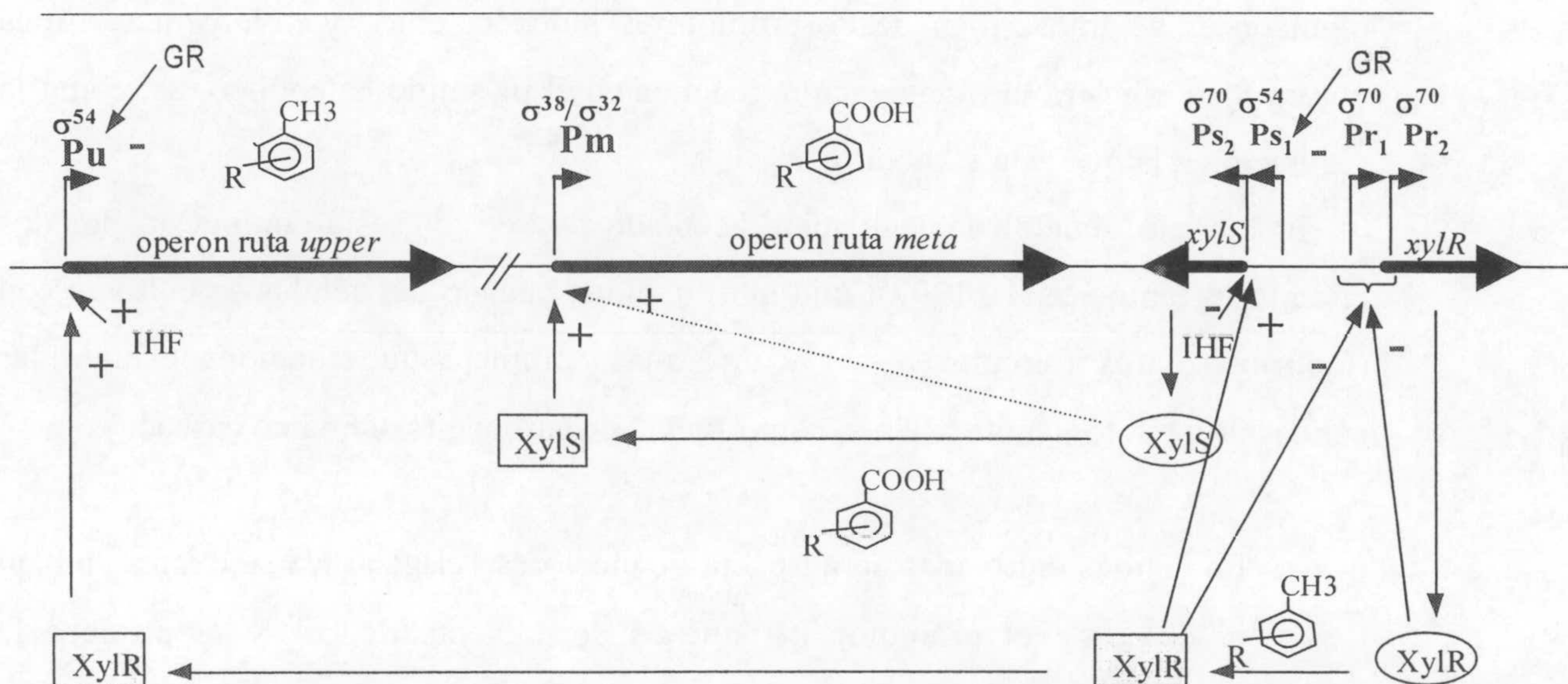


Figura 8. Red de regulación del plásmido TOL. Las elipses indican las formas inactivas de los reguladores. Los rectángulos grises indican las formas activas de los reguladores. Las líneas representan las conexiones entre las proteínas reguladoras y los promotores, donde (+) quiere decir activación de la transcripción y (-) indica inhibición de la transcripción; GR indica regulación global. Las líneas discontinuas indican activación de la transcripción debido a la sobreproducción de XylS en ausencia de efector. Los factores sigma implicados en el inicio de la transcripción se indican sobre cada promotor. Se indican los substratos aromáticos de las rutas que actúan como efectores de las proteínas reguladoras. (Adaptado de Ruíz et al., 2004).

4.2 Ruta TOD

4.2.2. Reacciones enzimáticas catalizadas por los genes de la ruta TOD

La otra ruta de degradación de tolueno que nos interesa en el contexto de esta Tesis Doctoral es la ruta de la tolueno dioxigenasa, descrita por primera vez en la cepa *Pseudomonas putida* F1 (Gibson et al., 1970). Esta ruta está presente en el cromosoma de *P. putida* DOT-T1E, la cepa altamente tolerante a disolventes orgánicos que es objeto de estudio en esta Tesis Doctoral (Mosqueda et al., 1999). En un primer paso de degradación se forma el compuesto *cis*-2,3-dihidro-2,3-dihidroxitolueno (*cis*-tolueno dihidrodiol), mediante una reacción de dioxigenación en la que el oxígeno molecular y dos electrones provenientes del NADH se incorporan en el anillo aromático. Esta reacción es catalizada por una enzima multicomponente denominada tolueno dioxigenasa (Figura 9). Los genes que codifican esta enzima heteromultimérica son los denominados *todC1C2BA*. Este sistema enzimático consta de tres elementos: una flavoproteína con actividad reductasa, codificada por el gen *todA*, una ferredoxina codificada por el gen *todB* y el tercer componente que es una proteína con hierro y azufre que posee, una subunidad grande (TodC1) y otra pequeña (TodC2) (Gibson et al., 1990).

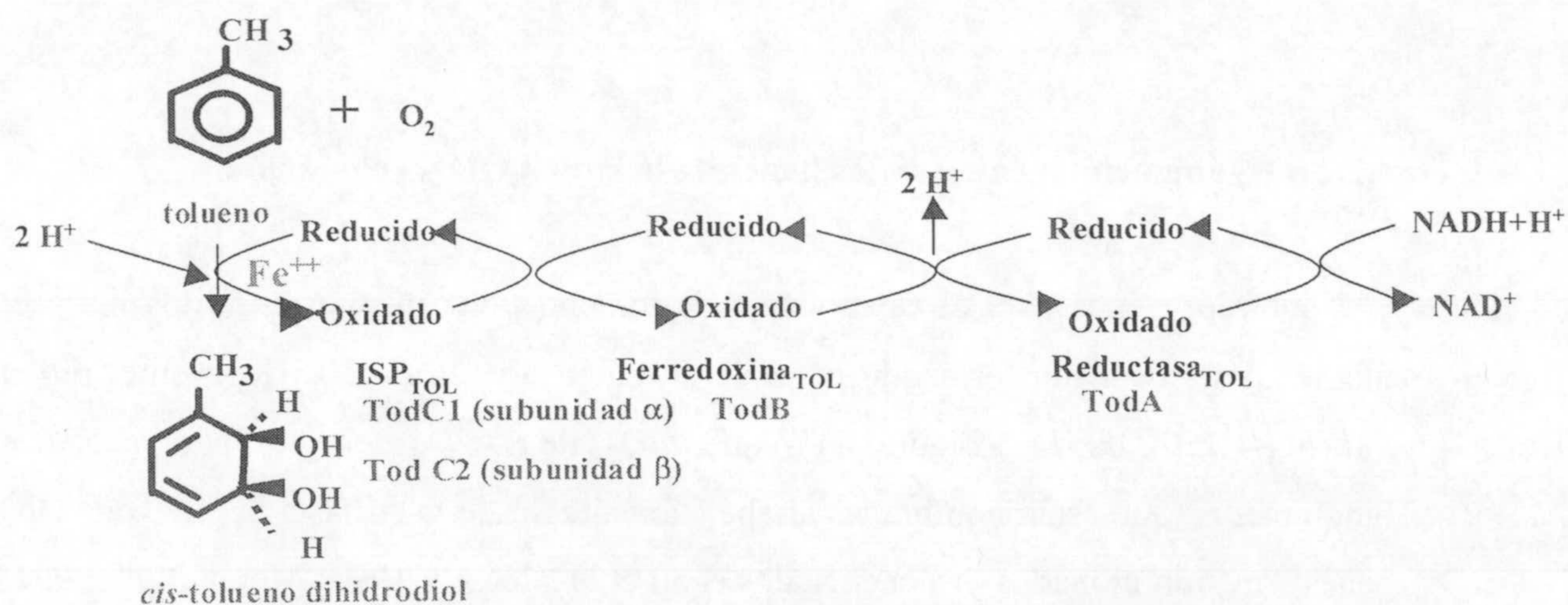


Figura 9. Flujo de electrones en el sistema TOD. Los electrones son transferidos desde el NADH a través de una flavoproteína reductasa (Reductasa_{TOL}) hasta una proteína Rieske [2Fe-2S] (Ferredoxina_{TOL}). Ésta última reduce el componente de la oxigenasa, una proteína hierro-azufre (ISP_{TOL}), la cual en presencia de hierro ferroso exógeno cataliza la adición estereoespecífica de O₂ al núcleo aromático (Subramanian et al., 1979, 1981 y 1985; Jiang et al., 1999).

Tras la formación del *cis*-tolueno dihidrodiol, la enzima *cis*-dihidrodiol deshidrogenasa (codificado por el gen *todD*) reduce NAD^+ a NADH y oxida el *cis*-tolueno dihidrodiol a 3-metilcatecol. La enzima 3-metilcatecol-2,3-dioxigenasa, codificada por el gen *todE*, transforma al 3-metilcatecol en 2-hidroxi-6-oxohepta-2,4-dienoato (HOHD). Los genes *todFGHI* codifican las enzimas necesarias para el paso del HOHD hasta piruvato y acetil-CoA (Figura 10). Esta ruta es la única vía de degradación de tolueno en *P. putida* DOT-T1E, ya que un mutante en uno de sus genes (*todC1*) es incapaz de crecer con tolueno como única fuente de carbono (Mosqueda et al., 1999).

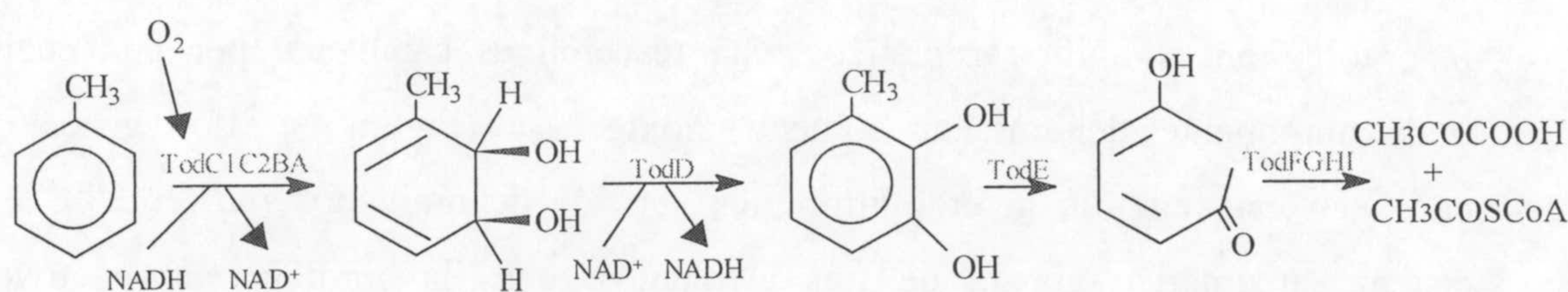


Figura 10. Degradación de tolueno a través de la ruta codificada por el operón TOD. Se indican los enzimas necesarios para cada paso: TodC1C2BA, tolueno dioxigenasa; TodD, *cis*-tolueno dihidrodiol deshidrogenasa; TodE, 3-metilcatecol-2,3-dioxigenasa; TodF, 2-hidroxi-6-oxohepta-2,4-dienoato hidrolasa; TodG, 2-hidroxi-penta-2,4-dienoato hidratasa; TodH, 4-hidroxi-2-oxovalerato aldolasa; TodI, aldehído deshidrogenasa acilante.

4.2.2. Organización génica de los genes de la ruta TOD y regulación

Todos los genes para el catabolismo de tolueno por esta ruta descritos hasta el momento se localizan formando parte de un único operón de 10,3 Kpb en el orden *todXFC1C2BADEGIH* (Figura 11), que no refleja el orden de las reacciones bioquímicas (que están nombradas alfabéticamente desde la A hasta la H). Todos los genes han sido clonados y secuenciados (Lau et al., 1994 y 1997; Menn et al., 1991; Wang et al., 1995; Zylstra y Gibson, 1989; Mosqueda et al., 1999), y se ha determinado su función proteica correspondiente.

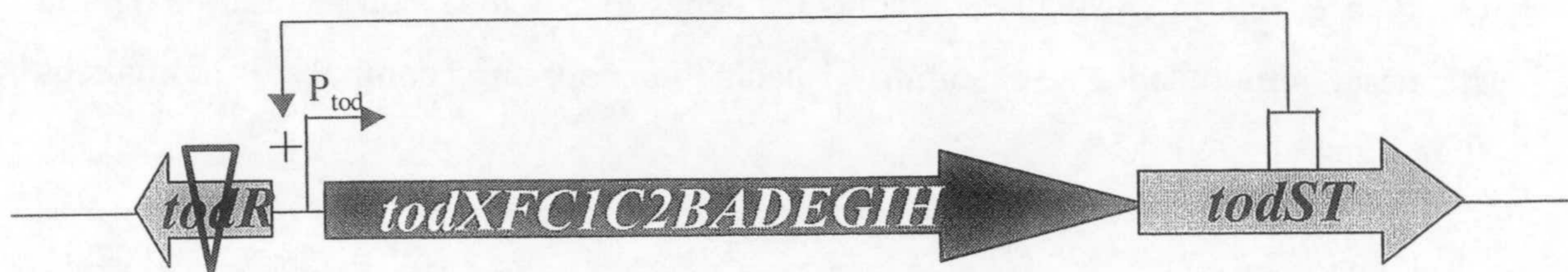


Figura 11. Organización genética del operón TOD y sus genes reguladores de *P. putida* F1. El símbolo ∇ sobre *todR* indica que este gen está interrumpido por un elemento de inserción. Se desconoce si el gen *todR* está también presente en la cepa *P. putida* DOT-T1E. El resto de elementos de la ruta sí se han encontrado en *P. putida* DOT-T1E con una alta identidad respecto a los genes de *P. putida* F1.

El gen *todR* de *P. putida* F1, que se transcribe divergentemente con respecto a *todX*, está truncado debido a la presencia de un elemento de inserción. Presenta homología con el dominio de unión a ADN de la familia de reguladores transcripcionales LysR. Su actividad no es necesaria para el metabolismo de tolueno en esta cepa. El gen *todX* codifica una proteína de membrana que presenta una elevada similitud con la proteína FadL de *E. coli*; ésta es una proteína de membrana externa, implicada en la unión y en el transporte de ácidos grasos de cadena larga (Wang et al., 1995). Aunque se ha especulado que el producto del gen *todX* podría facilitar la entrada de tolueno, se sabe que no es necesario para el crecimiento de la cepa en tolueno (Lau et al., 1997).

Aguas abajo del gen *todH*, se ha encontrado un sistema de regulación de dos componentes, *todST*, que activa la expresión de la ruta de degradación de tolueno en *P. putida* F1. El gen *todS* codifica una proteína híbrida histidín-quinasa que tiene dos componentes importantes: uno que presenta un dominio en cremallera de leucina en la región amino terminal, y otro que presenta un doble motivo histidín-quinasa. Se ha sugerido que la presencia de este motivo duplicado histidín-quinasa en la proteína podría implicar el funcionamiento de ésta como un sensor que responde tanto a la presencia de tolueno como a otras señales de estrés oxidativo, aunque aún no se ha examinado experimentalmente. TodT es el regulador de respuesta, cuya forma fosforilada parece que activa la expresión de los genes estructurales del operón TOD (Lau et al., 1997). Aunque todavía no se ha determinado el mecanismo de acción de este sistema, lo que sí está claro es que el sistema formado por los genes *todST*

interviene en la regulación de la expresión del operón TOD tanto en *P. putida* F1 como en *P. putida* DOT-T1E. Además los genes *todS* y *todT* son necesarios para la respuesta quimiotáctica de *P. putida* F1 hacia tolueno y otros compuestos aromáticos (Parales et al., 2000).

5. MECANISMOS DE TOLERANCIA A DISOLVENTES ORGÁNICOS

Los disolventes orgánicos producen un efecto tóxico en los microorganismos, siendo éste más o menos grave dependiendo de la toxicidad inherente del disolvente y de la tolerancia intrínseca de la especie bacteriana (o de la cepa). Al inicio de esta Tesis Doctoral se conocían algunos mecanismos de tolerancia a disolventes en bacterias gram-negativas: (a) alteraciones adaptativas de los ácidos grasos de la membrana y de la composición de los grupos de cabeza de los fosfolípidos; (b) formación de vesículas cargadas con los compuestos tóxicos; y (c) bombas de eflujo activas dependientes de energía pertenecientes a la familia denominada de resistencia-nodulación-división celular (RND), que exportan los disolventes orgánicos al medio externo. De estos mecanismos, los cambios en el perfil de fosfolípidos y el transporte de disolventes hacia el exterior son comunes a diferentes cepas (Tabla 1). Los cambios más significativos en cuanto a fosfolípidos son un incremento en la temperatura de fusión de las membranas mediante la rápida isomerización *cis/trans* de los ácidos grasos insaturados y la modificación en los grupos de cabeza de los fosfolípidos. Las bombas de eflujo de tolueno están involucradas en la tolerancia a disolventes orgánicos en varias cepas gram-negativas (Segura et al., 1999). Las bombas AcrAB-TolC y AcrEF-TolC se habían identificado como importantes para la tolerancia a *n*-hexano en *E. coli* (Ma et al., 1993; Nikaido, 1996; White et al. 1997); y las bombas de *P. aeruginosa*, MexAB-OprM, MexCD-OprJ, y MexEF-OprN (Li et al., 1998; Li y Poole, 1999), también se habían implicado en la expulsión de disolventes, entre otros compuestos. Al inicio de esta Tesis Doctoral se sabía que al menos dos bombas de eflujo (TtgABC y TtgDEF) estaban implicadas en la expulsión de tolueno en *P. putida* DOT-T1E (Ramos et al., 1998; Mosqueda y Ramos, 2000). El funcionamiento de estas bombas parece estar acoplado a la transferencia de energía dependiente de la fuerza protón motriz vía el

sistema TonB (Godoy et al., 2001) aunque los mecanismos íntimos de transferencia de energía no se conocen. Aunque la importancia de cada uno de estos mecanismos en la tolerancia a disolventes no es la misma, trataremos los rasgos críticos de cada una de estas estrategias seguidas por las bacterias gram-negativas para sobrevivir (o incluso prosperar) en presencia de compuestos que son normalmente tóxicos para las bacterias.

La toxicidad de un disolvente se correlaciona con el logaritmo del coeficiente de partición de un disolvente en una mezcla definida de octanol-agua ($\log P_{ow}$) (Sikkema et al., 1995). Una de las funciones principales de la membrana celular de un microorganismo es la de formar una barrera de permeabilidad que regula el paso de solutos entre la célula y el medio (Nikaido, 1996 [a] y 1999), y es de vital importancia para los procesos de transducción de energía de la célula (Sikkema et al., 1992). Los disolventes orgánicos con un $\log P_{ow}$ entre 4,0 y 1,5 aproximadamente, como benceno ($\log P_{ow}$ 2,13), tolueno ($\log P_{ow}$ 2,69), octanol ($\log P_{ow}$ 2,92), xilenos ($\log P_{ow}$ 3,12-3,2), y estireno ($\log P_{ow}$ 2,95), son extremadamente tóxicos para los microorganismos porque se acumulan en la membrana citoplasmática y alteran la estructura de la misma, provocando la pérdida de iones, metabolitos, lípidos y proteínas; la disipación del gradiente de pH y del potencial eléctrico; e inhibiendo el funcionamiento de las proteínas de membrana. Estos daños a menudo conducen a la lisis de las células (de Smet et al., 1978; Sikkema et al., 1992). La toxicidad de un disolvente no depende solamente de sus propiedades, sino también de la tolerancia intrínseca de las especies y cepas bacterianas. Por ejemplo, ciertas cepas de *Escherichia coli* son tolerantes a ciclohexano ($\log P_{ow}$ 3,44), mientras que otras son sensibles (Aono et al., 1991). A pesar de que la mayoría de los microorganismos son altamente sensibles a los disolventes con $\log P_{ow}$ entre 2,0 y 4,0 (Sikkema et al., 1995) existen varias especies de *Pseudomonas* que se aislaron por su capacidad de crecer en presencia de altas concentraciones de disolventes orgánicos tóxicos tales como tolueno, estireno y *p*-xileno (Cruden et al., 1992; Inoue y Korikoshi, 1989; Kim et al., 1998; Ramos et al., 1995; Weber et al., 1994). Algunas de estas cepas de *Pseudomonas* no sólo son resistentes en un sistema de dos fases a los compuestos aromáticos señalados arriba, sino que también pueden usar estos compuestos como

fuentes de carbono y energía (Cruden et al., 1992; Ramos et al., 1995; ver apartados 3 y 4 de esta Introducción).

Tabla 1. Cepas de *Pseudomonas putida* tolerantes a disolventes orgánicos y sus características. “+” indica que el mecanismo se ha encontrado en la cepa; “-“ indica que no se ha encontrado; “n.d.” quiere decir que no se ha determinado.

cepa	isomerización <i>cis/trans</i>	bombas de eflujo	formación de vesículas	referencias
IH-2000	n.d.	n.d.	+	Kobayashi et al., 2000
DOT-T1E	+	+	+	Mosqueda y Ramos, 2000; Ramos et al., 1995, 1997, 1998
S12	+	+	n.d.	Heipieper y de Bont, 1994; Heipieper et al., 1992; Kieboom et al., 1998a y b
MTB6	+	+	n.d.	Huertas et al., 2000
GM73	-	+	n.d.	Kim et al., 1998
F1	+	+	n.d.	Huertas et al., 2000

Aunque el metabolismo de los compuestos tóxicos puede ayudar a reducir su toxicidad, dos líneas de evidencias sugieren que este mecanismo es de menor importancia en la protección de la viabilidad celular en presencia de disolventes. Por un lado algunos microorganismos tolerantes a un disolvente orgánico en particular no pueden metabolizarlo, por ejemplo, *E. coli* K12 tolera hasta el 1% (vol/vol) de *n*-hexano ($\log P_{ow}$ 3,9), pero no lo utiliza (o biotransforma) (Aono et al., 1991). Igualmente, algunas cepas de *Pseudomonas* tolerantes a concentraciones supersaturantes de tolueno no utilizan este hidrocarburo como fuente de carbono (Inoue y Korikoshi, 1989). Por otro lado, y como ya se ha dicho con anterioridad, *Pseudomonas putida* DOT-T1E es una cepa tolerante a tolueno que degrada este compuesto a través de la ruta de la tolueno dioxigenasa (TOD). Sin embargo, mutantes incapaces de metabolizar tolueno son igual de tolerantes a este disolvente que la cepa silvestre (Mosqueda et al., 1999).

La toxicidad del octano ($\log P_{ow}$ 4,9) en *Pseudomonas oleovorans* GP12, que porta el plásmido OCT para el metabolismo de alcanos, es el resultado del metabolismo del alcano a su correspondiente alcohol, octanol ($\log P_{ow}$ 2,92), que es más tóxico que el alcano (Chen et al., 1995). De todo esto se deduce que el

metabolismo de un compuesto y la tolerancia hacia el mismo son dos hechos a priori no relacionados.

A continuación se describen a grandes rasgos los diversos mecanismos implicados en la tolerancia a disolventes orgánicos por bacterias del género *Pseudomonas*.

5.1. Alteración de la composición de fosfolípidos de las membranas debido a la exposición a disolventes orgánicos

Las etapas iniciales del daño que sufren las células bacterianas cuando son expuestas disolventes orgánicos son la interacción con el disolvente y su penetración en la membrana lipídica (Sikkema et al., 1995). Como consecuencia, la fluidez de la membrana se ve afectada y las bacterias ponen en marcha las respuestas encaminadas a disminuir estos efectos nocivos. La fluidez de la membrana se reajusta primero mediante la alteración de la bicapa lipídica a través de mecanismos compensatorios que recuerdan a los observados en respuesta a otros estreses químicos y físicos impuestos por el ambiente (Keweloh y Heipieper, 1996; Ramos et al., 2001; Russell y Fukunaga, 1990). Las siguientes subsecciones discuten las principales respuestas de las bacterias para reajustar la composición de la membrana ante la exposición a disolventes orgánicos.

5.1.1. Cambios en la composición de los ácidos grasos

Existen dos mecanismos principales para cambiar la composición de los ácidos grasos esterificados de la bicapa lipídica bacteriana, y con ello la fluidez de la membrana: isomerización *cis/trans* de ácidos grasos insaturados como respuesta inmediata (a corto plazo) y cambios en la razón ácidos grasos saturados/insaturados, como respuesta más lenta (a largo plazo) ante la presencia de disolventes. La razón de ácidos grasos de cadena corta/cadena larga también se puede alterar para regular la fluidez de la membrana.

5.1.1.1. Isomerización *cis/trans* de ácidos grasos

El comportamiento estérico de los ácidos grasos con configuración *trans* y de los ácidos grasos saturados es similar: ambos poseen una conformación alargada que permite un empaquetamiento más denso de la membrana. Por el contrario, la configuración *cis* de la cadena carbonada conlleva la presencia de un ángulo no movable de 30° que causa impedimento estérico y distorsiona el empaquetamiento de los ácidos grasos. Los ácidos grasos *cis* tienen una menor temperatura de transición de fase que los isómeros *trans* correspondientes (Keweloh y Heipieper, 1996). La configuración *cis* es la mayoritaria en la composición de los ácidos grasos insaturados esterificados localizados en la membrana de la mayoría de las bacterias Gram-negativas. Aunque se han encontrado isómeros *trans* en las membranas de algunos microorganismos en proporciones minoritarias. De hecho, el análisis de la composición de ácidos grasos de *P. putida* DOT-T1E muestra la presencia de ácidos grasos *trans* (Tabla 2).

Varias cepas de *P. putida* responden a disolventes y a compuestos aromáticos mediante la alteración de la razón *cis/trans* cuando se exponen a productos como fenol, 4-clorofenol, tolueno, xilenos, o alcoholes alifáticos con diferente longitud de cadena (Heipieper y de Bont, 1994; Heipieper et al., 1992; Keweloh et al., 1990; Keweloh y Heipieper, 1996; Pinkart y White, 1997; Pinkart et al., 1996; Ramos et al., 1995 y 1997; Weber et al., 1994). Estas cepas de *Pseudomonas* aumentan principalmente el contenido en isómeros *trans* del ácido palmitoleico (C16:1,9) y del ácido vaccénico (C18:1,11) (Tabla 2). Los isómeros *trans* son sintetizados directamente a partir del correspondiente isómero *cis* tan sólo 1 minuto después de la exposición al disolvente, sin cambio en la posición del doble enlace (Loffeld y Keweloh, 1996; Ramos et al., 1997). Dado que los disolventes orgánicos incrementan la fluidez de la membrana, un aumento en el contenido de ácidos grasos *trans* contrarrestaría esta alteración.

Tabla 2. Ácidos grasos presentes en la membrana de *P.putida* DOT-T1E. Los valores son el porcentaje de ácidos grasos en las células cultivadas en medio LB (verde) y en medio LB con tolueno suministrado en la fase gaseosa (rojo), en fase exponencial y estacionaria de crecimiento. “va” significa ácido vaccénico. (Obtenido de Godoy y Ramos, comunicación personal).

ácido graso	f. exponencial	f. estacionaria	f. exponencial tol (g)	f. estacionaria tol (g)
C _{14:0}	0,31	0,6	0,38	0
C _{16:1,9} <i>cis</i>	35	12,3	26,3	6,44
C _{16:1,9} <i>trans</i>	1,8	2,2	8,96	24,73
C _{16:0}	34	55	38,64	40,93
C _{17:ciclopropano}	1,6	18	0,23	4,11
C _{18:1,11} <i>cis</i> va	26	13	24,66	8,85
C _{18:1,11} <i>trans</i> va	0	0,4	0	14,1
C _{18:0}	0,8	0,6	0,82	0,82

Se han clonado y secuenciado los genes de las *cis/trans* isomerasas (*cti*) de *P. putida* P8 (Holtwick et al., 1997), *P. putida* KT2440, *P. putida* DOT-T1E (Junker y Ramos, 1999) y *P. oleovorans* Gpo12 (Pedrotta y Witholt, 1999). Todas ellas presentan un 95% de identidad a nivel de las secuencias de aminoácidos deducidas. El gen de la *cti* de *P. putida* DOT-T1E (y de las otras cepas) se expresa de forma constitutiva, y pese a que la enzima debe estar presente en la célula de forma permanente, la Cti sólo es funcional en presencia de disolventes orgánicos o ante un incremento de temperatura (Junker y Ramos, 1999; Pedrotta y Witholt, 1999).

La enzima Cti de *P. oleovorans* Gpo12 ha sido la única purificada hasta homogeneidad hasta el momento (Pedrotta y Witholt, 1999). Parece ser un monómero de alrededor de 70 kDa, y comparando la secuencia N-terminal de la proteína madura con la deducida a partir de la secuencia de nucleótidos del gen *cti*, se observa la liberación de un péptido señal del producto original del gen. De hecho, la presencia de este péptido en ésta y en otras Cti había sido predicho por análisis de secuencias. La enzima purificada funciona *in vitro* con ácidos grasos libres como substratos (los substratos preferidos fueron ácido *cis*-9-hexadecenoico, *cis*-11-octadecenoico, y *cis*-13-eicosénico). Sin embargo, la enzima purificada no isomerizó fosfolípidos *in vitro*. En contraste, cuando se utilizaron membranas de *E. coli* o

Pseudomonas spp. como fuentes de fosfolípidos, la isomerización *cis/trans* se detectó sólo en presencia de disolventes orgánicos.

Las bases moleculares de la activación de esta enzima periplásmica es una de las grandes incógnitas a resolver. Aún no se entiende cómo las células perciben la presencia de disolventes orgánicos para modificar la razón de ácidos grasos insaturados *cis/trans*. Si la hipótesis presentada por Pedrotta y Witholt (1999) es correcta, se esperaría que bajo condiciones de estrés inducido por disolventes, aumentase el recambio de fosfolípidos, la isomerasa alcanzase el doble enlace de la cadena insaturada del ácido graso libre, y que los ácidos grasos se incorporasen en las cabezas de los fosfolípidos. Éste es un mecanismo muy complejo que no está de acuerdo con los datos que confirman que hay actividad Cti en células en reposo (*resting cells*) y en la completa ausencia de fuentes de energía, puesto que al menos para la reincorporación del fosfolípido a la membrana se requeriría energía (Heipieper et al., 1992). Se baraja otra hipótesis sobre el funcionamiento de la Cti; a saber, debido al efecto fluidificante de los disolventes orgánicos, el doble enlace de los ácidos grasos insaturados de los fosfolípidos se haría más accesible al centro activo de la enzima, permitiendo que llevase a cabo la isomerización *cis/trans*. De acuerdo con esta hipótesis está el hecho de que la regioespecificidad observada refleja la penetración del centro activo de la enzima solamente hasta una profundidad determinada en la membrana (Chen et al., 1995 [b]). Esto permitiría que la rigidificación de la membrana pudiese estar regulada sin la intervención de un mecanismo indirecto de señalización. Este modelo de la regulación de la actividad de la Cti también explicaría lo que se ha descrito muchas veces como una correlación entre la mayor isomerización *cis/trans* a mayor toxicidad del agente de estrés ambiental (Heipieper et al., 1995 y 1996).

Merece la pena destacar que la razón de ácidos grasos insaturados *cis/trans* cambia también en respuesta a otros agentes de estrés, tales como temperatura, aumento de la concentración de sales (Chen et al., 1995; Heipieper, et al., 1996; Keweloh y Heipieper, 1996), transformación de octano en octanol (Chen et al., 1995), y la exposición de las células a metales pesados (Godoy y Ramos, datos sin publicar). Esto sugiere que la isomerización *cis/trans* es un mecanismo general de defensa más que una estrategia específica de tolerancia a disolventes orgánicos.

Junker y Ramos (1999) generaron un mutante Cti de *P. putida* DOT-T1E que era incapaz de isomerizar ácidos grasos insaturados *cis*. La cepa mutante en Cti exhibía una fase de latencia mayor que la de la cepa silvestre cuando se cultivó en medio mínimo y se suministraba tolueno a través de la fase gaseosa como única fuente de carbono; siendo además la cepa mutante más sensible que la silvestre frente a choques con 0,08% (vol/vol) de tolueno. Además el mutante Cti crecía significativamente más despacio a 37°C que la cepa silvestre. Por tanto, la isomerización *cis/trans* de los ácidos grasos de los fosfolípidos favorece la supervivencia de *P. putida* DOT-T1E en respuesta a tolueno y a altas temperaturas.

La isomerización *cis/trans* de ácidos grasos esterificados representa por tanto, una respuesta rápida a un estrés ambiental en *P. putida*. Esto permite a la célula adaptarse inmediatamente a las nuevas condiciones ambientales bajo las cuales un empaquetamiento más denso de la membrana es una ventaja selectiva. De esta manera la célula gana tiempo para la síntesis *de novo* de los componentes de membrana, un proceso que permite ajustarse más precisamente a estreses específicos.

5.1.1.2. Razón ácidos grasos saturados/insaturados

El incremento en el contenido de ácidos grasos saturados de los fosfolípidos en *E. coli* y en especies de *Vibrio* es una respuesta bien conocida ante cambios de temperatura y exposición a alcoholes (Cronan, 1968; Suutari y Laakso, 1994; Ingram, 1997; Hamamoto et al., 1994). En *P. putida* Idaho se ha descrito que comienza a incrementar el contenido de ácidos grasos saturados 15 minutos después de la exposición al disolvente, alcanzando un nivel máximo tras 2 horas de exposición a *o*-xileno (Pinkart y White, 1997); este mecanismo de adaptación está considerado una respuesta a largo plazo. Este efecto también se ha observado en *Pseudomonas putida* P8. Sin embargo, otras cepas de *Pseudomonas* no alteran su razón de ácidos grasos saturados/insaturados en respuesta a disolventes orgánicos (Weber et al, 1994). En este caso se encuentra *P. putida* DOT-T1E, que no varía esta proporción tras su exposición a distintos disolventes orgánicos (Ramos et al., 1997).

5.1.2. Cambios en los grupos de cabeza de los fosfolípidos

Los cambios en los grupos de cabeza de los fosfolípidos también influyen en la fluidez de membrana. Estos cambios son un fenómeno poco estudiado, por lo que se dispone sólo de pocos datos (Weber y de Bont, 1996). Los principales tipos de fosfolípidos en distintas cepas de *P. putida* son fosfatidiletanolamina (PE), fosfatidilglicerol (PG), y difosfatidilglicerol o cardiolipina (CL). Se han analizado los cambios en los grupos de cabeza polares en tres cepas: *P. putida* S12, *P. putida* DOT-T1E, y *P. putida* Idaho. En general, en todas se observó un aumento de los niveles de CL (Weber, 1994; Ramos et al., 1997; Tabla 3). La cardiolipina tiene una mayor temperatura de transición (10°C) que PE, lo cual hace disminuir la fluidez de la membrana y con ello supone un efecto estabilizante (Weber y de Bont, 1996).

Un análisis detallado del recambio de los grupos de cabeza de los fosfolípidos en ausencia y presencia de *o*-xileno en la cepa *P. putida* Idaho reveló que mientras en ausencia del disolvente la incorporación de ^{32}P era mayor en PG, seguida de PE y CL, en presencia de 200 ppm de *o*-xileno, la incorporación de ^{32}P se producía mayoritariamente en PE, seguida muy de cerca por PG. Un incremento en PE para contrarrestar los efectos de los disolventes no es muy común entre las bacterias (Weber y de Bont, 1996), aunque el PE tiene una temperatura de fusión más alta que PG, por tanto, un aumento en PE tiende a estabilizar la membrana celular. Pinkart y White (1997) también demostraron que la isomerización *cis/trans* de ácidos grasos insaturados ocurría principalmente en los ácidos esterificados en PE como grupo de cabeza. Por todo esto, parece que las distintas cepas de *Pseudomonas* han desarrollado estrategias diferentes para cambiar la composición de los grupos de cabeza de los fosfolípidos con el fin de incrementar la rigidez de la membrana así reparar los efectos dañinos de los disolventes.

Tabla 3. Porcentaje de los grupos de cabeza de los fosfolípidos de membrana de *P. putida* DOT-T1E. Los grupos de cabeza se midieron en la fase exponencial tardía en cultivos en LB y en LB con 1% (vol/vol) de tolueno.

(Ramos et al., 1997)

PE= fosfatidiletanolamina; PG= fosfatidilglicerol; CL=cardiolipina.

disolvente orgánico	PE	PG	CL
ninguno	78	12	10
tolueno (1% vol/vol)	65	9	26

5.1.3. Cambios en la velocidad de síntesis de los ácidos grasos

El análisis de la biosíntesis de fosfolípidos en la cepa tolerante *P. putida* Idaho mostró que el nivel basal de biosíntesis de fosfolípidos era mayor en esta cepa que en cepas sensibles a disolventes de la misma especie y que la velocidad de biosíntesis aumentaba en respuesta a la exposición de concentraciones subletales de disolventes orgánicos (Pinkart y White, 1997). En la cepa *P. putida* Idaho cultivada en un quimiostato con succinato como fuente de C, la cantidad total de ácidos grasos de fosfolípidos de membrana aumentaba con la exposición de las células a *o*-xileno. Esto contrastaba con los resultados obtenidos con la cepa sensible a disolventes *P. putida* MW1200 en quimiostatos equivalentes. La diferencia en el resultado sugiere que la cepa Idaho podría reparar mejor que la cepa sensible MW1200 las membranas dañadas. Esto se obtendría mediante un recambio eficiente y un incremento en la biosíntesis de fosfolípidos (Pinkart y White, 1997). El hecho de que la velocidad de biosíntesis de fosfolípidos fuese mayor tras la exposición a *o*-xileno que en ausencia del compuesto aromático sugiere que este aumento en la velocidad es un fenómeno inducible. Recientemente, Segura y colaboradores (2004) han identificado un mutante sensible a tolueno de *P. putida* DOT-T1E incapaz de incorporar $^{13}\text{CH}_3$ - $^{13}\text{COOH}$ en ácidos grasos en presencia de cantidades subletales de tolueno. El recambio limitado en el metabolismo de ácidos grasos en esta cepa mutante

contribuye a la pérdida de la integridad de la membrana en presencia de disolventes, y el consecuente aumento de la sensibilidad a estos compuestos.

Estos resultados sugieren que los cambios en la velocidad de biosíntesis de fosfolípidos y la alteración de la composición de fosfolípidos son respuestas específicas de la célula ante la presencia de disolventes orgánicos tóxicos.

5.1.4. Alteración de lipopolisacáridos

Los lipopolisacáridos (LPS) de las bacterias gram-negativas son uno de los principales componentes de la membrana externa y son considerados como una barrera de defensa. En varias cepas de *P. putida* la adición de altas concentraciones de cationes divalentes (Mg^{2+} y Ca^{2+}) al medio de cultivo con disolventes orgánicos supuso un incremento en la supervivencia (Inoue y Horikoshi, 1989; Ramos et al., 1995; Weber y de Bont, 1996). La hipótesis que se desarrolló a partir de estos datos fue que los cationes divalentes se unirían electrostáticamente a las moléculas polianiónicas adyacentes de LPS y así reducirían la repulsión de cargas. Los cationes permitirían un empaquetamiento más denso de las moléculas aniónicas de las membranas. Sin embargo, varias evidencias sugieren que los LPS juegan un papel menor, si alguno acaso en la respuesta a disolventes. En este sentido, un mutante en el gen *wbpL* de *P. putida* DOT-T1E, que codifica la enzima que inicia la síntesis de la cadena lateral del antígeno-O de los LPS fue tan tolerante como la cepa silvestre a disolventes orgánicos (tolueno, octanol, *p*-xileno, propilbenceno, y heptano [Junker et al., 2001]).

5.2. Bombas de eflujo y expulsión de disolventes

Durante el transcurso de la evolución, las bacterias han estado expuestas a diferentes compuestos tóxicos tales como toxinas naturales, productos finales del metabolismo endógeno, y antibióticos. Como protección, los microorganismos han desarrollado diferentes mecanismos para detoxificar y expulsar estas sustancias. Un grupo de estos mecanismos lo constituyen los sistemas de eflujo inespecífico de

compuestos tóxicos (MDR, *multidrug resistance*). Estos sistemas catalizan la expulsión activa de compuestos biogénicos y xenobióticos no relacionados estructural o funcionalmente, desde el citoplasma celular o la membrana interna, hacia el medio externo (Lomovskaya et al., 1999 y 2001). Las evidencias experimentales indican que las características físico-químicas de los compuestos (carga, hidrofobicidad, o anfipatía), las interacciones de van der Waal que establecen éstos con los residuos de los sitios activos, y la flexibilidad de estos sitios para acomodar distintas moléculas, son los factores determinantes de la relajada especificidad de estos sistemas de eflujo (Neyfakh, 2001; Murakami et al., 2002; Yu et al., 2003 [a]).

Las bombas de eflujo MDR han sido objeto de numerosas revisiones recientes. Se han identificado cinco familias de bombas MDR en bacterias: la superfamilia de facilitadores mayores (MFS, *major facilitator superfamily*), la familia de casetes de unión a ATP (ABC, *ATP-binding cassette*), la familia RDN (del inglés, *resistance, nodulation, division*), la familia de proteínas de bajo peso molecular que confieren resistencia a múltiples compuestos (SMR, *small multidrug resistance*), y la familia de extrusión de múltiples antibióticos y compuestos tóxicos (MATE, *multidrug and toxic compound extrusion*) (Poole, 2001; Putman et al., 2000; Paulsen et al., 2001). Todas las bombas de eflujo de disolventes orgánicos identificadas hasta ahora en bacterias gram-negativas pertenecen a la familia RND (Tabla 4). Se han descrito sistemas RND en organismos tan distintos como *Stenotrophomonas maltophilia*, *Burkholderia cepacia*, *Burkholderia pseudomallei*, *Haemophilus influenzae*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, y *Pseudomonas putida* (Poole, 2001 [a y b]).

Tabla 4. Bombas de expulsión de disolventes de la familia RND en bacterias gram-negativas. RND es el componente central de la bomba; MFP quiere decir proteína de fusión periplásmica; y OMP significa proteína de membrana externa. Los números entre paréntesis indican el tamaño de cada proteína en aminoácidos.

RND	MFP	OMP	Especie	Referencias
AcrB (1049)	AcrA (397)	TolC (495)	<i>E. coli</i>	Aono et al., 1998; Fralick, 1996; Zgusrkaya y Nikaido, 1999
AcrF (1034)	AcrE (385)	TolC (495)	<i>E. coli</i>	Kobayashi et al., 2001; Ma et al., 1993
MexB (1046)	MexA (383)	OprM (485)	<i>P. aeruginosa</i>	Li et al., 1998
MexD (1046)	MexC (387)	OprJ (479)	<i>P. aeruginosa</i>	Poole et al., 1996 [a]
MexF (1062)	MexE (414)	OprN (472)	<i>P. aeruginosa</i>	Köhler et al., 1997
TtgB (1050)	TtgA (384)	TtgC (484)	<i>P. putida</i>	Ramos et al., 1998
TtgE (1048)	TtgD (382)	TtgF (470)	<i>P. putida</i>	Mosqueda y Ramos, 2000
SrpB (1049)	SrpA (382)	SrpC (470)	<i>P. putida</i>	Kieboom et al., 1998 [a y b]; Kim et al., 1998
ArpB (1050)	ArpA (371)	ArpC (484)	<i>P. putida</i>	Fukimori et al., 1998

La característica fundamental de las bacterias gram-negativas es la presencia de una membrana interna y otra externa separadas por el espacio periplásmico (Nikaido, 1996 [a]). Las bombas RND de las bacterias gram-negativas transportan sustancias tóxicas a través de ambas membranas de la envoltura celular en un único paso acoplado a la generación de la fuerza protón motriz (Nikaido, 1996[b]). Estas bombas de eflujo están formadas por tres componentes: una translocasa localizada en la membrana citoplasmática, que actúa como una bomba dependiente de energía, una proteína de fusión de membrana (MFP), y una proteína de membrana externa (OMP) (Koronakis et al., 2000; Zgusrkaya y Nikaido, 1999).

Al comienzo de esta Tesis Doctoral se sabía que bombas de esta familia en *E. coli* y *P. aeruginosa*, tradicionalmente implicadas en resistencia antibióticos, también eran capaces de transportar disolventes orgánicos. Además en *P. putida* DOT-T1E se conocían ya dos bombas de eflujo de disolventes. A continuación expongo el estado del tema al inicio de esta Tesis Doctoral. Durante su desarrollo se han publicado nuevos datos, sobre todo en relación a la estructura de los componentes de las bombas, que se discutirán en el contexto de los Resultados de este trabajo en sucesivos capítulos.

5.2.1. Bombas de eflujo de la familia RND en *Escherichia coli*

Las cepas de *E. coli* son en general muy sensibles a disolventes orgánicos, y la mayoría de las cepas sólo sobrevive en presencia de disolventes con un $\log P_{ow} \geq 4$. Muchos de los estudios relacionados con tolerancia a disolventes en *E. coli* se han realizado con la cepa JA300. Aono et al. (1991 y 1995) aislaron clones resistentes espontáneos a ampicilina y cloramfenicol de la cepa JA300, que además mostraban tolerancia a disolventes orgánicos como ciclohexano ($\log P_{ow}$ 3,44), *n*-pentano ($\log P_{ow}$ 3,39), o *p*-xileno ($\log P_{ow}$ 3,15). Estos resultados indicaban que algunos de los sistemas que contribuyen a la tolerancia ante diversos antibióticos también participaban en la tolerancia a disolventes orgánicos. Éstos fueron los primeros trabajos que establecieron una conexión entre la tolerancia a disolventes orgánicos y la resistencia a antibióticos. Una caracterización más profunda de estos mutantes reveló que el principal mecanismo en *E. coli* para la expulsión de disolventes orgánicos era el sistema AcrAB-TolC. En este sistema, la proteína TolC es la OMP (Aono et al., 1998; Fralick et al., 1996), AcrA es la MFP, y AcrB es la translocasa (de la familia RND) (Ma et al., 1995).

5.2.1.1. La bomba AcrAB-TolC como modelo de bomba de eflujo de la familia RND

La bomba AcrAB-TolC es capaz de transportar acriflavina, β -lactámicos, sales biliares, cloramfenicol, cristal violeta, bromuro de etidio, eritromicina, ácidos grasos, ácido fusárico, novoviocina, aceite de pino, SDS, y tetraciclina entre otros compuestos (ver Tabla 5). La translocasa AcrB es una proteína de membrana interna que posee 12 α -hélices transmembrana y 2 grandes dominios proyectados hacia el periplasma (Saier et al., 1994; Thanassi et al., 1998). El transportador AcrB utiliza la fuerza protón-motriz como fuente de energía para transportar los substratos, ya que la actividad se inhibe en presencia de conductores de protones como CCCP y FCCP (Zgurskaya y Nikaido, 1999 [a y b]). La reciente cristalización de AcrB (Murakami et al., 2002; Yu et al., 2003 [b]), ha permitido desentrañar su estructura. AcrB es un homotrímero con forma de medusa. Cada protómero está compuesto por una región

de 50 Å de ancho y una cabeza protuberante de 70 Å. La parte de arriba de la cabeza se abre como un abanico, siendo probablemente el lugar donde encaje la proteína de membrana externa, TolC. En cuanto a la unión con los substratos, las estructuras cristalográficas muestran la unión de una molécula de substrato por subunidad, mediante interacciones hidrófobas y de van der Waals, aunque cada ligando emplea un conjunto distinto de residuos para unirse en la cavidad central de la proteína.

Las proteínas de fusión de membrana (MFP) son lipoproteínas ancladas a la membrana citoplasmática (Ma et al., 1993; Paulsen et al., 2001). La MFP mejor caracterizada hasta ahora es AcrA. Estudios bioquímicos indican que AcrA es una proteína trimérica y que cada monómero de AcrA es asimétrico y alargado (210 Å) (Zgurskaya y Nikaido, 1999 [a]; Avila-Sakar et al., 2001), compatible con la hipótesis de que la proteína se extiende por el espacio periplásmico y coordina la operación concertada de los componentes de membrana interna y externa del complejo de la bomba (Zgurskaya y Nikaido, 1999[a]). Dado que AcrA es muy similar a otras MFPs caracterizadas en otros sistemas de bombas de eflujo (Paulsen et al., 2001), sus características deben estar bien conservadas en otras MFPs.

La proteína de membrana externa TolC es el tercer componente de la bomba AcrAB. La identificación de TolC como el tercer componente de esta bomba se basa en que mutaciones en *tolC* abolieron la resistencia dependiente de AcrAB en *E. coli* (Fralick, 1996). La cristalización de TolC (Koronakis et al., 2000), ha ayudado a clarificar cómo el elemento de la translocasa de la membrana interna de la célula se conecta al medio externo que lo rodea durante el transporte y cómo la expulsión de substratos sobrepasa el espacio periplásmico que queda en medio.

5.2.1.2. Bomba AcrEF-TolC

Kobayashi et al., (2001) demostraron que la sensibilidad a disolventes de un mutante *acrAB* podía ser suprimida. Aislaron mutantes supresores con una alta resistencia a disolventes, los cuales producían altos niveles de las proteínas AcrE y AcrF. Los genes *acrEF* se expresan en condiciones normales a un nivel muy bajo (Ma et al., 1993). Sin embargo, en los mutantes la presencia de una secuencia de inserción IS1 o IS2 aguas arriba de *acrE* condujo a un alto nivel de expresión de este

operón. El producto del gen *tolC* era esencial para la supresión; por lo que AcrEF y TolC están implicados en el transporte de disolventes orgánicos.

Tabla 5. Substratos de las bombas de eflujo RND de *E. coli*, *P. aeruginosa*, y *P. putida*

organismo	bomba	substratos	referencias	
<i>E. coli</i>	AcrAB-TolC	AC, BL, SB, CM, CV, BE, ER, AG, FU, NV, AP, SDS, TC, TX, DO, FQ	Nikaido et al., 1998; Tsukagoshi y Aono, 2000; White et al., 1997	
	AcrEF-TolC	los mismos de AcrAB-TolC	Jellen-Ritter y Kern, 2001	
<i>P. aeruginosa</i>	MexAB-OprM	BL, FQ, CM, NV, TP, TG, SM, BE, AC, CV, SDS, DO, HL, CL, TL, IR, TS, TFF, RD, LM, MU	Poole et al, 1993 [a y b]	
	MexCD-OprJ	BL, FQ, CM, TC, NV, TP, ML, CV, BE, AC, SDS, DO, CL, TS, TG, LM, TFF, RD, BA, CHX, MU	Poole et al., 1996 [a]	
	MexEF-OprN	FQ, CM, TP, DO, TS	Köhler et al., 1997	
	MexXT-OprM	BL, FQ, AG, TC, ER, TG, MU	Aires et al., 1999; Masuda et al., 2000	
	MexJK-OprM	TS, ER, TC, CP	Chuanchuen et al., 2002	
	MexHI-OpmD	VA, HL?	Aendekerk et al., 2002	
	MexVW-OprM	FQ, TC, CM, ER, BE, AC	Li et al., 2003	
<i>P. putida</i>	S12	ArpABC	TC, CM, CB, ST, ER, NV	Kieboom y de Bont, 2001
		SrpABC	DO	Kieboom et al., 1998
	KT2442	MepABC	BL, TC, NV, ER, DO	Fukumori et al., 1998
		SepABC	DO	Phoenix et al., 2003
	DOT-T1E	TtgABC	CM, AMP, TC, CB, NAL, DO, CL	Ramos et al., 1998; Rojas et al., 2001
		TtgDEF	TO, STY	Mosqueda y Ramos, 2000; Rojas et al., 2001

Se muestran las bombas de las que se trata en la Introducción, en rojo las bombas que transportan disolventes orgánicos. Las bombas MepABC y SepABC se han incluido en la tabla, pero no se profundiza en ellas porque son idénticas a las bombas TtgABC y TtgDEF respectivamente de *P. putida* DOT-T1E. Las abreviaturas significan: AC, acriflavina; AG, aminoglicósidos; AMP, ampicilina; AP, aceite de pino; BA, benzalconio; BE, bromuro de etidio; BL, betalactámicos; CB,

carbenicilina; CHX, clorhexidina; CL, cerulenina; CM, cloramfenicol; CP, ciprofloxacina; CV, cristal violeta; DO, disolventes orgánicos; ER, eritromicina; FQ, fluoroquinolonas; FU, ácido fusídico; HL, homoserín-lactonas; IR, irgasán; LM, lincomicina; ML, macrólidos; MU, mureidomicina A y C; NAL, ácido nalidíxico; NV, novobiocina; RD, rodamina; SB, sales biliares; SDS, dodecil sulfato sódico; SM, sulfonamidas; ST, estreptomicina; STY, estireno; TC, tetraciclina; TFF, tetrafenil fosfonio; TG, tigeciclina; TL, tiolactomicina; TO, tolueno; TS, triclosán, TX, Tritón X-100; VA, vanadatos.

5.2.2. Bombas RND de *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa es un patógeno oportunista resistente a múltiples antibióticos. Esta resistencia es el resultado de una sinergia entre la impermeabilidad de la membrana externa y la acción de hasta 7 sistemas de eflujo de la familia RND codificados en su cromosoma: MexAB-OprM, MexCD-OprJ, MexEF-OprN, MexXY-OprM, MexJK-OprM (Poole, 2001 [a]; Poole and Srikumar, 2001; Germ et al., 1999; Li et al., 2000), implicados claramente en la expulsión de distintos antibióticos. Además de estos cinco sistemas, recientemente se han descrito otros dos sistemas de eflujo: MexGHI-OpmD, que proporciona resistencia a vanadio, y está relacionada con procesos dependientes de *quorum sensing* (Aendekerk et al., 2002); y MexVW-OprM (Li et al., 2003), relacionada con el transporte de fluoroquinolonas y otros compuestos (Tabla 5). Cabe destacar la presencia de un elemento extra en el sistema MexGHI-OpmD, aunque el componente MexG no presenta homología con ninguna proteína descrita hasta el momento y no parece ser necesaria para el funcionamiento de la bomba (Aendekerk et al., 2002).

Estas bombas se caracterizan por tener un amplio perfil de substrato (con la excepción de MexGHI-OpmD), siendo capaces de expulsar no sólo antibióticos de distinta estructura, sino también disolventes orgánicos, colorantes, detergentes, inhibidores metabólicos y energéticos, homoserín lactonas, y posiblemente factores de virulencia (Zhang et al., 2001).

MexAB-OprM fue la primera bomba descrita en *Pseudomonas aeruginosa* (Gotoh et al., 1995; Li et al., 1995; Poole et al., 1993 [a y b]). Se expresa constitutivamente en células cultivadas en condiciones estándar de laboratorio, y contribuye a la resistencia intrínseca de un gran número de compuestos tóxicos, como fluoroquinolonas, tetraciclinas, macrólidos, cloramfenicol, trimetoprima, sulfonamidas y lincomicina (Köhler et al., 1996; Masuda et al., 2000). Esta bomba es

además capaz de acomodar disolventes orgánicos (Li et al., 1998; Li y Poole, 1999) y otros muchos compuestos que se recogen en la Tabla 5. MexAB-OprM se hiperexpresa en los mutantes *nalB* (también llamados mutantes *cfxB*) (Köhler et al., 1996; Masuda y Ohya, 1992; Masuda et al. 1995; Poole et al., 1996 [b]; Ziha-Zarifi et al., 1999).

La expresión de la bomba MexCD-OprJ no es detectable en células silvestres, al menos en condiciones de laboratorio (Poole et a., 1996 [a]; Srikumar et al., 1998), aunque es inducible por algunos substratos que no son antibióticos, incluyendo cloruro de tetrametilfosfonio, bromuro de etidio, y acriflavina entre otros (Morita et al., 2001). Esta es una de las bombas de *P. aeruginosa* capaz de transportar disolventes orgánicos (Poole et al., 1996 [a]).

El sistema MexEF-OprN tampoco parece expresarse en condiciones normales de laboratorio en células silvestres (Köhler et al., 1997), aunque se sobreexpresa en mutantes *nfxC* (Fukuda et al., 1990 y 1995). Esta bomba transporta también un amplio abanico de compuestos, entre ellos disolventes orgánicos (Li et al., 1998; Tabla 5).

Se desconoce si los otros sistemas de eflujo de *P. aeruginosa* citados anteriormente contribuyen a la eliminación de disolventes orgánicos.

5.2.3. Regulación de las bombas de eflujo de la familia RND de *E. coli* y *P. aeruginosa*

Los sistemas de bombas de eflujo de la familia RND de bacterias gram-negativas están regulados generalmente por el producto de un gen (o genes) adyacente al operón de la bomba (Grkovic et al., 2002), siendo en la mayoría de los casos represores. En muchos casos la expresión de las bombas viene determinada por mutaciones en estos genes reguladores, aunque los sistema MexCD-OprJ y MexXY son claramente inducibles por reguladores transcripcionales positivos en presencia de los substratos que transportan las bombas de eflujo.

Mediante análisis de secuencia se ha demostrado que el *locus acr* está formado por tres genes organizados en dos operones divergentes: *acrR* y *acrAB* (Ma et al., 1996). El gen *acrR* codifica un regulador transcripcional con un motivo hélice-giro-

hélice en su extremo N-terminal, con homología con los reguladores de la familia TetR. AcrR es el modulador primario del operón *acrAB*, su sobreexpresión reprime la transcripción de *acrAB*, y reprime su propia síntesis.

Wang y colaboradores (2001) analizaron las bases genéticas de la resistencia a fluoroquinolonas en 30 muestras clínicas de *E. coli* procedentes de Pekín (China) con un nivel muy alto de resistencia a fluoroquinolonas. Cada una de estas cepas mostró resistencia a una gran variedad de antibióticos. La proteína AcrA del sistema AcrAB estaba sobreexpresada en 19 de las 30 cepas de *E. coli* probadas, y las 19 cepas toleraron una mezcla de hexano:ciclohexano 3:1 ($\log P_{ow}$ 3,4). Este hecho ligaba inequívocamente la función de AcrR al nivel de expresión del operón *acrAB* y a la tolerancia a disolventes orgánicos.

Asako y colaboradores (1997) observaron altos niveles de expresión de los genes *acrAB* en una serie de mutantes tolerantes a disolventes orgánicos. Algunas de estas mutaciones se localizaron en el gen *marR* (*multiple antibiotic resistance*). El operón *marRAB* está regulado negativamente por la proteína MarR, que se une al promotor *marRAB* (Alekhun y Levy, 1997). La proteína MarA es un regulador positivo que induce un conjunto de genes (los regulones *mar* y *soxRS*) que proporcionan resistencia a un gran número de antibióticos y de reactivos generadores de superóxidos en *E. coli*. La sustitución de una serina por una arginina en la posición 73 de MarR era la responsable del fenotipo de tolerancia a ciclohexano (Asako et al., 1997; Nakajima et al., 1995), seguramente porque la mutación en MarR interfiere en la correcta orientación de los dominios de unión a ADN de la proteína dimerica, lo que conlleva la pérdida de la represión sobre el operón *mar* (Alekhun et al., 2001). La síntesis de la proteína MarA permite a la bacteria inducir los genes de las bombas de eflujo y resistir la acción de diversos antibióticos y disolventes orgánicos, aunque las bases moleculares de este proceso aún no se han elucidado.

Los productos de los genes *soxS* y *rob* pueden reemplazar a MarA en la activación del operón *mar*. La presencia de *soxR* y *rob* en plásmidos de alto número de copia incrementó la tolerancia a disolventes orgánicos en *E. coli* (Nakajima et al., 1995 [a y b]). Por el contrario, la sobreexpresión del gen silvestre *marR* hace disminuir los niveles de tolerancia a disolventes orgánicos. La delección de los genes *acrAB* confiere un incremento de la sensibilidad hacia un gran número de

antibióticos y disolventes orgánicos, tanto en la cepa silvestre como en cepas mutantes en Mar. Por ello, el fenotipo Mar está ligado a la sobreexpresión del *locus acrAB*, y algunos mutantes Mar son por ello resistentes a disolventes orgánicos y a antibióticos (Okusu et al., 1996; White et al., 1997).

Por tanto, parece que la función primaria de AcrR es la de modular la expresión de *acrAB*, evitando con ello una producción excesiva de la bomba AcrAB, mientras que MarR y los reguladores globales relacionados, son los principales responsables de la inducción de *acrAB* y *tolC*. También se ha demostrado que AcrAB es regulada positivamente por SdiA, una proteína que regula genes de la división celular dependiente de *quorum sensing* (Rahmati et al., 2002). La relación entre AcrAB y *quorum sensing*, combinada con la observación de que algunas moléculas señal utilizadas por las bacterias son similares a algunos substratos de AcrAB (como fluoroquinolonas), sugeriría que AcrAB pueda tener un papel fisiológico en el transporte de moléculas señal de *quorum sensing* que no son capaces de difundir libremente (Rahmati et al., 2002).

Cada uno de los operones *mex* de *P. aeruginosa* posee un regulador transcripcional local que está codificado aguas arriba del operón, en la región inmediatamente adyacente (Figura 12). En contraste con el alto grado de identidad que comparten los componentes de las bombas de eflujo de *P. aeruginosa* entre sí, las proteínas codificadas por cada uno de los genes reguladores no tienen homología entre ellos, sino que pertenecen a familias distintas de reguladores (Tabla 6).

Las mutaciones que conducen a la sobreexpresión de MexAB-OprM, son la causa predominante de la adquisición de la elevada resistencia a un gran número de sustancias tóxicas (Poole, 2001 [a]). El regulador codificado divergentemente, MexR, miembro de la familia de proteínas MarR, actúa como represor de la transcripción de *mexAB-oprM* (Poole et al., 1996 [b]). MexR autorregula su expresión mediante la represión del promotor de *mexR* (P_{mexR}), además de controlar la transcripción desde el promotor de *mexA* ($P2_{mexA}$) (Evans et al., 2001). Se han descrito un gran número de cepas mutantes que contienen alteraciones en la región codificante de *mexR* que producen un represor MexR inactivo; todas estas mutaciones conllevan la sobreexpresión de la bomba MexAB-OprM, lo que supone un aumento en la resistencia a un gran número de sustancias como β -lactámicos,

fluoroquinolonas, tetraciclina, cloramfenicol y disolventes orgánicos como *n*-hexano y *p*-xileno (Evans et al., 2001; Köhler et al., 1999; Li y Poole, 1999; Saito et al., 1999; Srikumar et al., 2000; Zih-Zarifi et al., 1999]). Se ha propuesto que el incremento de la expresión desde el promotor controlado por MexR ($P2_{mexA}$) es el responsable de la hiperexpresión de MexAB-OprM (Evans et al., 2001). En algunos casos, se ha confirmado la incapacidad de los mutantes de MexR para reprimir $P2_{mexA}$, que se debía a la producción de proteínas MexR inestables o incapaces de dimerizar o de unirse a ADN (Adewoye et al., 2002). Sin embargo, ninguno de los antibióticos transportados por la bomba inducen su expresión, lo que sugiere que la bomba MexAB-OprM ha evolucionado para otras funciones fisiológicas, como pueden ser la extrusión de metabolitos secundarios (Poole, 1994), así como señales moleculares de *quorum sensing* (Pearson et al., 1999).

El sistema MexAB-OprM está sujeto además a regulación por fase de crecimiento (Evans y Poole, 1999) que conlleva que la expresión aumenta con el crecimiento, alcanzando el máximo al final de la fase exponencial. Esto ocurre de forma independiente a MexR, lo que vuelve a implicar a reguladores adicionales en el control de la expresión de *mexAB-oprM*. Algo muy interesante es que los sistemas de bombas Mex de *P. aeruginosa* están sujetos a una regulación coordinada, como lo demuestra el que la expresión de unos sistemas disminuya en respuesta a un incremento de expresión de otros (Li et al., 2000 [b]).

Aunque la bomba MexCD-OprJ es inducible por algunos de sus substratos (no por antibióticos), su contribución a la expulsión de compuestos tóxicos en *P. aeruginosa* se debe principalmente a la sobreexpresión del sistema como resultado de mutaciones en el gen *nfxB* (Osazaki et al., 1991; Osazaki y Hirai, 1992). El gen *nfxB* se localiza adyacente a los genes *mexCD-oprJ*. Codifica un represor de la familia LacI-GalR (Nguyen y Saier, 1995), que reprime la expresión de la bomba (Poole et al., 1996 [a]) y se autorregula negativamente (Shiba et al., 1995).

Aún no se ha descrito completamente la naturaleza de la mutación (o mutaciones) que provoca la hiperexpresión de la bomba MexEF-OprN en las cepas *nfxC*, aunque lo que sí se sabe es que la hiperexpresión de la bomba es independiente del producto del gen *mexT*, localizado aguas arriba de *mexAB-oprN* (Köhler et al., 2001; Maseda, et al., 2000 [b]). MexT es un regulador positivo de *mexEF-oprN*, que pertenece a la familia LysR (Schell, 1993), y que es también el responsable de la disminución de la

expresión de la porina OprD en las cepas *nfxC* (Köhler et al., 1999; Ochs et al., 1999).

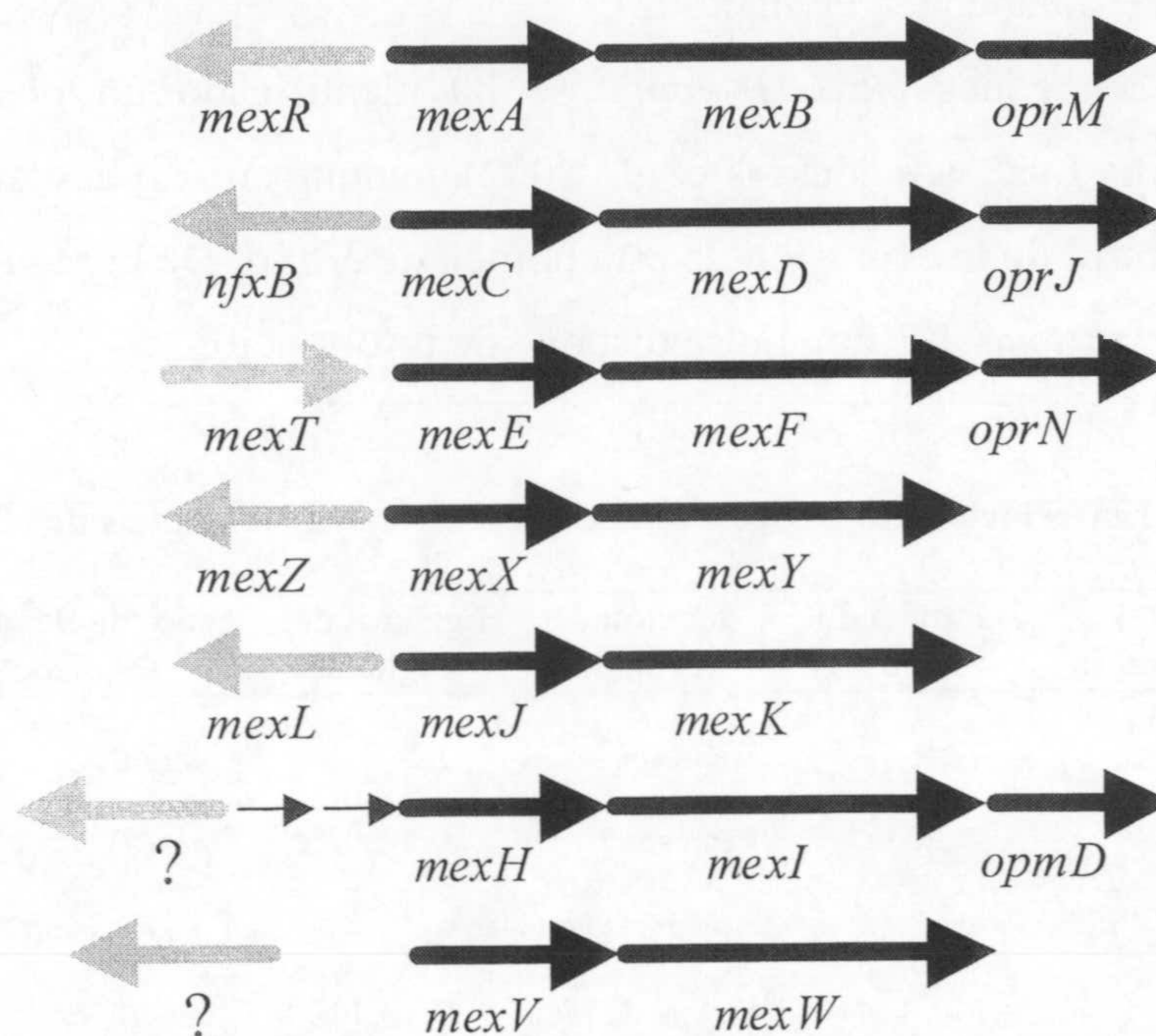


Figura 12. Esquema de la organización de las bombas Mex y de sus reguladores. Los genes reguladores se muestran con flechas grises; los de las bombas con flechas negras. Todos los genes reguladores que se muestran son represores, con la excepción de MexT, que es un regulador positivo de la familia LysR. MerR pertenece a la familia MarR, NfxB a la familia LacI-GalR, y MexZ y MexL a la familia TetR.

Se ha identificado el gen *mexZ* (también llamado *amrR* (Westbrock-Wadman et al., 1999) aguas arriba de *mexXY* (*amrAB*), que codifica un represor de la familia TetR, y controla la expresión de *mexXY* (Aires et al., 1999; Westbrock-Wadman et al., 1999). Las mutaciones en *mexZ* han demostrado ser suficientes para producir la hiperexpresión de los genes *mexXY* adyacentes, pero no para explicar el aumento de la resistencia a aminoglicósidos observado, quizá porque se están omitiendo otros componentes necesarios. Por ello, la resistencia a aminoglicósidos dependiente de la hiperexpresión de MexXY en los mutantes llamados “de tipo impermeable” es debida a mutaciones en otros genes distintos a *mexZ*.

El gen *mexL* codifica un represor de la familia TetR, y se ha identificado aguas arriba de los genes de la bomba *mexJK* (Chuanchuen et al., 2002). *mexL* parece ser la diana de distintas mutaciones que conducen a la hiperexpresión del operón de la bomba *mexJK*. Como se esperaba, se ha confirmado que MexL es el represor de la expresión de *mexJK* (Chuanchuen et al., 2002).

Aguas arriba de los genes *mexGHI-opmD* se ha identificado un posible gen regulador de la familia LysR (Aendekerk et al., 2002), aunque aún no hay evidencias de su papel en el control de la expresión de esta bomba de eflujo. De la regulación de la expresión de la bomba *mexVW* aún no se dispone de información.

Tabla 5. Reguladores transcripcionales que controlan la expresión de las bombas de eflujo RND.

organismo	proteína(s) reguladora(s)	familia del regulador	función del regulador	ligandos del regulador	genes de bombas regulados	Ref.
<i>E. coli</i>	AcrR	TetR	represor	?	<i>acrAB</i>	a
	AcrS	TetR	represor ?	?	<i>acrEF</i>	b
	MarA/SoxS/RobA	AraC	activadores globales	?	<i>acrAB</i> y <i>tolC</i>	c
	MarR	MarR	represor de MarA	DNP, Pg, Sa, Md	<i>acrAB</i> y <i>tolC</i>	d
<i>P. aeruginosa</i>	MexR	MarR	represor	?	<i>mexAB-OprM</i>	e
	MexT	LysR	activador	?	<i>mexEF-oprM</i>	f
	MexZ	TetR	represor ?	?	<i>mexXY</i>	g
	NfxB	LacI/GalR	represor ?	?	<i>mexCD-oprJ</i>	h
<i>P. putida</i>	ArpR	TetR	represor ?	?	<i>arpABC</i>	i
	SrpR	TetR	represor	?	<i>srpABC</i>	j
	SrpS	IclR	represor	?	<i>srpABC</i>	k
	TtgR	TetR	represor	Cm/Tc	<i>ttgABC</i>	l
	TtgD	IclR	represor ?	?	<i>ttgDEF</i>	m

Sólo se incluyen los reguladores de las bombas que se describen en la Introducción. Para ampliar la información ver Grkovic et al., 2002. DNP = 2,4-dinitrofenol; Pg = plumbagina; Sa = salicilato; Md = menadione; Cm = cloramfenicol; Tc = tetraciclina. a = Ma et al., 1996; b = Ma et al., 1995; c = Jair et al., 1996; Martin et al., 1996; Rhee et al., 1998; d = Alekshun y Levy, 1999; Alekshun et al., 2001; Martin y Rosner, 1995; e = Evans et al., 2001; Poole et al., 1996 [b]; f = Köhler et al., 1999; g = Aires et al., 1999; h = Poole et al., 1996 [a]; i = Kieboom y de Bont, 2001; j, k = Kieboom et al., 1998; Wery et al., 2001; l = Ramos et al., 1998; m = Mosqueda y Ramos, 2000. (Adaptado de Grkovic et al., 2002).

5.3. Bombas de eflujo en cepas de *Pseudomonas putida* tolerantes a compuestos altamente tóxicos

Desde que en 1989 se identificara una cepa de *Pseudomonas putida* capaz de crecer en altas concentraciones de tolueno (Inoue y Horikoshi, 1989), se han identificado algunas otras cepas de esta especie tolerantes a compuestos muy tóxicos, como *p*-xileno (log P_{ow} 3,15), estireno (log P_{ow} 3,0), octanol (log P_{ow} 2,92), y tolueno (log P_{ow} 2,69) (Aono et al., 1992; Cruden et al., 1992; Isken y de Bont, 1996; Kim et al., 1998; Ramos et al., 1995 y 1997; Weber y de Bont, 1994). Las primeras indicaciones de la implicación de un sistema activo de transporte en la tolerancia a disolventes orgánicos se deben a Isken y de Bont (1996) y Ramos y colaboradores (1997). Ellos midieron la acumulación de hidrocarburos aromáticos marcados con [^{14}C] en las cepas *P. putida* S12 y *P. putida* DOT-T1E cultivadas en ausencia (sin preadaptar) o en presencia de tolueno (preadaptadas). Ambos encontraron que la cantidad de hidrocarburos aromáticos marcados que se acumulaban en las cepas adaptadas era menor (entre la mitad a un quinto) de lo que se acumulaba en células no adaptadas. La adición de inhibidores de la cadena respiratoria, cianuro potásico, o el conductor de protones CCCP, a células adaptadas dio lugar a un incremento significativo de la acumulación del hidrocarburo aromático. Estos resultados fueron interpretados como evidencias de que estas cepas poseían sistemas de expulsión dependientes de energía capaces de disminuir la cantidad de disolvente presente en las membranas.

El aislamiento y caracterización de mutantes sensibles a tolueno de *P. putida* S12, *P. putida* DOT-T1E, y *P. putida* GM73, hicieron posible la identificación de varias bombas de eflujo implicadas en la tolerancia a tolueno (Kieboom et al., 1998 [a y b]; Kim et al., 1998; Ramos et al., 1998). Ésta era la evidencia definitiva de la participación de las bombas de eflujo en la tolerancia a disolventes orgánicos. La caracterización molecular del sitio de inserción del transposón en los mutantes permitió la identificación de los genes *srpABC* (*solvent resistant pump*, bomba de resistencia a disolventes) de *P. putida* S12, y los genes *ttgABC* (*toluene tolerance genes*, genes de tolerancia a tolueno) de *P. putida* DOT-T1E. Mediante el análisis de su secuencia se clasificaron como pertenecientes a las familias RND teniendo entre

un 58 y 77% de identidad, dependiendo de las proteínas que se comparen, con los sistemas AcrAB-TolC de *E. coli* y MexAB-OprM de *P. aeruginosa* (Figura 13).

Los genes *srpA* y *ttgA* codifican la lipoproteína anclada a la membrana interna (MFP) que se extiende por el periplasma y que interacciona con el transportador de membrana interna (codificado en estos sistemas por *srpB* y *ttgB*) y probablemente con la OMP codificada por *srpC* y *ttgC*. Además, Fukimori et al., (1998) aislaron un mutante resistente a tolueno de la cepa sensible a disolventes *P. putida* KT2442 en el que una bomba de eflujo casi idéntica a la TtgABC de *P. putida* DOT-T1E estaba expresada a altos niveles.

Ramos y colaboradores (1998) pusieron de manifiesto que la tolerancia a tolueno en la cepa silvestre *P. putida* DOT-T1E estaba influenciada por las condiciones de cultivo. La preexposición de células a bajas concentraciones del hidrocarburo aromático condujo a la supervivencia de casi el 100% de las células tras un choque con tolueno; en contraste, sólo una fracción (10^{-4}) de las células que no habían sido preexpuestas sobrevivían. Cuando estos ensayos se hicieron con un mutante en *ttgB*, la cepa no sobrevivía al choque con tolueno, y sólo una pequeña fracción (alrededor de 1 de cada 10^5 células) sobrevivía al choque si había sido preexpuesto a concentraciones subletales de tolueno. Esto llevó a pensar que la bomba TtgABC contribuía a la tolerancia innata de *P. putida* DOT-T1E a disolventes (Ramos et al., 1998).

Ramos y colaboradores (1998) postularon también la existencia de al menos otra bomba de eflujo implicada en el transporte de tolueno. Se identificó una segunda bomba de eflujo inducible, TtgDEF, que transporta tolueno en la cepa *P. putida* DOT-T1E, ligada a los genes *tod* de degradación de tolueno (Mosqueda y Ramos, 2000). El que los genes que codifican una ruta catabólica estén ligados a los genes implicados en el transporte del compuesto es un rasgo conservado entre otras cepas de *Pseudomonas* sp. que degradan tolueno a través de la ruta TOD (Huertas et al., 2000).

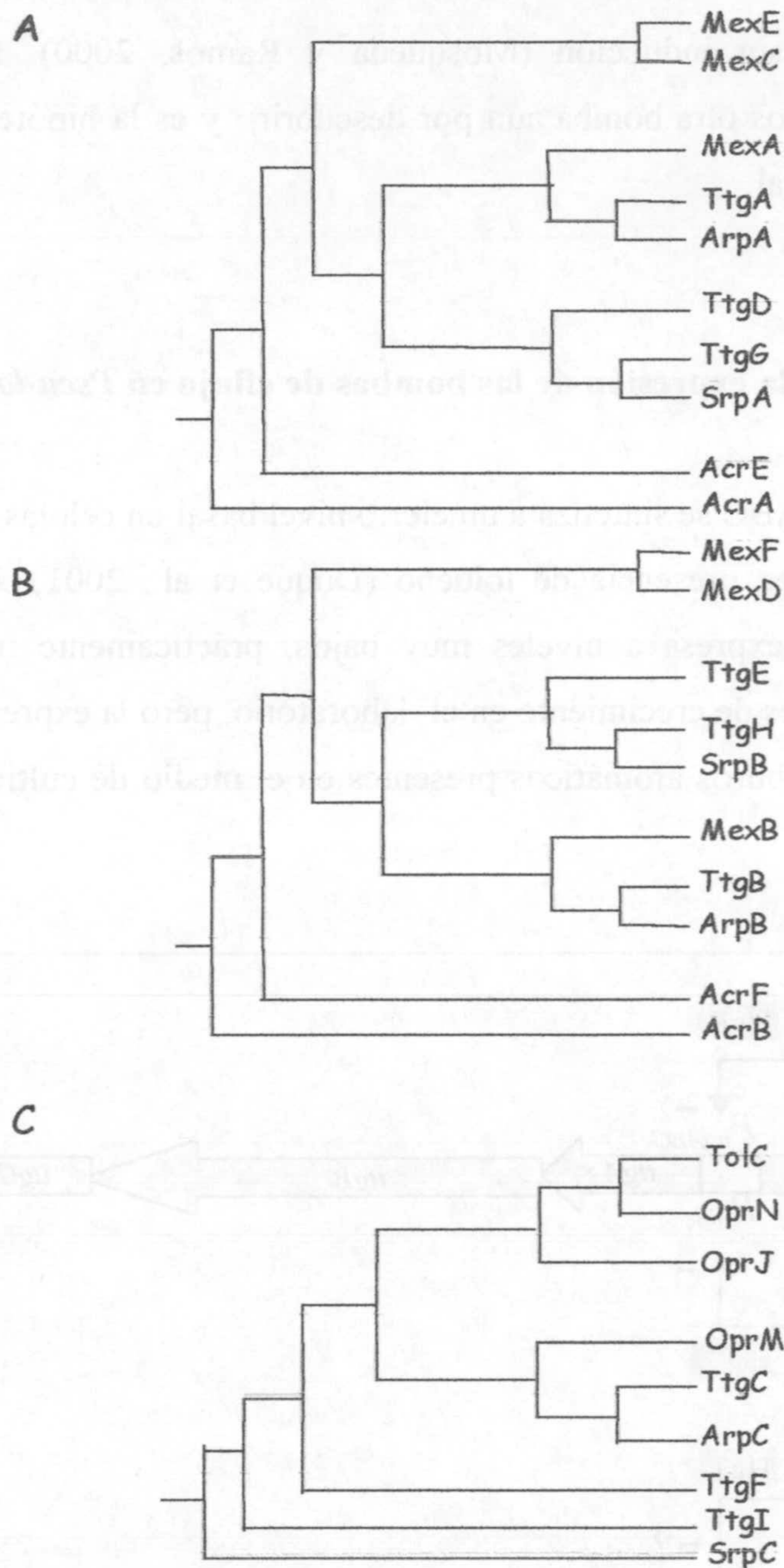


Figura 13. Árboles filogenéticos en los que se muestra la relación entre los sistemas de bombas de eflujo de distintas especies. Los árboles se han construido mediante el programa de alineamiento de secuencias ClustalW (Materiales y Métodos). (A) Proteína de fusión periplásmica; (B) translocasa RND o componente de membrana interna; (C) proteína de membrana externa. Se han incluido los siguientes sistemas: AcrAB-TolC y AcrEF-TolC de *E. coli*; MexAB-OprM, MexCD-OprJ y MexEF-OprN de *Pseudomonas aeruginosa*; ArpABC, SrpABC, TtgABC, TtgDEF y TtgGHI de *Pseudomonas putida*.

En un mutante de *P. putida* DOT-T1E con las bombas TtgABC y TtgDEF inactivas, todavía una fracción del cultivo (10^{-4} células) sobrevivía si éste había sido

preexposto a concentraciones subletales de tolueno, aunque casi ninguna célula ($<10^{-8}$) sobrevivía sin inducción (Mosqueda y Ramos, 2000). Esto sugería la presencia de al menos otra bomba aún por descubrir, y es la hipótesis de la partida de esta Tesis Doctoral.

5.4. Regulación de la expresión de las bombas de eflujo en *Pseudomonas putida*

La bomba TtgABC se sintetiza a un cierto nivel basal en células cultivadas tanto en ausencia como en presencia de tolueno (Duque et al., 2001). En contraste, el operón *ttgDEF* se expresa a niveles muy bajos, prácticamente indetectables, en condiciones normales de crecimiento en el laboratorio, pero la expresión aumenta en respuesta a hidrocarburos aromáticos presentes en el medio de cultivo (Mosqueda y Ramos, 2000).

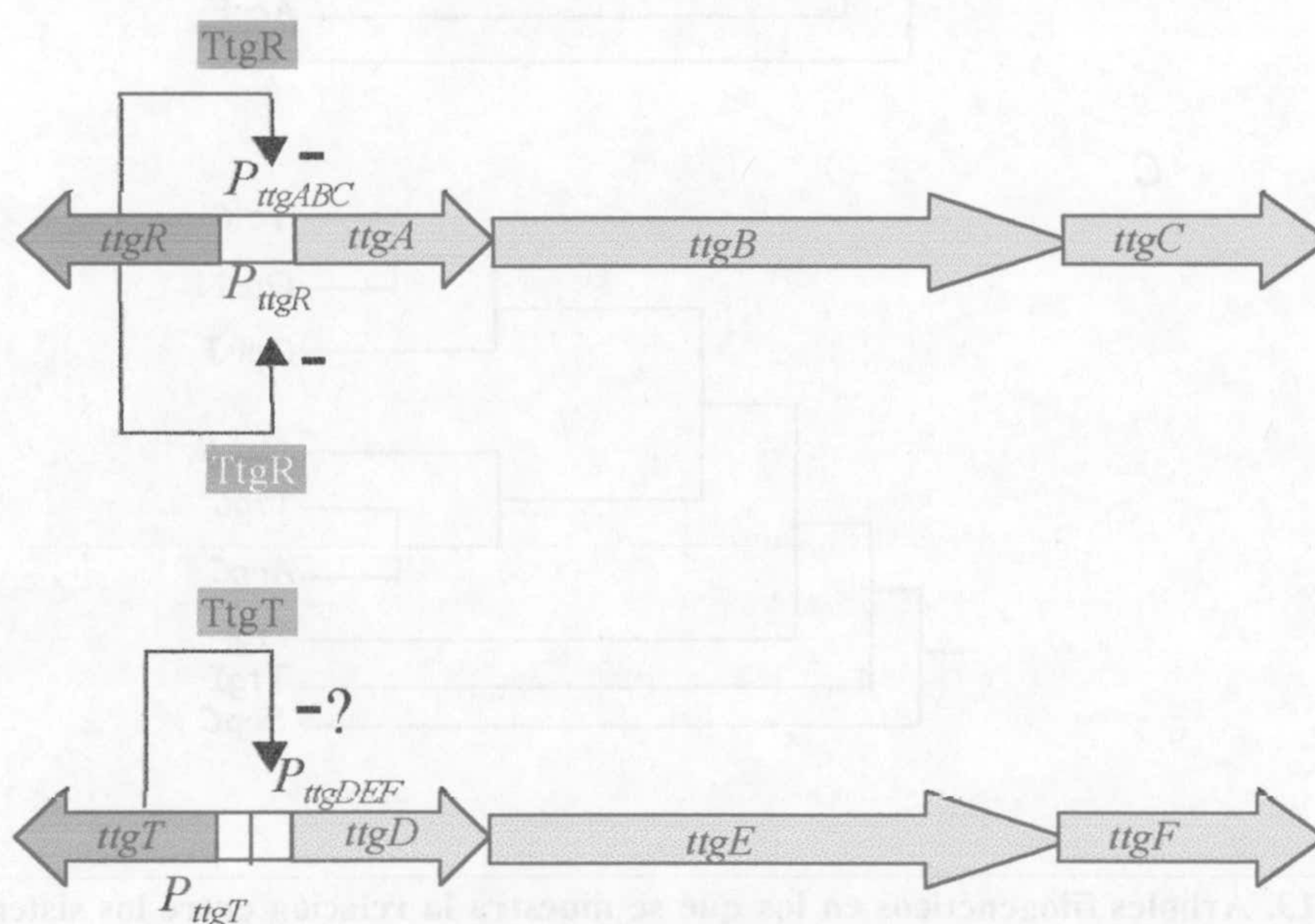


Figura 14. Organización de los operones *ttgABC* y *ttgDEF*. Los genes reguladores se transcriben de forma divergente respecto a los genes estructurales de las bombas. En el caso de *ttgABC* y *ttgR* las regiones promotoras propuestas solapan, no siendo así para *ttgDEF* y *ttgT*.

Ensayos de transcripción reversa acoplada a PCR han revelado que los genes *ttgABC* y *ttgDEF* forman sendos operones (Duque et al., 2001; Mosqueda y Ramos,

2000) (Figura 14). La transcripción de cada operón está controlada por un regulador específico codificado por un gen que se transcribe adyacente a cada operón (Figura 14). TtgR controla la expresión del operón *ttgABC* (Duque et al., 2001); y TtgT parece controlar la expresión de los genes *ttgDEF* (Terán et al., resultados sin publicar). TtgR pertenece a la familia de TetR de reguladores transcripcionales, mientras que TtgT pertenece a la familia IclR. En un mutante TtgR, la expresión desde el promotor *ttgA* aumentaba alrededor de 10 veces, sugiriendo que TtgR reprimía la expresión de *ttgABC* (Duque et al., 2001). En este mutante, la expresión del gen *ttgR* era también mucho más alta que en la cepa silvestre, lo que indicaba que TtgR controlaba además su propia expresión, aunque este nivel alto de expresión se incrementaba en presencia de tolueno y antibióticos. Estos resultados sugieren que debe existir otro regulador implicado en la expresión de TtgR. En el fondo mutante *ttgR⁻* la expresión desde el promotor *ttgD* seguía el mismo patrón de expresión que en la cepa silvestre (Duque et al., 2001; Terán, comunicación personal). El mutante *ttgR⁻*, que sobreproducía las proteínas de la bomba de eflujo, era más resistente que la cepa silvestre a carbenicilina, cloramfenicol, ácido nalidíxico y tetraciclina; mientras que un mutante *ttgB⁻* era más sensible que la cepa silvestre a estos mismos antibióticos. Esto aporta más evidencias sobre el papel de TtgABC en el transporte de estos antibióticos y muestra que un incremento en la expresión de los genes *ttgABC* como consecuencia de la pérdida de la represión conduce a un incremento en la tolerancia a antibióticos, aunque no a disolventes.

5.5. Funciones inesperadas relacionadas con la tolerancia a disolventes orgánicos

Aparte de las funciones descritas con anterioridad, el análisis de distintos mutantes sensibles a tolueno demostraron la implicación de otras proteínas en la tolerancia a disolventes orgánicos.

5.5.1. Papel de las proteínas de transporte de flagelos en la tolerancia a disolventes orgánicos

Segura y colaboradores (2001) aislaron, tras mutagénesis al azar con mini-Tn5, una cepa mutante de *P. putida* DOT-T1E que era incapaz de tolerar los choques de tolueno y que presentaba la inserción del mini-Tn5 en el gen *fliP*. Este gen forma parte del operón *fliLMNOPQRflhB*, un grupo de genes que codifica los componentes de la estructura flagelar. FliP es una proteína que forma parte del sistema de transporte de flagelos, y de hecho, un mutante *fliP* es inmóvil. Cuando el alelo mutante se reemplazó por el silvestre, la cepa recuperó el patrón silvestre de movilidad y resistencia. Esta observación asigna inequívocamente a FliP una función en resistencia a disolventes orgánicos. Para determinar si el efecto era específico de proteínas del transporte, o si estaba relacionado con movilidad en general, se construyeron mutantes en *flhB*, otro componente del aparato de transporte flagelar, y en *fliL*, que codifica una proteína de membrana citoplasmática asociada con el cuerpo basal del flagelo. Ninguno de estos mutantes eran móviles, y mientras el *flhB*⁻ era sensible a tolueno, el mutante *fliL* era tan resistente como el silvestre. Por tanto, estos resultados no deben ser interpretados como que movilidad y tolerancia a tolueno están ligadas en sí mismas, sino más bien que puede que el sistema de transporte flagelar sea parasitado por elementos que participan en la tolerancia a tolueno, y por ello sea necesario un aparato de transporte flagelar intacto para mantener la tolerancia a tolueno.

Este caso inusual de parasitación del sistema flagelar tiene precedentes en *Yersinia enterocolitica* y *Xenorhabdus nematophilus*, donde algunos enzimas involucrados en virulencia son transportados hacia el medio externo via el sistema flagelar (Giraudan Lanois, 2000; Young et al., 1999). Mutantes de *Yersinia* sp. o *Xenorhabdus* sp. con daños en el sistema de transporte flagelar eran inmóviles y menos virulentos que las cepas silvestres. También mutantes en varias proteínas flagelares de *P. putida* S12 han resultado ser más sensibles a tolueno que la cepa parental (Kieboom et al., 1998 [b]), por lo que parece que la implicación de las proteínas flagelares en la tolerancia es un factor común para distintas cepas de *P. putida*.

5.5.2. ¿Transfiere energía el sistema TonB a las bombas de eflujo RND?

Algunos grupos de investigación han señalado que el ionóforo FCCP impide la expulsión de compuestos tóxicos por las bombas RND, lo que sugiere que la energía requerida para el proceso proviene del acoplamiento con la fuerza protón-motriz a través de la membrana interna (Isken y de Bont, 1996; Ramos et al., 1997; Zgurskaya y Nikaido, 2000). Sin embargo, las bases moleculares de este acoplamiento aún se desconocen. Durante la búsqueda de mutantes con una susceptibilidad aumentada hacia diferentes compuestos aromáticos se aisló un mutante de *P. putida* DOT-T1E susceptible a altas concentraciones de 4-hidroxibenzoato (4HBA), a antibióticos y a tolueno (Godoy et al., 2001). La mutación afectaba al sistema de transducción de energía TonB porque se había mutado el gen *exbD* del operón *exbBDtonB*, y como consecuencia se acumulaba tanto tolueno como 4HBA en las membranas celulares del mutante a niveles más altos que en la cepa silvestre (Godoy et al., 2001; Ramos-González et al., 2001). Con estos datos se propuso que el incremento en la sensibilidad a tolueno en la cepa mutante era el resultado de que su eliminación por las bombas de eflujo estaba disminuida. Como se mencionó anteriormente, la preinducción en la cepa silvestre de las bombas de eflujo con concentraciones bajas de tolueno provocaba a una menor acumulación de ¹⁴C-tolueno (Ramos et al., 1997). Esto no ocurría en la cepa mutante con un sistema TonB defectuoso, lo que indicaba que las bombas no estaban funcionando correctamente.

Las proteínas ExbB, ExbD y TonB están implicadas fundamentalmente en la energetización de la membrana externa para el transporte de complejos de tipo ferrisideróforos, y podría estar implicado a nivel de membrana externa y/o interna en otros procesos celulares, tales como la expulsión de antibióticos vía bombas del tipo RND. La participación del sistema de transducción de energía TonB en el funcionamiento de las bombas de eflujo se ha propuesto también para otras cepas bacterianas. Por ejemplo, una cepa de *P. aeruginosa* con una mutación en el gen *tonB1* mostraba una disminución en la expulsión de antibióticos debido a las bombas RND, ligando de nuevo la sensibilidad a antibióticos con una mutación en el sistema TonB (Zhao et al., 1998).

El fenotipo del mutante ExbD de *P. putida* DOT-T1E y su influencia en los sistemas de eflujo de compuestos tóxicos se ha intentado explicar mediante distintas

hipótesis: (a) dado que en *E. coli* la estequiometría del sistema ExbB/ExbD/TonB es 7/2/1 (Higgs et al., 2002; Godoy et al., 2004 [mandado a publicación]), un desequilibrio en la producción de ExbD en la cepa mutante de *P. putida* DOT-T1E podría provocar efectos indirectos en las funciones de la membrana, lo que comprometería el funcionamiento de las bombas de eflujo; (b) un desequilibrio en la producción de ExbD puede interferir en la incorporación de los componentes de membrana de las bombas RND en la membrana citoplasmática, haciendo a las bombas no funcionales; (c) los miembros de la familia de bombas de eflujo RND puede que sean activadas a través del sistema TonB, aunque hasta ahora no se conoce ni el elemento diana en el sistema de eflujo ni el mecanismo de acción. Respecto a esta última posibilidad, el extremo periplásmico del túnel formado por el trímero de proteínas TolC (de la bomba de eflujo AcrAB-TolC de *E. coli*) está sellado por un conjunto de hélices enrolladas a modo de barrera, que podría abrirse gracias a un mecanismo alostérico proteína-proteína, en el que TonB podría estar involucrado (Koronakis et al., 2000; Witty et al., 2002), aunque esta hipótesis requiere confirmación experimental.

5.5.3. Vesículas membranosas como un mecanismo activo de eliminación de disolventes

Kobayashi et al., (2000) publicaron que la cepa tolerante a disolventes orgánicos *Pseudomonas* sp. IH-2000 producía vesículas de membrana cuando se añadía tolueno al medio de cultivo. Estos autores sugirieron que la formación de vesículas era una respuesta específica de esta cepa para eliminar tolueno. Las vesículas estaban formadas por fosfolípidos, LPS, y una pequeña cantidad de proteínas, y contenían 0.17-0.63 mol tolueno/mol lípidos. Por el contrario, un mutante sensible a tolueno de esta cepa con la mutación en el gen *cyoC* no producía vesículas (Kobayashi et al., 1999), o las producía incompletas, aunque el mutante mostraba diversos efectos pleiotrópicos: se perdían algunas porciones de la membrana externa y la superficie celular se hacía más hidrófoba. Se han observado también vesículas membranosas en cultivos de *P. putida* DOT-T1E en presencia de altas concentraciones de tolueno (Ramos et al., 1995); sin embargo, no hay

evidencias de que en *P. putida* DOT-T1E la función de estas vesículas sea la de expulsar tolueno. Es interesante notar que algunos patógenos liberan toxinas al medio externo a través de vesículas membranosas (Bibi et al., 2001), pero no hay evidencias que determinen si este mecanismo es específico o general para la protección contra tolueno.

6. UTILIZACIÓN DE MICROORGANISMOS TOLERANTES A DISOLVENTES ORGÁNICOS COMO FACTORÍAS CELULARES

6.1. Biotecnología

La Biotecnología tradicional se puede definir como el uso de los procesos celulares y moleculares para producir compuestos de interés para el hombre. La Biotecnología es inherente a la vida del hombre e incluye procesos tan antiguos como la fermentación de la cerveza y vino o la producción de queso y pan.

La Biotecnología moderna es diferente en el sentido de que hace uso de los nuevos conocimientos de Biología Celular y Molecular. Este conocimiento, que va en aumento cada día, contribuye a resolver problemas y poder enfocar mejor los caminos a seguir hasta los objetivos que se persiguen. Sin embargo, la Biotecnología moderna, al contrario que la síntesis química, todavía juega un papel minoritario en la industria. Se sabe desde hace largo tiempo que los microorganismos y enzimas poseen características muy favorables para un uso potencial en la industria: operan a temperaturas moderadas, lo que reduce los requerimientos energéticos para un proceso dado; son altamente específicos en las reacciones que catalizan y producen menos compuestos laterales y desechos; pueden utilizar compuestos menos puros; no requieren activación química o grupos protectores que encarecen los procesos, ni tampoco grandes cantidades de disolventes (Schoemaker et al., 2003).

Actualmente, se están llevando a cabo diversas reacciones a escala industrial con enzimas aisladas. Las enzimas más empleadas son: carbohidrasas, proteasas/peptidasas, lipasas, amidasas, y liasas; y se emplean principalmente en la industria alimentaria, la de detergentes y la del papel. También se está empleando la

biocatálisis con células enteras, pero estos procesos están muy lejos del desarrollo de todo su potencial. Las biotransformaciones con células enteras son particularmente útiles en los casos de reacciones que requieren enzimas multicomponentes y/o reacciones que dependen de cofactores, y que son llevadas a cabo de manera más ventajosa con células enteras, puesto que suponen una forma más barata de regeneración de cofactores. Los productos que se pueden sintetizar mediante estas reacciones son, por ejemplo, aromáticos hidroxilados, aldehídos, alcoholes o epóxidos. Estos compuestos son ingredientes importantes en química fina y su mercado se encuentra en expansión. Actualmente, la gran mayoría de estos compuestos se produce a partir de recursos fósiles mediante métodos de producción muy complicados que a menudo emplean reactivos químicos caros como grupos protectores o activadores. La biocatálisis con células enteras puede ser una alternativa “verde” para producir los compuestos de interés en unos pocos pasos, incluso partiendo de fuentes naturales renovables como los azúcares.

6.2. Sistemas de producción de dos fases

Una limitación muy importante para el empleo de células enteras en biocatálisis es que muchas reacciones interesantes incluyen componentes orgánicos (substratos o productos) que son muy poco solubles en agua. Además, en muchos casos el biocatalizador disminuye su productividad debido a la toxicidad del producto final (Van Sonsbeek et al., 1993). En estas biotransformaciones, el uso de una segunda fase orgánica tiene muchas ventajas: si el producto se va extrayendo continuamente por la fase orgánica el efecto tóxico se reduce y el biocatalizador puede aumentar su rendimiento; si el producto de interés se concentra en la fase orgánica se facilita su recogida final. Además, muchas reacciones necesitan una gran cantidad de reactivo para que el equilibrio se desplace hacia la formación de los compuestos, pero si se va extrayendo continuamente los productos con el disolvente apropiado se puede desplazar el equilibrio de la reacción en el sentido que nos interesa sin necesidad de utilizar un exceso de reactivo (Leon et al., 1998).

En muchos casos el uso de una segunda fase orgánica está limitado por la toxicidad del disolvente hacia las bacterias. Una posible solución a este problema

sería la separación de la fase de disolvente orgánico de la fase acuosa mediante una membrana hidrófila, de manera que se evite el contacto directo del biocatalizador con el disolvente (Choi et al., 1999; Hüsken, 2002; Molinari et al., 1997). Pero esta opción tiene algunos problemas como la formación de biofilms sobre la membrana (Mulder, 1996), lo que hace disminuir la transferencia de masa y por tanto la recogida del producto (Hüsken, et al., 2002). La alternativa ideal sería un sistema en el que las dos fases estuvieran en contacto directo, siempre y cuando el biocatalizador sea capaz de tolerar la fase orgánica. Aquí es donde cobra especial interés el uso de cepas tolerantes a disolventes orgánicos como *Pseudomonas putida* DOT-T1E.

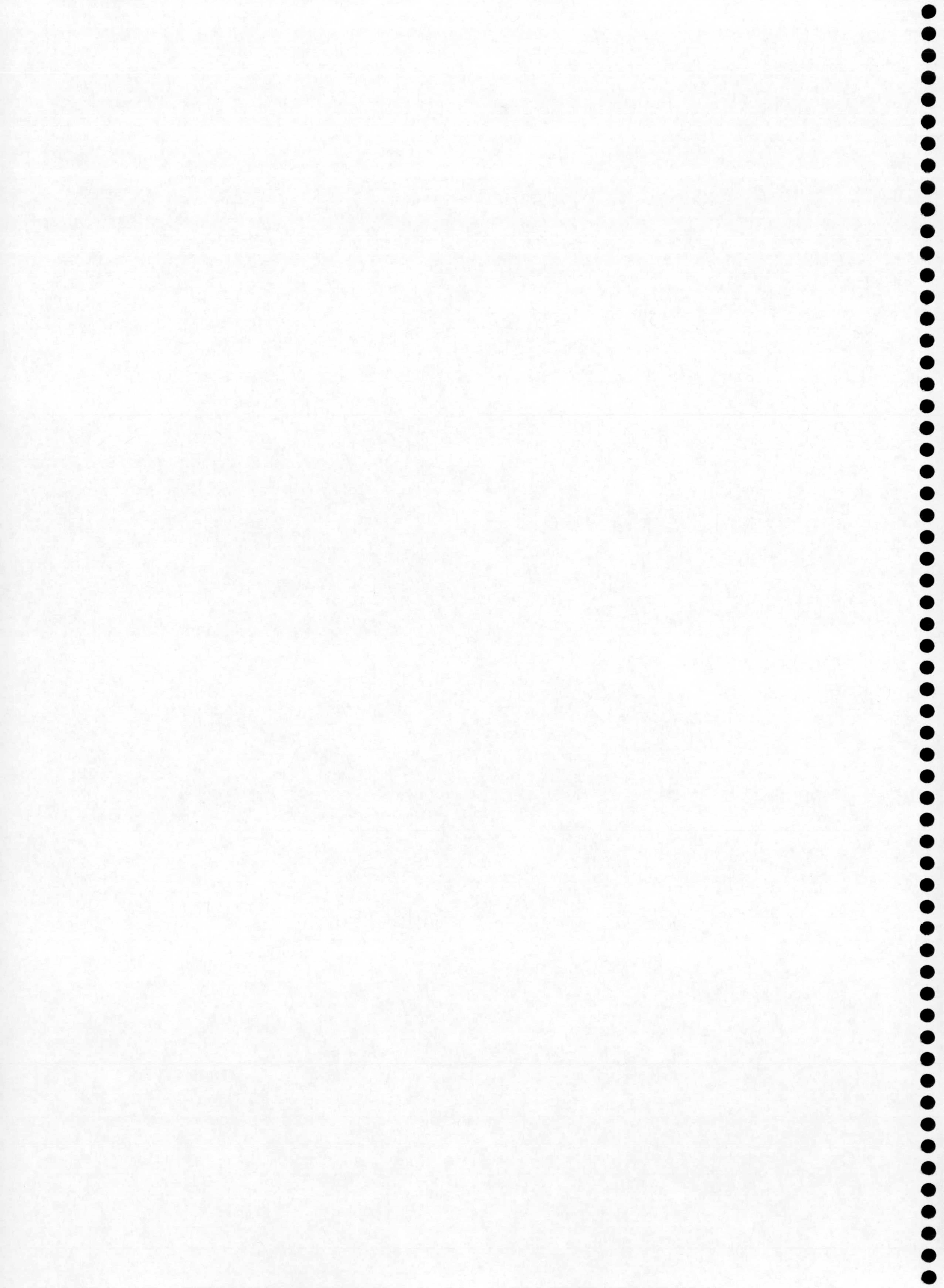
Los biocatalizadores más utilizados, como *E. coli* sólo pueden tolerar disolventes con un $\log P_{ow} > 5$. Por esta razón, los disolventes usados hasta ahora en procesos de dos fases han sido octano ($\log P_{ow}$ 4,6), dodecano ($\log P_{ow}$ 6,2), hexadecano ($\log P_{ow}$ 8,5) y bis(2-etilhexil)ftalato (BEHP) ($\log P_{ow}$ 8), para la síntesis de epóxidos hidrófobos (Witholt, et al., 1990), óxido de estireno (Panke et al., 1999 y 2002; Wubbolts et al., 1996), y benzaldehídos (Bühler et al., 2002 y 2003). Sin embargo, estos disolventes no son los más apropiados para la extracción de muchos compuestos aromáticos hidroxilados, aldehídos, alcoholes y epóxidos, que serían extraídos mucho más eficientemente por disolventes menos lipofílicos, pero a la vez más tóxicos, con un $\log P_{ow}$ entre 3 y 5. En este sentido, los requerimientos para un disolvente “perfecto” incluirían: distribución favorable para el producto, alta selectividad, baja tendencia a formar emulsiones, baja solubilidad en agua, estabilidad térmica química, propiedades favorables para la recogida del producto, que no sea biodegradable, que no sea tóxico, y que esté disponible en grandes cantidades (Daugulis, 1988).

En la bioproducción de óxido de estireno por *E. coli* se empleó un sistema de dos fases agua:bis(2-etilhexil)ftalato. De los estudios en escala piloto se concluyó que para optimizar la producción de óxido de estireno sería necesario aumentar la concentración de estireno en el sistema (Panke et al., 2002). Para ello se hubiese tenido que emplear un disolvente con un $\log P_{ow}$ menor. Sin embargo, *E. coli* no es capaz de tolerar concentraciones mayores de estireno y tampoco una segunda fase más polar. Se han propuesto dos posibles vías de solución para este problema. Una es la transferencia de las propiedades de tolerancia a disolventes orgánicos desde las

cepas tolerantes de *P. putida* a cepas de *E. coli*. La otra propuesta es la utilización de biocatalizadores del tipo de cepas tolerantes al disolvente utilizado como segunda fase. En el último capítulo de esta Tesis Doctoral (Capítulo V), se estudiará el uso de *P. putida* DOT-T1E en un proceso de biotransformación de *m*-xileno en 3-metilcatecol, en un sistema de doble fase, y se demostrará la conveniencia del uso de estas bacterias para sistemas en los que, por las características de los reactivos y los productos, se requiere el uso de una segunda fase orgánica con un $\log P_{ow} \leq 4$.

En resumen, las propiedades de *P. putida* DOT-T1E hacen de este microorganismo un sistema de sumo interés para desentrañar las bases moleculares de la tolerancia a disolventes orgánicos y para su explotación biotecnológica en química fina.

OBJETIVOS



OBJETIVOS

En el grupo de Degradación de Tóxicos Orgánicos de la Estación Experimental del Zaidín, que dirige el Doctor J. L. Ramos, se había identificado una cepa altamente tolerante a disolventes orgánicos, *P. putida* DOT-T1E (Ramos et al., 1995). Entre los mecanismos que confieren tolerancia a esta cepa destacaba la presencia de dos bombas de eflujo TtgABC y TtgDEF (Ramos et al., 1998; Mosqueda y Ramos, 2000). Una baja proporción de células del mutante doble carente de estas bombas de eflujo era capaz de sobrevivir al choque repentino con tolueno si las células habían sido preinducidas, por lo que se sospechaba la participación de un tercer elemento en la tolerancia a disolventes orgánicos. A partir de estos resultados se planteó el primer objetivo de esta Tesis Doctoral, a saber:

- (1) la identificación y caracterización de la posible tercera bomba implicada en la tolerancia a disolventes orgánicos en *Pseudomonas putida* DOT-T1E.

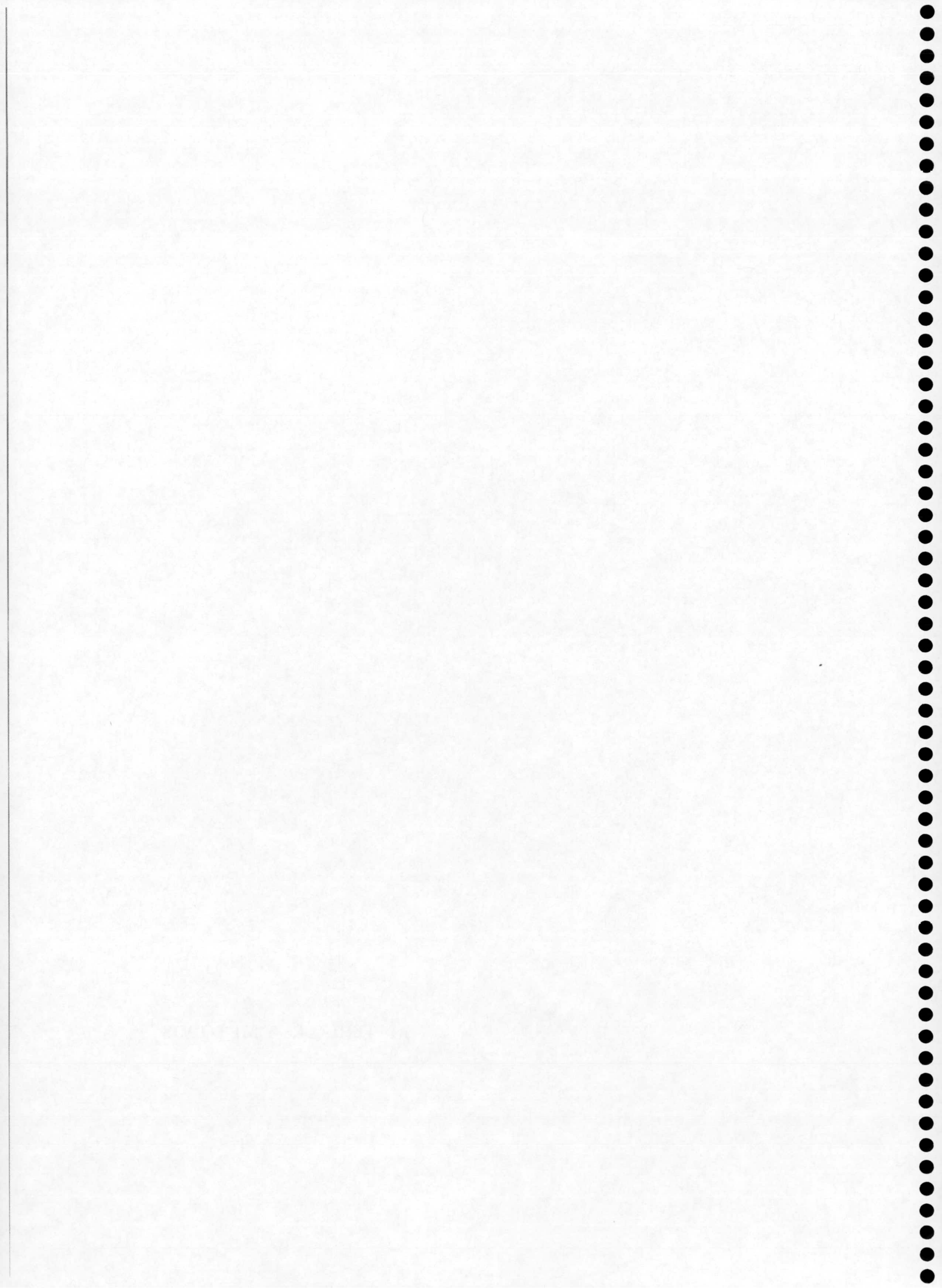
Una Tesis Doctoral representa un proceso dinámico que marca nuevos objetivos sobre la base de nuevos resultados. Así sugen los siguientes objetivos:

- (2) Análisis de la tolerancia a disolventes orgánicos de distintas cepas de *Pseudomonas* y correlación con la presencia y tipo de bombas de eflujo, tomando como modelo las bombas descritas en *P. putida* DOT-T1E.
- (3) Análisis del perfil de sustrato de las bombas de eflujo de *P. putida* DOT-T1E.
- (4) Estudio de la regulación de la bomba de eflujo TtgGHI identificada tras la investigación planteada en el objetivo 1.

El grupo de Degradación de Tóxicos Orgánicos tiene una manifiesta tendencia a la transferencia de resultados a la industria. La propiedad de tolerancia a disolventes orgánicos se planteó desde el principio de esta Tesis Doctoral como de interés en producción de compuestos de alto valor añadido. El objetivo concreto fue:

- (5) Explotación de la tolerancia a disolventes orgánicos de *P. putida* DOT-T1E en biotransformaciones en sistemas de doble fase (fase acuosa:disolvente orgánico), para la síntesis de compuestos tóxicos de alto valor añadido: adaptación a la segunda fase orgánica y producción de 3-metilcatecol.

MATERIALES Y MÉTODOS



1. CEPAS BACTERIANAS

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

Tabla M.1. Cepas bacterianas utilizadas en este trabajo

Cepa	Características	Referencia
<i>Escherichia coli</i>		
DH5 α F'	F'/endA1 hsdR17(r _k ⁻ m _k ⁺)glnV44 thi-1 recA1 gyrA (Nal ^r) relA1 Δ (lacIZYA-argF) U169 deoR (ϕ 80dlac Δ (lacZ)M15)	Hanahan, 1983
JM109	F' traD36 proA ⁺ B ⁺ lacI ^q Δ (lacZ)M15/ Δ (lac-proAB) glnV44 e14 ⁻ gyrA96 recA1 relA1 endA1 thi hsdR17	Yanisch-Perron et al., 1985
B834	F ⁻ omp ThsdS (r _B ⁻ m _B ⁻) gal dcm met auxotroph	Novagen
<i>Pseudomonas</i>		
<i>P. putida</i> DOT-T1E	Rif ^R , Tol ^R	Ramos et al., 1998
<i>P. putida</i> DOT-T1E-1	Rif ^R , Tel ^R , ttgD:: <i>kilAB</i>	Mosqueda y Ramos, 2000
<i>P. putida</i> DOT-T1E-18	Rif ^R , Km ^R , ttgB:: <i>'phoA-Km</i>	Ramos et al., 1998
<i>P. putida</i> DOT-T1E-82	Rif ^R , Km ^R , Tel ^R , ttgB:: <i>'phoA-Km</i> , ttgD:: <i>kilAB</i>	Mosqueda y Ramos, 2000
<i>P. putida</i> DOT-T1E-PS28	Rif ^R , Sm ^R , ttgH:: Ω Sm	Este trabajo (Cap. I)
<i>P. putida</i> DOT-T1E-PS30	Rif ^R , Tel ^R , Sm ^R , ttgD:: <i>kilAB</i> , ttgH:: Ω Sm	Este trabajo (Cap. III)
<i>P. putida</i> DOT-T1E-PS32	Rif ^R , Km ^R , ttgB:: <i>'phoA-Km</i> , ttgH:: Ω Sm	Este trabajo (Cap. III)
<i>P. putida</i> DOT-T1E-PS34	Rif ^R , Km ^R , Tel ^R , Sm ^R , ttgB:: <i>'phoA-Km</i> , ttgD:: <i>kilAB</i> , ttgH:: Ω Sm	Este trabajo (Cap. I)

<i>P. putida</i> DOT-T1E-PS52	Rif ^R , Km ^R ; <i>ttgW</i> :: ΩKm	Este trabajo (Cap. IV)
<i>P. putida</i> DOT-T1E-PS61	Rif ^R , Km ^R ; <i>ttgV</i> :: ΩKm	Este trabajo (Cap. IV)
<i>P. putida</i> DOT-T1E-PS62	Rif ^R , Km ^R <i>ttgV</i> :: <i>aphA3</i>	Este trabajo (Cap. IV)
<i>P. putida</i> MTB6	Ap ^R , Rif ^R , Tol ⁺	Huertas et al., 2000
<i>P. putida</i> MTB5	Ap ^R , Nal ^R , Tol ⁺	Huertas et al., 2000
<i>P. putida</i> KT2440	Ap ^R , Cm ^R	Franklin et al., 1981
<i>P. putida</i> S12	Ap ^R , Tol ^R	Weber et al., 94
<i>P. putida</i> SMO116	Ap ^R , Cm ^R , Tol ⁺	Møller et al., 1996
<i>P. putida</i> F1	Cm ^R , Tol ⁺	Gibson et al., 1970
<i>P. putida</i> JLR11	Cm ^R , Km ^R , TNT ⁺	Esteve-Nuñez et al., 2000
<i>P. putida</i> OUS82	fen ⁺ , naf ⁺	Kiyohara et al., 1994
<i>P. mendocina</i> KR1	Cm ^R , Tol ⁺	White and Gibson, 1991
<i>P. putida</i> 43	Rif ^R	PRCC-PSC49
<i>P. aeruginosa</i> SSS1	Tc ^R , Km ^R	CG297
<i>P. aeruginosa</i> 7NSH2	Km ^R	CG296
<i>P. aeruginosa</i> PAO1162	Km ^R	PRCC-PSC43
<i>P. aeruginosa</i> 1162RK	Rif ^R , Km ^R	CG392
<i>P. fluorescens</i> PF11		PRCC-PSC34
<i>P. fluorescens</i> EEZ23	Rif ^R , Nal ^R	PRCC-PSC26
<i>P. stutzeri</i>		PRCC-PSC60
<i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i>	patógeno de plantas	PRCC-PSC33
<i>P. putida</i> DOT-T1EΔ <i>todC1C2</i> :: <i>kilAB</i>	Rif ^R , Tel ^R , Tol ⁻	Mosqueda et al., 1999

Las abreviaturas Km^R, Rif^R, Sm^R, Nal^R, Tc^R, Cm^R, Ap^R, y Tel^R quieren decir resistencia a kanamicina, rifampicina, estreptomina, ácido nalidíxico, tetraciclina, cloramfenicol, ampicilina y telurito respectivamente; PRCC significa *Pseudomonas Reference Culture Collection* (Estación Experimental del Zaidín, Granada; www.eez.csic.es/prcc/); PSC es *Pseudomonas stock center*, que forma parte de la colección PRCC; y CG significa "Colección General del grupo del Dr. Ramos". Tol⁺, TNT⁺, fen⁺, naf⁺, significan capacidad de utilizar tolueno, trinitrotolueno, fenantreno y naftaleno, respectivamente, como fuente de carbono; y Tol⁻ que no puede utilizar tolueno como fuente de carbono. Tol^R indica que la cepa es tolerante a tolueno.

2. CONDICIONES Y MEDIOS DE CULTIVO

La composición de los medios de cultivo utilizados en este trabajo se detalla a continuación. Todos los medios y soluciones se esterilizaron en autoclave por calor húmedo a 120°C y 1 atmósfera de presión, o por filtración, utilizando filtros de 0,22 μm de diámetro de poro. En esta sección se describen los medios de cultivo más

usuales. Los medios de cultivo más específicos que se emplearon en distintos ensayos se describirán en las secciones correspondientes.

2.1. Medios ricos

Como medio habitual de crecimiento tanto de las cepas de *E. coli*, como de *P. putida*, se utilizó el medio Luria-Bertani (LB) (Sambrook et al., 1989), cuya composición es la siguiente: bacto-triptona, 10 g; extracto de levadura, 5 g; NaCl, 10 g; H₂O hasta 1 L. Para la preparación de medio sólido LB, se añadió bacto-agar (Difco, cat. no. 0140-01), hasta una concentración final del 2 % (p/vol), y se esterilizó en el autoclave.

2.2. Medios mínimos

Para el cultivo de células en medio mínimo se utilizó una modificación del medio M9 (Sambrooks et al., 1989), cuya composición fue la siguiente: solución 10xM9, 100 mL; solución A9 (“goodies”), 2,5 mL; MgSO₄ 1M, 1mL; citrato férrico amónico 6 ‰ (p/v), 1mL; H₂O hasta 1 L. Las soluciones empleadas en este medio se prepararon y esterilizaron por separado en el autoclave.

El medio mínimo utilizado en los ensayos con biofilms fue FB-A10.

Solución 10xM9: Na₂HPO₄·7H₂O, 70 g; KH₂PO₄, 30 g; NH₄Cl, 10 g; NaCl, 5 g; H₂O hasta 1 L.

Solución A9: HBO₃, 300 mg; ZnCl₂, 50 mg; CuCl₂·2H₂O, 10 mg; MnCl₂·4H₂O, 30 mg; CoCl₂, 200 mg; NiCl₂·6H₂O, 20 mg; NaMO₄·2H₂O, 30 mg; H₂O hasta 1 L.

Solución FB: 9 L de H₂O bidestilada, 10 mL MgCl₂ 1 M, 1 mL CaCl₂ 1 M, 1 mL 1000 x Fe-EDTA (1,83 g en 50 mL de agua bidestilada).

Solución A10: 20 g (NH₄)₂SO₄, 60 g Na₂HPO₄·2H₂O, 30 g KH₂PO₄, 30 g NaCl, hasta 1 L de agua bidestilada, pH ≈ 6,4.

Como fuentes de carbono se utilizaron citrato sódico a concentración 10 mM, benzoato sódico 5 mM y glucosa 27 mM (0,5% [p/vol]).

2.3. Condiciones de cultivo

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

2.4. Antibióticos

Las soluciones de antibióticos se prepararon a una concentración 1000 veces superior a la concentración final de los ensayos, en H₂O destilada, excepto el cloramfenicol, que se preparó en etanol absoluto, y rifampicina y tetraciclina, que se disolvieron en metanol. Las soluciones preparadas en H₂O se esterilizaron por filtración (utilizando filtros estériles de acetato de celulosa de 0,22 µm de diámetro de poro [Schelicher-Schuell, cat. no. 10462200]) y se almacenaron a -20°C. Los antibióticos se utilizaron generalmente a las concentraciones finales indicadas en µg/mL: ácido nalidíxico (Nal), 10; ampicilina (Ap), 100; carbenicilina (Cb), 500; cloramfenicol (Cm), 30; estreptomina (Sm), 50; kanamicina (Km), 25; rifampicina (Rif), 20; tetraciclina (Tc), 20; gentamicina (Gm), 10 para *E. coli* y 200 para *P. putida*; y piperacilina (Pip), 90.

2.5. Sales metálicas

El telurito potásico (Tel) se preparó en solución 1000 veces concentrada en H₂O destilada. Se esterilizó por filtración, se almacenó a -20°C y se utilizó a una concentración final de 15 µg/mL.

2.6. Conservación de cepas bacterianas

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

3. PLÁSMIDOS

En la Tabla M2 se muestran los plásmidos utilizados en este trabajo junto con sus características más relevantes. A continuación se describen más detalladamente los plásmidos mencionados en dicha tabla. Los plásmidos construidos en este trabajo se describen en la Tabla M3.

Tabla M 2. Plásmidos utilizados en este trabajo.

Plásmido	Características	Referencia/fuente
pHP45 Ω Km	Ap ^R , Km ^R ; <i>oriColE1</i> , porta el interposón Ω Km	Fellay et al., 1987
pHP45 Ω Sm	Ap ^R , Sm ^R ; <i>oriColE1</i> , porta el interposón Ω Sm	Prentki y Krisch, 1984
pMP220	Tc ^R ; IncP, amplio espectro de huésped, porta un gen <i>lacZ</i> sin promotor	Spaink et al., 1987
pRK600	Cm ^R ; <i>oriColE1</i> , <i>mobRK2</i> , <i>traRK2</i>	Kessler et al., 1992
pUC18	Ap ^R ; <i>oriColE1</i> , <i>rop</i> ⁻ , α -complementación	Norlander et al., 1983 GenBank: L08752
pUC18Not	Ap ^R ; idéntico a pUC18 pero con sitios <i>NotI</i> flanqueando el MCS de pUC18	Herrero et al., 1990
pET28a(+)	Km ^R , vector de expresión que permite fusionar proteínas a cola de hexa-histidina	Novagen
pGEMT	Ap ^R , vector de clonaje para fragmentos de PCR	Promega
pBS <i>saphA</i>	plásmido pSB que porta un casete no polar de resistencia a Km	Ménard et al., 1993
pSM1695	pUTKmPrib P _{A1/04/03} - <i>gfp</i> -T0-T1 utilizado para marcar cepas con fluorescencia	Andersen et al., 1998
pTTN119	pUTTcPrib P _{A1/04/03} - <i>gfp</i> -T0-T1 utilizado para marcar cepas con fluorescencia	Andersen et al., 1998

pHP45 Ω Km: 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 gen32 del fago T4 obtenido del plásmid pMJK4-18 (Krisch y Selzer, 1981) y por codones de terminación de la traducción en las tres fases de lectura, obtenidos del plásmido pKTH604 (Pettersen et al., 1983). La eficiencia de esta secuencia como sitio de terminación de la transcripción para la ARN polimerasa se ha demostrado mediante experimentos *in vivo* e *in vitro* (Prentki y Krisch, 1984). El plásmido pHP45ΩKm confiere resistencia a ampicilina y a kanamicina.

El plasmido **pHP45ΩSm** tiene la misma estructura que su homólogo con Km (Prentki y Krisch, 1984). El segmento que confiere resistencia a Sm, de 2 Kpb se puede extraer como un fragmento *Bam*HI, *Sma*I, *Eco*RI, o combinaciones de estas tres enzimas de restricción.

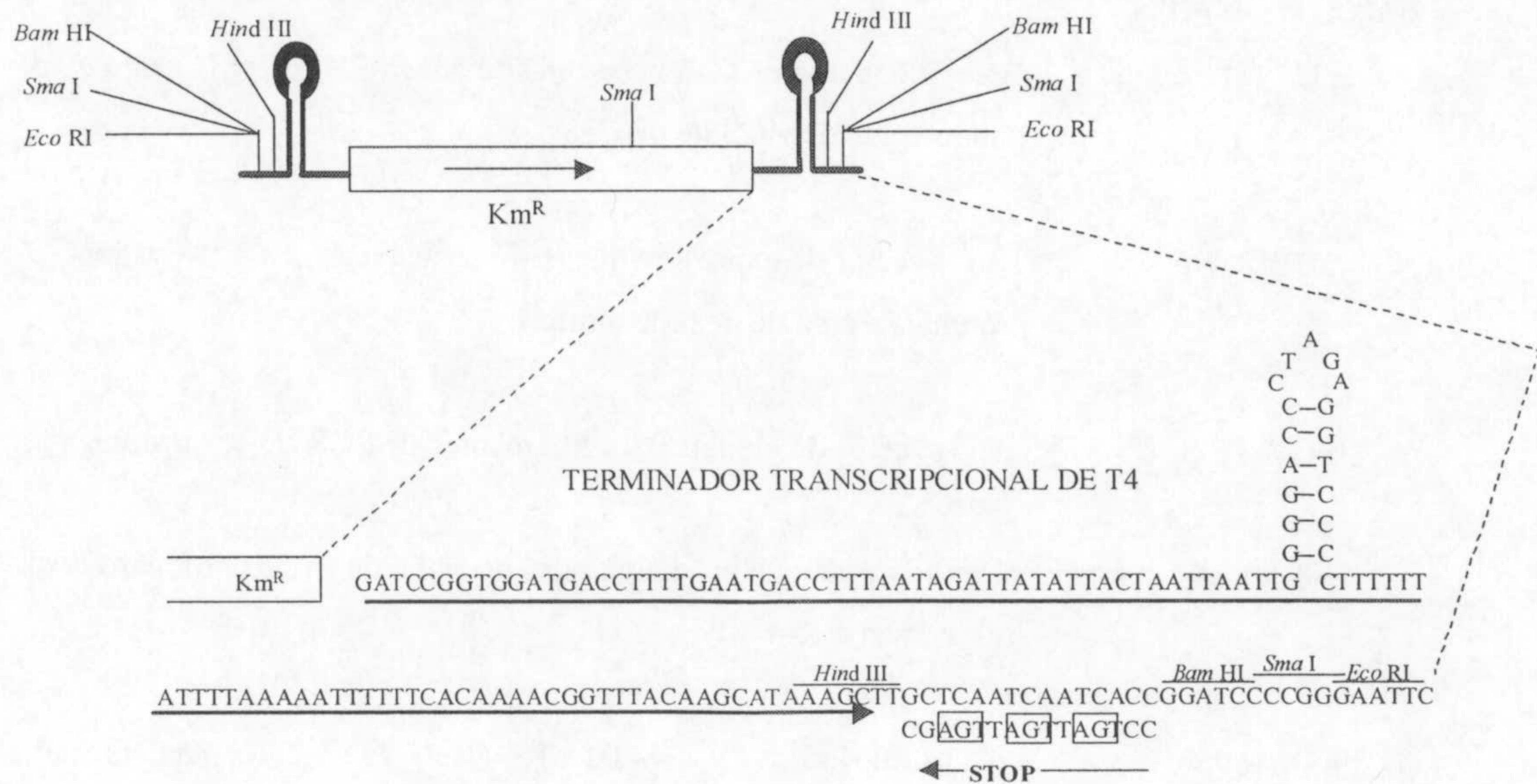


Figura M.1. Interposón Ω-Km del plásmido pHP45ΩKm. Sólo se indican los sitios de restricción relevantes. Las flechas negras indican el sentido de la transcripción. Se muestra en detalle la secuencia del terminador transcripcional del fago T4, así como la de los codones de parada de la traducción en las tres fases de lectura. Los dos terminadores que flanquean el gen de resistencia a kanamicina son simétricos.

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 el enzima de la cloramfenicol acetiltransferasa). La clonación de promotores delante del gen *lacZ* permite medir la expresión desde los mismos como actividad β -galactosidasa (Spaink et al., 1987). Confiere resistencia a tetraciclina.

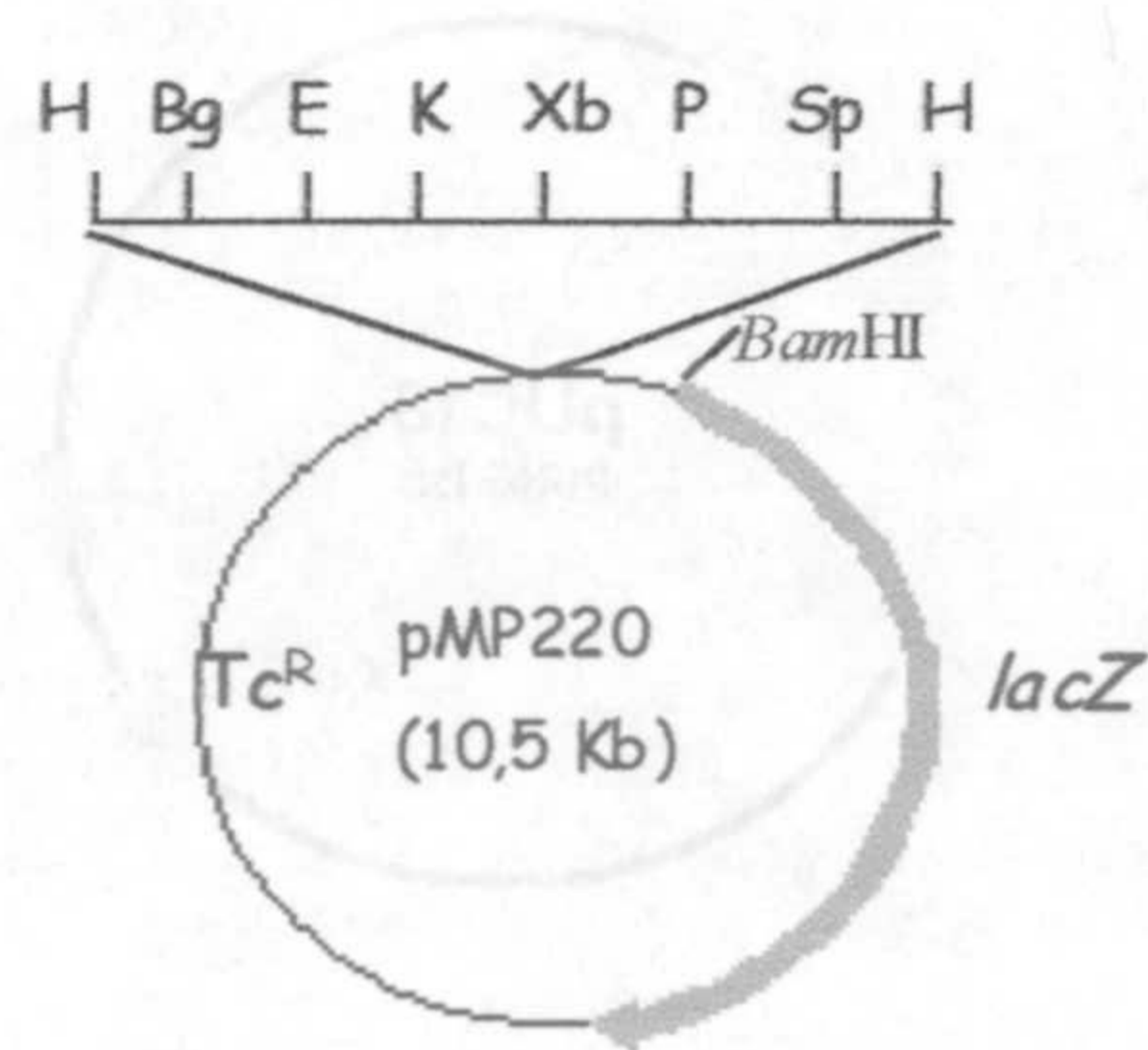


Figura M2. Esquema del plásmido pMP220. Los sitios de restricción de la región de multiclonaje son H, *HindIII*; Bg, *BglII*; E, *EcoRI*; K, *KpnI*; Xb, *XbaI*; P, *PstI*; y Sp, *SphI*.

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 2686 bp que combina fragmentos de pBR322 y de vectores de la serie M13mp. Carece del gen *rop* implicado en el control de número de copias de plásmidos que contienen el origen de replicación de ColE1, y como consecuencia, presenta un alto número de copias (más de 700 por célula). Confiere resistencia a ampicilina, y posee un sitio de clonación múltiple (MCS) dentro de la región que codifica el péptido α de LacZ. Esto posibilita una fácil selección de los plásmidos recombinantes en cepas que permitan α -complementación, es decir, aquellas portadoras de la delección *lacZ* 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 que contenga ampicilina y 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).

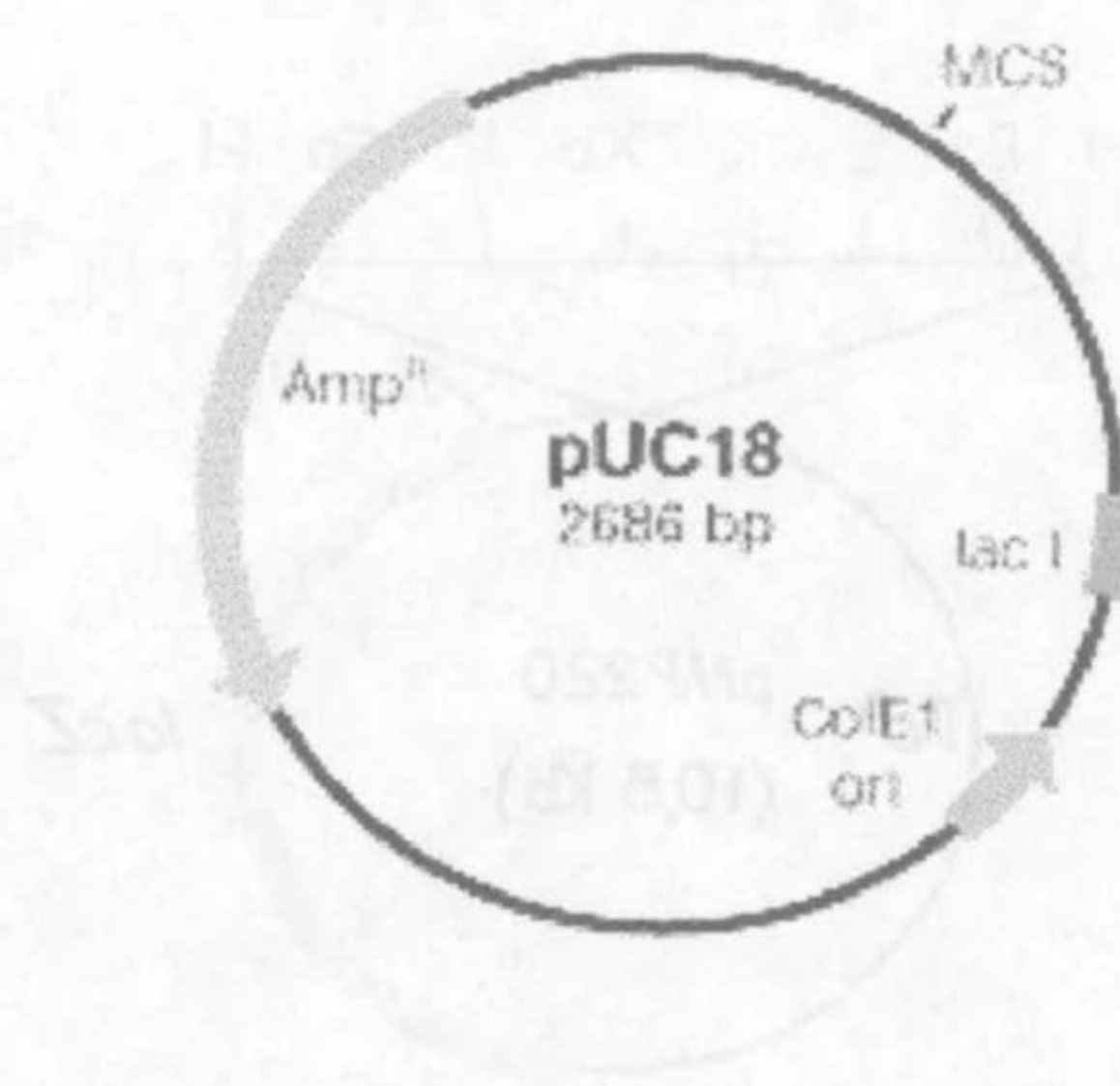


Figura M3. Esquema del plásmido pUC18.

pGEM[®]-T: es un vector que se utiliza para ligar productos de PCR. Proviene del vector [pGEM[®]-T5Zf(+)], basado a su vez en pUC18, que contiene el origen de replicación del fago filamentoso f1 y puede ser utilizado para producir ADN de cadena sencilla. El plásmido contiene los promotores T7 y SP6 de la ARN polimerasa flanqueando el sitio de clonación múltiple, dentro de la región codificante del péptido- α de la enzima β -galactosidasa. La inactivación mediante inserción del péptido- α permite identificar directamente los clones recombinantes mediante selección de color. El vector [pGEM[®]-T5Zf(+)] cortado con *EcoRV* y al que se le añade una timidina en cada extremos 3', que mejora la eficiencia de la ligación de los productos de PCR.

pET-28c (+): es un vector que porta una cola His-Tag[®]/trombina/T7-Tag[®] para fusionar al extremo N-terminal, y con una secuencia His-Tag opcional en el extremo C-terminal. Se consigue marcar así la proteína de interés con una cola de hexahistidina. El gen se clona bajo el control del promotor T7, para poder sobreexpresarlo al transformar el plásmido en una cepa que porta los genes de la T7-

ARN polimerasa (λ DE3 lisogénica), por ejemplo *E. coli* B834. En esta cepa el gen de la T7-ARN polimerasa está bajo el control del promotor *lacUV5*, que se induce al añadir IPTG al medio.

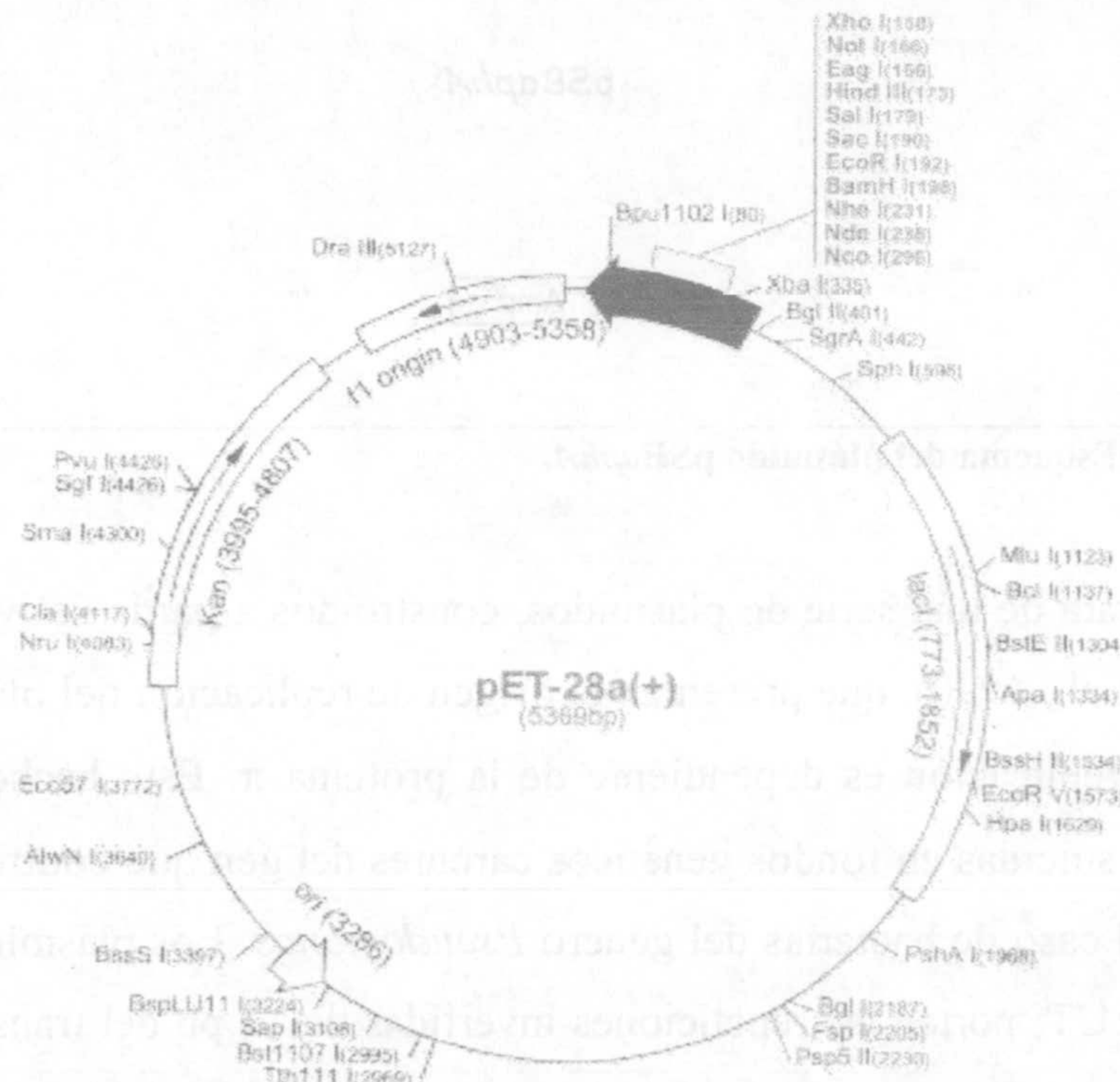


Figura M4. Mapa del vector de expresión de proteínas pET-28a(+). El mapa del vector pET-28c(+) es igual que el de pET-28a(+), excepto que es un plásmido de 5367 pb en vez de 5369.

pSBaphA: está basado en el pBluescriptII SK (Stratagene), al que se ha ligado el casete *aphA* de 900 pb de *Enterococcus faecalis*. Este plásmido se utiliza como fuente de un casete de resistencia a Km que no porta terminadores de la transcripción y por tanto se puede utilizar para construir mutaciones no polares (Mènard et al., 1993).

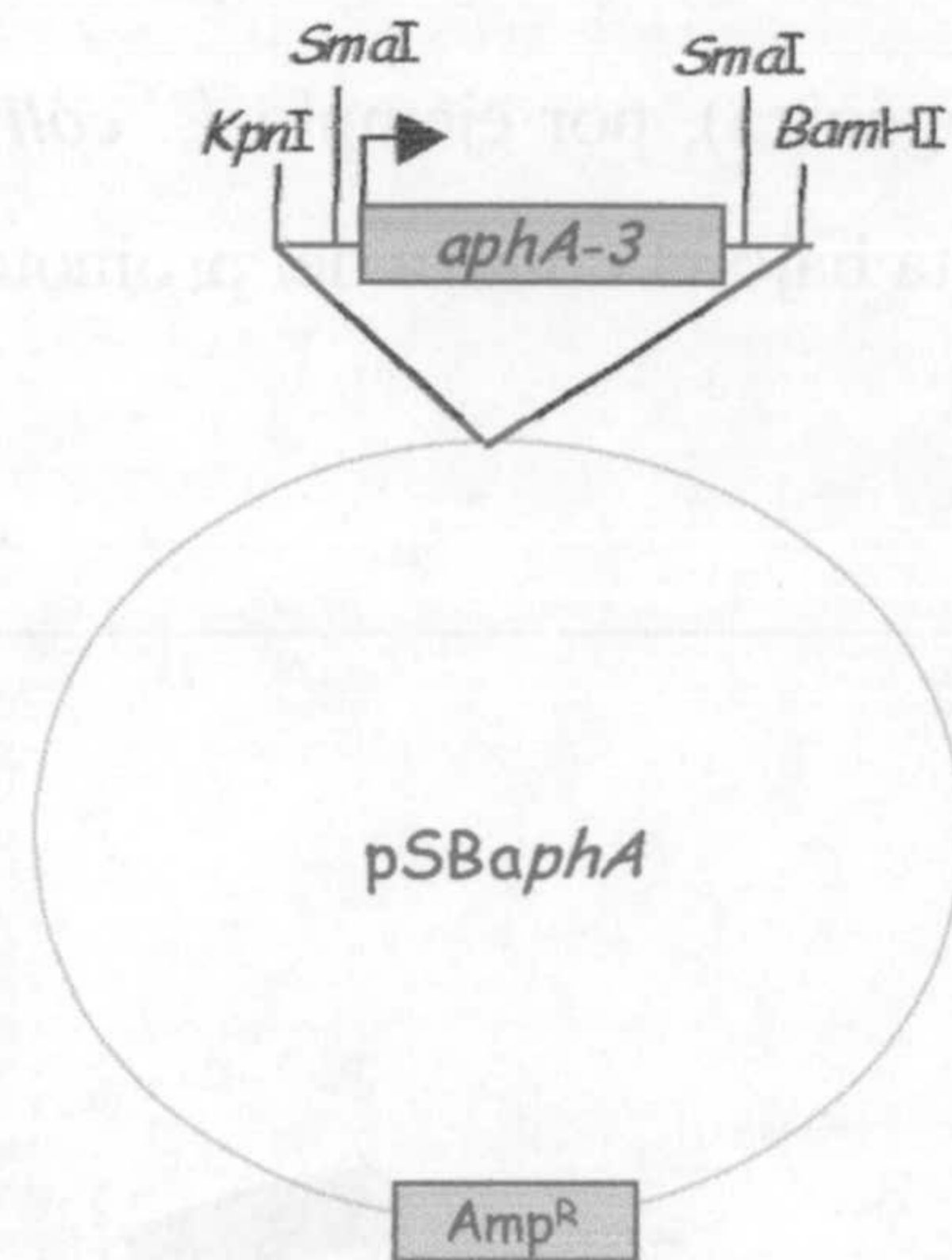


Figura M5. Esquema del plásmido pSBaphA.

pUT: se trata de una serie de plásmidos, contruidos a partir del vector pGP704 (de Lorenzo et al., 1990), que presentan el origen de replicación del plásmido pR6K, por lo que su replicación es dependiente de la proteína π . Este hecho los convierte en plásmidos suicidas en fondos genéticos carentes del gen que codifica dicha proteína, como es el caso de bacterias del género *Pseudomonas*. Los plásmidos pertenecientes a la serie pUT, portan las repeticiones invertidas de 19 pb del transposón Tn5 (IS0 e ISI), por lo que las secuencias de ADN incluidas entre dichas secuencias invertidas y las propias repeticiones constituyen un elemento transponible en presencia de la transposasa de Tn5. En estos plásmidos la transposasa se encuentra fuera del elemento transponible (mini-transposones), lo que ha permitido su empleo en la generación de inserciones estables. En este trabajo se utilizaron mini-Tn5 Km (pSM1695) y mini-Tn5 Tc (pTTN119), para la inserción de la proteína de fluorescencia verde (GFP) en el cromosoma de distintas cepas de *P. putida*.

Tabla M3. Plásmidos que se han construido en este trabajo.

Plásmido	Características	Referencia/fuente
pGG1	pUC18 que contiene un fragmento <i>Bam</i> HI de 7,7 kb con los genes <i>ttgGHI</i> y <i>ttgVW</i> ; <i>ttgI</i> está truncado, sólo incluye 268 pb de <i>ttgI</i>	Cap. I
pGG2	deriva del pGG1, tiene el gen <i>ttgH</i> interrumpido por Ω -Sm insertado en el sitio único <i>Eco</i> RV de <i>ttgH</i>	Cap.I
pANA95*	fusión transcripcional del promotor de <i>ttgV</i> a ' <i>lacZ</i> en el pMP220; región promotora (196 pb) amplificada por PCR introduciendo los sitios de restricción <i>Eco</i> RI- <i>Pst</i> I	Cap. IV
pANA96*	fusión transcripcional del promotor de <i>ttgG</i> a ' <i>lacZ</i> en el pMP220; región promotora amplificada por PCR introduciendo los sitios de restricción <i>Eco</i> RI- <i>Pst</i> I en sentido contrario al de pANA95	Cap. III
pANA125*	fragmento amplificado por PCR, clonado en pGEMT que incluye <i>ttgV</i> flanqueado por los sitios de restricción <i>Nde</i> I- <i>Bam</i> HI	Cap. IV W. Terán
pANA126	fragmento <i>ttgV Nde</i> I- <i>Bam</i> HI clonado en pET28c(+), para proporcionarle una cola de hexa-histidina en el extremo N-terminal de la proteína	Cap. IV
pANA82	fragmento <i>Bam</i> HI- <i>Eco</i> RV de 4,5 Kb derivado de pGG1 ligado a pUC18Not, que contiene los genes <i>ttgVW</i> , <i>ttgG</i> y parte del <i>ttgH</i> .	Cap. IV
pANA83	derivado del pANA82, al que se le ha introducido un Ω Km, en el sitio único <i>Bg</i> III, interrumpiendo el gen <i>ttgW</i>	Cap. IV

pANA117*	fragmento de 2,3 kb amplificado por PCR clonado en pGEMT; contiene los genes <i>ttgV</i> y <i>ttgW</i>	Cap. IV
pANA118	procede del pANA117; <i>ttgV</i> interrumpido por el casete de resistencia a kanamicina <i>aphA</i> , introducido en el sitio <i>XcmI</i> , para generar un mutante no polar	Cap. IV
pANA119	similar al pANA118, pero el gen <i>ttgV</i> está interrumpido por el interposón Ω -Km, para generar un mutante polar	Cap. IV
pWWO <i>xylE::\Omega</i> Km	plásmido catabólico de <i>P. putida</i> mt-2 con el gen <i>xylE</i> interrumpido, con la finalidad de acumular catecoles	Dra. E. Duque Cap. IV

* la secuencia de los oligonucleótidos empleados en la amplificación de los fragmentos se muestra en el apartado 8.6.

4. AISLAMIENTO DE ADN TOTAL

Se utilizó el método descrito por Ausubel et al. (1991) partiendo de 1,5-3 mL de cultivos bacterianos. Tras recoger las células por centrifugación y lavarlas con TE (Tris 10 mM pH 8, EDTA 1 mM), éstas fueron resuspendidas en 567 μ L de la misma solución, a la que se le añade posteriormente, 30 μ L de SDS al 10% (vol/vol) y 3 μ L de proteinasa K (20 mg/mL). Tras 1 h de incubación a 37 °C, se les añadieron 100 μ L de NaCl 5 M, agitando vigorosamente, y 80 μ L de CTAB/NaCl (bromuro de hexadeciltrimetilamonio 10% (p/vol) en cloruro de sodio 0,7 M). La mezcla se incubó 10 min a 65 °C. Posteriormente se hicieron extracciones con fenol: cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1), una extracción final con cloroformo: alcohol isoamílico 24:1 para eliminar los posibles restos de fenol. Se añadieron a la fase acuosa 0,6 vol de isopropanol para la precipitación del ADN. Posteriormente se hicieron dos lavados con etanol 70% (vol/vol), y se resuspendió el ADN en agua milliQ estéril y se cuantificó.

5. AISLAMIENTO DE ADN PLASMÍDICO

La cepa bacteriana portadora del plásmido de interés se cultivó con agitación durante 10-14 h a su temperatura óptima en medio LB 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-27104) siguiendo las instrucciones del fabricante.

6. PREPARACIÓN DE CÉLULAS COMPETENTES

Para la transferencia de plásmidos a células de *E. coli* se prepararon células competentes de las cepas DH5 α F', JM109 y B834, según el método descrito en Maniatis (1982).

7. TRANSFERENCIA DE PLÁSMIDOS

7.1. Por conjugación

La conjugación bacteriana se utilizó para la transferencia de ADN plasmídico desde *E. coli* a cepas de *Pseudomonas*. El sistema utilizado fue el denominado “triparental”. En este sistema de cruce, las funciones de transferencia (*tra*) son aportadas en *trans* por un plásmido auxiliar autotransferible (pRK600, Tabla M2), el cual moviliza el plásmido en cuestión; de esta forma, la bacteria portadora del plásmido auxiliar también forma parte del cruce (de Lorenzo y Timmis, 1994). Este sistema implica que las cepas donadora y receptora, así como la cepa auxiliar deben estar marcadas adecuadamente con resistencias a antibióticos o con capacidades metabólicas específicas que permitan la selección de los transconjugantes y la contraselección de donadores, receptores y cepa auxiliar.

Se partió de cultivos de las cepas donadoras y receptora del plásmido en cuestión, así como de la cepa portadora del plásmido auxiliar, cultivadas a 30°C en agitación durante 12-16 horas. Se recogieron aproximadamente 10^8 células de cada cultivo por

centrifugación a 12.000 x g durante 2 minutos. Las células sedimentadas se lavaron 2 veces con 1 mL de medio 1xM9. A continuación, se mezclaron los tres tipos de células, y se recogieron por centrifugación a 12.000 x g durante 2 minutos. Después, se resuspendieron en 20 µL de 1xM9, y la suspensión bacteriana se depositó sobre un filtro de nitrocelulosa estéril de 0,22 µm de poro colocado sobre la superficie de una placa de LB sólido. Se incubaron a 30°C durante 16-20 horas. Transcurrido este tiempo, el filtro con las células se colocó en un tubo con 5 mL de medio 1xM9, y las células se resuspendieron por agitación. A partir de esta suspensión se hicieron diluciones seriadas en el mismo medio y se sembraron placas de medio selectivo para los transconjugantes y los parentales. Generalmente se ha usado medio mínimo con citrato como fuente de carbono, y el antibiótico adecuado, para favorecer la selección de los transconjugantes de *Pseudomonas*. Las cepas donadora, receptora y auxiliar se sometieron individualmente al mismo tratamiento y se sembraron en placas del mismo medio selectivo, sirviendo como controles negativos de la conjugación.

7.2. Por transformación mediante choque térmico

Se sometió a las células competentes de la cepa de *E. coli* de interés a un choque térmico de 37 °C durante 45 segundos. Este método de transformación fue descrito por Inoue et al. (1990).

7.3. Por electroporación

La transformación de células de *Pseudomonas putida* se realizó mediante el método de Enderle y Farwell (1998). Para ello se partió de un cultivo reciente de *Pseudomonas putida* en medio sólido incubado a 30 °C durante 10-14 horas. De este cultivo se tomaron 3 mg de células, evitando arrastrar el agar del medio, y se resuspendieron en 0,5 mL de H₂O destilada estéril. Las células de la mezcla homogénea se recogieron por centrifugación a 12,000 x g, tras lo que se eliminó el sobrenadante y el sedimento se volvió a resuspender en 500 µL de H₂O destilada estéril, recogiendo en las mismas condiciones. Posteriormente se resuspendieron en 40 µL de H₂O destilada estéril y a partir de ese momento las células se mantuvieron en hielo hasta el pulso eléctrico. Las células preparadas según se ha descrito se mezclaron con 5-15 ng de ADN libre de sales, y esta mezcla se transfirió a una

cubeta de electroporar donde recibieron un pulso eléctrico mediante el Gene Pulser Apparatus (Bio-Rad, ref. 165-2098).

Tras el pulso eléctrico se añadieron 800 μ L de medio rico (SOC) a temperatura ambiente a la mezcla, y la suspensión se incubó 1 hora a 30 °C. A partir de este cultivo se hicieron diluciones seriadas en el mismo medio y se sembraron placas de medio selectivo.

Medio SOC: es medio SOB con 20 mM de glucosa.

Medio SOB: 20 g de bacto triptona; 5 g de extracto de levadura; 584 mg de NaCl; 186 mg de KCl; 5 mL de Cl_2Mg , 2 M; 5 mL de SO_4Mg , 2 M; hasta 1 L de H_2O destilada.

8. MANIPULACIÓN DE ADN Y ARN

8.1. Determinación de la concentración de ADN y ARN

Para estimar la concentración de ADN de una solución se utilizó el método espectrofotométrico descrito por Sambrook y colaboradores (1989). Se determinó la absorbancia de la solución de ADN y ARN a 260 nm y 280 nm, frente a un blanco de H_2O o TE, dependiendo del disolvente utilizado en la disolución del ácido nucleico. La concentración de ADN o ARN de la muestra se calculó respecto al valor estándar de $A_{260}=1$ para soluciones con 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de ADN de cadena doble o 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de ARN. La relación A_{260} / A_{280} se utilizó para estimar el grado de pureza de la preparación, de forma que los valores de esta relación por debajo de 1,8 se consideraron indicadores de contaminación por proteínas y/o fenol.

8.2. Restricción de ADN

Las digestiones de ADN con enzimas de restricción se realizaron en las condiciones óptimas para cada enzima indicadas por el fabricante. Las reacciones contenían habitualmente 0,5-10 μg de ADN, 0,1 volúmenes del tampón de restricción correspondiente, suministrado por la casa comercial (10 veces concentrado), y 0,5-5 unidades del enzima de restricción, en volúmenes finales de 10-30 μL completados con H_2O bidestilada estéril. Las digestiones de plásmidos se

llevaron a cabo incubando las mezclas de reacción durante 2 horas a la temperatura indicada por el fabricante, mientras que las restricciones de ADN cromosómico se incubaron durante 12-16 horas.

8.3. Electroforesis de ADN y ARN en geles de agarosa

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

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

El tamaño de los fragmentos se estimó por interpolación en curvas logarítmicas del tamaño de cada fragmento frente a su movilidad relativa, utilizando como patrón los fragmentos de ADN del fago λ de los patrones comerciales de Roche (patrón VIII [Roche Molecular Biochemicals, ref. 1336045] y patrón X [Roche Molecular Biochemicals, ref. 1498037]). Las imágenes se recogieron con una video-cámara acoplada a una impresora térmica, utilizando el equipo “gel printer” de la casa comercial TDI (Madrid).

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

Tampón TAE: Tris-base, 4,84 g; ácido acético glacial 1,14 mL; EDTA- Na_2 0,5 M pH 8,2 mL, y H_2O hasta 1 litro. Este tampón se preparó a partir de una solución 50 veces concentrada y esterilizada en el autoclave.

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

Cuando fue necesaria la separación y visualización del ARN total también se realizó mediante electroforesis en geles de agarosa, para comprobar si existía contaminación de ADN genómico en las muestras. El procedimiento fue el mismo que el descrito para ADN, con las variaciones siguientes: todo el material de electroforesis se enjuagó previamente en SDS 1% (p/vol) y se aclaró con una solución autoclavada 1:1000 de DEPC en H₂O. El tampón TAE se preparó por dilución del de 50 veces concentrado (anteriormente descrito) en solución autoclavada 1:1000 de DEPC en H₂O. La concentración de la agarosa en el gel fue de 1,5% (p/vol) en lugar de 0,8% (p/vol) y se acompañó de 0,1% (p/vol) SDS. Todo el material de vidrio para preparar estas soluciones se trató previamente con cloroformo para eliminar posibles contaminaciones con ARNasas.

8.4. Recuperación de fragmentos de ADN de geles de agarosa

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

8.5. Ligación de ADN

Para la ligación de moléculas de ADN se partió de fragmentos lineales obtenidos por digestión con enzimas de restricción en sitios compatibles para la ligación. El vector linearizado y el fragmento de ADN obtenido por digestión con uno o varias enzimas de restricción y purificado (según se indica en el apartado 8.3 y 8.4), se mezclaron en una proporción adecuada y se añadió 0,1 volumen de tampón de ligación (suministrado por el fabricante) y una unidad de ADN-ligasa del fago T4 en un volumen final de 15-20 µL completados con H₂O. La mezcla se incubó a 14°C durante 8-14 horas, tras lo que se introdujo en la cepa adecuada por los métodos descritos en los apartados 7.2 y 7.3.

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

Este método se utilizó para la amplificación de fragmentos de ADN del cromosoma, para el análisis de colonias obtenidas tras la transformación de

ligaciones (para encontrar de forma rápida clones con el fragmento de interés), y para la introducción de sitios de restricción adecuados flanqueando los fragmentos de ADN de interés. La reacción de amplificación contenía: ADN molde (0,2 ng de ADN cromosómico ó 10 pg de ADN plasmídico); cebador, 25-50 pmoles; 0,1 volumen de tampón de la Taq ADN-polimerasa (KCl 50 mM, MgCl₂ 1,5 mM, Tris-HCl 10 mM pH 9), dNTPs 25-50 µM de cada uno, Taq ADN-polimerasa 0,1 U/25 µL, H₂O hasta 25 µL. Las condiciones estándar de la reacción de amplificación fueron las siguientes: tras una desnaturalización inicial a 94°C durante 3 minutos, se realizaron 30 ciclos en las siguientes condiciones: 1 minuto a 92°C, 1 minuto a 50°C (temperatura de hibridación) y 1 minuto por cada 1 Kb de ADN del fragmento que queremos amplificar, a 72°C, seguido al final de los 30 ciclos de una extensión de 7 minutos a 72°C. La temperatura de hibridación se varió en función de la temperatura de fusión de los cebadores utilizados. Cuando la reacción estándar no resultó satisfactoria, se combinaron distintas modificaciones en la concentración de MgCl₂ (incrementándola a 3 ó 4,5 mM) y/o la presencia de ciertos compuestos en la mezcla de reacción, como por ejemplo glicerol al 10% (vol/vol) o DMSO al 5% (vol/vol). Ocasionalmente, el producto de la amplificación se purificó utilizando el sistema comercial "QUIAquick PCR Purification Kit" (Qiagen, ref.28104) para eliminar los cebadores y los dNTPs no incorporados.

Los oligonucleótidos utilizados en la construcción de plásmidos (Tabla M.3) han sido los siguientes: (los sitios de restricción correspondientes están subrayados)

pANA95: TtgVPstI, 5'-AACTGCAGATCTTTCCTCTGCGCGTACG-3'
 TtgVEcoRI, 5'-GGAATTCGACGGGGGCTATTGCTGAATCG-3'

pANA96: TtgGEcoRI, 5'-GGAATTCATCTTTCCTCTGCGCGTACG-3'
 TtgGPstI, 5'-AACTGCAGACGGGGGCTATTGCTGAATCG-3'

pANA125: V5'NdeI, 5'-NNNNNNCATATGAACCAATCAGATG-3'
 V3'BamHI, 5'-NNNNNNGGATCCTACTAGGGAGCTTTCTTCGAC-3'

pANA117: se utilizaron los oligonucleótidos srpB11 y srpB39 de la Tabla M.4.

8.7. Secuenciación de ADN

La secuenciación de ADN plasmídico se realizó en el servicio de secuenciación automática de nuestro grupo de investigación, en la Estación Experimental del Zaidín, utilizando el aparato ABI PRISM™ (modelo 3100) de Applied Biosystems. El método de secuenciación fue el comercializado por Applied Biosystems, ABI PRISM™ Dye Terminator, que utiliza en la reacción de extensión el enzima comercializado como “AmpliTaq DNA Polymerase” (ref. 402122), y emplea dideoxinucleótidos marcados con distintos cromóforos fluorescentes.

Tabla M4. Oligonucleótidos utilizados para secuenciación. Los números en azul se refieren a la Figura I.1 (Capítulo I) y en rojo a la Figura IV.1.B (Capítulo IV).

El símbolo (-) indica que la secuencia del oligonucleótido es la complementaria de la que se muestra en la figura. “n.i.” indica que la secuencia de este oligonucleótido queda fuera de la secuencia que se muestra en las Figuras I.1. y IV.1.B.

Nombre	Secuencia (5'→3')	Localización en Figura I.1 o Figura IV.1.B
srpB1	CTTCGTGTAGTGAAGTACCAG	1671-1691
srpB2 (-)	CCTTTTGCTGCTCCATCAGC	2235-2216
srpB3 (-)	ATCGGCTTGCCCGAACGATCC	1742-1721
srpB4	AGGGGGCACGATTCATGTCTCG	1277-1300
srpB5	GCGCTTGTCCACCGGCGGCAATC	2165-2187
srpB6 (-)	GTCCTCAGGGGAGATTCGC	3641-3622
srpB7	GGCCGGGTCAAACGGGTGTACGTCC	3582-3606
srpB8 (-)	TTCGCCACAGAAAATAGGTGG	5040-5020
srpB9 (-)	TCGCCAGAGACAGCGCACCGG	1377-1357
srpB10	TGGCGACCAGGCACCATTGC	3893-3912
srpB10'	TCTATGCGTTGACTGTGCTG	3913-3933
srpB11 (-)	GAAGGCGGCCTGACTCCAGCGC	788-768
srpB12 (-)	CAAGTCAGTTGTCAGGGTCAG	292-271
srpB13	GTCAAGCTTTTCGAGGGGC	4419-4437
srpB14 (-)	TACAAGTCGTCTTGCCTACGCGC	5372-5350
srpB15	TTCCAGCTGGGCTACCAGCTG	5310-5331
srpB16 (-)	GAGCTCATCACCAAAGCGTCC	n.i.
srpB17	GAGGCTTTAGGGCCTGCCGG	395-414
srpB18	CCGAGGTGAGCGTGATCCC	873-892
srpB19	GGCGCTGAAGTCAAGCTGGG	374-394
srpB20 (-)	CGCATGATCGAGGCTGCTCTGG	257-279

srpB21 (-)	CGATACAGCCGACAGCACC	2652-2633
srpB22 (-)	CCCTCGGTACGTTTCAGCGG	3037-3055
srpB23	CCATTCTCAAAGCTCCGG	2776-2793
srpB24	GATGCCAGCGTCATGGCGTTCG	3267-3288
srpB25 (-)	CTCTACGATCAGGATGGCG	4109-4127
srpB26 (-)	GTCGGGGATCAAGCTGCATCATC	4523-4545
srpB27 (-)	CTGCGCCTCCTCAGTAGCGAGG	4950-4971
srpB28	GGCTTGGTGA CTGCCTACGAG	4876-4896
srpB29	GCAGTAGCGCTGCCCTAG	n.i.
srpB30' (-)	CCTTTCGTCCTAGGGTGTTG	724-743
srpB31	GCGTGCTATCGGCCGCGCGTC	949-969
srpB32 (-)	CAAACACCTCAAGCGCCGC	1045-1063
srpB36	GGCAAAGTCCTCTTGGCAGC	647-666
srpB39	GCACAACAAGAAGCGAGGAGGC	n.i.
Buniv2 (M13UN)	GTAAAACGACGGCCAGT	n.i.
Buniv3	GCAGTCGCGCACTGATCTGG	n.i.

8.8. Aislamiento y purificación de ARN

Para experimentos de “extensión a partir de cebador” y RT-PCR, se purificó ARN de la cepa *Pseudomonas putida* DOT-T1E. La cepa se cultivó toda la noche en medio LB. Se eliminó el sobrenadante por centrifugación a 5000 rpm durante 10 minutos. El sedimento se resuspendió en medio mínimo fresco (30 ml) hasta una turbidez a 660 nm de 0,4 y se incubó en matraces de 100 mL a 30°C y 200 rpm hasta que la turbidez alcanzara el valor de 0,8. En ese momento se añadió el inductor a los cultivos. La incubación se llevó a cabo durante 90 minutos. Posteriormente, se recogieron alícuotas de 6 mL en tubos y se sumergieron rápidamente en nitrógeno líquido. La manipulación posterior de los cultivos para la obtención de ARN se llevó a cabo según el protocolo indicado en el kit comercial RNAeasy (*Total RNA Kit*, QIAGEN-ref. 74104).

Las muestras de ARN fueron verificadas en un gel de agarosa-TAE 1,5 % (p/vol) y se cuantificó la concentración espectrofotométricamente, con cubetas de cuarzo de 0,3 mL. Normamente la muestra se diluyó 300 veces para su cuantificación.

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

Con las muestras de ARN libres de ADN se llevaron a cabo reacciones de amplificación utilizando el kit *One Tube RT-PCR system* (Roche Molecular Biochemical, ref.1855476) utilizando los oligonucleótidos adecuados para cada caso. Se incluyeron controles positivos y negativos en cada experimento. Las condiciones generales fueron: 50 °C, 30 min; 94 °C, 2 min; y luego 30 ciclos de 94 °C, 30 seg; 60 °C, 30 seg; 68 °C, 1 min; y 4 °C por un tiempo indefinido. Los productos de RT-PCR se separaron en geles de agarosa-TAE y se observaron sobre una lámpara de luz ultravioleta tras ser teñidos en una solución de bromuro de etidio. Los oligonucleótidos utilizados fueron: srpB18 y srpB9 entre *ttgG* y *ttgH*; srpB10' y srpB26 entre *ttgH* y *ttgI*; srpB20 y srpB12 entre *ttgV* y *ttgG*; srpB32 y srpB36 entre *ttgV* y *ttgW* (ver Tabla M.4).

9. EXTENSIÓN A PARTIR DE CEBADOR

9.1. Marcaje de cebadores

Los oligonucleótidos utilizados como cebadores fueron marcados por fosforilación en su extremo 5' con [γ -³²P]ATP (Amersham Pharmacia Biotech, ref. AA0068). Cada reacción contenía en un volumen final de 10 μ L, 1 μ L de tampón de polinucleótido quinasa 10 veces concentrado, 10 pmoles de oligonucleótido, 1 μ L de [γ -³²P]ATP (>3000 mCi/mmol) y 1 unidad de polinucleótido quinasa del fago T4. Las reacciones se incubaron a 37 °C durante 1 h y la quinasa se eliminó tratando con fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1). El exceso de nucleótido radiactivo se eliminó por filtración forzada a través de una columna rellena de gel Sephadex G-25.

Tampón de polinucleótido quinasa 10 veces concentrado: TrisHCl, 0,5 M pH 7,6; MgCl₂, 0,1 M; DTT, 50 mM; espermidina 1 mM; EDTA, 1 mM.

9.2. Reacción de extensión

Como cebadores complementarios a las cadenas de ARNm se utilizaron los oligonucleótidos srpB12 (complementario a *ttgG*; ver Tabla M.4) y srpB20

(complementario a *ttgV*; ver Tabla M.4). Éstos hibridan con secuencias próximas al extremo 5' de los ARNm de los genes en estudio, dentro de la región codificante. Para la hibridación de los oligonucleótidos marcados con las cadenas de ARN se mezclaron 2 μL de tampón de hibridación, 10^5 cpm del oligonucleótido marcado y 10-60 μg de ARN total en un volumen final de 10 μL . La mezcla se incubó a 85 °C durante 5 minutos, se pasó a un baño a 65°C y se dejó enfriar hasta 45°C. La reacción de extensión se realizó añadiendo 40 μL de tampón de transcriptasa reversa que contenía: 1 mM de cada uno de los 4 desoxinucleótidos, 20 U de inhibidor de RNasa, 3 μg de Actinomicina D, y 7 U de transcriptasa reversa del virus de la mieloblastosis de ave (AMV), y se incubó a 44°C durante 1 hora. La reacción se detuvo mediante la adición de 5 μL de acetato sódico 3 M pH 4,8 y 150 μL de etanol.

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

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

Tampón de transcriptasa reversa: Tris-HCl, 12,5 mM pH 8,2; ditioneitol (DTT), 10 mM; MgCl₂, 6 mM.

9.3. Separación de las cadenas extendidas de ADNc mediante electroforesis

Las reacciones de extensión se precipitaron por centrifugación a 12000 x *g* durante 15 min, se lavaron con etanol al 70 % (vol/vol) y se resuspendieron en 6 μL de TE y 3 μL de tampón de carga con formamida. La separación de las cadenas de ADNc con distinta longitud se llevó a cabo mediante electroforesis en geles (40 x 20 cm) desnaturalizantes de poliacrilamida al 6 % (p/vol) en tampón TBE, a potencia fija de 40 W y voltaje variable entre 1500 y 2000 V.

Una vez finalizada la separación, el gel se transfirió a un papel de filtro Whatman 3MM, se cubrió con plástico transparente y se secó al vacío con un secador Bio-Rad a 80°C durante 20 minutos. El gel se autorradiografió en una película Amersham Hyperfilm-MP durante al menos 24 horas a -80°C. La película se reveló utilizando métodos estándar. Alternativamente, el gel se cuantificó mediante un Molecular Imager modelo GS-525 (Bio-Rad).

La composición de las soluciones utilizadas fue la siguiente:

TBE: Tris-base, 4,84 g; ácido acético glacial, 1,14 mM; EDTA-Na₂, 0,5 M pH 8,0, 2 mL; H₂O hasta 1 litro.

Solución concentrada de acrilamida 40% (p/vol): acrilamida, 38 g; N,N'-metilenbisacrilamida, 2 g y H₂O hasta 100 mL. La solución filtrada se almacenó en oscuridad a 4°C.

Acrilamida desnaturalizante 6 % (p/vol): acrilamida 40 % (p/vol), 9 mL; urea, 25,2 g; TBE (5 veces concentrado), 12 mL; y H₂O hasta 60 mL.

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

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

10. TRANSFERENCIA DE ADN A MEMBRANA POR EL MÉTODO “SOUTHERN BLOT E HIBRIDACIÓN”

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

10.1. Transferencia de ADN por capilaridad

Las muestras de ADN, digeridas con enzimas de restricción apropiadas, se separaron en geles de agarosa y se transfirieron a membranas de nylon de 0,45 µm de diámetro de poro cargadas positivamente (Roche Molecular Biochemicals, ref. 1417240), siguiendo el protocolo de transferencia alcalina descrito por Reed y Mann (1985).

Después de la electroforesis el gel se sumergió en una solución 0,2 N de HCl durante 15 minutos hasta que se produjo el viraje de azul de bromofenol a amarillo. Este tratamiento ácido permite introducir mellas en el ADN y depurarlo, lo que facilita la transferencia. El ADN se desnaturalizó introduciendo el gel en una solución de NaOH 0,5 M, hasta que se observó de nuevo el viraje del indicador, ahora de amarillo a azul.

Sobre un cristal se colocó una tira de papel de filtro del mismo ancho que el gel, de manera que los extremos quedasen sumergidos en la solución de

transferencia, 10 x SSC, colocada en el reservorio inferior. Sobre el papel se colocó el gel en posición invertida y sobre éste la membrana, sobre la cual se depositaron varias capas de papel de filtro que hacen de absorbentes, otro cristal y por último un peso de aproximadamente 0,5 Kg. De esta forma la solución de transferencia ascendió por capilaridad a través del gel arrastrando el ADN hasta la membrana, donde quedó retenido. La transferencia total de ADN del gel a la membrana requiere un mínimo de 5 horas, aunque a veces se dejó transfiriendo toda la noche. La membrana se lavó posteriormente en 10 x SSC, para eliminar los posibles restos de agarosa, y se dejó secar sobre un papel de filtro.

Para asegurar la adhesión de las moléculas de ADN a la membrana de nylon, ésta se expuso durante 3 minutos a una lámpara ultravioleta. Las membranas se conservaron secas a temperatura ambiente selladas en bolsas de plástico hasta su utilización.

Composición del tampón de transferencia 10 x SSC: 1,5 M NaCl, 0,15 M citrato sódico dihidratado, pH 7.

10.2. Marcaje no radiactivo de ADN lineal.

El marcaje de la sonda con digoxigenina y la detección de los híbridos ADN-ADN se realizó utilizando el sistema comercial "*DIG DNA Labeling and Detection Kit*" (Roche Molecular Biochemicals, ref. 1093657). Las sondas de ADN se marcaron con DIG-11-dUTP (Roche Molecular Biochemicals, ref. 1093088), mediante extensión con el fragmento de Klenow de la ADN-polimerasa de *E. coli*, y utilizando como cebadores una mezcla aleatoria de hexanucleótidos. El marcaje de la sonda y su recuperación se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante.

En algunos casos el marcaje de la sonda se hizo por PCR utilizando el mismo producto DIG-11-dUTP, que produce una incorporación múltiple de dUTP marcado, ya que puede ser usado como sustrato por la Taq-polimerasa, reemplazando al dTTP durante la reacción en cadena de la polimerasa. La mezcla de reacción contenía: ADN molde, 0,05-1 µg; cebador, 25 pmoles; tampón Taq-ADN-polimerasa (10x) 2,5 µL; dNTPs: 0,2 mM de dATP, dCTP y dGTP; 0,18 mM de dTTP y 0,02 mM de dig-dUTP; Taq ADN-polimerasa 1 U y H₂O hasta 25 µL. Para la amplificación se usó el programa descrito en el apartado 8.6 para la amplificación de genes cromosómicos.

10.3. Prehibridación e hibridación

Se utilizó un horno de hibridación (Techne Hybridiser HB-1D, Cambridge). Se mantuvo la membrana con solución de prehibridación durante 1-2 horas a 65°C (20 mL de solución de prehibridación por cada 100 cm² de membrana). Se retiró la solución de prehibridación y se añadió la sonda marcada y desnaturalizada disuelta en solución de prehibridación. Se realizó la hibridación durante 6-15 horas a 65°C. El lavado de las membranas se realizó en las siguientes condiciones de fuerza iónica y temperatura: dos lavados de 10 min cada uno a temperatura ambiente en 2 x SSC suplementado con 0,1% (p/vol) de SDS y dos lavados de 15 min a 65°C en 0,1 x SSC con 0,1% (p/vol) de SDS.

La composición de la **solución de prehibridación** fue la siguiente: 5 x SSC; 0,1% (p/vol) N-laurilsarcosina (sal sódica); 0,02% (p/vol) SDS; 0,5% (p/vol) agente bloqueante (suministrado por el fabricante); H₂O hasta 20 mL.

Para las hibridaciones con sondas heterólogas se emplearon condiciones de hibridación relajadas, disminuyendo la temperatura de hibridación a 42°C.

10.4. Sondas utilizadas en las hibridaciones ADN-ADN

Para producir las sondas que se utilizaron en las hibridaciones para la comprobación de las distintas mutaciones que llevamos a cabo en esta Tesis Doctoral utilizamos los siguientes oligonucleótidos (Tabla M.4): srpB5 y srpB22 para la sonda de *ttgH*, que origina un fragmento de ADN de 873 pb; srpB31 y Buniv3, que da un fragmento de ADN de 1,1 Kbp, para la sonda de *ttgW*; srpB12 y srpB32, para la sonda de *ttgV*, fragmento de 1,2 Kbp.

Las sondas utilizadas para la búsqueda de bombas homólogas a las descritas en *Pseudomonas putida* DOT-T1E en otras cepas de *Pseudomonas* (Capítulo II) se construyeron con los oligonucleótidos siguientes: MexBr2 y MexBr3 (fragmento de aprox. 700 pb) para la sonda de *ttgB*; TtgE1 y TtgE2 para *ttgE* (fragmento de aprox. 800 pb); SrpB5 y SrpB22 para *ttgH* (Tabla M.4, fragmento de ADN de 873 pb).

MexBr2: 5'-CAACGGTGTCGAAGCGATGG-3'

MexBr3: 5'-CCCAGCCTCATAACGTGG-3'

TtgE1: 5'-CAGCCAGTATCCCAACATTGCTGC-3'

TtgE2: 5'-ATCCTGACCTCGGTAGTTGGCGG-3'

10.5. Detección inmunológica

Esta reacción se realizó con el sistema *Detection kit* (Roche 1093657), siguiendo el protocolo detallado por el fabricante. La membrana se lavó con solución tampón-1, y se incubó en 100 mL de solución tampón-2 durante 30 minutos. A continuación se lavó con tampón-1 y se incubó con 20 mL de solución de anticuerpo (anti-digoxigenina-fosfatasa alcalina conjugado) diluido en tampón-1 durante 30 minutos. Posteriormente, se realizaron dos lavados de 15 min con 100 mL de tampón-1 para eliminar el anticuerpo no unido. A continuación, la membrana se equilibró con 20 mL de solución tampón-3 durante 2 minutos y finalmente se incubó con 10 mL de la solución colorante durante 1 a 20 horas en oscuridad. La reacción se detuvo lavando con 50 mL de H₂O durante 5 minutos.

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

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

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

Tampón-3, pH 9,5: Tris-HCl (pH 8,0), 100 mM; NaCl, 100 mM y MgCl₂, 50 mM.

Solución de anticuerpo: anticuerpo anti-digoxigenina-fosfatasas alcalina conjugado, preparado en 20 mL de tampón-1 a una concentración final de 150 mU/mL

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

11. MEDIDA DE LA ACTIVIDAD β-GALACTOSIDASA

La medida de la 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 β-galactosidasa, es hidrolizado por el enzima produciendo galactosa y *o*-nitrofenol. Éste es de color amarillo y su concentración puede determinarse espectrofotométricamente.

Los cultivos celulares incubados a 30°C durante 12-14 horas se diluyeron 100 veces en 25 mL de medio LB líquido o medio mínimo M9 y se incubaron a 30°C en agitación. Tras un período de incubación de 1,5 horas se añadió el inductor. Se recogieron alícuotas de un volumen variable entre 100 y 25 µL para su

permeabilización con el mismo volumen de detergente MATAB (2 mg/mL de bromuro de alquil-trimetil-amonio en Tris-ClH 0,2 M pH 8). A su vez se midió la turbidez del cultivo a 660 nm. Tras incubar la mezcla de células con MATAB en hielo durante 20 minutos, se añadieron 800 μ L de tampón Z pH 7 y 0,2 mL de solución de ONPG. La mezcla de reacción se incubó a 30°C hasta la aparición de color (entre 2 minutos y un máximo de 30 minutos). La reacción 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. También se midió la absorbancia de cada muestra a 550 nm para realizar una corrección debida a contribución de la turbidez celular.

Generalmente se llevó a cabo este proceso antes de poner el inductor en el cultivo, para tener un punto inicial, y aproximadamente cada hora después. Cuando se determinó que el máximo de actividad β -galactosidasa para los promotores de *ttgGHI* y *ttgVW* en nuestras cepas de *Pseudomonas* estaba en torno a las 4,5 horas medíamos directamente en este tiempo, prescindiendo de las medidas a tiempos anteriores. Rutinariamente los ensayos de actividad 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 minutos y “V” el volumen (en mL) de células utilizado en la permeabilización.

Tampón Z: 60 mM Na₂HPO₄, 40 mM NaH₂PO₄, 10 mM KCl, 1 mM MgSO₄ y 50 mM de β -mercaptoetanol, pH 7.

Solución de ONPG: 4 mg/mL de *o*-nitrofenil- β -D-galactopiranosido en tampón fosfato 0,1 M pH 7. La solución de ONPG se mantuvo estable a 4°C y en oscuridad durante 2 semanas aproximadamente.

12. CONSTRUCCIÓN DE MUTANTES POR INTERCAMBIO ALÉLICO

Para la construcción de mutantes de *P. putida* DOT-T1E por recombinación homóloga se utilizaron los vectores pUC18, pUC18*Not*, o pGEM-T (Tabla M2), en los cuales se clonaron los genes que interesaba mutar interrumpidos por un gen marcador (los interposones Ω -Km, Ω -Sm o el casete no polar *aphA*). En general se incluyó al menos 1 kb de secuencia de ADN del gen en cuestión a ambos lados de cada marcador. El plásmido se transfirió por electroporación a las cepas de *P. putida* que se deseaba mutar. Se seleccionaron los transconjugantes resistentes a Km o Sm, 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. Los merodiploides se comprobaron por hibridación en *Southern blot*. Se cultivaron en LB líquido durante una noche y se sembraron en placas de LB sin antibiótico. El crecimiento en ausencia de presión selectiva favoreció el segundo evento de recombinación, que tuvo como consecuencia la pérdida del vector y de una de las copias del gen que se deseaba mutar (bien la copia silvestre o la mutada). Se volvieron a sembrar las colonias de LB en los medios selectivos adecuados para comprobar que se había el vector y seleccionar las que portaban la copia mutada (a los que llamamos clones resueltos). Finalmente, se confirmó la mutación mediante PCR e hibridaciones *Southern-blot*, utilizando las sondas descritas en el apartado 10.4. Para la selección de los cointegrados y resueltos tuvimos que aumentar 3 veces la concentración de algunos antibióticos respecto a la concentración normal usada para *Pseudomonas putida* (Pip [hasta 300 $\mu\text{g/mL}$], Ap [hasta 300 $\mu\text{g/mL}$], y Sm [hasta 150 $\mu\text{g/mL}$]; la concentración de Km fue la normal [25 $\mu\text{g/mL}$]).

13. ENSAYOS DE RESISTENCIA/SENSIBILIDAD

13.1. Ensayos de tolerancia a tolueno

Las células se cultivaron en 30 mL de medio LB con o sin tolueno en fase gaseosa durante toda la noche. Al día siguiente, los cultivos se diluyeron 1:100 y se dejaron

crecer en las mismas condiciones hasta que alcanzaron una turbidez a 660 nm de 0.8. Estos cultivos contenían aproximadamente 10^8 UFC/mL. Los cultivos se dividieron en dos mitades: a una se le añadió 0,3 % (vol/vol) de tolueno y la otra se mantuvo como control. El número de células viables se determinó antes de añadir el tolueno y 10, 30 y 60 minutos después.

También se determinó la tolerancia a otros disolventes como: estireno, benceno, etilbenceno, propilbenceno y *m*-xileno. Se utilizó 0,3%, 0,1% ó 0,075% (vol/vol) de estos disolventes, según los casos.

13.2. 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 utilizaron placas de microtitulación de 96 pocillos con fondo en forma de "U" (Saerstedt, ref. 83.1837.500). Los antibióticos se prepararon concentrados: gentamicina, carbenicilina, ácido nalidíxico y ampicilina se prepararon en agua a una concentración de 15 mg/mL, 64 mg/mL, 25 mg/mL y 32 mg/mL respectivamente. El cloramfenicol se preparó en etanol 70% (vol/vol) a 20 mg/mL, y la tetraciclina en etanol absoluto a una concentración de 6 mg/mL. Las soluciones de antibióticos concentrados se diluyeron en medio LB líquido hasta un volumen de 100 μ L de modo que las concentraciones en las concentraciones de partida fueron: carbenicilina, 2 mg/mL; ácido nalidíxico, 512 μ g/mL; gentamicina, 32 μ g/mL; cloramfenicol, 512 μ l/mL; tetraciclina, 64 μ g/mL y ampicilina, 1024 μ g/mL. Estos 100 μ L de cada uno de los antibióticos 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 50 μ L de LB líquido. Con ayuda de una pipeta multicanal se realizaron diluciones seriadas, mezclando 50 μ L de la solución de antibiótico de la primera columna con los 50 μ L de LB líquido de la segunda columna, y así sucesivamente hasta la última columna, desechándose los 50 μ L finales. De esta manera, la concentración de antibiótico de cada columna de pocillos disminuye a la mitad con respecto a la anterior. Se mantuvo una fila de pocillos sin antibiótico y sin inocular con bacterias como control de la esterilidad del LB. Tras preparar las placas de cultivo con los antibióticos, se añadieron a cada uno de los pocillos 50 μ L de un

cultivo de células de las cepas en estudio en fase de crecimiento exponencial ($DO_{660} \sim 0,8$) 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.

14. PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS

14.1. Preparación de lisado celular total

Entre 1 y 10 mL de un cultivo de células en la fase de crecimiento deseada se recogieron por centrifugación a $2500 \times g$ durante 10 minutos a 4°C . El sedimento celular se resuspendió en tampón de muestra (Laemmli, 1970) con lisozima (una punta de espátula) y se rompieron las células por sonicación. Se centrifugó el lisado celular para separar la fracción soluble de la de membrana ($10.000 \times g$, 10 minutos). Para cargar las muestras se desnaturalizaron por calor (5 minutos a 100°C) y se les añadió tampón de carga 2x. Como patrón de peso molecular se utilizó el marcador comercial "*Color Markers, Wide Range*" (Sigma, ref. C3437).

14.2. Separación de proteínas por electroforesis desnaturalizante 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 40% [p/vol] de poliacrilamida) y un segmento inferior separador (con una concentración de poliacrilamida entre el 10 y el 15% [p/vol]). Tanto los geles como el tampón de electroforesis llevaban 0,1% (p/vol) de SDS.

14.3. 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/vol] de azul de Coomassie en una mezcla de metanol:ácido acético:agua en proporción 45:10:45 [vol/vol/vol]). La tinción se llevó a cabo calentando el gel sumergido en la solución de Coomassie en un microondas hasta que comenzó a hervir. El gel se dejaba enfriar a temperatura ambiente agitando durante 5 minutos en esta misma solución. Esta operación se repitió 3 veces. Después se agitaba a temperatura ambiente en una solución de decoloración (idéntica a la anterior, pero sin Coomassie) que se cambiaba frecuentemente por solución fresca, hasta que las bandas de proteínas fueron visibles 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% (vol/vol) y metanol 30% (vol/vol) 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 sobre un cristal.

15. ANÁLISIS INFORMÁTICO DE SECUENCIAS

Para el tratamiento y análisis de secuencias de nucleótidos y aminoácidos (determinación de las fases de lectura abierta, de los sitios de restricción, uso de codones, perfiles de hidropatía, composición de aminoácidos, etc.) se emplearon los programas informáticos DNA Strider v. 1.3 (Marck, 1988) y SeqEd v. 1.0.3 (Applied Biosystems Inc., 1992).

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 y 1997) disponible en el servidor de internet del NCBI, y FASTA3 (Pearson y Lipman, 1988) disponible en el servidor de internet del EMBL-EBI (*European Bioinformatics Institute*) (Tabla M5). Para la predicción de péptidos señal

y de su sitio de corte se usó el programa SignalP v. 2.0 (Nielsen et al., 1997) disponible en el servidor de internet del CBS (Tabla M5). El alineamiento de secuencias se realizó con el programa Clustal W (Thompson et al., 1994) disponible en el servidor de internet del EMBL-EBI (Tabla M5). Se buscaron los motivos HTH de unión a ADN en las proteínas reguladoras con el programa Helix-turn-helix motif prediction de Network Protein Sequence @analysis TIBs 2000 (Dodd y Egan, 1990). La búsqueda de motivos transmembrana se realizó con el programa Tmpred del servidor ISREC. Con todos estos programas se usaron las opciones estándar.

Para la modelización de la estructura tridimensional de la proteína TtgH basándonos en la estructura de AcrB, se empleó el método *First Approach* del servidor de Swiss-Model (Schwede, et al., 2003).

TABLA M5. Direcciones de internet de algunos de los programas informáticos utilizados.

Programa	Dirección
BLAST	http://ncbi.nlm.nih.gov/BLAST
FASTA3	http://www.ebi.ac.uk/fasta33
SignalP v2.0	http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP-2.0/
Tmpred	http://www.isrec.isb-sib.ch/ftp-server/tmpred/
Clustal W	http://www.ebi.ac.uk./clustalw
HTH motif prediction	http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/primanal.hth.pl
Swiss Model First Approach	http://swissmodel.expasy.org/SM_FIRST.html

16. ESTUDIO DE INTERACCIONES ADN-PROTEÍNA: retardos en gel

16.1. Sobreexpresión y purificación de (His)₆-TtgV

Con objeto de establecer las condiciones óptimas para la sobreexpresión de TtgV, la cepa *E. coli* B834 (pANA126) se cultivó en presencia de distintas concentraciones de IPTG y a distintas temperaturas. Estos ensayos se realizaron en matraces de 100 mL con 25 mL de LB suplementado con Km en el que se diluyó 100 veces un cultivo saturado de *E. coli* B834 (pANA126). Los matraces se incubaron a 37°C y 200 rpm hasta que alcanzaron una turbidez a 660 nm de 0,5. La expresión de TtgV se indujo en las distintas alícuotas mediante la adición de IPTG para alcanzar una concentración final de 0,1, 1, 5 y 10 mM; y los cultivos se incubaron a 25, 30 o 37 °C. Antes de la adición de IPTG y tras 1, 2, 3 y 4 horas de incubación, se tomaron muestras de 2 mL de cada cultivo que se centrifugaron a 13.000 x g. Tras retirar el sobrenadante, las células de cada muestra se resuspendieron en 100 µL de agua destilada, y se lisaron mediante sonicación. Se analizó el contenido en proteínas de cada muestra mediante electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida y tinción con azul de Coomassie como se describió en el apartado 14. Encontramos que las condiciones óptimas para la sobreexpresión de TtgV fueron 1 mM de IPTG y 4 horas de incubación a 30°C.

Para la purificación de la proteína se cultivó *E. coli* B834 (pANA126) en 1 L de LB y se indujo la expresión de TtgV en las condiciones óptimas que se acaban de describir. Las células se recogieron por centrifugación a 10.000 x g a 4°C durante 15 minutos y se almacenaron a -20°C. Posteriormente las células se resuspendieron en 30 mL de solución A (25 mM NaH₂PO₄ pH7, 5% [vol/vol] glicerol y 10 mM NaCl), con una punta de espátula de lisozima y una pastilla de cóctel de inhibidor de proteasas (Roche 1873580). La suspensión celular se sometió a sonicación para romper las células. Todos los pasos de purificación a partir de ese momento se llevaron a cabo a 4°C. La suspensión de células sonicadas se centrifugó durante 30 minutos a 18.000 x g. El sobrenadante constituyó el denominado extracto crudo que se cargó en un FPLC (ÄKTA, Amersham Pharmacia Biotech), provisto de una columna quelante de níquel de 5 ml HiTrap™ (Amersham Pharmacia Biotech) previamente equilibrada con 2 volúmenes de 0,12 g/mL de NiCl disuelto en acetato amónico 100 mM. El exceso de NiCl se lavó con acetato amónico 100 mM. La

elución de la proteína se llevó a cabo mediante un gradiente lineal de imidazol (1M de imidazol en solución A). Se recogieron fracciones de 5 mL que posteriormente fueron analizadas para determinar su contenido de proteínas. Dos de las fracciones, en las que (His)₆-TtgV (tamaño de 28,1 kDa) era homogénea se conservaron para ensayos posteriores, aunque previamente se concentró mediante diálisis y calculamos su concentración mediante el kit de ensayo de proteínas de Bio-Rad (Bio-Rad Laboratories 500-0006) basado en el ensayo de Bradford (1976).

16.2. Ensayos de retardo en gel o de cambio de movilidad electroforética

Este ensayo se basa en la diferencia de movilidad electroforética que presenta el ADN libre respecto al ADN unido a proteínas. El ADN utilizado para el ensayo fue un fragmento de 450 pb que contenía la región intergénica *ttgV-ttgG*. Este fragmento se amplificó por PCR utilizando los oligonucleótidos *srpB12* y *srpB20* (Tabla M4) y el plásmido pGG1 como molde (Tabla M3). Posteriormente se marcó en los extremos 5' con digoxigenina-dUTP utilizando la ADN polimerasa T4 (Maniatis et al., 1982), y se purificó el fragmento utilizando el kit de limpieza de productos de PCR de Quiagen (ref. 28104). El ADN marcado se incubó con distintas concentraciones de (His)₆-TtgV durante 10 min en el tampón de unión (TGED, Maniatis et al., 1982). La concentración de ADN marcado en el ensayo fue de 0,2 nM, mientras que la concentración de proteína se varió entre 50 y 150 nM. Las mezclas de reacción se separaron mediante electroforesis en un gel de poliacrilamida de 4,5% (p/vol) en condiciones no desnaturalizantes, siendo el tampón de electroforesis 1x Tris-glicina (Maniatis et al., 1982). Tras completar la electroforesis, el ADN se transfirió a una membrana de nylon, detectándose inmunológicamente utilizando un anticuerpo anti-digoxigenina conjugado a fosfatasa alcalina, siguiendo las instrucciones del fabricante (*Dig luminiscent Detection Kit*, Roche 1363514). Para visualizar el ADN marcado se recogió la luminiscencia producida por la desfosforilación del CSPD por la acción de la fosfatasa alcalina en películas de rayos-X.

Los experimentos de competencia se llevaron a cabo utilizando concentraciones crecientes de ADN desde una relación 1:1 (ADN marcado: ADN sin marcar) hasta 1:1000, tanto con ADN específico como inespecífico. Como ADN inespecífico utilizamos ADN de esperma de salmón.

17. BIOFILMS

17.1. Marcaje de las cepas

Para visualizar la captación de imágenes en microscopia confocal marcamos las cepas con la proteína de fluorescencia verde (GFP) de *Aequorea victoria*, que absorbe luz azul y emite fluorescencia verde. Se introdujo el gen de GFP, bajo el control de un promotor ribosómico constitutivo, al azar en el cromosoma de las cepas *P. putida* DOT-T1E, y los mutantes en las bombas, mediante conjugación triparental (ver apartado 7.1). Los plásmidos portadores del transposón fueron pSM1695 (Tabla M2), que confiere resistencia a Km y que fue utilizado para marcar la cepa silvestre y los mutantes *P. putida* DOT-T1E-1 (*ttgD*⁻) y *P. putida* DOT-T1E-PS28 (*ttgH*⁻); y pTTN119 (Tabla M2), que confiere resistencia a Tc y fue utilizado para mutantes que ya eran resistentes a Km, *P. putida* DOT-T1E-18 (*ttgB*⁻) y *P. putida* DOT-T1E-PS34 (*ttgB*⁻, *ttgD*⁻, *ttgH*⁻). Tras el marcaje de las cepas se comprobó que sus características fenotípicas eran idénticas a las cepas parentales en cuanto a tiempo de generación y tolerancia a disolventes.

17.2. Condiciones de cultivo

Se cultivaron los biofilms en cámaras de flujo con canales individuales de dimensiones de 1x4x40 mm, siendo el medio de cultivo medio mínimo FB+A10 (apartado 2.2) con 0,1 mM citrato ó 0,5 mM benzoato como fuente de carbono. El dispositivo experimental se preparó de acuerdo con Christensen et al. (1999) (Figura M6). La superficie sobre la que se cultivaron los biofilms fue un portaobjetos de vidrio de microscopio (Knittel 24x50 st 1; Knittel Gläser, Braunschweig, Germany).

Las cámaras de flujo se inocularon con cultivos creciendo en el mismo medio FB+A10 a una turbidez a 600 nm de 0,15. Tras la inoculación, el flujo de medio de cultivo estuvo parado durante 1 h para facilitar la adhesión de las células a la superficie de vidrio. Se restableció el paso de medio a un flujo de 3 mL/h por canal usando una bomba peristáltica Watson Marlow 205S (Watson Marlow Ltd. Falmouth, England). El sistema de cámaras de flujo se incubó a una temperatura constante de 22°C.

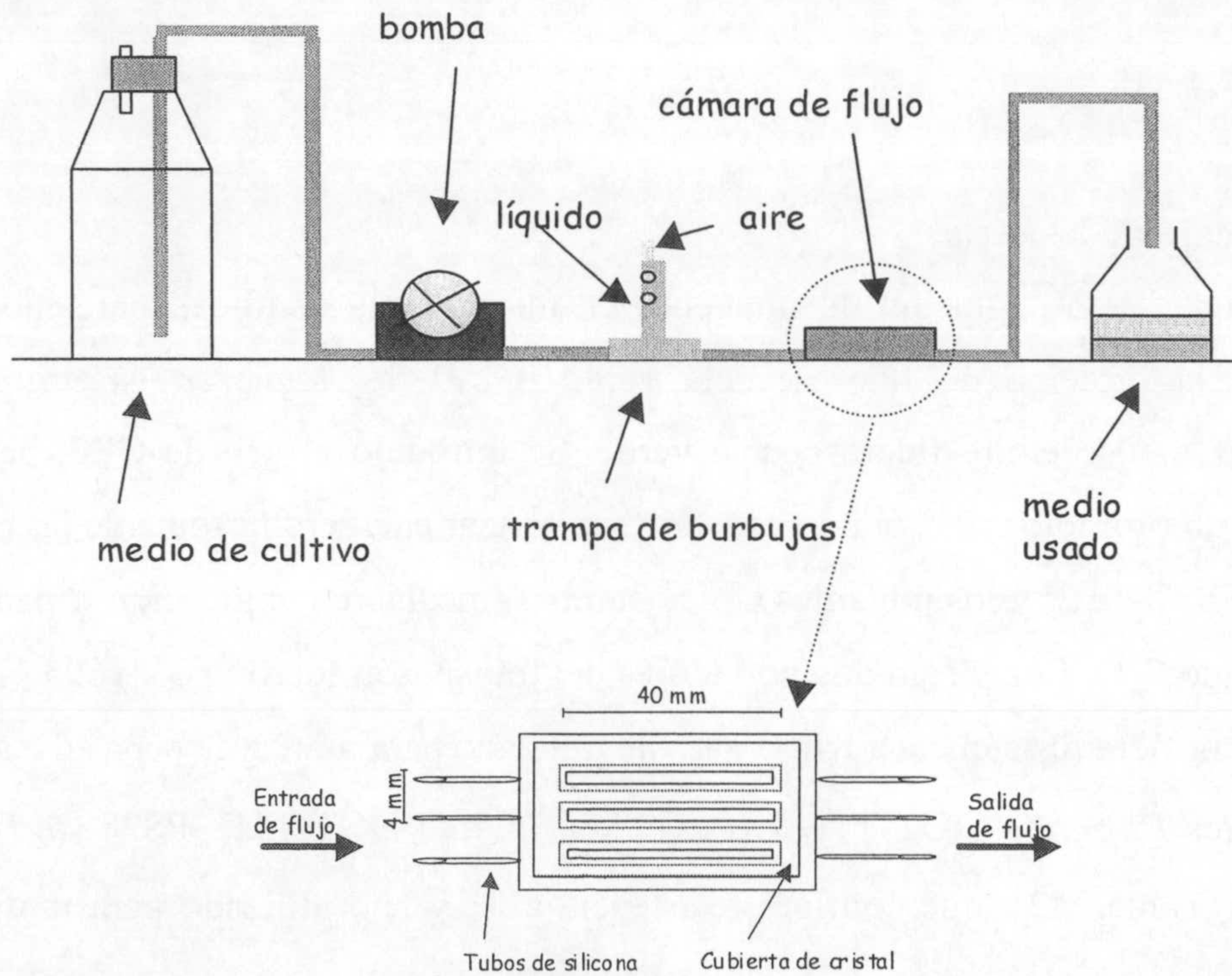


Figura M6. Esquema del dispositivo experimental utilizado para la incubación de biofilms.

Cuando se utilizó tetraciclina para el ensayo de resistencia a antibióticos en los biofilms el medio se dividió en distintos recipientes, cada uno con una concentración de antibiótico.

17.3. Captación de imágenes

La monitorización no invasiva de la estructura tridimensional del biofilm se llevó a cabo mediante microscopia laser confocal de barrido (SCLM), con un sistema Leica TCS4D (Leica Lasertechnik, GmbH, Heidelberg, Germany). La línea de láser de 488 nm fue utilizada para excitar la GFP. Los conjuntos de imágenes en el plano horizontal capturadas al azar por SCLM se analizaron mediante el programa informático COMSTAT (Heydorn et al., 2000). El programa calcula distintos parámetros característicos de los biofilms, como la profundidad del biofilm, la rugosidad o la cobertura de la superficie. Las proyecciones fluorescentes y las secciones verticales a través del biofilm se generaron utilizando el conjunto de programas informáticos IMARIS (Bitplane AG, Zürich, Switzerland) en una estación de trabajo Silicon Graphics Indigo2 (Silicon Graphics, Mountain View, Calif.). Las imágenes que se muestran en el Capítulo 3 de esta Tesis Doctoral, fueron finalmente

tratadas para su mejor visualización con el programa PhotoShop (Adobe, Mountain View, California, USA).

17.4. Determinación de la viabilidad en los ensayos de resistencia a tetraciclina.

En estos ensayos los biofilms se cultivaron como se ha descrito antes durante 24 h, entonces el medio de cultivo estándar se sustituyó por el mismo medio suplementado con Tc. La viabilidad celular se ensayó 24 horas más tarde. La viabilidad celular en los biofilms se determinó utilizando los colorantes del kit LIVE/DEAD BacLight (Molecular Probes Inc., Eugene, Oregon, USA). Las soluciones originales de SYTO 9 y PI (ioduro de propidio) se diluyeron 2000 veces en el medio FB-AB y se inyectaron en los canales de las cámaras de eflujo. Se dejó actuar el colorante durante 15 minutos con el flujo parado. El colorante SYTO 9 da color verde a las células vivas (se excita con la línea laser ArKr de 488 nm) y el colorante IP da color rojo a las células muertas, con la membrana celular dañada (se excita con la línea laser ArKr de 568 nm). Las imágenes se tomaron con SCLM utilizando los filtros ópticos de isotiocianato de fluoresceína (para la señal verde) y de isocianato de tetrametilrodamina (para la señal roja).

18. FERMENTADORES

18.1. Condiciones de cultivo

Los ensayos de adaptación de *P. putida* DOT-T1E a una segunda fase apolar y de producción de catecoles se llevaron a cabo en un bioreactor de 3 litros Biostat® B (Baun Biotech International, Melsungen, Alemania), en régimen de cultivo semicontinuo (*fedbatch*). Las condiciones de cultivo en el reactor fueron las siguientes: el medio utilizado fue M9 y glucosa como fuente de carbono; la temperatura se fijó en 30 °C; la agitación se mantuvo a 600 rpm cuando el volumen total era de 1 litro y en 1200 cuando aumentaba a 2 litros; el pH se fijó en 7,1 y se mantuvo mediante la adición de las soluciones de 40% (vol/vol) H₃PO₄ y de 32% (vol/vol) NH₄OH; la aireación se fijó en 1 L/minuto cuando sólo había una fase en el medio, y se aumentó a 2 L/minuto cuando se añadió la segunda fase. La formación de espuma se controló mediante la adición de polipropilenglicol P'2000 (Fluka,

Switzerland). Durante el experimento se trató de mantener la concentración de glucosa en el fermentador por debajo de 0,5% (p/vol), ajustando el flujo de la solución de nutrientes. Las medidas de pH se llevaron a cabo con un electrodo combinado de electrolito gelificado de Crison. La concentración de O₂ disuelto en el medio de cultivo se midió con un sensor de O₂ 12/220 de Ingold. Para las mediciones de temperatura se utilizó un sensor Pt-100. Estos tres sensores estaban integrados en el sistema de control del biorreactor.

Solución de nutrientes: 40% de glucosa (p/vol), 0,08M de MgSO₄, 15 µg/l de citrato de hierro, y 2,5 mL de solución de elementos traza Goodies.

18.2. Fermentación de *m*-xileno en fase acuosa

El fermentador se preparó como se describe en el apartado anterior y se autoclavó con 900 mL del medio tamponado M9. A este medio se añadió un inóculo de 100 mL de un cultivo saturado de *P. putida* DOT-T1EΔ*todC1C2* (pWW0::*xylE*::Km) cultivado en medio mínimo M9 (con glucosa 0,5 % [p/vol] y 25 µg/mL de Km), junto con 2,5 mL de solución de Goodies, 1 mL de MgSO₄ 1M, 1 mL de citrato de hierro 6 g/L, y glucosa hasta una concentración de 0,5 % (p/vol). El cultivo se incubó hasta que se consumió toda la glucosa que se había añadido inicialmente y entonces se alimentó con la solución de nutrientes con un flujo de aproximadamente 3 g de glucosa por hora. Tras 2 horas en estas condiciones se introdujo *m*-xileno en el fermentador mediante el burbujeador del suministro de aire en una botella que contenía *m*-xileno. Se tomaron muestras de 3 mL periódicamente para medir D.O.₆₆₀, determinar número de células viables mediante siembra de diluciones seriadas, y análisis del sobrenadante mediante HPLC (ver más adelante).

18.3. Fermentación de *m*-xileno en un sistema de doble fase octanol:agua y decanol:agua

El fermentador se preparó como se ha descrito en el apartado 18.1, pero con la salvedad de que el inóculo de 100 mL fue preadaptado al disolvente de la segunda fase mediante la adición de 1 mM de octanol. Además cuando se inoculó el fermentador también se añadió 1 mM de octanol cuando se utilizó octanol como segunda fase. Tras el consumo de toda la glucosa inicial se añadió la solución de

nutrientes y tras 2 horas se añadió la segunda fase, 500 ml de octanol o decanol con aproximadamente 120 mmoles de *m*-xileno, con el fin de que la concentración de *m*-xileno en la fase acuosa fuese de alrededor de 0,150 mM. Entonces se aumentó la aireación y la agitación como se ha descrito en el apartado 18.1. Se recogieron muestras de 6 mL, de las que sepáramos la fase acuosa de la orgánica mediante centrifugación (10 minutos, 13.000 x g). La fase orgánica se guardó para análisis en el HPLC. La fase acuosa se extrajo de los recipientes de las muestras mediante una jeringuilla para evitar el contacto con el octanol y también se almacenó para análisis posteriores. La viabilidad celular se determinó mediante conteo de células con la siembra de diluciones seriadas en placas de LB y LB con Km.

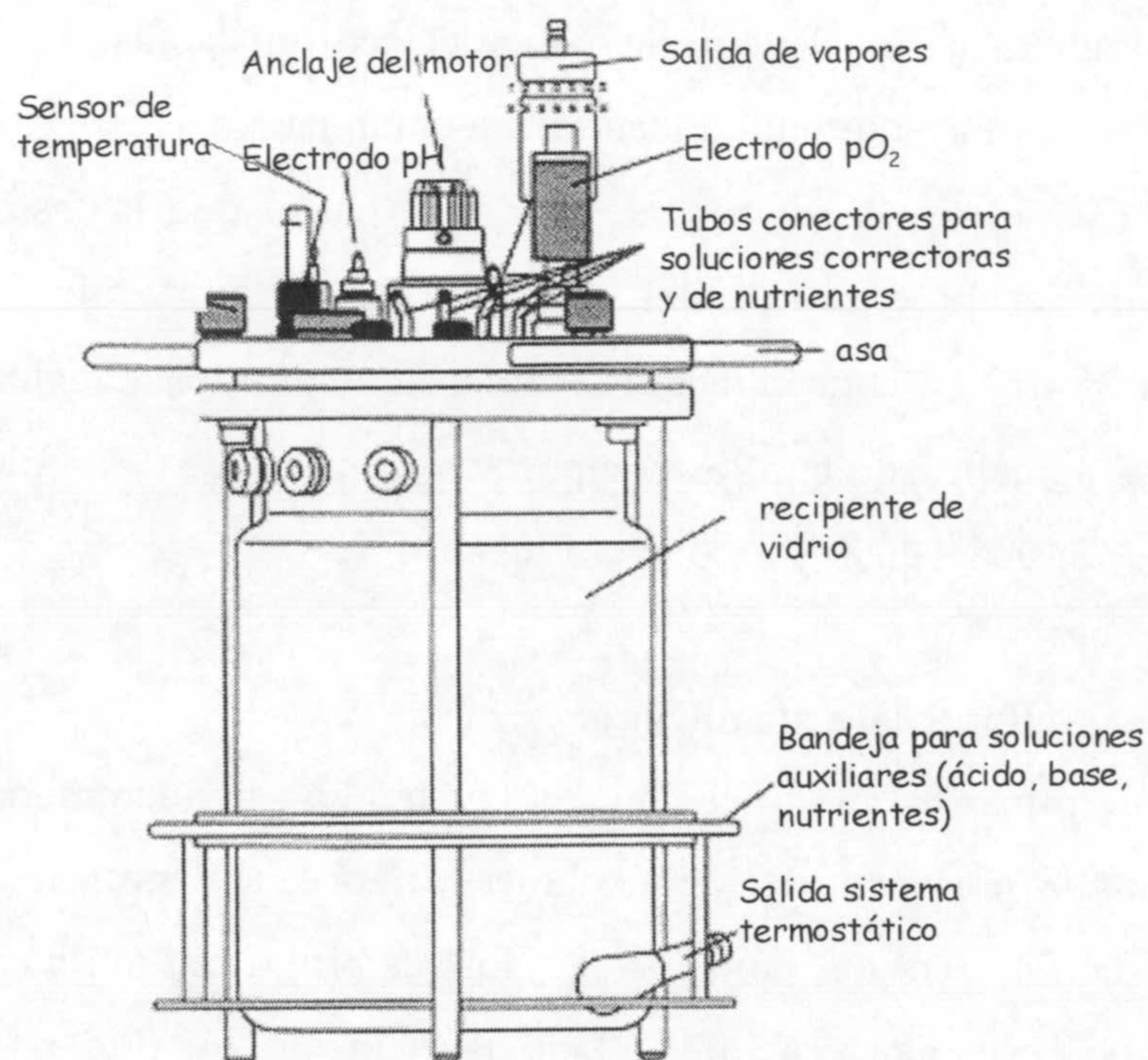


Figura M7. Dispositivo experimental utilizado para las biotransformaciones. Se trata de un reactor tipo B2 de BIOSTAT® B, del que se muestran las principales elementos.

18.4. Métodos analíticos aplicados al sobrenadante

La concentración de glucosa se determinó con un sensor Accutrend (Roche) a partir de la fase acuosa de las muestras.

La concentración de catecoles en la fase acuosa se midió mediante el ensayo de Arnou (Arnou, 1937), que consiste en una detección colorimétrica: se diluyó un

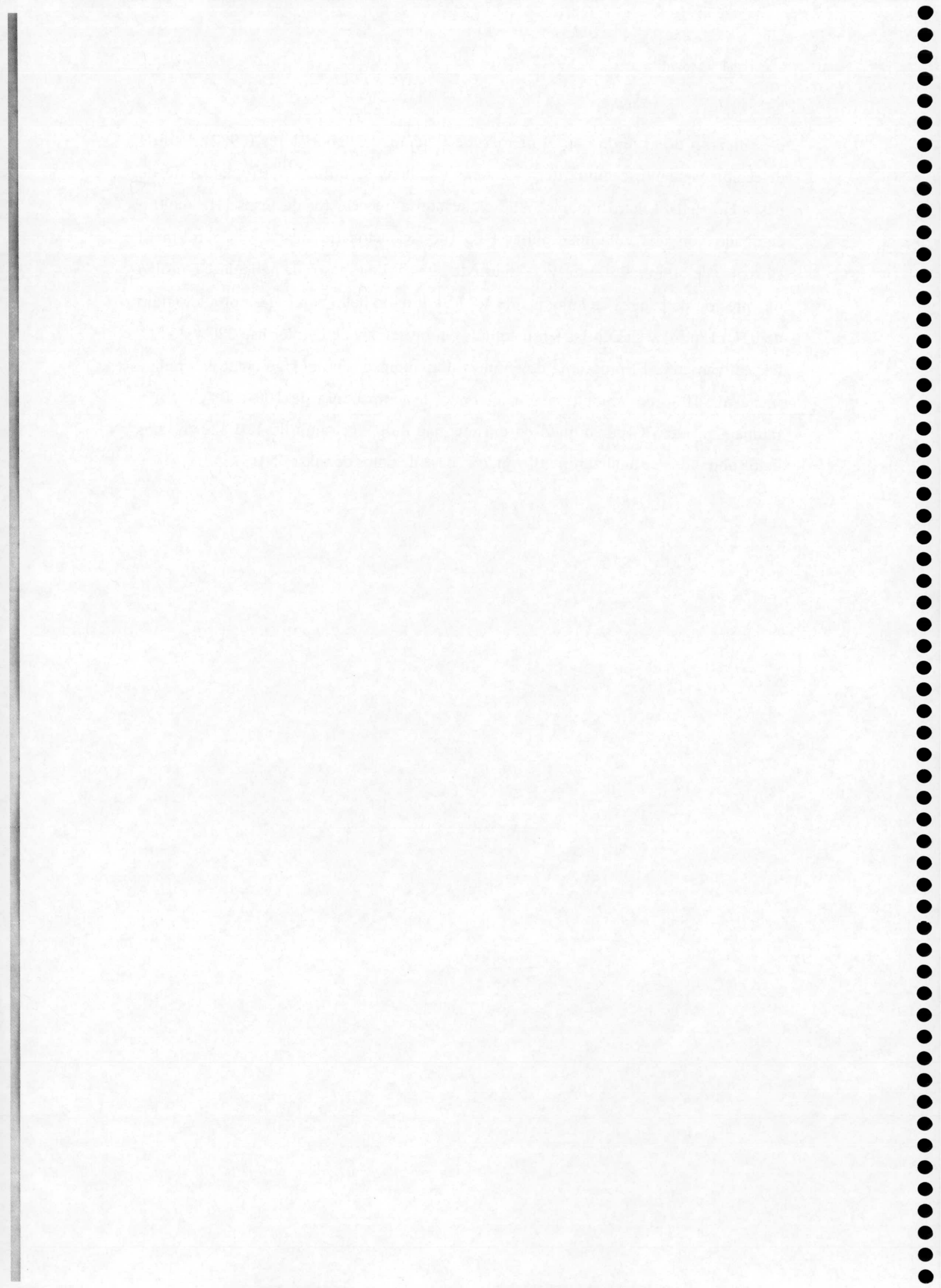
máximo de 0,2 mL de sobrenadante en agua hasta 0,6 mL. Se le añadieron 0,2 mL de HCl 0,5 N, 0,2 mL de reactivo nitrito-molibdato (100 g/L de ninitrito sódico y 100 g/l de molibdato sódico), y 0,2 mL de NaOH 1N. En presencia de catecoles se forma un color rojizo, que se midió espectrofotométricamente a 510 nm. Para hacer una determinación más exacta se hicieron pasar las muestras por un HPLC (modelo HP1050) con una columna C18 de 150 x 3,9 mm (60 Å, 4 µm) (NovaPack®, Waters, Ireland Column). El método utilizado es una modificación del descrito en Bühler et al. (2000) y consistía en una elución isocrática siendo la fase móvil una mezcla 70:30 de H₃PO₄ 0,1% (vol/vol) y acetonitrilo, con un flujo de 1 mL/minuto y un volumen de inyección de 25 µL. El 3-metilcatecol se detectó espectrofotométricamente a 210 nm y su concentración se estableció construyendo una curva patrón utilizando como estándar 3-metilcatecol comercial (Sigma-Aldrich ref. M34006-100G).

La concentración de *m*-xileno y de 3-metilcatecol en la fase orgánica se midió mediante HPLC en fase normal utilizando una columna Nucleosil 100CN de 250 x 3 mm (5 µm) (Scharlab), en un método isocrático en el que la fase móvil fue una mezcla 95:5 de hexano e isopropanol, con un flujo de 1,5 mL/min y un volumen de inyección de 25 µL. La concentración de ambos compuestos se determinó mediante sendas curvas de calibrado con los compuestos comerciales (3-metilcatecol, Sigma-Aldrich ref. M34006-100G; y *m*-xileno, Fluka ref. 95672).

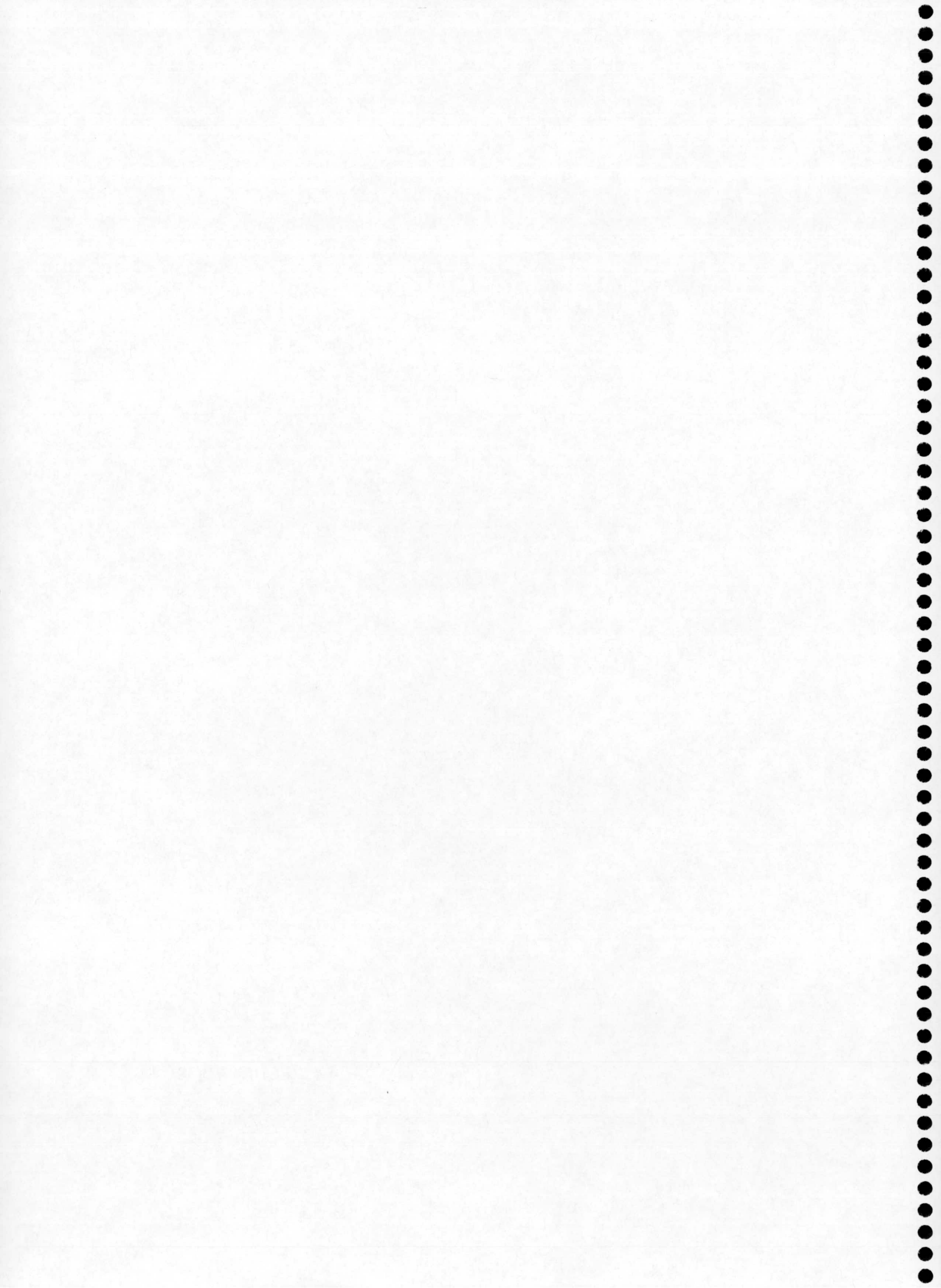
18.5. Análisis de lípidos de membrana

Para determinar la modificación en los lípidos de membrana de *P. putida* provocada por la presencia de los alcoholes alifáticos octanol, nonanol o decanol como segunda fase en los ensayos de biotransformación, utilizamos el método descrito en la Tesis Doctoral de la Dra. Patricia Godoy (2003, Tesis Doctoral, Universidad de Granada), que es una modificación del método de Bligh y Dyer (1959). Se tomaron muestras de 25 mL de cultivos de *P. putida* DOT-T1EΔ*todC1C2* (pWW0::*xyIE*::Km) en medio mínimo (0,5% [p/vol] glucosa) con 1% de cada uno de los alcoholes alifáticos, en dos ensayos diferentes. Se incluyeron controles sin disolvente. Se cultivaron las células hasta una turbidez a 660 nm de 0,8, y se tomaron alícuotas de 25 mL a las que se añadió 1% (vol/vol) de cada uno de los tres alcoholes. Se recogieron las células a los 30 minutos de incubación con el alcohol alifático mediante centrifugación (10000 x g, 10 minutos). Los ácidos grasos se

esterificaron de acuerdo con el método de Bannon y colaboradores (1982). Para la detección y cuantificación de los ésteres metílicos se utilizó un cromatógrafo de gases Hewlett-Packard modelo 6890 conectado a un detector de masas HP-6890 y equipado con una columna capilar HP5 (fase estacionaria ligada: 5% fenil-metil silosano) de 30 m x 250 μm y 0,25 μm de espesor de película. Se utilizó una presión de cabeza de columna de 4,8 PSI, usando helio como gas portador (flujo de 0,6 mL/min) y siendo las temperaturas del inyector y de la interfase 280 y 260°C, respectivamente. El programa de temperatura empleado fue el siguiente: una rampa inicial de 10°C por minuto en un intervalo de temperatura de 100-180 °C, y una rampa final de 3°C por minuto en un intervalo de temperatura de 180-222 °C. Los datos obtenidos se analizaron utilizando la base de datos de masas NBS75K.



RESULTADOS



Capítulo I

CARACTERIZACIÓN DE LA BOMBA DE EXPULSIÓN DE DISOLVENTES *ttgGHI* EN *Pseudomonas putida* DOT-T1E

RESUMEN

En estudios previos realizados en el laboratorio del Dr. Ramos se habían identificado y caracterizado dos bombas de expulsión de tolueno en la cepa *Pseudomonas putida* DOT-T1E pertenecientes a la familia RND (*Resistance/nodulation/cell division*), que contribuyen en gran medida a la tolerancia a disolventes orgánicos en esta cepa.

La bomba TtgABC había sido implicada en la tolerancia innata y no era inducible por tolueno; la TtgDEF participaba en la tolerancia inducida y su expresión aumentaba en respuesta a hidrocarburos aromáticos en el medio de cultivo. Sin embargo, un doble mutante en ambas bombas (*P. putida* DOT-T1E-82) era capaz de sobrevivir a un choque de tolueno cuando el cultivo había sido preinducido con concentraciones subletales de este hidrocarburo aromático administrado a través de la fase gaseosa, lo que sugería la implicación de al menos otra bomba en la tolerancia a disolventes orgánicos en esta cepa. En este primer capítulo de Tesis Doctoral se describe la identificación y caracterización de una tercera bomba de expulsión de tolueno en *P. putida* DOT-T1E, a la que hemos denominado TtgGHI. Los genes *ttgGHI* forman un operón que se expresa constitutivamente a niveles relativamente altos desde dos promotores solapantes. El nivel de estos transcritos aumentó en presencia de tolueno. Para estudiar la posible participación de esta bomba en la tolerancia a tolueno se construyó un mutante en el que el gen *ttgH* estaba interrumpido. Este mutante resultó ser incapaz de sobrevivir a un choque con tolueno, cualesquiera que fuesen las condiciones de cultivo. La construcción de un triple mutante a partir de la cepa *P. putida* DOT-T1E-82 resultó en una cepa hipersensible a tolueno, lo que sugiere que no existen más sistemas de eflujo de tolueno en esta cepa, o que en caso de existir su contribución a la expulsión de este disolvente orgánico no es significativa.

I.1. Identificación y clonaje de una tercera bomba en *Pseudomonas putida* DOT-T1E con una alta similitud con la bomba SrpABC de *P. putida* S12

En el momento de iniciar esta Tesis Doctoral, se conocía la existencia de dos bombas de eflujo de disolventes en la cepa *Pseudomonas putida* DOT-T1E (Ramos et al., 1998; Mosqueda y Ramos, 2000). Sin embargo, un doble mutante en el que las bombas TtgABC y TtgDEF no eran funcionales todavía era capaz de sobrevivir a un choque del 0,3% (vol/vol) de tolueno cuando el cultivo se había preinducido con una concentración subletal de tolueno suministrado a través de la fase gaseosa. Estos resultados apuntaban hacia la existencia de una tercera bomba de expulsión de disolventes, probablemente inducible, en esta cepa. En la cepa tolerante a tolueno *P. putida* S12 se había descrito una bomba de eflujo también de la familia RND implicada en la tolerancia a disolventes orgánicos, denominada SrpABC (*solvent resistant protein*) (Kieboom et al., 1998 [a y b]). La comparación de la secuencia de las proteínas SrpABC con la de las bombas de tolueno descritas hasta el momento en *P. putida* DOT-T1E (TtgABC y TtgDEF) reveló una similitud de secuencia del 54 al 70% entre los distintos componentes. Resultaba pues tentador especular con la idea de que una bomba similar a la SrpABC tuviera un papel importante en la tolerancia a disolventes orgánicos en la cepa *P. putida* DOT-T1E, objeto de nuestro estudio. Para confirmar esta hipótesis diseñamos oligonucleótidos basados en la secuencia del gen *srpB* de *P. putida* S12, y una vez sintetizados se utilizaron en una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en la que se empleó ADN cromosómico de *P. putida* DOT-T1E como molde. El resultado de la PCR se resolvió en un gel de agarosa al 0,8% (p/vol), que tras teñirse con bromuro de etidio permitió visualizar un fragmento de amplificación del tamaño esperado (565 pares de bases). Este fragmento se extrajo del gel para su secuenciación tal como se indica en Materiales y Métodos. La secuencia era casi idéntica a la de *srpB* de *P. putida* S12, sólo cambiaba en una base de las 565 amplificadas.

Una vez comprobado que existía una tercera bomba se procedió al clonaje del operón completo. Para ello se marcó el fragmento de 565 pb de ADN con digoxigenina y se hibridó con una librería genómica de *P. putida* DOT-T1E disponible en nuestro laboratorio. Se rescató un clon positivo, que denominamos

pGG1. Tras aislar ADN plasmídico, el análisis de restricción reveló que el plásmido contenía un fragmento *Bam*HI de 7,7 Kbp del cromosoma de *P. putida* DOT-T1E.

I.2. Secuenciación de los genes que codifican la bomba TtgGHI

Utilizando los oligonucleótidos que se muestran en la Tabla M1 de la sección Materiales y Métodos, se secuenció el inserto del plásmido pGG1 en ambas cadenas. El análisis de la secuencia reveló la presencia de cuatro posibles marcos de lectura abiertos (ORFs) y de un quinto incompleto. Las dos primeras ORFs presentaban homología con genes reguladores y serán analizados detenidamente en el Capítulo IV de esta Tesis Doctoral. Las otras tres ORFs presentaban una alta similitud con los genes *srpABC* (identidad media del 96% en secuencias de ADN y 98 % entre las de proteína). Los correspondientes genes fueron denominados *ttgGHI* (*toluene tolerance genes*) para continuar con la nomenclatura de las bombas de DOT-T1E y porque se sospechaba que estarían implicados en la tolerancia a tolueno en esta cepa. El gen *ttgI*, el homólogo a *srpC* de *P. putida* S12, no estaba completo en el clon pGG1. El sitio de reconocimiento *Bam*HI estaba localizado a 268 pb del codón de iniciación de *ttgI*. Dada la alta conservación de las secuencias entre los genes de las cepas *P. putida* DOT-T1E y *P. putida* S12 se utilizó un oligonucleótido localizado al final del inserto de pGG1 y otro basado en la secuencia aguas abajo de *srpC* para amplificar y secuenciar el fragmento que faltaba del gen *ttgI*. La secuencia completa de estas tres ORFs correspondientes a la bomba de eflujo se muestra en la Figura I.1.

Fig. I.1

TtgGHI

```

tcgaccaaccgcggtcagg cttgcttgcgtcttgcttgc gtcaagagtatcacataatg 60
ctacactctaccgcattacg attcagcaatagcccccgtc atgcgggcagagagatggag 120
                                     M R A E R W S
                                     ttgG →
ccaaaccgtgagacagatac gatccccgcgtgcattacgg gtaatccccttaactgcgct 180
Q T V R Q I R S P R A L R V I P L T A L
gatgctaatttcgggatgtg gtgagaaagaacaggttagc tctgcaactccaccaccgga 240
M L I S G C G E K E Q V S S A T P P P D
    
```


cgtgggcgtgtacaccgtgc gtgcacaagctctgaccctg acaactgacttgcctggccg 300
 V G V Y T V R A Q A L T L T T D L P G R
 gacttcggcattccgtgtag cggaagtccgcccacagggt tcggggattcttcagaagcg 360
 T S A F R V A E V R P Q V S G I L Q K R
 gtcgtttgttgaaggcgctg aagtcaagctgggtcagcag ctttatcagattgacccacg 420
 S F V E G A E V K L G Q Q L Y Q I D P R
 gacgtacgaagcgcagttgc gtcgtgcagaagcgaatcga actagcgcacaaaacctggc 480
 T Y E A Q L R R A E A N R T S A Q N L A
 tcgctcgtatgaaacgctgt tgaagaccaaggcagtcagc aagcagcagtacgacgatgc 540
 R R Y E T L L K T K A V S K Q Q Y D D A
 gcttgccgcatggaaacaag cagaagccgattaccagggtg gctcgcacgacggttcaata 600
 L A A W K Q A E A D Y Q V A R I D V Q Y
 cacacgggtgctttcccca tctccgggcgcattgggtcgc tcgacggtcaccgagggggc 660
 T R V L S P I S G R I G R S T V T E G A
 gctcgttaccaatggccaag ctcagtcgctcgccaccgtc acgcagctggacccattta 720
 L V T N G Q A Q S L A T V T Q L D P I Y
 tgtcgcagtcactcagccaa tcacaaagcttcttgggtctg cataaggcgcctggagtcagg 780
 V D V T Q P I T K L L G L H K A L E S G
 ccgccttcaaaagacaggcg agaaccaggctgaagtcagc ctgacgctggatgacggaag 840
 R L Q K T G E N Q A E V S L T L D D G S
 tgcttatccactgccaggaa ctctgaagttttccgagggt agctgtgatcccacaacagg 900
 A Y P L P G T L K F S E V S C D P T T G
 ttctgtgacccttcgcgccg aatttcccaatcctaactcgc aagctgctaccaggcatggt 960
 S V T L R A E F P N P N R K L L P G M F
 tgtgcatgctctgctgaaag agggcgtgcaaaacgccgca atcttgggtaccgcccgaaca 1020
 V H A L L K E G V Q N A A I L V P Q Q A
 agccatcagccgcgatacga gaggtgtgccaagcgtctgg gtcatgaaggctgacaacac 1080
 I S R D T R G V P S V W V M K A D N T
 cgtcgcagtcgggtgagattc agaccctccgaaccgtgggc aatgcttgggttgatcagcaa 1140
 V E S R E I Q T L R T V G N A W L I S N
 cggcgtgaccgagggagagc ggatcattaccgaagggtgt caacgtgttcgcagcggcat 1200
 G V T E G E R I I T E G V Q R V R S G I
 cgctgtcaacgcgggttgagg ccaagaatgtgaatttggt gacggcttcgcccgtaccac 1260
 A V N A V E A K N V N L V D G F A A T T
 agaagcctcgggctaactgag ggggcacgattcatgtctcg tttctttatcgacaggccga 1320
 E A S A N * ^M S R F F I D R P I
 tttttgcctgggttctcgct atcgtggccatgcttgccgg tgcgctgtctctggcgaaaa 1380
 F A W V L A I V A M L A G A L S L A K M
 tgcccattagccaatatcca aacatcgcggcccctgccgt ttcgatccaagtcagctacc 1440
 P I S Q Y P N I A A P A V S I Q V S Y P

cagggtgcttctgcacaaacc gtgcaggacacagtggttca ggtcattgagcagcagctca 1500
 G A S A Q T V Q D T V V Q V I E Q Q L S

gtgggctggatgggttccga tacatgtcggcagagagcgc ctctgacggcagcatgacca 1560
 G L D G F R Y M S A E S A S D G S M T I

tcacgtgacctttgaacag ggaaccgatccggatatcgc *EcoRV* acaggttcagggtgcagaaca 1620
 I V T F E Q G T D P D I A Q V Q V Q N K

agctgcagctggcaacacct cgtttgccggaagaggttca gcgtcagggtcttcgtgtag 1680
 L Q L A T P R L P E E V Q R Q G L R V V

tgaagtaccagatgaacttc ttcctggatcatgagcttggg ggatcgttcgggcaagctcg 1740
 K Y Q M N F F L V M S L V D R S G K L D

ataacttcgacctgggcaac ctgatcgcgtcacagctcca ggacccatttcgcgcatcc 1800
 N F D L G N L I A S Q L Q D P I S R I P

caggcgtcggcgatttccag ctgtttggtcgccttatgc catgctatctggctggacc 1860
 G V G D F Q L F G S P Y A M R I W L D P

caggcaagctcaatagctat cagctgacgcccactgacgt cgccagcgtatccgagagc 1920
 G K L N S Y Q L T P T D V A S A I R E Q

agaacgttcagggtgtcctcc ggccagttgggtggattacc aactcgctcaggcgtccagc 1980
 N V Q V S S G Q L G G L P T R S G V Q L

tgaatgacgaccgttctgggc aagacgcgcatgaccacgcc tagccagttcgatgagattc 2040
 N A T V L G K T R M T T P S Q F D E I L

tggtcaaggtaaaccggat ggctcgcagggtacgagtgaa ggatgttggctcgtgcggaac 2100
 V K V N P D G S Q V R V K D V G R A E L

ttggggctgacagcttcgcc atttccgcgagtagacaagga ctgccaaccgcaagcctgg 2160
 G A D S F A I S A Q Y K D S P T A S L A

cgctgcgcttgtccaccggc ggcaatctgctggaaaccgt agacgcggtcaaaaagctga 2220
 L R L S T G G N L L E T V D A V K K L M

tggagcagcaaaaggcctac ttgccagacggcgtggaggt catttatccctacgatacga 2280
 E Q Q K A Y L P D G V E V I Y P Y D T T

caccggttgttgaggcctcg attgagtcggtagtagacacac gatctttgaggcgggtggtac 2340
 P V V E A S I E S V V H T I F E A V V L

tggtcttctggtcatgtat ctgttctcgcagagcttccg ggccacactgatccccacc 2400
 V F L V M Y L F L Q S F R A T L I P T L

tggcagttccagtggtgctg ctgcccactttcgccctttt gccgtacttcggcctgaata 2460
 A V P V V L L A T F A L L P Y F G L N I

tcaacgtgctcaccatgtat gccatggtgctggctatcgg cttgctggtcgcagatgcaa 2520
 N V L T M Y A M V L A I G L L V D D A I

tcgtcgtggctcgagaacggt gagcggctcatgcatgacga gggcttgctgcctcttgagg 2580
 V V V E N V E R L M H D E G L S P L E A

ctacccgcaagtcgatggat cagatttcaggggcttggg gggcatcggcatggtgctgt 2640
 T R K S M D Q I S G A L V G I G M V L S

cggctgtattcgtacccatg gccttctttgggtggctccgc tggcatcatctatcaacaat 2700
 A V F V P M A F F G G S A G I I Y Q Q F
 ttgcgatcaccatcgtagtc tgcattggggctttcgatctt ggctcgtctttgtgttcaccc 2760
 A I T I V V C M G L S I L V A L V F T P
 cagcactttgcgtgaccatt ctcaaagctccggagggttaa ttcacaccacgagagaaagg 2820
 A L C V T I L K A P E G N S H H E R K G
 gcttcttcggctggtttaac cgcattcttcgaccgcgccac gcggcggttcgagcgaggcg 2880
 F F G W F N R I F D R G T R R F E R G V
 tcggcgcaatgctgaagggg cgcggtaggtacctgcttgc gttcttgctcatcaccggag 2940
 G A M L K G R G R Y L L A F L L I T G G
 gaaccggctatctgttcacc cagatccctaaggcattcct gcccaacgaggatcaggggct 3000
 T G Y L F T Q I P K A F L P N E D Q G L
 tgatgatgatcgaggtgcgt acaccggcaaacgcttccgc tgaacgtaccgaggggtgtgc 3060
 M M I E V R T P A N A S A E R T E G V L
 ttcaagaggtgagactac ttggccaatgatgaaggtgc attgggtgagcacttcatga 3120
 Q E V R D Y L A N D E G A L V E H F M T
 cggatgaatggcttcaacttt gctggctcgtgggcagaactc ggggctgggtgctgatcacct 3180
 V N G F N F A G R G Q N S G L V L I T F
 tcaaggactggaaggagcgt cacgggtgctgggcaagacgt attcagcatcgcgcaacggg 3240
 K D W K E R H G A G Q D V F S I A Q R A
 ctaatcagcattttgccaag atcaaagatgccagcgtcat ggcgttcgtccctccagcca 3300
 N Q H F A K I K D A S V M A F V P P A I
 ttctggaaatgggcaacgcg atgggcttcaacttgtatct gcaggacaacctcgggtctag 3360
 L E M G N A M G F N L Y L Q D N L G L G
 gccacgaagcattgatggca gctcgaaaaccaattcctgca actggcaagccagaacccta 3420
 H E A L M A A R N Q F L Q L A S Q N P K
 agctccaggcagttcgtcca aacggcaaggacgacgagcc gcaattccagggtgaacatcq 3480
 L Q A V R P N G K D D E P Q F Q V N I D
 atgacgaaaaggcccgtgcg ctgcaagtaagcatcgcgctc catcaacgaaacgatgtcgg 3540
 D E K A R A L Q V S I A S I N E T M S A
 cagcctggggctcgatgtat gtcaacgacttcatcgaccg cggccgggylcaaacgggtgt 3600
 A W G S M Y V N D F I D R G R V K R V Y
 acgtccagggcgaagacatc tcgcgaatctcccctgagga cttcgataaatggtacgtgc 3660
 V Q G E D I S R I S P E D F D K W Y V R
 gcaatagcctgggcccagatg gttccgttctcggcgtttgc aaccgggtgagtggggtgaacg 3720
 N S L G Q M V P F S A F A T G E W V N G
 gctcaccgaggctggagcgc tacgggtggcatttcgtccct gaacatcctcggcgagccag 3780
 S P R L E R Y G G I S S L N I L G E P A
 cgctggatacagcacgggt gactcgatgatagctatcgc tgaatcatgcaacaactgc 3840
 P G Y S T G D S M I A I A E I M Q Q L P

ctgccggcattggcctgagc tacaccgggtctctcatatga agaaatccatgctggcgacc 3900
A G I G L S Y T G L S Y E E I H A G D Q

aggcaccattgctctatgcg ttgactgtgctgatcgttgt cctgtgcctggccgctctgt 3960
A P L L Y A L T V L I V V L C L A A L Y

atgagagctggtcggtaccg gtctcagtgatcatggttgt tcctctgggtattttgggcg 4020
E S W S V P V S V I M V V P L G I L L G

cggtgctggcaacgctttgg cgcgacctgacggcagatgt gtacttccagggtgggcttga 4080
A V L A T W R D L T A D V Y F Q V G L M

tgaccacggttggcttgtcc gccaaagaacgccatcctgat cgtagagttcgccaaagagc 4140
T T V G L S A K N A I L I V E F A K E L

tgtatgagaaggagggttat ccgatcgtcaaagctgcgat agaggccgccaagctgcggt 4200
Y E K E G Y P I V K A A I E A A K L R L

tgcgtccgatattgatgacc tcgctggcattcaccttcgg tgtgctgccgatggccatag 4260
R P I L M T S L A F T F G V L P M A I A

catccggcgcagggcgtggc agccagcactccattgctac cggcgtcgtcggcgcagggcg 4320
S G A G A G S Q H S I A T G V S G A G A

ctggcagccagcactccatt gctaccggcgtcgtcggagg catgatcacagcaacgggtgc 4380
G S Q H S I A T G V V G G M I T A T V L

tggctgtcttctttgttccg ctgttctacgtagtagttgt caagcttttcgaggggctca 4440
A V F F V P L F Y V V V V K L F E G L M

tgaaaagaaagccaaacgcg gtcaaggagggtgactcatga agtttaa
K R K P N A V K E V T H E V *

atca agtttaagtcaactccccatg 4500
M K F K S L P M

ttgI →

tttgctttgctgatgctcgg cggatgcagcttgatccccg actatcagcagccagccgca 4560
F A L L M L G G C S L I P D Y Q Q P A A P

ccgatgcaggcacaatggcc aacggggccaggcctacggcg ggcagggagaccaacgcagt 4620
M Q A Q W P T G Q A Y G G Q G D Q R S I

atcgcgacggctctcccaa ggcaaaagagttttttaaag atccagcgtgggtccgcctc 4680
A T A L P K A K E F F K D P A L V R L L

ctcgatgcagcactagagaa caacagagatcttcgaatcg ctgccaaaaatggtgaatcc 4740
D A A L E N N R D L R I A A K N V E S Y

BamHI

tacagagcgtgtaccggat ccaacgagcagagcggtttc ccacacttgatggccaagcc 4800
R A L Y R I Q R A E R F P T L D G Q A S

tctggaaatcgaaccgctt gcctgacgatttatccccca ccggcgattctcggatcgat 4860
G N R T R L P D D L S P T G D S R I D S

agccagtaccaagtaggctt ggtgactgcctacgagttgg acttatttggccgaatccga 4920
Q Y Q V G L V T A Y E L D L F G R I R S

agcttgtcgaaccaagcact tgaaaaatacctcgctactg aggaggcgcagcgcagcgtt 4980
L S N Q A L E K Y L A T E E A Q R S V Q

cagatcgcaactcataggcga tgtggcaaccacctatcttc tgtggcgaaccgaccaagcg 5040
 I A L I G D V A T T Y F L W R T D Q A L

ctcttggagctgaccgaagc gacgctgaccagctacgttg aaagcttggcaatgatcgag 5100
 L E L T E A T L T S Y V E S L A M I E S

tcgagtgcttgggcaggaac ctcgctcggagctagatgttc gtcaggccaggactttggtg 5160
 S A W A G T S S E L D V R Q A R T L V N

aaccaagcccaggcccagca ggccttgtacacccgctcga tagcgcaggatgtgaatgca 5220
 Q A Q A Q Q A L Y T R R I A Q D V N A L

ctggaattgttgctgggcag caagattccaacggatttgc caaaaaactcgccactggcc 5280
 E L L L G S K I P T D L P K N S P L A M

atgagcgccttagggaaggt tccagctgggctaccagctg atctgctgctgaacagaccg 5340
 S A L G K V P A G L P A D L L L N R P R

cgcatccgcttctgctgaaca tcaacttatggccgcaacg caaatatcggcgcagctcgt 5400
 I R S A E H Q L M A A N A N I G A A R A

gcggcattttttccacgcat tagcctgacagcttcagcgg gctcagccagcagcgatctt 5460
 A F F P R I S L T A S A G S A S S D L D

gatggactgttcaacagcgg atctgacagctggagcttcg ctccacaaatcagcgtgccg 5520
 G L F N S G S D S W S F A P Q I S V P I

atttttaacgcaggaaagct gcgagccaatctcgattacg ctgagcttcagaaggatgtg 5580
 F N A G K L R A N L D Y A E L Q K D V G

ggcgtagcgcactacgagaa gagtatcgaaaccgctttcc gagaggtagccgacggactc 5640
 V A T Y E K S I E T A F R E V A D G L A

gctgcgaggggaacttacgg caaacagctcagtgctcaaa gcgagctggttgataattat 5700
 A R G T Y G K Q L S A Q S E L V D N Y K

aaagcctatctcagcttggc ccagcagcgcctatgaccagg gcgctgatagctatcttgaca 5760
 A Y F S L A Q Q R Y D Q G V D S Y L T V

gtgctggatgctcaacgcga actgttttctcacaacaga agctattgaatgatcagctc 5820
 L D A Q R E L F S S Q Q K L L N D Q L D

gatcaaatcaatagtgaagt ccagctttacaagccctcg ggggcggctggagcgtgagt 5880
 Q I N S E V Q L Y K A L G G G W S V S

caaaactaa 5889
 Q N *

Figura I.1. Secuencia de los genes *ttgGHI* de *P. putida* DOT-T1E y su traducción en aminoácidos. En azul se muestran los codones de iniciación y en rosa los de parada de la traducción. En negro se muestra el resto de secuencia codificante para cada gen. La posición de los genes, según la numeración utilizada en la figura es la siguiente: *ttgG*, 101-1279; *ttgH*, 1293-4487; *ttgI*, 4477-5889. Los sitios de restricción *Bam*HI y *Eco*RV están subrayados en la secuencia de *ttgI* y *ttgH* respectivamente. En la secuencia de aminoácidos de TtgG y TtgI está señalada en rojo la zona de corte del péptido señal predicha por el programa SignalP V2.0; y en rojo y en negrita la Cys33 a la que se uniría el lípido A en el caso de TtgG. El número de acceso de esta secuencia en la base de datos de GenBank es AF299253.

I.3.- Análisis comparativo con otras secuencias.

Las comparaciones de las proteínas deducidas de la secuencia nucleotídica con las bases de datos pueden dar una indicación de la función y localización de cada proteína. El estudio teórico de las proteínas de la bomba TtgGHI permite predecir la estructura de cada proteína y determinar su organización en distintos dominios. Por ejemplo, se puede estudiar si las proteínas poseen péptidos señal o dominios transmembrana, lo cual es importante para entender la localización de una proteína. Así el gen *ttgG* codificaría una lipoproteína anclada en la membrana interna en contacto con la bomba de la membrana interna (TtgH) y con el canal que forma la proteína de la membrana externa (TtgI). El gen *ttgH* codificaría la proteína de membrana interna, que es la bomba en sí; el gen *ttgI* codificaría la proteína de membrana externa que se extiende en el periplasma formando una especie de túnel. En la Figura A.1 del apéndice se muestra el alineamiento de cada una de estas proteínas con las correspondientes SrpABC de *P. putida* S12 y las otras dos bombas descritas en *P. putida* DOT-T1E.

La proteína TtgG como hemos dicho anteriormente, basándonos en los análisis informáticos, codificaría una lipoproteína 42.562 Da anclada en la membrana interna. TtgG pertenece a la familia denominada MFP (*membrane fusion protein*), de las cuales la mejor caracterizada es la proteína AcrA de *E. coli*. AcrA forma parte del sistema AcrAB-TolC de *E. coli* implicado en la tolerancia a un gran número de sustancias en esta cepa (antibióticos como tetraciclina, cloramfenicol, β -lactámicos, novobiocina, ácido fusídico, ácido nalidíxico y fluorquinolonas; detergentes como SDS, Triton X-100 y sales biliares; varios colorantes catiónicos, desinfectantes e incluso disolventes [Nikaido, 1998; Tsukagoshi y Aono, 2000; White et al., 1997]). En la Tabla I.1 se muestran las proteínas homólogas a TtgG con mayor porcentaje de identidad encontradas en distintos organismos. TtgG tiene un alto porcentaje de identidad con las proteínas TtgA y TtgD de *P. putida* DOT-T1E (57% con TtgA y 72% con TtgD). Con estas tres proteínas se ha hecho un esquema del alineamiento para mostrar su similitud (Figura I.3).

Los primeros 24 aminoácidos de AcrA forman un péptido señal típico de lipoproteínas bacterianas (Zgurskaya y Nikaido, 1999; Hussain et al., 1982). El análisis de la proteína TtgG mediante el programa informático SignalP V2.0 (Nielsen et al., 1997, ver Materiales y Métodos) determinó la presencia de un péptido señal cuyo posible punto de corte más probable se encontraría entre los aminoácidos Gly32 y Cys33, siendo la Cys33 el residuo a través del cual se uniría al lípido A (Figura I.1). En la Figura I.2. se muestra la estructura primaria del péptido señal hipotético de TtgG.

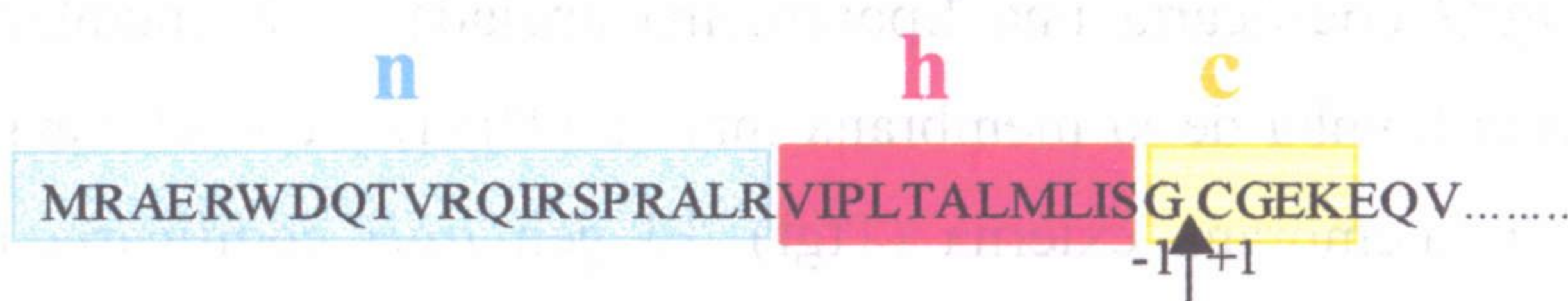


Figura I.2. Estructura primaria del péptido señal hipotético en el extremo amino terminal de TtgG de *P. putida* DOT-T1E. Sobre la secuencia de aminoácidos se indican tres dominios diferenciados: un dominio polar con carga neta positiva (dominio “n”), una región central hidrofóbica (“h”) y un dominio “c”, normalmente menos hidrofóbico, que contiene el blanco que reconoce la peptidasa. La flecha indica el sitio propuesto de procesamiento. El lípido A se uniría a la cisteína marcada con el +1 (Cys33). Para esta predicción se ha utilizado el programa SignalP V2.0 (Nielsen et al., 1997).

Las proteínas de la familia MFP poseen un único dominio transmembrana N-terminal y un amplio dominio periplásmico C-terminal. El programa TMPred (ver Materiales y Métodos) predijo la presencia de una hélice transmembrana localizada entre los aminoácidos Ile22 y Pro44, quedando en el periplasma el resto de la proteína. Se piensa que la función de estas proteínas en los sistemas de bombas de eflujo podría ser la de facilitar la interacción de las proteínas localizadas en la membrana interna con las de membrana externa. Desgraciadamente aún no se ha cristalizado ninguna proteína de esta familia, por lo que no conocemos su estructura tridimensional a alta resolución. Sin embargo, su forma alargada se ha comprobado por cristalografía electrónica en dos dimensiones (Avila-Sakar et al., 2001; Zgurskaya y Nikaido, 1999 [a]).

Tabla I.1 Homólogos de TtgG en distintas especies bacterianas. El porcentaje de identidad se da con respecto a la secuencia de aminoácidos de TtgG.

proteína	especie bacteriana	n° aminoácidos	% identidad	n° acceso	referencia
SrpA	<i>Pseudomonas putida</i>	382	98	AF029405.1	Kieboom et al., 1998
TtgD	<i>Pseudomonas putida</i>	382	72	Y19106	Mosqueda y Ramos, 2000
MexA	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	383	58	AE004479.1	Stover et al., 2000
TtgA	<i>Pseudomonas putida</i>	384	57	AF031417.2	Ramos et al., 1998
ArpA	<i>Pseudomonas putida</i>	371	57	AF183959.1	Kieboom et al. 2001
MexA	<i>Xanthomonas axonopodis</i>	404	48	AE011925.1	da Silva et al., 2002
AcrA	<i>Salmonella typhimurium</i>	397	50	AE008717.1	McClelland et al., 2001
AcrA	<i>Escherichia coli</i>	397	50	AE000152.1	Blattner et al., 1997
MexA	<i>Xanthomonas campestris</i>	399	48	AE012380.1	da Silva et al., 2002
AcrA	<i>Shigella flexneri</i>	409	49	NC004337.1	Jin et al., 2002

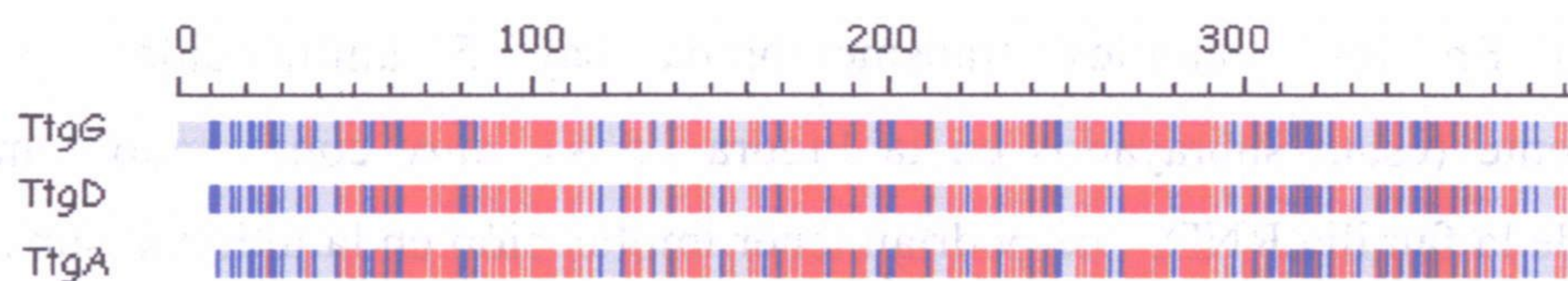


Figura I.3. Esquema del alineamiento de TtgG con otras proteínas similares. Se han utilizado para la comparación las secuencias de aminoácidos de TtgD y TtgA de *P. putida* DOT-T1E. El color rojo significa aminoácidos idénticos; en azul están señalados los aminoácidos que son diferentes pero que tienen similitud en carga y estructura, y en gris los demás. Los alineamientos completos se muestran en la Figura A.1 del Apéndice.

La proteína TtgH, con un tamaño predicho de 114.012 Da sería la verdadera translocasa del sistema. TtgH pertenece a la familia RND (*resistance/nodulation/ cell division*) de proteínas de membrana. Esta familia se caracteriza porque sus miembros poseen doce segmentos transmembrana (TMS) y dos grandes lazos o segmentos periplásmicos entre los TMS 1 y 2 y entre los TMS 7 y 8 en su estructura secundaria. Esta estructura, predicha en principio por programas informáticos de predicción de estructura secundaria, se ha verificado para MexB de *Pseudomonas aeruginosa* (Guan et al. 1999) mediante fusiones del gen de la fosfatasa alcalina a los dominios predichos por estos programas; y para AcrB de *Escherichia coli* (Fujihira, et al., 2002), mediante modificación química de mutantes

en cisteínas. Como se ha dicho anteriormente AcrAB-TolC participa en el transporte de un gran número de sustancias diferentes, al igual que el sistema al que pertenece MexB (MexAB-OprM transporta antibióticos de gran importancia clínica como fluoroquinolonas, β -lactámicos, tetraciclina, macrólidos, cloramfenicol, novobiocina, trimetoprima, sulfonamidas, colorantes, detergentes, inhibidores de la síntesis de ácidos grasos, disolventes orgánicos y homoserín-lactonas [Poole y Srikumar, 2003]). Teniendo en cuenta la homología existente entre TtgH y MexB (ver la Tabla I.2 y la Figura A.2 del Apéndice), los datos de Guan et al. (1999) y las predicciones del programa TMpred (ver Materiales y Métodos) la proteína TtgH poseería todos los dominios característicos de esta familia y también atravesaría la membrana citoplasmática 12 veces dejando los extremos amino y carboxi terminal en la membrana interna. Este mismo análisis informático predice que TtgH poseería dos amplios segmentos hidrofílicos de 310 aminoácidos entre TMS 1 y 2, y de 306 entre TMS 7 y 8 (Figura I.5.B). TtgH también posee los dominios A, B, C y D conservados en todas las proteínas de la familia RND (Figura I.5.A y B; Paulsen et al., 1996) En los dominios transmembrana hay 5 aminoácidos cargados negativamente (están subrayados en la Figura I.5.A), muy conservados entre las proteínas de la familia RND, que podrían tener implicación en la unión al substrato y en el transporte de protones. De estos cinco aminoácidos Guan y Nakae (2001) demostraron que Asp40, Asp408 y Lys939 en AcrB son funcionalmente importantes. Estos aminoácidos también están presentes en TtgH y según estos mismos autores, puede que estén formando una red de estabilización de carga entre los segmentos transmembrana 4 y 10, importante para la translocación de protones y el acoplamiento energético.

Tabla I.2. Homólogos de TtgH en distintas especies bacterianas. El porcentaje de identidad se da con respecto a la secuencia de aminoácidos de TtgH.

proteína	especie bacteriana	nº aminoácidos	% identidad	nº acceso	referencia
SrpB	<i>Pseudomonas putida</i>	1049	96	AF029405.1	Kieboom et al., 1998
TtgE	<i>Pseudomonas putida</i>	1048	83	Y19106.2	Mosqueda y Ramos, 2000
MexB	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1046	63	AE004479.1	Stover et al. 2000
EnvD homólogo	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1046	63	S39630	Poole, et al. 1993
TtgB	<i>Pseudomonas putida</i>	1050	62	AF031417.2	Ramos et al. 1998
TtgB	<i>Pseudomonas putida</i>	1050	62	AE016779.1	Nelson et al. 2002

ArpB	<i>Pseudomonas putida</i>	1050	62	AF183959.1	Kieboom et al. 2001
AcrB	<i>Escherichia coli</i>	1049	57	AE000152.1	Blattner et al. 1997
AcrB	<i>Salmonella typhimurium</i>	1037	57	AE008856.1	McClelland et al. 2002

Como ocurría con TtgG, TtgH presenta un alto porcentaje de identidad con las otras bombas descritas en *P. putida* DOT-T1E (Tabla I.2), TtgE y TtgB. En el esquema de alineamiento que se muestra en la Figura I.4, se comparan estas tres proteínas. Todas las zonas que se observan en rojo son idénticas.

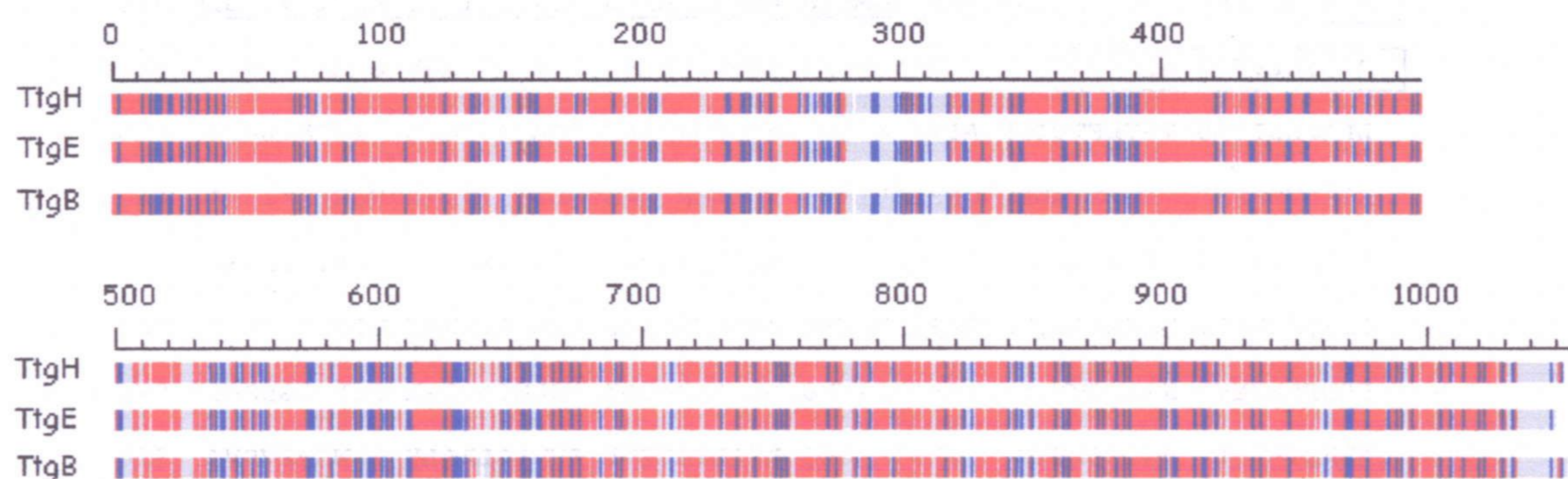
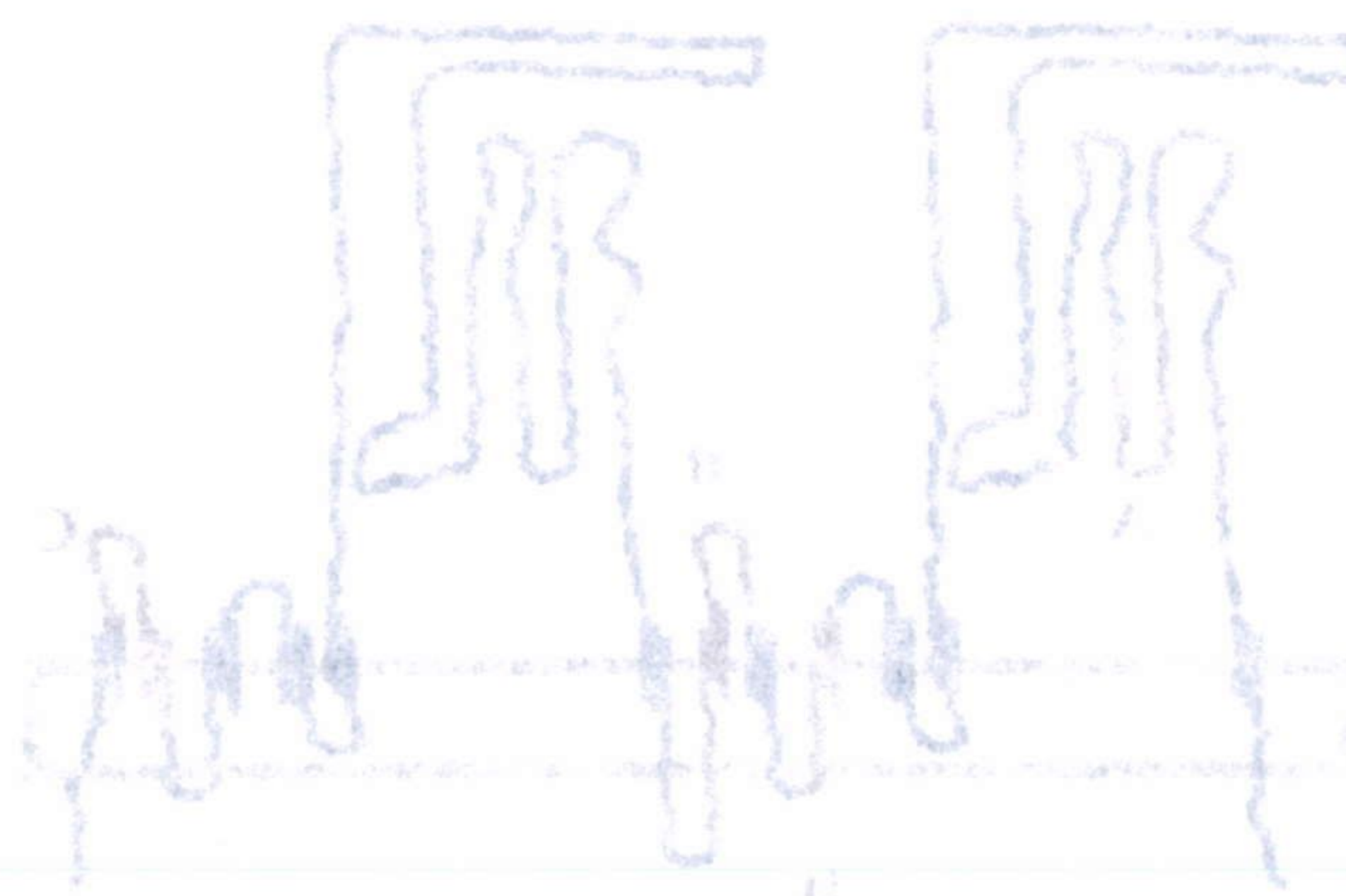


Figura I.4. Esquema del alineamiento de TtgH con otras proteínas similares. Se han utilizado para la comparación las secuencias de aminoácidos de TtgE y TtgB de *P. putida* DOT-T1E. El color rojo significa aminoácidos idénticos; en azul están señalados los aminoácidos que son diferentes pero que tienen similitud en carga y estructura, y en gris los demás.



A

```

MSRFFIDRPI FAWVLAIVAM LAGALSLAKM PISQYPNIAA PAVSIQVSYP GASAQTVQDT 60
VQVIEQQLS GLDGFYMSA ESASDGSMTI IVTFEQGTDP DIAQVQVQNK LQLATPRLPE 120
EVQRQGLRVV KYQMNFFLVM SLVDRSGKLD NFDLGNLIAS QLQDPISRIP GVGDFQLFGS 180
PYAMRIWLDP GKLNSYQLTP TDVASAIREQ NVQVSSGQLG GLPTRSGVQL NATVLGKTRM 240
TTPSQFDEIL VKVNPDGSQV RVKDVGRAEL GADSFASIAQ YKDSPTASLA LRLSTGGNLL 300
ETVDAVKKLM EQQKAYLPDG VEVIYPYDTP PVVEASIESV VHTIFEAVVL VFLVMYLFLO 360
SFRATLIPTL AVPVLLATF ALLEYFGLNI NVLTMYAMVL AIGLLVDDAI VVVENVERLM 420
HDEGISPLEA TRKSMDQISG ALVGIGMVL AVFVPMAFFG GSAGIIYQOF AITIVVCMGL 480
SILVALVFTP ALCVTIHKAP EGNSHHERKG FFGWFNRIFD RGTRRFERGV GAMLKGRGRY 540
LLAFLLITGG TGYLFTQIPK AFLPNEDQGL MMIEVRTPAN ASAERTEGVL QEVRDYLAND 600
EGALVEHFMT VNGFNFAGRG QNSGLVLITF KDWKERHGAG QDVFSIAQRA NQHFAKIKDA 660
SVMFVPPAI LEMGNAMGFN LYLQDNLGLG HEALMAARNQ FLQLASQNPQ LQAVRPNQKD 720
DEPQFQVNID DEKARALQVS IASINETMSA AWGSMYVNDP IDRGRVKRVY VQGEDISRIS 780
PEDFDKQYVR NSLGQMVVPS AFATGEWVNG SPRLERYGGI SSLNILGEPQ PGYSTGDSMI 840
AIAEIMQQLP AGIGLSYVGL SYEEIHAGDQ APLLYALTVL IVVLCCLALY ESWSVPVSVI 900
MVVPLGILLG AVLATWRDLT ADVYFQVGLM TTVGLSAKNA ILIVEFAKEL YEKEGYPIVK 960
AAIEAAKLRL RPILMTSLAF TFGVLPMAIA SGAGAGSQHS IATGVSGAGA GSQHSIATGV 1020
VGGMITATVL AVFFVPLFYV VVVKLFEGLM KRKPNVAVKEV THEV* 1064
    
```

B

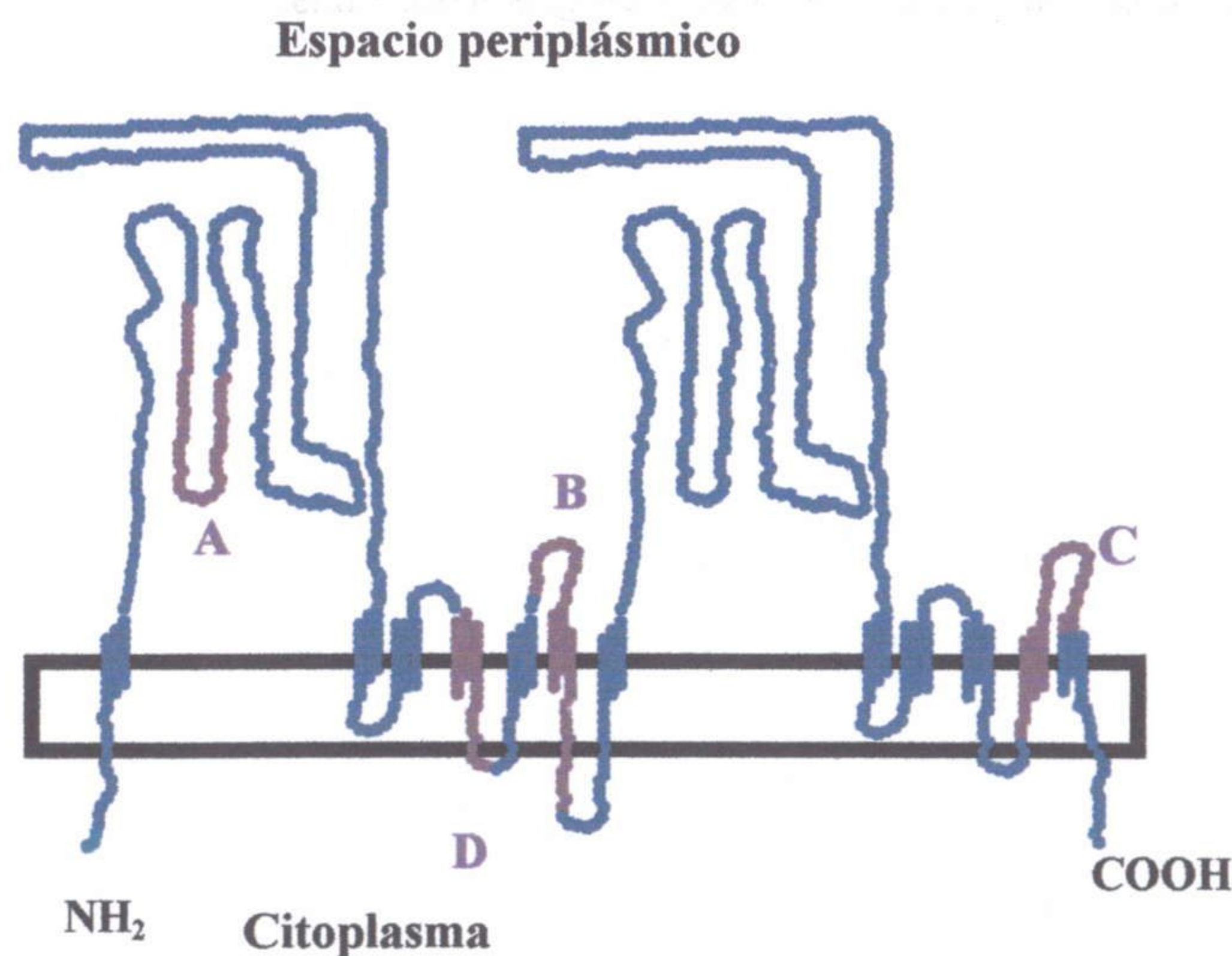


Figura I.5. Modelo de la topología de TtgH, basado en el modelo de las proteínas RND. A. Esquema de la estructura secundaria de TtgH, en el que los dominios de la proteína se distinguen por colores según su ubicación respecto a la membrana interna, basándonos en la predicción del programa TMpred: en rojo los segmentos intracitoplasmáticos, en verde los segmentos transmembrana, y en negro los periplásmicos. Los aminoácidos subrayados y en relieve son posibles sitios de unión con el substrato y de intercambio de protones, según el modelo de Guan y Nakae, (2001). **B.** Representación

de la estructura topológica de TtgH basándonos en la estructura de MexB (Guan y Nakae, 2001; Paulsen et al. 1996). Los residuos que constituyen los dominios conservados están marcados en morado.

Las recientes cristalizaciones de AcrB de *E. coli* por Murakami et al. (2002) y Yu et al. (2003 [a]) han sido fundamentales para entender la estructura y el funcionamiento de las proteínas de la familia RND. AcrB se ha cristalizado como un trímero que forma una cavidad central de 5000 amstrongs cúbicos en la que se unen los substratos. Las principales interacciones que se producen en la unión con los substratos son de carácter hidrofóbico (interacciones π - π entre anillos aromáticos y de van der Waals) (Yu et al., 2003 [a]). Cada ligando utiliza distintos residuos de AcrB para unirse y además los ligandos interaccionan entre sí para estabilizar la unión. Se ha observado que existen varios residuos en el sitio de unión a substratos de AcrB que se conservan entre las distintas proteínas de la familia RND (Yu et al., 2003 [b]). En la Tabla I.4 se muestran los aminoácidos de AcrB, y los correspondientes a las bombas Mex de *P. aeruginosa* y a las bombas Ttg de *P. putida* DOT-T1E. De los ocho aminoácidos conservados en el sitio de unión a substrato, sólo hay una variación en TtgH con respecto AcrB: existe una leucina en el lugar de la fenilalanina (Phe388, marcada en rojo en la Tabla I.4).

Tabla I.4. Conservación de los residuos de unión a substrato entre las bombas de la familia RND (adaptado de Yu et al., 2003b). En rojo se señala el aminoácido de TtgH que varía con respecto a AcrB. Se han escrito en cursiva los aminoácidos de las otras proteínas que difieren con respecto a los de AcrB.

	Leu25	Lys29	Asp99	Asp101	Phe386	Phe388	Phe458	Phe459
AcrB	Leu	Lys	Asp	Asp	Phe	Phe	Phe	Phe
TtgB	Leu	Lys	<i>Asn</i>	Asp	<i>Ala</i>	Phe	Phe	Phe
TtgE	Leu	Lys	<i>Asn</i>	Asp	Phe	<i>Ile</i>	Phe	Phe
TtgH	Leu	Lys	Asp	Asp	Phe	<i>Leu</i>	Phe	Phe
MexB	Leu	<i>Ser</i>	Asp	Asp	Phe	Phe	Phe	Phe
MexD	Leu	Lys	Asp	Asp	<i>Leu</i>	Phe	Phe	Phe
MexF	<i>Ile</i>	<i>Gln</i>	Asp	Asp	<i>Leu</i>	Phe	Phe	Phe
MexY	Leu	<i>Phe</i>	<i>Asn</i>	Asp	<i>Leu</i>	Phe	Phe	<i>Ile</i>

La proteína TtgI tiene un tamaño de 51.397 Da y es la tercera pieza de este sistema de transporte. Pertenece a la familia de proteínas OMP (*outer membrane protein*), cuyos miembros más estudiados son TolC (sistema AcrAB-TolC) de *Escherichia coli* y OprM (sistema MexAB-OprM) de *Pseudomonas aeruginosa*.

Ensayos de marcaje con [³H]-palmitato revelaron que OprM es una lipoproteína (Nakajima et al., 2000), anclada a la membrana externa por la unión de ácidos grasos al residuo Cys18 del extremo N-terminal. Gran parte de esta proteína según este estudio quedaría expuesta al espacio periplásmico. El extremo N-terminal de TtgI mantiene una identidad muy alta con respecto a la misma región de OprM (Figura I.6). La Cys17 de TtgI podría ser el sitio de unión a un ácido graso, como se ha demostrado para OprM.

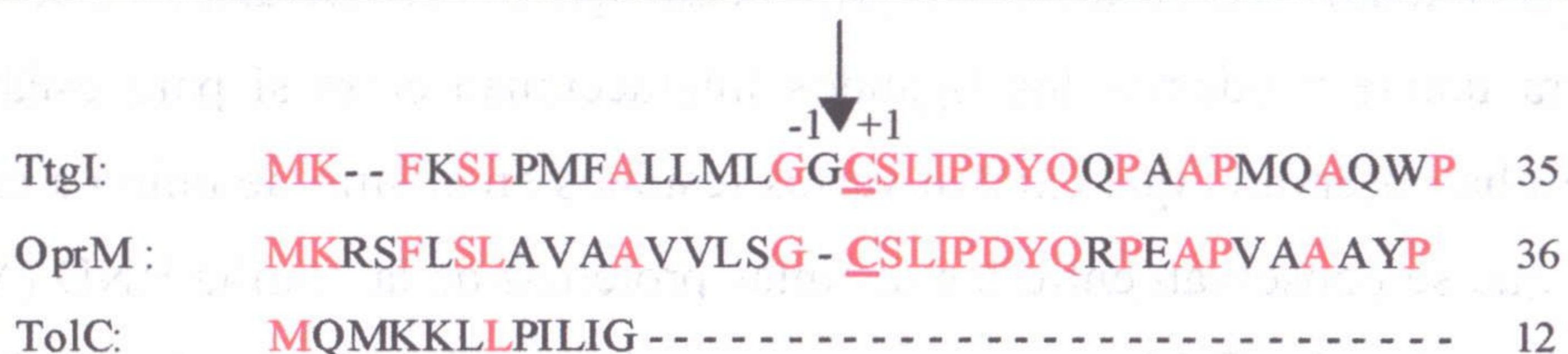


Figura I.6. Extremo amino terminal de TtgI y proteínas homólogas. En rojo se han señalado los aminoácidos idénticos. El posible punto de acilación de TtgI, Cys17, se ha subrayado y marcado con +1. El posible péptido señal comprendería desde Met1 hasta Gly16, marcada con -1. La Cys18 de OprM está también subrayada, por ser el sitio de acilación de esta proteína (Nakajima et al., 2000).

TtgI, al igual que los otros componentes de la bomba, comparte un alto porcentaje de identidad con las proteínas homólogas de las otras dos bombas descritas en *P. putida* DOT-T1E, como se observa en la Tabla I.3 y en la Figura I.7. La estructura cristalográfica de TolC ha sido publicada por Koronakis y colaboradores (2000), siendo la primera estructura de una proteína de este tipo que se resuelve. A pesar de que el porcentaje de identidad entre TolC y TtgI es muy bajo (19%, ver Tabla I.3), los residuos esenciales para la estructura de TolC están conservados entre los miembros de una amplia familia de proteínas de membrana de bacterias gram negativas, entre ellas TtgI (ver alineamiento de proteínas en Apéndice A.1; Sharff, et al., 2001), y por ello nos permitimos sugerir que comparten una estructura similar.

Tabla I.3. Homología de TtgI con proteínas de distintas especies bacterianas. El porcentaje de homología se da con respecto a la secuencia de aminoácidos de TtgI.

proteína	especie bacteriana	n° aminoácidos	% identidad	n° acceso	referencia
SrpC	<i>Pseudomonas putida</i>	470	99	AF029405.1	Kieboom et al., 1998
TtgF	<i>Pseudomonas putida</i>	480	59	Y19106.2	Mosqueda y Ramos, 2000
OprM	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	485	59	AE004479.1	Stover et al., 2000
OprK	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	477	59	A49937	Poole, et al., 1993
TtgC	<i>Pseudomonas putida</i>	484	56	AF031417.2	Ramos et al., 1998
TtgC	<i>Pseudomonas putida</i>	484	56	AE106779.1	Nelson et al., 2002
ArpC	<i>Pseudomonas putida</i>	484	56	AF183959.1	Kieboom et al., 2001
OprM	<i>Aeromonas hydrophila</i>	475	52	AF148126.2	Zhang et al., 2002
OprM	<i>Xanthomonas campestris</i>	497	48	NC003902.1	da Silva et al., 2002
OprM	<i>Xanthomonas axonopodis</i>	503	47	NC003919.1	da Silva et al., 2002
OprJ	<i>Pseudomonas putida</i>	468	45	NC002947.3	Nelson et al., 2001
SmeC	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	471	45	AF173226.1	Li et al., 2002
TolC	<i>Escherichia coli</i>	495	19	P02930	Blattner et al., 1997

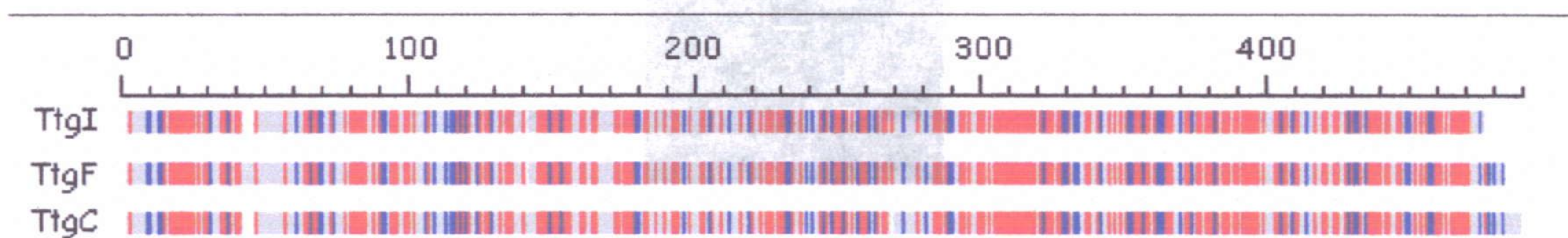


Figura I.7. Esquema del alineamiento de TtgI con otras proteínas similares. Se han utilizado para la comparación las secuencias de aminoácidos de TtgC y TtgF de *P. putida* DOT-T1E. El color rojo significa aminoácidos idénticos; en azul están señalados los aminoácidos que son diferentes pero que tienen similitud en carga y estructura, y en gris los demás.

I.4.- Organización de los genes *ttgGHI*.

El análisis de la secuencia de los genes *ttgG*, *ttgH* y *ttgI* indicaba que probablemente los tres formaban un operón, ya que entre el codón de finalización de *ttgG* y el ATG de *ttgH* sólo había 17 pares de bases de separación; y el codón de terminación del segundo gen y el codón de iniciación del tercero (*ttgI*) solapaban. Para comprobarlo se aisló el ARN total de *P. putida* DOT-T1E a partir de células

cultivadas en LB y se llevaron a cabo ensayos de RT-PCR, según se describe en Materiales y Métodos. Los oligonucleótidos utilizados están basados en la secuencia del extremo 3' de *ttgG* y del 5' de *ttgH*; y la del extremo 3' de *ttgH* y el 5' de *ttgI* (Figura I.8.A). Ambas amplificaciones dieron como resultado una banda del tamaño predicho a partir de la secuencia de ADN (Figura I.8.B). Los controles negativos, en los que no se añadió la retrotranscriptasa, no mostraron amplificación alguna, indicando la ausencia de ADN contaminante en la reacción. Estos resultados confirmaban que los genes *ttgGHI* formaban un operón.

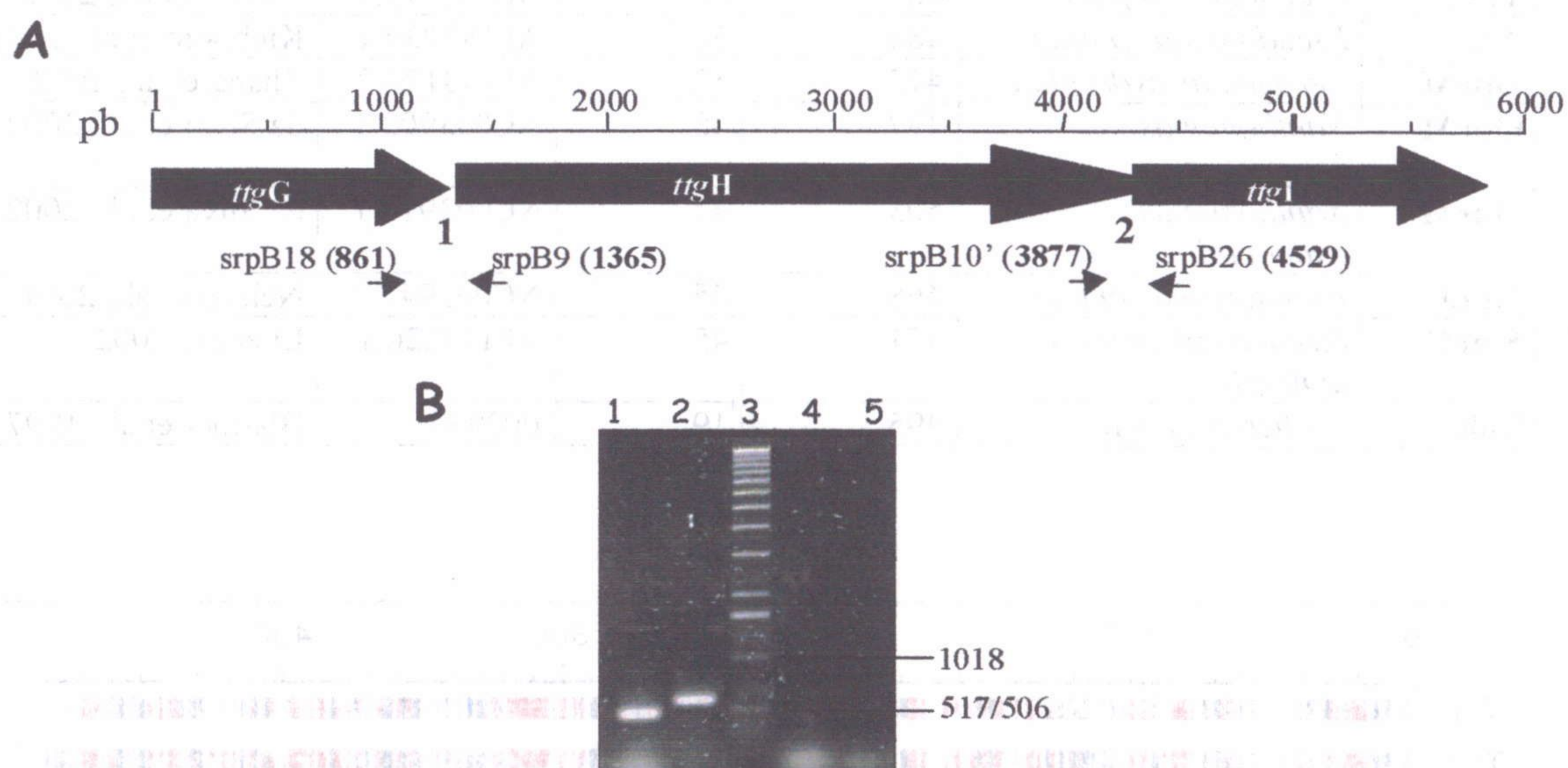


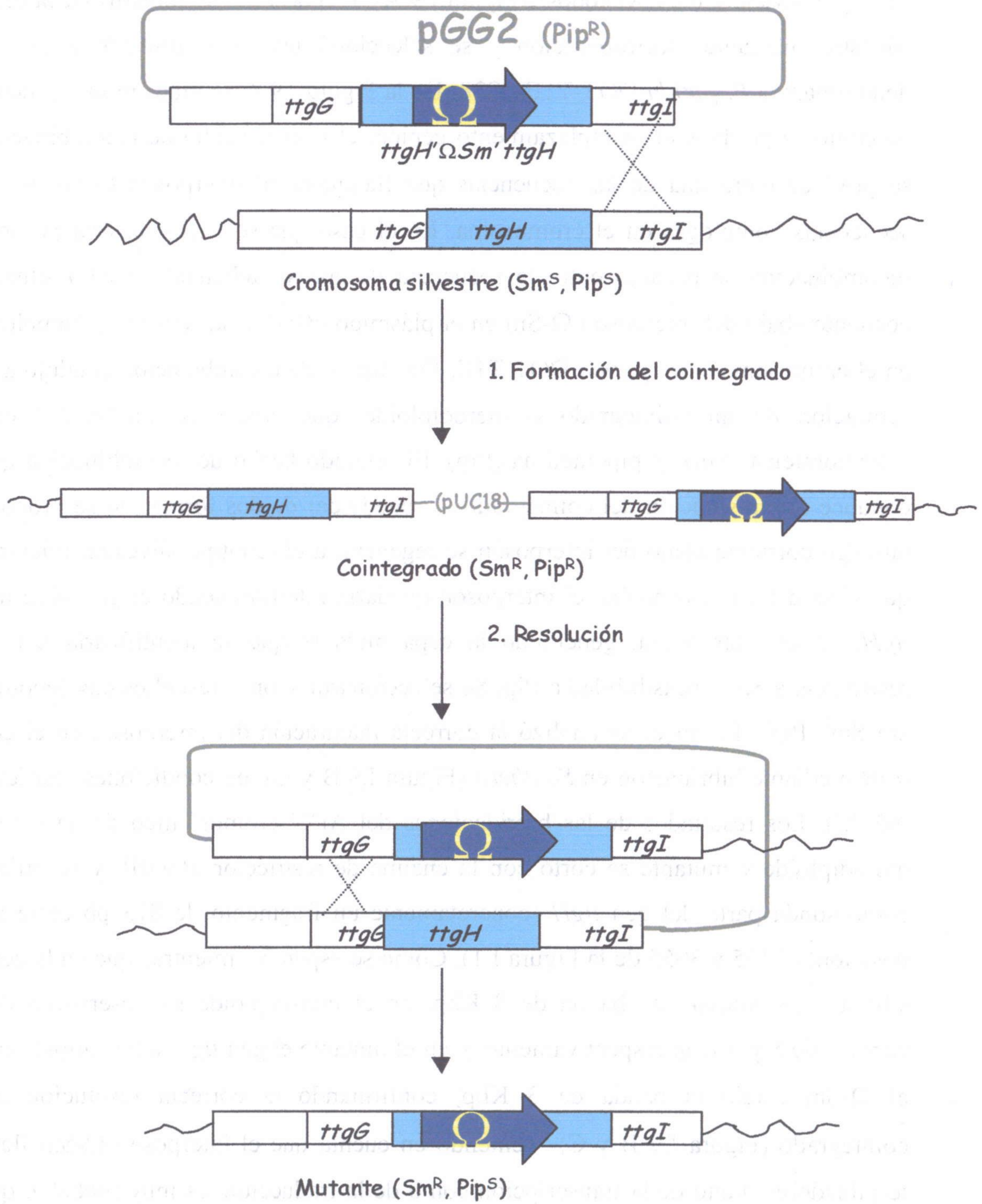
Figura I.8. Análisis mediante RT-PCR de la organización transcripcional de los genes *ttgGHI* en *P. putida* DOT-T1E. A. Esquema de la estructura de los genes *ttgGHI* y localización de los oligonucleótidos usados para la amplificación del ARNm en el ensayo de RT-PCR. Los números en paréntesis indican la posición de los oligonucleótidos en la secuencia de ADN de los genes *ttgGHI* conforme a la Figura I.1. B. Electroforesis del ADNc amplificado con los oligonucleótidos srpB18 y srpB9 (calle 1); srpB10' y srpB26 (calle 2). La calle 3 corresponde al marcador de peso molecular X de Roche. En el margen derecho se indican los tamaños correspondientes de las bandas del marcador de peso molecular más cercanas a las de las bandas amplificadas en el ensayo. Las calles 4 y 5 corresponden a los controles negativos, en los que no se incluye la transcriptasa reversa.

I.5. Inactivación del gen *ttgH*.

Con el fin de determinar la función de la bomba TtgGHI en la tolerancia a tolueno decidimos introducir una mutación que inactivase el producto del gen *ttgH*.

Para ello usamos el plásmido suicida pGG2, que contiene el fragmento *Bam*HI de 7,7 Kbp de pGG1 con el interposón Ω -Sm (Prentki y Krisch, 1984) interrumpiendo el gen *ttgH*, (Materiales y Métodos) (Figura I.9.A). El plásmido se transfirió a la cepa silvestre mediante electroporación y se seleccionó una cepa mutante a la que denominamos *P. putida* DOT-T1E-PS28. En la Figura I.9.A se muestra un esquema de cómo se produce el reemplazamiento génico: el primer hecho de recombinación se produce entre una de las secuencias que flanquean al interposón Ω -Sm y sus secuencias homólogas en el cromosoma. En el caso que se examina, esta primera recombinación se produjo entre la secuencia de aproximadamente 5 Kbp situado corriente abajo del interposón Ω -Sm en el plásmido pGG2 y su secuencia homóloga en el cromosoma de *P. putida* DOT-T1E. Este hecho de recombinación condujo a la formación de un cointegrado o merodiploide, que crecía en medio LB con estreptomicina (Sm) y piperacilina (Pip). El segundo hecho de recombinación que conduce a la resolución del cointegrado, se puede dar de dos formas: si se produce también corriente abajo del interposón se regeneraría el fenotipo silvestre, mientras que si se diese aguas arriba, el interposón quedaría interrumpiendo el gen silvestre, *ttgH*, en el cromosoma, generando la cepa mutante que se identificaría por su resistencia a Sm y sensibilidad a Pip. Se seleccionaron clones resueltos cuyo fenotipo era Sm^R Pip^R. Entonces se analizó la correcta integración del interposón en el gen *ttgH* mediante hibridación en *Southern* (Figura I.9.B y C), en condiciones estrictas (65 °C). Los resultados de las hibridaciones del ADN cromosómico del silvestre, merodiploide y mutante se cortó con la enzima de restricción *Bam*HI, y se utilizó como sonda parte del gen *ttgH* (concretamente un fragmento de 873 pb entre las posiciones 2165 y 3055 de la Figura I.1). Como se esperaba, mientras que en la cepa silvestre se obtuvo una banda de 8 Kbp, en el merodiploide se observaron dos bandas, de 8 y 3 Kbp respectivamente, y en el mutante el gen *ttgH* interrumpido por el Ω -Sm rindió la banda de 3 Kbp, confirmando la correcta resolución del cointegrado (Figura I.9 B y C). Teniendo en cuenta que el interposón Ω -Sm lleva terminadores tanto de la transcripción como de la traducción, es muy probable que esta mutación sea polar y que afecte también al gen *ttgI*.

A



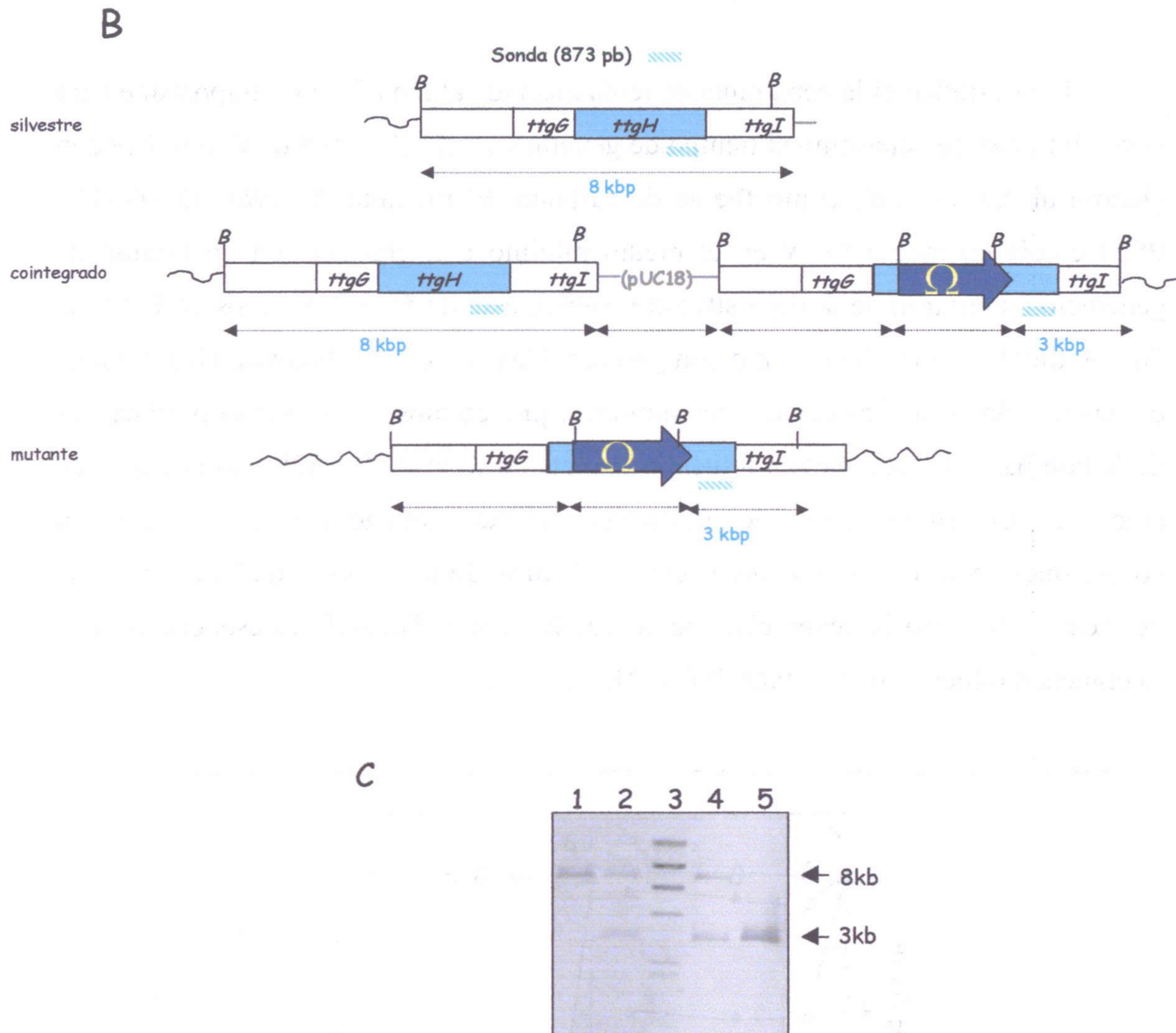


Figura I.9. Estrategia seguida para la construcción del mutante *P. putida* DOT-T1E PS28 y comprobación mediante hibridación de ADN de la interrupción del gen *ttgH*. A. Pasos seguidos para provocar el reemplazamiento génico, se explica en el texto. B. Esquema de los fragmentos de restricción *Bam*HI de la zona del cromosoma y del plásmido pGG2 a los que se uniría la sonda de *ttgH* en la hibridación: en el silvestre la sonda marcada se uniría al fragmento de 8 Kbp que contiene el gen *ttgH* silvestre; en el cointegrado la sonda se seguiría uniendo a la zona intacta del cromosoma que contiene el gen *ttgH*, pero a la vez se uniría al fragmento *Bam*HI de aproximadamente 3 Kbp que quedan después del interposón. En el mutante, carente del gen *ttgH* íntegro, la sonda sólo se puede unir al fragmento de 3 Kbp de después del interposón. C. Análisis mediante hibridación de la región de ADN donde se encuentra el gen *ttgH*. El ADN de la cepa silvestre (calle 1) y de los candidatos a cointegrados o resueltos (calles 2, 4 y 5) digerido con *Bam*HI se separó mediante electroforesis en gel de agarosa y se transfirió a una membrana de nylon. En el margen derecho de la figura se indican los tamaños de los fragmentos obtenidos. En la calle 1 se observa una sola banda correspondiente a la hibridación de la sonda con el ADN de la cepa silvestre. Según las bandas obtenidas en la hibridación vemos que los candidatos de las calles 2 y 4 corresponden a cointegrados; el mutante se muestra en la calle 5. En la calle 3 se ha corrido un patrón de peso molecular marcado con digoxigenina (marcador II-dig de Roche), del que se ven 6 fragmentos en la figura, de 23.1, 9.4, 6.6, 4.4, 2.3, y 2.0 Kpb, de arriba a abajo.

I.6.- Identificación de un fenotipo asociado a la mutación en *ttgH*.

Para estudiar si la cepa mutante tenía afectada alguna función importante para el crecimiento, se determinó el tiempo de generación en LB y medio mínimo M9 con glucosa al 0,5% (p/vol) como fuente de carbono. El mutante *P. putida* DOT-T1E-PS28 crecía en medio LB y en el medio mínimo con glucosa con un tiempo de generación similar al de la cepa silvestre, siendo éste de 50 ± 2 minutos en LB y de 70 ± 3 minutos en medio mínimo con glucosa. Una vez comprobado que los tiempos de generación de ambas cepas eran similares, procedimos a estudiar la implicación de la bomba en la tolerancia a tolueno. El mutante DOT-T1E-PS28 no era capaz de crecer en LB en presencia del 0,3% (vol/vol) de tolueno ($\log P_{o/w} = 2,5$) en condiciones en las que el silvestre sí crecía, alcanzando una D.O.₆₆₀ de 3 tras 16 horas de incubación. Esto indicaba claramente que la bomba TtgGHI era esencial para la tolerancia a tolueno en *P. putida* DOT-T1E.

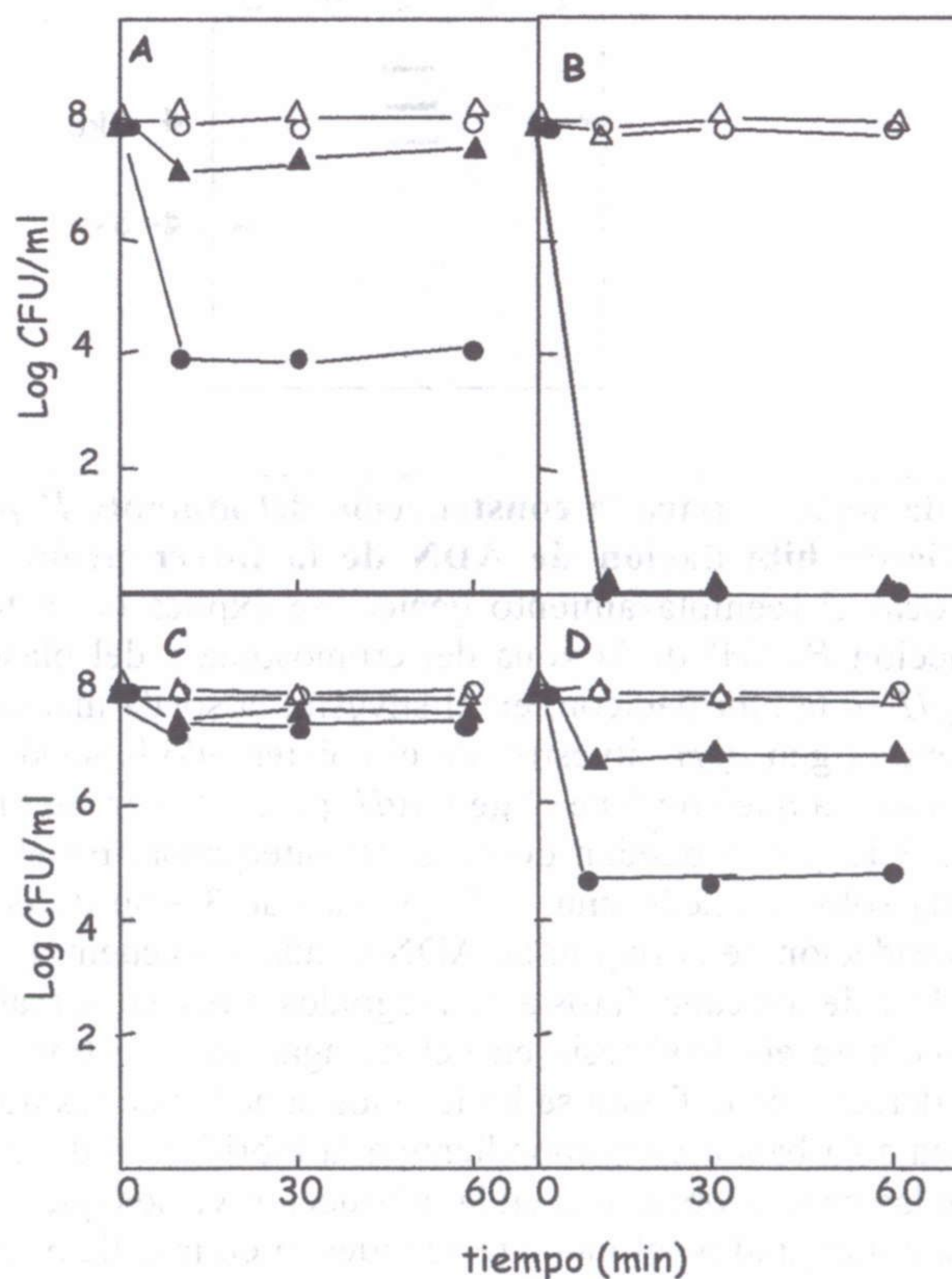


Figura I.10. Ensayos de supervivencia al choque con tolueno (cinéticas de muerte) de la cepa silvestre *P. putida* DOT-T1E y el mutante PS28. Las dos cepas se cultivaron durante 14-16 horas en LB o en LB con tolueno en fase gaseosa. Se diluyeron 100 veces en LB o en LB con tolueno en fase gaseosa y se incubaron hasta que alcanzaron una turbidez a 660 nm de aproximadamente 0,8. Entonces se dividió cada cultivo en dos alícuotas: una se dejó como control (símbolos vacíos) y a la otra se le añadió tolueno (símbolos llenos) al 0,3% (vol/vol) en el caso de A y B en la figura, ó 0,075% (vol/vol) en el caso de C y D. La supervivencia se determinó contando en placas de LB las unidades formadoras de colonias por mililitro de cultivo, antes del choque con el disolvente y a los 10, 30 y 60 minutos. En las gráficas A y C muestra el comportamiento de la cepa silvestre, mientras que las gráficas B y D representan el comportamiento del mutante *P. putida* DOT-T1E-PS28.

Para caracterizar mejor el papel en la tolerancia a tolueno, llevamos a cabo ensayos de supervivencia a un choque repentino con tolueno (añadiendo tolueno al 0,3% y 0,075% [vol/vol]) en cultivos preexpuestos o no a bajas concentraciones de tolueno suministrado a través de la fase gaseosa. Para la cepa silvestre (Figura I.10.A) la supervivencia tras el choque fue de entre 0,01 a 0,001% de las células cuando el tolueno era añadido a cultivos no preinducidos y de entre el 50% al 100% de las células cuando habían sido preexpuestas a tolueno, como se describía en el trabajo de Ramos y colaboradores (1998). En cambio, los cultivos de *P. putida* DOT-T1E-PS28 (Figura I.10.B) no toleraban un choque repentino de tolueno sin preinducir o preinducidos con tolueno en la fase gaseosa, y la supervivencia estuvo por debajo de los límites de detección del ensayo. Esta diferencia en la tolerancia a tolueno también se observó cuando en el ensayo se utilizó una concentración menor de tolueno (0,075% [vol/vol]). Mientras el 100% de las células de la cepa silvestre sobrevivía a este choque independientemente de las condiciones de crecimiento (Figura I.10.C), sólo una fracción del cultivo no inducido (10^{-3}) y del inducido (10^{-1}) del mutante toleró el choque del 0,075% (vol/vol) de tolueno (Figura I.10.D). Estos resultados sugerían que la bomba TtgGHI participaba tanto en la tolerancia intrínseca como en la inducible por tolueno.

I.8 Estudio de la expresión del operón *ttgGHI* y determinación del punto de iniciación de la transcripción.

Los datos fisiológicos obtenidos en los experimentos de supervivencia al choque de tolueno indicaban que la bomba TtgGHI participaba tanto en la tolerancia constitutiva como en la inducible. Para elucidar el papel de la bomba TtgGHI en ambas situaciones decidimos estudiar el patrón de expresión de los genes *ttgGHI* en la cepa silvestre cultivada en medio LB con y sin tolueno en fase gaseosa. El análisis

de extensión de cadena a partir del cebador nos permitió identificar dos bandas de cDNA de 213 pb y 218 pb cuando las células se cultivaron en ausencia de tolueno. De esto se deduce que en ausencia del hidrocarburo aromático tiene lugar una cierta expresión basal del operón *ttgGHI*. Cuando al medio de cultivo se añadía una pequeña cantidad de tolueno, suministrada en la fase gaseosa (aproximadamente 3 mM), la expresión desde ambos promotores se incrementó entre 3 y 4 veces (Figura I.11.A). La intensidad de la banda de cDNA de 218 pb en estas condiciones era aproximadamente la mitad de la de 213 pb (Figura I.11.A, calle 2).

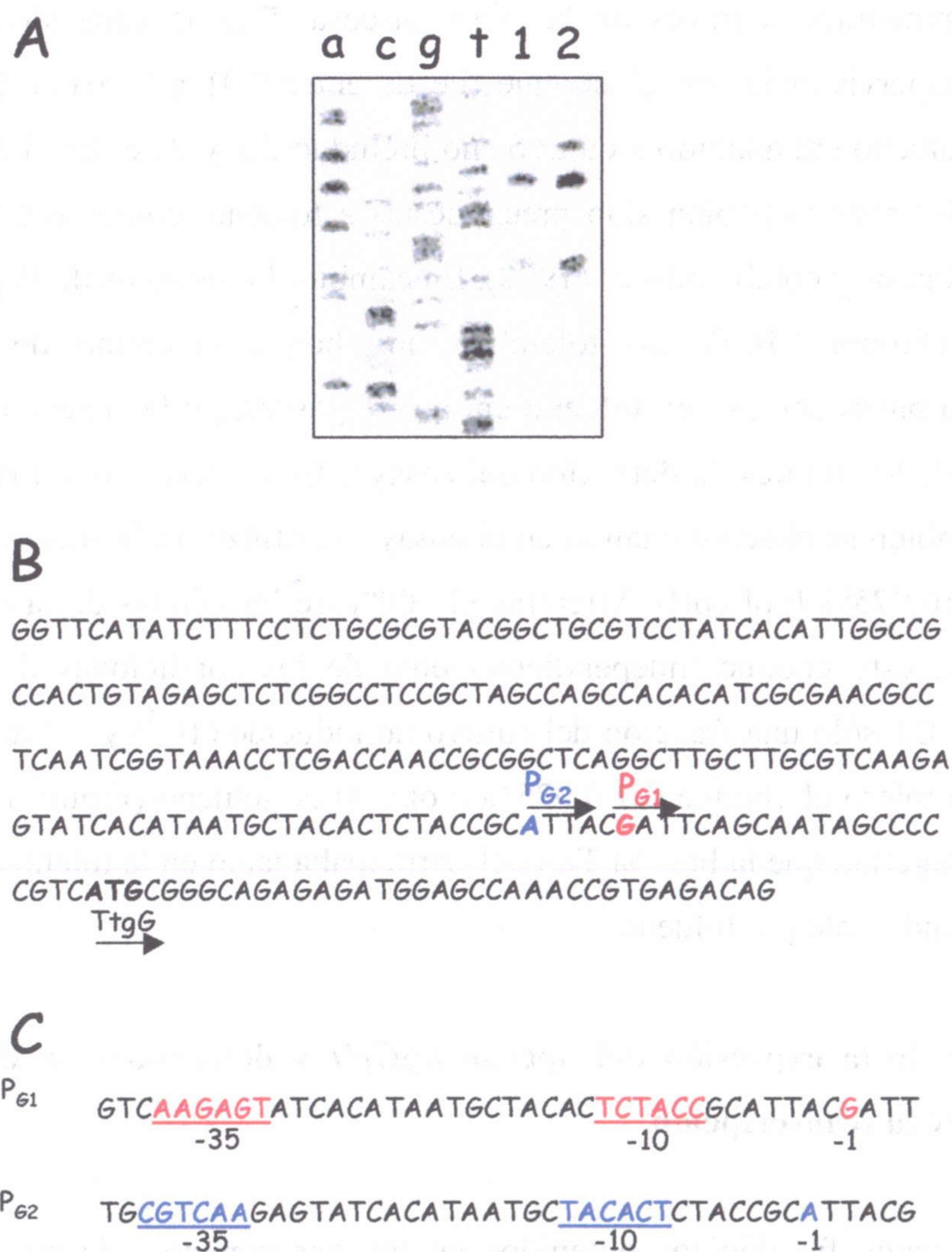


Figura I.11. Patrón de expresión del operón *ttgGHI* en células *wt* bajo diferentes condiciones de cultivo. **A.** Mapa del punto de iniciación de la transcripción del gen *ttgG*. Las calles 1 y 2 corresponden a células cultivadas en LB sin y con tolueno en la fase gaseosa, respectivamente. Las calles ACGT corresponden a la escalera de secuenciación. **B.** Secuencia de ADN de la región promotora de *ttgG*. Los puntos de inicio de la transcripción están en rojo para P_{G1} y en azul para P_{G2} y las flechas indican el sentido de la transcripción del gen. El codón de iniciación ATG del gen *ttgG* está

en negrita. C. Localización de las cajas -10 y -35 de los promotores P_{G1} y P_{G2}. Estos posibles promotores están solapados en al menos 1 pb en sus regiones -10 y -35.

A partir del tamaño de la banda de cDNA y de la escalera de secuencia formada a partir del mismo oligonucleótido usado en el experimento de elongación de la cadena, dedujimos que los puntos de iniciación de la transcripción correspondieron a las bases G83 y A78 de la secuencia que se muestra en la Figura I.11.B, para los promotores denominados P_{G1} y P_{G2} respectivamente. El análisis de las secuencias corriente arriba de los puntos de iniciación de la transcripción permitió definir las posibles cajas -10 y -35 de los promotores propuestos. Corriente arriba del punto de iniciación del P_{G1} encontramos una región conservada -10 con la secuencia típica reconocida por el factor de transcripción σ^{70} y una región -35 con bases menos conservadas con respecto al consenso (Figura I.11.C) (Wösten, 1998; Patek et al., 1996; Helmann, 1995). El promotor llamado P_{G2} también mostró características comunes a las cajas -10 (3 de 6 bases de una caja -10 consenso), y una región -35 con un bajo nivel de conservación (Figura I.11.C). Así definidos, los promotores P_{G1} y P_{G2} solapan al menos 1 bp en sus regiones -10 y -35 (Figura I.11.C).

UNIVERSIDAD DE GRANADA

21 NOV. 2003

COMISION DE DOCTORADO

I.8. Construcción de un triple mutante en las bombas de expulsión de tolueno

Dado que la bomba TtgGHI parecía determinante para la supervivencia a tolueno en la cepa *P. putida* DOT-T1E nos preguntamos qué pasaría en un mutante triple en el que ninguna de las tres bombas descritas en esta cepa estuviese presente. Intentábamos averiguar si existían otros mecanismos adicionales capaces de transportar tolueno. La cepa *P. putida* DOT-T1E-82, construida en nuestro laboratorio (Mosqueda y Ramos, 2000), es un doble mutante *ttgB⁻ ttgD⁻* del que ya hemos hablado con anterioridad: cuando se cultivaba este mutante en presencia de tolueno en fase gaseosa una fracción de 10⁻⁵ células era aún capaz de sobrevivir al choque con 0,3% (vol/vol) de tolueno (Figura I.12). Era la cepa parental ideal para construir un triple mutante. Introdujimos y comprobamos la mutación en *ttgH* de la misma forma que se ha explicado para el mutante *P. putida* DOT-T1E-PS28, mediante recombinación homóloga utilizando el plásmido pGG2. La cepa resultante fue denominada *P. putida* DOT-T1E-PS34. Comprobamos la mutación mediante la

hibridación del ADN cromosómico de los candidatos con una sonda de *ttgH*, de la misma forma que se hizo para el mutante *P. putida* DOT-T1E-PS28. El esquema de recombinación homóloga es el mismo que el de la Figura I.9, donde se explicaba la construcción del mutante *P. putida* DOT-T1E-PS28.

Este mutante es tan sensible a tolueno que no es capaz de crecer en presencia de tolueno en fase gaseosa, y no fue posible llevar a cabo en el ensayo de supervivencia con células inducidas. El hecho de que este triple mutante no sea capaz de crecer en presencia de bajas concentraciones de tolueno es muy significativo, ya que la mayoría de las cepas consideradas sensibles, *Escherichia coli* por ejemplo, sí son capaces de crecer en estas condiciones. Por tanto, se sugiere que una cepa en la que las tres bombas de extrusión de tolueno no son funcionales es hipersensible a tolueno.

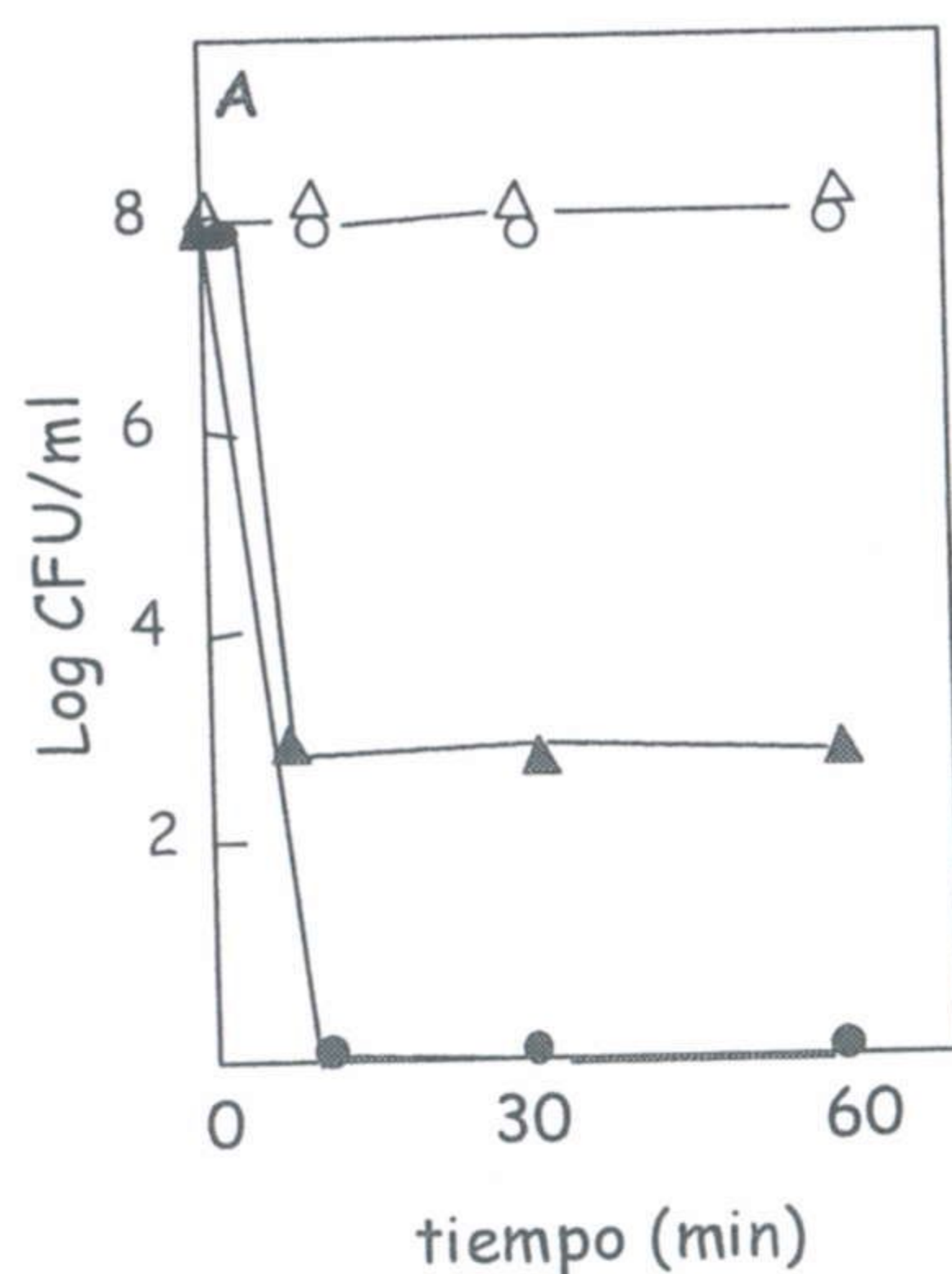


Figura I.12. Supervivencia al choque con 0,3% de la cepa *P. putida* DOT-T1E-82 (*ttgB::phoA-Km; ttgD::kilAtelAB*) En el caso de *P. putida* DOT-T1E-82 todavía 1 de entre 10^5 células es capaz de sobrevivir al choque con tolueno tras preinducir el cultivo con tolueno suministrado en fase gaseosa. Figura obtenida de Mosqueda y Ramos (2000).

DISCUSIÓN

Al inicio de esta Tesis Doctoral se conocía la participación de dos bombas de eflujo de la familia RND en la eliminación activa de tolueno en *P. putida* DOT-T1E. Sin embargo, una fracción de células de la cepa mutante *P. putida* DOT-T1E-82, que tiene los genes *ttgB* y *ttgD* interrumpidos por un casete Ω -Km y de resistencia a telurito respectivamente, sobrevivía al choque con tolueno si el cultivo había sido previamente inducido con bajas concentraciones de tolueno. Estos datos sugerían la existencia de algún otro mecanismo de tolerancia, posiblemente otra bomba de carácter inducible, que permanecía sin caracterizar. Dado que en *P. putida* S12 se había identificado una bomba de expulsión de tolueno de carácter inducible, decidimos averiguar si una bomba similar a ésta estaba presente en el organismo que se estudiaba en el laboratorio de Granada.

Como se explicó en la sección de Materiales y Métodos y en la de Resultados se consiguió identificar una bomba homóloga a la SrpABC, a la que denominamos TtgGHI. Los datos obtenidos en su secuenciación y el posterior análisis de la secuencia nos permitieron clasificar esta bomba como perteneciente a la familia RND. Los tres genes encontrados codificaban 3 proteínas que tenían alta similitud con proteínas de fusión periplásmica (TtgG), proteínas de membrana interna o translocasas (TtgH) y proteínas de membrana externa (TtgI) tal y como se señala en la sección de Resultados de este capítulo.

La estructura de las proteínas Ttg aún no se ha determinado experimentalmente, pero se puede especular sobre la misma comparando su secuencia con la de otras proteínas de la misma familia para las que sí se conoce su estructura tridimensional. El sistema mejor estudiado es AcrAB-TolC de *Escherichia coli*, implicado en el transporte de diversos antibióticos, colorantes, detergentes, e incluso disolventes orgánicos (Nikaido, 1998; Tsukagoshi y Aono, 2000; White et al., 1997). Por ejemplo, se ha propuesto que las proteínas MFP (familia a la que pertenece TtgG) poseen un único dominio transmembrana y un dominio C-terminal, que se alarga a lo ancho del periplasma y que o bien podría facilitar la estructuración del sistema acercando las membranas externa e interna (Dinh et al., 1994); o bien

actuando como un sistema tipo abrazadera que facilitaría la formación de un túnel continuo para la extrusión de los compuestos (Zgurskaya y Nikaido, 1999). La proteína AcrA tiene una forma inusualmente alargada, con una longitud predicha de 17 nm, que concuerda con la idea de que AcrA une o fusiona las membranas externa e interna. Los rasgos estructurales de AcrA, tales como su forma altamente asimétrica, la presencia de un dominio “*coiled-coil*” y dos regiones hidrofóbicas, se interpretaron como reminiscencias de proteínas de membrana de fusión víricas (Zgurskaya y Nikaido, 1999 [a]). En TtgG hemos encontrado rasgos comunes con esta proteína, como la presencia de un posible péptido señal y una cisteína (Cys33), candidata a ser el punto de unión con el lípido A de la membrana externa. Sin embargo, Zgurskaya y Nikaido (1999 [a]) demostraron que la modificación lipídica no es necesaria para el correcto funcionamiento de AcrA. Por otro lado la estructura general de AcrA con un solo segmento transmembrana y un dominio C-terminal alargado parece concordar con las predicciones basadas en el análisis de la secuencia primaria de TtgG.

La estructura de AcrB de *E. coli*, paradigma de proteína de la familia RND, se ha determinado a una resolución de 3,5 Å (Murakami et al., 2002). Se ha visto que los protómeros de AcrB se organizan como un homotrímero en forma de medusa. Cada protómero está compuesto de una región transmembrana de 50 Å de ancho y una cabeza saliente de 70 Å. La parte de arriba de la cabeza se abre como un embudo, donde posiblemente se ancle TolC directamente sobre AcrB. Un poro formado por tres hélices α conecta el embudo con una cavidad central localizada en la parte inferior de la cabeza. La cavidad tiene tres vestíbulos en el lado de la cabeza que conducen al periplasma. En la región transmembrana cada protómero tiene doce hélices α . La estructura implica que los substratos translocados desde el interior celular a través de la región transmembrana y desde el periplasma a través de los vestíbulos son recogidos en la cavidad central y entonces transportados activamente a través del poro hacia el túnel que forma TolC. Un estudio de Zgurskaya y Nikaido (1999 [b]) en el que se añadían antibióticos a AcrB asociado a liposomas, jugando con el gradiente de pH, determinó que AcrB es un transportador antiporter, que intercambia los substratos desde el interior celular por protones del exterior. Lo que no quedaba claro es desde dónde se transportan los substratos, si desde el citoplasma o desde la bicapa lipídica de la membrana. Si AcrB bombease sus substratos desde el

en la bicapa procedentes del exterior, antes de que lleguen al citoplasma. El reciente trabajo de Yu et al. (2003 [a]) de cristalización de AcrB, ha ido un paso más allá al cristalizar AcrB con distintos sustratos de la bomba (Rodamina 6G, bromuro de etidio, dequalinium y ciprofloxacina). En cada caso un trímero de AcrB está unido a tres moléculas de sustrato. La estructura concuerda a grandes rasgos con la propuesta por Murakami et al. (2002). Según estos autores la cavidad central formada por los 3 protómeros de AcrB era tan grande que se asumió que debía estar rellena con bicapa lipídica. Aunque no les fue posible localizar los sustratos en la estructura de AcrB. Yu et al. (2003 [a]) sugirieron que la unión de los sustratos a AcrB no sólo involucraba a la proteína AcrB sino también a los fosfolípidos localizados en la cavidad central. Por tanto, los ligandos primero se unirían cerca de la superficie externa de la bicapa fosfolipídica mediante procesos influenciados por hidrofobicidad, carga y probablemente el momento dipolar de los ligandos (Yu et al., 2003 [b]). Entonces difundirían lateralmente a través de los vestíbulos que existen entre los protómeros de AcrB, alcanzarían la cavidad central y se unirían a las paredes de la cavidad, presumiblemente antes de ser expulsados gracias a la energía que proporciona la entrada de protones.

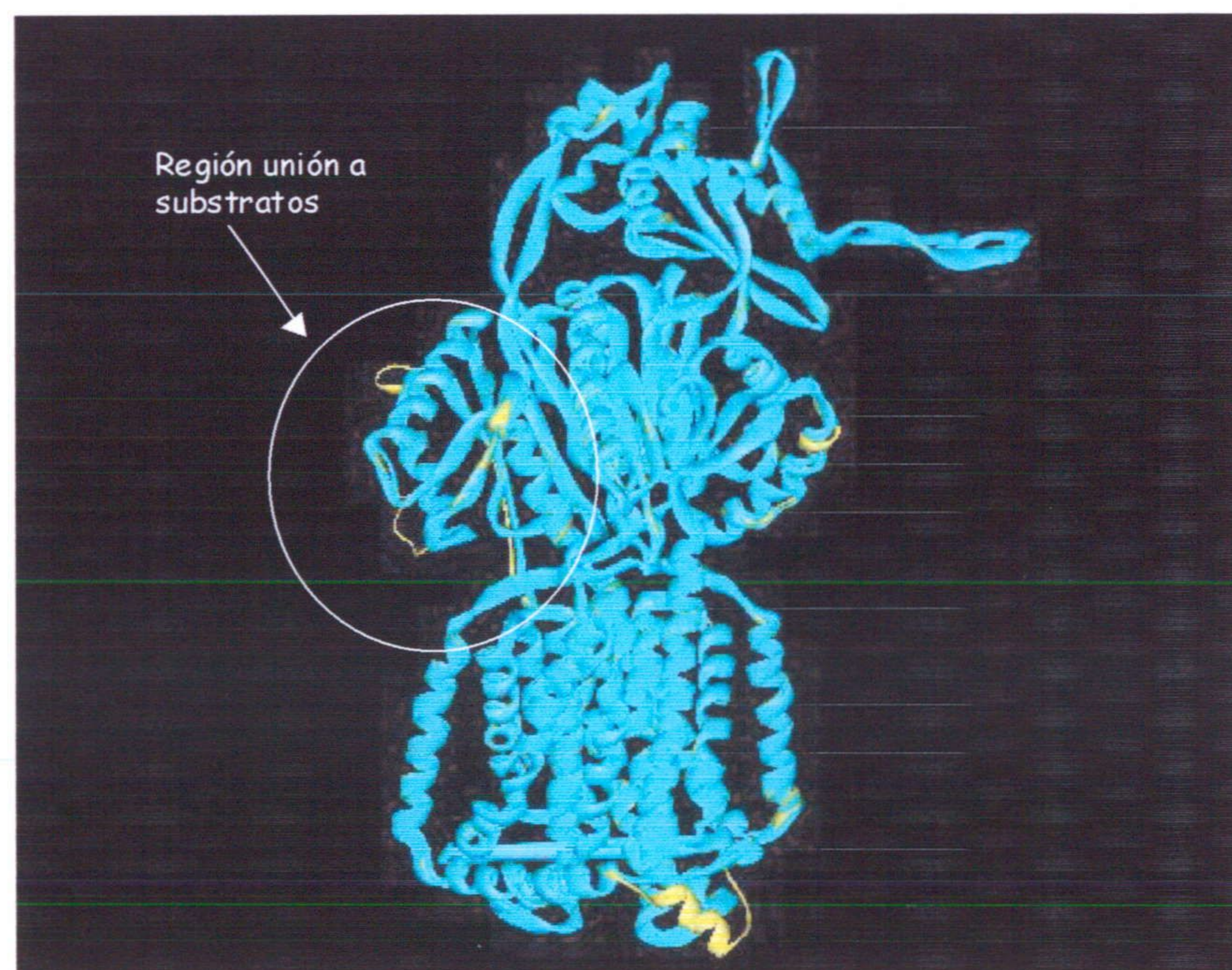


Figura I.13. Modelización de la estructura de TtgH sobre la estructura conocida de AcrB. Superposición de la estructura primaria de TtgH sobre la estructura conocida de AcrB (Murakami et

al., 2002) mediante el método *First Approach* del servidor de Swiss-Model (Schwede, et al., 2003; Materiales y Métodos), mostrado con cintas. AcrB se representa en azul y TtgH en amarillo.

Una de las principales implicaciones de este modelo es que ayuda a explicar el amplio rango de sustratos observado como característica general en este tipo de transportadores. Las moléculas catiónicas pueden entrar a la cavidad central ayudándose de los grupos de cabeza acídicos de los fosfolípidos. Y para el resto de moléculas conocidas como sustratos de las bombas RND su transporte se ve ayudado por la presencia de momento dipolar y por su afinidad por los fosfolípidos que rellenan la cavidad de AcrB. Análisis del solapamiento de la secuencia de aminoácidos de TtgH sobre la estructura de AcrB (Figura I.13) sugiere que la mayoría de los aminoácidos implicados en la unión a sustrato de AcrB estarían conservados en posición y carga en TtgH (ver Tabla I.4 y alineamientos de secuencias en el Apéndice A.I) y como se verá en el Capítulo III TtgGHI también tiene un amplio rango de sustratos.

La estructura de TtgI es posible que sea similar a la de TolC de *Escherichia coli*, puesto que a pesar de que comparten una identidad de tan solo el 19%, se supone que la estructura dentro de esta familia de proteínas está muy conservada. La estructura de TolC se ha resuelto a una resolución de 2.1 Å (Koronakis et al., 2000) y se ha descrito como una proteína trimérica que se extiende por la membrana externa (como un barril- β) y por el periplasma (como un barril de α -hélices). A pesar de que existe una homología limitada entre TolC y OprM, se ha predicho para OprM una estructura predominantemente de α -hélices parecida a la de TolC (Li y Poole, 2000; Wong et al., 2000) y la propuesta de que OprM no está realmente en la membrana externa (Nakajima et al., 2000) es seguramente errónea (Poole and Srikumar, 2003). El trabajo de Koronakis y colaboradores (2000) de cristalización de TolC ha ayudado a clarificar cómo el elemento de la translocasa de la membrana interna de la célula se conecta al medio externo que lo rodea durante el transporte y cómo la expulsión de sustratos sobrepasa el espacio perimplásmico que queda en medio. Estos autores mostraron que se unen tres protómeros de TolC para formar un túnel continuo accesible a disolventes de más de 140 Å de largo que se extiende tanto por la membrana externa como por el espacio periplásmico. El extremo periplásmico (proximal) está sellado por un conjunto de hélices enrolladas, que es probable que se desenrollen para abrir el túnel mediante un mecanismo alostérico mediado por

desenrollen para abrir el túnel mediante un mecanismo alostérico mediado por interacciones proteína-proteína. Koronakis y colaboradores (2000) propusieron que la proteína alostérica que promueve el desenrollamiento era la translocasa de la membrana interna (AcrB); este papel de AcrB está apoyado por las evidencias experimentales de las interacciones entre TolC y AcrB (Thanabalu et al., 1998).

Basándonos en la homología con AcrAB-TolC, siguiendo el modelo de Yu et al. (2003), la localización de la bomba TtgGHI en la membrana sería la que se muestra en la Figura I.14.

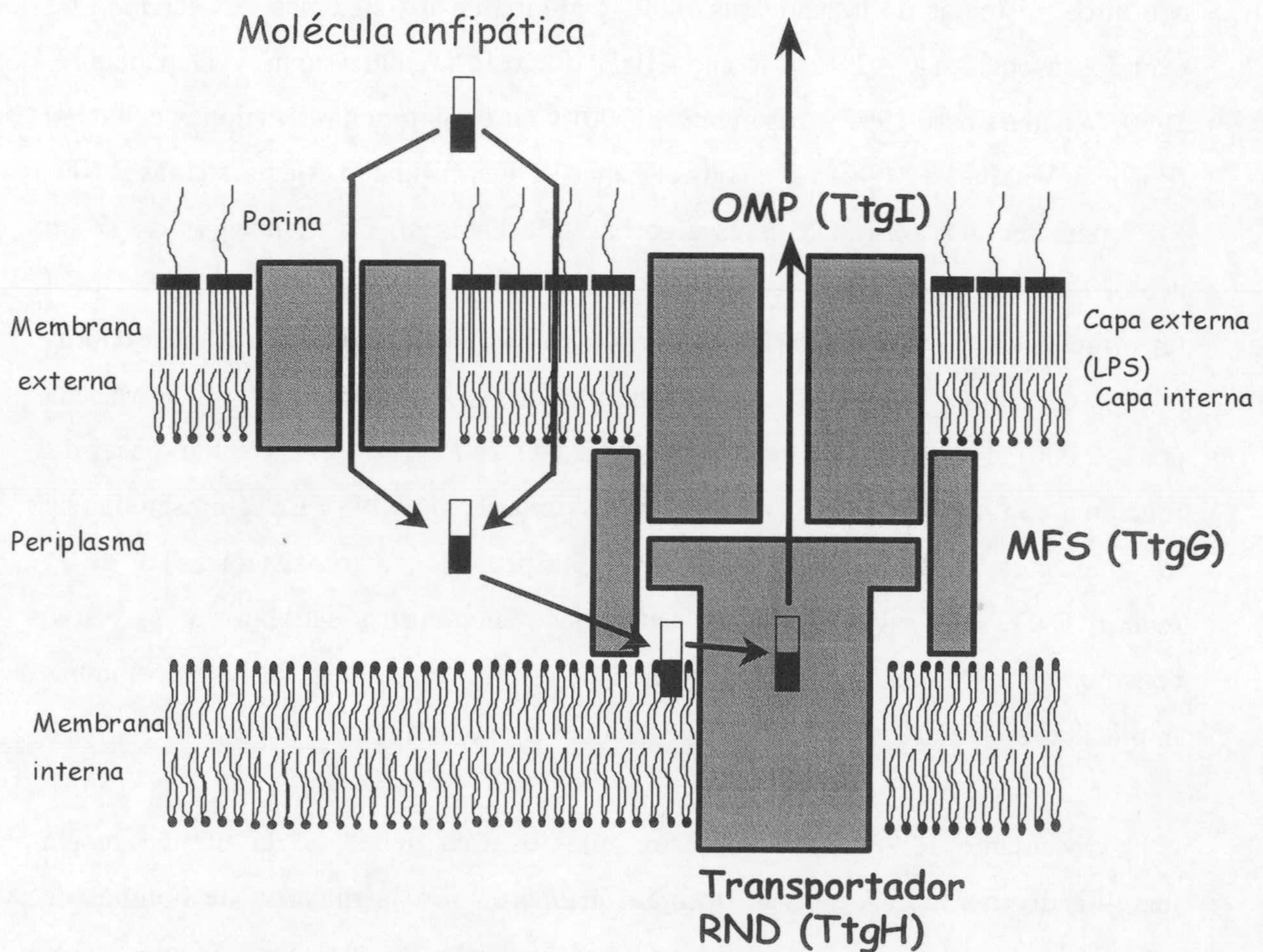


Figura I.14. Esquema de la localización y organización de la bomba TtgGHI. Se esquematiza la organización de los componentes de la bomba TtgGHI de *P. putida* DOT-T1E y el modelo de captura lateral de sustratos según la propuesta de Yu et al. (2003 [b]). OMP indica *outer membrane protein* (proteína de membrana externa) y MFS *membrane fusion protein* (proteína de fusión de membrana). La figura ha sido modificada a partir de la original de Yu et al. (2003 [b]).

Las proteínas de membrana externa como TtgI, TolC, OprM, etc. no parecen mantener una unión permanente con los otros miembros del sistema de expulsión. En contraste con los componentes RND y MFP de los cuales hay evidencias de que están asociados *in vivo* de manera estable en el caso de MexAB y AcrAB (Poole y Srikumar, 2001; Zgurskaya y Nikaido, 2000). Posiblemente, el componente de membrana externa es reclutado por los componentes RND-MFP sólo cuando un substrato está siendo transportado activamente (Thanabalu et al., 1998). Seguramente esto es así porque TolC no sólo participa en el transporte de antibióticos y disolventes asociado al sistema AcrAB, sino que también es reclutado por AcrEF (Aono et al., 1998; Fralick, 1996; Klein et al. 1991, Ma et al., 1994) y además trabaja con otros sistemas de translocasas. TolC participa en los sistemas de secreción de péptidos asociado a ATPasas como HylB o CvaB (Wandersman y Depapelaire, 1990; Wandersman, 1992; Gilson et al., 1990) y en otras muchas funciones celulares (Postle y Vakharia, 2000). De todas formas la flexibilidad de los sistemas RND-MFP para reclutar otras OMFs es algo bastante habitual. En *P. aeruginosa* se ha demostrado que OprM puede sustituir a OprJ en el sistema quimérico MexCD-OprM (el original sería MexCD-OprJ) y a OprN en el sistema quimérico MexEF-OprM (siendo el original MexEF-OprN) (Srikumar et al., 1997; Gotoh et al. 1998; Maseda et al., 2000). También los componentes MexCD de *P. aeruginosa* son capaces de funcionar con la proteína TolC de *E. coli* (Srikumar et al., 1998). La promiscuidad de los elementos de membrana externa no se ha probado en los sistemas Ttg de *P. putida* DOT-T1E, aunque en la actualidad en nuestro laboratorio se están construyendo bombas quiméricas combinando los tres elementos de las tres bombas implicadas en la tolerancia a tolueno (Segura et al., comunicación personal)

Mediante RT-PCR se demostró que los tres genes de la bomba recién identificada (*ttgG*, *ttgH* y *ttgI*) forman un operón. En la mayoría de bombas de antibióticos o disolventes descritas en otras bacterias los tres componentes de la bomba también están codificados por genes que forman un solo operón, como es el caso de MexAB-OprM o MexCD-OprJ de *P. aeruginosa* (Poole et al., 1993 [a y b]; Poole et al., 1996). No sucede lo mismo en el caso de AcrAB-TolC de *E. coli*. En este sistema, AcrA y AcrB sí se localizan de manera adyacente en el cromosoma de la célula y se transcriben como un único ARN mensajero, mientras que TolC está en

una región distinta del cromosoma (Wandersman 1992; Nikaido,1996), lo que también podría explicarse por las distintas funciones que realiza TolC en la célula.

Mediante ensayos de extensión del cebador se logró determinar los principales puntos de iniciación de la transcripción y se definieron las posibles cajas -10 y -35 de los promotores propuestos (Figura. I.11). Ante la presencia de dos bandas en este ensayo propusimos la existencia de dos promotores diferentes (Figura I.11.A), pero también podría ser que la banda más pequeña de cADN, desde la que definimos el promotor descrito como P_{G1}, sea producto de degradación de la banda mayor (la correspondiente a P_{G2}). Ensayos posteriores de transcripción *in vitro* llevados a cabo en este sentido en nuestro laboratorio sugieren que el inserto de menor tamaño podría resultar del corte del otro mRNA (Guazzaroni et al., mandado a publicar), aunque no se puede descartar que los distintos promotores puedan ser reconocidos por la ARN polimerasa con factores sigma diferentes, ya que en los ensayos *in vitro* el único factor sigma presente fue σ^{70} .

Para asegurar la implicación de la bomba TtgGHI en la tolerancia a tolueno en la cepa *P. putida* DOT-T1E se decidió construir un mutante en *ttgH*. La cepa mutante resultante, *P. putida* DOT-T1E-PS28, era hipersensible a tolueno (Figura I.10). Estos experimentos demostraron el papel primordial de esta bomba en la tolerancia tanto intrínseca como inducible a tolueno de *P. putida* DOT-T1E. Esta participación en la tolerancia constitutiva e inducible supone que los genes de la bomba deben estar expresados a un nivel significativo en condiciones normales de crecimiento en el laboratorio. Y además su expresión debe aumentar en respuesta a las condiciones de preinducción utilizadas en los experimentos de cinéticas de muerte. Como se puede ver en los Resultados, Figura I.11.A., el patrón de expresión se correspondería perfectamente con lo esperado: en los experimentos de extensión de cadena a partir de cebador se obtuvieron ciertos niveles basales de expresión de los genes de la bomba relativamente altos en ausencia de tolueno, que aumentaron unas 4 veces en respuesta a la presencia de tolueno en concentraciones subletales.

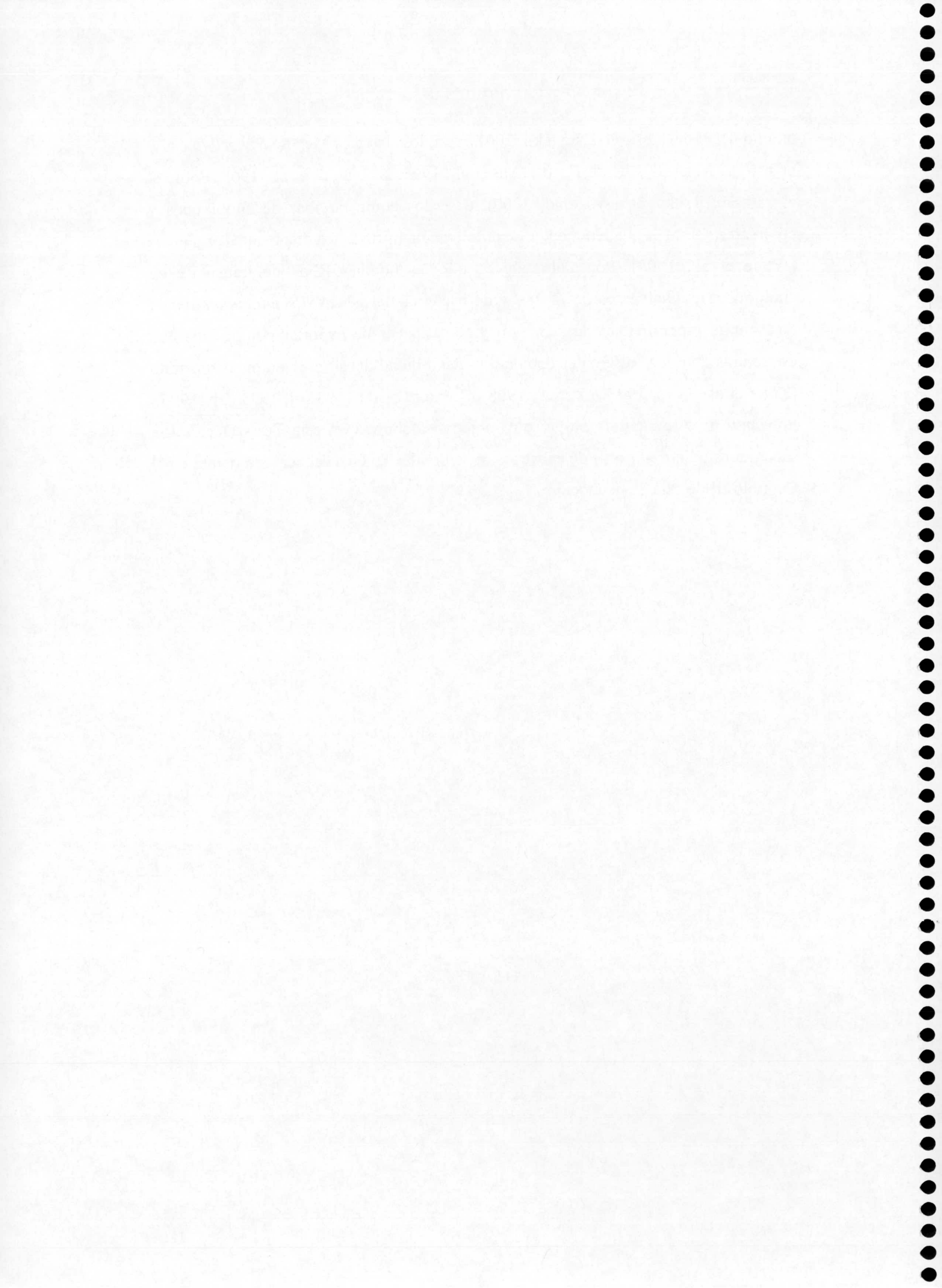
Probablemente no existan otros sistemas de eflujo importantes para la tolerancia a tolueno en esta cepa que no sean TtgABC, TtgDEF y TtgGHI, como lo

demuestra la hipersensibilidad a tolueno del triple mutante construido en esta Tesis Doctoral (*P. putida* DOT-T1E-PS34). Estas tres bombas de eflujo, con sus diferencias en los niveles de expresión y en las condiciones en las que son funcionales deberían de ser capaces de trabajar de forma coordinada para proporcionar la gran tolerancia a tolueno por la que se caracteriza la cepa *P. putida* DOT-T1E: así, las bombas TtgABC (Ramos et al., 1998) y TtgGHI se expresan de forma constitutiva en la cepa y por tanto la cepa está preparada para repeler el ataque por los disolventes en cualquier momento; la bomba TtgDEF (Mosqueda y Ramos, 2000) por el contrario, no parece expresarse en condiciones de laboratorio y necesita la presencia de tolueno en el medio de cultivo para aumentar su expresión; también la bomba TtgGHI aumentó su expresión en presencia de tolueno, ayudando a la tolerancia a largo plazo de la bacteria. Por tanto, cabe destacar una vez más que la bomba TtgGHI está presente en todas las condiciones en la célula, siendo el elemento más importante implicado en la tolerancia a tolueno descrito hasta ahora en *Pseudomonas putida* DOT-T1E.

Aunque de la regulación de las bombas se tratará en otro capítulo de la Tesis Doctoral, es importante mencionar que la expresión de los operones *ttgABC* y *ttgDEF* está controlada por reguladores transcripcionales que se transcriben divergentemente al operón de la bomba: en el caso de *ttgABC* el represor que regula su expresión es TtgR, que pertenece a la familia de TetR (Duque et al., 2001); mientras que el regulador de la expresión de TtgDEF podría ser TtgT (Terán et al., comunicación personal), de la familia IclR. Seguramente exista regulación global para todas las bombas de eflujo de un mismo organismo que organice el funcionamiento de los distintos sistemas con el fin de obtener un aprovechamiento óptimo de sus propiedades.

Análisis genómicos comparativos de sistemas de transportadores de membrana revelan que la especificidad de sustrato de los transportadores se correlaciona con el estilo de vida de los microorganismos (Paulsen et al., 2001). El mayor número de bombas de transporte de antibióticos y otros compuestos tóxicos se encuentra en bacterias del suelo, por lo que se presupone que los sistemas de bombas de expulsión se han originado como sistemas de secreción de metabolitos secundarios o como mecanismos de defensa frente a los antibióticos producidos por otros microorganismos. Además estos transportadores se caracterizan por tener un

amplio perfil de sustrato (Neyfakh, 2001). Así, los sistemas Mex de *P. aeruginosa* y el sistema AcrAB-TolC de *E. coli* (Ma et al., 1995; Nakamura et al., 1968; Poole et al., 1993b; Tsukagoshi y Aono, 2000), descritos como bombas de antibióticos y colorantes, también pueden mediar en la tolerancia intrínseca a disolventes orgánicos (White et al., 1997). Por tanto, parece que las bombas RND de transporte de antibióticos y disolventes de *E. coli* y de bacterias del género *Pseudomonas* tienen una amplia especificidad de sustrato y son capaces de exportar compuestos con estructuras químicas diferentes debido a la flexibilidad del sitio de unión al sustrato (Köler et al., 1996, 1997; Li et al., 1998 [b]; Poole et al., 1993 [a], 1993 [b] y 1996). Por tanto de este capítulo surgió otro objetivo a abordar en esta Tesis Doctoral, a saber, el estudio del perfil de sustrato de la bomba TtgGHI, el cual se tratará en el Capítulo III de esta Tesis Doctoral.



CAPÍTULO II

ANÁLISIS GENÓMICO COMPARATIVO DE LAS BOMBAS DE TRANSPORTE DE DISOLVENTES EN DISTINTAS CEPAS DE *Pseudomonas*, CON DISTINTOS GRADOS DE TOLERANCIA A DISOLVENTES

RESUMEN

Los disolventes orgánicos son tóxicos para los microorganismos, pero su toxicidad no sólo depende de la naturaleza del compuesto, sino también de la tolerancia intrínseca de las cepas y especies bacterianas. Varias cepas de *Pseudomonas putida* son capaces de crecer en medio líquido con una segunda fase de disolvente orgánico, como tolueno, estireno o *m*-xileno. En este capítulo se analiza la tolerancia al choque con 0,1% (vol/vol) y 0,3% (vol/vol) de tolueno de distintas cepas de *Pseudomonas* preinducidas o no con tolueno en fase gaseosa. A tendiendo a estos resultados, las cepas se pueden clasificar en tres categorías:

1.- Altamente resistentes, en las que independientemente de las condiciones de crecimiento, casi el 100% de las células del cultivo sobreviven al choque con 0,1% (vol/vol) de tolueno y entre el 50%- 100% de las células preinducidas con concentraciones subletales de tolueno sobreviven el choque con el 0,3% (vol/vol) de tolueno.

2.- Moderadamente resistentes, aquellas en las que sólo una fracción (10^{-4} – 1) de las células sobrevive al choque con 0,1% (vol/vol) de tolueno, pero menos de una en 10^7 células sobreviven al choque con 0,3% (vol/vol) de tolueno, independientemente de las condiciones de cultivo.

3.- Sensibles, aquellas en las que independientemente de las condiciones de cultivo, menos de 10^{-5} células sobreviven al choque con 0,1% (vol/vol) de tolueno.

También hemos estudiado el número y tipo de bombas de expulsión de disolventes en diferentes cepas de *Pseudomonas* en comparación con la cepa de referencia *P. putida* DOT-T1E. Los resultados indican que sólo las cepas pertenecientes a la especie *P. putida* poseen bombas altamente similares a las de *P. putida* DOT-T1E. Entre estas cepas, había una correlación positiva entre el número y el tipo bombas de eflujo y el grado de tolerancia a tolueno.

II.1. Estudio de la tolerancia a disolventes orgánicos en distintas cepas del género *Pseudomonas*

Los efectos tóxicos de los disolventes orgánicos no dependen sólo de la naturaleza del compuesto, sino también de la tolerancia intrínseca de las distintas especies y cepas. Así por ejemplo, ciertas cepas de *Escherichia coli* son tolerantes a ciclohexano ($\log P_{ow}$ 3,44), mientras que otras son sensibles (Aono et al., 1991; Ramos et al., 2002). La mayoría de los microorganismos son altamente sensibles a disolventes aromáticos con un $\log P_{ow}$ entre 2,0 y 3,3, pero existen varias especies de *Pseudomonas* que crecen en presencia de altas concentraciones de disolventes orgánicos tóxicos como tolueno, estireno, y *p*-xileno (Inoue y Korikoshi, 1989; Ramos et al., 1995). Dentro de la especie de *Pseudomonas putida* se han encontrado también diferencias en cuanto a tolerancia a tolueno y otros disolventes orgánicos dependiendo de la cepa: así se ha establecido que *P. putida* KT2440 es extremadamente sensible a tolueno, mientras que la cepa estudiada en esta Tesis Doctoral, *P. putida* DOT-T1E, es muy resistente.

Tras la identificación de la bomba TtgGHI y el estudio del triple mutante con las tres bombas inactivas, parecía claro que no había más bombas de eflujo en *P. putida* DOT-T1E implicadas significativamente en la tolerancia a disolventes orgánicos, y que la alta tolerancia mostrada por esta cepa ante disolventes orgánicos se debía precisamente a la presencia de las tres bombas de eflujo de la familia RND. Esto nos llevó a considerar la respuesta al choque de tolueno en distintas cepas del género *Pseudomonas* y ver si esta respuesta se relacionaba con el tipo y número de bombas presentes en cada cepa, tomando como referencia la cepa *P. putida* DOT-T1E. Para realizar el estudio de la supervivencia al choque de tolueno, se eligieron 19 cepas de *Pseudomonas* (Tabla II.1) de las cuales diez pertenecían a la especie *P. putida*, cuatro a *P. aeruginosa*, dos a *P. fluorescens*, y un único representante de *P. mendozina*, *P. stutzeri* y *P. syringae*. Las bacterias se cultivaron en LB en presencia o ausencia de tolueno en la fase gaseosa, y se estudió la supervivencia a un choque con 0,1% ó 0,3% (vol/vol) de tolueno a los diez minutos.

Aproximadamente el 100% de las células de *P. putida* DOT-T1E, *P. putida* MTB6 y *P. putida* S12 sobrevivieron al choque con 0,1% de tolueno (vol/vol),

independientemente de las condiciones de cultivo. Sin embargo había una gran diferencia en la supervivencia de estas cepas entre cultivos preinducidos y no preinducidos cuando la concentración de tolueno utilizada para el choque era del 0,3% (vol/vol). En este caso, sólo una fracción de las células (10^{-4} - 10^{-6}) sobrevivía cuando los cultivos no estaban preinducidos, siendo la fracción superviviente mucho mayor cuando los cultivos estaban preinducidos (aumentaba hasta 10^{-3} - 1). En las dos condiciones, el grado de supervivencia de *P. putida* S12 era siempre significativamente inferior que el de *P. putida* DOT-T1E o *P. putida* MTB6. Todas las demás cepas estudiadas presentaron un grado de supervivencia igual o inferior a 10^{-7} ante un choque de tolueno del 0,3% (vol/vol), independientemente de las condiciones de cultivo. Estos resultados permitían ya clasificar a *P. putida* DOT-T1E, *P. putida* S12 y *P. putida* MTB6 como cepas altamente resistentes a tolueno.

Para diferenciar el nivel de tolerancia entre aquellas cepas menos resistentes, se bajó la concentración de tolueno de los ensayos hasta el 0,1% (vol/vol). En cultivos sin preinducir, el grado de supervivencia de *P. putida* MTB5, *P. putida* SMO116, *P. putida* F1, *P. putida* 43, *P. putida* JLR11, *P. aeruginosa* PAO1162, *P. aeruginosa* PAO1162RK, y *P. fluorescens* PF11, fue mayor o igual a 10^{-4} , por lo que se catalogaron como cepas de tolerancia media. Dentro de este grupo se pueden distinguir a su vez dos subgrupos. El primero lo constituirían las cepas cuya supervivencia tras la preinducción con tolueno fue mayor que cuando no estaban preinducidas: *P. putida* MTB5, *P. putida* SMO116, y *P. putida* F1. El otro subgrupo lo constituyen cepas que sobreviven mejor al choque con 0,1% (vol/vol) de tolueno cuando no han sido preinducidas: *P. putida* 43, *P. putida* JLR11, *P. aeruginosa* PAO1162 y *P. aeruginosa* PAO1162RK, y *P. fluorescens* PF11.

Finalmente, hay otras cepas en las que menos de 10^{-5} células del cultivo sobrevivía al choque con tolueno. Se trata de *P. putida* KT2440, *P. putida* OUS82, *P. mendocina* KR1, *P. aeruginosa* SSS1, *P. aeruginosa* 7NSK2, *P. fluorescens* EEZ23, *P. stutzeri* y *P. syringae* pv. *syringae*. Estas cepas las clasificamos como cepas sensibles.

Tabla II.1. Grado de supervivencia de las diferentes cepas de *Pseudomonas* ante choques de tolueno. Las células se cultivaron en ausencia (NI) o en presencia (I) de tolueno. Cuando los cultivos alcanzaban una turbidez de 0.8-1, se dividieron en tres alícuotas, y a dos de ellas se les añadió 0,1% (vol/vol) y 0,3% (vol/vol) de tolueno. La tercera alícuota se usaba como control. El número de células viables se determinó 10 minutos después de la adición del disolvente. Los valores mostrados son la relación entre el número de células en el control y las que sobrevivían al choque del disolvente. Los datos representan la media de la menos 3 ensayos independientes con una desviación estándar por debajo del 5% de los valores dados.

Cepa	0,1% tolueno		0,3% tolueno		Tolerancia
	N.I.	I	N.I.	I	
<i>P. putida</i> DOT-T1E	1	1	10^{-4} - 10^{-5}	0,5-1	H
<i>P. putida</i> MTB6	1	1	10^{-4} - 10^{-5}	10^{-1}	H
<i>P. putida</i> S12	1	1	10^{-6}	10^{-2} - 10^{-3}	H
<i>P. putida</i> MTB5	10^{-4}	1	$<10^{-8}$	10^{-6}	M
<i>P. putida</i> SMO116	10^{-4} - 10^{-5}	10^{-1}	$<10^{-8}$	$<10^{-8}$	M
<i>P. putida</i> F1	10^{-4}	10^{-3}	$<10^{-8}$	10^{-7}	M
<i>P. putida</i> 43	10^{-3} - 10^{-4}	10^{-5} - 10^{-6}	$<10^{-8}$	$<10^{-8}$	M
<i>P. putida</i> JLR11	10^{-3} - 10^{-4}	10^{-4} - 10^{-5}	$<10^{-8}$	$<10^{-8}$	M
<i>P. putida</i> KT2440	10^{-5}	10^{-6}	$<10^{-8}$	$<10^{-8}$	S
<i>P. putida</i> OUS82	10^{-5}	10^{-5}	$<10^{-8}$	$<10^{-8}$	S
<i>P. mendocina</i> KR1	10^{-6}	10^{-8}	$<10^{-8}$	$<10^{-8}$	S
<i>P. aeruginosa</i> SSS1	10^{-7}	10^{-7}	$<10^{-8}$	$<10^{-8}$	S
<i>P. aeruginosa</i> 7NSK2	10^{-6}	10^{-7}	$<10^{-8}$	$<10^{-8}$	S
<i>P. aeruginosa</i> PAO1162	1	10^{-4}	$<10^{-8}$	$<10^{-8}$	M
<i>P. aeruginosa</i> 1162RK	1	10^{-2}	$<10^{-8}$	$<10^{-8}$	M
<i>P. fluorescens</i> PF11	1	10^{-1}	10^{-7}	10^{-7}	M
<i>P. fluorescens</i> EEZ23	10^{-6}	10^{-6}	$<10^{-8}$	$<10^{-8}$	S
<i>P. stutzeri</i>	10^{-6}	10^{-4}	$<10^{-8}$	$<10^{-8}$	S
<i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i>	10^{-5}	10^{-5}	$<10^{-8}$	$<10^{-8}$	S

II.2. Análisis genómico comparativo de las bombas de expulsión de disolventes en distintas cepas de *Pseudomonas*

Tras estudiar la tolerancia de las distintas cepas de *Pseudomonas* a tolueno, nos interesaba establecer una correlación entre el número y el tipo de bombas presentes en cada una de estas cepas y su grado de tolerancia. Para ello se analizó si bombas similares a TtgABC, TtgDEF y TtgGHI estaban presentes en cada una de estas cepas.

La presencia o no de bombas similares a las Ttg se abordó de dos formas: en la primera de ellas, se preparó ADN cromosómico de todas las cepas estudiadas en el apartado anterior, y tras digestión total con *Bam*HI, se separaron los fragmentos mediante electroforesis en un gel de agarosa y se transfirieron a membranas de nylon.

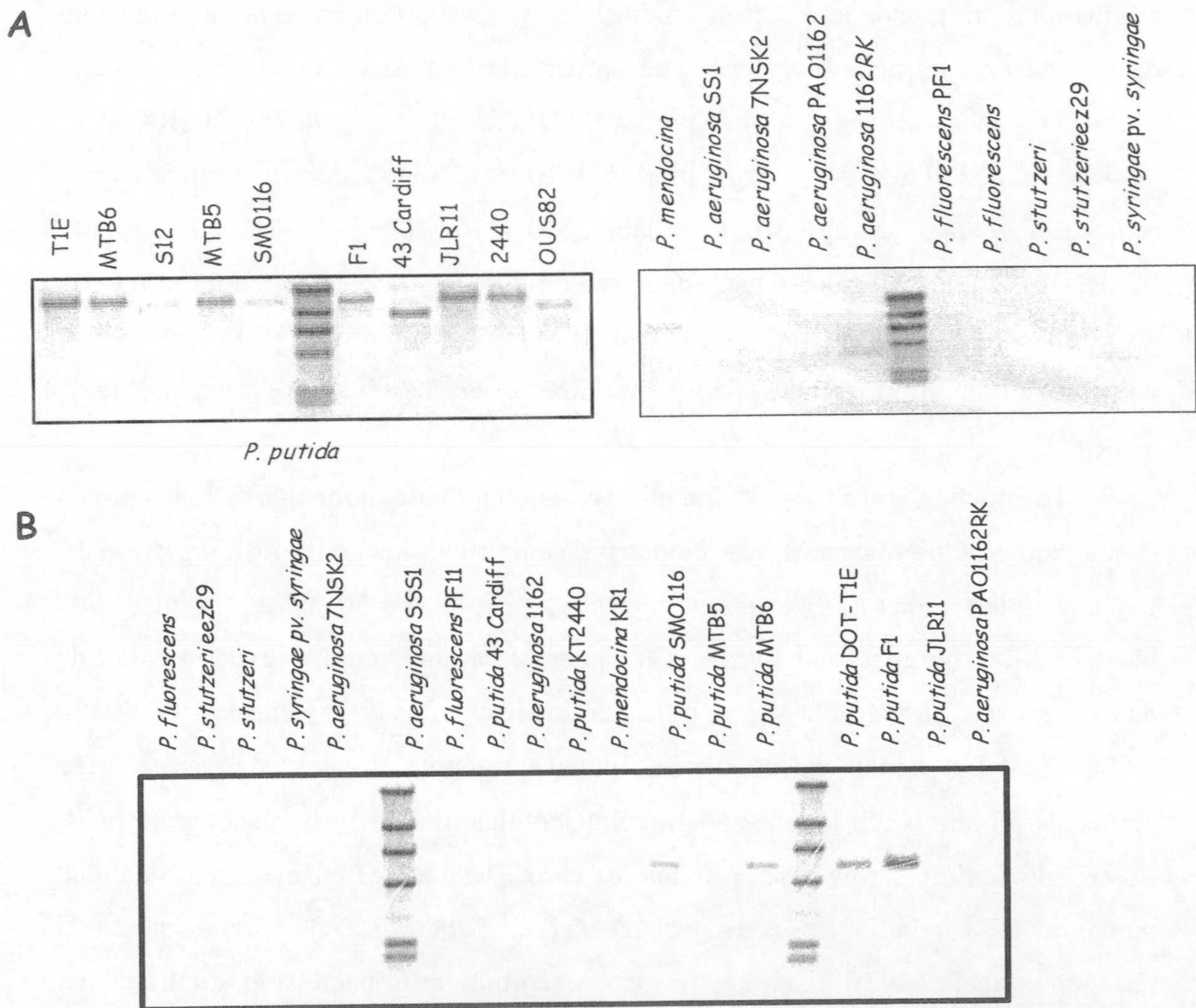


Figura II.1. Hibridaciones *southern* del ADN cromosómico de diferentes cepas de *Pseudomonas* sp. frente a una sonda del gen *ttgB* y *ttgE* de *P. putida* DOT-T1E. El ADN cromosómico de las distintas cepas fue digerido con *Bam*HI, fraccionado por tamaños en un gel de agarosa e hibridado bajo condiciones estrictas contra una sonda marcada con digoxigenina de *ttgB* o *ttgE* preparada por PCR. El revelado de la membrana se realizó según las recomendaciones de Roche. A. El panel de la izquierda corresponde a la hibridación de todas las cepas de *P. putida* con *ttgB* y el panel de la derecha a la hibridación de la sonda de *ttgB* con el resto de cepas estudiadas. B. Hibridación del ADN de las distintas cepas de *Pseudomonas* con la sonda de *ttgE*.

Estas membranas se hibridaron con las sondas de los genes *ttgB*, *ttgE* y *ttgH*, de *P. putida* DOT-T1E, descritas en Materiales y Métodos. Las hibridaciones se llevaron a cabo primero en condiciones estrictas (65 °C) para evitar la hibridación cruzada entre los genes de las distintas bombas presentes en cada cepa; y posteriormente en condiciones más permisivas para intentar identificar posibles bombas que no tuviesen una identidad tan alta. Como se puede ver en la Figura II.1.A, las preparaciones de ADN todas las cepas de *P. putida* incluidas en el estudio hibridaron con la sonda de *ttgB*, indicando que esta bomba está ampliamente distribuida en este género. Además, se apreciaban bandas de hibridación, aunque débiles, en *P. mendocina*, *P. aeuginosa* PAO1162, *P. aeruginosa* 1162RK y *P. fluorescens* PF1. La sonda de *ttgE* hibridó el ADN cromosómico de algunas de las cepas de *P. putida* de este estudio, a saber, SMO116, MTB5, MTB6 y F1 (Figura II.1.B). Por último, cuando se usó una sonda de *ttgH* tan sólo se encontraron bandas de hibridación con *P. putida* S12 y *P. putida* MTB6 (no se muestra). Los resultados obtenidos de las hibridaciones a 55 °C no diferían de los obtenidos a 65 °C (no se muestran).

La segunda aproximación fue utilizar los oligonucleótidos que se muestran en el apartado 10.4 de Materiales y Métodos para amplificar los genes *ttgB*, *ttgE* y *ttgH*, en las distintas cepas de *Pseudomonas putida*, a 60 °C ó a 50 °C, en un intento de identificar las bombas que pudieran no haber hibridado en los experimentos de *Southern Blot*. En la Tabla II.2 se muestran los resultados de los ensayos de PCR a 60 °C. Los fragmentos de amplificación se extrajeron del gel de agarosa y se secuenciaron utilizando los mismos oligonucleótidos usados en la reacción de PCR. Los resultados revelaron que en todos los casos, las bandas poseían una identidad mayor al 98% con la respectiva secuencia de *P. putida* DOT-T1E. Cuando la reacción se realizó a 50 °C en algunos casos se obtuvieron bandas de amplificación de diversos tamaños incluso en cepas distintas de las mostradas en la Tabla III.2. Pero su análisis por secuenciación demostró que las bandas amplificadas no se correspondían con bombas de eflujo.

Tabla II.2. Amplificación de genes homólogos de las bombas en diferentes cepas de *P. putida*. El símbolo “+” quiere decir que hubo amplificación por PCR; y “-“ ausencia de bandas de amplificación.

Cepas	Tolerancia	<i>ttgABC</i>	<i>ttgDEF</i>	<i>ttgGHI</i>
<i>P. putida</i> DOT-T1E	H	+	+	+
<i>P. putida</i> MTB6	H	+	+	+
<i>P. putida</i> S12	H	+	-	+
<i>P. putida</i> F1	M	+	+	-
<i>P. putida</i> MTB5	M	+	+	-
<i>P. putida</i> SMO116	M	+	+	-
<i>P. putida</i> 43	M	+	-	-
<i>P. putida</i> JLR11	M	+	-	-
<i>P. putida</i> 2440	S	+	-	-
<i>P. putida</i> OUS82	S	+	-	-

Tabla III.3. Identidad entre los genes *ttgB*, *ttgE* y *ttgH* de *P. putida* DOT-T1E y los genes correspondientes en otras cepas de *P. putida*. Los oligonucleótidos usados para la amplificación están recogidos en el apartado 10.4 de Materiales y Métodos. El tamaño de las bandas amplificadas era de alrededor de 400 pb. El grado de identidad se refiere a las regiones correspondientes. “n.a.” quiere decir no aplicable.

Cepa	<i>ttgB</i>	<i>ttgE</i>	<i>ttgH</i>
<i>P. putida</i> DOT-T1E	100%	100%	100%
<i>P. putida</i> MTB6	100%	99,7%	100%
<i>P. putida</i> S12	98%	n.a	99,8%
<i>P. putida</i> MTB5	99,5%	100%	n.a.
<i>P. putida</i> SMO116	98,5%	100%	n.a.
<i>P. putida</i> F1	99,5%	100%	n.a.
<i>P. putida</i> 43	90,7%	n.a.	n.a.
<i>P. putida</i> JLR11	98,5%	n.a.	n.a.
<i>P. putida</i> 2440	98,2%	n.a.	n.a.
<i>P. putida</i> OUS82	93,9%	n.a.	n.a.

Aunque en los análisis por hibridación de *Southern Blot* se detectaron bandas débiles cuando se usó la sonda *ttgB* con el ADN de *P. aeruginosa* PAO1162, *P. mendocina* KR1, *P. aeruginosa* PAO1162 RK y *P. fluorescens* PF1 (Figura III.1), no se obtuvieron bandas de amplificación por PCR, debido seguramente a que la

identidad de secuencia no es lo suficientemente alta como para obtener amplificación por PCR.

Según los resultados que se muestran en las Tablas II.1 y II.2 sólo tres de las cepas más resistentes a tolueno (*P. putida* DOT-T1E, *P. putida* MTB6 y *P. putida* S12) hibridaron con la sonda *ttgH*. *P. putida* MTB5, *P. putida* SMO116 y *P. putida* F1 dieron bandas de hibridación con las bombas *ttgABC* y *ttgDEF*. La presencia de estas dos bombas de eflujo también se correlaciona con sus niveles de resistencia, puesto que estas tres cepas fueron sólo moderadamente resistentes a los choques con tolueno y mostraron una mayor supervivencia cuando habían sido preinducidas con concentraciones subletales del disolvente (Tabla II.1).

Basándonos en sus niveles de supervivencia, clasificamos *P. putida* 43 y *P. putida* JLR11 como moderadamente resistentes a tolueno, pero sin una respuesta inducible a tolueno.

Discusión

Con este trabajo, realizado en colaboración con la Dra. Ana Segura, se ha puesto de manifiesto que la tolerancia intrínseca a tolueno de distintas especies y cepas de bacterias del género *Pseudomonas* es muy variable. Nuestro estudio indica que entre las especies utilizadas en el estudio, tan sólo algunas cepas de *Pseudomonas putida* son altamente tolerantes a tolueno. Precisamente estas tres cepas altamente tolerantes, *P. putida* DOT-T1E, *P. putida* MTB6 y *P. putida* S12 poseen bombas similares a la TtgGHI. Esto apoya las conclusiones obtenidas en el primer capítulo de esta Tesis Doctoral, respecto a que la bomba TtgGHI es la más relevante de las tres descritas hasta ahora en *P. putida* DOT-T1E en cuanto a tolerancia a tolueno. Como se demostró en el Capítulo I, un mutante de *P. putida* DOT-T1E en el que el *ttgH* estaba interrumpido fue incapaz de sobrevivir a un choque al 0,3% (vol/vol) de tolueno independientemente de las condiciones de cultivo. En el grupo del Dr. J. de Bont se ha identificado también una bomba prácticamente idéntica en cuanto a secuencia a la TtgGHI en *P. putida* S12 (denominada SrpABC) (Wery et al., 2001), y también se demostró que era el factor más importante en la tolerancia a tolueno (Wery et al., 2001) en esta cepa.

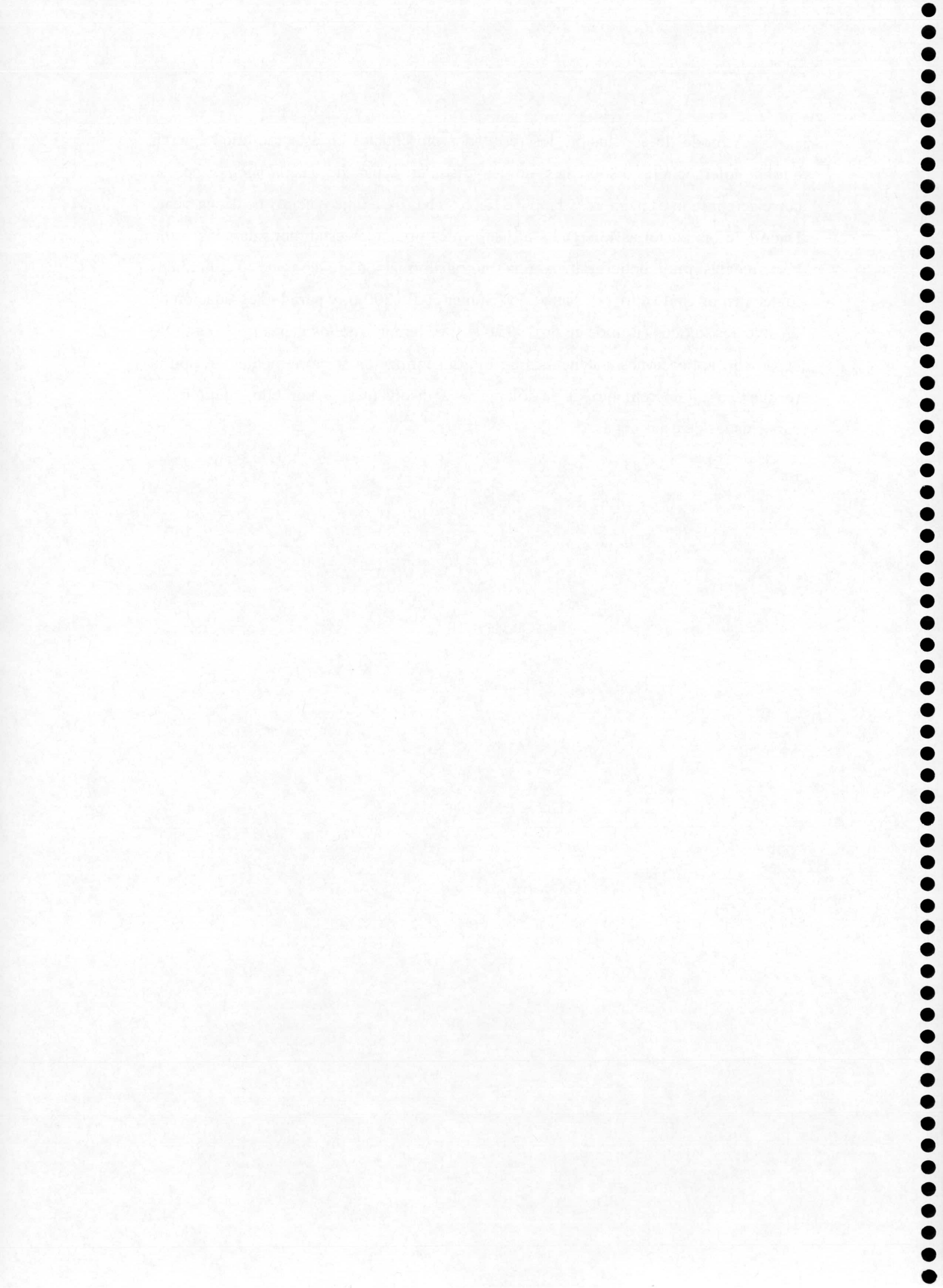
Dado que la bomba TtgGHI está presente en las tres únicas cepas capaces de sobrevivir el choque de un 0,3% (vol/vol) de tolueno, concluimos que la presencia de esta bomba es un factor clave en la alta resistencia a tolueno manifestada por estas cepas. Sin embargo existen diferencias en cuanto a tolerancia entre estas tres cepas: la supervivencia de *P. putida* S12 siempre fue menor que la de las otras dos cepas. Esto puede ser debido al diferente grado de expresión de las bombas en cada cepa, o por la presencia en *P. putida* DOT-T1E y *P. putida* MTB6 de la bomba TtgDEF, ausente en la S12. Por lo tanto, se puede hacer una matización y considerar *P. putida* DOT-T1E y *P. putida* MTB6 como altamente tolerantes, mientras que *P. putida* S12 podría considerarse con tolerancia media-alta.

Entre las cepas clasificadas como medianamente tolerantes se distinguieron dos subgrupos: el de aquellas en las que el efecto de la preinducción con dosis subletales de tolueno fue positivo en cuanto a mejora de la supervivencia al choque (*P. putida* MTB5, *P. putida* SMO116 y *P. putida* F1); y el de las que la supervivencia a un choque con tolueno al 0,1% (vol/vol) era menor si habían sido

pre-cultivadas con tolueno (*P. putida* 43, *P. putida* JLR11, *P. aeruginosa* PAO1162 y *P. aeruginosa* PAO1162RK, y *P. fluorescens* PF11), lo que se correlaciona también con el tipo de bombas presentes en su cromosoma. La supervivencia de las cepas del primer grupo sugiere que poseen algún mecanismo inducible por tolueno que las hace más tolerantes al choque. Por el contrario, la disminución de la supervivencia de las cepas del segundo grupo estaría reflejando los efectos negativos de la presencia de tolueno en el cultivo, a pesar de tratarse de concentraciones muy bajas, y la ausencia de mecanismos inducibles de tolerancia. Esto concuerda con los resultados de la hibridación con sondas de las bombas de *P. putida* DOT-T1E: *P. putida* MTB5, *P. putida* SMO116 y *P. putida* F1 mostraron bandas de hibridación con las bombas TtgABC y TtgDEF. La bomba *ttgDEF* se induce por tolueno, por lo que concuerda con los datos de supervivencia. Estas tres cepas degradan tolueno a través de la ruta de la tolueno dioxigenasa (ruta *tod*) (Huertas et al., 2000), y aunque la degradación de tolueno pueda rebajar la toxicidad del compuesto (Mosqueda et al., 1999), se ha demostrado que un mutante en los genes *tod* es tan tolerante como el silvestre a este disolvente.

P. putida 43 y *P. putida* JLR11 como ya hemos comentado se clasificaron como moderadamente tolerantes, pero sin una respuesta inducible a tolueno, y al igual que las cepas *P. putida* OUS82 y *P. putida* 2440, que son clasificadas como sensibles a tolueno, sólo poseen los genes *ttgABC*. Esta aparente discrepancia en cuanto a tipo de bomba y tolerancia de la cepa puede deberse a los diferentes niveles de expresión de esta bomba en las distintas cepas, o a diferencias en el grado de eficiencia en la expulsión de tolueno en cada cepa. Respecto a esto, hay que tener en cuenta que la secuencia de *ttgB* de *P. putida* OUS82 muestra sólo un 94 % de identidad con la de *P. putida* DOT-T1E; mientras que la identidad que muestra la secuencia de *ttgB* de *P. putida* JLR11 es de 98,5%. Por otro lado, como se ha tratado en la Introducción de esta Tesis Doctoral, existen otros mecanismos que influyen en la tolerancia a disolventes, como la isomerización *cis-trans* de los ácidos grasos insaturados en las membranas (Junker y Ramos, 1999; Junker et al., 2001; Cronan, 2002), la velocidad de la biosíntesis de lípidos (Pinkart y White, 1997) y la hidrofobicidad de la membrana (Aono y Kobayashi, 1997). Estos factores también pueden tener parte de responsabilidad en las diferencias observadas en cuanto a tolerancia a tolueno entre las cepas estudiadas en este capítulo.

A modo de conclusión, los resultados presentados en este capítulo sugieren que la tolerancia a disolventes de las distintas cepas de *Pseudomonas* sp. se correlaciona con el número y tipo de las bombas de flujo que posee dicha cepa. Dado que las bacterias tolerantes a disolventes orgánicos están consideradas como herramientas muy poderosas para la biotransformación de compuestos químicos tóxicos en otros de alto valor añadido (Bühler et al., 2002), y para la degradación de disolventes tóxicos (Ramos et al., 1995), la transferencia de los genes *ttg* a distintas cepas con aplicaciones potenciales en biotransformación y biorremediación podría resultar en un incremento de la tolerancia a disolventes, y por ello, mejorar las capacidades de estas cepas.



Capítulo III

IDENTIFICACIÓN DEL PERFIL DE SUBSTRATO DE LAS BOMBAS TtgABC, TtgDEF y TtgGHI, BASADO EN EL ESTUDIO DE LA TOLERANCIA A DISTINTOS COMPUESTOS TÓXICOS

RESUMEN

Estudios previos en nuestro laboratorio habían puesto de manifiesto que la bomba TtgABC era importante para la resistencia a antibióticos, pero que también era capaz de transportar tolueno (Ramos *et al.*, 1998); y que la bomba TtgDEF (Mosqueda y Ramos, 2000) se inducía por tolueno y estireno, pero no por antibióticos, y estaba implicada en la tolerancia inducible a tolueno, pero no a antibióticos. La bomba TtgGHI es fundamental para la tolerancia a tolueno, como se ha demostrado en el Capítulo I de esta Tesis Doctoral, pero se desconocía su implicación en la tolerancia a otros disolventes orgánicos y a diferentes antibióticos. Para analizar más a fondo el papel de cada bomba tanto en la tolerancia a disolventes orgánicos como a antibióticos se construyeron los dobles mutantes TtgABC/TtgGHI y TtgDEF/ TtgGHI. El uso de los mismos conjuntamente con los tres mutantes sencillos, el mutante *P. putida* DOT-T1E-82 (construido por el Dr. Mosqueda) y el triple mutante resultante del trabajo de esta Tesis Doctoral (Capítulo I, apartado 9) nos ha permitido establecer el perfil de substratos de cada bomba: las bombas TtgABC y TtgGHI transportan tolueno, estireno, *m*-xileno, etilbenceno, propilbenceno, y antibióticos (ampicilina, cloramfenicol, tetraciclina y ácido nalidíxico); mientras que la TtgDEF sólo bombea tolueno y estireno.

Existe un gran interés en determinar el papel natural de las bombas de eflujo: si su función primordial es la de conferir resistencia a antibióticos o disolventes o si esta capacidad es solamente un aprovechamiento oportunístico de los sistemas de transporte diseñados originariamente para otras funciones fisiológicas. En este sentido nuestros resultados de resistencia a antibióticos en biofilms indican que las bombas de eflujo no son esenciales para la resistencia a antibióticos, y sospechamos que pueden estar implicadas en funciones de transporte de moléculas de señalización importantes para la formación de biofilms.

III.1. Construcción de los mutantes dobles TtgABC⁻TtgGHI⁻ y TtgDEF⁻TtgGHI⁻

Para estudiar el posible efecto aditivo de las bombas en la tolerancia a tolueno decidimos abordar la construcción de los mutantes dobles de los que no se disponía en el laboratorio. La construcción de los mutantes se hizo de forma análoga a como se construyó el mutante sencillo *P. putida* DOT-T1E-PS28 y explicada anteriormente (Capítulo I, Figura I.9), pero usando como cepas receptoras del plásmido pGG2 (que contiene el gen *ttgH* interrumpido por un casete Ω Sm, ver Materiales y Métodos y el capítulo anterior) *P. putida* DOT-T1E-18 (*ttgB-phoA-Km*) (Ramos et al., 1998) y *P. putida* DOT-T1E-1 (*ttgD::KilAB*) (Mosqueda y Ramos, 2000) para la construcción de los dobles mutantes *P. putida* DOT-T1E-PS32, y *P. putida* DOT-T1E-PS30 respectivamente. En la Figura III.1 se muestran las hibridaciones con una sonda de TtgH para comprobar la introducción de la mutación en cada una de las cepas utilizadas.

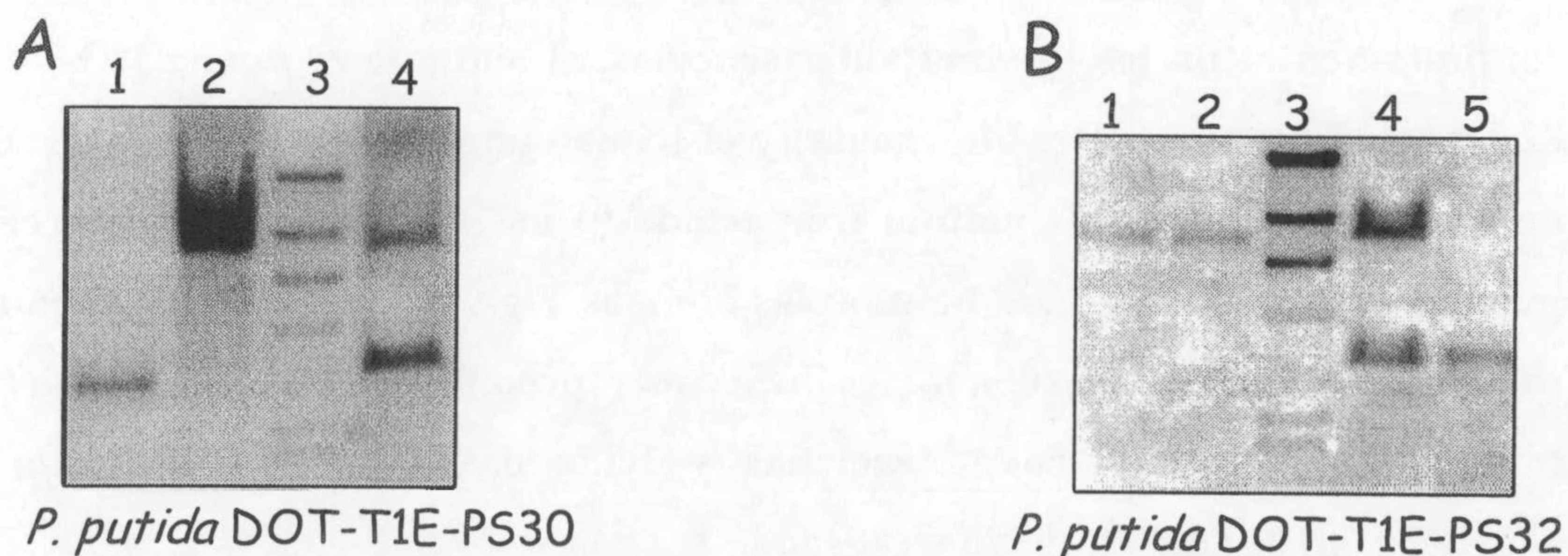


Figura III.1. Análisis mediante hibridación de la región de ADN donde se encuentra el gen *ttgH*. El ADN de las cepas parentales y de los candidatos a resueltos y cointegrados se digirió con *Bam*HI y se separó mediante electroforesis en gel de agarosa. Posteriormente se transfirió el ADN a membranas de *nylon*. Como sonda de ADN se utilizó un fragmento de 873 pb del gen *ttgH*. En el margen derecho de la figura se indican los tamaños de los fragmentos obtenidos. El patrón de bandas como resultado de la hibridación se explica en la Figura I.9.B del Capítulo I. **A.** En este caso la cepa parental es *P. putida* DOT-T1E-1, cuyo ADN se separó electroforéticamente en la calle 2. En la calle 4 se observan dos bandas correspondientes a la hibridación de la sonda con el ADN de un merodiploide. La resolución del cointegrado generó un resuelto que presentaba sólo una banda (calle 1). A esta cepa mutante la llamamos *P. putida* DOT-T1E-PS30. En la calle 3 se separó electroforéticamente un patrón de peso molecular marcado con digoxigenina (marcador II-dig de Roche), del que se detectaron 6 fragmentos de 23.1, 9.4, 6.6, 4.4, 2.3, y 2.0 Kpb, de arriba a abajo. **B.** La cepa parental en este caso fue *P. putida* DOT-T1E-18. Las calles 1 y 2 muestran la hibridación de la sonda con el ADN de la cepa parental y la calle 4 con el del cointegrado. El ADN digerido y separado electroforéticamente de un clon resuelto se muestra en la calle 5. Este clon se llamó *P. putida* DOT-T1E-PS32. El patrón de peso molecular (calle 3) es el mismo que en la hibridación anterior.

Con estos dos mutantes completábamos la colección en la que disponíamos de los tres mutantes sencillos, los tres dobles y el mutante triple. En la Tabla III.1 se recogen las características de cada una de estas cepas.

Tabla III.1. Colección de mutantes en las bombas de *P. putida* DOT-T1E.

	mutación	cepa parental	referencia
DOT-T1E-1	<i>ttgD::kil'telAB</i>	<i>P. putida</i> DOT-T1E	Mosqueda y Ramos, 2000
DOT-T1E-18	<i>ttgB::phoA-Km</i>	<i>P. putida</i> DOT-T1E	Ramos et al., 1998
DOT-T1E-82	<i>ttgB::phoA-Km;</i> <i>ttgD::kilAB</i>	<i>P. putida</i> DOT-T1E-18	Mosqueda y Ramos, 2000
DOT-T1E-PS28	<i>ttgH::ΩSm</i>	<i>P. putida</i> DOT-T1E	Capítulo I
DOT-T1E-PS34	<i>ttgB::phoA-Km;</i> <i>ttgD::kilAB;</i> <i>ttgH:: ΩSm</i>	<i>P. putida</i> DOT-T1E-82	Capítulo I
DOT-T1E-PS30	<i>ttgD::kil'telAB;</i> <i>ttgH::ΩSm</i>	<i>P. putida</i> DOT-T1E-1	Este capítulo
DOT-T1E-PS32	<i>ttgB::phoA-Km;</i> <i>ttgH:: ΩSm</i>	<i>P. putida</i> DOT-T1E-18	Este capítulo

El mutante *Pseudomonas putida* DOT-T1E PS28 fue muy sensible al choque con tolueno, y como era de esperar, también los dobles mutantes en la bomba TtgGHI (Tabla III.2) fueron extremadamente sensibles a tolueno, y de hecho, la supervivencia de estos dobles mutantes al choque con tolueno está por debajo del límite de detección de nuestro ensayo. Por ello consideramos utilizar disolventes orgánicos menos tóxicos para estudiar en mayor detalle el papel de cada una de las bombas.

III.2. Contribución de las bombas de eflujo a la eliminación de otros disolventes

Pseudomonas putida DOT-T1E no sólo es capaz de tolerar altas concentraciones de tolueno, sino que también es capaz de crecer en presencia de un gran número de disolventes orgánicos con un log P_{ow} comprendido entre 3,6 y 2,9, como son propilbenceno, *m*-xileno, etilbenceno y estireno. En general, las bombas de la familia RND, a la cual pertenecen las tres bombas implicadas en tolerancia a tolueno en nuestra cepa, tienen un amplio espectro de substrato, y aunque trabajos anteriores de nuestro laboratorio con la bomba TtgABC ya indicaban que esta bomba

podía transportar tanto tolueno como algunos antibióticos (Ramos et al., 1998) , no se había abordado el estudio de la tolerancia a otros disolventes. Los disolventes orgánicos que se utilizan en este estudio se muestran en la Figura III.2; son todos aromáticos, de polaridad parecida, aunque con distintos grados de toxicidad.

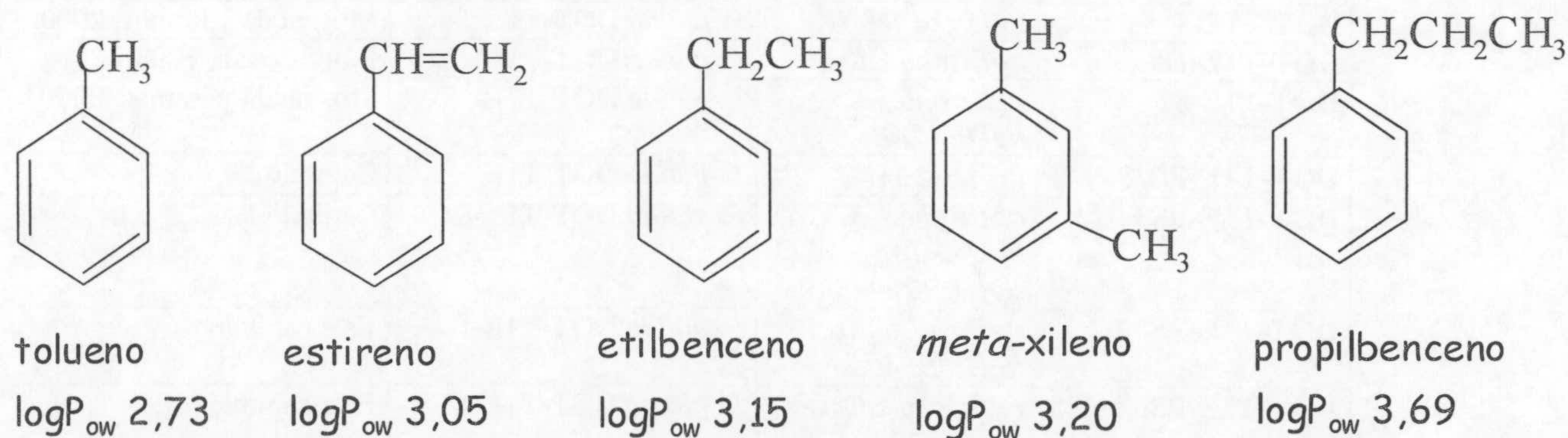


Figura III.2. Estructura de los disolventes probados como posibles sustratos de las bombas RND de *P. putida* DOT-T1E. Éstos son los disolventes que se han utilizado en los ensayos supervivencia a choques con disolventes orgánicos. Todos poseen una estructura aromática similar, pero varía su polaridad y su logP_{ow} en función de su radical alifático.

La disponibilidad de mutantes sencillos, dobles y triples de las bombas nos permitió evaluar la implicación de cada una de las bombas en la expulsión de disolventes orgánicos distintos de tolueno. Las células de la cepa silvestre y de los mutantes se cultivaron como se ha descrito anteriormente, con (inducidas) y sin (no inducidas) tolueno en la fase gaseosa hasta llegar a una D.O. _{660 nm} de 0,8 y se les añadió 0,3 % (vol/vol) de cada uno de los disolventes elegidos. Se determinó la supervivencia de los cultivos 10 minutos después del choque con el disolvente (Tabla III.2). Dado que el triple mutante *P. putida* DOT-T1E-PS34 no crecía cuando se exponía a tolueno en fase gaseosa, los ensayos sólo se pudieron realizar utilizando células de cultivos no inducidos.

TABLA III. 2. Supervivencia de *P. putida* DOT-T1E y sus mutantes derivados a los choques con disolventes. La supervivencia se refiere a la fracción de células viables 10 minutos después de la adición del 0.3% (vol/vol) de disolvente a los cultivos en medio LB (no inducidos) o en medio LB con tolueno administrado vía fase gaseosa. n.i.= no inducidos; i= inducidos; n.v.= no es viable realizar el ensayo.

Cepa	Bomba Ttg no funcional	Tolueno (logP _{ow} 2,73)		Estireno (logP _{ow} 3,05)		Etilbenceno (logP _{ow} 3,15)	
		n.i.	i.	n.i.	i.	n.i.	i.
		DOT-T1E	-	10 ⁻⁴ -10 ⁻⁵	0.5-1	10 ⁻²	1
DOT-T1E-18	ABC	<10 ⁻⁸	10 ⁻⁴ -10 ⁻⁵	10 ⁻⁷	10 ⁻²	10 ⁻²	10 ⁻²
DOT-T1E-1	DEF	10 ⁻⁴ -10 ⁻⁵	10 ⁻² -10 ⁻³	10 ⁻²	10 ⁻²	10 ⁻²	10 ⁻²
DOT-T1E-PS28	GHI	<10 ⁻⁸	<10 ⁻⁸	10 ⁻⁷	10 ⁻⁶	10 ⁻²	10 ⁻²
DOT-T1E-82	ABC, DEF	<10 ⁻⁸	10 ⁻⁴	10 ⁻⁷	10 ⁻⁵	10 ⁻²	10 ⁻²
DOT-T1E-PS30	DEF, GHI	<10 ⁻⁸	<10 ⁻⁸	<10 ⁻⁸	10 ⁻⁷	10 ⁻²	10 ⁻²
DOT-T1E-PS32	ABC, GHI	<10 ⁻⁸	<10 ⁻⁸	<10 ⁻⁸	<10 ⁻⁸	10 ⁻⁴ -10 ⁻⁵	10 ⁻⁴
DOT-T1E-PS34	ABC, DEF, GHI	<10 ⁻⁸	n.v.	<10 ⁻⁸	n.v.	10 ⁻⁵	n.v.

Cepa	Bomba Ttg no funcional	<i>m</i> -xileno (logP _{ow} 3,20)		Propilbenceno (logP _{ow} 3,69)	
		n.i.	i.	n.i.	i.
		DOT-T1E	-	1	1
DOT-T1E-18	ABC	10 ⁻³	1	1	1
DOT-T1E-1	DEF	1	1	1	1
DOT-T1E-PS28	GHI	1	1	1	1
DOT-T1E-82	ABC, DEF	10 ⁻³	1	1	1
DOT-T1E-PS30	DEF, GHI	1	1	1	1
DOT-T1E-PS32	ABC, GHI	10 ⁻⁴ -10 ⁻⁵	10 ⁻⁴	10 ⁻⁴	10 ⁻³
DOT-T1E-PS34	ABC, DEF, GHI	10 ⁻⁵	n.v.	10 ⁻⁴ -10 ⁻⁵	n.v.

Las células no inducidas de los mutantes sencillos que carecían de las bombas TtgABC (*P. putida* DOT-T1E-18) o TtgGHI (*P. putida* DOT-T1E-PS28) fueron hipersensibles a estireno ($\log P_{ow}$ 3,05), y tal y como esperábamos, esta sensibilidad fue mayor en un doble mutante *ttgABC-ttgGHI* (*P. putida* DOT-T1E-PS32) confirmando el carácter aditivo de la acción de estas bombas. Estos resultados indicaban que estas dos bombas estaban implicadas en el transporte de estireno. El mutante en *ttgDEF* era más sensible que la cepa silvestre a estireno en condiciones de inducción, lo que sugiere que esta bomba también participa en el transporte de estireno. Los cultivos inducidos por tolueno del mutante sencillo en *ttgABC* eran más tolerantes al choque con estireno que los no inducidos, mientras que en ausencia de la bomba TtgGHI (mutante *P. putida* DOT-T1E-PS28) este efecto de inducción fue menor, lo que confirmaba que el operón *ttgGHI* era inducible por tolueno. Los dobles mutantes *ttgDEF-ttgABC* y *ttgDEF-ttgGHI* fueron más susceptibles al choque con estireno que los mutantes sencillos, lo que confirmaba el papel de TtgDEF en el transporte de estireno. Además, en el mutante doble de las bombas TtgABC-TtgDEF se observó una disminución significativa de la supervivencia cuando el cultivo había sido inducido. Estos datos concuerdan con el hecho de que esta bomba (la TtgDEF) es inducible por tolueno y estireno (Mosqueda y Ramos, 2000).

El *m*-xileno ($\log P_{ow}$ 3,20) parece no afectar significativamente a la viabilidad de los cultivos de los mutantes sencillos, tan sólo el mutante sencillo *P. putida* DOT-T1E-18 vio comprometida su supervivencia por la exposición a este hidrocarburo, lo que sugiere que la bomba TtgABC estaba implicada en la expulsión de *m*-xileno. La sensibilidad al choque con *m*-xileno es mayor en el doble mutante *ttgABC-ttgGHI* que en los correspondientes mutantes sencillos, indicando que la bomba TtgGHI también contribuye al transporte de *m*-xileno. Dado que el perfil de tolerancia a *m*-xileno era idéntico al de la cepa silvestre en el mutante sencillo *P. putida* DOT-T1E-1; que la tolerancia de los mutantes sencillos en las bombas TtgABC y TtgGHI era igual a la de los dobles mutantes en TtgABC-TtgDEF y TtgDEF-TtgGHI respectivamente, y que la tolerancia en células inducidas de los mutantes sencillos y dobles era casi idéntica a la de las células no inducidas, concluimos que la bomba TtgDEF no contribuía significativamente a la expulsión de este compuesto.

Células inducidas y no inducidas de dos de los dobles mutantes, *P. putida* DOT-T1E-82 (que carece de las bombas TtgABC y TtgDEF) y *P. putida* DOT-T1E-PS30 (que carece de TtgDEF y TtgGHI) fueron tan tolerantes como el silvestre a los choques con propilbenceno ($\log P_{ow}$ 3,69) y etilbenceno ($\log P_{ow}$ 3,15). Sin embargo, el doble mutante *P. putida* DOT-T1E-PS32 (al que le faltan las bombas TtgABC y TtgGHI) mostró una menor tolerancia frente a estos dos compuestos que los correspondientes mutantes sencillos. Esto sugiere la participación de las bombas TtgABC y TtgGHI en la expulsión de etilbenceno y propilbenceno, mientras que por los mismos motivos indicados para el transporte de *m*-xileno, no se puede atribuir ninguna participación significativa de la bomba TtgDEF en el transporte de estos hidrocarburos aromáticos.

III.3. Contribución de las bombas de transporte de disolventes a la expulsión de antibióticos

Como se ha indicado antes, en nuestro grupo se había demostrado que la bomba TtgABC, además de disolventes orgánicos, es capaz de expulsar ampicilina, cloramfenicol y tetraciclina (Ramos *et al.*, 1998), mientras que la bomba TtgDEF es específica para disolventes orgánicos y no transporta ninguno de estos antibióticos (Mosqueda y Ramos, 2000). De la bomba TtgGHI sólo sabíamos que transportaba tolueno y disolventes orgánicos, pero desconocíamos si era capaz de transportar antibióticos. Para estudiar la expulsión de antibióticos determinamos la concentración mínima inhibitoria (MIC) de algunos antibióticos en el crecimiento de *P. putida* DOT-T1E-PS28 (al que le falta la bomba TtgGHI), DOT-T1E-18 (que carece de la TtgABC), del doble mutante DOT-T1E-PS32 (con las bombas TtgABC y TtgGHI no funcionales) y del triple mutante DOT-T1E-PS34. A este estudio se añadió un inhibidor de la síntesis de ácidos grasos (cerulenina), el cual se sabía que era expulsado por las bombas MexAB-OprM y MexCD-OprJ de *P. aeruginosa* (Schweizer *et al.*, 1998). La estructura de los compuestos que se han ensayado en los MICs se muestran en la Figura III.3.

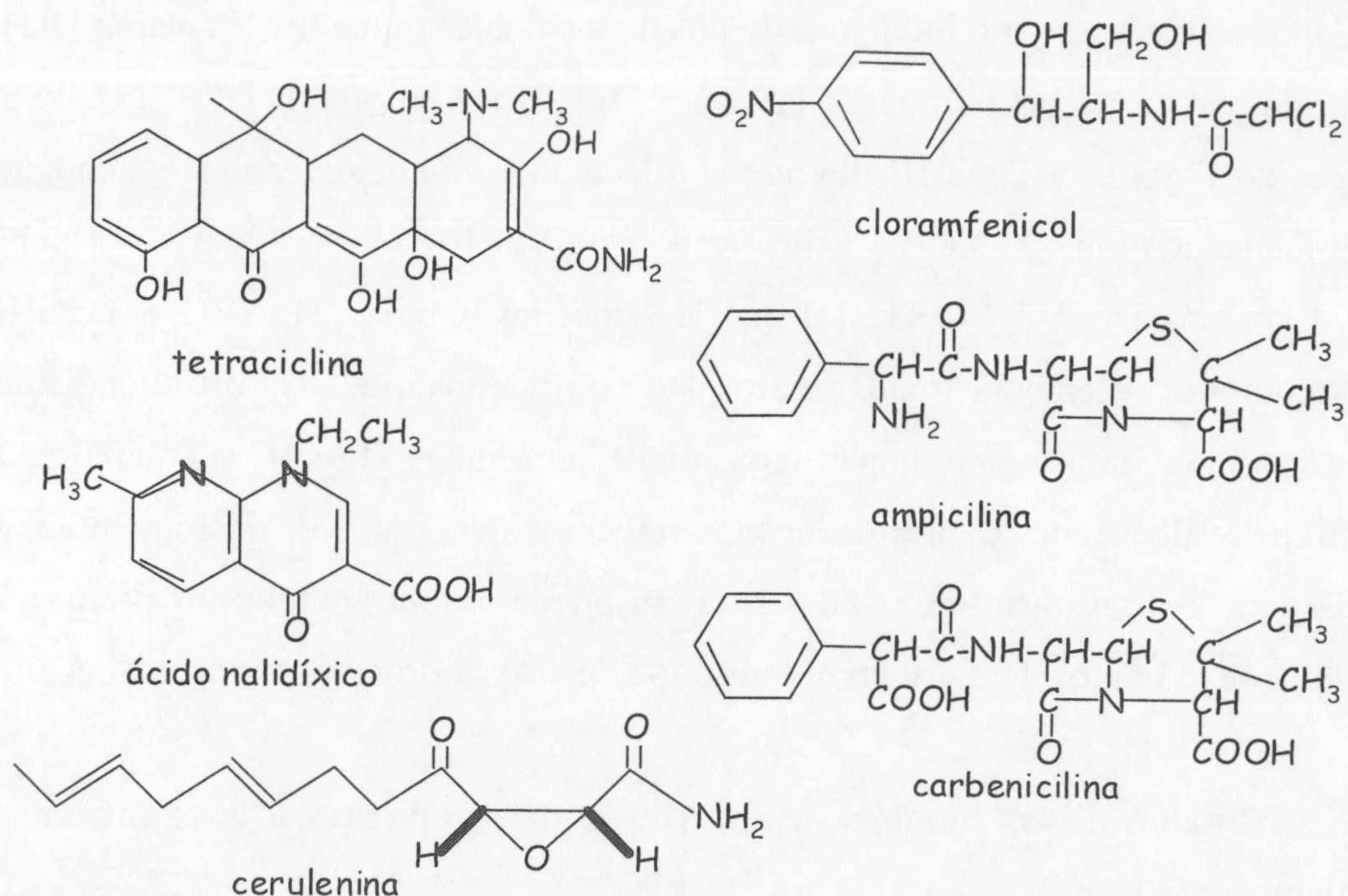


Figura III.3. Estructura de los antibióticos probados como posibles sustratos de las bombas RND de *P. putida* DOT-T1E. Estos antibióticos pertenecen a familias diferentes por su estructura y su modo de acción, aunque todos comparten una característica común, son moléculas anfipáticas.

Tabla III.3. MICs para *P. putida* DOT-T1E y sus mutantes. Las cifras indican la concentración ($\mu\text{g/ml}$) de antibiótico que inhibe el crecimiento bacteriano. Cab, Nal, Cm, Tet, Amp y Cer indican carbenicilina, ácido nalidíxico, cloramfenicol, tetraciclina, ampicilina y cerulenina, respectivamente. n.d., no determinado.

	Cab	Nal	Cm	Tet	Amp	Cer
DOT-T1E	64	64	32	4	256	450
DOT-T1E-18	8	16	8	0,25	16	56
DOT-T1E-PS28	64	64	32	4	256	450
DOT-T1E-PS32	2	16	8	0,05	2	n.d.
DOT-T1E-PS34	2	16	8	0,05	2	n.d.

La resistencia de *P. putida* DOT-T1E-18 a los antibióticos (ampicilina, cloramfenicol y tetraciclina) ensayados por Ramos et al. (1998) y a los dos nuevos incorporados al estudio (ácido nalidíxico y carbenicilina) era menor que la del silvestre, así como la resistencia a cerulenina. El mutante *P. putida* DOT-T1E-PS28 (TtgGHI⁻) tenía el mismo perfil que el silvestre (Tabla III.3) para todos los compuestos probados. Sin embargo, el doble mutante TtgABC/TtgGHI, *P. putida* DOT-T1E-PS32, fue más susceptible a carbenicilina y a ampicilina que su cepa parental (*P. putida* DOT-T1E-18), lo que indica que la bomba TtgGHI identificada en esta Tesis Doctoral también

participaba en la expulsión de antibióticos; aunque esta participación quedaba enmascarada cuando la bomba TtgABC funciona correctamente en la célula. El triple mutante presenta el mismo perfil de resistencia a antibióticos que el mutante DOT-T1E-PS32, lo que confirmaba que la bomba TtgDEF no participa en la expulsión de antibióticos.

III.4. Expresión del operón *ttgGHI* ante diferentes compuestos

Dado que habíamos demostrado la participación de la bomba TtgGHI en la extrusión de gran variedad de compuestos, nos planteamos realizar un análisis más completo de la expresión de este operón en respuesta no sólo a tolueno, sino también a otros disolventes orgánicos. Para ello clonamos un fragmento de ADN de 210 pb situado corriente arriba del gen *ttgG* y lo fusionamos al gen de la β -galactosidasa en el vector carente de promotor pMP220 (Spaink et al., 1987), según se detalló en Materiales y Métodos. El plásmido resultante (pANA96, ver Tabla M.2 de Materiales y Métodos) se introdujo en *P. putida* DOT-T1E por electroporación y esta cepa se utilizó para medir la expresión del operón *ttgGHI* a concentraciones subletales de distintos disolventes orgánicos. Los resultados de la expresión de la bomba *ttgGHI* en los ensayos de β -galactosidasa (Figura III.4) coinciden con los obtenidos mediante el análisis de extensión de cadena a partir de cebador con tolueno (Figura I.11.A): en presencia del disolvente orgánico, se producía un aumento en los niveles de actividad β -galactosidasa de 4 veces. Además comprobamos que la expresión de los genes *ttgGHI* aumentaba unas 2 veces en presencia de otros disolventes de estructura y características parecidas a las del tolueno como benceno, ($\log P_{ow}$ 2,13), estireno ($\log P_{ow}$ 3,05), *p*-xileno ($\log P_{ow}$ 3,15), y propilbenceno ($\log P_{ow}$ 3,69). Algunos de estos compuestos se había visto que eran transportados por la bomba TtgGHI, como estireno y propilbenceno (ver apartado anterior).

Estudios previos realizados en el laboratorio con la bomba TtgABC (que transporta tanto disolventes orgánicos como antibióticos) indicaron que ésta era inducida por distintos antibióticos, aunque no por disolventes orgánicos (Duque et al., 2001). Dado que la bomba TtgGHI también participa en la expulsión de antibióticos decidimos usar la fusión a *lacZ* para estudiar la expresión de la bomba en respuesta a

varios antibióticos. A diferencia de lo descrito para los genes *ttgABC*, no se encontró un aumento de la expresión del operón *ttgGHI* en presencia de cloramfenicol y ampicilina respecto al control (Figura III.4).

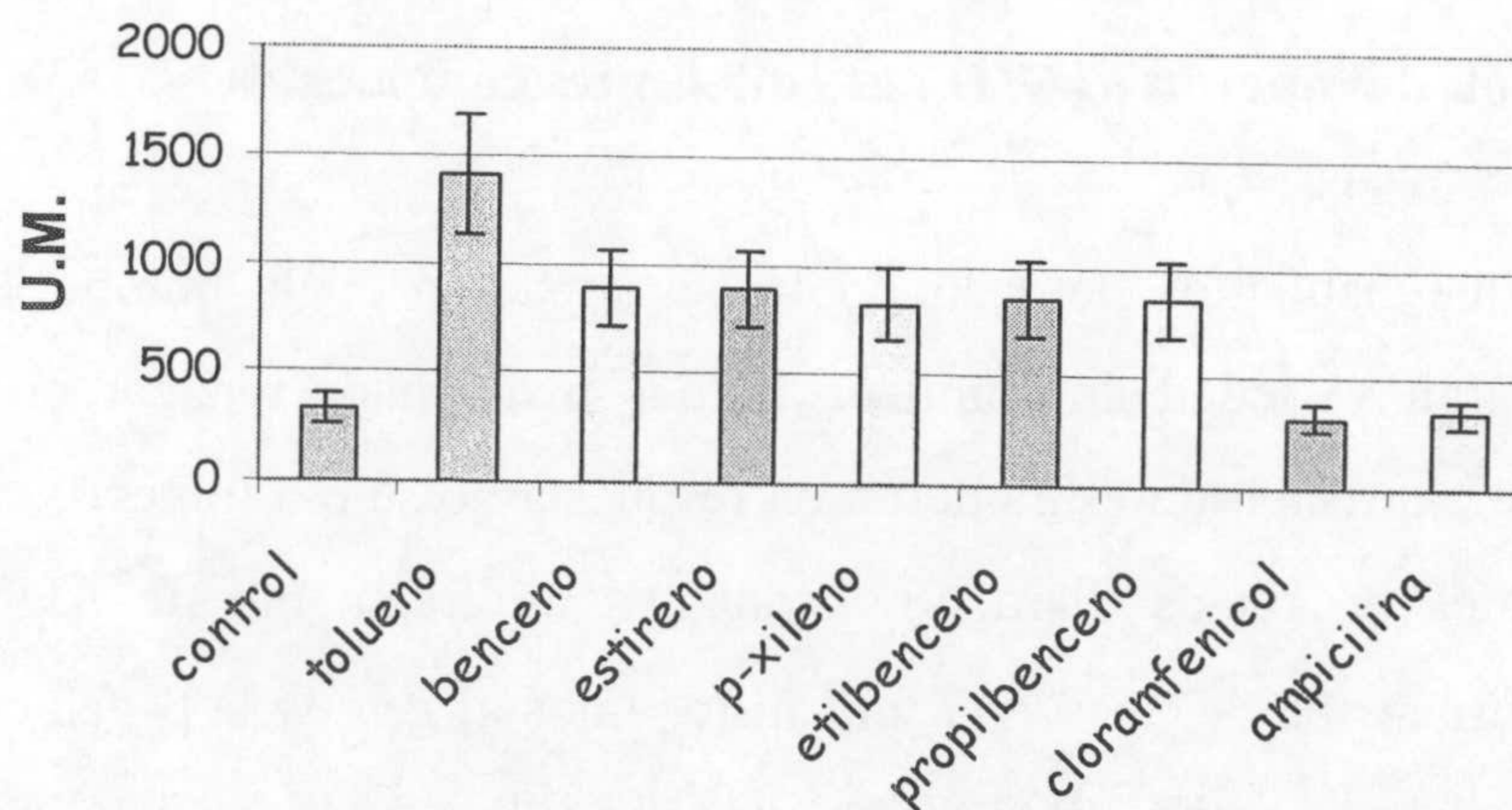


Figura III.4. Expresión de la bomba *ttgGHI* en diferentes condiciones de crecimiento. Se ha medido la expresión de los promotores de *ttgGHI* fusionándolo al gen de la β -galactosidasa en el vector pMP220 según se describió en Materiales y Métodos. Las medidas se realizaron en cultivos en fase exponencial tardía. La actividad β -galactosidasa se expresa en unidades Miller y fueron el resultado de al menos 3 medidas independientes en otros tantos experimentos independientes. La desviación estándar fue menor del 20% en todos los casos. Se indujeron los cultivos con 3 mM de cada disolvente, excepto en el caso de estireno, que se usó 1,5 mM. En cuanto a los antibióticos, se utilizaron concentraciones subletales, 15 μ g/ml en el caso del cloramfenicol, y 50 μ g/ml en el de ampicilina.

III.5. Papel de las bombas Ttg en la resistencia a antibióticos en biofilms.

La forma predominante de vida de los microorganismos en la naturaleza es la de asociación a superficies en comunidades formando biofilms (Watnick y Kolter, 2000; Davey y O'Toole, 2000). Uno de los rasgos característicos de estos biofilms es su alta resistencia a antibióticos, lo que constituye un grave problema en el caso de infecciones por *Pseudomonas aeruginosa* y otros patógenos. Puesto que se ha demostrado la implicación de las bombas de eflujo de la familia RND en la resistencia a antibióticos en células planctónicas en diversos organismos, entre ellos *Pseudomonas putida* DOT-T1E (principalmente la bomba TtgABC), nos preguntamos cómo sería la resistencia a

este tipo de compuestos en los biofilms de esta cepa y si las bombas de eflujo jugaban algún papel en ello.

Para resolver estas incógnitas realicé una estancia breve en el laboratorio del Doctor Søren Molin en la Universidad Técnica de Dinamarca (DTU) en Copenhague, donde tienen una amplia experiencia en el campo de los biofilms de *Pseudomonas putida* y *Pseudomonas aeruginosa*. Para la visualización y posterior cuantificación de la estructura de los biofilms se utilizó una técnica de monitorización no invasiva: la adquisición de imágenes tridimensionales de los biofilms mediante el escaneo con microscopía laser confocal (SCLM, *scanning confocal laser microscopy*). Para la monitorización del biofilm se marcaron las cepas con la proteína GFP (*Green Fluorescent Protein*), tal y como se describió en Materiales y Métodos. De manera resumida, se insertó un casete $P_{A1/04/03-gfp-T0-T1}$ en el cromosoma de las cepas estudiadas mediante conjugación triparental usando plásmidos basados en los pUTKm (pSM1695) o pUTTc (TTN119) como donadores según el caso (Materiales y Métodos). La inserción de estos transposones en el cromosoma dio lugar a fenotipos estables de fluorescencia verde compatibles con la microscopía de fluorescencia. Una vez marcadas la cepa silvestre y las mutantes se comprobó que el fenotipo de las cepas no cambiaba con la inserción de la proteína de fluorescencia verde (GFP) en cuanto a velocidad de crecimiento y tolerancia a los disolventes orgánicos.

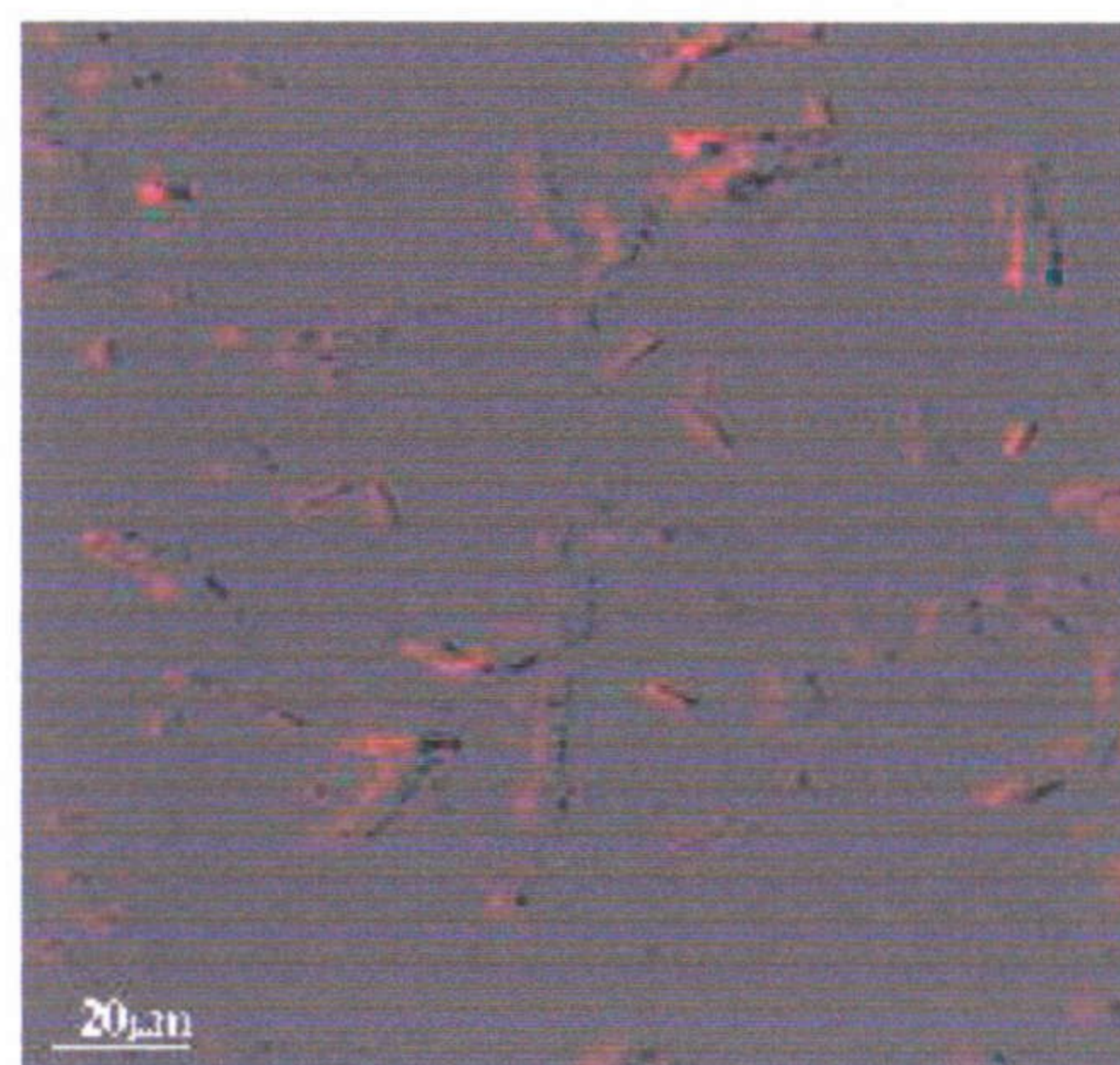
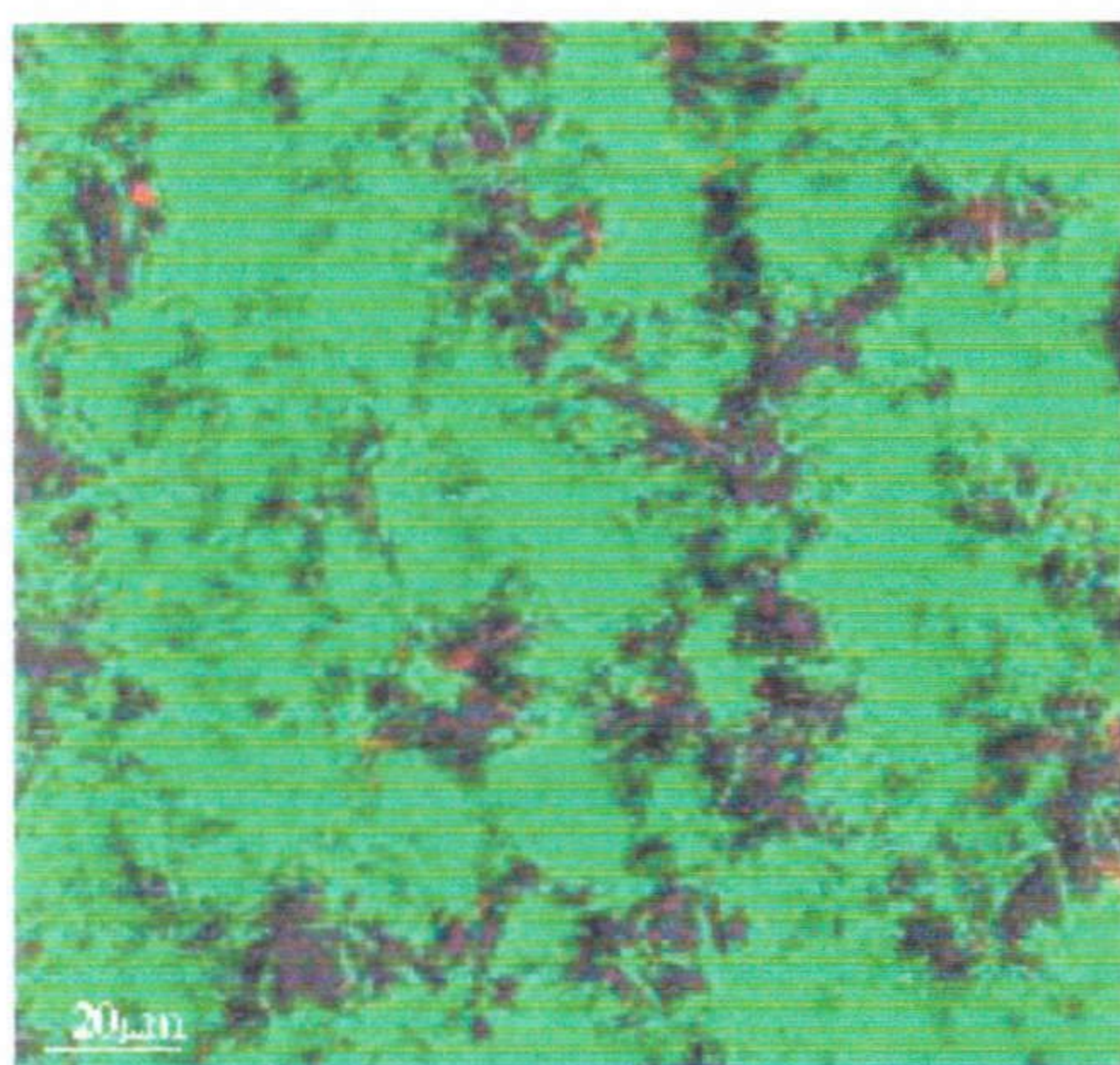
Nos centramos en la cepa silvestre y en el mutante en la bomba TtgABC, puesto que es la bomba más importante en cuanto a resistencia a antibióticos en *P. putida* DOT-T1E. Inoculamos ambas cepas en cámaras de eflujo para formar los biofilms y tras un día, hicimos pasar junto con el medio de cultivo, distintas cantidades de tetraciclina (antibiótico transportado por la bomba TtgABC y en menor medida por TtgGHI). El efecto del antibiótico se midió viendo el número de células muertas mediante tinción con *LIVE/DEAD BacLight* (que tiñe de rojo las células muertas o con la membrana celular dañada), y posterior captación de imágenes mediante microscopía confocal (Microscopio Leica Lasertechnik, con un láser de Ar/Kr de 488 nm).

Como vemos en las fotografías de los controles (Figura III.5), la inmensa mayoría de las células en ambos biofilms tras dos días creciendo sin antibiótico presentan un color verde, indicando que se trata de células vivas y sanas. Tras un día de tratamiento de 15 $\mu\text{g/ml}$ y 50 $\mu\text{g/ml}$ de tetraciclina, tampoco se observó una disminución

significativa de viabilidad, ni siquiera a la concentración de 50 $\mu\text{g/ml}$, 10 veces mayor que la concentración mínima inhibitoria determinada para las células de vida libre (Figuras III.6).

Controles sin antibiótico

Silvestre *P. putida* DOT-T1E



Mutante *P. putida* DOT-T1E-18

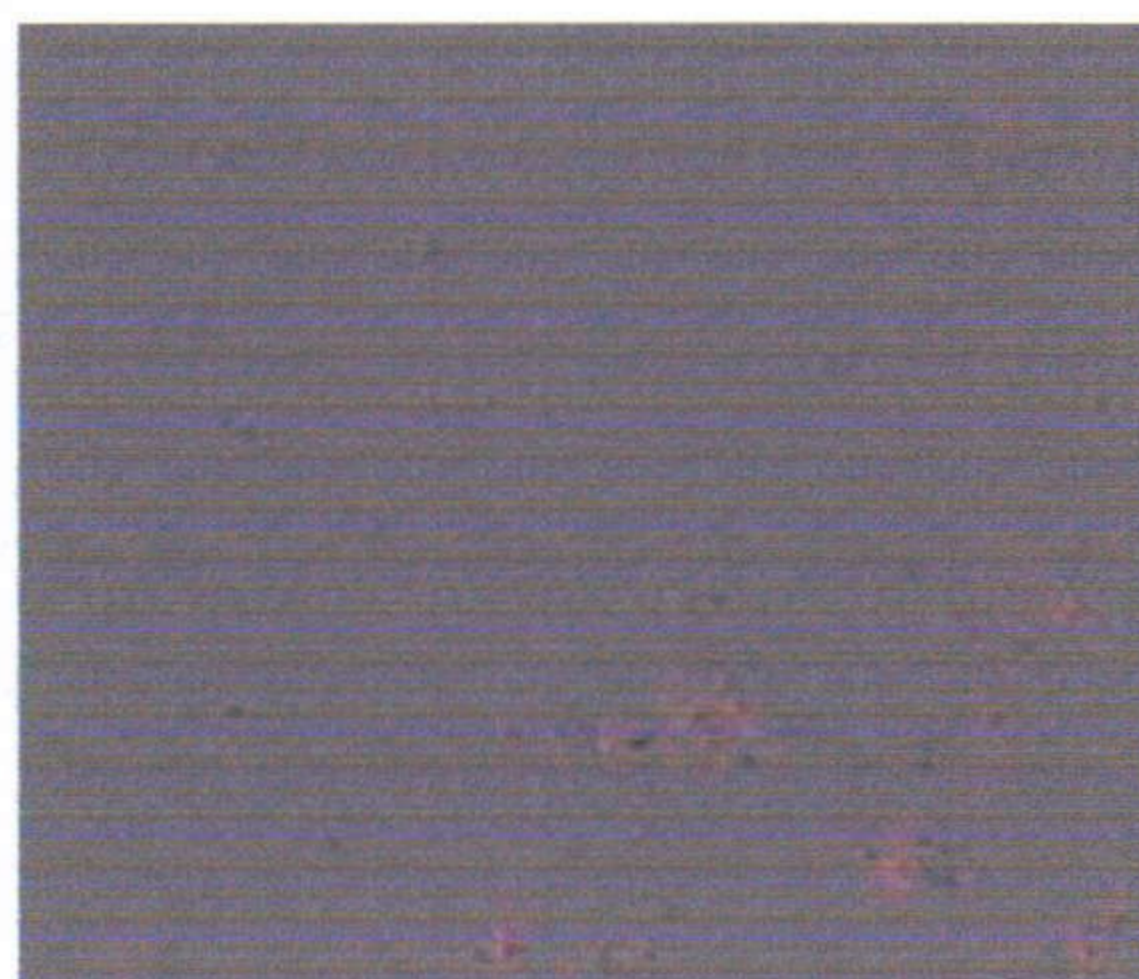
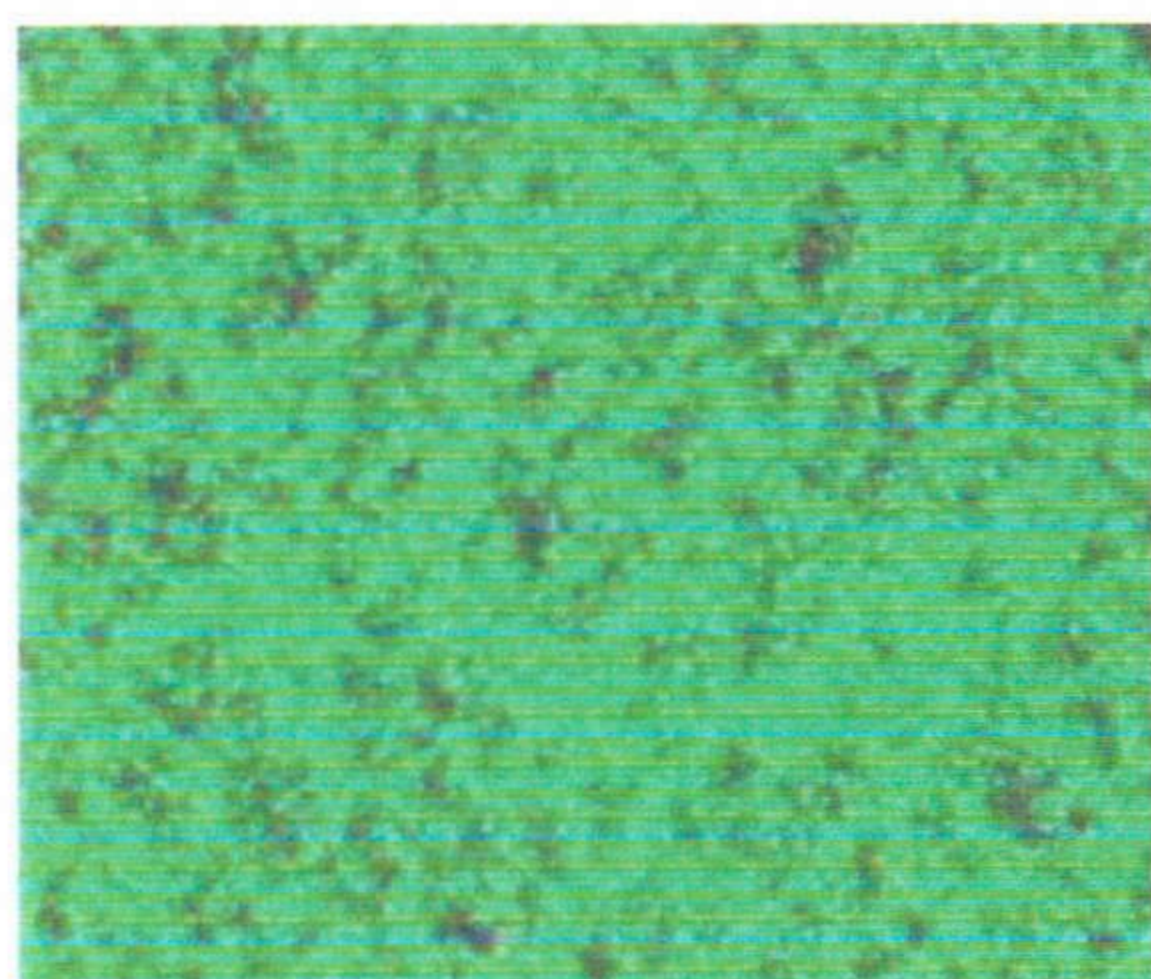
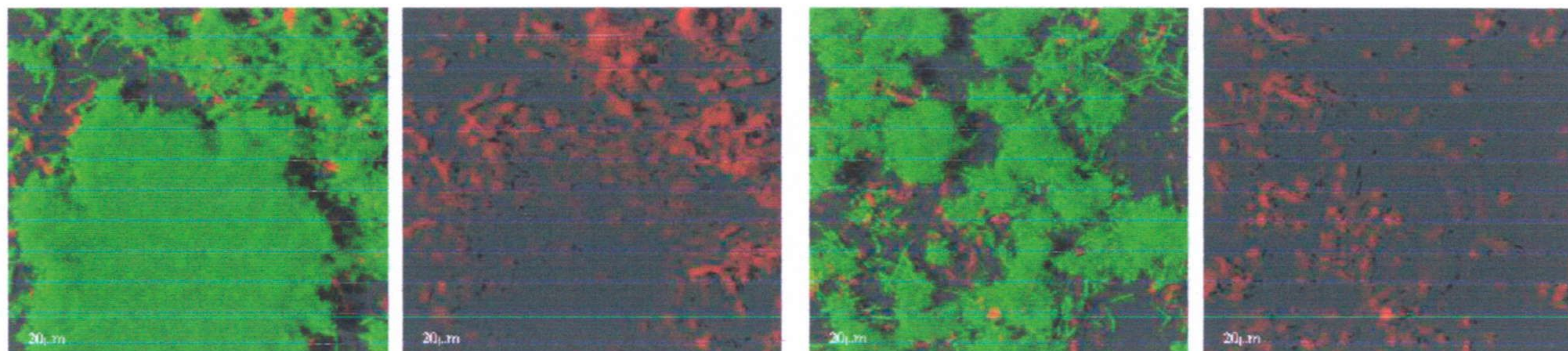


Figura III.5. Control de viabilidad de células en biofilms de 2 días de antigüedad. Para los análisis de la viabilidad de las células en biofilms sin tetraciclina en el medio se inyectó el colorante en la cámara de flujo donde crecía el biofilm y se incubó 15 minutos con el flujo parado. Las células muertas o con la membrana celular dañada se tiñen de rojo y las células vivas de verde y la imagen se recogió mediante microscopía confocal utilizando filtros ópticos de tetrametil isocianato de rodamina y de isotiocianato de fluoresceína respectivamente. En la fotografía de cada pareja, la de la izquierda recoge las dos señales, verde y roja; la de la derecha sólo recoge la señal roja, para que se vea con más claridad. Las fotografías han sido tomadas con un objetivo de 63 aumentos.

Biofilm después de 1 día con 15 μ g/ml de tetraciclina

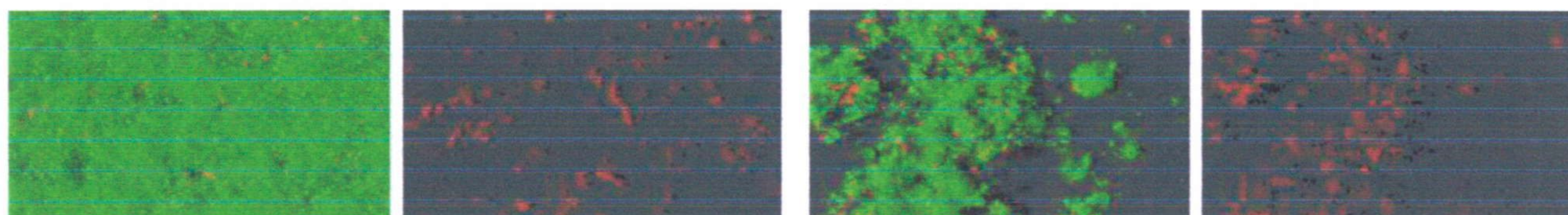
Silvestre *P. putida* DOT-T1E

A



Mutante *P. putida* DOT-T1E-18

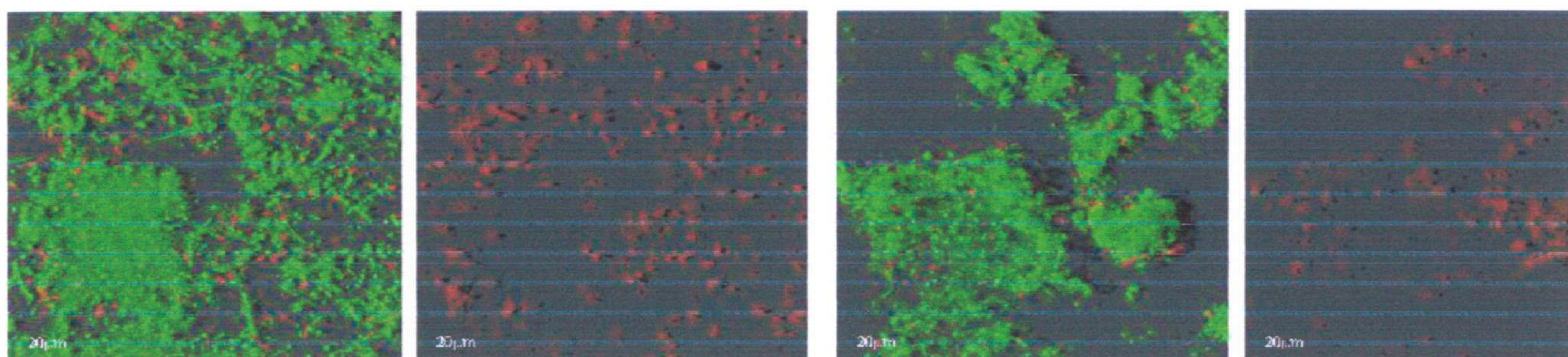
B



Biofilms después de 1 día con 50 μ g/ml de tetraciclina

Cepa silvestre *P. putida* DOT-T1E

C



Mutante *P. putida* DOT-T1E-18

D

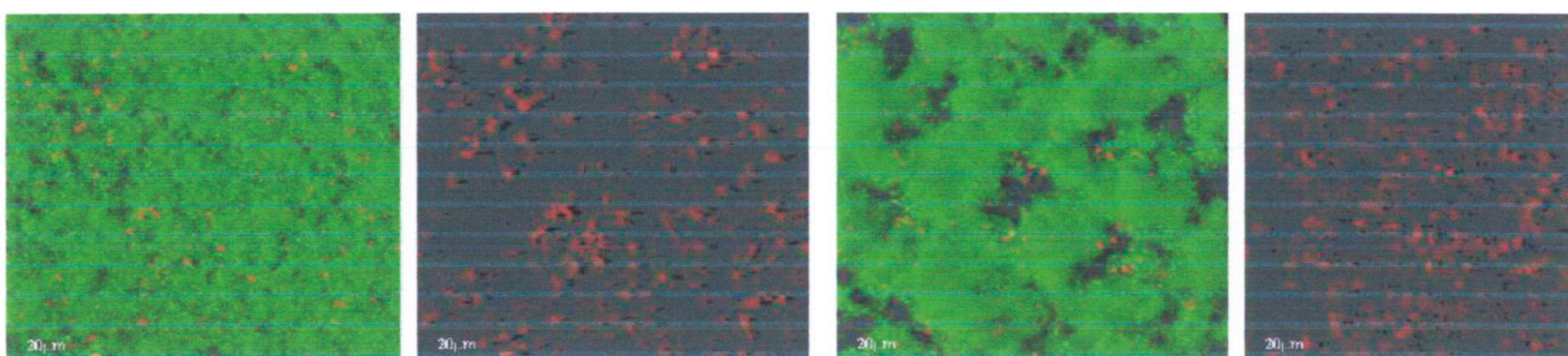


Figura III.6. Viabilidad en los biofilms tras añadir al medio de cultivo distintas concentraciones de tetraciclina. Las células de dos días (un día de incubación en el medio de cultivo normal, y un segundo día de incubación con el antibiótico), se tiñeron y se tomaron las fotografías como se explica en Materiales y Métodos. Se tomaron fotografías a distinta profundidad en el biofilm: la pareja de fotografías de la izquierda corresponde a la zona del biofilm más pegada a cristal sobre el que se forma; y la pareja de fotografías de la derecha corresponde a la zona del biofilm más alejada de la superficie sobre la que crece, y por tanto más accesible al medio de cultivo. (A) Cepa silvestre tras 1 día con 15 $\mu\text{g/ml}$ de tetraciclina; (B) mutante *P. putida* DOT-T1E-18 tras 1 día con 15 $\mu\text{g/ml}$ de tetraciclina; (C) cepa silvestre tras 1 día con 50 $\mu\text{g/ml}$ de tetraciclina; (D) *P. putida* DOT-T1E-18 tras 1 día con 50 $\mu\text{g/ml}$ de tetraciclina.

En el transcurso de estos ensayos observamos que existían diferencias notables en cuanto a estructura en los biofilms de las dos cepas, *P. putida* DOT-T1E y *P. putida* DOT-T1E-18, por lo que nos propusimos estudiar más a fondo la estructura de los biofilms de estas dos cepas y también de los otros mutantes sencillos (*P. putida* DOT-T1E-1 y *P. putida* DOT-T1E-PS28) en las bombas y del triple mutante (*P. putida* DOT-T1E-PS34). Marcamos todas las cepas mediante la inserción de la proteína de fluorescencia verde y comprobamos que no había cambios fenotípicos. Se inocularon las cepas en cámaras de flujo y se hicieron dos ensayos independientes. En cada uno, y para cada canal, se tomaron las imágenes como hemos explicado antes, con un objetivo de 40 aumentos, a lo largo de varios días. Estas imágenes se muestran en la Figura III.7 y en más detalle en la Figura III.8. El biofilm formado por las cepas *P. putida* DOT-T1E-PS28 (*ttgGHI*⁻), y *P. putida* DOT-T1E-1 (*ttgDEF*⁻) fue idéntico al formado por la cepa silvestre, por lo que no se presentan las imágenes correspondientes a estos biofilms.

Objetivo 40x

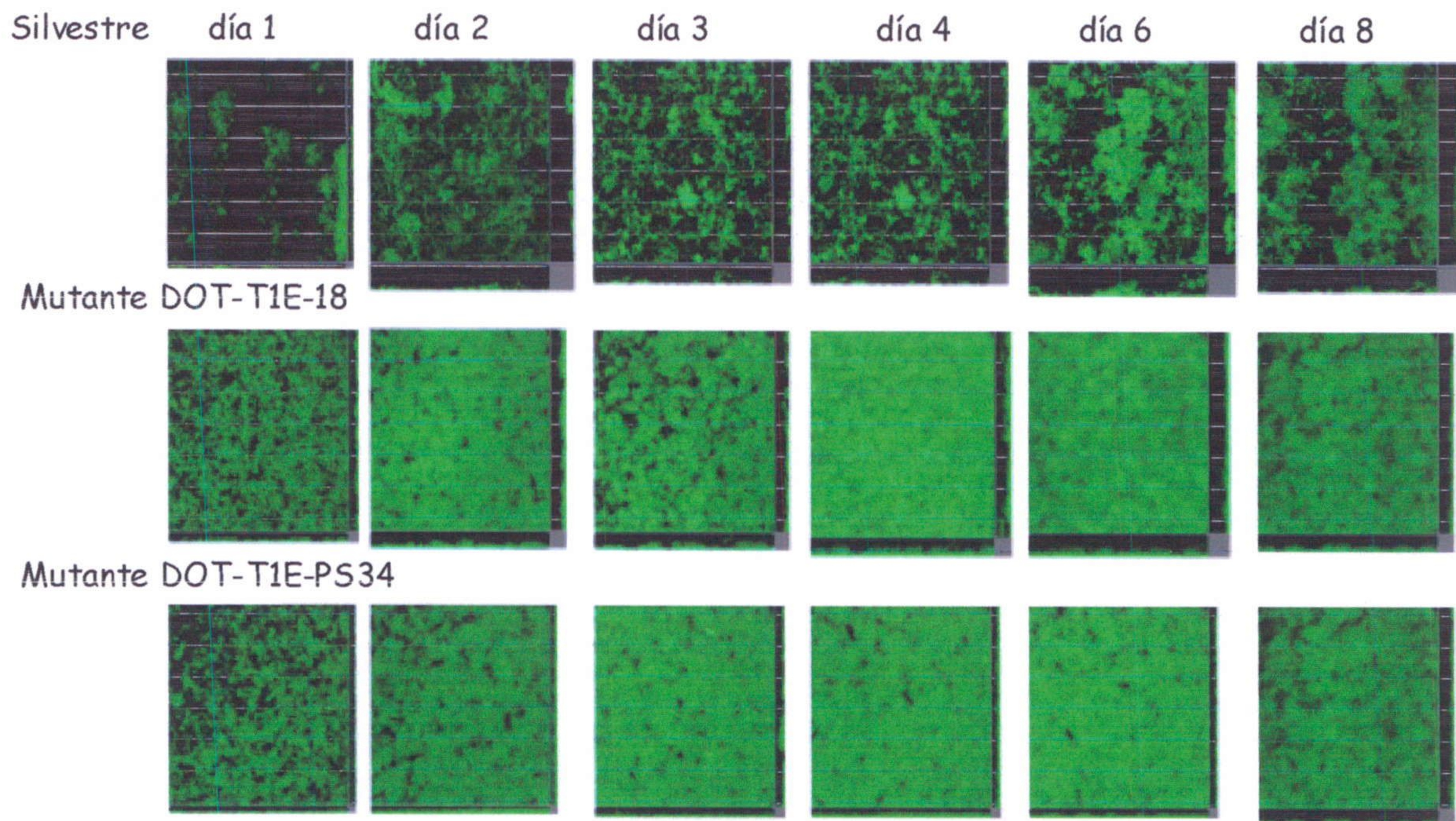


Figura III.7. Imágenes obtenidas mediante microscopía confocal de los biofilms formados por *P. putida* DOT-T1E, *P. putida* DOT-T1E-18 y *P. putida* DOT-T1E-P34. Las cepas están marcadas con la proteína verde fluorescente GFP. Cada imagen es la superposición de 10 imágenes tomadas a con un intervalo de entre 3 y 5 μm con un objetivo de 40 aumentos.

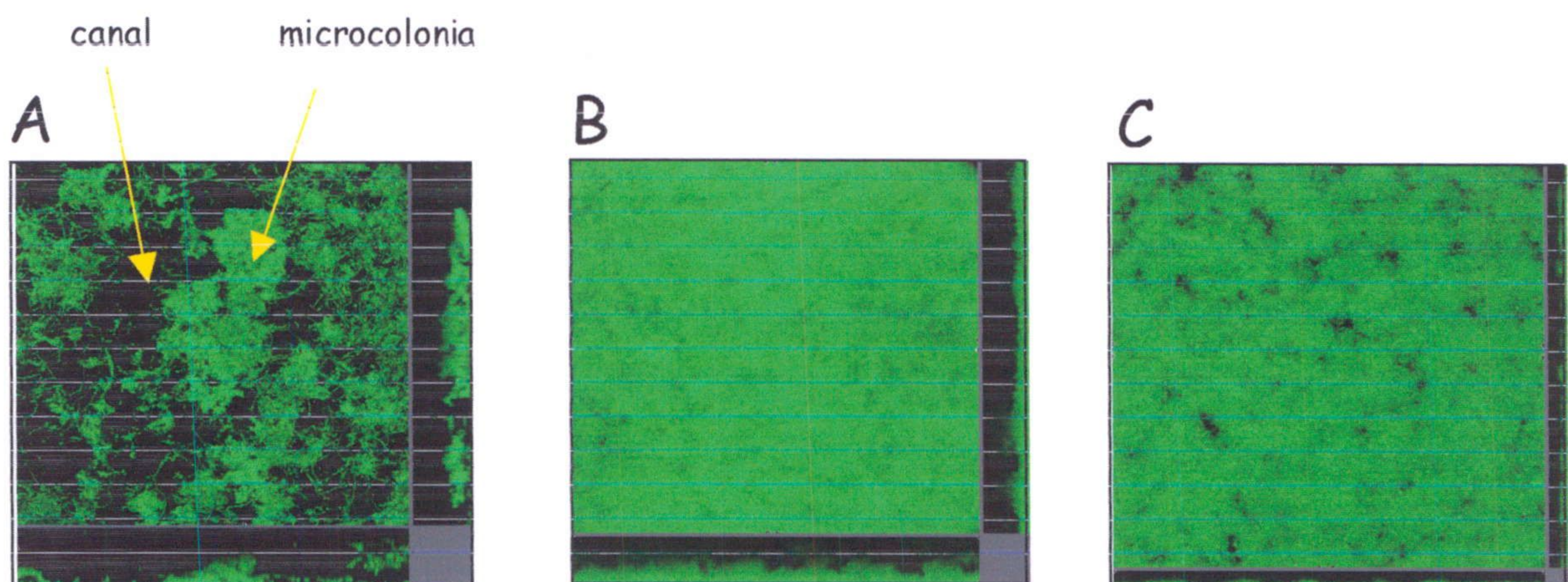


Figura III.8. Imágenes ampliadas de los biofilms 6 días después de su inoculación. Las fotografías se tomaron con un objetivo de 40 aumentos de la misma forma que en la Figura III.4. **A.** corresponde a la cepa silvestre, donde se distinguieron grupos de células que formaban microcolonias separadas por grandes espacios vacíos. **B.** Biofilm de *P. putida* DOT-T1E-18 (mutante TtgABC). **C.** Biofilm de *P. putida* DOT-T1E-PS34 (triple mutante).

En estas imágenes se observa claramente que el biofilm formado por la cepa silvestre está estructurado en microcolonias y presenta muchos canales entre estas microcolonias. Este tipo de estructuras se observaron en otros biofilms y se consideran la arquitectura “normal” de los biofilms de *Pseudomonas sp.* (Costerton et al., 1995 y 1999). Los canales parecen formarse para mejorar la accesibilidad a los nutrientes. El biofilm de las dos cepas mutantes fue mucho más denso y homogéneo, no observándose tantos canales. Por lo que se sugiere que el biofilm de *P. putida* DOT-T1E (así como el de los mutantes en las bombas *ttgGHI* y *ttgDEF*) se encuentra mucho más organizado que el de las otras dos cepas.

El programa COMSTAT, desarrollado por Heydorn et al. (2000) permite analizar conjuntos de imágenes obtenidas mediante microscopía confocal y calcula una serie de variables que permiten diferenciar distintas estructuras tridimensionales. Los parámetros que hemos considerado en este estudio son: grosor medio, que es una medida del tamaño en el espacio del biofilm; relación superficie/volumen, que refleja qué fracción del biofilm está expuesto al flujo de nutrientes, y es por ello una medida de cómo el biofilm se adapta al ambiente; rugosidad, que es una muestra de cómo varía el grosor del biofilm, siendo una medida de su heterogeneidad; y cobertura del sustrato, que refleja cómo de eficiente es una cepa en la colonización del sustrato (sustrato se refiere en este campo a la superficie sobre la que crecen los biofilms).

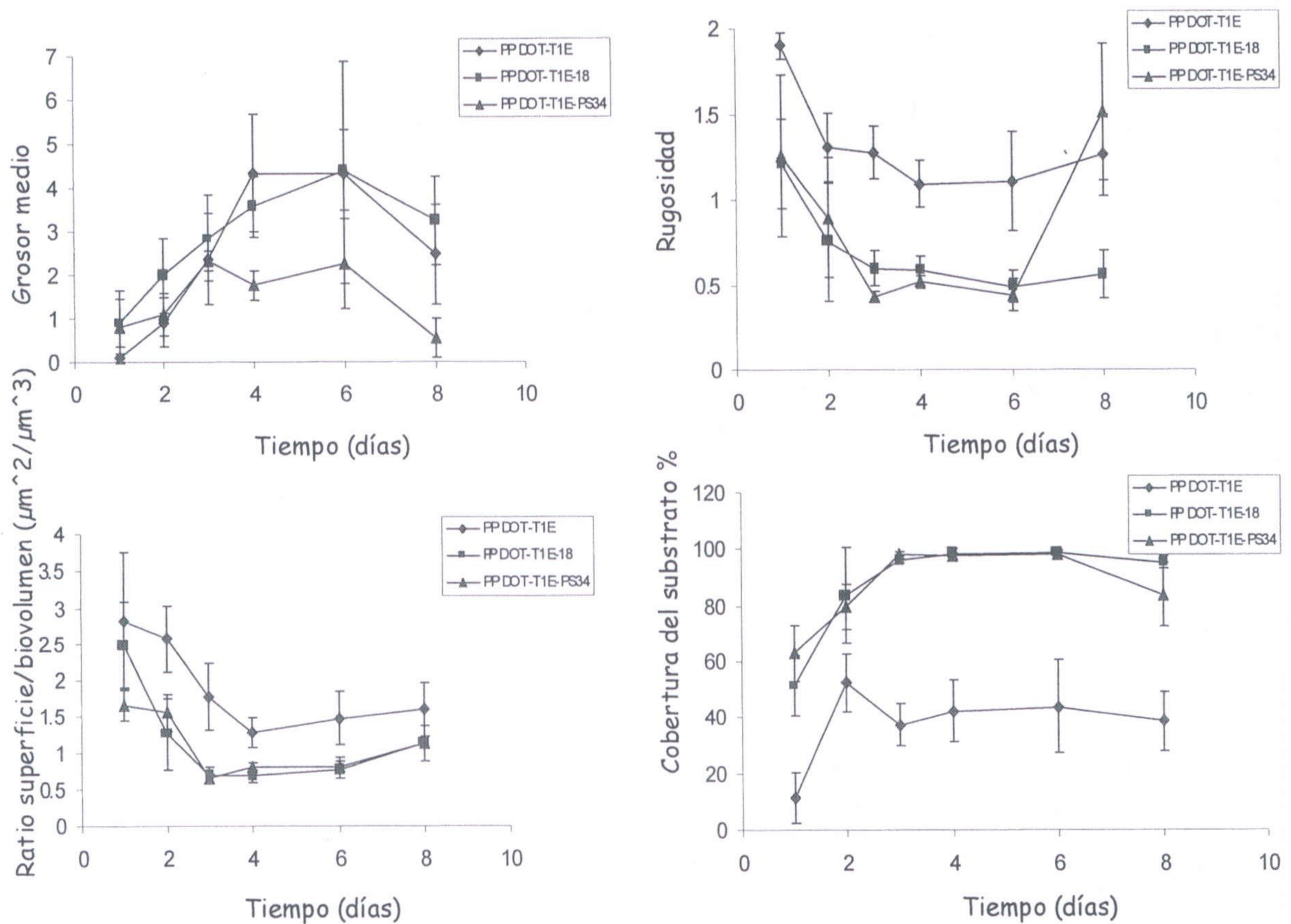


Figura III.9. Análisis mediante COMSTAT de la estructura de los biofilms. Se muestran las diferencias entre el biofilm de *P. putida* DOT-T1E, *P. putida* DOT-T1E-18 y *P. putida* DOT-T1E-PS34, atendiendo a distintos parámetros: grosor medio (esquina izquierda arriba), relación entre superficie y volumen (esquina izquierda abajo), coeficiente de rugosidad (esquina derecha arriba) y cobertura de sustrato (esquina derecha abajo). Se tomaron 10 fotografías de los biofilms en distintos puntos al azar utilizando el microscopio láser confocal con un objetivo de 40 aumentos.

Los resultados obtenidos con el programa COMSTAT (Figura III.9) constataron las diferencias apreciadas visualmente: el biofilm de la cepa silvestre difiere del de las otras dos cepas en todos los parámetros analizados. Los mutantes DOT-T1E-18 y DOT-T1E-PS34 se comportaron de forma muy similar, de manera que sólo comentaremos las diferencias entre la cepa silvestre y el mutante *P. putida* DOT-T1E-18. Quizá el parámetro más destacable es el de superficie/volumen, que indica cómo el biofilm se adaptó al ambiente, siendo los valores más altos en la cepa silvestre. La cepa mutante colonizó el sustrato muy eficazmente y alcanzó casi el 100% de cobertura. El biofilm del mutante muestra una menor relación superficie/volumen, lo que concuerda con que su biofilm sea uniforme y plano.

DISCUSIÓN

Utilizando la colección de mutantes combinados de las tres bombas *ttg* construida en este trabajo junto con los mutantes que ya existían en el laboratorio se ha definido el perfil de sustratos de cada bomba. Dada la extrema sensibilidad del mutante *P. putida* DOT-T1E-PS28 (TtgGHI) a tolueno, para el estudio del perfil de sustratos se han usado disolventes algo más apolares que el tolueno, por lo que presentan menos afinidad por la membrana celular, y eso hace que sean menos tóxicos. Los resultados recogidos en la Tabla III.1 indican que las bombas TtgABC y TtgGHI participan en la expulsión de todos los disolventes probados, mientras que TtgDEF parece que sólo está implicada significativamente en el transporte de tolueno y estireno. En estas conclusiones no hay que olvidar que atendemos a la toxicidad del compuesto hacia la célula, por lo que estos resultados no nos permiten concluir fehacientemente que alguna de estas bombas, por ejemplo, la TtgDEF no participe también en la eliminación de otros compuestos distintos de tolueno y estireno. Nuestros resultados apoyan las conclusiones del trabajo de Lee et al. (2000) en el que sugiere que existe un efecto aditivo en la expulsión de sustancias tóxicas por bombas que operan mediante un mecanismo común. Se ve muy claramente en los experimentos de tolerancia a propilbenceno y etilbenceno: la supervivencia no estaba afectada en mutantes sencillos en *ttgABC* o *ttgGHI*, pero sí en un doble mutante que carecía de ambas bombas.

Además de transportar disolventes orgánicos, estas bombas también transportan antibióticos con estructura, propiedades y modo de acción diferentes: penicilinas como la carbenicilina y la ampicilina; quinolonas como el ácido nalidíxico; tetraciclina, cloramfenicol y cerulenina. Antibióticos como las penicilinas sólo afectan a células en crecimiento: bloquean la síntesis de peptidoglicanos de forma que la pared celular se hace muy débil, llevando a la lisis celular. Las tetraciclinas inhiben la síntesis de proteínas, bloqueando su elongación. El cloramfenicol tiene un modo de acción similar, inhibiendo también la elongación de las proteínas. El ácido nalidíxico es una 4-quinolona que interfiere en la síntesis del ADN. Su diana en las células es la ADN-girasa. La cerulenina es un potente inhibidor de la síntesis de ácidos grasos. Sus dianas son las proteínas Fab (*Fatty acid biosynthesis*). Como se ve en la Tabla III.1, tanto la bomba TtgABC como la TtgGHI están implicadas en el transporte de antibióticos como demuestra que el doble mutante DOT-T1E-PS32 (*ttgABC ttgGHI*) sea más sensible a

antibióticos que la DOT-T1E-18 (*ttgABC*), aunque el papel de la bomba TtgGHI parece enmascarado ante la gran efectividad de la TtgABC. La gentamicina, que inhibe el inicio de la síntesis de proteínas, no parece ser transportada por ninguna de las bombas *ttg* de *P. putida* DOT-T1E. La supervivencia de ninguno de los mutantes se veía afectada a las concentraciones de gentamicina utilizadas (estos datos no se mostraron). Nuestros resultados confirman los resultados de Mosqueda y Ramos (2000) que indicaban que la bomba *ttgDEF* no transporta antibióticos.

Como se determina en este capítulo, las tres bombas de eflujo TtgABC, TtgDEF y TtgGHI son capaces de transportar los mismos substratos, aunque su eficiencia en la eliminación de los mismo no es igual. El hecho de que las distintas bombas de un mismo organismo tengan un perfil de sustrato solapante no es tan raro. En *P. aeruginosa* se han descrito hasta siete bombas del tipo *RND* para antibióticos (MexAB-OprM, MexCD-OprJ, MexEF-OprN, MexXY-OprM, MexJK-OprM, MexHI-OprD y MexVW-OprM [Gotoh et al., 1995; Köler et al., 1996; Köler et al., 1997; Li et al., 1998b; Poole et al., 1996; Mine et al., 1999; Westbrook-Wadman et al., 1999; Chuanchuen et al., 2002; Sekiya et al., 2003; Li et al., 2003]). Las bombas Mex transportan un amplio rango de antibióticos (Gotoh et al., 1995; Hirai et al., 1997; Köler et al., 1996; Köler et al., 1997; Koronakis et al., 2000, Li et al., 1998 a y b; Poole et al., 1996; Ramos et al., 1998) y también se ha demostrado su participación en la eliminación de disolventes orgánicos (White et al., 1997). En el caso de las bombas Mex algunos de los substratos son compartidos por varias bombas como por ejemplo, fluoroquinolonas y tetraciclina, que son expulsados por cuatro de estos sistemas de bombas. Sin embargo, solamente la bomba MexAB-OprM se ha implicado en la expulsión de sulfonamidas y el antibiótico imipenem parece ser solamente sustrato de la bomba MexEF-OprN (ver Tabla 3 de la Introducción). Por otro lado, cabe destacar que sólo las bombas MexAB-OprM y MexXY-OprM contribuyen a la resistencia intrínseca de las células, mientras que MexCD-OprJ y MexEF-OprN sólo se expresan en cepas mutantes *nfxB⁻* y *nfxC⁻* respectivamente (Poole y Srikumar, 2001). Las bombas AcrAB-TolC y AcrEF-TolC de *E. coli* muestran también un perfil de substratos común, pero mientras la bomba AcrAB-TolC se expresa en la cepa silvestre bajo condiciones normales de laboratorio, la bomba AcrEF-TolC apenas se expresa en la cepa silvestre,

pero sí en mutantes AcrAB^r resistentes a disolventes orgánicos o fluroquinolonas (Kobayashi et al., 2001).

Como ya se ha comentado con anterioridad, la amplia especificidad de substrato y la capacidad de exportar compuestos con estructuras químicas diferentes es debida a la flexibilidad del sitio de unión del substrato. Esta amplia especificidad de substrato se ha considerado muchos años como contradictoria con los dogmas de la bioquímica (Neyfakh, 2001 y 2002), para los cuales la teoría de la “llave-cerradura” para las reacciones enzimáticas se consideraba universal en el mecanismo de reconocimiento proteína-substrato. Con la cristalización de AcrB de *Escherichia coli* por Murakami y colaboradores (2002) y Yu y colaboradores (2003), se ha visto que efectivamente el sitio de unión a los ligandos del trímero de AcrB es muy amplio, tiene un diámetro de 35 Å y la parte superior de la cavidad tiene un volumen de 5,000 Å³. La estructura resuelta unida a distintos ligandos muestra que se unen tres moléculas de ligando simultáneamente a la cavidad central, principalmente mediante interacciones hidrófobas, aromáticas y de van der Waals. La superficie interior de la parte superior de la cavidad de AcrB está rodeada por numerosos residuos hidrófobos, incluyendo 12 residuos de fenilalanina muy conservados, participando cada protómero con Phe386, Phe388, Phe458 y Phe459.

Tabla III.4. Conservación de los residuos de unión a substrato entre las bombas de la familia RND (adaptado de Yu et al., 2003b). Los aminoácidos que no siguen el consenso están marcados en rojo.

	Leu25	Lys29	Asp99	Asp101	Phe386	Phe388	Phe458	Phe459
AcrB	Leu	Lys	Asp	Asp	Phe	Phe	Phe	Phe
TtgB	Leu	Lys	Asn	Asp	Ala	Phe	Phe	Phe
TtgE	Leu	Lys	Asn	Asp	Phe	Ile	Phe	Phe
TtgH	Leu	Lys	Asp	Asp	Phe	Leu	Phe	Phe

En el caso de las tres bombas Ttg, como se vio en la Tabla I.4 del Capítulo I y que reproducimos parcialmente aquí (Tabla III.4), están presentes 3 de estas fenilalaninas en cada una de las proteínas TtgB, TtgE y TtgH. También están conservados en las bombas Ttg los residuos con carga que en AcrB se ha demostrado que interaccionan con las moléculas de substrato para estabilizar su unión. Las

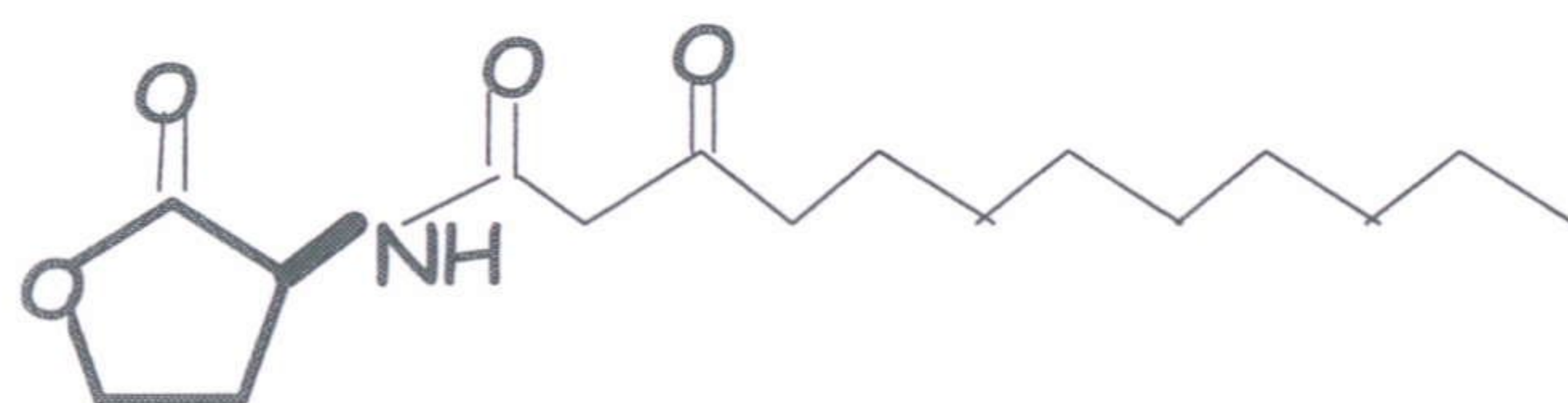
variaciones con respecto al paradigma de AcrB y con las proteínas Ttg entre sí podrían explicar las diferencias de especificidad de sustrato observadas.

Los sistemas de transporte son responsables de la entrada de prácticamente todos los minerales, nutrientes y vitaminas, y de la expulsión de compuestos tóxicos, productos finales del metabolismo y macromoléculas de la superficie celular. También funcionan en la homeostasis iónica, comunicación entre las células y su ambiente, y constituyen componentes esenciales de los sistemas generadores de energía (Neyfakh, 2001). Constituyen por tanto mecanismos esenciales en toda célula. La función natural de los sistemas de eflujo está siendo objeto de un profundo debate (Poole y Srikumar, 2001; Neyfakh, 2001; Paulsen et al., 2001). Nikaido y Zgurskaya (1999 [b]) encontraron que los sustratos para los que AcrB tenía mayor afinidad eran sales biliares y sus derivados, tales como taurocolato y glicocolato. *Escherichia coli* tiene que sobrevivir en presencia de altas concentraciones de estos detergentes en sus hábitats naturales, y se ha visto que mutantes en AcrAB son hipersensibles a sales biliares y no sobreviven en el tracto intestinal superior. La amplia especificidad de AcrB permitiría expulsar los distintos ácidos biliares, que adoptan diversas estructuras como consecuencia de su metabolismo en el tracto intestinal (Nikaido y Zgurskaya, 2001; Thanassi et al., 1997). La inducibilidad del sistema AcrAB de *E. coli* por ácidos grasos tóxicos y el papel de AcrAB en el transporte y en la resistencia ante sales biliares, son consistentes con el papel de AcrAB en la protección de las células ante estos agentes en el intestino. A la bomba MtrCDE de *Neisseria gonorrhoeae* se le ha atribuido también un papel en la resistencia a lípidos fecales y posiblemente a las sales biliares que recubren las mucosas de las membranas (Shafer et al., 1995). Por tanto, se podría pensar que el papel principal de estas bombas es el de protección ante agentes antimicrobianos. El hecho de que bombas como TtgABC o MexXY sean inducidas por algunos de los antibióticos que transportan sugeriría que cumplen una función de protección. Sin embargo, nuestros resultados conjuntamente con los de Kievit et al., (2001) en *P. aeruginosa*, muestran que cuando *P. putida* o *P. aeruginosa* crecen como biofilms (forma predominante de vida de los microorganismos en la naturaleza), las células adquieren una mayor resistencia a antibióticos. Además esta resistencia no está mediada por las bombas de eflujo de antibióticos, ya que mutantes que carecen de bombas funcionales son tan resistentes a los antibióticos como las cepas silvestres (aunque en cultivos de células de

vida libre los mutantes si fueron más sensibles). Estos resultados sugieren que el papel natural de las bombas en estas dos cepas no es sólo el de la protección frente a antibióticos. Las células asociadas a biofilms son mucho más resistentes no sólo a antibióticos, sino también a detergentes y otros agentes antimicrobianos (Costerton et al., 1987). Esta propiedad de los biofilms es probablemente multifactorial (Watnick y Kolter, 2000), englobando una disminución de la difusión de los antibióticos en el biofilm, disminución del ritmo de crecimiento de las células (fase de crecimiento), producción de exopolisacáridos y cambios fenotípicos en el ambiente del biofilm (Davey y O'Toole, 2000).

Otra teoría interesante sugiere que los substratos naturales de estas bombas de eflujo son sustancias que están presentes de forma natural en las propias células. Así se ha visto que el indol es transportado por la bomba AcrEF-TolC de *E. coli* y que en *P. aeruginosa* la molécula implicada en *quorum sensing* N-(4-oxododecanoil)-L-homoserina lactona (3-oxo-C12 HSL) es substrato de la bomba MexAB-OprM. Las moléculas tipo acil-homoserin lactonas (AHLs) son fundamentales para la comunicación intercelular en muchas especies bacterianas. Las señales de cadena corta, como la C4-HSL, difunden libremente a través de la membrana celular; mientras que las de cadena larga se quedan atrapadas en la membrana, necesitando un sistema de transporte activo para ser liberadas al exterior. Se ha probado el papel de la bomba MexAB-OprM en el transporte activo de la molécula señal 3-oxo-C12-HSL (Fig. III.11) (Evans et al., 1998; Pearson et al., 1999). La síntesis de esta molécula de cadena larga está dirigida por el producto del gen *lasI*, que forma parte del sistema de señalización de *quorum sensing lasI-lasR*. El biofilm producido por un mutante en *lasI* tiene las mismas características que el biofilm del mutante en la bomba TtgABC de *Pseudomonas putida* DOT-T1E (Davies et al., 1998): no forma microcolonias ni canales de agua, sino que el biofilm mutante parece crecer de forma desorganizada como capas continuas sobre la superficie del cristal. Aunque la identificación de posibles moléculas AHLs, y el estudio de su transporte por las bombas TtgABC, TtgDEF y TtgGHI quedan fuera de los objetivos de esta Tesis Doctoral, cabe señalar que algunas cepas de *Pseudomonas putida* son capaces de producir moléculas señal del tipo AHL (Berg et al., 2002; Elasri et al., 2001; Kojic et al., 1999; Sauer y Camper, 2001), y se ha encontrado un sistema de *quorum sensing* dependiente de AHLs en *P. putida* IsoF (Steidle et al.,

2002). Sin embargo en la secuencia del cromosoma de la cepa homóloga a *P. putida* DOT-T1E, *P. putida* KT2440 no se han encontrado genes homólogos *lasI* (encargado de la síntesis de AHLs) presente en *P. aeruginosa*. Nuestros resultados en cuanto a la desorganización del biofilm del mutante *P. putida* DOT-T1E-18 (*ttgABC*⁻) sugerirían que quizá estas diferencias en la estructura del biofilm respecto a la cepa silvestre se puedan explicar por la falta de liberación al medio de señales de comunicación. Por supuesto, esta hipótesis necesitaría mucha experimentación adicional para ser demostrada.



N-(4-oxododecanoil)-L-homoserina lactona
3-oxo-C12 HSL

Figura III.10. Estructura de 3-oxo-C12 HSL. Molécula señal transportada por MexAB-OprM que forma parte de un circuito de *Quorum Sensing* en *Pseudomonas aeruginosa*.

Por último, Paulsen y colaboradores (2000) indicaron que las especificidades de sustrato de las bombas de un organismo podrían reflejar la diversidad y concentración de los sustratos presentes en su ambiente. En este sentido conviene resaltar que el genoma de organismos considerados “ambientales”, (que presumiblemente viven en contacto con muchas sustancias potencialmente tóxicas) codifica numerosos sistemas del tipo RND, algunos de los cuales ya han sido demostrados como tales (al menos cuatro en *Escherichia coli* y *Aquifex aeolicus*, entre tres y cinco en *Synechococcus*); mientras que patógenos obligados adaptados sólo a un tipo de ambiente (presumiblemente libre de sustancias anfílicas tóxicas) contienen muy pocos (ninguno en *Chlamydia trachomatis*, entre ninguno o uno en *Treponema pallidum*, y uno en *Haemophilus influenzae*). *Pseudomonas putida* DOT-T1E fue aislada de una planta de aguas residuales de Granada (Ramos et al., 1995), por lo que puede considerarse una cepa de un estilo de vida “ambiental”. Seguramente las bombas de la familia RND que

posee le han ayudado a sobrevivir en un ambiente cambiante con muchas sustancias tóxicas diferentes.

Capítulo IV

REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LA BOMBA TtgGHI

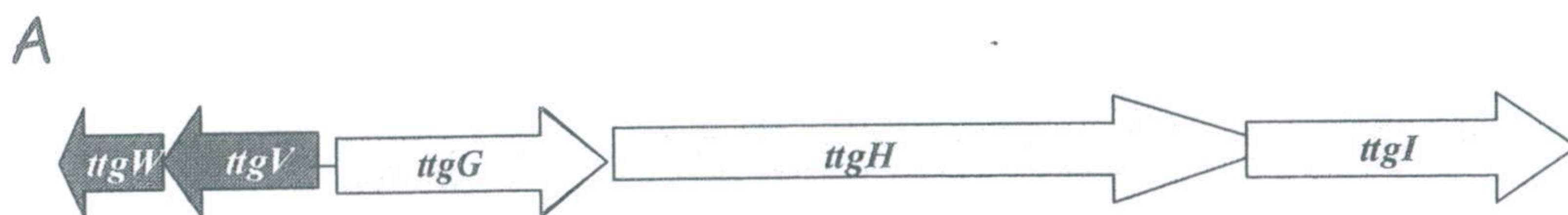
RESUMEN

La bomba TtgGHI de *Pseudomonas putida* DOT-T1E juega un papel fundamental en la tolerancia innata e inducida de esta cepa hacia hidrocarburos aromáticos y antibióticos. El operón *ttgGHI* se expresa constitutivamente desde dos posibles promotores solapantes (P_{G1} y P_{G2}) en ausencia de tolueno, y aumenta su expresión en presencia de este hidrocarburo aromático. Adyacentes al operón *ttgGHI* se identificaron dos marcos de lectura abiertos (ORFs) que se transcriben divergentemente respecto a *ttgGHI* y que denominamos *ttgV* y *ttgW*. Estos dos ORFs forman parte de la misma unidad transcripcional, y se transcriben desde un promotor con cajas -10 y -35 similares a las reconocidas por la ARN polimerasa con la unidad σ^{70} .

En fondos deficientes en TtgV, pero no en los deficientes en TtgW, la expresión de los operones *ttgGHI* y de *ttgVW* aumenta cuatro veces. Esto sugiere que TtgV reprime la expresión de *ttgGHI* y además también controla su propia expresión. Los ensayos de extensión a partir de cebador específicos para los ARN mensajeros de *ttgV* y *ttgG* muestran que los promotores divergentes de *ttgG* y *ttgV* solapan. Ensayos de retardo en gel con la proteína purificada muestran que TtgV se une con una alta afinidad a la región promotora.

IV.1. Identificación de un operón corriente arriba de los genes *ttgGHI* que se transcribe divergentemente con respecto a los genes de la bomba de eflujo

Los genes de las bombas de eflujo de la familia RND están frecuentemente regulados por el producto de un gen que se localiza adyacente y se transcribe de forma divergente respecto a los genes estructurales de la bomba (Adewoye et al. 2002; Baranova y Nikaido, 2002; Ma et al., 1996; Meier et al., 1988; Paulsen et al., 2001). De hecho, el gen *ttgR* (regulador de la bomba TtgABC de *P. putida* DOT-T1E), se localiza en 5' con respecto al operón *ttgABC*, y se estableció que se transcribía divergentemente respecto a *ttgA* (Duque et al., 2001). En un mutante TtgR la expresión desde el promotor *ttgA* aumentó alrededor de diez veces, indicando que TtgR reprimía la expresión del operón *ttgABC* (Duque et al., 2001). En este fondo mutante, la expresión desde los promotores *ttgD* y *ttgG* seguía el mismo patrón que en el fondo silvestre, lo que indicaba que debería haber otro(s) reguladore(s) implicados en el control de la expresión de las otras dos bombas de eflujo. Siguiendo este razonamiento nos propusimos secuenciar la región 5' del operón *ttgGHI* para intentar identificar posibles genes reguladores de la bomba. Para la secuenciación de la región de ADN situada corriente arriba de los genes *ttgGHI* se utilizó como molde el plásmido pGG1 (Tabla M2 de Materiales y Métodos). El análisis de la secuencia reveló la presencia de dos marcos de lectura abiertos, de acuerdo con la predicción realizada con el programa DNA Strider 1.1. Estos dos ORFs constaban de 780 pb y 405 pares de bases respectivamente, y estaban separados el uno del otro por 5 pb (Figura IV.1). Estos genes se transcribirían de manera divergente con respecto a los del operón *ttgGHI*. Al gen de mayor tamaño (780 pb), adyacente a *ttgG*, lo llamamos *ttgV*; y al otro, adyacente a *ttgV*, de 405 pb, lo llamamos *ttgW*.



B

← *ttgG* (complementaria)

tgcccgcac gacgggggcta ttgctgaatcgtaatgcggt agagtgtagcattatgtgat 60

actcttgacgcaagcaagcc tgagccgcggttggtcgagg tttaccgattgaggcgttcg 120

cgatgtgtggctggctagcg gaggccgagagctctacagt ggcgccaatgtgataggac 180

ttgV

gcagccgtacgcgcagagga aagataatgaaccaatcagat gaaaatattggcaaggccgg 240
M N Q S D E N I G K A

gggcatccaggtcatcgcca gagcagcctcgatcatgcga gcgcttggcagtcatccgca 300
G G I Q V I A R A A S I M R A L G S H P

cggttgagcttggcgggcca ttgcgcaactgggtgggctg cctcgctccaccgttcagag 360
H G L S L A A I A Q L V G L P R S T V Q

aatcatcaacgctctggaag aagsgttcctagtcgaggct ttagggcctgccggaggttt 420
R I I N A L E E E F L V E A L G P A G G

tcgacttggccctgcgcttg gccagctaataatcaggcg caaacagacattctttcttt 480
F R L G P A L G Q L I N Q A Q T D I L S

ggtgaaaccgtacttgcgct cgctggctgaggagctggac gagtcggtctgtctggcttc 540
L V K P Y L R S L A E E L D E S V C L A

tctggccggagataaaaatct acgtgcttgaccgtatcgtg tcagagcgagagctgcggg 600
S L A G D K I Y V L D R I V S E R E L R

agtgtttccgattggtatta acgtacccgccgcagcgacg gcggccggcaaagtcctctt 660
V V F P I G I N V P A A A T A A G K V L

ggcagcattacctgacgaaa ccctacaagccgcgcttggc gagcagctgccagtattgac 720
L A A L P D E T L Q A A L G E Q L P V L

ctccaacaccctaggacgaa aggcgcttgtcaaacaactg agcgaagtgcggcagagtg 780
T S N T L G R K A L V K Q L S E V R Q S

cgttgccagcgatctggacg agcacattgatggcggtgtgc tcattcgcaacgcttttgga 840
G V A S D L D E H I D G V C S F A T L L

tacctacctcgggtattact ccctcgcgatcgtaatgccg agttccagagcgagcaagca 900
D T Y L G Y Y S L A I V M P S S R A S K

gtcagacttgatcaaaaaag ctctgctgcagagcaagctg aacatagagcgtgctatcgg 960
Q S D L I K K A L L Q S K L N I E R A I

ttgW

ccgcgcgtcgaagaaagctc cctagataagatggccagaa agacggcagctgaggcgaag 1020
G R A S K K A P * M A R K T A A E A K

gagacaagacagcgcattat tgatgcggcgcttgagggtg ttggtgcccagggtgttccc 1080
E T R Q R I I D A A L E V F V A Q G V P


```

gacgcgaccctagatcagat agctcgggaagggcagggcgtca cgcgtggtgctgtctactgg 1140
D A T L D Q I A R K A G V T R G A V Y W
cattttaacgggaagctgga agtgctccagggcgggtgctgg catctcggcagcatcccctc 1200
H F N G K L E V L Q A V L A S R Q H P L
gaattggactttactcctga cttaggtattgagcgttctt gggagggcgggtggttgtctcc 1260
E L D F T P D L G I E R S W E A V V V A
atgctggacgcccgtgcatag cccccagtcaaagcagttct cggagatcttgatttaccaa 1320
M L D A V H S P Q S K Q F S E I L I Y Q
gggcttgatgagtcgggcct gatccataatcgaatgggtgc aagcgagcgatcggttcctg 1380
G L D E S G L I H N R M V Q A S D R F L
cagtacattcgcctaagttct tcggcatgcggttacccaag ggggaattgcccataaatctg 1440
Q Y I R *

```

Figura IV.1. Localización y secuencia de los genes *ttgV* y *ttgW* de *P. putida* DOT-T1E. A. Las ORFs encontradas corriente arriba del operón *ttgGHI* se transcriben de manera divergente al operón de la bomba. B. Secuencia de *ttgV* y *ttgW*: en azul se muestran los codones de iniciación y en rosa los de parada de la traducción. En negro se muestra el resto de secuencia codificante para cada gen; en verde la zona intergénica entre *ttgV* y *ttgW*. La posición de los genes, según la numeración utilizada en la figura es la siguiente: *ttgV*, 206-985; *ttgW*, 991-1396. También se muestra la secuencia complementaria del comienzo del gen *ttgG* así como la zona intergénica. El número de acceso de esta secuencia en la base de datos de GenBank es AF299253. Los oligonucleótidos utilizados para su secuenciación se recogen en la Tabla M3 de Materiales y Métodos.

Se utilizó el programa BLASTX (Altschul et al., 1990 y 1997) para comparar las secuencias de las proteínas deducidas de estos genes con las bases de datos de proteínas TREMBL y SwissProt. El análisis nos permitió deducir que los productos de los genes *ttgV* y *ttgW* tenían alta similitud con reguladores de la transcripción descritos en distintos organismos:

El gen *ttgV* codificaría una proteína de 259 aminoácidos, que presenta alta similitud con los reguladores de la transcripción de la familia de IclR (Sunnarborg et al., 1990). En la Tabla IV.1 se muestra el porcentaje de identidad de TtgV con respecto a algunos miembros de la familia. El alineamiento de TtgV con algunas de estas proteínas se muestra en la Figura A.2 del Apéndice. La familia IclR de reguladores transcripcionales recibe su nombre de la proteína reguladora del operón del glicerol y del acetato de *E. coli*. Las proteínas de esta familia tienen un motivo hélice-giro-hélice (*helix-turn-helix*, HTH) en la región N-terminal, el cual se encuentra bastante conservado, mientras que la región C-terminal es muy heterogénea y se supone que representa el dominio al que el efector se une al regulador. Se debe resaltar que en el caso concreto de la comparación de TtgV con

IcIR se observó un cierto grado de identidad global entre los reguladores (30%), repartido a lo largo de la secuencia de las proteínas (Figura IV.2)

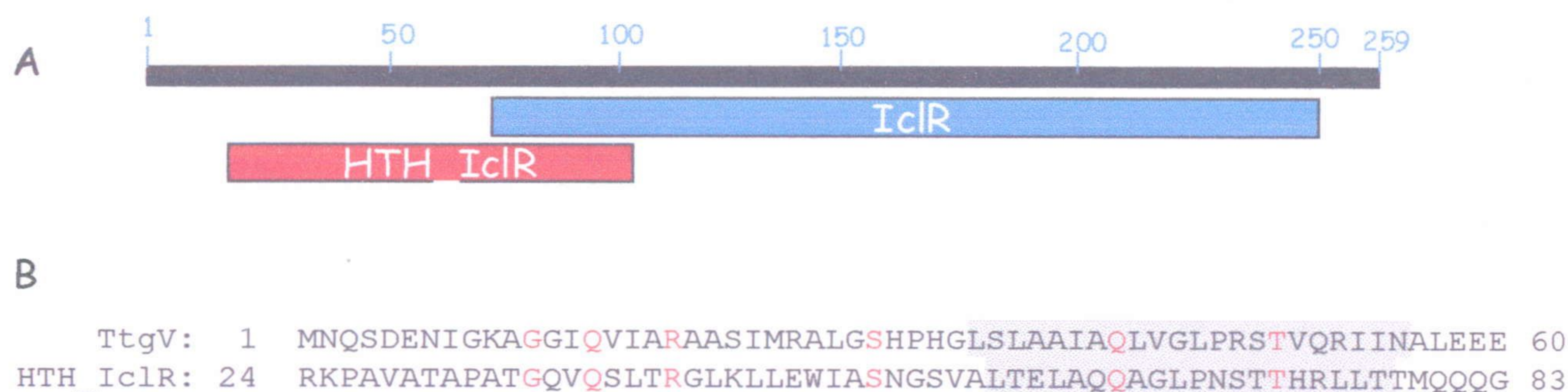


Figura IV.2. Dominios conservados de la familia IclR en TtgV. **A.** Esquema de los alineamientos de TtgV e IclR. La barra negra representa TtgV. En la región N-terminal de TtgV el programa informático BLAST encuentra una zona, que contiene el motivo HTH, similar al de la proteína IclR (en rojo) de *E. coli*; también se ha encontrado una zona con un cierto porcentaje de identidad con esta misma proteína que se extiende por la región C-terminal (en azul). **B.** Alineamiento del posible motivo HTH de TtgV (residuos desde el 36 al 55) con el descrito para IclR según el perfil de Swissprot ICLR ECOLI1 (residuos del 59 al 78), enmarcados en color gris. El dominio HTH de TtgV se ha predicho mediante el programa informático “Helix-turn.helix motif prediction” (Network Protein Sequence Analysis TIBS 2000). En rojo se han marcado los aminoácidos idénticos.

Tabla IV.1. Proteínas con las que TtgV comparte identidad en otras especies y cepas bacterianas. El porcentaje de identidad se da con respecto a la secuencia de aminoácidos de TtgV.

proteína	especie o cepa bacteriana	n° aminoácidos	% identidad	n° acceso	sistema que regula o junto al que se ha encontrado (referencia)
SrpS	<i>Pseudomonas putida</i> S12	259	96	AF06137	Bomba de eflujo <i>srpABC</i> (Dennis y Zylstra, 1999)
TtgT	<i>Pseudomonas putida</i> DOT-T1E	260	63	PPY19106	Bomba de eflujo <i>ttgDEF</i> (Mosqueda y Ramos, 2000)
SepR	<i>Pseudomonas putida</i> F1	260	63	U72354.2	Bomba de eflujo (Phoenix et al., 2003)
KdgR	<i>Erwinia chrysanthemi</i>	291	47	P37728	Genes de degradación de pectina (Reverchon et al., 1991)
PcaR	<i>Mesorhizobium loti</i>	256	45	NC 002678.1	Genes degradación <i>p</i> -hidroxibenzoato (Kaneko et al., 2000)

PcaR	<i>Pseudomonas putida</i>	291	29	Q52154	Genes degradación <i>p</i> -hidroxibenzoato (Romero-Steiner et al., 1994)
IclR	<i>Escherichia coli</i> K12	287	28	NC-000913.1	Ciclo del glioxilato (Sunnarborg et al., 1990)
PcaU	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	278	27	L05770.5	Genes de utilización de protocatecuato (Gerischer et al., 1998)
AttJ	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	275	24	AY052389.1	Recambio de moléculas de <i>quorum sensing</i> (Zhang et al., 2002)

El gen *ttgW* daría lugar a una proteína de 134 aminoácidos, con un dominio HTH similar al consenso establecido para los dominios HTH de las proteínas de la familia TetR (Baumeister et al., 1991; Hillen y Berens, 1994) (Figura IV.3). En la Tabla IV.2 se muestra el porcentaje de identidad en aminoácidos de TtgW con respecto a otras proteínas de la familia, y los alineamientos con algunas de ellas se muestran en la Figura A.2 del Apéndice.

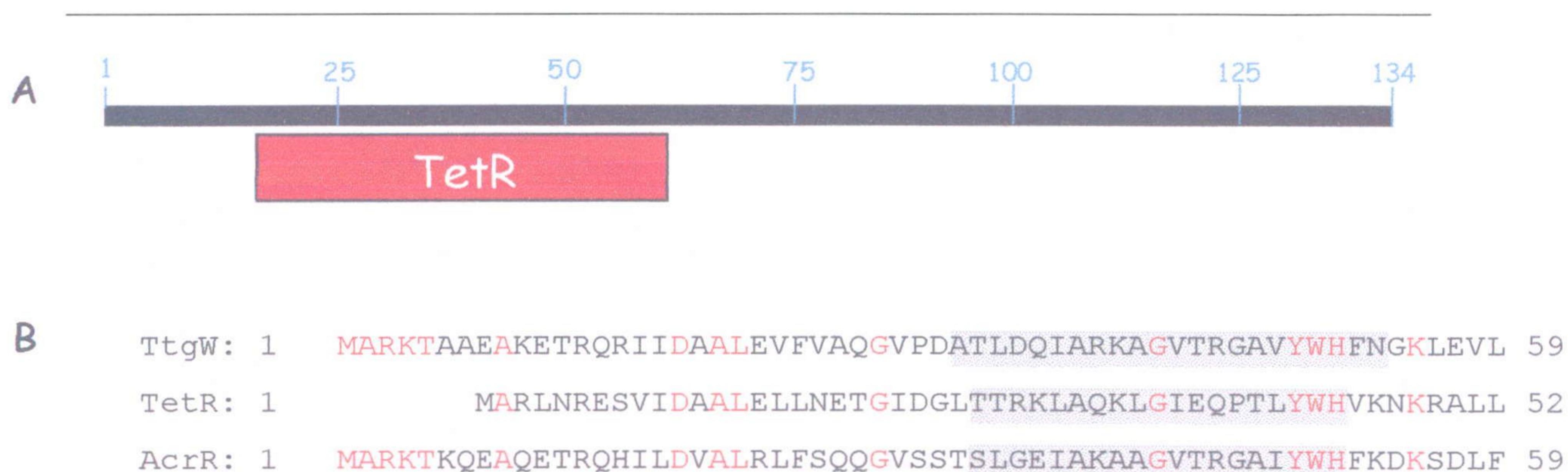


Figura IV.3. Dominios conservados de la familia TetR en TtgW. **A.** Esquema de los alineamientos significativos encontrados mediante el programa BLAST entre TetT y TtgW. La línea negra representa a TtgW. En la región N-terminal de TtgW el programa informático predijo una zona similar a la que contiene el dominio HTH de la proteína TetR (en rojo). **B.** Alineamiento del posible dominio HTH de TtgW (residuos desde el 32 al 53) predicho por el programa “Helix-turn-helix motif prediction” (Network Protein Sequence Analysis TIBS 2000) con los dominios HTH descritos para las proteínas TetR (Perfil de Swissprot TETR4 ECOLI12, residuos 26 al 44) y AcrR (perfil ACRR ECOLI1, residuos 33 al 51). Los dominios HTH se han encerrado en rectángulos grises. Se han señalado en rojo los aminoácidos idénticos.

Tabla IV.2. Proteínas con las que TtgW comparte identidad en otras especies y cepas bacterianas. El porcentaje de identidad se da con respecto a la secuencia de aminoácidos de TtgW.

proteína	especie o cepa bacteriana	n° aminoácidos	% identidad	n° acceso	sistema que regula o junto al que se ha encontrado (referencia)
SrpR	<i>Pseudomonas putida</i> S12	213	96	AF06137	Bomba de eflujo <i>srpABC</i> (Dennis y Zylstra, 1999)
AcrR	<i>Escherichia coli</i>	215	54	NC-000913.1	Bomba de eflujo <i>acrAB-tolC</i> (Ma et al., 1996)
ArpR	<i>Pseudomonas putida</i> KT2440	210	56	AE016779.1	Bomba de eflujo <i>arpABC</i> (Kieboom and de Bont, 2001)
TtgR	<i>Pseudomonas putida</i> DOT-T1E	210	56	AF238479.1	Bomba de eflujo <i>ttgABC</i> (Duque et al., 2001)
ThnB	<i>Streptomyces cattleya</i>	360	51	SCA421798	Conjunto de genes para la producción del antibiótico betalactámico carbapenem-tienamicina (Nuñez et al., 2003)
MtrR	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	210	46	P39897	Bomba de eflujo <i>mtrCDE</i> (Lucas et al., 1997)

TtgW	MARKTAAEA K ETRQR I I DAAL EVFVAQGV P DAT LQDIARKAGVTRGAVYWHFNGKLEVLQ	60
SrpR	MARKTAAEA E ETRQR I I DAAL EVFVAQGV S DAT LQDIARKAGVTRGAVYWHFNGKLEVLQ	60
TtgW	AVLASRQHPL E LDFTPDLGIER S WEAVVAMLD A VHSPQ S KQFSE ILIYQGLDESGLIHN	120
SrpR	AVLASRQHPL E LDFTPDLGIER S WEAVVAMLD A VHSPQ S KQFSE ILIYQGLDESGLIHN	120
TtgW	RMVQASDRFLQYI R *VLRHAVTQ G ELP INLDL H TSIGVFKGLITGLLYEGLRSKDQQ T QI	180
SrpR	RMVQASDRFLQYI H QVLRHAVTQ G ELP INLDL Q TSIGVFKGLITGLLYEGLRSKDQQ A QI	180
TtgW	IKVALGSF L ALLREP PRFLLC EEAQIKQ A K P FE	213
SrpR	IKVALGSF W ALLREP PRFLLC EEAQIKQ V K S FE	213

Figura IV.4. Alineamiento de la secuencia de aminoácidos de TtgW y SrpR Los aminoácidos que no se conservan se han marcado en azul. En el recuadro rojo, marcado con un asterisco se indica el codon de finalización de TtgW. La secuencia después de este punto sigue siendo casi idéntica a la de su homólogo SrpR.

Cabe destacar que TtgW parece ser una proteína truncada, puesto que sólo tiene 134 aminoácidos y los demás miembros de la familia tienen más de 200. La secuencia de TtgW después del codón de finalización se mantiene idéntica en un 96% respecto a la de SrpR (Figura IV.4), por tanto *ttgW* podría ser un pseudogen.

IV.2. Organización de los genes *ttgV* y *ttgW*.

El análisis de la secuencia de los genes *ttgV* y *ttgW* indicaba que probablemente formaban un operón, ya que entre el codón de finalización de *ttgV* y el ATG de *ttgW* sólo había 5 pares de bases de separación. Para comprobarlo se aisló el ARN total de *P. putida* DOT-T1E a partir de células en fase de crecimiento exponencial cultivadas en LB y se llevaron a cabo ensayos de RT-PCR. Los oligonucleótidos utilizados están basados en la secuencia del extremo 3' de *ttgV* y del 5' de *ttgW* (Figura IV.5.A). La amplificación entre los genes *ttgV* y *ttgW* dio lugar a una banda del tamaño predicho (Figura IV.5.B), indicando que estos genes probablemente se transcribían en un solo ARN mensajero.

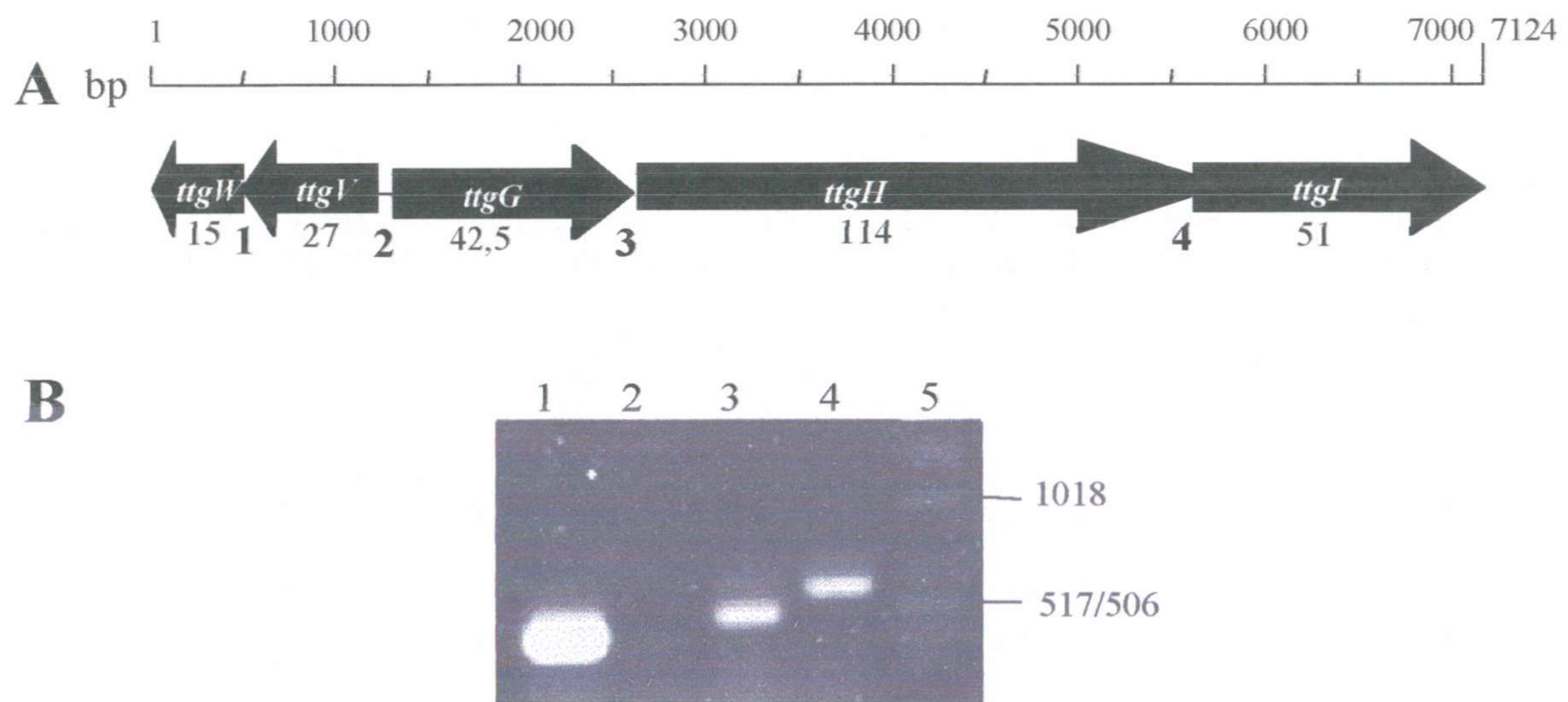


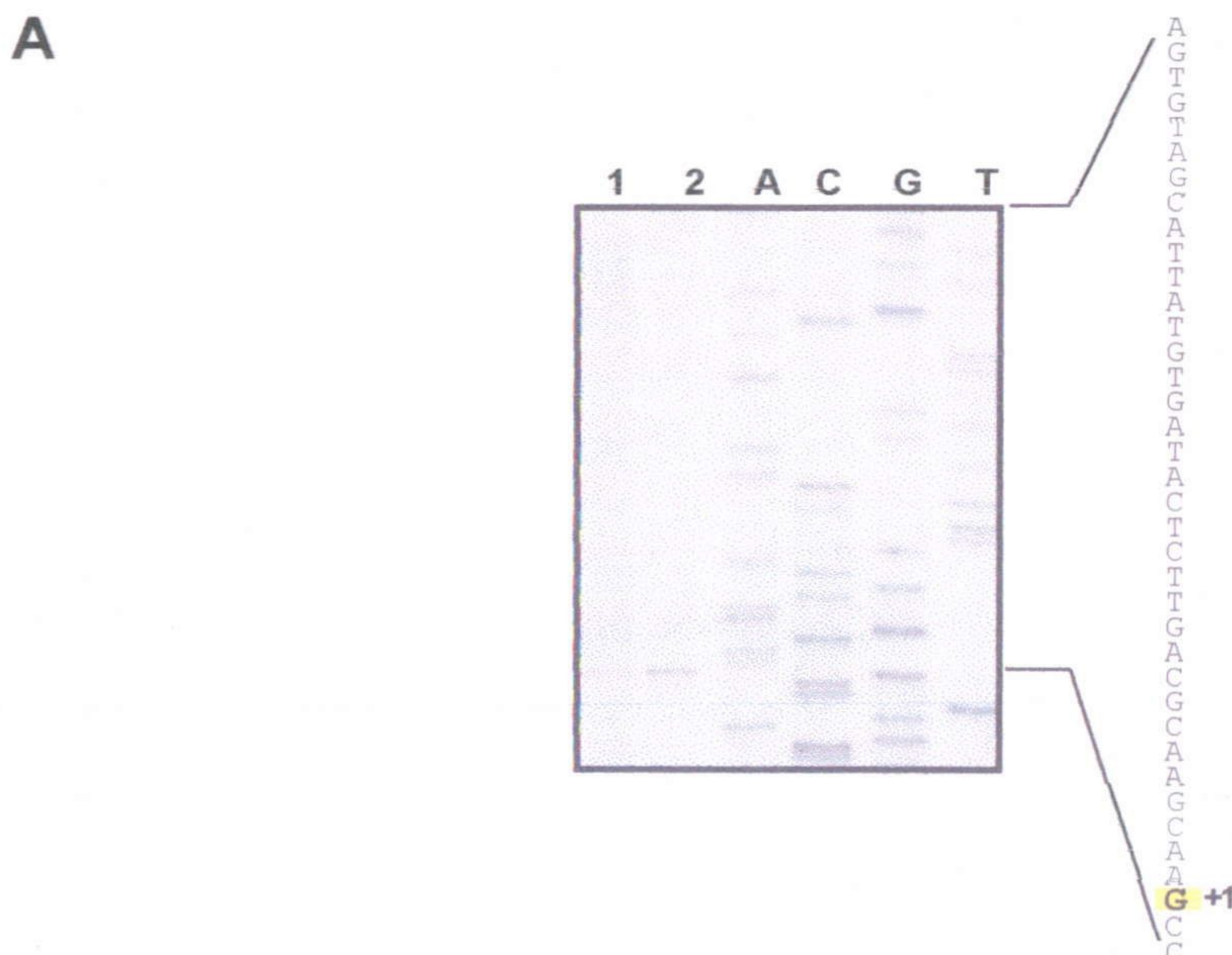
Figura IV.5. Organización física del agrupamiento génico *ttgGHI-ttgVW* y la evidencia de que *ttgV* y *ttgW* forman un operón. A. Esquema de cómo se organizan los dos operones divergentemente. El tamaño aproximado del producto de cada marco de lectura abierto se da en kilodaltons debajo de la flecha que representa a cada gen. B. El producto resultante de las distintas RT-PCR se separó en un gel de agarosa, como se describe en Materiales y Métodos. Calle 1, amplificación entre *ttgV-ttgW* (tamaño esperado de 398 pb); calle 2, amplificación entre *ttgV-ttgG* (tamaño esperado, 437pb); calle 3, amplificación entre *ttgG-ttgH* (tamaño esperado de 503 pb); calle

4, amplificación entre *ttgH-ttgI* (tamaño esperado de 606 pb); calle 5, marcador de peso molecular, con el tamaño de las bandas a la derecha. Las muestras a las que no se añadió retrotranscriptasa no mostraron amplificación alguna, indicando la ausencia de ADN contaminante en la reacción (no están incluidas en la fotografía)

También se muestra la RT-PCR de *ttgGHI* (Figura IV.5.B), que se utilizó como control positivo. Como era de esperar, entre *ttgG* y *ttgV* no hubo amplificación, y sí la hubo entre *ttgG* y *ttgH*, y entre *ttgH* y *ttgI*. Esto confirmaría que *ttgVW* y *ttgGHI* pertenecen a unidades transcripcionales diferentes.

IV.3. Análisis transcripcional del operón *ttgVW*

Para determinar el punto de iniciación de la transcripción del operón *ttgVW*, se utilizó la técnica de extensión a partir de cebador. El ARN mensajero se aisló de células cultivadas en presencia o en ausencia de tolueno. En este caso, el operón, independientemente de las condiciones de cultivo, tenía un único punto de iniciación de la transcripción que se correspondía con la base G situada a 128 bases de la A del primer codón de *TtgV* (Figura IV.6. A).



B



Figura IV.6. Punto de inicio de la transcripción del *ttgV* de *Pseudomonas putida* DOT-T1E cultivada con y sin tolueno. A. Mapa del punto de inicio de la transcripción de *ttgV*. El ARN para la calle 1 se aisló de células cultivadas en medio LB, mientras que el de la calle 2 procede de cultivos a los que se les suministraba tolueno a través de la fase gaseosa. Las otras calles corresponden a la escalera de secuencia. El punto de inicio de la transcripción está marcado en negrita sobre fondo amarillo y con +1. B. Solapamiento de los posibles promotores de *ttgV* (en verde) y *ttgG* (en rosa, P_{G1} y en morado P_{G2}). La dirección de la transcripción de los operones *ttgVW* y *ttgGHI* está marcada con flechas e indicado por la notación *ttgV* o *ttgG*. Los +1 del promotor sencillo de *ttgV* y de los dos promotores de *ttgG* están marcados con los respectivos colores y se les ha designado +1 P_V , +1 P_{G1} , y +1 P_{G2} . Las cajas -10 y -35 propuestas de cada promotor están encerradas en rectángulos de los colores respectivos: P_{G1} en rosa, P_{G2} en morado y P_V en verde.

El extremo 5' del ARN mensajero de *ttgVW* empieza en la G marcada como +1 en la secuencia que se muestra en la Figura IV.6.A. Las regiones -10 y -35 del promotor P_V mostraron baja similitud con los promotores reconocidos por el factor σ^{70} de la RNA-polimerasa: región -10 (5'-TGACGC-3') y región -35 (5'-TGTAGC-3'). La localización de los sitios de inicio de la transcripción de *ttgV* y *ttgG* indicaban que estos promotores divergentes solapaban (Figura IV.6.B). De hecho, las cajas -10 y -35 del promotor P_V solapaban totalmente con las cajas -35 y -10 del promotor P_{G2} , respectivamente (Figura IV.6.B).

La intensidad de las bandas de cADN, determinada densitométricamente, en la Figura IV.6.A se utilizó para estimar variaciones en la expresión de *ttgV* en ausencia de tolueno o en su presencia. Se observó que cuando el tolueno estaba presente, el nivel de expresión del operón *ttgVW* fue entre 3 y 4 veces mayor que en ausencia del hidrocarburo aromático. Como se vio en el Capítulo I, el nivel de expresión del operón *ttgGHI* también aumentaba entre 3 y 4 veces en presencia de tolueno.

IV. 4. Análisis de la inducción del operón *ttgVW*

Los resultados presentados en el Capítulo III, indicaban que la bomba *ttgGHI* transportaba distintos hidrocarburos aromáticos. Por ello decidimos determinar si alguno de ellos era capaz de inducir la expresión del operón *ttgVW*. Para esta serie de ensayos construimos el plásmido pANA95, el cual porta la región promotora de *ttgV* fusionada al gen de la β -galactosidasa (*lacZ*) carente de promotor, en el vector de bajo número de copias pMP220 (ver Materiales y Métodos). pANA95 se transfirió a *P. putida* DOT-T1E y se realizaron medidas de actividad β -galactosidasa en células cultivadas en medio LB al que le añadíamos 3 mM de los siguientes compuestos: benceno, tolueno, *p*-xileno, etilbenceno, propilbenceno; 1,5 mM de estireno; o concentraciones subletales de cloramfenicol y ampicilina. Los resultados se muestran en la Figura IV.7.

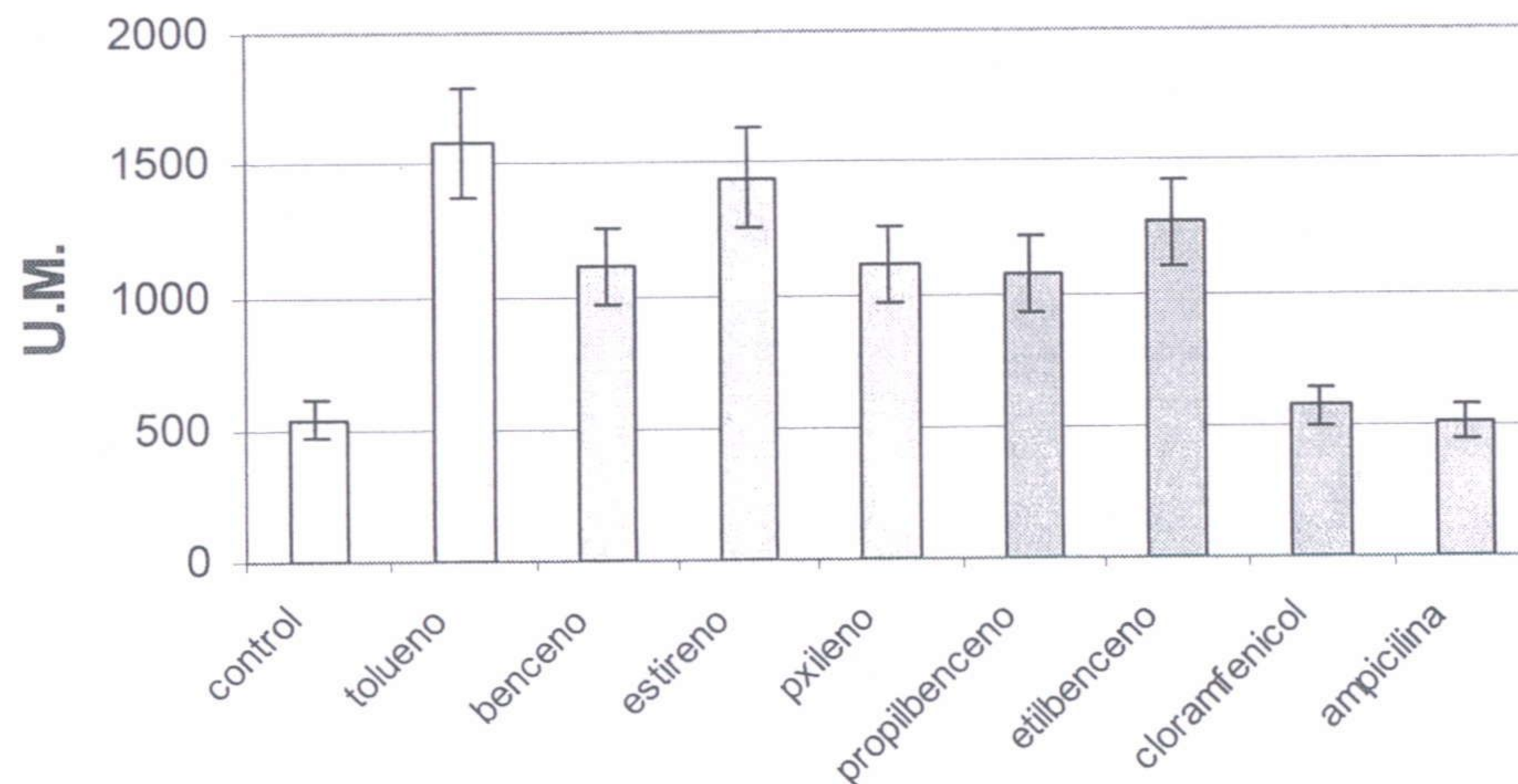


Figura IV.7. Expresión del operón *ttgVW* con distintos efectores. Cultivos de *P. putida* DOT-T1E (pANA95) en medio LB se suplementaron con concentraciones subletales de los disolventes (3mM, excepto de estireno, que se usó a una concentración de 1,5 mM). En el caso de los antibióticos, se utilizaron también en concentraciones subletales: 15 μ g/ml de cloramfenicol y 50 μ g/ml de ampicilina. Tras 4-6 horas de incubación los cultivos alcanzaron la fase exponencial tardía y entonces se determinó la actividad β -galactosidasa. Los resultados se dan en unidades Miller, y son el resultado de al menos 3 medidas independientes en otros tantos experimentos independientes. La desviación estándar es menor del 20% en todos los casos.

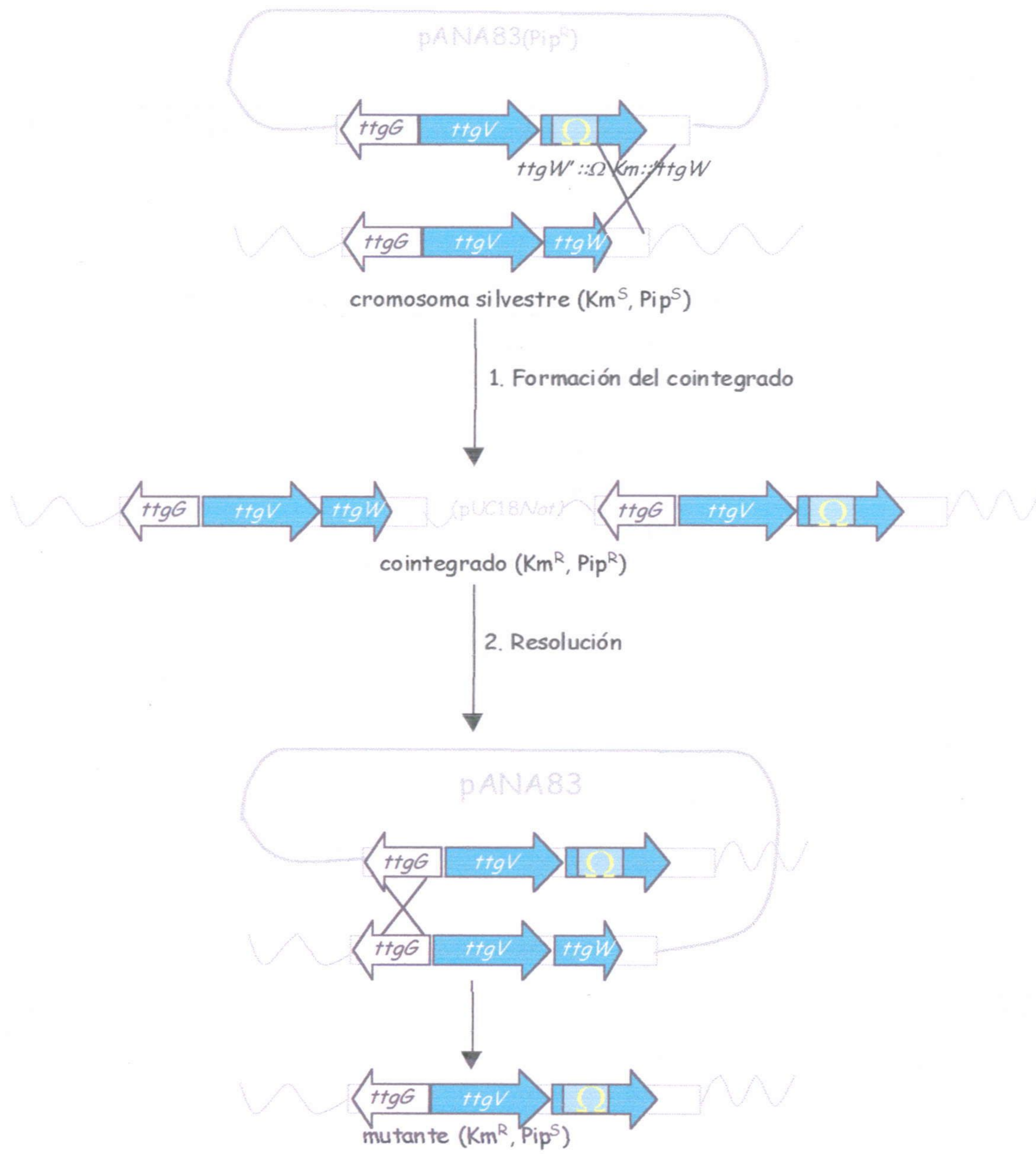
Observamos que el promotor P_V sigue el mismo patrón de expresión que el que se determinó para los promotores de *ttgG* en el Capítulo III: su expresión se vio aumentada de 2 a 3 veces en presencia de los disolventes orgánicos empleados en el ensayo; y como ocurría también con *ttgG*, no se indujo con los antibióticos ensayados (cloramfenicol y ampicilina).

IV.5. Inactivación de los genes *ttgV* y *ttgW*

Basándonos en el análisis de secuencia, TtgV y TtgW, podrían ser los reguladores transcripcionales de la bomba *ttgGHI*. Para demostrar que efectivamente TtgV y TtgW regulaban la expresión de la bomba, nos propusimos construir diferentes mutantes en los genes *ttgV* y *ttgW*.

Para generar un mutante en *ttgW* se electroporó el plásmido pANA83 en *P. putida* DOT-T1E y seleccionamos la cepa mutante por su resistencia a Km. El plásmido pANA83 porta un fragmento de 4.5 Kbp (*Bam*HI-*Eco*RV) que contiene *ttgW* interrumpido por el casete Ω -Km (Prentki y Krisch, 1984) (Figura IV.8.A). En la Figura IV.8.A se muestra un esquema de cómo se realizó el reemplazamiento génico. El primer evento de recombinación se produjo entre la secuencia de aproximadamente 2,5 Kbp situada corriente abajo del interposón Ω -Km en el plásmido pANA83 y su secuencia homóloga en el cromosoma de *P. putida* DOT-T1E, formándose un cointegrado. El merodiploide crecía en medio LB con kanamicina (Km) y piperacilina (Pip). El segundo hecho de recombinación se produjo aguas arriba del casete Ω -Km, generando la cepa mutante que se identificó por su resistencia a Km y sensibilidad a Pip. La correcta integración del interposón en el gen *ttgW* se comprobó mediante hibridación en *Southern* (Figura IV.8.B y C), en condiciones estrictas (65 °C). El ADN cromosómico del silvestre, merodiploide y resuelto se cortó con el enzima de restricción *Bam*HI, y se utilizó como sonda un fragmento de ADN de 1103 pb que incluye parte de *ttgW* y de *ttgV* (Materiales y Métodos). El mutante resultante en *ttgW* se llamó *P. putida* DOT-T1E-PS52.

A



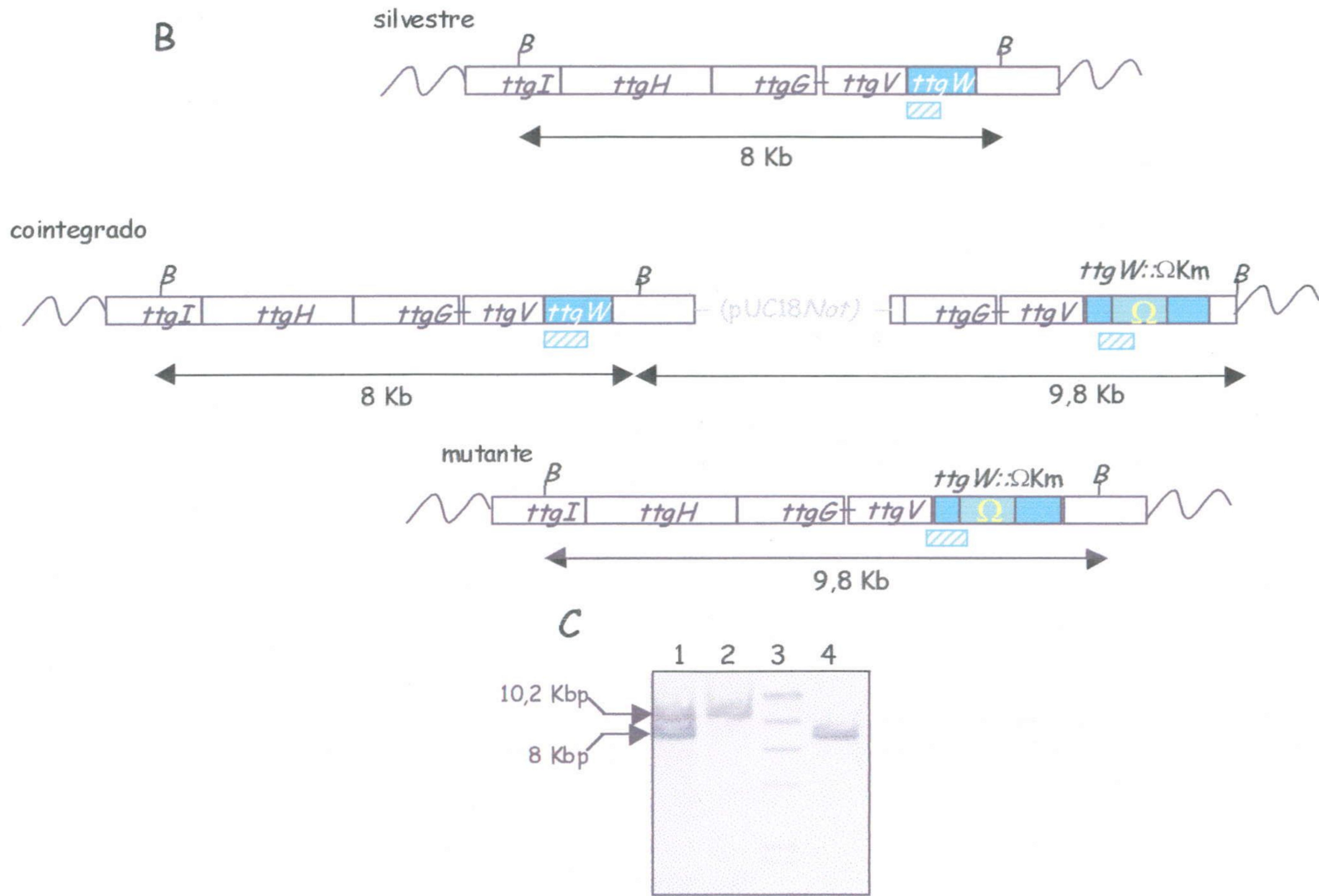
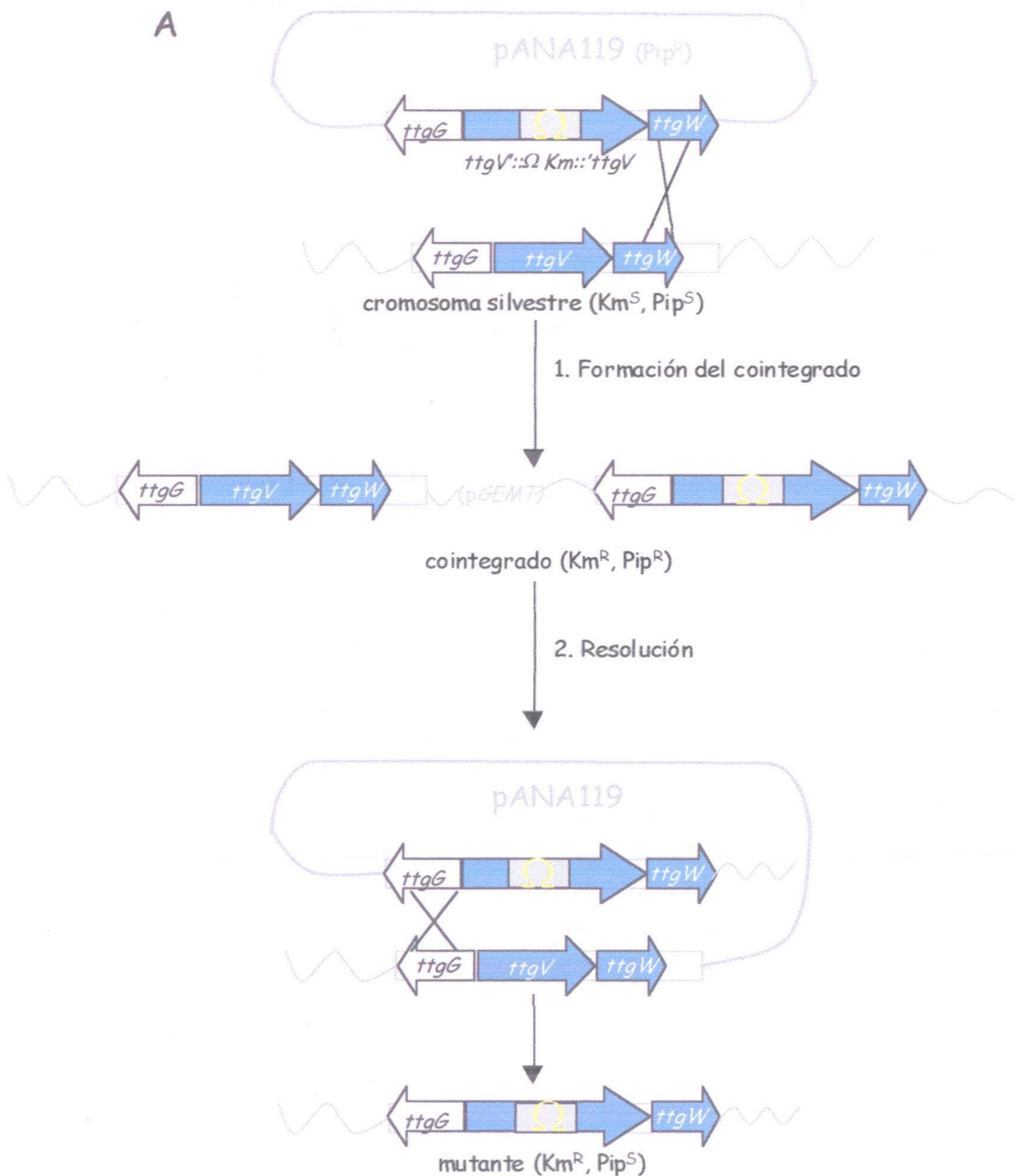


Figura IV.8. Estrategia seguida para la construcción del mutante *P. putida* DOT-T1E PS52 y comprobación mediante hibridación de ADN de la interrupción del gen *ttgW*. A. Pasos seguidos para provocar el reemplazamiento génico, según se explica en el texto. B. Esquema de los fragmentos de restricción *Bam*HI de la zona del cromosoma y del plásmido pANA83 a los que se uniría la sonda de *ttgW* en la hibridación. En el silvestre la sonda marcada se uniría al fragmento de 8 Kbp que contiene el gen *ttgW* silvestre; en el cointegrado la sonda se seguiría uniendo a la zona intacta del cromosoma que contiene el gen *ttgW*, pero a la vez se uniría al fragmento *Bam*HI de aproximadamente 10 Kbp que incluye el interposón Ω -Km. En el mutante sólo tenemos la región de 8 Kbp interrumpida por el interposón (2,2 Kbp), por lo que se espera un fragmento en la hibridación de aproximadamente 10 Kbp. C. Análisis mediante hibridación de la región de ADN donde se encuentra el gen *ttgW*. El ADN de la cepa silvestre (calle 4) y del cointegrado (calle 1) y resuelto (calle 2) digerido con *Bam*HI se separó mediante electroforesis en gel de agarosa y se transfirió a una membrana de *nylon*. En el margen izquierdo de la figura se indican los tamaños de los fragmentos obtenidos. En la calle 4 se observa una sola banda correspondiente a la hibridación de la sonda con el ADN de la cepa silvestre. En la calle 3 se ha corrido un patrón de peso molecular marcado con digoxigenina (marcador II-dig de Roche), del que se ven 6 fragmentos en la figura, de 23.1, 9.4, 6.6, 4.4, 2.3, y 2.0 Kpb, de arriba a abajo.

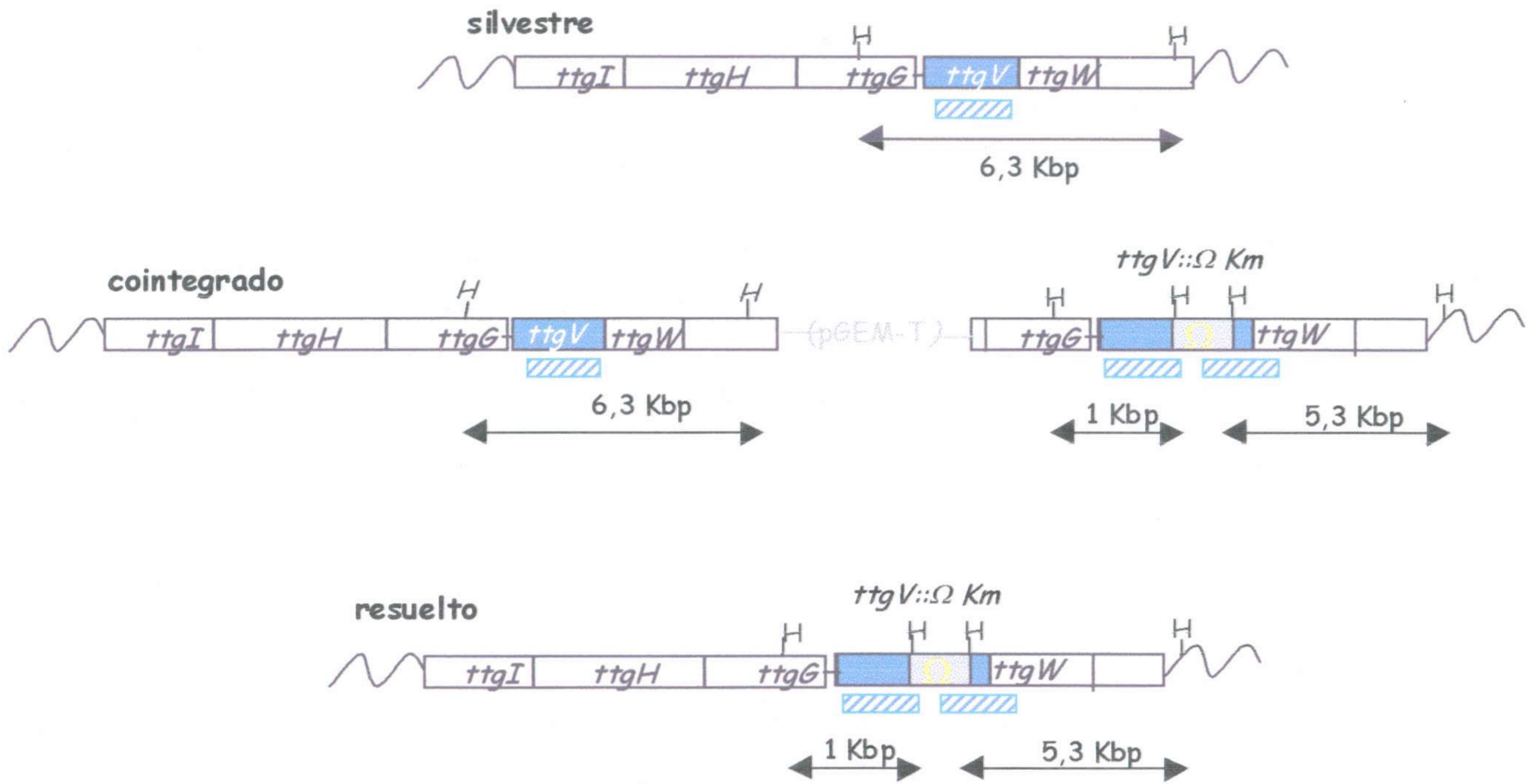
Como *ttgV* y *ttgW* forman un operón, un mutante polar en *ttgV* sería en realidad un doble mutante (*ttgV* *ttgW*). Construimos un mutante polar en *ttgV* mediante la inserción de un casete en el que las señales de parada de la transcripción que porta afectan también a *ttgW*. Para obtener el mutante sencillo en *ttgV* fue

necesario introducir en el mismo el casete *aphA* de resistencia a Km que genera mutaciones no polares (ver Materiales y Métodos).

Para la construcción de un mutante polar en *ttgV* se utilizó también el interposón Ω -Km. En este caso se electroporó el plásmido pANA119, con el gen *ttgV* interrumpido por el interposón (según se explica detalladamente en Materiales y Métodos y se esquematiza en la Figura IV.9.A) en la cepa silvestre *P. putida* DOT-T1E. El intercambio génico se comprobó como se ha explicado anteriormente, mediante hibridación en *Southern* (Figura IV.9.B y C). La cepa mutante *ttgV*⁻ *ttgW* obtenida fue denominada *P. putida* DOT-T1E-PS61



B



C

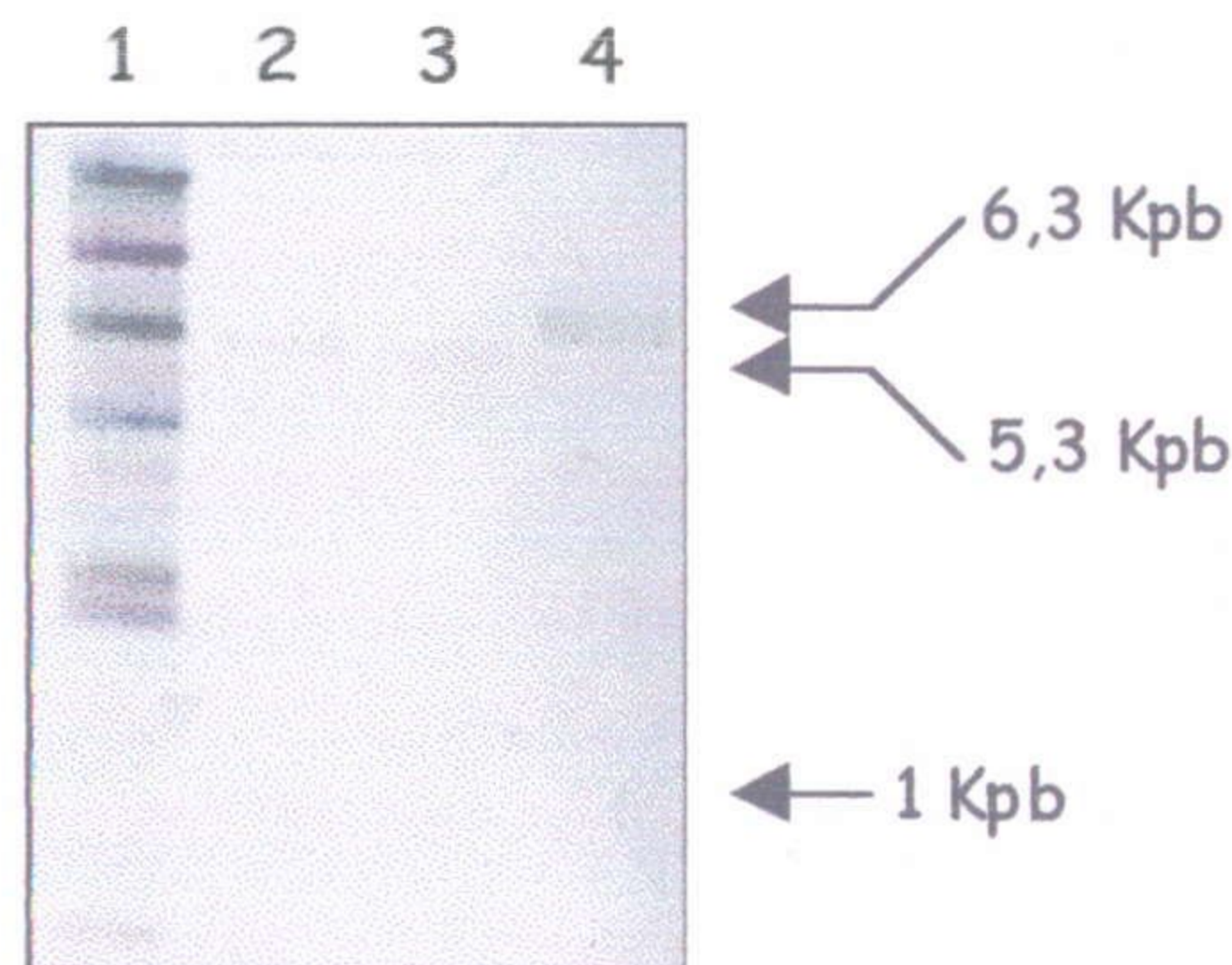
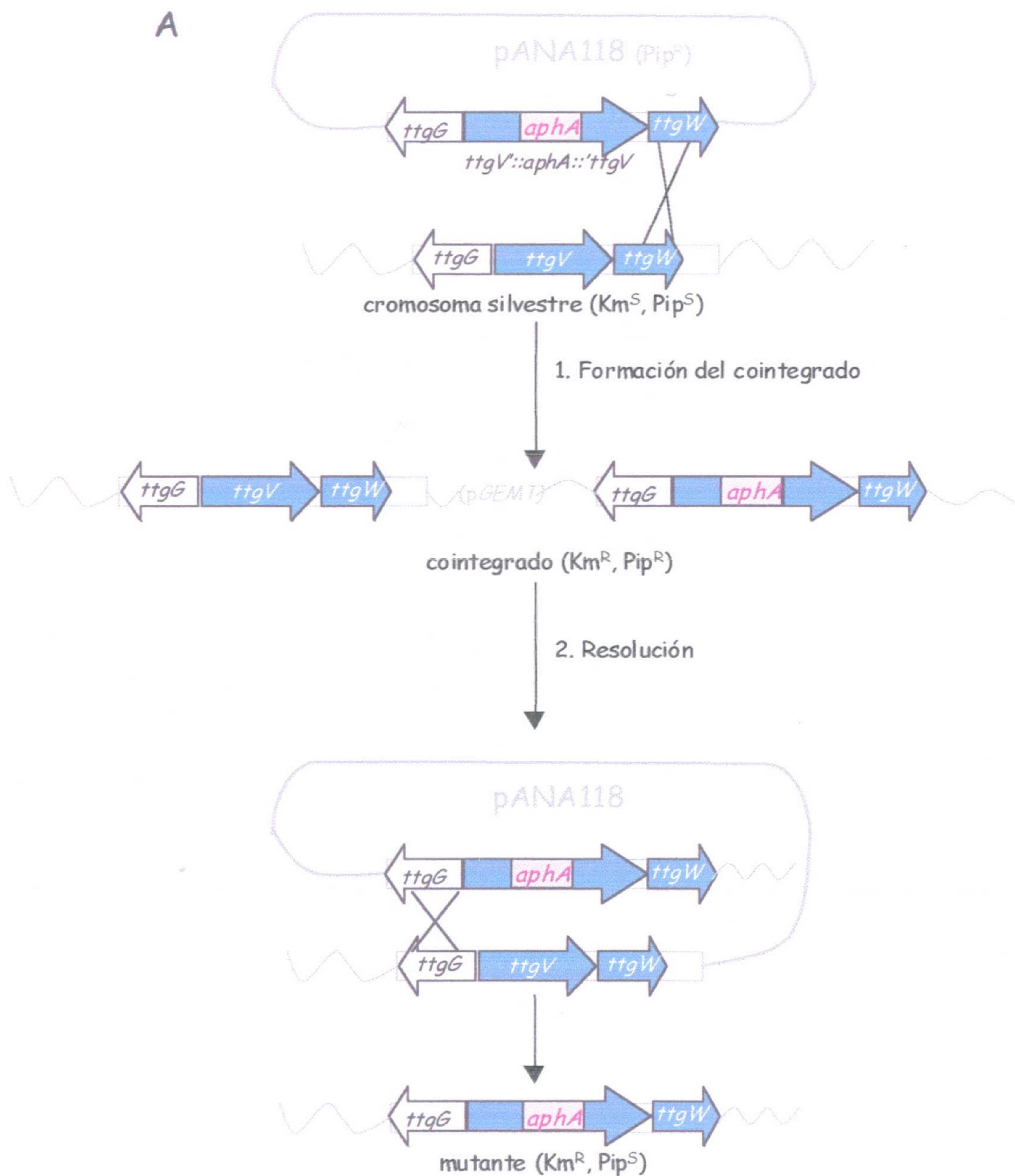


Figura IV.9. Estrategia seguida para la construcción del mutante *P. putida* DOT-T1E-PS61 y comprobación mediante hibridación de ADN de la interrupción del gen *ttgV*. A. Pasos seguidos para provocar el reemplazamiento génico: según se explica en el texto. B. Esquema de los fragmentos de restricción *Hind*III de la zona del cromosoma y del plásmido pANA119 a los que se uniría la sonda de *ttgV* en la hibridación. En el silvestre la sonda marcada se uniría al fragmento de 6,3 Kbp que contiene el gen *ttgV* silvestre; en el cointegrado la sonda se seguiría uniendo a la zona intacta del cromosoma que contiene el gen *ttgV*, pero a la vez se uniría a dos fragmentos *Hind*III en los que queda dividida la región con la que hibridaría la sonda, de aproximadamente 5,3 Kbp que queda después y de 1 Kbp que queda antes del interposón. En el mutante la sonda hibridaría también con los dos fragmentos en los que el interposón divide al gen *ttgV*. C. Análisis mediante hibridación de la región de ADN donde se encuentra el gen *ttgV*. El ADN de la cepa silvestre (calle 4) y de dos mutantes (calles 2 y 3) digerido con *Hind*III se separó mediante electroforesis en gel de agarosa y se transfirió a una membrana de nylon. En el margen derecho de la figura se indican los tamaños de los fragmentos obtenidos. Obtuvimos dos mutantes, en las calles 2 y 3. En la calle 1 se ha corrido un patrón de peso molecular marcado con digoxigenina (marcador II-dig de Roche), del que se ven 6 fragmentos en la figura, de 23.1, 9.4, 6.6, 4.4, 2.3, y 2.0 Kpb, de arriba a abajo.

El proceso de construcción del mutante no polar en *ttgV* fue igual que el explicado en los dos casos anteriores, pero electroporando el plásmido pANA118 (ver Materiales y Métodos) que contiene el gen *ttgV* interrumpido por el casete *aphA* (Ménard et al.,1993) La comprobación del genotipo mutante también se realizó mediante hibridación en *Southern* (Figura IV.10). Utilizamos la misma sonda de ADN para la hibridación que cuando comprobamos la cepa mutante *P. putida* DOT-T1E-PS61. La cepa así obtenida se llamó *P. putida* DOT-T1E-PS62. En la Tabla IV.3 se resumen las características de cada una de las cepas mutantes en los reguladores construidas en este capítulo.



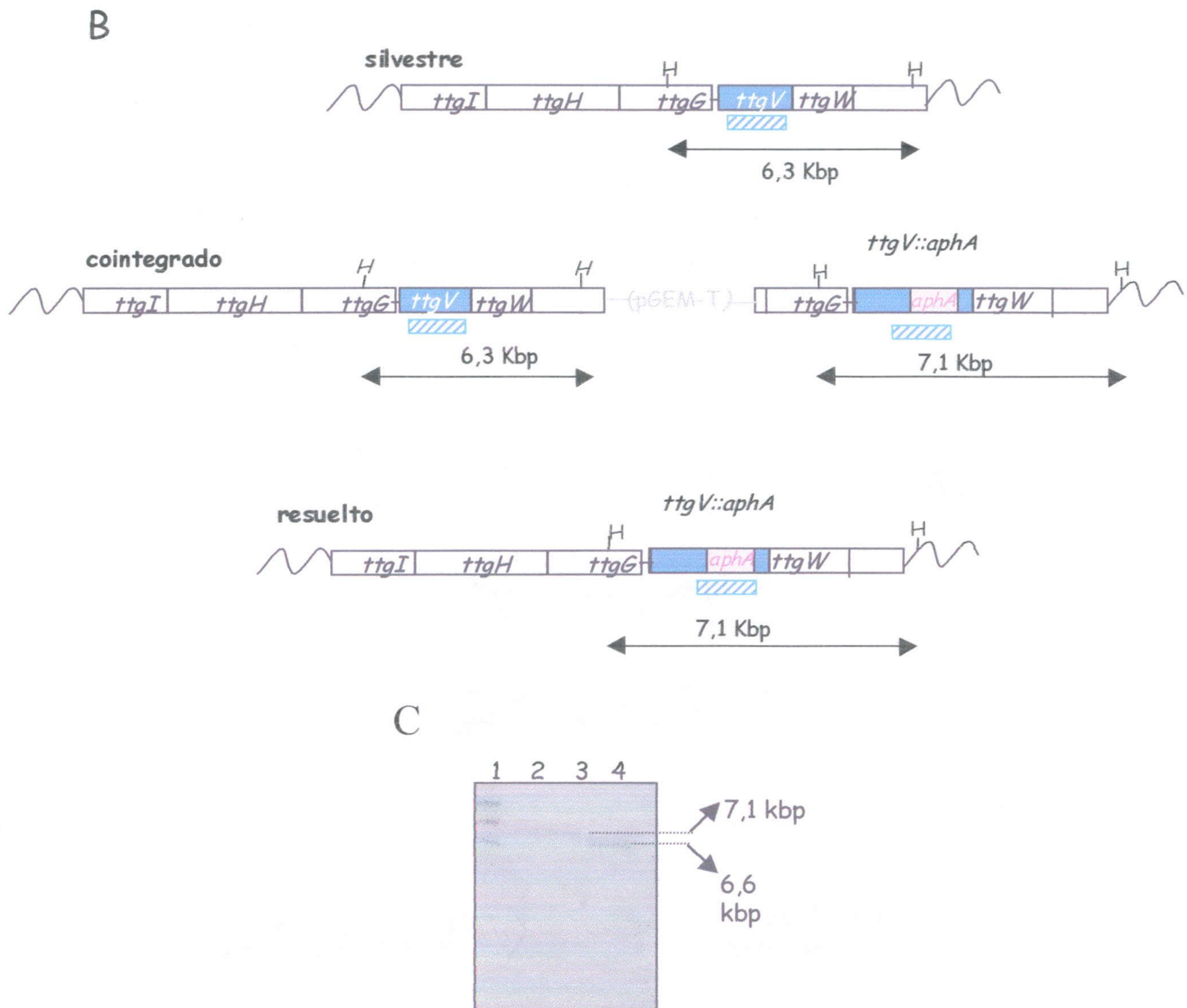


Figura IV.10. Estrategia seguida para la construcción del mutante no polar *P. putida* DOT-T1E-PS62 y comprobación mediante hibridación de ADN de la interrupción del gen *ttgV*. A. Pasos seguidos para provocar el reemplazamiento génico: según se explica en el texto. **B.** Esquema de los fragmentos de restricción *Hind*III de la zona del cromosoma y del plásmido pANA118 a los que se uniría la sonda de *ttgV* en la hibridación. En el silvestre la sonda marcada se uniría al fragmento de 6,3 Kbp que contiene el gen *ttgV* silvestre; en el cointegrado la sonda se seguiría uniendo a la zona intacta del cromosoma que contiene el gen *ttgV*, pero a la vez se uniría al gen *ttgV* interrumpido por el casete no polar (0,8 Kbp), dando lugar a una banda de hibridación de aproximadamente 7,1 Kbp. En el mutante sólo tendríamos la banda con *ttgV* interrumpido (7,1 Kbp). **C.** Análisis mediante hibridación de la región de ADN donde se encuentra el gen *ttgV*. El ADN de la cepa silvestre (calle 4) y de los resueltos (calles 2 y 3) digerido con *Hind*III se separó mediante electroforesis en gel de agarosa y se transfirió a una membrana de *nylon*. En el margen derecho de la figura se indican los tamaños de los fragmentos obtenidos. Obtuvimos dos mutantes, en las calles 2 y 3. En la calle 1 se ha corrido un patrón de peso molecular marcado con digoxigenina (marcador II-dig de Roche), del que se ven 3 fragmentos en la figura, de 23,1, 9,4, 6,6 Kpb, de arriba abajo.

Tabla IV.3. Mutantes de *P. putida* DOT-T1E en los genes reguladores *ttgV* y *ttgW*.

	mutación	genotipo
DOT-T1E-PS52	<i>ttgW::Ω-Km</i>	<i>ttgV⁺, ttgW⁻</i>
DOT-T1E-PS61	<i>ttgV::Ω-Km</i>	<i>ttgV⁻, ttgW⁻</i>
DOT-T1E-PS62	<i>ttgV::aphA</i>	<i>ttgV⁻, ttgW⁺</i>

IV.6.- Efecto de las mutaciones en *ttgV* y *ttgW* sobre la expresión de los operones *ttgGHI* y *ttgVW*

Si TtgV y TtgW eran efectivamente proteínas reguladoras de la expresión de la bomba *ttgGHI*, la inactivación de las mismas debería reflejarse en cambios en los niveles de expresión del operón de la bomba. Puesto que los promotores propuestos tanto de la bomba como de los genes reguladores solapan, era lógico pensar que pudieran tener una regulación común. Para ver el efecto que las mutaciones en *ttgV* y *ttgW* tenían en la expresión de *ttgGHI* y *ttgVW* utilizamos las fusiones de los correspondientes promotores al gen de la β -galactosidasa en pANA95 ($P_V::lacZ$) y pANA96 ($P_{G1,G2}::lacZ$; ver Capítulo III). Electroporamos estas dos construcciones en las tres cepas mutantes *P. putida* DOT-T1E-PS52, *P. putida* DOT-T1E-PS61 y *P. putida* DOT-T1E-PS62 y se determinó la actividad β -galactosidasa en presencia y en ausencia de 3 mM de tolueno (Tabla IV.4). En ausencia de tolueno encontramos que la expresión de *ttgGHI* fue alrededor de 4 veces mayor en la cepa *P. putida* DOT-T1E-PS62 que en la cepa silvestre. Esto indicaba que TtgV actúa como un represor que limita la expresión del operón *ttgGHI*. La expresión desde el promotor P_V fue también alrededor de 3 veces mayor en esta cepa mutante que en la silvestre, indicando que TtgV controla negativamente su propia expresión (Tabla IV.4).

Tabla IV.4. Transcripción desde los promotores de los operones *ttgVW* y *ttgGHI*. *P. putida* DOT-T1E y sus mutantes fueron electroporados con pANA95 ($P_{ttgV}::lacZ$) o pANA96 ($P_{ttgG}::lacZ$), y se cultivaron en LB con y sin tolueno. La actividad β -galactosidasa se midió 4 horas después en muestras por duplicado. Los datos son valores redondeados de medias de al menos 3 ensayos independientes.

Construcción y cepa	Fondo genético	actividad β -galactosidasa y condiciones de cultivo	
		- tolueno	+ tolueno
$P_{ttgG}::lacZ$			
cepa silvestre	V ⁺ W ⁺	320 ± 20	1400 ± 60
PS62	V ⁻ W ⁺	1100 ± 120	1600 ± 250
PS61	V ⁻ W ⁻	1350 ± 120	1500 ± 130
PS52	V ⁺ W ⁻	470 ± 50	1230 ± 70
$P_{ttgV}::lacZ$			
cepa silvestre	V ⁺ W ⁺	440 ± 80	1600 ± 30
PS62	V ⁻ W ⁺	1100 ± 200	1420 ± 200
PS61	V ⁻ W ⁻	1050 ± 150	1720 ± 180
PS52	V ⁺ W ⁻	470 ± 30	1310 ± 190

La expresión desde los promotores de *ttgG* y *ttgV* en el fondo mutante *P. putida* DOT-T1E-PS52, deficiente en TtgW, pero en el que sí está presente TtgV, fue similar a la medida en la cepa silvestre (Tabla IV.4), lo que sugería que la proteína TtgW, bajo las condiciones de nuestro ensayo, no juega ningún papel en la regulación de ninguno de estos dos operones. El nivel de expresión desde los promotores de *ttgG* y *ttgV* en el fondo mutante *P. putida* DOT-T1E-PS61 (*ttgV*, *ttgW*), fue similar al que obtuvimos para el mutante *P. putida* DOT-T1E-PS62 (*ttgV*, *ttgW*⁺) (Tabla IV.4), lo que confirma la ausencia de actividad reguladora de *ttgW* en nuestras condiciones de ensayo.

Para confirmar que TtgV es un represor de la expresión de la bomba y de su propia síntesis, se midió la actividad β -galactosidasa de los plásmidos pANA95 y pANA96 en el hospedador heterólogo *Escherichia coli* DH5 α F', con o sin el plásmido pANA126, que sobreproducía TtgV (ver Materiales y Métodos). Encontramos que en los casos en los que se sobreproducía TtgV la expresión desde

P_{ttgG} y P_{ttgV} fue del 10 al 20% menor del nivel que medíamos en la cepa sin TtgV, lo que confirmaba que TtgV es un represor de la expresión de los dos operones.

IV.7. Fenotipo de los mutantes en los reguladores TtgV y TtgW

En los Capítulos I y III se describió que la bomba de eflujo TtgGHI está implicada tanto en la tolerancia intrínseca como en la inducida frente a disolventes orgánicos. Dado que la expresión desde P_{ttgG} aumentó en los mutantes deficientes en la proteína TtgV, se decidió analizar la tolerancia a tolueno en las tres cepas mutantes determinando la supervivencia a un choque con 0,3% (vol/vol) de tolueno en células cultivadas con o sin tolueno en fase gaseosa. La cepa *P. putida* DOT-T1E-PS52 (TtgV⁺W⁻) sobrevivió al choque de tolueno en el mismo grado que la cepa silvestre (Figura IV.11.A y B). La supervivencia cuando las células no habían sido preinducidas con tolueno fue alrededor de 1 célula entre 10.000; mientras que casi entre el 50 y el 100% de las células sobrevivió al choque cuando los cultivos habían sido preinducidos con tolueno en fase gaseosa.

En el mutante *P. putida* DOT-T1E-PS62 (*ttgV ttgW*⁺) y en el doble mutante *P. putida* DOT-T1E-PS61 (*ttgV ttgW*), se observó un incremento en la supervivencia de los cultivos sin preinducir de alrededor de dos órdenes de magnitud, alcanzando los mismos niveles de supervivencia que presentaba el cultivo cuando las células habían sido preinducidas con concentraciones subletales de tolueno (Fig. IV.11.A, C y D).

Los resultados del Capítulo III indicaban que la bomba TtgGHI participaba en la resistencia a ampicilina, cloramfenicol y tetraciclina, pero que su efecto se veía solamente en un fondo mutante *ttgB*⁻. Esto indicaba un papel poco significativo de la bomba TtgGHI en el transporte de antibióticos. Hemos comparado la sensibilidad de la cepa mutante con la de los mutantes construidos en los reguladores, determinando la concentración mínima inhibitoria de antibiótico (MIC, ver Materiales y Métodos) que limita el crecimiento. No se encontraron diferencias significativas en cuanto a resistencia a antibióticos entre la cepa silvestre y los tres mutantes en estudio (*P. putida* DOT-T1E-PS52, *P. putida* DOT-T1E-PS61 y *P. putida* DOT-T1E-PS62).

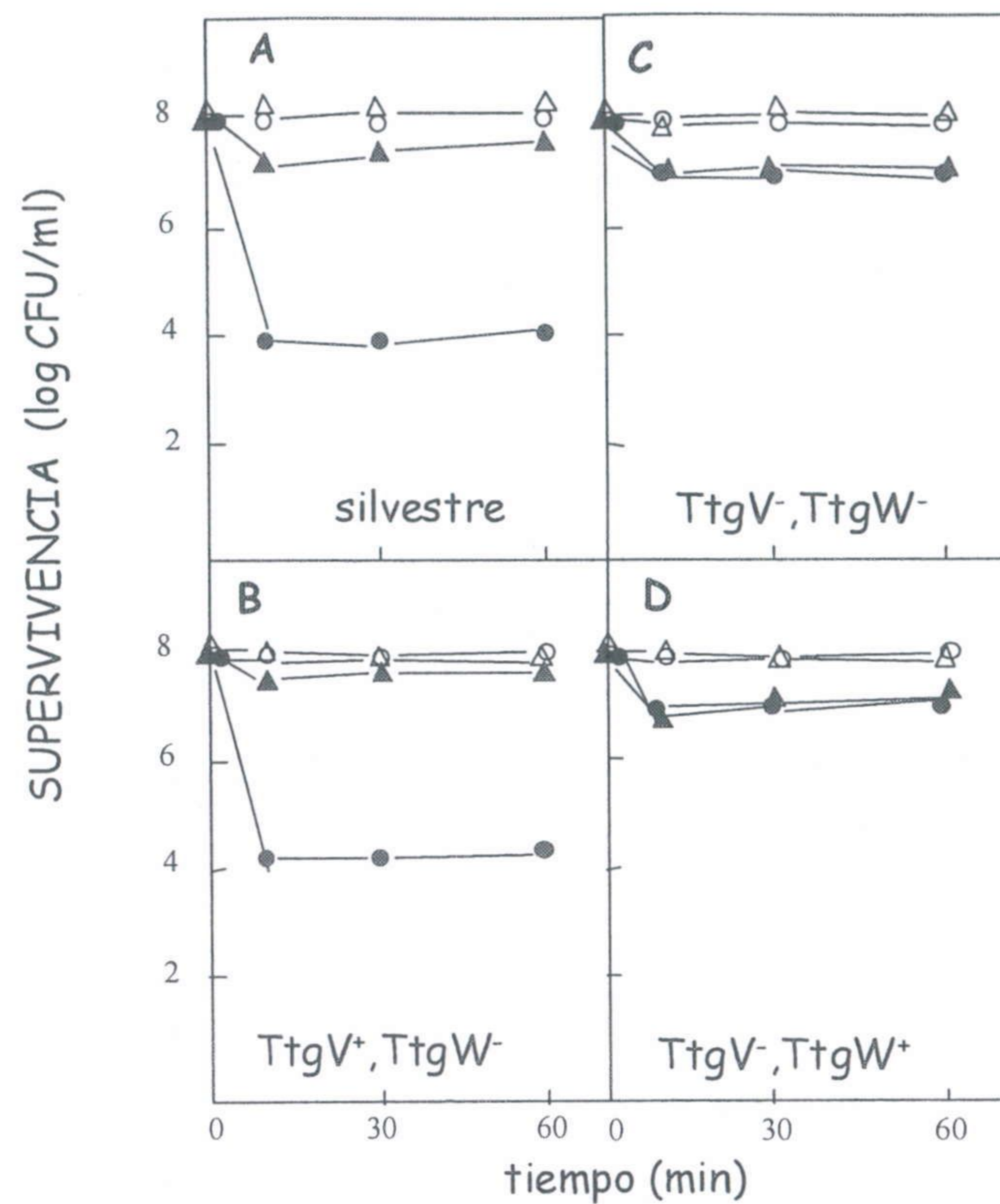


Figura IV.11. Supervivencia al choque con 0,3% (vol/vol) de tolueno. *P. putida* DOT-T1E (A), DOT-T1E-PS52 (B), DOT-T1E-PS61 (C) DOT-T1E-PS62 (D). Las células se cultivaron en medio LB (círculos) o en LB con tolueno en fase gaseosa (triángulos) hasta que los cultivos alcanzaban una turbidez de 0,8 a 660 nm. Cada cultivo se dividió en dos alícuotas: a una se le añadía 0,3% (vol/vol) de tolueno (símbolos cerrados), mientras que la otra se mantenía como control (símbolos abiertos). El número de células viables se determinó antes del choque, y a los 10, 30 y 60 minutos.

IV.8. Purificación de (His)₆-TtgV

Con el fin de estudiar con más detalle la regulación que ejerce TtgV sobre el operón *ttgGHI* y sobre el propio operón *ttgVW* procedimos a realizar análisis *in vitro* de unión de la proteína TtgV purificada a la región de ADN que contiene los promotores de *ttgV* y *ttgG*.

Primero se clonó el gen *ttgV* en un vector (pET28) que le proporcionaba una cola de hexa-histidina, con objeto de hacer más fácil su purificación, y bajo el control de promotor T7 que permitía su sobreexpresión. Para sobreexpresar la proteína se eligió como hospedador del plásmido la cepa *E. coli* B834. Se purificó la proteína His₆-TtgV a homogeneidad mediante cromatografía de afinidad utilizando una columna de níquel. En la Figura IV.12 se muestran los gels de proteínas teñidos con

Azul de Coomassie mediante los que se siguió el proceso de sobreexpresión y purificación de la proteína.

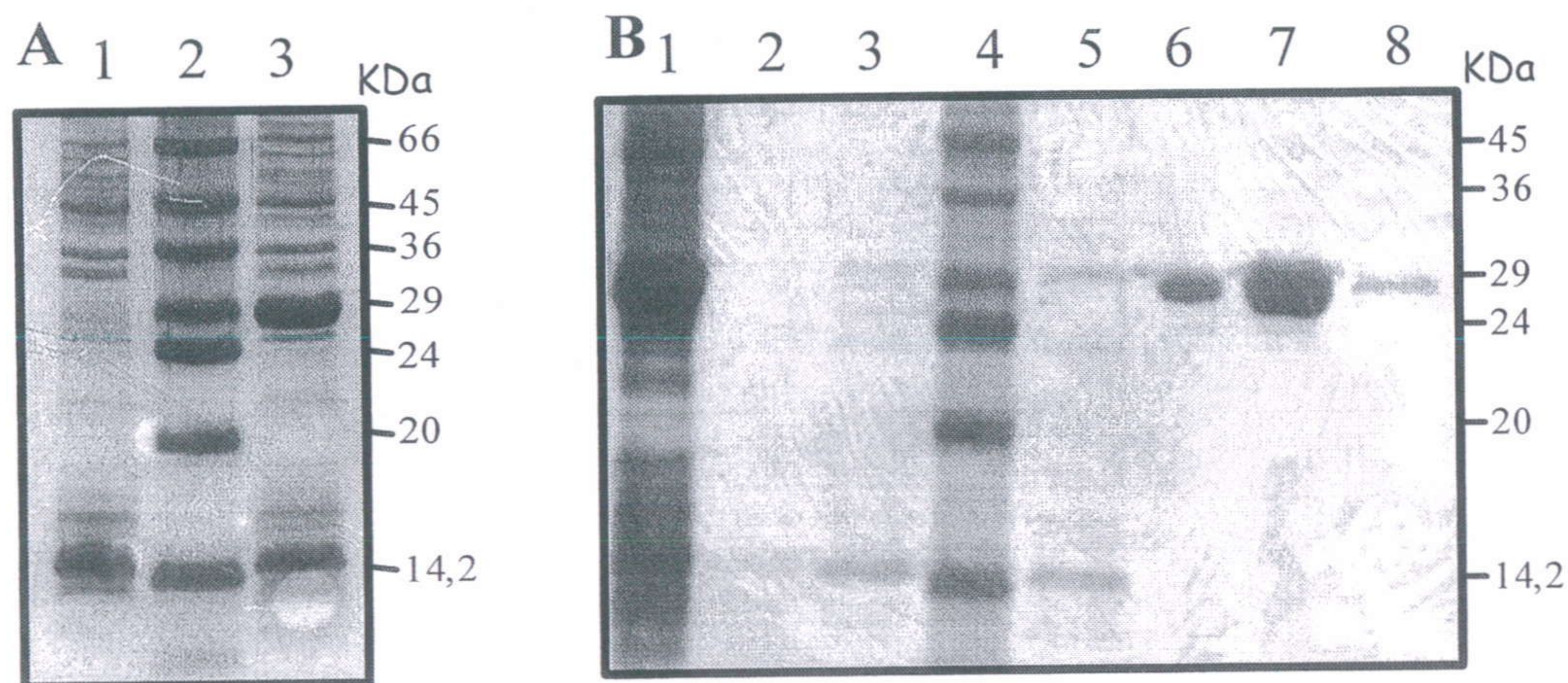


Figura IV.12. Sobreexpresión y purificación de His₆-TtgV. A. *Escherichia coli* B834 portando el vector pET28 sin inserto (calle 1) y el mismo vector con el *ttgV* clonado (calle 3), se cultivaron como se describe en Materiales y Métodos. En la calle 2 se ha corrido el marcador de peso molecular de SIGMA. El tamaño esperado para la proteína más la cola de hexa-histidina es de aproximadamente 28.1 kDa. B. His₆-TtgV se purificó a partir de *E. coli* B834 portando el plásmido pANA126 mediante cromatografía de afinidad a un metal quelante. La calle 4 es el marcador de peso molecular; la calle 1 es el resultado del lisado de las células; las calles 2, 3 y 5 a 8 son las fracciones eluidas de la columna. En las fracciones representadas en las calles 6 y 7 se obtuvo His₆-TtgV homogénea.

IV.9. Estudio *in vitro* de las interacciones entre las zonas promotoras de *ttgGHI* y *ttgVW* con la proteína TtgV

Los resultados obtenidos hasta ahora indicaban que los promotores de los dos operones *ttgGHI* y *ttgVW* solapaban, y que la proteína TtgV era el represor transcripcional de la expresión de ambos operones. Para constatar la unión de TtgV a la zona de los promotores se realizaron ensayos de retardo en gel. Sintetizamos mediante PCR un fragmento de ADN de 450 pb que contenía la región intergénica *ttgG-ttgV*, y se marcó con digoxigenina-dUTP. Cuando este fragmento se incubó con concentraciones crecientes de TtgV, se encontró una banda retardada (Figura IV.13.A). La banda retardada se perdió gradualmente en ensayos de competencia con el mismo ADN sin marcar (frío) (Figura IV.13.B), e hizo falta una concentración

diez veces superior para eliminar el retardo cuando se añadía un competidor inespecífico (ADN de esperma de salmón) (no se muestra).

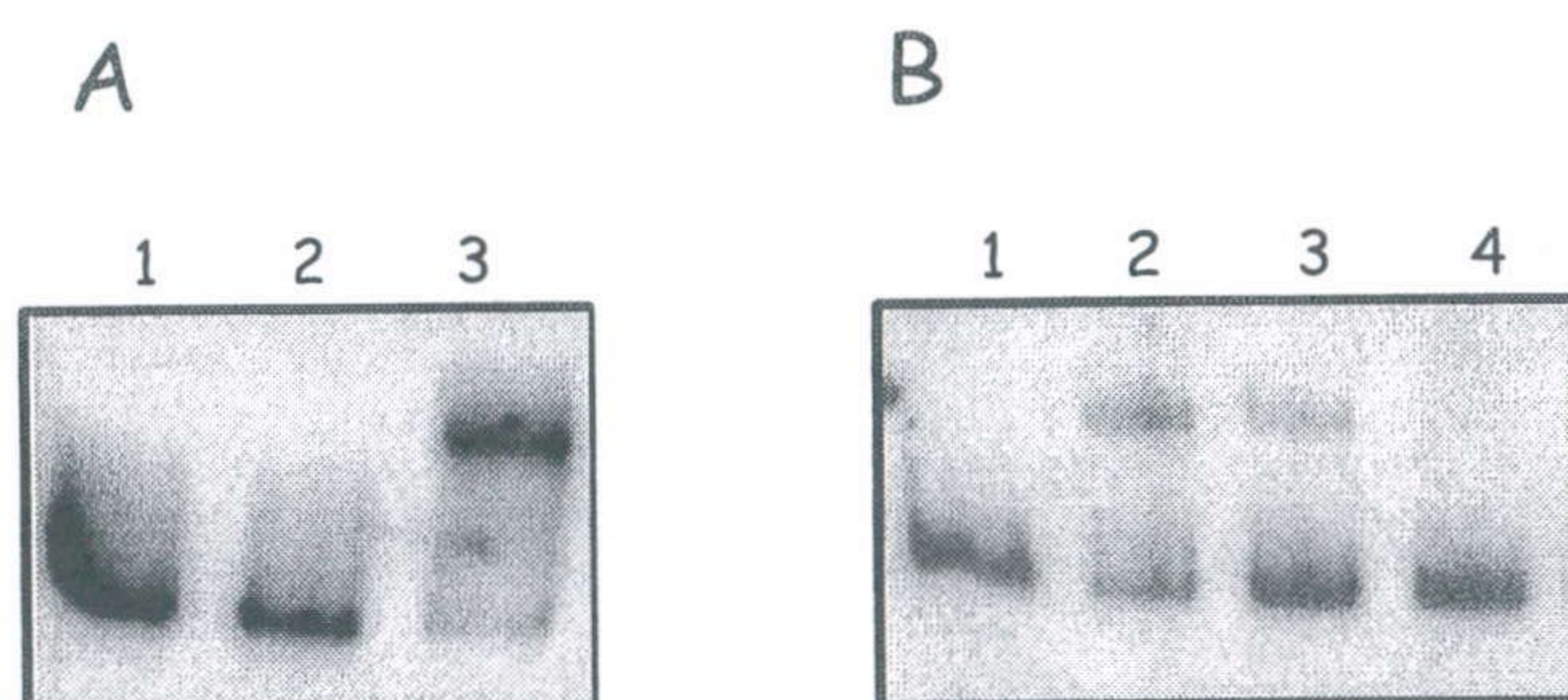


Figura IV.13. Interacción de His₆-TtgV con la región intergénica *ttgG-ttgV*. A. El fragmento de 450 pb (50 pg, 8,5 nM) que contiene la región intergénica *ttgG-ttgV* se incubó sin TtgV (calle 1) o con concentraciones crecientes de His₆-TtgV: 50 nM (calle 2), y 100 nM (calle 3). El ADN libre corresponde a la banda que se observa en la calle 1. B. Competición con ADN específico: la calle 1 muestra ADN libre marcado; en las calles 2, 3 y 4, el fragmento de 450 pb (50 pg) se incubó con 100 nM de proteína purificada y con distintas concentraciones del mismo fragmento de ADN sin marcar como competidor: 500 pg (calle 2), 5 ng (calle3) y 50 ng (calle 4).

IV.10. Búsqueda de secuencias de inserción que puedan estar implicadas en la regulación de la bomba *ttgGHI*

En *P. putida* S12 se ha encontrado que una secuencia de inserción (*ISS12*) juega un papel fundamental en la tolerancia a tolueno (Wery et al., 2001). La preadaptación a tolueno en *P. putida* S12 permitía a las células de esta cepa sobrevivir a una segunda fase del disolvente (1% [vol/vol]). Sin preadaptación la mayoría de las células del cultivo muere. Sólo unas pocas células de la población total sobrevivían al choque de 1% (vol/vol) de tolueno, como es el caso de *P. putida* DOT-T1E. En el caso de *P. putida* las células que sobrevivieron al choque de tolueno mantuvieron su fenotipo de tolerancia, lo que sugería la transición a una variante genética tolerante a disolventes. Este fenotipo no se ha observado en *P. putida* DOT-T1E. Bajo condiciones normales de cultivo el genoma de la cepa *P. putida* S12 contiene 7 copias de la secuencia de inserción *ISS12*; sin embargo, las células tolerantes a tolueno portan 8 copias. Este elemento extra se localizó en el gen *srpS* (*SrpS* comparte 96% de identidad con TtgV en secuencia de aminoácidos) (Wery et al., 2001). El nivel basal de la actividad del promotor *srpABC* en la cepa con la

inserción extra fue siete veces mayor que en la cepa silvestre y la frecuencia de supervivencia al choque con tolueno de estos cultivos fue 1000 veces superior que la de la silvestre. En *P. putida* DOT-T1E no se ha detectado una secuencia de inserción similar a ISS12. Además en las cepas preinducidas con tolueno de *P. putida* DOT-T1E no se observó inactivación del gen *ttgV*. Estos resultados indican que no existe un elemento similar a la ISS12 en el genoma de *P. putida* DOT-T1E, a pesar del alto porcentaje de identidad que existe entre los distintos genes de ambas cepas.

DISCUSIÓN

Tras la identificación de la bomba TtgGHI de *P. putida* DOT-T1E como una de las principales bombas implicadas en la tolerancia a tolueno (Capítulo I y III) y tras comprobar que su expresión dependía de las condiciones de cultivo de la cepa (se inducía en presencia de tolueno y otros disolventes orgánicos) decidimos estudiar la regulación de esta bomba. La mayoría de los genes reguladores que codifican proteínas involucradas en el control de la expresión de bombas de eflujo pertenecientes a la familia RND están situados de forma adyacente a los genes estructurales de la bomba, y en general se transcriben divergentemente respecto al operón de la bomba. Algunos de estos reguladores son activadores transcripcionales como MexT (regulador positivo de la bomba MexEF-OprN de *Pseudomonas aeruginosa* (Köhler et al., 1999); pero la mayoría de ellos actúa como represores. Algunos ejemplos son: MexR (regulador negativo de la bomba MexAB-OprM de *P.aeruginosa*), AcrR (regulador de la bomba AcrAB-TolC de *E. coli*) y SmeT (regulador de la bomba SmeDEF de *Stenotrophomonas maltophilia*) (Srikumar et al., 2000; Ma et al., 1996, Sánchez et al., 2002).

Hasta este momento los activadores de la transcripción conocidos de las bombas de transporte de compuestos tóxicos se han descrito como pertenecientes a las familias MerR, AraC o LysR; mientras que los represores identificados pertenecen a las familias TetR, MarR o LacI (Schumacher y Brennan, 2002). En *P. putida* DOT-T1E se han identificado cuatro posibles reguladores: TtgR pertenece a la familia TetR y se ha demostrado su papel en la represión de la bomba TtgABC (Duque et al., 2001); el gen *ttgT*, adyacente a *ttgDEF*, seguramente codifica la proteína represora de esta bomba y pertenece a la familia IclR; TtgV y TtgW pertenecen a las familias IclR y TetR respectivamente.

Los resultados de actividad β -galactosidasa y los experimentos de extensión de cadena indicaron que el perfil de expresión del operón *ttgVW* es igual que el descrito en el Capítulo III para el operón *ttgGHI*. Ambos aumentaron su expresión entre 3 ó 4 veces en presencia de tolueno (u otros disolventes orgánicos), pero no respondían a la presencia de cloramfenicol o ampicilina (Figura IV.7). Por un lado parece lógico que promotores solapantes (como se ha demostrado que son los de *ttgGHI* y *ttgVW* [Figura IV.6]) estén regulados de la misma forma y por tanto que

respondan ante los mismos compuestos; por otro lado, puede resultar extraño que un promotor de un represor aumente su expresión en presencia de los substratos de la bomba a la que regula. Al aumentar la expresión del represor en principio el efecto esperado sería que se reprimiese aún más la bomba, pero lo que parece ocurrir en estos sistemas es una desrepresión: la interacción entre el represor y un efector de la bomba facilita de alguna manera la síntesis de más bomba. En esta misma cepa *P. putida* DOT-T1E existe otro ejemplo de regulación “simultánea” en la bomba de eflujo TtgABC: la proteína TtgR, que pertenece a la familia TetR, reprime la bomba TtgABC a la vez que reprime su propia expresión, sus promotores también solapan (Duque et al., 2001) y presentan el mismo perfil de efectores.

Los resultados obtenidos en los experimentos de choque con el 0,3% (vol/vol) de tolueno indicaban que el incremento de la expresión de *ttgGHI*, que ocurría en los mutantes deficientes en TtgV (*P. putida* DOT-T1E-PS61 [*ttgV::Ω-Km*] y *P. putida* DOT-T1E-PS62 [*ttgV::aphA*]), conllevaba un aumento en la resistencia a tolueno en las cepas, precisamente hasta el mismo nivel de cuando los cultivos han sido preinducidos con tolueno en la cepa silvestre *P. putida* DOT-T1E (Figura IV.10). Tanto los resultados de expresión de *ttgGHI* y *ttgVW*, como los de ensayos de cinéticas de muerte no nos permiten asignar un papel a TtgW en la regulación de ninguno de los dos operones, probablemente esto es así porque parece ser una proteína truncada.

Dada la organización solapante de los promotores de los dos operones y el hecho de que TtgV reprime la expresión de los dos operones en el mismo grado, el modo de acción de TtgV podría ser que se uniera a la zona intergénica bloqueando la entrada de la RNA polimerasa impidiendo de esta manera la transcripción (Rojo, 1999). Este mecanismo funciona en diversos represores: en el represor cI del fago λ cuando se une al operador O_{RI} del promotor viral p_R , en el represor LexA cuando se une al promotor *uvrA*, la proteína p4 del fago $\phi 29$ de *B. subtilis* cuando se une al promotor vírico A2b, y LacI cuando se une al operador O_1 del promotor *lac* (Rojo, 1999). Todos estos represores se unen a un sitio que solapa con el sitio de unión de la RNA polimerasa. Nosotros hemos demostrado que TtgV se une específicamente a la región intergénica *ttgG-ttgV*. El mecanismo de represión podría ser consecuencia de la unión de TtgV sobre su operador en ausencia de efector impidiendo la entrada de la RNA polimerasa; cuando el efector está presente se uniría a TtgV, provocando un

cambio conformacional en la proteína que daría lugar a que se suelte del operador sobre el que estaba asentado y permitiese la colocación de la RNA polimerasa y la consecuente transcripción tanto de la bomba como del regulador. La expresión basal se explicaría por la diferencia de afinidad entre TtgV y la RNA polimerasa en ausencia de e factor por el operador, como un equilibrio entre ambos procesos. En nuestro laboratorio se continua actualmente con el estudio de la interacción entre el regulador TtgV y el ADN, y los distintos experimentos y datos preliminares apuntan en esta dirección (Guazzaroni et al., enviado a publicación).

El análisis de la secuencia de la región intergénica *ttgG-ttgV* nos ha permitido localizar dos repeticiones invertidas (Figura IV.14). Estas repeticiones invertidas se localizan entre las posiciones -12 a -34 y -2 a -24 respecto a P_{GI}, y se pueden considerar posibles sitios de unión de TtgV. La mayoría de los factores transcripcionales de bacterias se unen a secuencias palindrómicas como dímeros (Lewin, 1990). El regulador IclR de *E. coli* reconoce una región palindrómica que incluye parte de la región -35 del promotor propuesto para los genes que regula, *aceBAK* (Pan et al., 1996). La simetría de la secuencia de unión de IclR sugiere que probablemente IclR se una al ADN de una forma simétrica. De acuerdo con esta sugerencia, Negre et al. (1992) han demostrado que IclR es un dímero.

También es interesante señalar la presencia de repeticiones directas en la región intergénica *ttgV-ttgG* cuya secuencia consenso es 5'-GNA/T/TACAC/G-3' (Figura IV.14). Se han descrito ejemplos de reguladores transcripcionales que reconocen repeticiones directas en la familia AraC/XylS de reguladores transcripcionales positivos (Egan, 2002; Tobes y Ramos, 2002). El regulador MarR (Seone y Levy, 1995), del regulón *marRAB-marC* de *E. coli* (responsable del fenotipo de *multiple antibiotic resistance* [resistencia múltiple a antibióticos]) reprime *marRAB* mediante su unión como dímero a dos regiones: sitio I y II en el *locus marO* entre los genes *marRAB* y *marC*. La unión de MarR al sitio I, localizado entre las cajas -35 y -10 del operón *marRAB*, es necesario y suficiente para que haya represión (Martin y Rosner, 1995). BmrR, regulador positivo que pertenece a la familia MerR, activa la transcripción del transportador de compuestos lipofílicos catiónicos Bmr de *Bacillus subtilis* (Ahmed et al., 1994). BmrR se une al sitio de ADN en el promotor *bmr* entre las cajas -10 y -35, que no están óptimamente

espaciadas, pero que están separadas 19 pb. BmrR se une a este sitio en el ADN en ausencia y en presencia de los efectores con casi la misma afinidad, pero tras la unión dispara la transcripción de *bmr* de alguna manera reconfigurando el espaciador de 19 pb, que puede interactuar productivamente con la RNA polimerasa. Aunque en este momento no podemos discernir cuáles son los nucleótidos reconocidos específicamente por TtgV, merece la pena destacar que el regulador QacR de la bomba QacA de *Staphylococcus aureus* interactúa con los promotores de su sistema mediante el reconocimiento de repeticiones directas dentro de la secuencia de repeticiones invertidas (Schumacher, et al., 2002b). Continuando con los estudios de la regulación de la bomba TtgGHI por TtgV en nuestro laboratorio, la Lda. M. E. Guazzaroni ha llevado a cabo ensayos de huella genética (*footprinting*) con DNasaI con la proteína TtgV purificada (His₆-TtgV) sobre la región intergénica *ttgV-ttgG* (Rojas et al., 2003). Según los resultados de este ensayo, la zona protegida por TtgV cubriría las regiones -10 y -35 de cada uno de los promotores de *ttgG* y el promotor divergentemente orientado de *ttgV*. La zona protegida se extendería desde la posición +7 hasta la -34 respecto al promotor P_{G1}, incluyendo dos repeticiones invertidas (Figura IV.14).

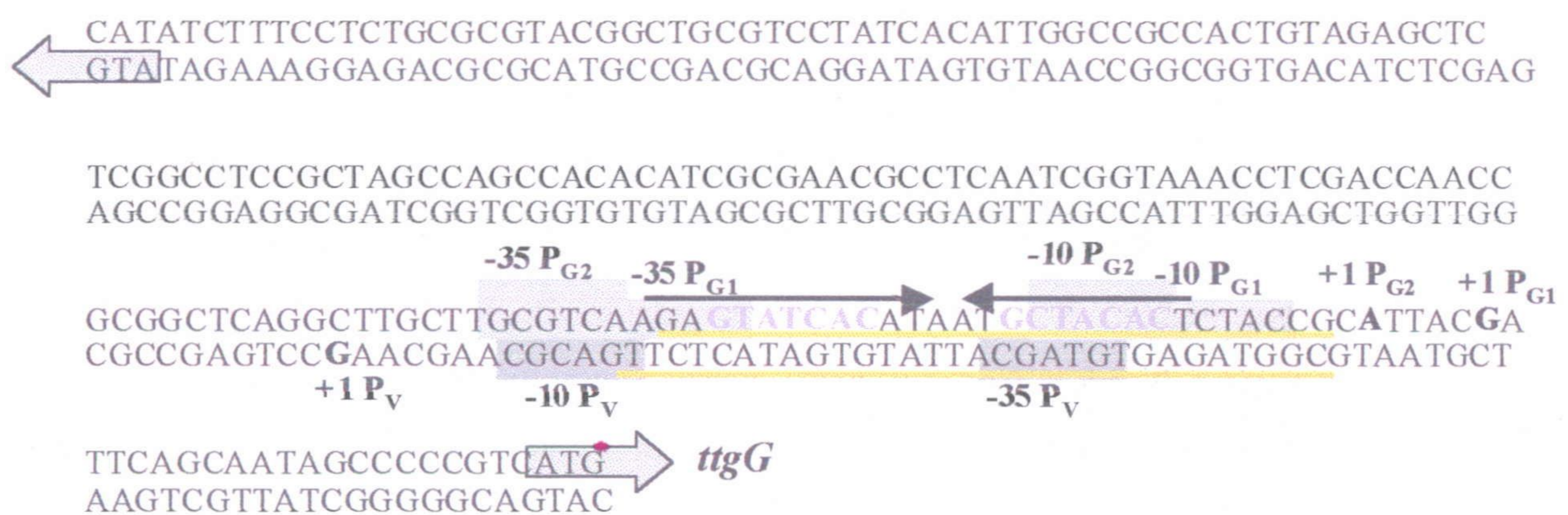


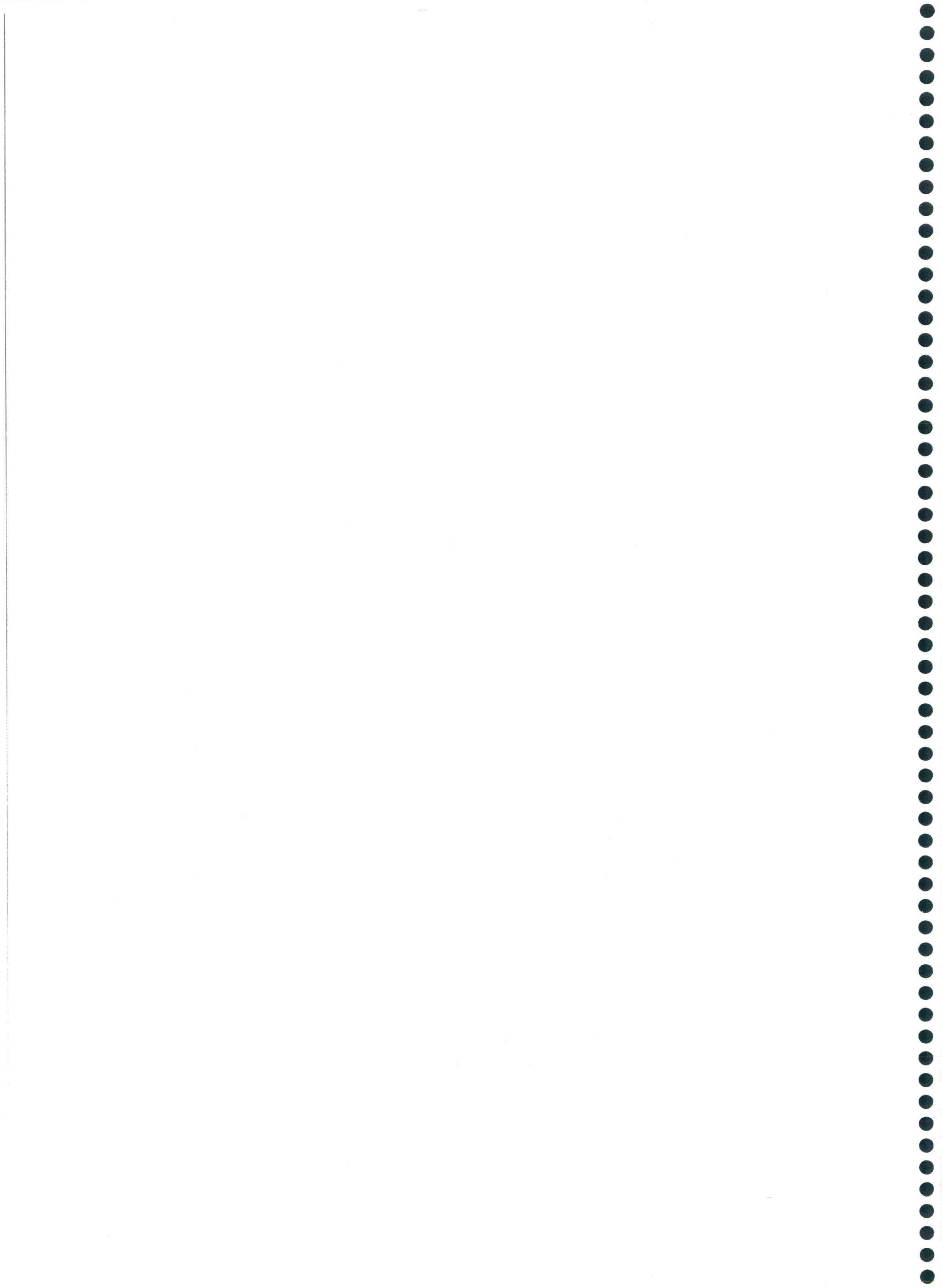
Figura IV.14. Posible sitio de unión de TtgV en la región intergénica *ttgV-ttgG*. Solapamiento de los promotores de *ttgGHI* y *ttgVW* y la zona de unión de TtgV según el ensayo de huella genética con DNasaI llevado a cabo por la Lda. Guazzaroni (Rojas et al., 2003). Los +1 de cada promotor están marcados en negrita y se designan como +1P_V, +1P_{G1} y +1P_{G2} respectivamente. Las cajas -10 y -35 también están marcadas mediante rectángulos grises. La región protegida por TtgV está subrayada en amarillo. Las repeticiones invertidas propuestas se indican mediante las flechas delgadas, y las posibles repeticiones directas están coloreadas en morado.

Respecto a la unión de los reguladores a los efectores, éstos generalmente muestran el mismo perfil de sustrato que las bombas a las que regulan. Un ejemplo de regulador de una bomba de eflujo muy estudiado en este sentido es QacR. QacR es una proteína que se une a múltiples compuestos y que pertenece a la familia TetR de represores transcripcionales (Aramaki et al., 1995). Se han determinado las estructuras de los complejos QacR-ADN (Schumacher et al., 2002 [b]) así como QacR unido a seis diferentes compuestos catiónicos lipofílicos (R6G, etidio, cristal violeta, verde malaquita, berberina y dequalinium) (Schumacher et al., 2001). Las estructuras de QacR unido a estos seis compuestos indicaban que se uniría una molécula por dímero de QacR. En contraste a TetR, que une dos moléculas de tetraciclina por dímero. El bolsillo expansivo de QacR está limitado por 4 residuos de glutamato E57, E58, E90 y E120, cuya función es la de neutralizar las cargas positivas de los diferentes sustratos. Un rasgo crítico del bolsillo de unión a efectores, compartido por BrmR, es su abundancia de residuos aromáticos. Además, existen residuos polares y moléculas de agua no unidas específicamente localizadas en el bolsillo y contribuyen a la unión a diversos compuestos. Las estructuras de los complejos con los 6 efectores indican la presencia de sitios de unión distintos separados, dentro de una misma proteína. La presencia de un amplio bolsillo de unión ($\approx 1100 \text{ \AA}^3$ en QacR) con varios sitios de unión solapantes es ideal para acomodar diversos compuestos con estructuras diferentes. Lo que es interesante es que la arquitectura de QacR aparece como un rasgo general de las proteínas implicadas en resistencia a múltiples sustancias tóxicas (proteínas MDR) (Schumacher et al., 2002a; Godsey et al., 2002; Grkovic et al., 2002). La comparación entre las estructuras de QacR y QacR-efector indicaron que la unión a un efector produciría una transición en forma de leva que provoca una separación de unos 9 \AA en la α -hélice 3 unida al ADN, que da lugar a que QacR se desprege del operador (Schumacher et al., 2001).

No se ha estudiado en profundidad la regulación del operón *srpABC* por los reguladores SrpR y SrpS de *P. putida* S12, que como hemos dicho anteriormente se parecen en más de un 96% a los reguladores TtgV y TtgW. Sin embargo, de lo que conocemos hasta ahora existen diferencias importantes respecto a la regulación de las bombas homólogas (*srpABC* y *ttgGHI*) en las dos cepas (Segura et al., 2003). En

primer lugar, la presencia de una secuencia de inserción en el genoma de *P. putida* S12 que inactiva el gen *srpS* y conlleva un aumento de la expresión de la bomba, y por tanto de la tolerancia de la cepa en presencia de tolueno; y en segundo lugar, que se ha demostrado que SrpR, al contrario que su proteína homóloga en *P. putida* DOT-T1E (TtgW), sí contribuye a la regulación de la bomba. En ensayos de complementación de las células de *P. putida* S12 que portan una copia extra de la secuencia de inserción ISS12 en el gen *srpS* (“variantes”) con *srpSR* se consiguió un descenso dramático en la tolerancia a tolueno, que no se produjo cuando se complementaba solamente con *srpS*. Esto sugiere que se necesitan ambas proteínas SrpS y SrpR para una represión efectiva del operón *srpABC* (Wery et al., 2001). En el sistema de regulación de *P. putida* DOT-T1E TtgW no parece tener ninguna participación, probablemente por tratarse de una proteína truncada.

Respecto a la regulación mediada por secuencias de inserción se conocen otros casos: la inserción de la secuencia IS186 en el gen *acrR*, que codifica la proteína represora de la bomba de eflujo *acrAB* de *E. coli*, también supone un aumento de la expresión de esta bomba (Jellen-Ritter y Kern, 2001). Además, se demostró que otra secuencia de inserción (IS2) en la región promotora de *acrE* también incrementaba la expresión de la bomba de eflujo *acrEF* de *E. coli* (Kobayashi et al., 2001; Jellen-Ritter y Kern, 2001). En estos dos casos el aumento de la expresión de las bombas de eflujo condujo a un incremento en la resistencia a fluoroquinolonas. En contraste con estos ejemplos, nuestros resultados sugieren que la bomba *ttgGHI* no parece estar mediada por la participación de secuencias de inserción.



Capítulo V

UTILIZACIÓN DE LA CEPA TOLERANTE A DISOLVENTES
ORGÁNICOS *Pseudomonas putida* DOT-T1E EN
BIOTRANSFORMACIONES EN SISTEMAS DE DOBLE FASE
RESUMEN

La tolerancia de los microorganismos a disolventes orgánicos puede ser explotada para desarrollar sistemas de biotransformación en doble fase (disolvente orgánico/agua), en los que los reactivos o los productos tóxicos se acumulan en la fase orgánica. *Pseudomonas putida* DOT-T1E, como hemos visto con anterioridad, es una cepa altamente tolerante a disolventes orgánicos con $\log P_{ow} \geq 2,5$, por lo que puede ser un biocatalizador ideal para estos sistemas. En este capítulo se estudia la tolerancia a distintos alcoholes alifáticos con $\log P_{ow}$ entre 2 y 4, como decanol ($\log P_{ow}$ 4), nonanol ($\log P_{ow}$ 3,4) y octanol ($\log P_{ow}$ 2,9), que son potencialmente útiles en biotransformaciones en sistemas de doble fase para la producción de compuestos con $\log P_{ow}$ alrededor de 1,5. *Pseudomonas putida* DOT-T1E responde a los alcoholes alifáticos que constituyen la segunda fase mediante la isomerización *cis/trans* de los ácidos grasos insaturados *cis*, y mediante la expulsión de los alcoholes alifáticos a través de las bombas de eflujo de hidrocarburos aromáticos. *Pseudomonas putida* DOT-T1E sobrevive a la presencia de altas concentraciones de los tres alcoholes alifáticos, observándose crecimiento en presencia de nonanol y decanol. En presencia de octanol como segunda fase el crecimiento de *P. putida* DOT-T1E se inhibió, aunque las células eran viables. Nuestros resultados apoyan la correlación entre el $\log P_{ow}$ de los alcoholes alifáticos y su toxicidad, puesto que el 1-octanol ($\log P_{ow}$ 2,9) es más tóxico para *P. putida* DOT-T1E que 1-nonanol ($\log P_{ow}$ 3,4), y éste a su vez, más tóxico que 1-decanol ($\log P_{ow}$ 4). *Pseudomonas putida* DOT-T1E portando el plásmido pWW0 (*xylE::Km*) es capaz de transformar *m*-xileno ($\log P_{ow}$ 3,2) en 3-metilcatecol ($\log P_{ow}$ 1,5). La cantidad de 3-metilcatecol producida en un biorreactor de dos fases decanol/agua fue alrededor de 20 veces superior que en medio acuoso, demostrando la utilidad de los sistemas de doble fase para las biotransformaciones.

V.1. Tolerancia de *Pseudomonas putida* DOT-T1E a alcoholes alifáticos de cadena de longitud media

Pseudomonas putida DOT-T1E, como hemos visto en los capítulos anteriores, es una cepa tolerante a disolventes orgánicos por su capacidad de sobrevivir en presencia de diferentes hidrocarburos como tolueno, xilenos, etilbenceno, y propilbenceno, entre otros compuestos. Estos compuestos son en general dañinos para el medio ambiente y para las personas que trabajan con ellos, además de que suelen ser muy volátiles y potencialmente inflamables, y por ello no son apropiados para procesos industriales. Debido a su carácter lipofílico, su baja toxicidad, y a que son baratos, los alcoholes alifáticos son buenos candidatos para su uso como segunda fase en procesos de biotransformación (Tabla V.1) en los que los reactivos y/o los productos no son solubles en la fase acuosa (como es el caso de los catecoles y el aldehído del ácido hidroximucónico que se utiliza como precursor en la síntesis piridinas). Sin embargo, la tolerancia de esta cepa hacia alcoholes alifáticos no se había estudiado antes del inicio de esta Tesis Doctoral. Por ellos comprometimos nuestros esfuerzos en estudiar la supervivencia de *P. putida* DOT-T1E ante el choque de 0,3 % (vol/vol) de 1-octanol, 1-nonanol y 1-decanol, como fase inicial de los estudios de biotransformación en sistemas de doble fase. Los resultados obtenidos con células que se habían cultivado en medio LB, en ausencia y en presencia de tolueno suministrado a través de la fase gaseosa para la se muestran en la Tabla V.2.

Tabla V.1. Características de los alcoholes alifáticos utilizados en los ensayos y que son susceptibles de ser utilizados como segunda fase en los procesos de biotransformación con la cepa *P. putida* DOT-T1E. a = solubilidad del alcohol alifático en agua; b = porcentaje de extracción de 3-metilcatecol 1 mM en una mezcla 1:1 (vol/vol) de agua:octanol, agua:nonanol y agua:decanol (Hüsken et al., 2001 [a]); c = precio según el catálogo de Fluka del 2003.

	logP _{ow}	solubilidad ^a (mM)	capacidad extracción ^b (%)	precio ^c (euros/litro)
1-octanol	2,9	4	98	20
1-nonanol	3,4	1	94	80
1-decanol	4,0	0,2	90	18

Tabla V.2. Supervivencia de *P. putida* DOT-T1E tras el choque con disolventes orgánicos. *Pseudomonas putida* DOT-T1E se cultivó en medio LB en ausencia o en presencia de tolueno en la fase gaseosa como se describe en Materiales y Métodos. Los valores que se dan son las razones de la supervivencia respecto al control (al que no se añade disolvente). Los valores son las medias de 6 experimentos independientes.

disolvente	sin preinducir	preinducidos
ninguno	1	1
tolueno (logP _{ow} 2,5)	10 ⁻⁴ -10 ⁻⁵	0,5-0,8
1-octanol (logP _{ow} 2,9)	10 ⁻¹	1
1-nonanol (logP _{ow} 3,4)	1	1
1-decanol (logP _{ow} 4)	1	1

Como se había demostrado previamente (Ramos et al., 1998), la tolerancia a disolventes orgánicos en *P. putida* DOT-T1E es un proceso inducible: sólo 1 de entre 10⁴ células cultivadas en LB sobrevivía al choque con 0,3% de tolueno (vol/vol), aunque cuando las células habían sido preexpuestas a concentraciones subletales de tolueno, entre el 50 y el 100% de las mismas toleraban el choque (Tabla V.2). En la tolerancia a alcoholes alifáticos se observó el mismo efecto de inducción que en la tolerancia a tolueno, con respecto al octanol. La supervivencia tras el choque 0,3% (vol/vol) de 1-octanol, con los cultivos preinducidos con tolueno en la fase gaseosa, incrementó y cerca del 100% de las células sobrevivieron el choque con octanol (Tabla V.2). Cuando el experimento se realizó con 1-nonanol o 1-decanol (Tabla V.2) se observó una alta supervivencia de *P. putida* DOT-T1E a estos alcoholes, tanto en células preinducidas como sin preinducir.

Para examinar si el propio octanol podría inducir la tolerancia a altas concentraciones de este alcohol alifático, cultivamos *P. putida* DOT-T1E en medio LB con 1 mM de 1-octanol, y cuando el cultivo alcanzó una turbidez de alrededor de 0,8 a 660 nm, dividimos el cultivo en dos alícuotas, y a una de ellas le añadimos 0,3% (vol/vol) de octanol, dejando la otra como control. Encontramos que casi el

100% de las células sobrevivió a este choque repentino con el alcohol alifático. Por lo que se consideró que tanto el tolueno como el octanol podrían inducir los mismos mecanismos de defensa contra disolventes orgánicos en *P. putida* DOT-T1E.

Estos resultados indicaban que *P. putida* DOT-T1E era altamente tolerante a los tres alcoholes alifáticos ensayados, y que éstos, en principio, podrían ser utilizados como segunda fase en procesos de biotransformaciones mediados por *P. putida* DOT-T1E. Sin embargo, para una utilización más eficaz será necesario preinducir los cultivos para evitar la muerte celular cuando se utilice octanol como segunda fase.

V.2. Transporte de los alcoholes alifáticos por las bombas TtgABC, TtgDEF y TtgGHI de *P. putida* DOT-T1E

Dado que la tolerancia a octanol aumentaba en las células preinducidas con octanol o tolueno, decidimos examinar la respuesta de *P. putida* DOT-T1E para establecer claramente cuáles eran los mecanismos de defensa contra los alcoholes alifáticos. Las bombas de eflujo de la familia RND, objeto de estudio de los capítulos anteriores de esta Tesis Doctoral, poseen una amplia especificidad de sustrato y son capaces de expulsar muchos compuestos diferentes químicamente (como hemos determinado en el Capítulo III). Las bombas TtgABC y TtgGHI transportaban distintos antibióticos, así como hidrocarburos aromáticos. Para ver si estas bombas extruían a lcoholes a lifáticos se utilizaron los mutantes que se describieron en los capítulos anteriores. El primer ensayo se realizó con células en fase de crecimiento exponencial, en medio LB. Como se muestra en la Tabla V.3, el 100% de las células de la cepa silvestre y de los mutantes sencillos sobrevivieron el choque repentino con 0,3% (vol/vol) de nonanol o decanol. El doble mutante *P. putida* DOT-T1E-82 (TtgABC⁻/TtgDEF⁻) se comportó como el silvestre y como los mutantes sencillos ante el choque con octanol. Sin embargo los otros dobles mutantes fueron más susceptibles; así de un cultivo de *P. putida* DOT-T1E-PS30 (TtgDEF⁻/Ttg⁻GHI) sólo 1 de 10² células sobrevivió al choque con 0,3% (vol/vol) de 1-octanol y de un cultivo de *P. putida* DOT-T1E-PS32 (TtgABC⁻/Ttg⁻GHI), la supervivencia fue de 1 de cada 10⁴-10⁵ células. En el mutante *P. putida* DOT-T1E-PS32, se encontró

también una alta susceptibilidad ante 1-nonanol y 1-decanol. En el triple mutante, en el que ninguna de las 3 bombas de eflujo están presentes, la disminución en la supervivencia fue aún mayor, y sólo 1 de entre 10^5 - 10^6 de las células sobrevivió el choque con octanol, y también se observó una disminución de la supervivencia en el caso de 1-nonanol y 1-decanol. Estos resultados sugieren que las tres bombas de eflujo están involucradas en la expulsión de los alcoholes alifáticos ensayados. Cabe destacar que los dobles mutantes en los que la bomba TtgGHI no es funcional (*P. putida* DOT-T1E-PS30 y *P. putida* DOT-T1E-32) fueron más susceptibles al choque con octanol que el doble mutante TtgABC⁻/TtgDEF⁻, lo que sugiere que la bomba TtgGHI es la que más influye en la tolerancia a este alcohol alifático.

Tabla V.3. Supervivencia a los 10 minutos de *P. putida* DOT-T1E y de los mutantes en las bombas de eflujo ante la adición de 0,3% (vol/vol) de 1-octanol, 1-nonanol y 1-decanol. En verde se muestran los datos de los cultivos en LB sin preinducción, y en rojo los de los cultivos preinducidos con tolueno en fase gaseosa. El resultado expresa la razón de las células que sobreviven con respecto al control sin disolvente tras 10 minutos en presencia del disolvente. n.d. significa «no determinable», porque el ensayo no se puede realizar debido a la hipersensibilidad de la cepa al tolueno en la fase gaseosa.

cepa	bombas mutadas	octanol	nonanol	decanol	octanol	nonanol	decanol
DOT-T1E	silvestre	10^{-1}	1	1	1	1	1
DOT-T1E-18	TtgABC	10^{-1}	1	1	1	1	1
DOT-T1E-1	TtgDEF	10^{-1}	1	1	1	1	1
DOT-T1E-PS28	TtgGHI	10^{-1}	1	1	10^{-1}	1	1
DOT-T1E-82	TtgABC/TtgDEF	10^{-1}	1	1	10^{-1}	1	1
DOT-T1E-PS30	TtgDEF/TtgGHI	10^{-1} - 10^{-2}	1	1	10^{-1}	1	1
DOT-T1E-PS32	TtgABC/TtgGHI	10^{-4} - 10^{-5}	10^{-2} - 10^{-3}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-2}	10^{-1}
DOT-T1E-PS34	TtgABC/TtgDEF/ TtgGHI	10^{-5} - 10^{-6}	10^{-4}	10^{-2} - 10^{-3}	n.d.	n.d.	n.d.

Esta serie de ensayos se llevó a cabo también preinduciendo las células con tolueno en fase gaseosa y en otra serie de ensayos con 1 mM de octanol, obteniendo resultados muy parecidos en ambos casos. Como se esperaba, la supervivencia de la cepa silvestre y de los mutantes sencillos aumentó al menos un orden de magnitud cuando fueron preinducidos (Tabla V.3). Éste fue también el caso de los dobles mutantes, pero no del mutante triple cuando la inducción se llevó a cabo con 1mM de

octanol (no se muestra), cuya sensibilidad a los choques con los alcoholes alifáticos fue igual que cuando las células no habían sido preinducidas.

V.3. Las bombas de eflujo Ttg se inducen en presencia de alcoholes alifáticos

El hecho de que la supervivencia al 0,3% (vol/vol) de octanol en los dobles mutantes fue mayor cuando las células habían sido preinducidas, nos llevó a determinar si las bombas de eflujo se inducían en presencia de estos alcoholes alifáticos. Para los ensayos de inducción utilizamos fusiones de los promotores de las tres bombas de eflujo (P_{ttgABC} [Duque et al., 2001, P_{ttgDEF} [Terán y Gallegos, 2003, datos sin publicar] y P_{ttgGHI} [Capítulo I de esta Tesis Doctoral]), al gen de la β -galactosidasa en el vector pMP220 (Materiales y Métodos). Los ensayos de actividad β -galactosidasa mostraron que la expresión desde los tres promotores fue de entre 2 y 3 veces superior en presencia de 2 mM de 1-octanol, 1-nonanol y 1-decanol, que en los controles sin la adición de estos alcoholes (Tabla V.4).

Tabla V.4. Expresión de las bombas de eflujo *ttg* en respuesta a alcoholes alifáticos. *Pseudomonas putida* DOT-T1E portando los plásmidos pED13 ($P_{ttgA}::lacZ$), pMTT ($P_{ttgD}::lacZ$) y pANA96 ($P_{ttgG}::lacZ$), se cultivaron en medio LB con 2 mM de cada uno de los alcoholes alifáticos ensayados. La actividad β -galactosidasa se determinó 4 horas después, según se describe en Materiales y Métodos. Los resultados son valores medios de 5 ensayos independientes realizados por duplicado.

	control	octanol	nonanol	decanol
$P_{ttgA}::lacZ$	51 ± 14	108 ± 13	114 ± 35	85 ± 16
$P_{ttgD}::lacZ$	6 ± 2	13 ± 6	18 ± 7	15 ± 7
$P_{ttgG}::lacZ$	408 ± 89	1474 ± 361	1585 ± 254	919 ± 204

V.4. Cambios en la composición de los ácidos grasos de las membranas

También ensayamos si estos tres alcoholes alifáticos inducían cambios en la composición de fosfolípidos de la membrana de *P. putida* DOT-T1E, como se sabía que causaba el tolueno (Ramos et al., 1997; ver Introducción). El ensayo se realizó

en cultivos en medio mínimo creciendo en fase exponencial (Materiales y Métodos) a los que añadimos una segunda fase de cada alcohol alifático (1% [vol/vol]). Extrajimos los lípidos y los esterificamos para su separación mediante cromatografía de gases tras media hora en presencia de la segunda fase de octanol, nonanol y decanol. Encontramos que la razón de ácidos grasos insaturados *cis/trans* fue de $0,92 \pm 0,3$ en células en presencia de octanol, mientras que fue de $14,5 \pm 0,5$ en células sin tratar con el alcohol alifático.

Tabla V.5. Composición en ácidos grasos de la membrana de *P. putida* DOT-T1E en presencia de alcoholes alifáticos. Se muestran los datos de la composición de ácidos grasos tras 30 minutos de incubación con los alcoholes alifáticos.

ácido graso	control	octanol	nonanol	decanol
C _{14:0}	0,36	0,7	0,1	0,3
C _{16:1,9} <i>cis</i>	31,7	13,2	22,7	14,0
C _{16:1,9} <i>trans</i>	2,8	26,5	19,2	23,08
C _{16:0}	33,4	37,5	34,9	35,7
C _{17:ciclopropano}	5,1	5,2	13,8	4,3
C _{18:1,11} <i>cis</i> va	24,9	13,3	9,4	17,2
C _{18:1,11} <i>trans</i> va	1,1	2,25	---	4,6
C _{18:0}	0,45	1,25	---	0,8
razón <i>cis/trans</i>	14,5	0,92	1,67	1,13

Estos resultados indican que el efecto más acusado en cuanto a cambios en la composición de los lípidos de los fosfolípidos de la membrana celular se produce con el disolvente más tóxico, es decir, con octanol. Nonanol y decanol también producen un cambio importante en la composición de los ácidos grasos, ligeramente menor que con octanol (Tabla V.5.).

V.5. Crecimiento de *P. putida* DOT-T1E en presencia de octanol, nonanol y decanol

Los resultados anteriores sugieren que concentraciones subletales de los tres alcoholes alifáticos estudiados en este capítulo podrían mejorar la supervivencia de *P. putida* DOT-T1E cuando al cultivo se le añadiesen altos volúmenes de cualquiera

de estos compuestos. Para probar esta hipótesis, cultivamos *P. putida* DOT-T1E durante toda la noche en medio mínimo M9 con glucosa 0,5% (p/vol) y 1 mM de octanol. Al día siguiente el cultivo se diluyó 100 veces en el mismo medio, al que añadimos 0%, 0,1%, 1%, 10% y 100% (vol/vol) de 1-octanol, 1-nonanol y 1-decanol. En esta serie de ensayos el crecimiento se determinó contando células viables en placas de LB.

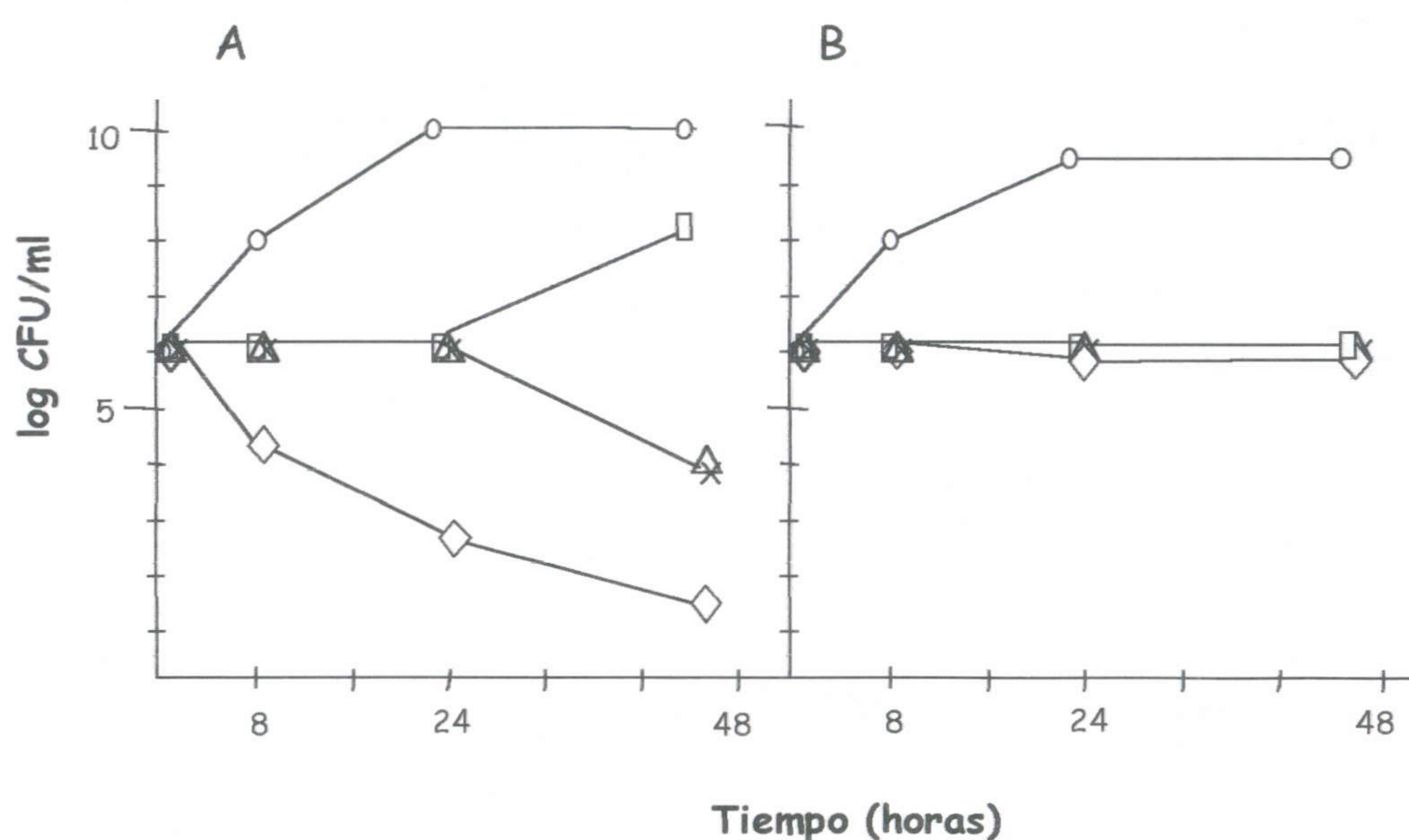


Figura V.1. Crecimiento de *P. putida* DOT-T1E en medio mínimo M9 (glucosa 0,5% [p/vol]) y medio mínimo con glucosa (0,5% [p/vol]) y 1 mM de octanol, en presencia de octanol. A. Cultivos sin preinducir. B. Cultivos preinducidos con 1 mM de octanol. Los círculos indican los cultivos control, sin octanol; los rectángulos simbolizan los cultivos con 0,1% (vol/vol) de octanol; las aspas, con 1%; los triángulo, con 10%; y los rombos son cultivos con 100% (vol/vol) de octanol.

La velocidad de crecimiento en medio mínimo con glucosa como fuente de carbono en presencia de nonanol o decanol fue similar al observado sin estos disolventes orgánicos (tiempo de generación de 65 ± 2 minutos), para cualquiera de las concentraciones utilizadas. Por el contrario, la adición de octanol al cultivo sin preinducir, incluso a una concentración de 1% (vol/vol) inhibía el crecimiento celular, aunque el número de células viables en el cultivo permaneció constante durante las primeras 24 horas de incubación. Después, observamos una disminución continua en la viabilidad celular con la concentración más alta de octanol (100%

[vol/vol]), hasta que a las 42 horas de iniciado el ensayo el número de células viables bajó hasta 10^2 unidades formadoras de colonia por mililitro (Figura V.1.A). Cuando se indujeron los cultivos con 1 mM de octanol, la viabilidad celular no disminuyó en presencia de concentraciones crecientes de octanol en el medio (Figura V.1.B).

Nuestros resultados sugieren que 1-nonanol y 1-decanol no son tóxicos para *P. putida* DOT-T1E, y que se pueden utilizar como segunda fase sin preinducción previa de las células. También hemos encontrado que aunque *P. putida* DOT-T1E no puede crecer en presencia de concentraciones saturantes de 1-octanol, la viabilidad celular se puede mantener mediante largos periodos de tiempo si el cultivo se preinduce con concentraciones subletales de octanol (1 mM).

V.6. Producción de 3-metilcatecol por la cepa *P. putida* DOT-T1E Δ *todC1C2::kilAB* (pWW0::*xylE::Km*) en fase acuosa

Pseudomonas putida DOT-T1E Δ *todC1C2::kilAB* es un mutante resistente a telurito de *P. putida* DOT-T1E generado previamente en nuestro laboratorio en un estudio relacionado con la degradación de tolueno por la cepa (Mosqueda et al., 1999). Esta cepa es la que hemos elegido para la biotransformación de toluenos sustituidos, precisamente porque no puede metabolizar estos compuestos por tener la ruta de la tolueno dioxigenasa bloqueada (ver apartado 4.2 de la Introducción). Utilizamos el mutante *todC1C2*⁻ como cepa hospedadora de un plásmido TOL mutado en el gen *xylE* (que codifica la enzima catecol-2,3-dioxigenasa, ver apartado 4.1 de la Introducción), inactivado mediante la introducción de un casete de kanamicina (construido por la Dra. Estrella Duque, ver Materiales y Métodos), que es capaz de acumular los correspondientes catecoles a partir de tolueno y sus derivados sustituidos en las posiciones *meta* y *para* (Figura V.2). Comprobamos la supervivencia y el crecimiento de esta cepa mutante en presencia de alcoholes alifáticos de la misma forma que hicimos para la cepa parental. Los resultados obtenidos fueron similares a los de la cepa parental *P. putida* DOT-T1E (no se muestran), y concluimos que ni la inactivación de la tolueno dioxigenasa ni la carga genética adicional impuesta por el plásmido TOL influía en la tolerancia a los alcoholes alifáticos de los ensayos.

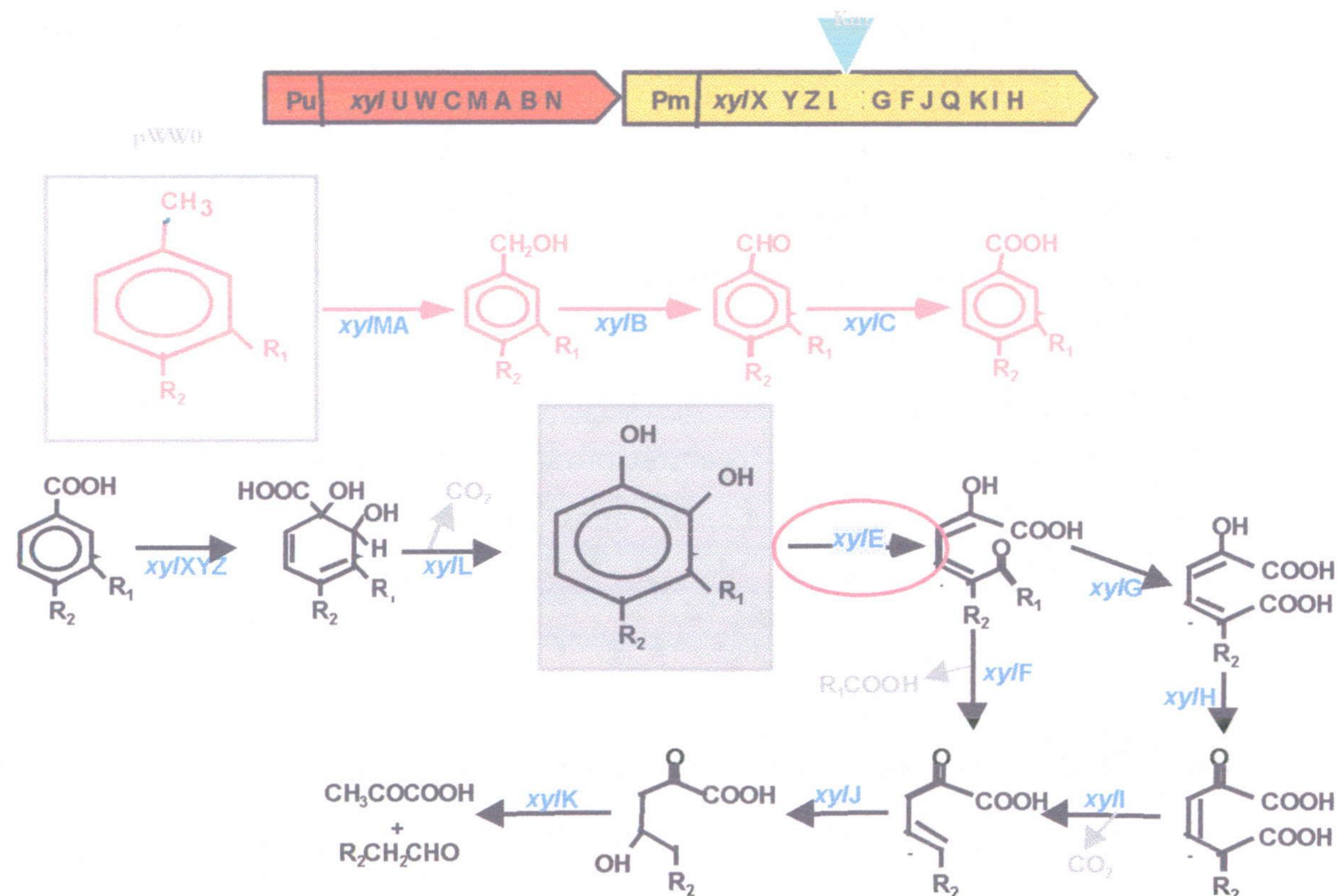


Figura V.2. Ruta de degradación de tolueno del plásmido TOL, mutada en *xyIE* para la acumulación de catecoles. Se ha introducido un casete Ω -Km en el gen de la catecol-2,3-dioxigenasa (*xyIE*), lo que permite interrumpir la ruta de degradación de tolueno y toluenos sustituidos y acumular los catecoles correspondientes. Las estructuras en rojo son los productos que se van formando por la acción de las enzimas de la ruta *upper* codificadas en el plásmido TOL, y las estructuras en negro, son los compuestos que se producen en la ruta *meta*. Se han encerrado en cuadrados el producto inicial (tolueno y derivados), y los catecoles (cuadrado gris).

Para determinar la capacidad de la cepa de transformar *m*-xileno en 3-metilcatecol, cultivamos *P. putida* DOT-T1E Δ toDCIC2::*kiLAB* (pWW0::*xyIE*::Km) en matraces de 100 mL con medio mínimo M9 y 0,5% (p/vol) de glucosa, 10 mM de citrato o glicerol, con *m*-xileno suministrado en la fase gaseosa. Se alcanzó una concentración máxima de 3 mM de 3-metilcatecol con glucosa en el medio, tras 30 horas de incubación. Con las otras fuentes de carbono se alcanzó la misma concentración de 3-metilcatecol, pero se requirieron más de 48 horas de incubación. Por ello, elegimos glucosa como fuente de carbono para los siguientes ensayos de biotransformación. Ensayamos la capacidad de producción de 3-metilcatecol de la cepa en un biorreactor de 3 litros de capacidad con medio mínimo en condiciones de *fed-batch*, como se describe en Materiales y Métodos. Se observó que también en

régimen de cultivo semiconutino en el biorreactor la concentración máxima de 3-metilcatecol acumulada en el medio fue de 3 mM.

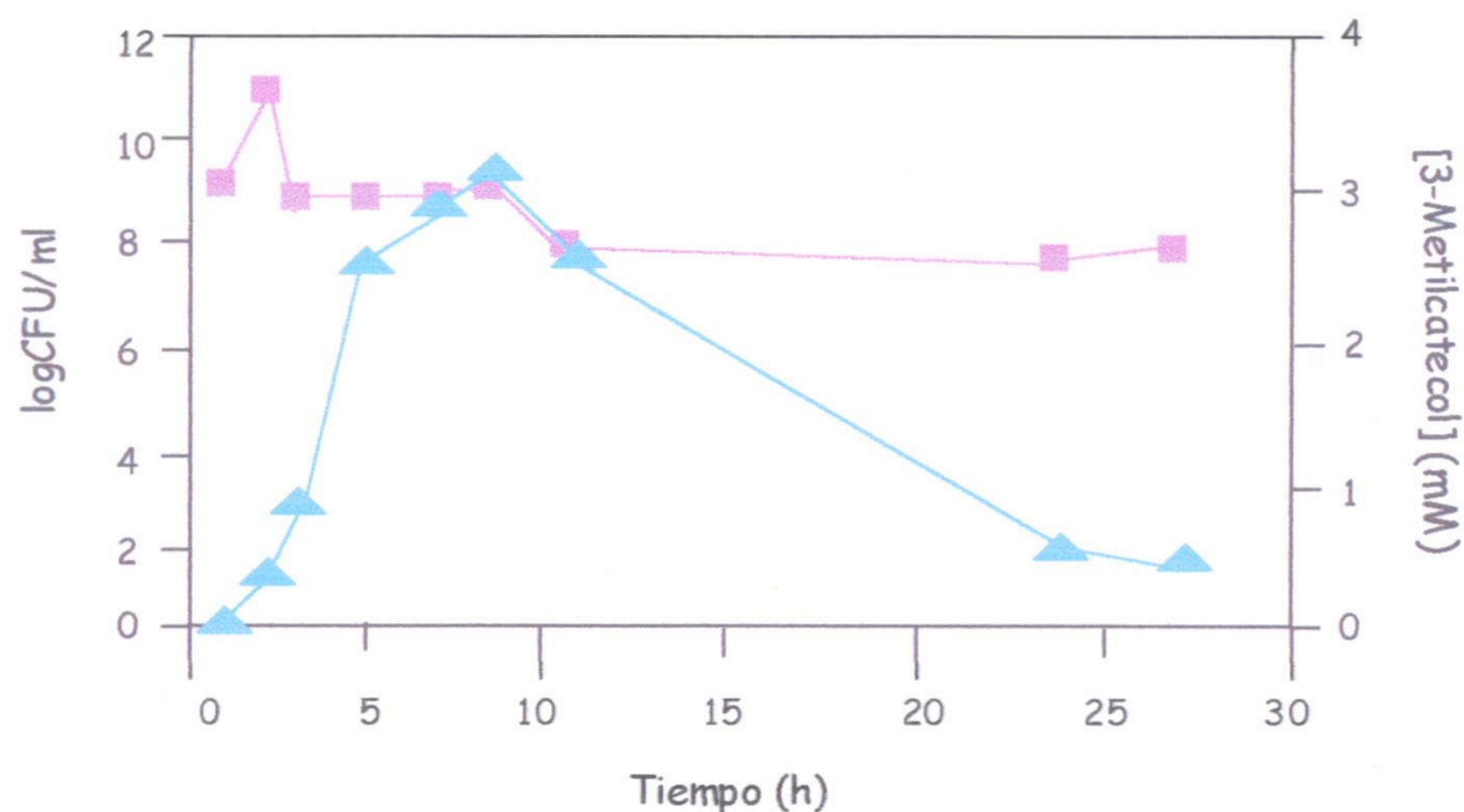


Figura V.3. Viabilidad y producción de 3-metilcatecol en la fermentación de *m*-xileno en fase acuosa por *P. putida* DOT-T1E Δ todC1C2 (pWW0::*xylE*::Km). El experimento se llevó a cabo en un biorreactor de 3 litros, en condiciones de cultivo semicontinuo, como se explica en Materiales y Métodos. La viabilidad celular se ha medido mediante el conteo de unidades formadoras de colonias en placas de LB; y la concentración de 3-metilcatecol en el medio se midió mediante cromatografía (HPLC). Los cuadrados morados representan la viabilidad celular (logCFU/ml) y los triángulos verdes representan la concentración de 3-metilcatecol.

Para determinar si la concentración máxima de 3-metilcatecol alcanzada reflejaba la toxicidad intrínseca del producto, añadimos concentraciones crecientes de 3-metilcatecol a cultivos de células de *P. putida* DOT-T1E Δ todC1C2::*kiLAB* (pWW0::*xylE*::Km) en medio mínimo M9 con glucosa [0,5% (p/vol)] y medimos el efecto sobre el crecimiento. Encontramos que una concentración de 3 mM de 3-metilcatecol en el medio inhibió el crecimiento de la cepa. Con estos resultados concluimos que la causa más probable de la baja producción de 3-metilcatecol era la toxicidad del producto frente al biocatalizador.

Como se observa en la Figura V.3, tras alcanzar el máximo de acumulación de 3-metilcatecol la concentración del compuesto disminuyó y el medio de cultivo adquirió un color marrón oscuro, probablemente debido a la inestabilidad del 3-metilcatecol. Se sabe que en soluciones acuosas aireadas a pH por encima de 6 los

catecoles se autooxidan a quinonas formándose posteriormente polímeros de alto peso molecular, que dan al medio el color marrón pardusco característico (Scheweigert et al., 2001).

V.7. Producción de 3-metilcatecol en un sistema de dos fases (fase acuosa:: alcohol alifático) con *P. putida* DOT-T1EΔ*todC1C2* (pWW0::xylE::Km) como biocatalizador

Dado que la limitación de la producción de 3-metilcatecol es debida a la toxicidad del compuesto, nos planteamos utilizar alguno de los alcoholes alifáticos estudiados como segunda fase para que fuese extrayendo el 3-metilcatecol producido por las células. Octanol y decanol fueron los disolventes elegidos, octanol porque su $\log P_{ow}$ (2,9) es el más cercano al de los catecoles (el $\log P_{ow}$ 3-metilcatecol es de 1,5) y decanol porque su toxicidad era menor. Además el precio de estos alcoholes es 4 veces inferior al del nonanol, y ello será un factor a considerar en un probable desarrollo industrial del sistema. La producción de 3-metilcatecol se ensayó en un biorreactor de 3 litros, como se describió en Materiales y Métodos, con una segunda fase consistente en 50% (vol/vol) de 1-octanol o 1-decanol. En ambos casos, se partió de la misma cantidad de *m*-xileno, 119 mmoles en la fase orgánica, para que la concentración de *m*-xileno en la fase acuosa fuese alrededor de 0,150 mM (concentración de *m*-xileno no inhibitoria del crecimiento celular). Esta cantidad de *m*-xileno fue calculada utilizando la fórmula descrita por Isken et al., (1999):

$$n_{xyl,ad} = V_{air} \cdot c_{xyl,air} \cdot K_{aq,air}^{-1} + V_{aq} \cdot c_{xyl,aq} + V_{org} \cdot c_{xyl,oct}$$

donde *n* es la cantidad de moles de *m*-xileno añadidos al sistema para alcanzar una concentración de *m*-xileno en la fase acuosa determinada [$c_{xyl,aq}$ (moles por litro)]; V_{air} es el volumen de aire y $K_{aq,air}$ es el coeficiente de partición del *m*-xileno entre el agua y el aire, y es 3,7 según Amoores y Hautala (1983); V_{aq} es el volumen de la fase acuosa; V_{org} es el volumen de la fase orgánica, y $c_{xyl,oct}$ es la concentración de *m*-xileno en la fase orgánica (octanol), que $c_{xyl,oct} = 1585 c_{xyl,aq}$, en virtud del $\log P_{ow}$ del

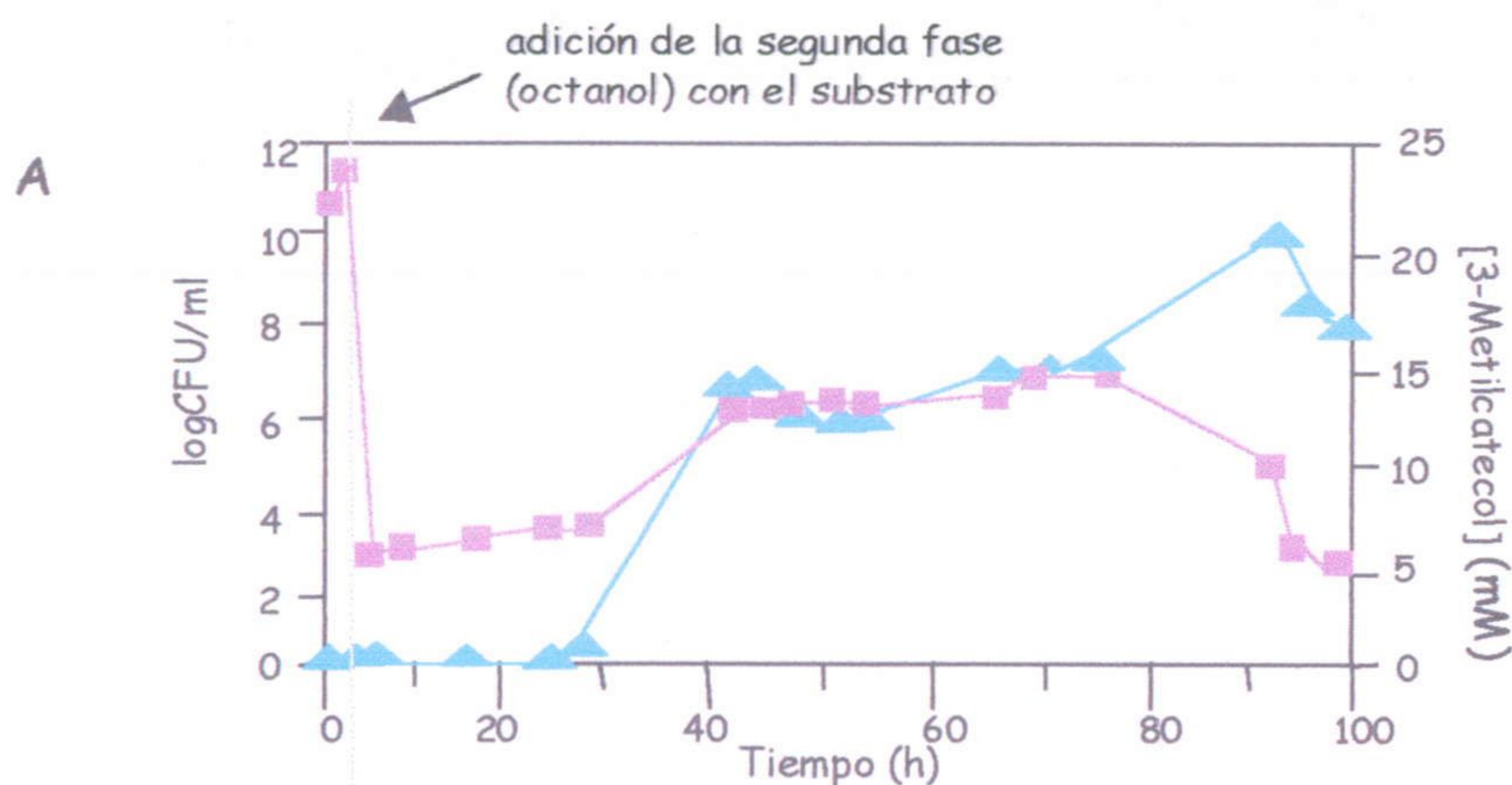
m-xileno (3,2). El primer término de la fórmula lo desestimamos porque es muy bajo. Considerando que $V_{org} = 0,5 V_{aq}$, lo que nos queda es que

$$n_{xyl,ad} = 794c_{xyl,aq}$$

y como queremos que la concentración de *m*-xileno en la fase acuosa sea de 0,150 mM, tenemos que $n_{xyl,ad} = 794c_{xyl,aq} = 794 \cdot 0,150 \text{ mM} = 119 \text{ mmoles}$.

Este cálculo lo hemos hecho atendiendo al coeficiente de partición del *m*-xileno en la mezcla agua: octanol. No tenemos datos precisos sobre el coeficiente de partición de *m*-xileno en una mezcla agua:decanol, pero asumimos que es parecido al caso del octanol, y por ello para el ensayo de biotransformación utilizamos la misma cantidad de *m*-xileno calculada para un sistema de doble fase con octanol como fase orgánica, es decir pusimos 119 mmoles de *m*-xileno en la fase orgánica.

La producción máxima que encontramos con 1-octanol fue de 21 mM (2,6 g/l), observándose una fase de latencia muy larga en la producción (aprox. 30 horas) desde la adición del substrato de la reacción y de la segunda fase. La producción fue de 0,93 moles $\text{h}^{-1} \text{m}^{-3}$. La producción con 1-decanol como segunda fase apenas presentaba fase de latencia, alcanzando una producción máxima de 70 mM (8,7 g/l) a las 32 horas de incubación, con una productividad volumétrica de 4,8 moles $\text{h}^{-1} \text{m}^{-3}$. La concentración máxima de 3-metilcatecol en la fase acuosa fue de 0,7 mM en el caso del octanol (a las 94 horas) y de 3 mM (a las 32 horas) cuando el decanol fue la segunda fase. En ambos casos se observó la aparición de productos derivados de la oxidación del 3-metilcatecol (Figura V.5).



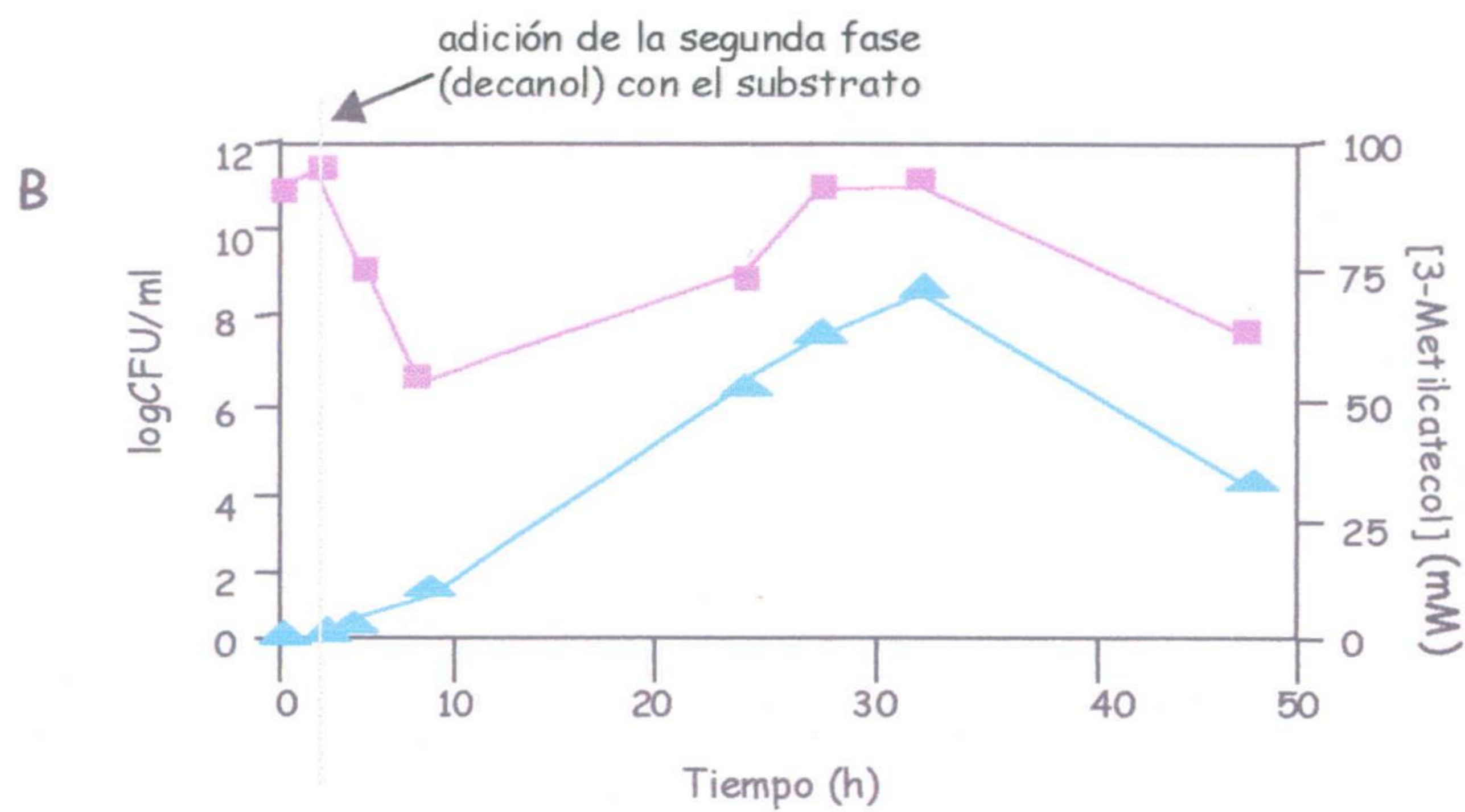


Figura V.4. Viabilidad y producción de 3-metilcatecol en un sistema de doble fase. A. 50% (vol/vol) de octanol como segunda fase. **B.** 50% (vol/vol) de decanol como segunda fase. En ambos casos la concentración inicial de *m*-xileno fue la misma. Los datos de concentración de 3-metilcatecol se refieren a la fase orgánica en las dos gráficas. Notar que las escalas de concentración de 3-metilcatecol son diferentes. También cabe destacar la fase de latencia de aproximadamente 30 horas cuando se utilizó octanol como segunda fase. Los cuadrados morados representan CFU/ml y los triángulos verdes, la concentración de 3-metilcatecol en la fase orgánica (determinada mediante HPLC en fase normal).

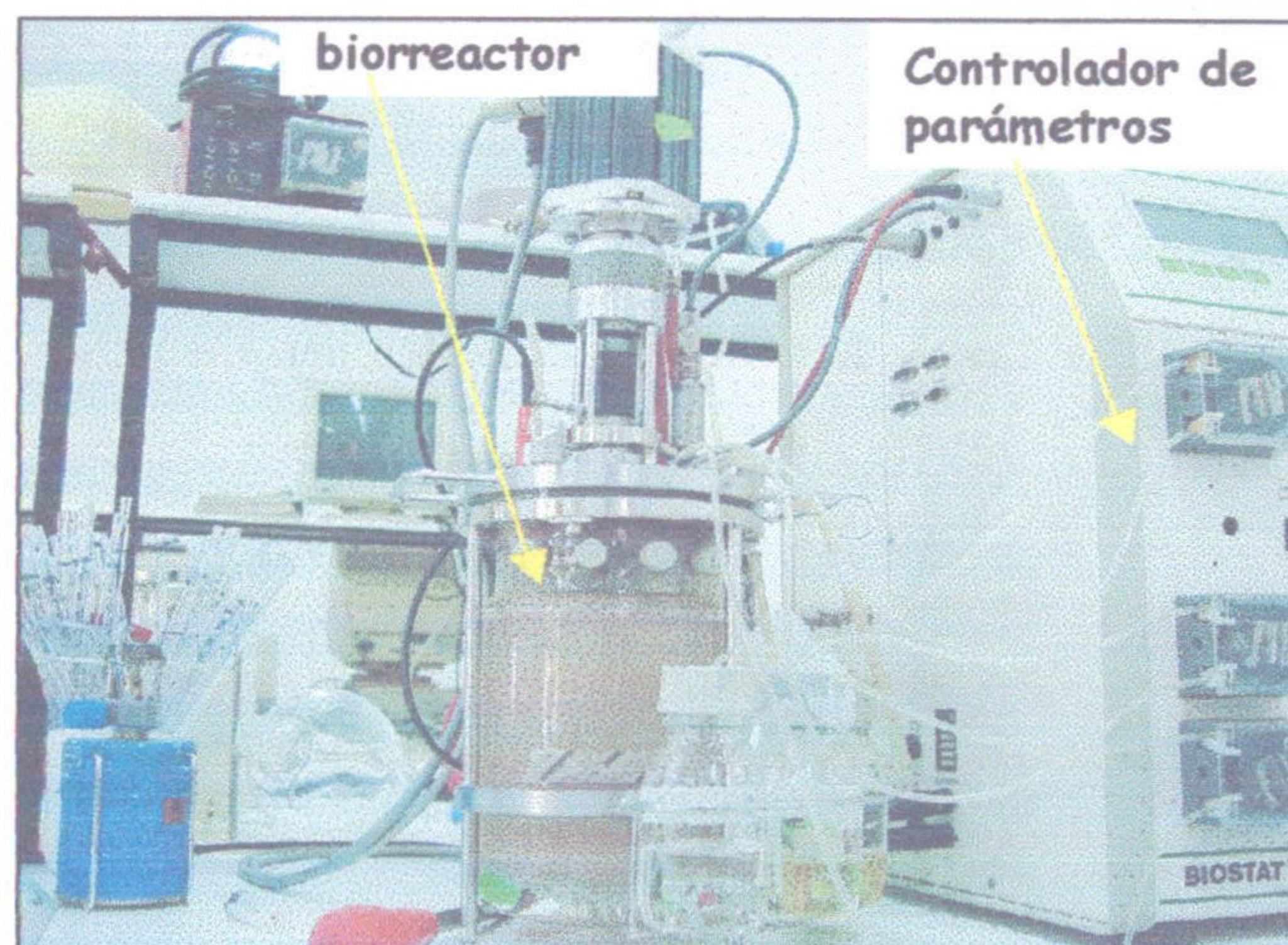


Figura V.5. Biorreactor de *P. putida* DOT-T1EΔ*todC1C2* (pWW0::*xyIE*::Km) con decanol como segunda fase a las 28 horas. Se observa el color marrón oscuro característico de la polimerización de las quinonas, producto de la autooxidación del 3-metilcatecol.

DISCUSIÓN

El uso de una segunda fase en la que tanto el sustrato como el producto se disuelven preferentemente añade un gran valor a los procesos de biotransformación, en el sentido de que resuelve el problema de la solubilidad de algunos compuestos. Además, en el caso de compuestos químicos tóxicos, su solubilización en la fase orgánica mejora la capacidad del sistema. Sin embargo, no todos los disolventes son biocompatibles con la cepa que porta la maquinaria adecuada para la reacción de interés, y la elección de una fase orgánica para el proceso de biotransformación no es una cuestión trivial. El disolvente orgánico debe cumplir algunos criterios (de los que se trató en la Introducción de esta Tesis Doctoral, apartado 6.2), y en particular debe ser biocompatible con el microorganismo elegido. La cepa *Pseudomonas putida* DOT-T1E es altamente tolerante a diferentes hidrocarburos aromáticos (Ramos et al., 1995), como hemos visto en las secciones anteriores de esta Tesis Doctoral. Además es fácilmente manipulable, lo que la hace muy interesante para su utilización en biotransformaciones (Ramos-González et al., 2003; Mosqueda et al., 1999). Como ya se ha tratado con anterioridad, los hidrocarburos aromáticos no son adecuados para los procesos industriales por su toxicidad y volatilidad, pero los alcoholes alifáticos pueden ser buenos candidatos por las características que se resumen en la Tabla V.1, y por su baja toxicidad. Nuestros resultados demuestran que *P. putida* DOT-T1E es también altamente tolerante a los 3 alcoholes alifáticos ensayados, requiriendo la preexposición de las células a concentraciones subletales de este octanol en el caso de la tolerancia a este compuesto (Figura V.1). Además, hemos comprobado que aunque el octanol no limitó la viabilidad celular cuando se preindujo el cultivo, concentraciones relativamente bajas de este compuesto sí limitaron el crecimiento celular, probablemente porque la célula requiere mucha energía para el funcionamiento de las bombas. El alcohol alifático que resultó ser menos tóxico para *P. putida* DOT-T1E fue 1-decanol, como era de esperar atendiendo a su $\log P_{ow}$.

La tolerancia de *P. putida* DOT-T1E hacia estos compuestos parece ser debida a la rigidificación de la membrana celular, mediante la isomerización *cis/trans* de los ácidos grasos insaturados (Junker y Ramos, 1999; Weber et al., 1994; ver Introducción apartado 5.1), y a la acción de las bombas de eflujo Ttg que evitan la acumulación de estos alcoholes alifáticos en el interior de las células.

Nuestros resultados indican que al menos tres bombas de eflujo de amplio perfil de sustrato se indujeron a niveles moderados en presencia de 1-octanol, 1-nonanol, y 1-decanol (Tabla V.4). Además, hemos demostrado la importancia de las bombas TtgABC y TtgGHI en la tolerancia a alcoholes alifáticos: el mutante doble más sensible a tolueno fue el que carece de ambas bombas (*P. putida* DOT-T1E-PS32), seguido del mutante *P. putida* DOT-T1E-PS30 (TtgDEF⁻/TtgGHI⁻) y siendo el menos sensible el mutante *P. putida* DOT-T1E-82 (TtgABC⁻/TtgDEF⁻). Aunque la bomba TtgDEF también participa en la expulsión de los tres alcoholes, como lo demuestra la mayor sensibilidad del mutante triple (*P. putida* DOT-T1E-PS34) (Tabla V.3). Estos resultados concuerdan con los del de los Capítulos I y III de esta Tesis Doctoral, que demostraron que la bomba TtgGHI parecía ser la bomba más importante en la tolerancia a tolueno.

La producción máxima de 3-metilcatecol en el sistema con fase acuosa fue alrededor de 3 mM. Esta limitación parece deberse a la toxicidad intrínseca del producto, que impide el crecimiento de *P. putida* DOT-T1E a dicha concentración. Al utilizar una segunda fase consistente en un alcohol alifático, más del 96% del 3-metilcatecol producido fue extraído por esta fase orgánica, evitando así la toxicidad hacia *P. putida* y permitiendo la producción del compuesto en concentraciones superiores a 3 mM (que es el límite de producción en fase acuosa). Por tanto, la adición de una segunda fase al biorreactor mejoró considerablemente la producción de 3-metilcatecol; en términos cuantitativos la adición de 1-decanol como segunda fase incrementó la producción del compuesto deseado en un factor de 20. Aunque los tres alcoholes alifáticos ensayados (1-octanol, 1-nonanol y 1-decanol) fueron biocompatibles hacia *P. putida* DOT-T1E (si las células se preinducían en el caso del octanol), la producción de 3-metilcatecol fue mayor con 1-decanol, probablemente porque el 1-octanol es más tóxico que el 1-decanol y por ello las células necesitan menos energía para evitar los efectos dañinos de la segunda fase en el caso del 1-decanol.

Los catecoles sustituidos son precursores muy valiosos en los procesos de producción farmacéuticos (Ennis y Ghazal, 1992; Hartog y Wouters, 1988; van Scharrenburg y Frankena, 1996); y el catecol y sus derivados son compuestos muy importantes en la síntesis de aditivos sintéticos como vanillina (Shirai, 1986). La

síntesis química de los catecoles sustituidos en posición 3 es compleja y se requieren muchos pasos complicados, que dan lugar a una mezcla de catecoles diferentes y además con un rendimiento muy bajo (Held et al., 1998; van Scharrenburg y Frankena, 1996). Ésta es la razón del estudio de posibles alternativas a la síntesis química de estos compuestos.

La producción de catecoles a partir de tolueno fue estudiada por primera vez en *P. putida* 2313 (Robinson et al., 1992). Esta cepa es capaz de mineralizar el tolueno por completo, por lo que se realizó una mutagénesis con N-metil-N-nitro-N-nitrosoguanidina (NTG) con el fin de encontrar un mutante bloqueado en la transformación de 3-metilcatecol. Basado en este mutante se diseñó un sistema de producción de 3-metilcatecol que consiguió producir una concentración máxima de 3-metilcatecol (en un sistema de una sola fase acuosa) de 1,3 g/l (10 mM). En este estudio, al igual que en el llevado a cabo en esta Tesis Doctoral, se demostró que la causa de la baja producción era el efecto tóxico del 3-metilcatecol presente en el medio. Se intentó mejorar la productividad mediante la adsorción sobre partículas de carbón activado granular, y de esta forma se incrementó la producción, que aumentó hasta una concentración máxima de 5 g/l (40 mM).

Recientemente el grupo de J. A. M. de Bont ha usado un sistema de doble fase con distintas cepas de *Pseudomonas putida* como biocatalizadores para la producción de 3-metilcatecol a partir de tolueno. En el primer estudio que presentaron utilizaban *P. putida* DS10 como cepa productora (es *P. putida* S12 a la que introdujeron en el cromosoma los genes *todC1C2BAD* de *P. putida* F1, bajo el control de un promotor inducible por salicilato) (Wery et al., 2000). Midieron la producción de 3-metilcatecol en matraces tanto en una sola fase acuosa como en un sistema de doble fase con octanol 40% (vol/vol) como segunda fase. Sus resultados fueron: 0,5 g/l (4 mM) en un sistema de una sola fase (medio mínimo con succinato) y 3,1 g/l (25 mM) cuando utilizaban el sistema de dos fases. Los inconvenientes de este sistema es que necesita la presencia de salicilato para inducir los genes de producción de catecol y que esta cepa no es tan tolerante como la *P. putida* DOT-T1E ante disolventes orgánicos (ver Capítulo II de esta Tesis Doctoral).

Con el fin de mejorar la productividad utilizaron otra cepa de *Pseudomonas putida*. En este caso fue *P. putida* MC2: se trata de un derivado de *P. putida* F1 mutado en la ruta de TOD de degradación de tolueno que acumula catecoles, en cuyo genoma se

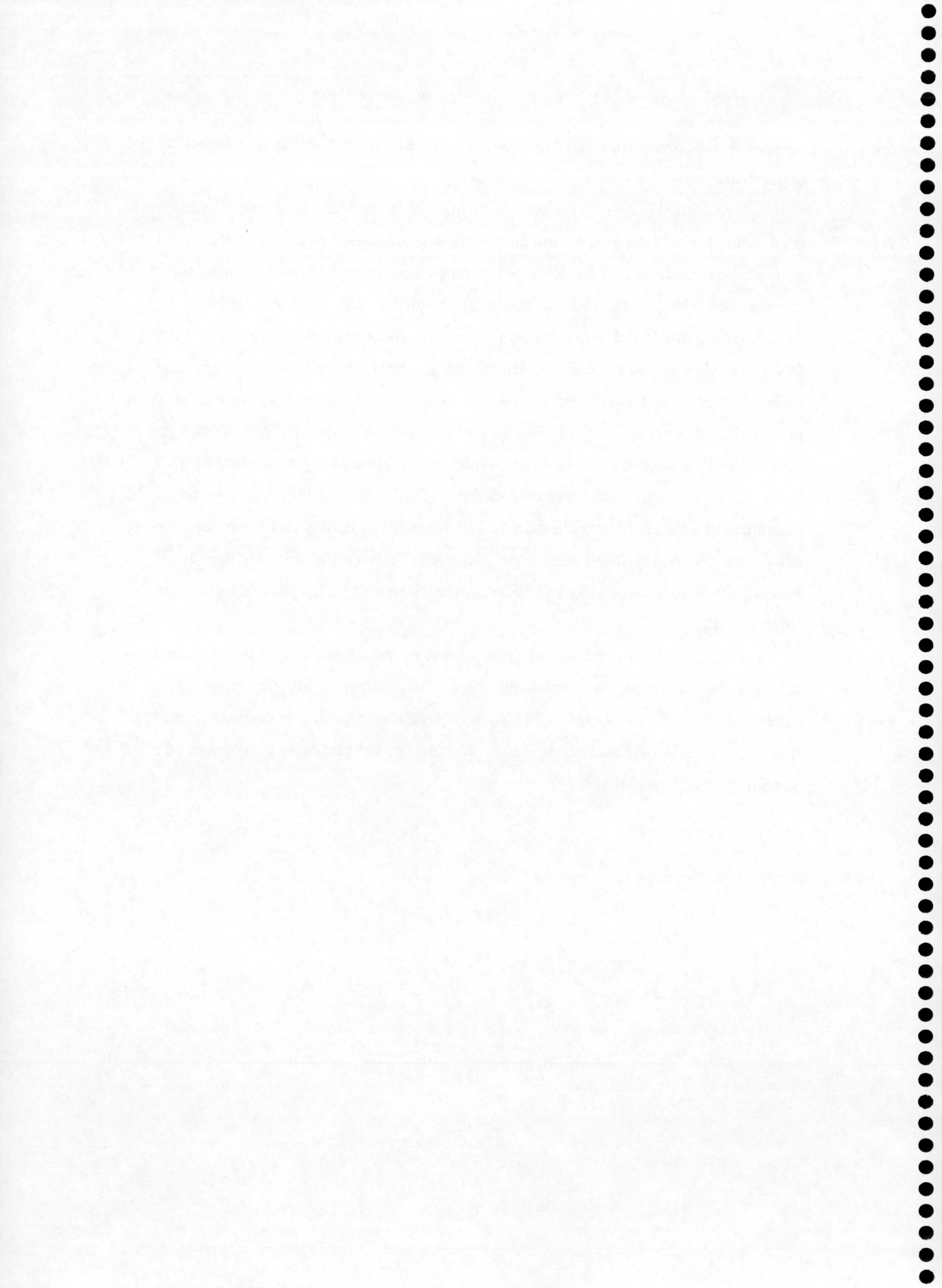
integraron además varias copias de los genes *todC1C2BAD* bajo el control de un promotor inducible por salicilato (Hüsken et al., 2001 [a]). La concentración máxima de 3-metilcatecol producida en un sistema de doble fase con octanol al 100% (vol/vol) fue de 48 mM (5,95 g/l, productividad volumétrica de 0,9 moles h⁻¹ m⁻³) (Hüsken et al., 2001 [b]). Cabe destacar que el medio utilizado para la producción en este caso fue LB, que el sistema necesitó 50 horas para alcanzar la concentración máxima y que se observó una fase de latencia de aproximadamente 24 horas. Esta cepa es también menos tolerante que *P. putida* DOT-T1E a tolueno (Capítulo II). No realizaron el experimento en medio mínimo porque el biocatalizador sufría una inhibición mucho mayor debido a la toxicidad de los compuestos. Posteriormente mejoraron el sistema mediante la incorporación de una membrana que separase las dos fases (Hüsken et al., 2002) y evitando así la toxicidad de la fase orgánica. Consiguieron incrementar la productividad volumétrica en un 40% (hasta 1,4 moles h⁻¹ m⁻³) y evitar la fase de latencia, pero no mejoraron la concentración máxima de producto, llegando a una producción de 6,9 g/l (56 mM), también en medio LB. No alcanzaron una producción mayor por la baja efectividad de la membrana en cuanto a transferencia de masa, por lo que el 3-metilcatecol se acumulaba en la fase acuosa ejerciendo su efecto tóxico sobre las células.

Una diferencia importante con nuestro sistema es que en los casos anteriores se ha utilizado un medio rico, LB, como fase acuosa. Desde el principio nosotros decidimos utilizar medio mínimo puesto que es un medio controlado en el que sabemos todos los componentes que intervienen y que es mucho más viable económicamente en el caso de plantear un proceso industrial, ya que la fuente de carbono utilizada (glucosa) es muy barata. En nuestro caso hemos demostrado que el octanol, que a priori se pensó podría ser la mejor solución en sistemas de doble fase, no soluciona sustancialmente el problema de la toxicidad, puesto que el biocatalizador está muy limitado. El decanol es por tanto mejor opción, llegando a una productividad de 4,8 moles h⁻¹ m⁻³, alrededor de 5 veces mayor que con octanol. En nuestro sistema hemos alcanzado el límite de producción, puesto que aunque hemos podido incrementar la producción con respecto a octanol como segunda fase, el biocatalizador se inhibe cuando la concentración en la fase acuosa llega a 3 mM. Por tanto, habrá que seguir mejorando el sistema, quizá recurriendo a mezclas de disolventes en las que se incluya un co-disolvente en una concentración muy baja por

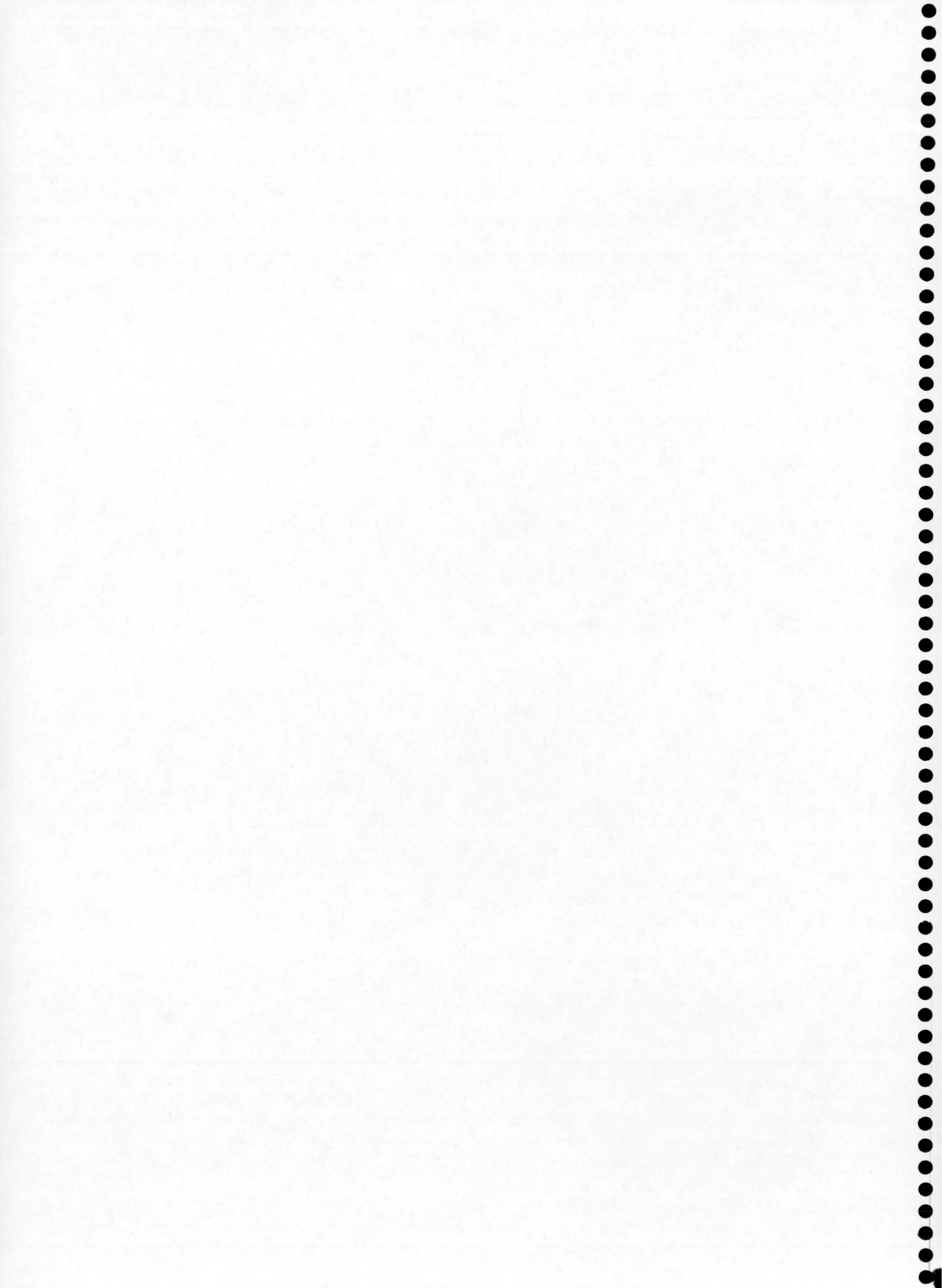
ser más tóxico, pero capaz de proporcionar a la fase orgánica una mayor capacidad extractiva.

Otro factor a tener en cuenta que disminuye la producción de catecoles es su inestabilidad. Los catecoles en soluciones acuosas aireadas a $\text{pH} > 7$ se oxidan hasta quinonas, que polimerizan dando lugar a compuestos de alto peso molecular de color marrón oscuro (Scheweigert et al., 2001). El producto es más estable a pH bajo. La degradación química del 3-metilcatecol es aproximadamente del 60% a pH 8,0; del 9% a pH 7,0 y del 3% a pH 5,8 (Hüsken et al., 2001). Hemos observado que se forman estos compuestos de color oscuro en nuestros ensayos: se forman muy pronto cuando tenemos una sola fase (a partir de las 5 horas); mientras que cuando está presente la segunda fase la aparición de estos polímeros se retrasa hasta las 28 horas en el caso del biorreactor con 1-decanol (Figura V.5), debido a que la mayor acumulación de 3-metilcatecol se da en la fase orgánica, donde estos procesos de autooxidación no se producen. Este fenómeno explica la disminución de la concentración de 3-metilcatecol en la fase orgánica a partir de las 32 h de incubación (Figura V.4.B).

En este trabajo por tanto se demuestra el concepto de que la adición de una segunda fase mejoraba la producción y que es posible la utilización de cepas tolerantes como *P. putida* DOT-T1E para la producción de compuestos de interés industrial, en sistemas en los que otras cepas menos tolerantes no son capaces de funcionar como biocatalizadores.



DISCUSIÓN GENERAL



DISCUSIÓN GENERAL

Pseudomonas putida DOT-T1E es una cepa altamente tolerante a disolventes orgánicos que se aisló de la planta de tratamiento de aguas residuales del puente de los Vados en Granada (Ramos et al., 1995). Los mecanismos que confieren tolerancia a disolventes orgánicos en esta cepa han sido y siguen siendo estudiados en nuestro laboratorio. El interés del estudio de las cepas tolerantes a disolventes orgánicos estriba en su potencial utilización en procesos de biorremediación de lugares altamente contaminados con hidrocarburos aromáticos, y en procesos de biocatálisis en los que los substratos y/o los productos son tóxicos para las células o insolubles en agua. La tolerancia en esta cepa se debe a su capacidad para reajustar la fluidez de la membrana mediante la isomerización *cis/trans* de los ácidos grasos que forman los fosfolípidos de la membrana (Ramos et al., 1997), y en mayor medida a la actuación de unos sistemas de bombas de eflujo de la familia RND que son capaces de expulsar los disolventes orgánicos desde el citoplasma o el espacio periplásmico hasta el exterior, mediante un proceso acoplado a la fuerza protón-motriz (Ramos et al., 1997 [b]; Godoy et al., 2001).

Al inicio de esta Tesis Doctoral se conocían dos de las tres bombas (TtgABC y TtgDEF) implicadas en la tolerancia a tolueno (Ramos et al., 1998; Mosqueda y Ramos; 2000), constituyendo la identificación y caracterización de la bomba TtgGHI una parte muy significativa de esta Tesis Doctoral (Capítulos I y III). Estos estudios han puesto de manifiesto que la bomba TtgGHI es un elemento clave en la tolerancia a tolueno, ya que participa tanto en la tolerancia inducible como en la constitutiva, y un mutante en *ttgH* es extremadamente sensible a un choque repentino con tolueno. De hecho, la identificación de TtgGHI nos permitió concluir que probablemente no existan más bombas de eflujo en *P. putida* DOT-T1E implicadas en la tolerancia a tolueno y xilenos, o puede que la participación de otras bombas de eflujo sea poco significativa desde el punto de vista cuantitativo en cuanto a la expulsión de estos hidrocarburos aromáticos. Además hemos constatado que las cepas de *Pseudomonas* sp. más tolerantes a disolventes orgánicos son aquellas que portan en su genoma un operón muy similar a *ttgGHI* [Capítulos I, II y III]).

El hecho de que las tres bombas de *P. putida* DOT-T1E actúen de forma aditiva (Capítulo III) y se expresen de forma diferente (Capítulos I y IV), sugiere una actuación conjunta y finamente regulada de las mismas. A nivel local, la expresión de cada una de estas bombas de eflujo de *P. putida* DOT-T1E parece estar controlada por un represor transcripcional que se localiza adyacente al operón de la bomba y cuyo gen se transcribe de forma divergente. A pesar de haber identificado un operón aguas arriba de los genes estructurales de la bomba *ttgGHI*, constituido por los genes *ttgV* y *ttgW*, cuyos productos presentan homología con reguladores transcripcionales de la familia IclR y TetR respectivamente (Capítulo IV), sólo hemos podido asignar la participación de TtgV en la regulación de la expresión de los operones *ttgGHI* y *ttgVW*. Los sistemas Mex de *P. aeruginosa* implicados en resistencia a antibióticos parece que están regulados de una manera coordinada (Li et al., 2000 [b]), sobreexpresándose las bombas MexCD-OprJ y MexEF-OprN en ausencia de la bomba MexAB-OprM. Este tipo de regulación coordinada explicaría por qué el mutante doble *P. putida* DOT-T1E-82 es más tolerante al choque de tolueno cuando las células están preinducidas que el mutante sencillo *P. putida* DOT-T1E-18 (Tabla III.2, Capítulo III). De hecho, resultados preliminares indican que la expresión de la bomba TtgDEF aumenta en un doble mutante *ttgB/ttgH* (Terán, resultados sin publicar).

Las bombas de eflujo de *E. coli* y *P. aeruginosa* además de estar reguladas por los reguladores adyacentes, responden a reguladores globales. Por ejemplo, en *E. coli* AcrR modula la expresión de la bomba AcrAB-TolC evitando una producción excesiva de la bomba (Alekhun y Levy, 1997), mientras que MarR y otros reguladores transcripcionales globales (MarA, SoxS y Rob) son los responsables de la inducción de los genes de la bomba (Nakajima et al., 1995 [a y b]). Por otro lado, el nivel de expresión de AcrAB está regulado positivamente por SdiA, un regulador global implicado en fenómenos de *quorum sensing* (Rahmati et al., 2002), que además relaciona la expresión de la bomba con la fase de crecimiento.

El hecho de que las bombas AcrAB-TolC de *E. coli* y MexAB-OprM de *P. aeruginosa* estén ligadas a fenómenos de *quorum sensing* y que sean capaces de transportar moléculas señal del tipo de las homoserín lactonas (Rahmati et al., 2002; Pearson et al., 1999) incide de lleno en la cuestión del papel fisiológico de las bombas de eflujo y de cuál puede ser el substrato natural de las bombas. Otro dato a

tener en cuenta es que ninguno de los antibióticos transportados por la bomba MexAB-OprM induce su expresión, lo que hace suponer que esta bomba no surgió para hacer frente a antibióticos, sino para otras funciones fisiológicas diferentes (Poole et al., 1994; Pearson et al., 1999). Nuestros resultados de resistencia a antibióticos en biofilms de *P. putida* DOT-T1E y *P. putida* DOT-T1E-18 (*ttgABC*) corroboraron los resultados de De Kievit y colaboradores (2001) que demostraron que la resistencia a antibióticos en biofilms de *P. aeruginosa* no está mediada por las bombas de eflujo. Dado que la forma predominante de vida de los microorganismos en la naturaleza es como biofilms, se reafirman las dudas en cuanto al papel fisiológico de protección frente a antibióticos de las bombas de eflujo. Esta función puede ser simplemente un fenómeno de oportunismo, ayudado por la flexibilidad del sitio de unión de substrato en el componente de membrana interna o translocasa (Murakami et al., 2002; Yu et al., 2003 [a y b]).

El desarrollo actual de la tecnología de proteómica y de *DNA-arrays*, así como el estudio de cristales de los distintos componentes de las bombas de eflujo, permitirán en un futuro no muy lejano contestar a todas las preguntas acerca de estos sistemas. Esta información permitirá identificar e integrar todas las respuestas fisiológicas que hacen posible la tolerancia a disolventes. Lo que a su vez hará posible aumentar las capacidades de tolerancia en microorganismos de interés medioambiental y biocatalítico, mediante la transferencia de los genes de bombas de eflujo, así como de las redes de regulación importantes para su funcionamiento.

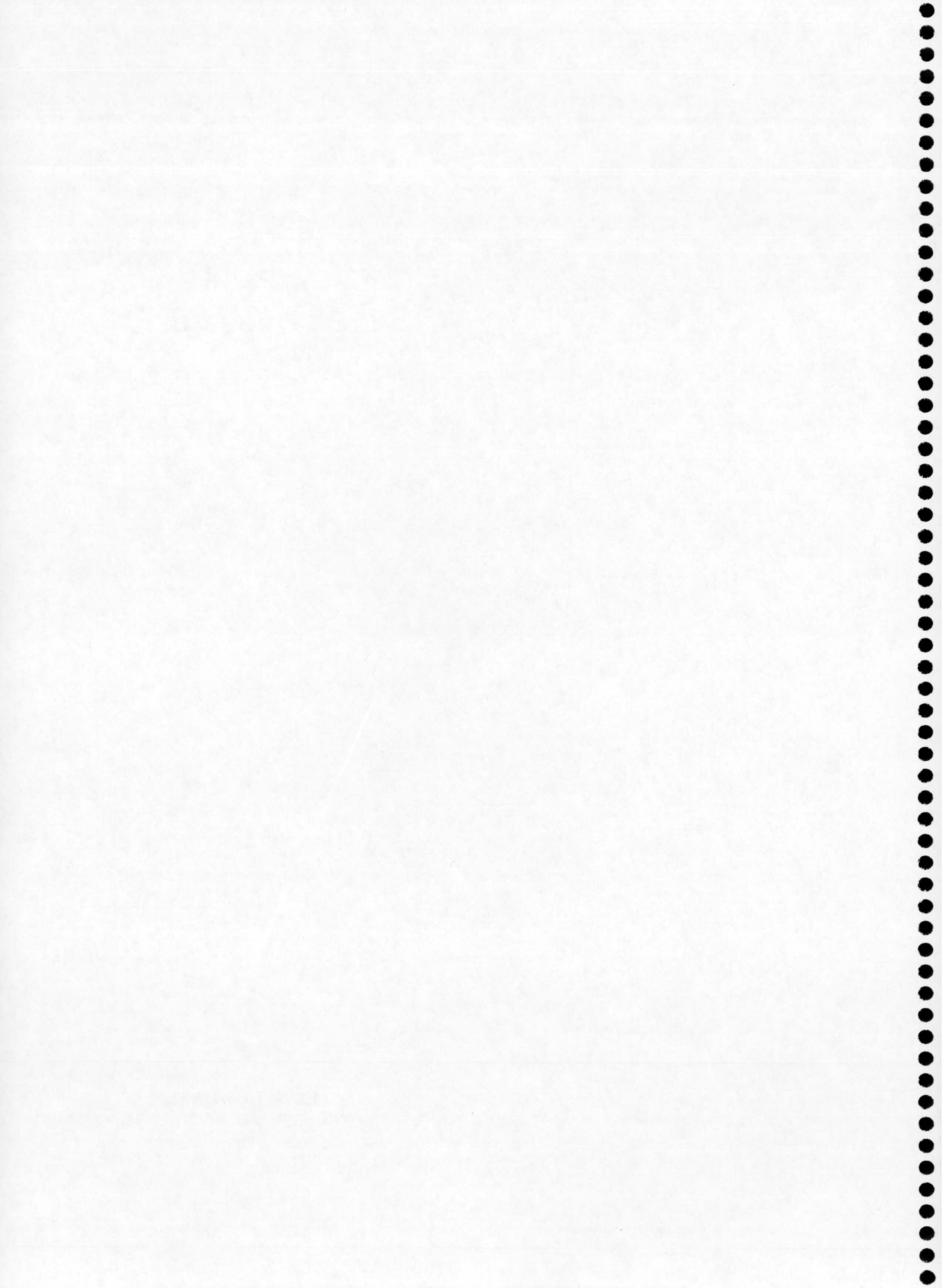
Desde un punto de vista medioambiental los microorganismos tolerantes a disolventes orgánicos son una herramienta muy importante en la lucha contra la contaminación ambiental, sobre todo si poseen rutas catabólicas para la degradación y/o mineralización de contaminantes del tipo de los hidrocarburos aromáticos (como *P. putida* DOT-T1E). En zonas contaminadas con este tipo de compuestos, frecuentemente no crece ninguna bacteria degradadora debido a la alta toxicidad de los compuestos. La utilización en tareas de limpieza de cepas resistentes (modificadas o no genéticamente para hacerlas degradadoras) sería una buena solución para este problema.

Desde el punto de vista biotecnológico, las cepas tolerantes podrían permitir la producción de compuestos, que por las características físico-químicas tanto de los reactivos como de los productos requerirían una síntesis química muy complicada.

Además de que en procesos de esa naturaleza se obtiene un rendimiento muy bajo debido a la baja solubilidad en agua de los compuestos implicados. En esta Tesis Doctoral hemos demostrado que utilizando un derivado *P. putida* DOT-T1E con la maquinaria enzimática necesaria para la acumulación de catecoles a partir de tolueno y toluenos sustituidos, y como segunda fase un alcohol alifático relativamente apolar (decanol), tóxico para la mayoría de microorganismos, se logra mejorar significativamente la producción de estos compuestos útiles en la producción de compuestos farmacéuticos y aditivos sintéticos (Capítulo V). Por ello aventuramos el éxito de este tipo de aproximaciones en la síntesis industrial de compuestos de alto valor añadido.

Por tanto, la identificación y conocimiento de los mecanismos moleculares de la tolerancia a disolventes orgánicos nos permitirá avanzar en el conocimiento y en la mejor utilización de estas cepas. En este sentido, esta Tesis Doctoral aporta un estudio profundo sobre uno de los mecanismos esenciales para la tolerancia a disolventes orgánicos y propone una alternativa biotecnológica en la síntesis de compuestos tóxicos aprovechando las capacidades de tolerancia y plasticidad genética de *P. putida* DOT-T1E.

CONCLUSIONES

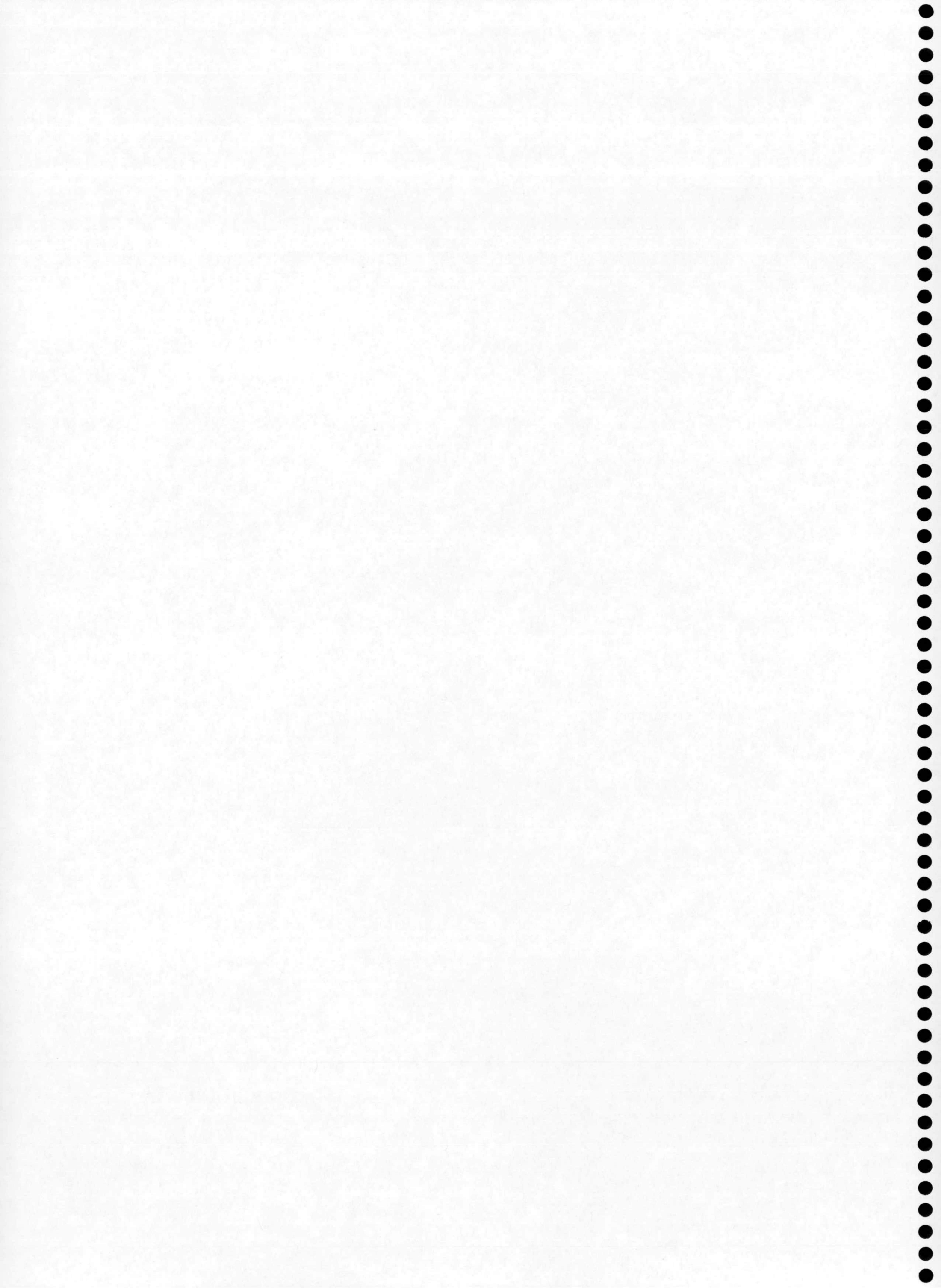


CONCLUSIONES

1. La bomba TtgGHI participa en la tolerancia intrínseca e inducible a tolueno en la cepa *Pseudomonas putida* DOT-T1E, siendo fundamental para su supervivencia ante choques con 0,3% (vol/vol) de tolueno.
2. La tolerancia a disolventes orgánicos en distintas cepas de *Pseudomonas* se correlaciona con el número y tipo de bombas de eflujo presentes en cada cepa
3. La bomba TtgABC participa en la expulsión de los antibióticos ampicilina, cloramfenicol, tetraciclina, ácido nalidíxico y cerulenina, y los disolventes orgánicos tolueno, estireno, *m*-xileno, etilbenceno, propilbenceno, octanol, nonanol y decanol. La bomba TtgDEF transporta los disolventes tolueno, estireno, octanol, nonanol y decanol, y no parece estar implicada en la expulsión de antibióticos. La bomba TtgGHI participa fundamentalmente en la expulsión de los disolventes tolueno, estireno, *m*-xileno, etilbenceno, propilbenceno, octanol, nonanol y decanol, y en menor medida en la expulsión de los antibióticos ampicilina, cloramfenicol, tetraciclina y ácido nalidíxico.
4. En 5' con respecto a los genes *ttgGHI* se localiza el operón *ttgVW*, que se transcribe divergentemente con respecto al operón que codifica los genes de la bomba de eflujo. La expresión del operón de la bomba *ttgGHI* y del operón *ttgVW* aumentó en presencia de los disolventes orgánicos tolueno, benceno, estireno, *p*-xileno, etilbenceno, y propilbenceno. La expresión de estos dos operones no se incrementó en presencia de los antibióticos cloramfenicol y ampicilina.
5. TtgV es el regulador transcripcional que reprime la expresión del operón *ttgGHI* y su propia expresión, uniéndose específicamente a la región intergénica.
6. La presencia de los alcoholes alifáticos octanol, nonanol y decanol, en el medio de cultivo provocó un aumento de la isomerización *cis/trans* de los ácidos grasos de la membrana, así como un incremento de entre dos a tres veces de la expresión de los operones de las bombas de eflujo *ttgABC*, *ttgDEF* y *ttgGHI*.
7. *Pseudomonas putida* DOT-T1E es tolerante a la presencia de una segunda fase orgánica constituida por los alcoholes alifáticos octanol, nonanol y decanol, aunque el octanol inhibe el crecimiento de la cepa.

8. *Pseudomonas putida* DOT-T1E Δ *todC1*(pWW0::*xylE*::Km) transforma *m*-xileno en 3-metilcatecol, un producto precursor en la síntesis de compuestos farmacéuticos y aditivos sintéticos.
9. En un sistema acuoso la producción está limitada debido a la toxicidad del producto hacia la cepa, que a una concentración de 3 mM inhibe el crecimiento. En un sistema de dos fases agua:decanol la producción aumenta 20 veces con respecto al sistema acuoso.

BIBLIOGRAFÍA



- Adewoye, L., A. Sutherland, R. Srikumar, and K. Poole. 2002. The MexR repressor of the *mexAB-oprM* multidrug efflux operon in *Pseudomonas aeruginosa*: characterization of mutations compromising activity. *J. Bacteriol.* **184**: 4308-4312.
- Aendekerk, S., B. G hysels, P. Cornelis, and C. Baysse. 2002. Characterization of a new efflux pump, MexGHI-OpmD, from *Pseudomonas aeruginosa* that confers resistance to vanadium. *Microbiology* **148**: 2371-2381.
- Ahmed, M., C. M. Borsch, S. S. Taylor, N. Vazques-Laslop, and A. A. Neyfakh. 1994. A protein that activates expression of a multidrug efflux transporter upon binding the transporter substrates. *J. Biol. Chem.* **269**: 28506-28513.
- Aires, J. R., T. Köhler, H. Nikaido, and P. Plesiat. 1999. Involvement of an active efflux system in the natural resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to aminoglycosides. *Antimicrob. Agents Chemother.* **43**: 2624-2628.
- Aires, J. R., J. C. Pechere, C. Van Delden, and T. Köhler. 2002. Amino acid residues essential for function of the MexF efflux pump protein of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **46**: 2169-2173.
- Alekshun, M. N., and S. B. Levy. 1997. Regulation of chromosomally mediated multiple antibiotic resistance: the *mar* regulon. *Antimicrob. Agents Chemother.* **41**: 2067-2075.
- Alekshun, M. N., and S. B. Levy. 1999. Alteration of the repressor activity of MarR, the negative regulator of the *Escherichia coli marRAB* locus, by multiple chemicals in vitro. *J. Bacteriol.* **181**: 4669-4672.
- Alekshun, M. N., S. B. Levy, T. R. Mealny, B. A. Seaton, and J. F. Head. 2001. The crystal structure of MarR, a regulator of antibiotic resistance, at 2.3 Å resolution. *Nat. Struct. Biol.* **8**: 710-714.
- Alexander, M. 1981. Biodegradation of chemicals of environmental concern. *Science* **211**: 132-138.
- Altschul, S. F., W. Gish, W. Miller, E. W. Myers and D. J. Lipman. 1990. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* **215**: 403-410.
- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schatter, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller W. and Lipman, D. J. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* **25**: 3389-3402.
- Amoore, J. E., and E. Hautala 1983. Odor as an aid to chemical safety: odor thresholds compared with threshold limit values and volatilities for 214 industrial chemicals in air and water dilutions. *J. Appl. Toxicol.* **3**: 272-290.
- 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.C.
- Andersen, J. B., C. Stenberg, L. K. Poulsen, S. P. Bjørn, M. Givskov, and S. Molin. 1998. New unstable variants of green fluorescent protein for studies of transient gene expression in bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**: 2240-2246.
- Andersen C., E. Koronakis, E. Bokma, J. Eswaran, D. Humphreys, C. Hughes, and V. Koronakis. 2002. Transition to the open state of the TolC periplasmic tunnel entrance. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**: 11103-11108.
- Aono, R., K. Aibe, A. Inoue, and K. Horikoshi. 1991. Preparation of organic solvent-tolerant mutants from *Escherichia coli* K12. *Agric. Biol. Chem.* **55**: 1935-1938.

- Aono, R., M. Ito, A. Inoue, and H. Horikoshi. 1992. Isolation of a novel toluene-tolerant strain of *Pseudomonas aeruginosa*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 1: 145-146.
- Aono, R., M. Kobayashi, H. Nakajima, and H. Kobayashi. 1995. A close correlation between improvement of organic solvent tolerance levels and alteration of resistance toward low levels of multiple antibiotics in *Escherichia coli*. *Biosci. Biotech. Biochem.* 59: 213-218.
- Aono, R., and H. Kobayashi. 1997. Cell surface properties of organic solvent-tolerant mutants of *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 3637-3642.
- Aono, R., N. Tukagoshi, and 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.
- Aramaki, H., N. Yagi, and M. Suzuki. 1995. Residues important for the function of a multihelical DNA binding domain in the new transcription factor family of Cam and Tet repressors. *Protein Eng.* 8: 1259-1266.
- Arnou, L. E. 1937. Colorimetric determination of the components of 3,4-dihydroxyphenylalanine-tyrosine mixtures. *J. Biol. Chem.* 118: 531-537.
- Asako, H., H. Nakajima, K. Kobayashi, M. Kobayashi, and R. Aono. 1997. Organic solvent tolerance and antibiotic resistance increased by overexpression of *marA* in *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 1428-1433.
- Atlas, R. M. 1995. Efficacy of bioremediation: chemical and risk-based determinations. In *Bioremediation: The Tokyo'94 Workshop*. OCDE Documents, Paris, Francia.
- Ausubel, F. M., R. Brent, R. F. Kingston, D. D. Moore, J. G. Seidman, J. A. Smith and K. Struhl (eds.) 1991. *Current protocols in molecular biology*. Greene Publishing Associated. New York.
- Avila-Sakar, A. J., S. Misaghi, E. M. Wilson-Kubalek, K. H. Downing, H. Zgurskaya, H. Nikaido, and E. Nogales. 2001. Lipid-layer crystallization and preliminary three-dimensional structural analysis of AcrA, the periplasmic component of a bacterial multidrug efflux pump. *J. Struct. Biol.* 136: 81-88.
- Baggi, G., Barbieri, P., E. Galli, and S. Tollari. 1987. Isolation of a *Pseudomonas stutzeri* strain that degrades *o*-xylene. *Appl. Environ. Microbiol.* 53: 2129-2132.
- Bannon, C. D., G. J. Breen, J. D. Craske, N. T. Hai, N. L. Harper, and K. L. O'Rourke. 1982. Analysis of fatty acid methyl esters with high accuracy and reability, III literature review of an investigation into the development of a rapid procedure for methoxide catalysed methanolysis of fats and oils. *J. Chromatograph.* 247: 71.
- Baranova, N., and H. Nikaido. 2002. The BaeSR two-component regulatory system activates transcription of the *yegMNOB* (*mdtABCD*) transporter gene cluster in *Escherichia coli* and increases its resistance to novobiocin and deoxycholate. *J. Bacteriol.* 184: 4168-4176.
- Bartels, I., H. J. Knackmuss, and W. Reineke. 1984. Suicide inactivation of catechol 2,3-dioxygenase from *Pseudomonas putida* mt-2 by 3-halocatechol. *Appl. Environ. Microbiol.* 47: 500-505.
- Bassler, B. S., M. Wright, and M. R. Silverman. 1993. Intercellular signalling in *Vibrio harveyi*: sequence and function of genes regulation expression of bioluminescence. *Mol. Microbiol.* 9: 773-786.
- Baumeister, R., P. Flache, O. Melefors, A. von Gabain, and W. Hillen. 1991. Lack of a 5' non-coding region in Tn1721 encoded *tetR* mRNA is associated with a low efficiency of translation and a short half-life in *Escherichia coli*. *Nucleic. Acids Res.* 19: 4595-4600.

- Costerton, J. W., K. J. Cheng, G. g. Geesey, T. I. Ladd, J. C. Nickel, M. Dasgupta, and T. J. Marrie. 1987. Bacterial biofilms in nature and disease. *Annu. Rev. Microbiol.* 41: 435-464.
- Costerton, J. W., Z. Lewandowski, D. E. Caldwell, D. E. Korber, and H. M. Lappin-Scott. 1995. Microbial biofilms. *Ann. Rev. Microbiol.* 49: 711-745.
- Costerton, J. W., P. S. Stewart, and E. P. Greenberg. 1999. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* 284: 1318-1322.
- Cronan, J. E. 1968. Phospholipids alterations during growth of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 95: 2054-2061.
- Cronan, J. E. 2002. Phospholipid modifications in bacteria. *Curr. Opin. Microbiol.* 5: 202-205.
- Cruden D.L., J. H. Wolfram, R.D. Rogers and D.T. Gibson. 1992. Physiological properties of a *Pseudomonas* strain which grows with *p*-xylene in a two-phase (organic-aqueous) medium. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 2723-2729.
- Dagley, S., P. J. Chapman, and D. T. Gibson. 1965. The metabolism of beta-phenylpropionic acid by an achromobacter. *Biochem. J.* 97: 643-650.
- Dagley, S. 1981. New perspectives in aromatic catabolism. In Lessinger, T., Cook, A. M., R. Hütter, and Nüesch, J. (eds). *Microbial degradation of xenobiotics and recalcitrant compounds* (pp 181-186). Academic Press. New York.
- Dagley, S. 1986. Biochemistry of aromatic hydrocarbon degradation in *Pseudomonads*. pp 527-555. Ornston L. N. and J. R. Sockatch (ed). *En The Bacteria*. Academic Press, New York.
- Dagulis, A. J. 1988. Integrated reaction and product recovery in bioreactor systems. *Biotechnol. Prog.* 4: 113-122.
- da Silva, A. C. R., J. A. Ferro, F. C. Reinach, C. S. Faran, L. R. Furlan, R. B. Quaggio, C. B. Monteiro-Vitorello, M. A. van Sluys, N. F. Almeida, L. M. C. Almeida, L. M. C. Alves, A. M. do Amaral, M. C. Bertolini, L. E. A. Camargo, G. Camarotte, F. Cannavan, J. Cardozo, F. Chamberg, L. P. C. Iapina, R. M. B. Cicarelli, L. L. Coutinho, J. R. Cursino-Santos, H. El-Dorry, J. B. Faria, A. J. S. Ferreira, R. C. C. Ferreira, M. I. T. Ferro, E. F. Formighieri, M. C. Franco, C. C. Greggio, A. Gruber, A. M. Katsuyama, L. T. Kishi, R. P. Leite, E. G. M. Lemos, M. V. F. Lemos, E. C. Locali, M. A. Machado, A. M. B. N. Madeira, N. M. Martínez-Rossi, E. C. Martins, J. Meidanis, C. F. M. Menck, C. Y. Miyaki, D. H. Moon, L. M. Moreira, M. T. M. Novo, V. K. Okura, M. C. Oliveira, V. R. Oliveira, H. A. Pereira, A. Rossi, J. A. D. Sena, C. Silva, R. F. de Souza, L. A. F. Spinola, M. A. Takita, R. E. Tamura, E. C. Teixeira, R. I. D. Tezza, M. Trindade dos Santos, D. Truffi, S. M. Tsai, F. F. White, J. C. Setubal, and J. P. Kitajima. 2002. Comparison of the genomes of two *Xanthomonas* pathogens with differing host specificities. *Nature* 417: 459-463.
- Davey, M. H., and G. O'Toole. 2000. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiol. and Mol. Biol. Rev.* 64: 847-867.
- Davies, D. G., M. R. Parsek, J. P. Pearson, G. H. Iglewski, J. W. Costerton and E. P. Greenberg. 1998. The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. *Science* 280: 295-298.
- de Lorenzo, V., M. Herrero, U. Jakubzik, and J. B. Neilands. 1990. Mini-Tn5 transposon derivatives for insertion mutagenesis, promoter probing, and chromosomal insertion of cloned DNA in Gram-negative eubacteria. *J. Bacteriol.* 172: 6568-6572.
- de Lorenzo, V. and 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.

- Bradford, M. M.** 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248-254.
- Benz, R., E. Maier, and I. Gentshev.** 1993. TolC of *Escherichia coli* functions as an outer membrane channel. *J. Bacteriol.* **178**: 5803-5805.
- Berg, G., N. Rostok, A. Steidle, L. Eberl, A. Zock, and K. Smalla.** 2002. Plant-dependent genotypic and phenotypic diversity of antagonistic rhizobacteria isolated from different *Verticillium* host plants. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**: 3328-3338.
- Bertoni, G., F. Bolognese, E. Galli, and P. Barbieri.** 1996. Cloning of the genes for and characterization of the early stages of toluene and *o*-xylene catabolism in *Pseudomonas stutzeri* OX1. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 3704-3711.
- Bertoni, G., M. Martino, E. Galli, and P. Barbieri.** 1998. Analysis of the gene cluster encoding toluene/*o*-xylene monooxygenase from *Pseudomonas stutzeri* OX1. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**: 3626-3632.
- Bligh, E. G., and W. J. Dyer.** 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* **37**: 911-917.
- Blattner, F. R., G. Plunkett III, C. A. Bloch, N. T. Perna, V. Burland, M. Riley, J. Collado-Vides, J. D. Glasner, C. K. Rode, G. F. Mayhew, J. Gregor, N. W. Davis, H. A. Kirkpatrick, M. A. Goeden, D. J. Rose, B. Mau, and Y. Shao.** 1997. The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science.* **277**: 1453-1474.
- Blummer, M., and N. J. Rudrum.** 1970. *Inst. Petrol.* **56**: 99.
- Blummer, M.** 1976. Polycyclic aromatic compounds in Nature. *Sci. Am.* **234**: 35.
- Brammar, W. J., and P. H. Clarke.** 1964. Induction and repression of *Pseudomonas aeruginosa* amidase. *J. Gen. Microbiol.* **37**: 307-319.
- Bühler, B., B. Witholt, B. Hauer, and A. Schmid.** 2002. Characterization and application of xylene monooxygenase for multistep biocatalysis. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**: 560-568.
- Bühler, B., I. Bollhalder, B. Hauer, B. Witholt, and A. Schmid.** 2003. Use of the two-liquid phase concept to exploit kinetically controlled multistep biocatalysis. *Biotechnol. Bioeng.* **20**: 683-684.
- (a) Chen, Q., D. B. Janssen, and B. Witholt** 1995. Growth on octane alters the membrane lipid fatty acids of *Pseudomonas oleovorans* due to the induction of *alkB* and synthesis of octanol. *J. Bacteriol.* **177**: 6894-6901.
- (b) Chen, Q., A. Nijenhuis, H. Preusting, J. Dolfing, D. B. Janssen, and B. Witholt.** 1995. Effects of octane on the fatty acid composition and transition temperature of *Pseudomonas oleovorans* membrane lipids during growth in two-liquid-phase continuous cultures. *Enzyme Microb. Technol.* **17**: 647-652.
- Choi, W. J., C. Y. Choi, J. A. M. de Bont, and C. A. G. M. Weijers.** 1999. Resolution of 1,2-epoxyhexane by *Rhodotorula glutinis* using a two-phase membrane bioreactor. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **53**: 7-11.
- Christensen, B. B., C. Stenberg, J. B. Andersen, R. J. Palmer Jr., A. T. Nielsen, M. Givskov, and S. Molin.** 1999. Molecular tools for study of biofilm physiology. *Methods Enzymol.* **310**: 20-42.
- Chuanchuen, R., C. T. Narasaki, and H. P. Schweizer.** 2002. The MexJK efflux pump of *Pseudomonas aeruginosa* requires OprM for antibiotic efflux but not for efflux of triclosan. *J. Bacteriol.* **184**: 5036-5044.

- de Kievit, T. R., M. D. Parkins, R. J. Gillis, R. Srikumar, H. Ceri, K. Poole, B. H. Iglewski, and D. G. Storey. 2001. Multidrug efflux pumps: expression patterns and contribution to antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Ant. Agents Chem.* **45**: 1761-1770.
- den Dooren Jong, L. E. 1926. Bigdrage tot de kennis van het mineralisatieproces. *Nijgh & van Ditmar*, Rotterdam.
- Dennis, J. J., and G. J. Zylstra. 1999. Characterization of the regulators of the Srp solvent resistance efflux pump. *Unpublished*.
- de Smet, M. J., J. Kingma, and B. Witholt. 1978. The effect of toluene on the structure and permeability of the outer and cytoplasmic membranes of *Escherichia coli*. *Biochim. Biophys. Acta* **506**: 64-80.
- De Vos, P., A. V. Landschoot, P. Segers, R. Tytgat, M. Gillis, M. Bauwens, R. Rossau, M. Goor, B. Pot, K. Kerster, P. Lizzaraga, and J. De Ley. 1989. Genotypic relationships and taxonomic localization of unclassified *Pseudomonas* and *Pseudomonas*-like strains by deoxy-ribonucleic acid: ribosomal ribonucleic acid hybridizations. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **39**: 35-49.
- Dinh, T., I. T. Paulsen, and M.H. Saier. 1994. A family of extracytoplasmic proteins that allow transport of large molecules across the outer membrane of gram-negative bacteria. *J. Bacteriol.* **176**: 3825-3831.
- Dodd, I. B., and J. B. Egan. Improved detection of helix-turn-helix DNA-binding motifs in protein sequences. *Nucleic. Acid Res.* **17**: 5019-5026.
- Duque, E., A. Segura, G. Mosqueda, and J. L. Ramos. 2001. Global and cognate regulators control the expression of the organic solvent efflux pumps TtgABC y TtgDEF of *Pseudomonas putida*. *Mol. Microbiol.* **39**: 1100-1006.
- Eberl, L. 1999. N-acyl-homoserinelactone-mediated gene regulation in gram-negative bacteria. *Syst. Appl. Microbiol.* **22**: 493-506.
- Egan, S. M. 2002. Growing repertoire of AraC/XylS activators. *J. Bacteriol.* **184**: 5529-5532.
- Elasri, M., S. Delorme, P. Lemanceau, G. Stewart, B. Laue, E. Glickmann, P. M. Oger, and Y. Dessaux. 2001. Acyl-homoserine lactone production is more common among plant-associated *Pseudomonas* spp. than among soil-borne *Pseudomonas* spp. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**: 1198-1209.
- Ennis, M. D., and N. B. Ghazal. 1992. The synthesis of (+) and (-)-flesinoxan: application of enzymatic resolution methodology. *Tetrahedron Lett.* **33**: 6287-6290.
- Evans, E., L. Passador, R. Srikumar, E. Tsang, J. Nezezon, and K. Poole. 1998. Influence of the MexAB-OprM multidrug efflux system on quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **180**: 5443-5447.
- Evans, E., and K. Poole. 1999. The MexA-MexB-OprM multidrug efflux system of *Pseudomonas aeruginosa* is growth-phase regulated. *FEMS Microbiol. Lett.* **173**: 35-39.
- Evans, E., L. Adewage, and K. Poole. 2001. MexR repressor of the *mexAB-OprM* multidrug efflux operon of *Pseudomonas aeruginosa*: identification of MexR binding sites in the *mexA-mexR* intergenic region. *J. Bacteriol.* **183**: 807-812.
- Feist, C. F., and G. D. Hegeman. 1969. Regulation of the *meta* cleavage pathway for benzoate oxidation by *Pseudomonas putida*. *J. Bacteriol.* **100**: 1121-1123.

- 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.
- Ferrante, A. A., J. Angliera, K. Lewis, and A. M. Klibanov. 1995. Cloning of an organic solvent-resistance genes in *Escherichia coli*. The unsuspected role of alkylhydroperoxide reductase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 7617-7621.
- Fralick, J. A. 1996. Evidence that TolC is required for functioning of the Mar/AcrAB efflux pump of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 178: 5803-5805.
- Franklin, F. C. H., M. Bagdasarian, M. M. Bagdasarian, and K. N. Timmis. 1981. Molecular and functional analysis of the TOL plasmid pWW0 from *Pseudomonas putida* and cloning of genes for the entire regulated aromatic ring *meta* cleavage pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78: 7458-7462.
- Fujihira, E., N. Tamura, and A. Yamaguchi. 2002. Membrane topology of a multidrug efflux transporter, AcrB, in *Escherichia coli*. *J. Biochem.* 131: 145-151.
- Fukimori, F., H. Hirayama, H. Tamami, A. Inoue, and K. Horikoshi. 1998. Isolation and transposon mutagenesis of a *Pseudomonas putida* KT2442 toluene-resistant variant: involvement of an efflux system in solvent resistance. *Extremophiles* 2: 395-400.
- Fukuda, H., M. Hosaka, K. Hirai, and S. Iyobe. 1990. New norfloxacin resistance gene in *Pseudomonas aeruginosa* PAO. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 34: 1757-1761.
- Fukuda, H., M. Hosaka, S. Iyobe, N. Gotoh, T. Nishino, and K. Hirai. 1995. *nfxC*-type quinolone resistance in a clinical isolate of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 39: 790-792.
- Gerischer, U., A. Segura, and L. N. Ornston. 1998. PcaU, a transcriptional activator of genes for protocatechuate utilization in *Acinetobacter*. *J. Bacteriol.* 180: 1512-1524.
- Germ, M., E. Yoshihara, H. Yoneyama, and T. Nakae. 1999. Interplay between the efflux pump and the outer membrane permeability barrier in fluorescent dye accumulation in *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 261: 452-455.
- Gibson, D. T., M. Hensley, H. Yoshioka, and T. J. Mabry. 1970. Formation of (+)-*cis*-2,3-dihydroxy-1-methylcyclohexa-4,6-diene from toluene by *Pseudomonas putida*. *Biochemistry* 9: 1626-1630.
- Gibson, D. T., and V. Subramanian. 1984. Microbial degradation of aromatic hydrocarbons. In: Gibson D. T. (ed). *Microbial degradation of organic compounds* (pp 361-369) Marcel Dekker. New York.
- Gibson, D. T., A. S. Abdul, y R. H. Olsen. 1988. Microbial degradation of aromatic hydrocarbon in hydrogeologic material: microcosm studies, p. 53-69. En: *Proceedings of the Second National outdoor action conference on aquifer restoration: groundwater and geophysical methods*. National Water Well Association, Dublin, Ohio.
- Gilson, L., H. K. Mahanty, and R. Kolter. 1990. Genetic analysis of an MDR-like export system: the secretion of colicin V. *Eur. Mol. Biol. Org. J.* 9: 3875-3884.
- Giraudan, A., and A. Lanois. 2000. *flhDC*, the flagellar master operon *Xenorhabdus nematophilus*: requirement for motility, lypolysis, extracellular hemolysis, and full virulence in insects. *J. Bacteriol.* 182: 107-115.
- Godoy, P., M. I. Ramos-González, and J. L. Ramos. 2001. Involvement of the TonB system in tolerance to solvents and drugs in *Pseudomonas putida* DOT-T1E. *J. Bacteriol.* 183: 5285-5292.

- Godsey, M. H., N. N. Baranova, A. Neyfakh, and R. G. Brennan. 2001. Crystal structure of MtaN, a global multidrug transporter gene activator. *J. Biol. Chem.* **276**: 47178-47184.
- Godsey, M. H., E. E. Zheleznova Heldwein, and R. G. Brennan. 2002. Structural biology of bacterial multidrug resistance gene regulators. *J. Biol. Chem.* **277**: 40169-40172.
- Gotoh, N., H. Tsujimoto, K. Poole, J. I. Yamagishi, Y. Oyadama, and T. Nishino. 1995. The outer membrane protein OprM of *Pseudomonas aeruginosa* is encoded by *oprK* of the *mexA-mexB-oprK* multidrug resistance operon. *Antimicrob. Agents Chemoter.* **39**: 2567-2569.
- Gotoh, N., H. Tsujimoto, A. Nomura, K. Okamoto, M. Tsuda, and T. Nishino. 1998. Functional replacement of OprJ by OprM in the MexCD-OprJ multidrug efflux system of *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol. Lett.* **165**: 21-27.
- Gotoh, N., T. Kusumi, H. Tsujimoto, T. Wada, and T. Nishino. 1999. Topological analysis of an RND family transporter, MexD of *Pseudomonas aeruginosa*. *FEBS Lett.* **458**: 32-36.
- Gray, P. H. H., and H. G. Thornton. 1928. *Zentralbl. Bakteriologie* (II) **73**: 74.
- Grkovic, S., M. H. Brown, N. J. Roberts, I. T. Paulsen, and R. A. Skurray. 1998. QacR is a repressor protein that regulates expression of the *Staphylococcus aureus* multidrug efflux pump QacA. *J. Biol. Chem.* **273**: 18665-18673.
- Grkovic, S., M. H. Brown, and R. A. Skurray. 2002. Regulation of bacterial drug export systems. *Microb. Mol. Biol. Rev.* **66**: 671-701.
- Guan, L., M. Ehrmann, H. Yoneyama, and T. Nakae. 1999. Membrane topology of the xenobiotic-exporting subunit, MexB, of the MexAB-OprM extrusion pump in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Biol. Chem.* **274**: 10517-10552.
- Guan, L., and T. Nakae. 2001. Identification of essential charged residues in transmembrane segments of the multidrug transporter MexB of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **183**: 1734-1739.
- Hackett, J. and P. Reeves. 1983. Primary structure of the *tolC* gene that codes for an outer membrane protein of *Escherichia coli* K12. *Nucl. Acids. Res.* **11**: 6487-6495.
- Hagman, K. E., W. Pan, B. G. Spratt, J. T. Balthazar, R. C. Judd, and W. M. Shafer. 1995. Resistance of *Neisseria gonorrhoeae* to antimicrobial hydrophobic agents is modulated by the *mtrRCDE* efflux system. *Microbiology* **141**: 611-622.
- Hahn, D. R., P. J. Solenberg, and R. H. Baltz. 1991. Tn5099, a *xylE* promoter tube transposon for *Streptomyces* spp. *J. Bacteriol.* **173**: 5573-5577.
- Hamamoto, T., N. Takata, T. Kudo, and K. Horikoshi. 1994. Effect of temperature and growth phase on fatty acid composition of the psychrophilic *Vibrio* sp. strain no. 5710. *FEMS Microbiol. Lett.* **119**: 77-81.
- Hanahan, D. 1983. Studies on transformations of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* **166**: 557-580.
- Hanzelka, B. L., M. R. Parsek, D. L. Val, P. V. Dunlap, J. E. Cronan Jr., and E. P. Greenberg. 1999. Acylhomoserine lactone synthase activity of the *Vibrio fischeri* AinS protein. *J. Bacteriol.* **181**: 5766-5770.
- Harayama, S. 1984. Transposon mutagenesis analysis of the *meta*-cleavage pathway operon genes of the TOL plasmid of *Pseudomonas putida* mt-2. *J. Bacteriol.* **160**: 251-255.

- Harayama, S., R. A. Leppik, M. Rekik, N. Mermond, P. R. Lehrbach, W. Reinede, and K. Timmis. 1986. Gene order of the TOL catabolic plasmid upper pathway operon and oxidation of both toluene and benzyl alcohol by the *xylA*. *J. Bacteriol.* **167**: 455-461.
- (a) Harayama, S., M. Rekik, A. Wasserfallen, and A. Bairoch. 1987. Evolutionary relationships between catabolic pathways for aromatics: conservation of gene order and nucleotide sequences of catechol oxidation genes of pWWO y NAH7. *Mol. Gen. Genet.* **210**: 241-247.
- (b) Harayama, S., N. Mernod, M. Rekik, P. R. Lehrbach, and K. N. Timmis. 1987. Roles of the divergent branches of the meta-cleavage pathway in the degradation of benzoate and substituted benzoates. *J. Bacteriol.* **169**: 558-564.
- Harayama, S., M. Rekik, M. Wubbolts, K. Rose, R. A. Leppik, and K. N. Timmis. 1989. Characterization of five genes in the upper pathway operon of TOL plasmid pWW0 from *Pseudomonas putida* and identification of the gene products. *J. Bacteriol.* **171**: 5084-5095.
- Harayama, S., and M. Rekik. 1989. Bacterial aromatic ring-cleavage enzymes are classified in two different genes families. *J. Biol. Chem.* **264**: 15328-15333.
- Harayama, S., and K. N. Timmis. 1989. Catabolism of aromatic hydrocarbons by *Pseudomonas*. pp 151-174. Hopwood D. A. and K. Charter (ed). *En Genetics of bacterial diversity*. Academic, New York.
- Harayama, S., and M. Rekik. 1990. The meta-cleavage operon of TOL degradative plasmid pWW0 comprises 13 genes. *Mol. Gen. Genet.* **221**: 113-120.
- Harayama, S., and K. N. Timmis. 1992. Aerobic biodegradation of aromatic hydrocarbons by bacteria. pp 99-156. Sigel H., and A. Sigel (ed). *En Degradation of environmental pollutants by microorganisms and their metalloenzymes*. Marcel Dekker Inc., New York.
- Harayama, S., M. Kok, and E. L. Neidle. 1992. Functional and evolutionary relationships among diverse oxygenases. *Ann. Rev. Microbiol.* **46**: 565-601.
- Hartline, R., and I. C. Gonsalus. 1971. Induction specificity and catabolite repression of the early enzymes in camphor degradation by *Pseudomonas putida*. *J. Bacteriol.* **106**: 468-478.
- Hartog J., and W. Wouters. 1988. Flesinoxan hydrochloride. *Drugs Future.* **13**: 31-33.
- Heipieper, H. J., R. Difenbach, and H. Keweloh. 1992. Conversion of *cis* unsaturated fatty acids to *trans*, a possible mechanism for the protection of phenol degrading *Pseudomonas putida* P 8 from substrate toxicity. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**: 1847-1852.
- Heipieper, H. J., and J. A. M. de Bont. 1994. Adaptation of *Pseudomonas putida* S12 to ethanol and toluene at the level of fatty acid composition of membranes. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**: 4440-4444.
- Heipieper, H. J., G. Menlenbeld, Q. van Oirstchot, and J. A. M. de Bont. 1996. Effect of environmental factors on the *cis/trans* ratio of unsaturated fatty acids in *Pseudomonas* S12. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 2773-2777.
- Held, M., W. Suske, A. Schmid, K. H. Engesser, H. P. E. Kohler, B. Witholt, and M. G. Wobolts. 1998. Preparative scale production of 3-substituted catechols using a novel monooxygenase from *Pseudomonas azelaica* HBP 1. *J. Mol. Catal. B. Enzym.* **5**: 87-93.
- Heldwein, E. E., and R. G. Brennan. 2001. Crystal structure of the transcriptional activator BmrR bound to DNA and a drug. *Nature* **409**: 378-382.

- Helmann, J. D.** 1995. Compilation and analysis of *Bacillus subtilis* σ^A -dependent promoter sequences: evidence for extended contact between RNA polymerase and upstream promoter DNA. *Nucleic Acids. Res.* **23**: 2351-2360.
- Herrero, M., V. de Lorenzo and K. N. Timmis.** 1990. Transposon vectors containing non-antibiotic resistance selection markers for cloning and stable chromosomal insertion of foreign genes in gram-negative bacteria. *J. Bacteriol.* **172**: 6557-6567.
- Heydorn, A., A. T. Nielsen, M. Hentzer, C. Stenberg, M. Givskov, B.K. Ersbøll, and S. Molin.** 2000. Quantification of biofilm structures by the novel computer program COMSTAT. *Microbiology* **146**: 2395-2407.
- Hillen, W., and C. Berens.** 1994. Mechanisms underlying expression of Tn10 encoded tetracycline resistance. *Annu. Rec. Microbiol.* **48**: 345-359.
- Hirai, K., S. Suzue, T. Irukura, S. Iyobe, and S. Mitsuhashi.** 1987. Mutations producing resistance to norfloxacin in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **31**: 582-586.
- Hirai, K., S. Suzue, T. Irikura, S. Iyobe, and S. Mitsuhashi.** 1997. Mutations producing resistance to norfloxacin in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemoter.* **31**: 582-586.
- Holtwick, R., F. Meinhardt, and H. Keweloh.** 1997. *Cis-trans* isomerization of unsaturated fatty acids: cloning and sequencing of the *cti* gene from *Pseudomonas putida* P8. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**: 4292-4297.
- Huertas, M. J., E. Duque, L. Molina, R. Rossello-Mora, G. Mosqueda, P. Godoy, B. Christensen, S. Molin and J.L. Ramos.** 2000. Tolerance to sudden organic solvent shocks by soil bacteria and characterization of *Pseudomonas putida* strains isolated from toluene polluted sites. *Env. Sci. Technol.* **34**: 3395-3400.
- (a) Hüskén, L. E., R. Beeftink, J. A. M. de Bont, and J. Wery.** 2001. High-rate 3-methylcatechol production in *Pseudomonas putida* strains by means of a novel expression system. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **55**: 571-577.
- (b) Hüskén, L. E., M. C. F. Dalm, J. Tramper, J. Wery, J. A. M. de Bont, and Rik Beeftink.** 2001. Integrated bioproduction and extraction of 3-methylcatechol. *J. Biotechnol.* **88**: 11-19.
- Hüskén, L. E., M. Oomes, K. Schoren, J. Tramper, J. A. M. de Bont, and R. Beeftink.** 2002. Membrane-facilitated bioproduction of 3-methylcatechol in an octanol/water two-phase system. *J. Biotechnol.* **96**: 281-289.
- Hussain, M., S. Ichichara and S. Mizushima.** 1982. Mechanism of signal peptide cleavage in the biosynthesis of the major lipoprotein of the *Escherichia coli* outer membrane. *J. Biol. Chem.* **257**: 5177-5182.
- Ingram, L. O.** 1977. Changes in lipid composition of *Escherichia coli* resulting from growth with organic solvents and with food additives. *Appl. Environ. Microbiol.* **33**: 1233-1236.
- Inoue, H., and K. Horikoshi.** 1989. A *Pseudomonas* thrives in high concentrations of toluene. *Nature* **338**: 264-266.
- Inoue, H., H. Nojima and H. Okayama.** 1990. High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* **96**: 264-28.
- Inouye, S., M. Gomada, U. M. X. Sangodar, A. Nakazawa, and T. Nakazawa.** 1981. Upstream regulatory sequence for transcriptional activator XylR in the first operon of xylene metabolism on the TOL plasmid. *J. Mol. Biol.* **216**: 251-260.

- Inouye, S., A. Nakazawa, and T. Nakazawa. 1983. Molecular cloning of gene *xylS* of the TOL plasmid, evidence for positive regulation of the *xylDEGF* operon by *xylS*. *J. Bacteriol.* **148**: 413-418.
- Inouye, S., A. Nakazawa, and T. Nakazawa. 1986. Nucleotide sequence of the regulatory gene *xylS* on the *Pseudomonas putida* TOL plasmid and identification of the protein product. *Gene* **44**: 235-242.
- Ishii, T., M. Yamada, H. Sato, M. Matsue, S. Taketani, K. Nakayama, Y. Sugita, and S. Bannai. 1993. Cloning and characterization of a 23-KDa stress-induced mouse peritoneal macrophage protein. *J. Biol. Chem.* **268**: 18633-36.
- Isken, S., and J.A.M. de Bont. 1996. Active efflux of toluene in a solvent-resistant bacterium. *J. Bacteriol.* **178**: 6056-6058.
- Isken, S., A. Derks, P.F.G. Wolfs, and J. A. M. de Bont 1999. Effect of organic solvents on the yield of solvent-tolerant *Pseudomonas putida* S12. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 2631-2635.
- Jair, K. W., W. P. Fawcett, N. Fujita, A. Ishihama, and R. E. Wolf. 1996. Transcriptional activation of promoters of the superoxide and multiple antibiotic resistance regulons by Rob, a binding protein of the *Escherichia coli* origin of chromosomal replication. *J. Bacteriol.* **178**: 2507-2513.
- Jakics, E. B., S. Iyobe, K. Hirai, H. Fukuda, and H. Hashimoto. 1992. Occurrence of the *nfxB* type mutation in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents. Chemother.* **36**: 2562-2565.
- Jalal, S., and B. Wretling. 1998. Mechanisms of quinolone resistance in clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiol. Drug Resist.* **4**: 257-261.
- Jalal, S., O. Ciofu, N. Hoiby, N. Gotoh, and B. Wretling. 2000. Molecular mechanisms of fluoroquinolone resistance in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from cystic fibrosis. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**: 710-712.
- Jellen- Ritter, A. S., and W. V. Kern. 2001. Enhanced expression of the multidrug efflux pumps AcrAB and AcrEF associated with insertion element transposition in *Escherichia coli* mutants selected with fluoroquinolone. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45**: 1467-1472.
- Jiang, H., P. Arales, R. E., and D. T. Gibson. 1999. The α -subunit of toluene dioxygenase from *Pseudomonas putida* F1 can accept electrons from reduced ferredoxin_{TOL} but is catalytically inactive in the absence of the β -subunit. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 315-318.
- Jin, Q., Z. Yuan, J. Xu, Y. Wang, Y. Shen, W. Lu, J. Wang, H. Liu, J. Yang, F. Yang, X. Zhang, J. Zhang, G. Yang, H. Wu, D. Qu, J. Dong, L. Sun, Y. Xue, A. Zhao, Y. Gao, J. Zhu, B. Kan, K. Ding, S. Chen, H. Cheng, Z. Yao, B. He, R. Chen, D. Ma, B. Quiang, Y. Wen, Y. Hou, and J. Yu. 2002. Genome sequence of *Shigella flexneri* 2a: insights into pathogenicity through comparison with genome of *Escherichia coli* K12 and 0157. *Nucleic Acid Res.* **30**: 4432-4441.
- Johnson, B. F., and R. Y. Stainer. 1971. Dissimilation of aromatic compounds by *Alcaligenes eutrophus*. *J. Bacteriol.* **107**: 468-475.
- Johnson G. R., and R. H. Olsen. 1997. Multiple pathways for toluene degradation in *Burkholderia* sp strain JS150. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**: 4047-4052.
- Junker, F., and J. L. Ramos, 1999. Involvement of the *cis/trans* isomerase Cti in solvent resistance of *Pseudomonas putida* DOT-T1E. *J. Bacteriol.* **181**: 5693-5700.
- Junker, F., J. J. Rodríguez-Herva, E. Duque, M. I. Ramos- González, and J. L. Ramos. 2001. A WbpL mutant of *Pseudomonas putida* DOT-T1E strains, which lacks the O-antigenic side chain of lipopolysaccharides, is tolerant to organic solvent shocks. *Extremophiles* **5**: 93-99.

- Kaneko, T., Y. Nakamura, S. Sato, K. Minamisawa, T. Uchiumi, S. Sasamoto, A. Watanabe, K. Idesawa, M. Iriguchi, K. Kawashima, M. Kohara, M. Matsumoto, S. Shimpo, H. Tsuruoka, T. Wada, M. Yamada, and S. Tabata. 2000. Complete genomic sequence of nitrogen-fixing symbiotic bacterium *Bradyrhizobium japonicum* USDA110. *DNA Res.* **9**: 189-197.
- Kaplan, H. B., and E. P. Greenberg. 1985. Diffusion of autoinducer is involved in regulation of the *Vibrio fischeri* luminiscence system. *J. Bacteriol.* **163**: 1210-1214.
- Kern, W. 1947. *Helv. Chim. Acta* **30**: 595.
- Kessler, B., V. de Lorenzo and K. N. Timmis. 1992. A general system to integrate *lacZ* fusions into the chromosomes of gram-negative eubacteria: regulation of the Pm promoter of the TOL plasmid studied with all controlling elements in monocopy. *Mol. Gen. Genet.* **233**: 293-301.
- Keweloh, H. G. Weyrauch, and H. J. Rehm. 1990. Phenol-induced membrane changes in free and immobilized *Escherichia coli*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **33**: 66-71.
- Keweloh, H., and H. J. Heipieper. 1996. *Trans* unsaturated fatty acids in bacteria. *Lipids* **31**: 129-137.
- (a) Kieboom, J., J. J. Dennis, J. A. M. de Bont and G. J. Zylstra. 1998. Identification and molecular characterization of an efflux pump involved in *Pseudomonas putida* S12 solvent tolerance. *J. Biol. Chem.* **273**: 85-91.
- (b) Kieboom, J., J. J. Dennis, G. J. Zylstra and J. A. M. de Bont. 1998. Active efflux of organic solvents by *Pseudomonas putida* S12 is induced by solvents. *J. Bacteriol.* **180**: 6769-6772.
- Kieboom, J. and J. A. M. de Bont. 2001. Identification and molecular characterization of an efflux system involved in *Pseudomonas putida* S12 multidrug resistance. *Microbiology* **147**: 43-51
- Kieboom, J., R. Bruinenberg, I. Keizer-Gunnink, and J. A. M. de Bont. 2001. Transposon mutations in the flagella biosynthetic pathway of the solvent-tolerant *Pseudomonas putida* S12 result in a decreased expression of solvent efflux genes. *FEMS Microbiol. Lett.* **198**: 117-122.
- Kim, K., S. Lee, K. Lee, and D. Lim. 1998. Isolation and characterization of toluene-sensitive mutants from the toluene-resistant bacterium *Pseudomonas putida* GM73. *J. Bacteriol.* **180**: 3692-3696.
- Kiyohara, H., S. Torigoe, N. Kaida, T. Asaki, T. Iida, H. Hayashi, and N. Takizawa. 1994. Cloning and characterization of a chromosomal gene cluster, *pah*, that encodes the upper pathway for phenanthrene and naphthalene utilization by *Pseudomonas putida* OUS82. *J. Bacteriol.* **176**: 2439-2443.
- Klein, J. R., B. Henrich, and R. Plapp. 1991. Molecular analysis and nucleotide sequence of the *envCD* operon of *Escherichia coli*. *Mol. Gen. Genet.* **240**: 230-240.
- Kobayashi, H., H. Takami, H. Hirayama, K. Kobata, R. Usami, and K. Horikoshi. 1999. Outer membrane changes in a toluene-sensitive mutant of toluene-tolerant *Pseudomonas putida* IH-2000. *J. Bacteriol.* **181**: 4493-4498.
- Kobayashi, H., K. Uematsu, H. Hirayama, and K. Horikoshi. 2000. Novel toluene elimination system in a toluene-tolerant microorganism. *J. Bacteriol.* **182**: 6451-6455.
- Kobayashi, H., N. Tsukagoshi, and R. Aono. 2001. Suppression of hypersensitivity of *Escherichia coli* *acrB* mutant to organic solvents by integrational activation of the *acrEF* operon with the IS1 or IS2 element. *J. Bacteriol.* **183**: 2646-2653.

- Köhler, T., M. Kok, M. Michea-Hamzehpour, P. Plesiat, N. Gotoh, T. Nishino, L. K. Curty, and J. C. Pechere. 1996. Multidrug efflux in intrinsic resistance to trimethoprim and sulfamethoxazole in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **40**: 2288-2290.
- Köler, T., M. Michea-Hamzehpour, U. Henze, N. Gotoh, L. K. Curty, and J. C. Pêche. 1997. Characterization of MexE-MexF-OprN, a positively regulated multidrug efflux system of *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol. Microbiol.* **23**: 345-354.
- Köhler, T., S. F. Epp, L. K. Curty, and J. C. Pêche. 1999. Characterization of MexT, the regulator of the MexE-MexF-OprN multidrug efflux system of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **181**: 6300-6305.
- Köhler, T., C. Van Delden, L. K. Curty, M. M. Hamzehpour, and J. C. Pechere. 2001. Overexpression of the MexEF-OprN multidrug efflux system affects cell-to-cell signalling in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **183**: 5213-5222.
- Kojick, M., G. Gegrassi, and V. Venturi. 1999. Cloning and characterization of the *rpoS* gene from plant growth-promoting *Pseudomonas putida* WCS358: RpoS is not involved in siderophore and homoserine lactone production. *Biochim. Biophys. Acta* **1489**: 413-420.
- Koronakis V., A. Sharft, E. Koronakis, B. Luisi, and C. Hughes. 2000. Crystal structure of the bacterial membrane protein TolC central to multidrug efflux and protein export. *Nature* **405**: 914-919.
- Krieg, N. R., and G. M. Garrity. 2001. On using the manual, p. 15-19. In D. R. Boone, R. W. Castensholz, and G. M. Garrity (ed.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd Ed., Vol I. Springer Verlag, New York.
- Krisch, H. M. and 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 assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature (London)* **227**: 680-685.
- Lau, P. C., H. Gergeron, D. Labbé, Y. Wang, R. Brousseau, y D. T. Gibson. 1994. Sequence and expression of the *todGHI* genes involved in the last three steps of toluene degradation by *Pseudomonas putida* F1. *Gene* **146**: 7-13.
- Lau, P. C., Y. Wang, A. Patel, D. Labbe, H. Bergeron, R. Brousseau, Y. Konishi, and M. Rawlings. 1997. A bacterial basic region leucine zipper histidine kinase regulating toluene degradation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **94**: 1453-1458.
- Laue, B. E., Y. Jiang, S. R. Chhabra, S. Jacob, G. S. Stewart, A. Hardman, J. A. Downie, F., O'Gara, and P. Williams. 2000. The biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* F113 produces the *Rhizobium* small bacteriocin, N-(3-hydroxy-7-cis-tetradecenoyl) homoserine lactone, via HtdS, a putative novel N-acyl-homoserine lactone synthase. *Microbiology* **146**: 2469-2480.
- Lee, A., W. Mao, A. Warren, A. Mistry, K. Hoshino, R. Okumura, H. Ishida, and O. Lomovskaya. 2000. Interplay between efflux pumps may provide either additive or multiplicative effect on drug resistance. *J. Bacteriol.* **182**: 3142-3150.
- Lendenmann, U., and J. C. Spain. 1996. 2-aminophenol 1,6-dioxygenase: a novel aromatic ring cleavage enzyme purified from *Pseudomonas pseudoalcaligenes* JS45. *J. Bacteriol.* **178**: 6227-6232.
- Leon, R., P. Fernandes, H. M. Pinheiro, and J. M.S. Cabrales. 1998. Whole-cell biocatalysis in organic media. *Enzyme and Microb. Technol.* **23**: 483-500.
- Lewin, B. 1990. *Genes IV*. Cell Press, Cambridge, Mass.

- Lewis, K. 1994. Multidrug resistance pumps in bacteria: variations on a theme. *Trends Biochem. Sci.* **19**: 119-123.
- Li, X., H. Nikaido, and K. Poole. 1995. Role of *mexA-mexB-oprM* in antibiotic efflux in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antim. Agents and Chem.* **39**: 1948-1953.
- Li, X.Z., L. Zhang, and K. Poole. 1998. Role of the multidrug efflux systems of *Pseudomonas aeruginosa* in organic solvent tolerance. *J. Bacteriol.* **180**: 2987-2991.
- Li, X.Z., and K. Poole. 1999. Organic solvent-tolerant mutants of *Pseudomonas aeruginosa* display multiple antibiotic resistance. *Can. J. Microbiol.* **45**: 18-22.
- (a) Li, X. Z., L. Zhang, and K. Poole. 2000. Interplay between MexAB-OprM multidrug efflux system and the outer membrane barrier in the multiple antibiotic resistance of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Antimicrob. Chemother.* **45**: 433-436.
- (b) Li, X. Z., N. Barré, and K. Poole. 2000. Influence of the MexA-MexB-OprM multidrug efflux system on expression of the MexC-MexD-OprJ and MexE-MexF-OprN multidrug efflux system in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Antimicrob. Chemother.* **46**: 885-893.
- Li, X. Z., and K. Poole. 2001. Mutational analysis of the OprM outer membrane component of the MexA-MexB-OprM multidrug efflux system of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **183**: 12-27.
- Li, X. Z., L. Zhang, and K. Poole. 2002. SmeC, an outer membrane multidrug efflux protein of *Stenotrophomonas maltophilia*. *Antimicrobial Agents Chem.* **46**: 333-343.
- Li, Y., T. Mima, Y. Komuri, Y. Morita, T. Kuroda, T. Mizushima, and T. Tsuchiya. 2003. A new member of the tripartite multidrug efflux pumps, MexVW-OprM, in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Antimicrob. Chemother.* 1093/jac/dkg390
- Lim, D., K. Poole, and N. C. Strynadka. 2002. Crystal structure of the MexR repressor from the multidrug efflux operon in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Biol. Chem.* **277**: 29253-29259.
- Loffeld, B., and H. Keweloh. 1996. *Cis/trans* isomerization of unsaturated fatty acids as possible control mechanism of membrane fluidity in *Pseudomonas putida* P8. *Lipids* **31**: 811-815.
- Lomovskaya, O., A. Lee, K. Hoshino, H. Ishida, A. Mistry, M. S. Warren, E. Boyer, S. Chamberland, and V. J. Lee. 1999. Use of a genetic approach to evaluate the consequences of inhibition of efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **43**: 1340-1346.
- Lomovskaya, O., M. S. Warren, A. Lee, J. Galazzo, R. Fronko, M. Lee, J. Blais, D. Cho, S. Chamberlain, T. Rennan, R. Leger, S. Hecker, W. Watkins, K. Hoshino, K. Ishida, and V. J. Lee. 2001. Identification and characterization of inhibitors of multidrug resistance efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa*: novel agents for combination therapy. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45**: 105-116.
- Lucas, C. E., J. T. Balthazar, K. E. Hagman, and W. M. Shafer. 1997. The MtrR repressor binds the sequence between *mtrR* and *mtrC* genes of *Neisseria gonorrhoeae*. *J. Bacteriol.* **179**: 4123-4128.
- Ludwig, M. L., L. D. Weber, and D. P. Ballou. 1984. Characterization of crystal of protocatechuate 3,4-dioxygenase from *Pseudomonas cepacia*. *J. Biol. Chem.* **259**: 14840-14842.
- Lugtenber, B. J., and L. C. Dekkers. 1999. What makes *Pseudomonas* bacteria rhizosphere competent?. *Environ. Microbiol.* **1**: 9-13.
- Ma, D., D. N. Cook, M. Alberti, N. G. Pon, H. Nikaido, and J. E. Hearst. 1993. Molecular cloning and characterization of *acrA* and *acrE* genes of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **175**: 6299-6313.

- Ma, D., D. N. Cook, J. E. Hearst, and H. Nikaido. 1994. Efflux pumps and drug resistance in Gram-negative bacteria. *Trends Microbiol.* **2**: 489-493.
- Ma, D., D. N. Cook, M. Alberti, N.G.Pon, H. Nikaido, and J.E. Hearst. 1995. Genes *acrA* and *acrB* encode a stress-induced efflux system of *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **16**: 45-55.
- Ma, D., M. Alberti, C. Lynch, H. Nikaido, and J. E. Hearst. 1996. The local repressor AcrR plays a modulating role in the regulation of the *acrAB* gene of *Escherichia coli* by a global stress signal. *Mol. Microbiol.* **19**: 101-112.
- Mandelstam, J., and G. A. Jacoby. 1965. Induction and multisensitive end-product repression in the enzymic pathway degrading madelate in *Pseudomonas flourescens*. *Biochem J.* **94**: 569-577.
- Maniatis, T., E. F. Fritsch, and J. Sambroc. 1982. Molecular cloning: A laboratory Manual. *Cold Spring Harbor, New York*.
- Mao, W., M. S. Warren, D. S. Black, T. Satou, T. Murata, T. Nishino, N. Gotoh, and O. Lomovskaya. 2002. On the mechanism of substrate specificity by resistance nodulation division (RND)-type multidrug resistance pumps: the large periplasmic loops of MexD from *Pseudomonas aeruginosa* are involved in substrate recognition.
- 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., and J. L. Ramos. 1993. Transcriptional control of the *Pseudomonas putida* TOL plasmid catabolic pathways. *Mol. Microbiol.* **9**: 923-929.
- Mars, A. E., T. Kasberg, S. R. Kaschabek, M. H. Van Agteren, D. B. Janssen, and W. Reineke. 1997. Microbial degradation of chloroaromatics: use of the *meta*-cleavage pathway for mineralization of chlorobenzene. *J. Bacteriol.* **179**: 4530-4537.
- Marsh, J. L., M. Erfle and 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, R. G., and J. L. Rosner. 1995. Binding of purified multiple antibiotic resistance repressor (MarR) to *mar* operator sequences. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **92**: 5456-5460.
- Martin, R., K. W. Jair, R. E. Wolf, and J. L. Rosner. 1996. Autoactivation fo the *marRAB* multiple antibiotic resistance operon by the MarA transcriptional activator in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **178**: 2216-2223.
- (a) Maseda, H., H. Yoneyama, and T. Nakae. 2000. Assigment of the substrate-selective subunits of the MexEF-OprN multidrug efflux pump of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents. Chem.* **44**: 658-664.
- (b) Maseda, H., K. Saito, A. Nakajima, and T. Nakae. 2000. Variation of the *mexT* gene, a regulator of the MexEF-OprN efflux pump expression in wild-type strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol. Lett.* **192**: 107-112.
- Masuda, N., and S. Ohya. 1992. Cross-resistance ot meropenem, cephems, and quinolones in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents. Chemother.* **36**: 1847-1851.
- Masuda, N., E. Sakagawa, and S. Ohya. 1995. Outer membrane proteins responsible for multiple drug resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents. Chemother.* **39**: 645-649.
- Masuda, N., N. Gotoh, S. Ohya, and T. Nishino. 1996. Quantitative correlation between susceptibility and OprJ production in NfxB mutants of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **40**: 909-913.

- (a) Masuda, N., E. Sakagawa, S. Ohya, N. Gotoh, H. Tsujimoto, and T. Nishino. 2000. Substrate specificities of MexAB-OprM, MexCD-OprJ, and MexEF-OprM efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44: 3322-3327.
- (b) Masuda, N., E. Sakagawa, S. Ohya, N. Gotoh, H. Tsujimoto, and T. Nishino. 2000. Contribution of the MexX-MexY-OprM efflux system to intrinsic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44: 2242-2246.
- McClelland, M. and co-workers. 2001. Complete genome sequence of *Salmonella enterica* genomovar Thyphimurium. *Nature.* 413: 852-856.
- Meier, I., L. V. Wray, and W. Hillen. 1998. Differential regulation of the Tn10-encoded tetracycline resistance genes *tetA* and *tetR* by the tandem *tet* operators O1 and O2. *EMBO J.* 7: 567-572.
- Ménard, R., P. J. Sansonetti and C. Parsot. 1993. Nonpolar mutagenesis of the *ipa* genes defines IpaB, IpaC, and IpaD as effectors of *Shigella flexneri* entry into epithelial cells. *J. Bacteriol.* 175:5899-5906.
- Menn, F. M., G. J. Zylstra, y D. T. Gibson. 1991. Location and sequence of the *todF* gene encoding 2-hydroxy-6-oxohepta-2,4-dienoate hydrolase in *Pseudomonas putida* F1. *Gene* 104: 91-94.
- Migula, W. 1894. Ueber ein neues System der Bakterien. *Arb. Bakteriolog. Inst. Karlsruhe* 1: 235-238.
- Miller, J. 1972. Experiments in molecular genetics. Cold Spring Harbor, New York, USA.
- Mine, T., Y. Morita, A. Kataoka, T. Mizushima, T. Tsuchiya. 1999. Expression in *Escherichia coli* of the new multidrug efflux pump, MexXY, from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43: 415-417.
- Molinari, F. et al. 1997. Continuous production of isovaleraldehyde through extractive bioconversion in a hollow-fiber membrane bioreactor. *Enzyme Microb. Technol.* 20: 604-611.
- Møller, S., A. R. Pedersen, L. K. Poulsen, E. Arvin, and S. Molin. 1996. Activity and three dimensional distribution of toluene-degrading *Pseudomonas putida* in a multispecies biofilm assessed by quantitative in situ hybridization and scanning confocal laser microscopy. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 4632-4640.
- Morita, Y., Y. Komori, T. Mine, T. Kuroda, T. Mizushima, and T. Tsuchiya. 2001. Construction of a series of mutants lacking all the four major *mex* operons for multidrug efflux pumps or possessing each one of the operons from *Pseudomonas aeruginosa* PAO1: MexCD-OprJ is an inducible pump. *FEMS Microbiol. Lett.* 202: 139-143.
- Mosqueda, G., M. I. Ramos-González, and J. L. Ramos. 1999. Toluene metabolism by the solvent-tolerant *Pseudomonas putida* DOT-T1 strain, and its role in solvent impermeabilization. *Gene* 232: 69-76.
- Mosqueda, G., and J. L. Ramos. 2000. A set of genes encoding a second toluene efflux system in *Pseudomonas putida* DOT-T1E is linked to the *tod* genes for toluene metabolism. *J. Bacteriol.* 182: 937-943.
- Mulder, M. 1996. Basic principles of membrane technology. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, the Netherlands.
- Murakami, S., R. Nakashima, E. Yamashita, and A. Yamaguchi. 2002. Crystal structure of bacterial multidrug efflux transporter AcrB. *Nature.* 419: 587-593.
- Murray K., and P. A. Williams. 1974. Role of catechol and the methylcatechol as inducers of aromatic metabolism in *Pseudomonas putida*. *J. Bacteriol.* 117: 1153-1157.

- Nakai, C., H. Kagamiyama, M. Nozaki, T. Nakazawa, S. Inouye, Y. Elbina, and A. Nakazawa. 1983. Complete nucleotide sequence of the metapyrocatechase gene on the TOL plasmid of *Pseudomonas putida* mt-2. *J. Biol. Chem.* 258: 2923-2928.
- (a) Nakajima, H., K. Kobayashi, M. Kobayashi, H. Asako, and R. Aono. 1995. Overexpression of the *roxA* gene increases organic solvent tolerance and multiple antibiotic and heavy metal ion resistance in *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 2302-2307.
- (b) Nakajima, H., M. Kobayashi, T. Negishi, and R. Aono. 1995. *soxRS* gene increased the level of organic solvent tolerance in *Escherichia coli*. *Biosci. Biotech. Biochem.* 59: 1323-1325.
- Nakajima, A., Y. Sugimoto, H. Yoneyama, and T. Nakae. 2000. Localization of the outer membrane subunit OprM of resistance-nodulation-cell division family multicomponent efflux pump in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Biol. Chem.* 275: 30064-30068.
- Nakamura, H. 1968. Genetic determination of resistance to acriflavin, phenyl alcohol and sodium dodecyl sulphate in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 96: 987-996.
- Negre, D., J. C. Cortay, A. Galinier, P. Sauve, and A. J. Cozzone. 1992. Specific interactions between the IclR repressor of the acetate operon of *Escherichia coli* and its operator. *J. Mol. Biol.* 228: 23-29.
- Nelson, K. E., C. Weinel, I. T. Paulsen, R. J. Dodson, H. Hilbert, V. A. Martins dos Santos, D. E. Founts, S. R. Gill, M. Pop, M. Holmes, L. Brinkac, Beanan, M., DeBoy, S. Daugherty, J. Kolonay, R. Madupu, W. Nelson, O. White, J. Peterson, H. Khouri, I. Hance, P. Chris Lee, E. Holtzapple, D. Scalan, K. Tran, A. Moazzez, T. Utterback, M. Rizzo, K. Lee, D. Kosack, D. Moestl, H. Weder, J. Lauber, D. Stjepandic, J. Hoheisel, M. Straetz, S. Heim, c. Kiewitz, J. A. Eisen, K. N. Timmis, A. Dusterhoft, B. Tummeler, and C. M. Fraser. 2002. Complete genome sequence and comparative analysis of the metabolically versatile *Pseudomonas putida* KT2440. *Environ. Microbiol.* 4: 799-808.
- Neyfack, A. A. 1997. Natural functions of bacterial multidrug transporters. *Trends Microbiol.* 8: 309-313.
- Neyfakh, A. A. 2001. The ostensible paradox of multidrug recognition. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 3: 151-154.
- Neyfakh, A. A. 2002. Mystery of multidrug transporters: the answer can be simple. *Mol. Microbiol.* 44: 1123-1130.
- Nguyen, C. C., and M. H. Saier, Jr. 1995. Phylogenetic, structural and functional analyses of the LacI-GalR family of bacterial transcription factors. *FEBS Lett.* 377: 98-102.
- Nielsen, H., J. Engelbretcht, S. Brunak, and G. von Heijne. 1997. Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. *Protein Engineering*, 10: 1-6.
- (a) Nikaido, H. 1996. Outer membrane, p. 29-47. En F. C. Neidhardt, R. Curtis, J. L. Ingraham, E. C. C. Lin, B. Low, B. Magasanik, W. S. Reznikoff, M. Riley, M. Schaechter, y H. E. Umbarger (ed.), *Escherichia coli* and *Salmonella*: cellular and molecular biology. ASM Press, Washington, D. C.
- (b) Nikaido, H. 1996. Multidrug efflux pumps of gram-negative bacteria. *J. Bacteriol.* 178: 5853-5859.
- Nikaido, H. 1998. Multiple antibiotic resistance and efflux. *Curr. Op. Microbiol.* 1: 516-523.
- Nikaido, H., 1999. Microdermatology: cell surface in the interaction of microbes with the external world. *J. Bacteriol.* 181: 4-8.

- Nishino, S. F., and J. C. Spain. 1993. Degradation of nitrobenzene by *Pseudomonas pseudoalcaligenes*. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**: 2520-2525.
- Norrander, K., T. Kempe and K. Messing. 1983. Construction of improved M13 vectors using oligodeoxynucleotide-directed mutagenesis. *Gene* **26**: 101-106.
- Nunez, L. E., C. Mendez, A. F. Brana, G. Blanco, and J. A. Salas. 2003. The biosynthetic gene cluster for the beta-lactam carbapenem thienamycin in *Streptomyces cattleya*. *Chem. Biol.* **10**: 301-311.
- Ochs, M. M., M. P. McCusker, M. Bains, and R. E. 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.
- Okusu, H., D. Ma, and H. Nikaido. 1996. AcrAB efflux pump plays a major role in the antibiotic resistance phenotype of *Escherichia coli*. Antibiotic-resistance (Mar) mutants. *J. Bacteriol.* **178**: 306-308.
- Olsen, R., J. J. Kukor, and B. Kaphamer. 1994. A novel toluene-3-monooxygenase pathway cloned from *Pseudomonas pickettii* PK01. *J. Bacteriol.* **176**: 3749-3756.
- Ornston, L. N. 1966. The conversion of catechol and protocatechuate to beta-ketoadipate by *Pseudomonas putida*. Regulation. *J. Biol. Chem.* **241**: 3800-3810.
- Osazaki, T., S. Iyobe, H. Hashimoto, and K. Hirai. 1991. Cloning and characterization of a DNA fragment that complements the *nfxB* mutation in *Pseudomonas aeruginosa* PAO. *FEMS Microbiol. Lett.* **79**: 31-36.
- Osazaki, T., and K. Hirai. 1992. Cloning and nucleotide sequence of the *Pseudomonas aeruginosa* *nfsB* gene, conferring resistant to new quinolones. *FEMS Microbiol. Lett.* **91**: 197-202.
- Palleroni, N. J., R. Kunisawa, R. Contopoulou, and M. Doudoroff. 1973. Nucleic acid homologies in the genus *Pseudomonas*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **23**: 333-339.
- Palleroni, N. J. 1986. Taxonomy of *Pseudomonas*. In "The Bacteria". Vol. X. Sokatch, J. R. (ed.). Academic Press. London. pp 3-25.
- Palleroni, N. J., and E. Moore. 2004. Taxonomy of *Pseudomonas*. Chapter 1 in *The Pseudomonads*. vol. I.
- Pan, B., I. Unnikrishnan, and D. C. LaPorte. 1996. The binding site of the IclR repressor protein overlaps the promoter of *aceBAK*. *J. Bacteriol.* **178**: 3982-3984.
- Panke, S., A. Meyer, C. M. Huber, B. Witholt, and M. G. Wubbolts. 1999. An alkane-responsive expression system for the production on fine chemicals *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 2324-2332.
- Panke, S., M. Held, M. G. Wubbolts, B. Witholt, and A. Schmid. 2002. Pilot-scale production of (S)-styrene oxide from styrene by recombinant *Escherichia coli* synthesizing styrene monooxygenase. *Biotechnol. Bioeng.* **80**: 33-41.
- Parales, R. E., J. L. Ditty, and C. S. Harwood. 2000. Toluene-degrading bacteria are chemotactic towards the environmental pollutants benzene, toluene, and trichloroethylene. *Appl. Env. Microbiol.* **66**: 4098-4104.
- Parsek, M. R., D. L. Val, B. L. Hanzelka, J. E. Cronan Jr, and E. P. Greenberg. 1999. A cyl homoserine-lactone quorum-sensing signal generation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**: 4360-4365.

- Patek, M., B. J. Eikmanns, J. Patek, and H. Sahm. 1996. Promoters from *Corynebacterium glutamicum*: cloning, molecular analysis and search for a consensus motif. *Microbiology* **142**: 1297-1309.
- Paulsen I. T., M. H. Brown, and R. A. Skurray. 1996. Proton dependent multidrug efflux systems. *Microbiol. Rev.* **60**: 575-608.
- Paulsen, I. T., J. Chen, K. E. Nelson and M. H. Saier Jr. 2001. Comparative genomics of microbial drugs efflux systems. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **3**: 145-150.
- Pearson, W. R. and D. J. Lipman. 1988. Improved tools for biological sequence comparison. *Proc. Na. tl. Acad. Sci. USA* **85**: 2444-2448.
- Pearson, J. P., Van Delden, C., and B. H. Iglewski. 1999. Active efflux and diffusion are involved in transport of *Pseudomonas aeruginosa* cell-to-cell signals. *J. Bacteriol.* **181**: 1203-1210.
- Pedrotta, V., and B. Witholt. 1999. Isolation and characterization of the *cis/trans*-unsaturated fatty acid isomerase of *Pseudomonas oleovorans*. *J. Bacteriol.* **181**: 3256-3261.
- Petterson, R. F., K. Lundstrom, J. B. Chattopadhyaya, S. Josephson, L. Philipson, L. Kaarinainen and I. Palva. 1983. Chemical synthesis and molecular cloning of a STOP oligonucleotide encoding a UGA translation terminal signal in the three reading frames. *Gene* **24**: 15-27.
- Phoenix, P., A. Keane, A. Patel, H. Bergeron, S. Ghoshal, and P. C. K. Lau. 2003. Characterization of a new solvent-responsive locus in *Pseudomonas putida* F1 and its functionalization as a versatile biosensor. *Environ. Microbiol.* **5**: in press.
- Pinkart, H. C., J. W. Wolfram, R. Rogers, and D. C. White. 1996. Cell envelope changes in solvent-tolerant and solvent-sensitive *Pseudomonas putida* strains following exposure to *o*-xylene. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 1129-1132.
- Pinkart, H.C., and D. C. White. 1997. Phospholipid biosynthesis and solvent tolerance in *Pseudomonas putida* strains. *J. Bacteriol.* **179**: 4219-4226.
- (a) Poole, K., K. Krebs, C. McNally, and S. Neshat. 1993. Multiple antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: evidence for involvement of an efflux operon. *J. Bacteriol.* **175**: 7363-7372.
- (b) Poole, K., D. Heinrichs, and S. Neshat. 1993. Cloning and sequence analysis of an EnvCD homologue in *Pseudomonas aeruginosa*: regulation by iron and possible involvement in the secretion of the siderophore pyoverdine. *Mol. Microbiol.* **10**: 529-544.
- Poole, K. 1994. Bacterial multidrug resistance-emphasis on efflux mechanisms and *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Antimicrob. Chemother.* **34**: 453-456.
- (a) Poole, K., N. Gotoh, H. Tsujimoto, Q. Zhao, A. Wada, T. Yamasaki, S. Neshat, J. Yamagishi, X. Z. Li, and T. Nishino. 1996. Overexpression of the *mexC-mexD-oprJ* efflux operon in *nfxB*- type multidrug-resistant strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol. Microbiol.* **21**: 713-724.
- (b) Poole, K., K. Tetro, Z. Zhao, S. Neshat, D. Heinrichs, and N. Bianco. 1996. Expression of the multidrug resistance operon *mexA-mexB-oprM* in *Pseudomonas aeruginosa*: *mexR* encodes a regulator of operon expression. *Antimicrob. Agents Chemother.* **40**: 2021-2028.
- (a) Poole, K. 2001. Multidrug efflux pumps and antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and related organisms. *J. Mol. Microbiol. Biotech.* **3**: 255-564.
- (b) Poole, K. 2001. Multidrug resistance in Gram-negative bacteria. *Current Opinion Microbiol.* **4**: 500-508.

- Poole, K., and R. Srikumar. 2001. Multidrug efflux in *Pseudomonas aeruginosa*: components, mechanisms and clinical significance. *Curr. Top. Med. Chem.* **1**: 59-71.
- Popp, R., T. Kohl, P. Patz, G. Trautwein, and U. Gerischer. 2002. Differential DNA binding of transcriptional regulator PcaU from *Acinetobacter* sp. strain ADP1. *J. Bacteriol.* **184**: 1988-1997.
- Postle, K., and H. Vakharia. 2000. TolC, a macromolecular periplasmic "channel". *Nature Struct. Biol.* **7**: 527-530.
- Prentky, P. and H. M. Krisch. 1984. In vivo insertional mutagenesis with a selectable DNA fragment. *Gene* **29**: 303-313.
- Pumbwe, L., and L. J. Piddock. 2000. Two efflux systems expressed simultaneously in multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **38**: 2861-2864.
- Putman, M., L. A. Koole, H. W. van Veen, and W. N. Konings. 1999. The secondary multidrug transporter LmrP contains multiple drug interaction sites. *Biochemistry* **38**: 13900-13905.
- Putman, D., H. W. van Veen, and W. N. Konings. 2000. Molecular properties of bacterial multidrug transporters. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **64**: 672-693.
- Rahamati, S., S. Yang, A. L. Davidson, and E. L. Zechiedrich. 2002. Control of the AcrAB multidrug efflux pump by quorum sensing regulator SdiA. *Mol. Microbiol.* **43**: 677-695.
- Ramos, J. L., A. Stolz, W. Reineke, and K. N. Timmis. 1986. Altered effector specificities in regulators of gene expression: TOL plasmid *xylS* mutants and their use to engineer expansion of the range of aromatics degraded by bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **83**: 8467-8471.
- Ramos, J. L., N. Mermoud, and K. N. Timmis. 1987. Regulatory circuits controlling transcription of TOL plasmid operon encoding *meta*-cleavage pathway for degradation of alkylbenzoates by *Pseudomonas*. *Mol. Microbiol.* **1**: 293-300.
- Ramos, J. L., y F. Rojo. 1990. Biodegradación e ingeniería genética. *Investigación y Ciencia.* **164**: 72-79.
- Ramos, J. L., E. Díaz, D. Dowling, V. de Lorenzo, S. Molin, S. O'Gara, C. Ramos, and K. N. Timmis. 1994. The behavior of bacteria designed for biodegradation. *Biotechnology N.Y.* **12**: 1349-1358.
- Ramos, J. L., E. Duque, M. J. Huertas and A. Haidour. 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.
- (a) Ramos, J. L., S. Marqués, and K. N. Timmis. 1997. Transcriptional control of the *Pseudomonas* TOL plasmid catabolic operons is achieved through an interplay of host factors and plasmid encoded regulators. *Ann. Rev. Microbiol.* **51**: 341-373.
- (b) Ramos, J. L., E. Duque, J. J. Rodríguez-Herva, P. Godoy, A. Haidour, F. Reyes, and A. Fernández-Barrero. 1997. Mechanisms for solvent tolerance in bacteria. *J. Biol. Chem.* **272**: 3887-3890.
- Ramos, J. L., E. Duque, P. Godoy, and A. Segura. 1998. Efflux pumps involved in toluene tolerance in *Pseudomonas putida* DOT-T1E. *J. Bacteriol.* **180**: 3323-3329.
- Ramos, J. L., M. T. Gallegos, S. Marqués, M. I. Ramos-González, M. Espinosa-Urgel, and A. Segura. 2001. Responses of gram-negative bacteria to certain environmental stresses. *Curr. Opin. Microbiol.* **4**: 166-171.

- Ramos-González, M. I., P. Godoy, M. Alaminos, A. Ben-Bassat, and J. L. Ramos. 2001. Physiological characterization of *Pseudomonas putida* DOT-T1E tolerance to *p*-hydroxybenzoate. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**: 4338-4341.
- Ramos, J. L., E. Duque, M. T. Gallegos, P. Godoy, M. I. Ramos-González, A. Rojas, W. Terán, and A. Segura. 2002. Mechanisms of solvent tolerance in gram-negative bacteria. *Ann. Rev. Microbiol.* **56**: 743-768.
- Rand, J. D., S. G. Danby, D. L. Greenway, and R. R. England. 2002. Increased expression of the multidrug efflux genes *acrAB* occurs during slow growth of *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Lett.* **207**: 91-95.
- Reineke W., D. J. Jeenes, P. A. Williams, and H. J. Knackmuss. 1982. TOL plasmid pWWO in constructed halobenzoate-degrading *Pseudomonas* strains: prevention of *meta* pathway. *J. Bacteriol* **150**: 195-201.
- Reverchon, S., W. Nasser, and J. Robert-Baudouy. 1991. Characterization of *kdgR*, a gene of *Erwinia chrysanthemi* that regulates pectin degradation. *Mol. Microbiol.* **5**: 2203-2216.
- Rhee, S., R. G. Martin, J. L. Rosner, and D. R. Davies. 1998. A novel DNA-binding motif in MarA: the first structure for an AraC family transcriptional activator. *Proc. Natl. Sci. U. S. A.* **95**: 10413-10418.
- Riegert, U., G. Heiss, P. Fischer, and A. Stolz. 1998. Distal cleavage of 3-chlorocatechol by an extradiol dioxygenase to 3-chloro-2-hydroxymuconic semialdehyde. *J. Bacteriol.* **180**: 2849-1853.
- Roberts, L. 1987. Discovering microbes with a taste for PCBs. *Science* **237**: 75-77.
- Robinson, G. K., G. M. Stephens, H. Dalton, and P. J. Geary. 1992. The production of catechols from benzene and toluene by *Pseudomonas putida* in glucose fed-batch culture. *Biocatalysis* **6**: 81-100.
- Rojo, F., D. H. Pieper, K. H. Engesser, H. J. Knackmuss, and K. N. Timmis. 1987. Assemblage of *ortho* cleavage route for simultaneous degradation of chloro- and methylaromatics. *Science* **238**: 1395-1398.
- Rojo, F. 1999. Repression of transcription initiation in bacteria. *J. Bacteriol.* **181**: 2987-2991.
- Romero-Steiner, S., R. E. Parales, C. S. Harwood, and J. E. Houghton. 1994. Characterization of the *pcaR* regulatory gene from *Pseudomonas putida*, which is required for the complete degradation of *p*-hydroxybenzoate. *J. Bacteriol.* **176**: 5771-5779.
- Ruiz, R., M. I. Aranda-Olmedo, P. Dominguez-Cuevas, M. I. Ramos-González, and S. Marqués. 2004. Transcriptional regulation of the toluene catabolic pathways. Chapter 17 of *The Pseudomonads*, vol.II.
- Russell, N., and N. Fukunaga. 1990. A comparison of the thermal adaptation of membrane lipids in psychrophilic and thermophilic bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* **75**: 171-182.
- Saier, M. H. Jr, R. Tam, A. Reizer, and J. Reizer. 1994. Two novel families of bacterial membrane proteins concerned with nodulation, cell division and transport. *Mol. Microbiol.* **11**: 841-847.
- Saito, K., H. Yoneyama, and T. Nakae. 1999. *nalB*-type mutations causing the overexpression of the MexAB-OprM efflux pump are located in the *mexR* gene of the *Pseudomonas aeruginosa* chromosome. *FEMS Microbiol. Lett.* **179**: 67-72.
- Sala-Trepat, J. M., K. Murray, and P. A. Williams. 1972. The metabolic divergence in the *meta* cleavage pathway of catechols by *Pseudomonas putida* NCIB 10015. *Eur. J. Biochem.* **28**: 347-356.

- Sambrook, J., E. F. Fritsch and T. Maniatis.** 1989. Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York.
- (a) **Sánchez, P., A. Alonso, and J. L. Martínez.** 2002. Cloning and characterization of SmeT, a repressor of the *Stenotrophomonas maltophilia* multidrug efflux pump SmeDEF. *Antimicrob. Agents. Chemother.* **46**: 3386-3393.
- (b) **Sánchez, P., J. F. Linares, B. Ruiz-Díez, E. Campanario, A. Navas, F. Baquero, and J. Martínez.** 2002. Fitness of *in vitro* isolated *Pseudomonas aeruginosa* *nalB* and *nfxB* multidrug resistant mutants. *J. Antimicrob. Chemother.* **50**: 657-664.
- (c) **Sánchez, P., F. Rojo, and J. L. Martínez.** 2002. Transcriptional regulation of *mexR*, the repressor of *Pseudomonas aeruginosa* *mexAB-oprM* multidrug efflux pump. *FEMS Microbiol. Lett.* **207**: 63-68.
- Sato, K., K. Shibayama, T. Horii, Y. Arakawa, and M. Ohta.** 1998. Abst. 38th Intersci. Conf. Antimicrob. Agents Chemoter., abstr. C-126.
- Sauer, K., and A. K. Camper.** 2001. Characterization of phenotypic changes in *Pseudomonas putida* in response to surface-associated growth. *J. Bacteriol.* **183**: 6597-6589.
- Scharrenburg, G. J. M., and J. Frankena.** 1996. Biocatalyse helpt farmaceutische industrie bij asymmetrische synthese. *Chem. Mag.* Jul/Aug; 284-286.
- Schell, M. A.** 1993. Molecular biology of the LysR family of transcriptional regulators. *Ann. Rev. Microbiol.* **47**: 597-620.
- 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.
- Schoemaker, H. E., D. Mink, and M. G. Wubbolts.** 2003. Dispelling the Myths-Bicatalysis in industrial synthesis. *Science* **299**: 1649-1697.
- Schumacher, M. A., M. C. Miller, S. Grkovic, M. H. Brown, R. A. Skurray, and R. G. Brennan.** 2001. Structural mechanisms of QacR induction and multidrug recognition. *Science* **294**: 2158-2163.
- Schumacher M. A., and R. G. Brennan.** 2002. Structural mechanisms of multidrug recognition and regulation by bacterial multidrug transcription factors. *Mol. Microbiol.* **45**: 885-893.
- Schumacher, M. A., M. C. Miller, S. Grkovic, M. H. Brown, R. A. Skurray, and R. G. Brennan.** 2002. Structural basis for cooperative DNA binding by two dimers of the multidrug-binding protein QacR. *EMBO J.* **21**: 1210-1218.
- Schwede, T., J. Kopp, N. Guex, and M. C. Peitsch.** 2003. Swiss Model: an automated protein homology-modeling server. *Nucleic Acids Res.* **31**: 3381-3385.
- Schweigert, N., A. J. B. Zehnder, and R. I. L. Eggen.** 2001. Chemical properties of catechols and their molecular modes of toxic action in cells, from microorganisms to mammals. *Environ. Microbiol.* **3**: 81-91.
- Schweizer, H. P.** 1998. Intrinsic resistance to inhibitors of fatty acid biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa* is due to efflux: application of a novel technique for generation of unmarked chromosomal mutations for the study of efflux systems. *Antimic. Agents Chem.* **42**: 394-398.
- Segura, A., E. Duque, G. Mosqueda, J. L. Ramos, and F. Junker.** 1999. Multiple responses of gram-negative bacteria to organic solvents. *Environ. Microbiol.* **1**: 191-198.

- Segura, A., E. Duque, A. Hurtado, and J. L. Ramos. 2001. Mutations in genes involved in the flagellar export apparatus of the solvent-tolerant *Pseudomonas putida* DOT-T1E strain impair motility and lead to hypersensitivity to toluene shocks. *J. Bacteriol.* **183**: 4127-4133.
- Segura, A., E. Duque, A. Rojas, P. Godoy, A. Delgado, A. Hurtado, J. E. Cronan, Jr., and J. L. Ramos. 2004. Fatty acid turnover in *Pseudomonas putida* DOT-T1E solvent tolerance. *Environmental Microbiol.* Accepted for publication.
- Segura, A., H. J. Heipieper, W. Terán, M. E. Guazzaroni, A. Rojas, E. Duque, M. T. Gallegos, and J. L. Ramos. 2004. Enzymatic activation of the *cis-trans* isomerase and transcriptional regulation of efflux pumps in *Pseudomonas putida* solvent tolerance. Chapter 16 in *The Pseudomonads* vol. II.
- Sekiya, H., T. Mima, Y. Morita, T. Kuroda, T. Mizushima, and T. Tschuya. 2003. Functional cloning and characterization of a multidrug efflux pump, MexHI-OpmD, from a *Pseudomonas aeruginosa* mutant. *Antimicrob. Agents Chem.* **47**: 2990-2992.
- Seone, A. S., and S. B. Levy. 1995. Characterization of MarR, the repressor of the multiple antibiotic resistance (*mar*) operons in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **177**: 3414-3419.
- Shafer, W. M., J. T. Balthazar, K. E. Hagman, and S. A. Morse. 1995. Missense mutations that alter the DNA-binding domain of the MtrR protein occur frequently in rectal isolates of *Neisseria gonorrhoeae* that are resistant to faecal lipids. *Microbiology* **141**: 907-911.
- Sharff, A., C. Fanutti, J. Shi, C. Calladine, and B. Luisi. 2001. The role of the TolC family in protein transport and multidrug efflux: from stereochemical certainty to mechanistic hypothesis. *Eur. J. Biochem.* **268**: 5011-5026.
- Shiba, T., K. Ishiguro, H. Takemoto, H. Koibuchi, and K. Sugimoto. 1995. Purification and characterization of *Pseudomonas aeruginosa* NfxB protein, the negative regulator of the *nfxB* gene. *J. Bacteriol.* **177**: 5872-5877.
- Shields, M. S., S. O. Montgomery, P. J. Chapman, S. M. Cuskey, and P.H. Pritchard. 1989. Novel pathway of toluene catabolism in the trichloroethylene-degrading bacterium G4. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**: 1624-1629.
- Shirai, K. 1986. Screening of microorganisms for catechol production from benzene. *Agric. Biol. Chem.* **50**: 284-286.
- Sikkema, J., B. Poolman, W. N. Konings, and J. A. M. de Bont. 1992. Effects of the membrane action of tetralin on the functional and structural properties of artificial and bacterial membranes. *J. Bacteriol.* **174**: 2986-2992.
- Sikkema, J., J. A. M. de Bont, and B. Poolman. 1995. Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. *Microbiol. Rev.* **59**: 201-222.
- Söhngen, N. L. 1913. *Centr. Bakteriell., Parasitenk. Infek.* **20**: 282
- Spaink, H. P., R. J. Okker, C. A. Wijffelman, E. Pees y B. J. J. Lugtenberg. 1987. Promoters in the nodulation region of the *Rhizobium leguminosarum* Sym plasmid pRL1JI. *Plant. Mol. Biol.* **9**: 27-39.
- Srikumar, R., X. Z. Li, and K. Poole. 1997. Inner membrane efflux components are responsible for the β -lactam specificity of multidrug efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **179**: 7875-7881.
- Srikumar, R., T. Kon, N. Gotoh, and K. Poole. 1998. Expression of *Pseudomonas aeruginosa* multidrug efflux pumps MexA-MexB-OprM and MexC-MexD-OprJ in a multidrug-sensitive *Escherichia coli* strain. *Antimicrob. Agents Chem.* **42**: 65-71.

- Srikumar, R., C. J. Paul, and K. Poole. 2000. Influence of mutations in the *mexR* repressor gene on expression of the MexA-MexB-OprM multidrug efflux system of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **182**: 1410-1414.
- Steidle, A., M. Allesen-Holm, K. Riedel, G. Berg, M. Givskov, S. Molin, and L. Eberl. 2002. Identification and characterization of an N-acylhomoserine lactone-dependent quorum-sensing system in *Pseudomonas putida* strain IsoF. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**: 6371-6382.
- Stover, C.K., X. Q. Pham, A. L. Erwin, S. D. Mizoguchi, P. Warrener, M. J. Hickey, F. S. L. Brinkman, W. O. Hufnagle, D. J. Kowalik, M. Lagrou, R. L. Garber, L. Goltry, E. Tolentino, S. Westbrook-Wadman, Y. Yuan, L. L. Brody, S. N. Coulter, K. R. Folger, A. Kas, K. Larbic, R. Lim, K. Smith, D. Spencer, G. K. S. Wong, Z. Wu, I. T. Paulsen, J. Reizer, M. H. Saier, R. E. W. Hancock, S. Lory, and M. V. Olson. 2000. Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, and opportunistic pathogen. *Nature* **406**: 959-964.
- Subramanian, V., T. N. Liu, W. K. Yeh, and D. T. Gibson. 1979. Toluene dioxygenase: purification of an iron-sulfur protein by affinity chromatography. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **91**: 1131-1139.
- Subramanian, V., T. N. Liu, W. K. Yeh, M. Narro, and D. T. Gibson. 1981. Purification and properties of a NADH-ferredoxin_{TOL} reductase: a component of toluene dioxygenase from *Pseudomonas putida*. *J. Biol. Chem.* **256**: 2723-2730.
- Subramanian, V., T. N. Liu, W. K. Yeh, C. M. Serdar, L. P. Wackett, and D. T. Gibson. 1985. Purification and properties of ferredoxin_{TOL}: a component of toluene dioxygenase from *Pseudomonas putida* F1. *J. Biol. Chem.* **260**: 2355-2363.
- Sunnaborg, A., D. Klumpp, T. Chung, D. D. LaPorte. 1990. Regulation of the glyoxylate bypass operon: cloning and characterization of *iclR*. *J. Bacteriol.* **172**: 2642-2649.
- Suutari, M., and S. Laakso. 1994. Microbial fatty-acids and thermal adaptation. *Crit. Rev. Microbiol.* **20**: 129-137.
- Thanabalu, T., E. Koronakis, C. Hughes, and V. Koronakis. 1998. Substrate-induced assembly of a contiguous channel for protein export from *E. coli*: reversible binding of an inner-membrane translocase to an outer membrane exit pore. *EMBO J.* **17**: 6487-6496.
- Thanassi, D. G., L. W. Chang, and H. Nikaido. 1997. Active efflux of bile salts by *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **179**: 2512-2518.
- Thompson, J. D., D. G. Higgins, and 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**: 4673-4680.
- Timmis, K. N., F. Rojo, and J. L. Ramos. 1988. Prospects for laboratory engineering of bacteria to degrade pollutants. In "Environmental Biotechnology: reducing risks from environmental trouble biotechnology". Omenn, G. S. (ed) New York. Plenum
- Tobes, R., and J. L. Ramos. 2002. AraC-XylS database: a family of positive transcriptional regulators in bacteria. *Nucleic Acids Res.* **30**: 318-321.
- Tsukagoshi, N., and R. Aono. 2000. Entry and release of solvents by *Escherichia coli* in an organo-aqueous two-liquid phase system and substrate specificity of the ArcAB-TolC solvent-extruding pump. *J. Bacteriol.* **182**: 4803-4810.
- Van Sonsbeek, H. M., H. H. Beffink, and J. Tramper. 1993. Two-liquid-phase bioreactors. *Enzyme Microb. Technol.* **15**: 722-729.
- Wagner, R. 1914. *Z. Garngsphysiol.* **4**: 289.

- Wandersman, C., and P. Delapelaire. 1990. TolC, and *Escherichia coli* outer membrane protein required for hemolysin secretion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 4776-4780.
- Wandersman, C. 1992. Secretion across the bacterial outer membrane. *Trends Genet.* 8: 317-322.
- Wang, Y., M. Rawlings, D. T. Gibson, D. Labbé, H. Bergeron, R. Brousseau, and P. C. K. Lau. 1995. Identification of a membrane protein and a truncated LysR-type regulator associated with the toluene degradation pathway in *Pseudomonas putida* F1. *Mol. Gen. Genet.* 246: 570-579.
- Wang, H., J. L. Dzink-Fox, M. Chen, and S. B. Levy. 2001. Genetic characterization of highly fluoroquinolone-resistant clinical *Escherichia coli* strains from China: role of *acrR* mutations. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45: 1515-1521.
- Webber, M. A., and L. J. V. Piddock. 2003. The importance of efflux pumps in bacterial antibiotic resistance. *J. Antimicrob. Chemotherapy.* 51: 9-11.
- Weber, F. J. 1994. *Toluene: biological waste-gas treatment, toxicity and microbial adaptation*. PhD thesis. Univ. Wageningen. The Netherlands.
- Weber F. J., S. I sken, and J. A. M. de B ont. 1994. *Cis/trans* isomerization of fatty acids as a defense mechanism of *Pseudomonas putida* strains to toxic concentrations of toluene. *Microbiology.* 140: 2013-2017.
- Weber, F. J., and J. A. M. de Bont. 1996. Adaptation mechanisms of microorganisms to the toxic effects of organic solvents on membranes. *Biochim. Biophys. Acta* 1286: 225-245.
- Wei, J., M. B. Goldberg, V. Burland, M. M. Venkatesan, W. Deng, G. Founier, G. F. Mayhew, G. Plunkett III, D. J. Rose, A. Darling, B. Mau, N. T. Perna, S. M. Payne, L. J. Runyen-Janecky, S. Zhou, D. C. Schawrtz, and F. R. Blattner. 2003. Complete genome sequence and comparative genomic of *Shigella flexenei* serotype 2 a strain 2457T. *Infect. Imm.* 71: 2775-2786.
- Wery, J., D. I. Mendes da Silva, and J. A. M. de Bont. 2000. A genetically modified solvent-tolerant bacterium for optimized production of a toxic fine chemical. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 54: 180-185.
- Wery, J., B. Hidayat, J. Kieboom, and J. A. M. de Bont. 2001. An insertion sequence prepares *Pseudomonas putida* S12 for severe solvent stress. *J. Biol. Chem.* 276: 5700-5706.
- Westbrock-Wadman, S., D. R. Sherman, M. J. Hickey, S. N. Coulter, Y. Q. Zhu, P. Warrener, L. Y. Nguyen, R. M. Shawar, K. R. Folger, C. K. Stover. 1999. Characterization of a *Pseudomonas aeruginosa* efflux pump contributing to aminoglycoside impermeability. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 43: 2975-2983.
- Whited, G. M., and D. T. Gibson. 1991. Toluene-4-monooxygenase, a three-component enzyme system that catalyzes the oxidation of toluene to *p*-cresol in *Pseudomonas mendocina* KR1. *J. Bacteriol.* 173: 3010-3016.
- White, D. G., J. D. Goldman, B. Demple, and S. B. Levy. 1997. Role of the *acrAB* locus in organic solvent tolerance mediated by expression of *marA*, *soxS* or *roxA* in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 179: 6122-6126.
- Williams, P. A., L. M. Shaw, C. W. Pitt, and M. Vreal. 1991. *xyIUW*, two genes at the start of the upper catabolic operon of TOL plasmid pWW0, appear to play no essential part in determining its catabolic phenotype. *Microbiol.* 5: 101-107.
- Witholt, B., M. J. de Smet, J. Kingma, J. B. Beilen, M. Kok, R. G. Lageveen, and G. Eggink. 1990. Bioconversions of aliphatic compounds by *Pseudomonas oleovorans* in multiphase bioreactors; background and economic potential. *Tren Biotechnol.* 8: 46-52.

- Woese, C. R., W. G. Weisburg, C. M. Hahn, B. J. Paster, L. B. Zablen, B. J. Lewis, T. J. Macke, W. Ludwig, and E. Stackebrandt. 1985. The phylogeny of purple bacteria: the gamma subdivision. *Syst. Appl. Microbiol.* **6**: 25-33.
- Wong, K. K. Y., and R. E. W. Hancock. 2000. Insertion mutagenesis and membrane topology model of the *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane protein OprM. *J. Bacteriol.* **182**: 2402-2410.
- Wong, K. K. Y., F. S. Brinkman, R. S. Benz, and R. E. W. Hancock. 2001. Evaluation of a structural model of *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane protein OprM, a new efflux component involved in intrinsic antibiotic resistance. *J. Bacteriol.* **183**: 367-374.
- Worsey, M. J., and P. A. Williams. 1975. Metabolism of toluene and the xylenes by *Pseudomonas putida* (arvilla) mt-2: evidence for a new function of the TOL plasmid. *J. Bacteriol.* **124**: 7-13.
- Wösten, M. M. S. M. 1998. Eubacterial sigma-factors. *FEMS Microb. Rev.* **22**: 127-150.
- Wubbolts, M. G., O. Favre-Bulle, and B. Witholt. 1996. Biosynthesis of synthons in two-liquid-phase media. *Biotechnol. Bioeng.* **52**: 301-308.
- Yanisch-Perron, C., J. Vieira and J. Messing. 1985. Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* **33**: 103-119.
- Yen, K. M., M. R. Karl, L. Blatt, M. J. Simon, R. B. Winter, P. R. Fausset, H. S. Lu, A. A. Harcourt, and K. K. Chen. 1991. Cloning and characterization of a *Pseudomonas mendocina* KR1 gene cluster encoding toluene-4-monooxygenase. *J. Bacteriol.* **173**: 5315-5327.
- Yoneyama, H., H. Maseda, H. Kamiguchi, and T. Nakae. 2000. Function of the membrane fusion protein, MexA, of the MexAB-OprM efflux pump in *Pseudomonas aeruginosa* without an anchoring membrane. *J. Biol. Chem.* **275**: 4628-4634.
- Yoneyama, H., H. Maseda, T. A. Yamabayashi, S. Izumi, and T. Nakae. 2002. Secondary-site mutation restores the transport defect caused by the transmembrane domain mutation of the xenobiotic transporter MexB in *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **292**: 513-518.
- Yoshihara, E., H. Maseda, and K. Saito. 2002. The outer membrane component of the multidrug efflux pump from *Pseudomonas aeruginosa* may be a gated channel. *Eur. J. Biochem.* **269**: 4738-4745.
- Young, G. M., D. H. Schmiel, and V. L. Miller. 1999. A new pathway for the secretion of virulence factors by bacteria: The flagellar export apparatus functions as protein-secretion system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**: 6454-6461.
- Young, L. Y. 1984. Anaerobic degradation of aromatic compounds. In "Microbial degradation of organic compounds" (Gibson, D. T., ed), pp 487-523. Dekker, New York.
- (a) Yu, E. W., G. McDermott, H. Zgurskaya, H. Nikaido, and D. E. Koshland Jr. 2003. Structural basis of multiple drug-binding capacity of the AcrB multidrug efflux pump. *Science* **300**: 976-980.
- (b) Yu, E. W., J. R. Aires, and H. Nikaido. 2003. AcrB multidrug efflux pump of *Escherichia coli*: a composite substrate-binding cavity of exceptional flexibility generates its extremely wide substrate specificity. *J. Bacteriol.* **185**: 5657-5664.
- (a) Zgurskaya, H.I., and H. Nikaido. 1999. AcrA is a highly asymmetric protein capable of spanning the periplasm. *J. Mol. Biol.* **285**: 409-420.
- (b) Zgurskaya, H.I., and H. Nikaido. 1999. Bypassing the periplasm: Reconstitution of the AcrAB multidrug efflux pump of *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **96**: 7190-7195.

(a) Zgurskaya, H.I., and H. Nikaido. 2000. Cross-linked complex between trimeric periplasmic lipoprotein AcrA and the inner-membrane-associated multidrug efflux pump AcrB from *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **182**: 4264-4267.

(b) Zgurskaya, H. I., and H. Nikaido. 2000. Multidrug resistance mechanisms: drug efflux across two membranes. *Mol. Microbiol.* **37**: 219-225.

Zgurskaya, H. I., and H. Nikaido. 2001. AcrAB and related multidrug efflux pumps of *Escherichia coli*. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **3**: 215-218.

Zhang, L., Li X. Z, and K. Poole. 2001. Fluoroquinolone susceptibilities of efflux-mediated multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*, *Stenotrophomonas maltophilia* and *Burkholderia cepacia*. *J. Antimicrob. Chemother.* **48**: 549-552.

Zhang, H. B., L.W. Wang, and L. H. Zhang. 2002. Genetic control of quorum sensing turnover in *Agrobacterium tumefaciens*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **99**: 4638-4643.

Zhao, Q., X. Z. Li, A. Mistry, R. Srikumar, L. Zhang, O. Lomovskaya, and K. Poole. 1998. Influence of the TonB energy-coupling protein on efflux-mediated multidrug resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chem.* **42**.

Zheleznova, E. E., P. N. Markham, A. A. Neyfakh, and R. G. Brennan. 1999. Structural basis of multidrug recognition by BmrR, a transcription activator of a multidrug transporter. *Cell* **96**: 353-362.

Ziha-Zarifi, I., C. Llanes, T. Köler, J. C. Péchère, and P. Plesiat. *In vivo* emergence of multidrug-resistant mutants of *Pseudomonas aeruginosa* overexpressing the active efflux system MexA-mexB-OprM. *Antimicrob. Agents. Chemoter.* **43**: 287-291.

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

APÉNDICE

CLUSTAL W (1.74) multiple sequence alignment

```

TtgA -----MQFKPAVTALVSAVALAT--LLSGCKKEEAAP-AAQAPQVGVVTIQPQAF
ArpA -----MQFKPAVTALVSAVALAT--LLSGCKKEEAAP-AAQAPQVGVVTIQPQAF
MexA -----MQRT PAMRVLVPALLVAIS-ALSGCGKSEAPP-PAQTPEVGI VTL EAQTVT
AcrA -----MNKNRGFTPLAVVLM LSGSLALTGCDDKQAQQGGQMPAVGVVTVKTEPLQ
TtgG MRAERWSQTVRQIRSPRALRVIPLTALM-LISGCGEKEQVSSATPPPVDVGVYTVRAQALT
SrpA -----MRQIRSPRALRVIPLTALM-LISGCGEKEQVSSATPPPVDVGVYTVRAQALT
TtgD -----MRLERALRARQLIPLAAIW-LLVGCGKQETVESTAVPPEVGVYTVKAQALT
          : . . . : : * * . . : * * * : * : . . . .

```

```

TtgA LTSELPGRTSAYRVAEVRPQVNGI I LKRLFKEGSEVKEGQQLYQIDPAVYEATLANAKAN
ArpA LTSELPGRTSAYRVAEVRPQVNGI I LKRLFKEGSEVKEGQQLYQIDPAVYEATLANAKAN
MexA LNTELPGR TNAFRIA EVRPQVNGI I LKRLFKEGSDVKAGQQLYQIDPATYEADYQSAQAN
AcrA ITTELPGR TSAYRIA EVRPQVSGI I LKRNFKEGSDIEAGVSLYQIDPATYQATYDSAKGD
TtgG LTTDLPGRTSAFRVAEVRPQVSGI LQKRSFVEGA EVKLGQQLYQIDPRTYEAQLRRAEAN
SrpA LTTDLPGRTSAFRVAEVRPQVSGI LQKRSFVEGA EVKLGQQLYQIDPRTYEAQLRRAEAN
TtgD LTTDLPGRTSAYRVSEVRPQASGILQKRMFVEGA EVKQGEQLYQIDPRTYEALLARAEAS
          : . . : * * * * . * : * * * * . * * : * * * * * * * * * * * : . .

```

```

TtgA LLATRS LA-----ERYKQLIDEQAVSKQEYD-----DANAKRLQAEASLKS AQIDL
ArpA LLATRS LA-----ERYKQLIDEQAVSKQEYD-----DANAKRLQAEASLKS AQIDL
MexA LASTQEQA-----QRYKLLVADQAVSKQQYA-----DANAAYLQSKAAVEQARINL
AcrA LAKAQAAANIAQLTVNRYQKLLGTQYI SKQEYDQALADAQQANA AVTAAKAAVETARINL
TtgG RTSAQNLA-----RRYETLLKTKAVSKQQYD-----DALAAWKQAEADYQVARIDV
SrpA RTSAQNLA-----RRYETLLKTKAVSKQQYD-----DALAAWKQAEADYQVARIDV
TtgD LLTAQNLA-----RRYERLLDTNAISQQQYD-----DAMATWKQAQAE AQMARINM
          : : * . * * : * : : * * * * : * * * : * * : * * * :

```

```

TtgA RYTKVLAPISGRIGRSSFTEGALVSNGQTDAMATIQQQLDPIYVDVTQSTAELLKLRDL
ArpA RYTKVLAPISGRIGRSSFTEGALVSNGQTDAMATIQQQLDPIYVDVTQSTAELLKLRDL
MexA RYTKVLSPI SGRIGRS AVTEGALVTNGQANAMATVQQQLDPIYVDVTQPSTALLRLRRELA
AcrA AYTKVTSPISGRIGKSNVTEGALVQNGQATALATVQQQLDPIYVDVTQSSNDFLRLKQELA
TtgG QYTRVLSPI SGRIGRSTVTEGALVTNGQAQSLATVTQLDPIYVDVTQPITKLLGLHKALE
SrpA QYTRVLSPI SGRIGRSTVTEGALVTNGQAQSLATVTQLDPIYVDVTQPITKLLGLQKALE
TtgD QYTKVLAPITGRIGRS AVTEGALVTNGQAQELATVTQLDPIYVDVNQPI TRLLGLKRALE
          * * : * : * * * * : * . * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

```

```

TtgA SGQLQKAGNNAASVQLVLEDGSLFKQEGRLEFSEVAVDETTGSVTLRALFPNP DHTLLPG
ArpA SGQLQKAGNNAASVQLVLEDGSLFKQEGRLEFSEVAVDETTGSVTLRALFPNP DHTLLPG
MexA SGQLERAGDNAAKVSLKLEDGSQYPLEGRLEFSEVSVDEGTGSVTIRAVFPNP NNELLPG
AcrA NGTLKQE-NGKAKVSLITSDGIKFPQDGTLEFSDVTVDQTTGSITLRAIFPNPDHTLLPG
TtgG SGRLQKTGENQAEVSLTLDDGSAYPLPGTLKFSEVSCDPTTGSVTLRAEF PNP NRKLLPG
SrpA SGRLQKTGENQAEVSLTLDDGSAYPLPGTLKFSEVSDPTTGSVTLRAEF PNP NRKLLPG
TtgD SGRLQRVGDNQAQVSLTLDDGTPYPLKGVLFSEVSVAPSTGSVTLRAEF PNP DHKLLPG
          . * * : : . * . * * . * * : * * * * * * * * * * * * * * * * * *

```

```

TtgA MFVHARLKAGVNANAILAPQQGVTRDLKGAPTALVVNQENKVELRQLKASRTLGS DWLIE
ArpA MFVHARLKAGVNANAILAPQQGVTRDLKGAPTALVVNQENKVELRQLKASRTLGS DWLIE
MexA MFVHAQLQEGVKQKAILAPQQGVTRDLKGQATALVVNAQNKVELRVIKADRVI GDKWLVT
AcrA MFVRARLEEGLNPNAI LVPQQGVTRTPRGD ATVLVVGADDKVETRPIVASQAIGDKWLVT
TtgG MFVHALLKEGVQNAAI LVPQQAISRDTRGVPSVWVMKADNTVESREIQTLRTVGN AWLIS
SrpA MFVHALLKEGVQNAAI LVPQQAISRDTRGVPSVWVVKADNTVESREIQTLRTVGN AWLIS
TtgD MFVHALLNEGEQQAAI LVPHQAVGRDARGVPTVWVVKPDNTVESREVQTLQTVGN AWLLG
          * * * : * * : * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

```

```

TtgA EGLNPGDRLITEGLQYVRPGVEVKVSDATNVKPKPAGPDQANA AKADAKAE
ArpA EGLNPGDRLITEGLQYVSPRRRCEGQRCHQRQEAGRP-----
MexA EGLNAGDKIITEGLQFVQPGVEVKTVPKKNVASAQKADAAP-AKTDSKG-
AcrA EGLKAGDRVVISGLQKVRPGVQVKAQEVTADNNQQAASGAQPEQSKS---
TtgG NGVTEGERIITEGVQRVRS GI AVNAVEAKNVNLVDGFAATTEASAN----
SrpA NGVTEGERIITEGVQRVRS GI AVNAVEAKNVNLVDGFAATTEASAN----
TtgD AGINDGERVITEGVQLARSGIKVKPVAANKV KLMSEFGSQVQAQAH----
          * : . * : : : . * : * . . . :

```


CLUSTAL W (1.74) multiple sequence alignment

TtgH MSRFFIDRPIFAWVLAIVAMLAGALSLAKMPISQYPNIAAPAVSIQVSYPGASAQTVQDT
 SrpB MSRFFIDRPIFAWVLAIVAMLAGALSLAKMPISQYPNIAAPAVSIQVSYPGASAQTVQDT
 TtgE MSRFFIDRPIFAWVLAIIAMLAGALSLTKMPISQYPNIAAPAVSIQVVYYPGASAKTVQDT
 TtgB MSKFFIDRPIFAWVIALVIMLVGALSILKLPINQYPSIAPPAIAIAVTPGASAQTVQDT
 AcrB MPNFFIDRPIFAWVIAIIIMLAGGLAILKLPVAQYPTIAPPAVTISASYPGADAKTVQDT
 MexB MSKFFIDRPIFAWVIALVIMLAGGLSILSLPVNQYPAIAPPAIAVQVSYPGASAETVQDT
 *..*****:*:: **.*.*:: .*: *** **.**::: . *****.*:*****

TtgH VVQVIEQQLSGLDGFYMSAESASDGSMTIIVTFEQGTDPDIAQVQVQNKQLLATPRLPE
 SrpB VVQVIEQQLSGLDGFYMSAESASDGSMTIIVTFEQGTDPDIAQVQVQNKQLLATPRLPE
 TtgE VVQVIEQQLNGLDGFYMAAESASDGSMTIIVTFEQGTNPDIQVQVQNKQLLATPRLPE
 TtgB VVQVIEQQLNGLIDNLRVVSSESNSDGSMTITATFEQGTNPDTAQVQVQNKLNLATPLLPQ
 AcrB VTQVIEQNMNGIDNLMYSSNSDSTGTQITLTFESGTDADIAQVQVQNKQLLAMPLLPQ
 MexB VVQVIEQQMNGIDNLRYSISSESNSDGSMTITVTFEQGTDPDIAQVQVQNKQLLATPLLPQ
 *..*****:*:: **.*.*:: .*: *** **.**::: . *****.*:*****

TtgH EVQRQGLRVVKYQMNFFLVMSLVDRSGKLDNFDLGNLIASQLQDPISRIPGVGDFQLFGS
 SrpB EVQRQGLRVVKYQMNFFLVMSLVDRSGKLDNFDLGNLIASQLQDPISRIPGVGDFQLFGS
 TtgE EVQRQGLRVVKYQMNFFMVVGLVDKTGKMTNFDLGNLIASQLQDPISRINGVDFLLFGS
 TtgB EVQQQGIRVTKAVKNFLLVIGLVSEDSMTKDDLANYIVSNMQDPISRTAGVGVDFQVFGA
 AcrB EVQQQGVSVKSSSSFLMVVGVINTDGTMTQEDISDYVAANMKDAISRISGVGDVQLFGS
 MexB EVQRQGIRVTKAVKNFLMVVGVVSTDGSMTKEDLSNYIVSNIQDPLSRTKGVGDFQVFGS
 :*:* * * .*::*:..: *.: : *.: : :.::*:* **. :**:

TtgH PYAMRIWLDPGKLNYSYQLTPTDVASAIREQNVQVSSGQLGGLPTRSGVQLNATVVLGKTRM
 SrpB PYAMRIWLDPGKLNYSYQLTPTDVASAIREQNVQVSSGQLGGLPTRSGVQLNATVVLGKTRM
 TtgE PYAMRIWLDPGKLNYSYQLTPGDVAQAIREQNVQVSSGQLGGLPTRSGVQLNATVVGKTRM
 TtgB QYAMRIWLDPAKLNKFKQLTPVDVKTAVAAQNVQVSSGQLGGLPALPGTQLNATIIGKTRL
 AcrB QYAMRIWMPNELNKFQLTPVDVITAIKAQNAQVAAGQLGGTTPVKGQQLNASIIAQTRL
 MexB QYSMRIWLDPAKLNYSYQLTPGDVSSAIQAQNVQISSGQLGGLPAVKGQQLNATIIGKTRL
 ::*:*:* :**.*:***** ** * : **.*:*:***** * . * *****:..:***:

TtgH TTPSQFDEILVKVNPDGSQVRVKDVGRAELGADSFSAIQAQYK--DSPTASLALRLSTGGN
 SrpB TTPSQFDEILVKVNPDGSQVRVKDVGRAELGADSFSAIQAQYK--DSPTASLALRLSTGGN
 TtgE TTPAEFEEILVKVKADGSQVRVKDLDRVVLASENFSAISAKYRGQDSAGLGLLRLASGGN
 TtgB QTAEQFESILLKVNKDGSQVRLGDVAQVGLGGENYAVSAQFNG--KPASGLAVKLATGAN
 AcrB TSTEEFGKILLKVNQDGSRVLLRDVAKIELGGENYDIIAEFNG--QPASGLGIKLATGAN
 MexB QTAEQFENILLKVNPDGSQVRLKDVADVGLGGQDYSINAQFNG--SPASGLAIKLATGAN
 :. :* .**:*:*: ***:* : * : *..: : *.:. . . :.:*:*.*

TtgH LLETVDAVKKLMEQQKAYLPDGVEVIYPYDTTPVVEASIESVVHTIFEAVVLVFLVMYLF
 SrpB LLETVDAVKKLMEQQKAYLPDGVEVIYPYDTTPVVEASIESVVHTIFEAVVLVFLVMYLF
 TtgE LLETVKAVKAELEKQKAYLPEGVEVIYPYDTSPVVEASIDSVVHTILEAVVLVFLVMFLF
 TtgB ALDTAKALRETIKGLEPFFPPGVKAVFPYDTTPVVTESISGVIHTLIEAVVLVFLVMYLF
 AcrB ALDTAAAIRAELAKMEPFFPSGLKIVYPYDTTPFVKISIEHVVKTLVEAIIILVFLVMYLF
 MexB ALDTAKAIRQTIANLEPFPMPQGMKVVPYDTTPVVSASIEHVVKTLGEAIIILVFLVMYLF
 :.* :.: : :.:* *.: :*****:*.* ** *.:*:* *.:*****:**

TtgH LQSFRATLIPTLAVPVVLLATFALLPYFGLNINVLTMAMVLAIGLLVDDAIVVVENVER
 SrpB LQSFRATLIPTLAVPVVLLATFALLPYFGLNINVLTMAMVLAIGLLVDDAIVVVENVER
 TtgE LQSLRATIIPTLAVPVVLLAAAFALLPYFGISINVLTMAMVLAIGLLVDDAIVVVENVER
 TtgB LQNFRATIIITMTVPVLLGTFGILAAAGFSINTLTMFAMVLAIGLLVDDAIVVVENVER
 AcrB LQNFRATLIPTIAPVAVVLLGTFVLAFAFGFSINTLTMFGMVLAIGLLVDDAIVVVENVER
 MexB LQNFRATLIPTIAPVAVVLLGTFGVLAFAFGFSINTLTMFGMVLAIGLLVDDAIVVVENVER
 .:*:*.*:*****.*:*. * :*.***.*:**********

TtgH LMHDEGLSPLAATRKSMQISGALVGIGMVLSAVFVPMAFFGGSAGIIYQQFAITIVVCM
 SrpB LMHDEGLSPLAATRKSMQISGALVGIGMVLSAVFVPMAFFGGSAGIIYQQFAITIVVCM
 TtgE LMHDEGLSPLAATRKSMQISGALVGIGMVLSAVFVPMAFFGGSAGIIYKQFAVTIVICM
 TtgB VMSEEGLPPEATKRSMEQIQGALVGIALVLSAVLLPMAFFGGSTGVIYRQFSITIVSAM
 AcrB VMAEEGLPPEATKRSMEQIQGALVGIAMVLSAVFVPMAFFGGSTGAIYRQFSITIVSAM
 MexB VMAEEGLSPREARKSMQIQGALVGIAMVLSAVFLPMAFFGGSTGVIYRQFSITIVSAM
 :* :***.* **.:** **.******.:*****:*****:* **:*:*:***.*

TtgH GLSILVALVFTPALCVTILKAPEGNSHHE-RKGFFGWFNRIFDRGTRRFERGVGAMLKGR
 SrpB GLSILVALVFTPALCVTILKAPEGNSHHE-RKGFFGWFNRIFDRGTRRFERGVGAMLKGR
 TtgE SLSVLVALIFTPALCATILKAPENDAHHE-KKGFFGWFNRSFDRNSARFERGVGGILKHR

SrpB
TtgE
TtgB
AcrB
MexB

VFFVPLFYVVVVKLFEGLMKRKPNAVKEVTHEV-----
VFFVPLFYVVVVKVFE--RNRKPAALAEELA-----
IFWVPLFFVAVSSLFG---SKEPEKDVT PENPRYEAGQ
IFFVPVFFVVRRRFSR-KNEDIEHSHTVDHH-----
IFWVPLFYVAVSTLTK---DEASKQQASVEK-----GQ
:*:*:*:*:*.* * ..

CLUSTAL W (1.74) multiple sequence alignment

TtgI MKFKSLPMFA-LLMLGGCSLIPDYQQPAAPMQAQWPTGQAYG--GQGDQRSIAT--ALPK
 SrpC MKFKSLPMFA-LLMLGGCSLIPDYQQPAAPMQAQWPTGQAYG--GQGDQRSIAT--ALPK
 TtgF MKTHYLSIAL-SVALSGCSLIPDYQRPPAPIQAGWPQGEAYAKLKAGTHRPSQTRDAELN
 TtgC MTKSLLSLAVTAFILGGCSLIPDYQTPPEAPVAAQWPQGPAYS----P-TQADVAAAEQG
 ArpC MTKSLLSLAVTAFILGGCSLIPDYQAPEAPVAAQWPQGPAYS----P-TQADVAAAEQG
 OprM MKRSFSLAVAAVVLSGCSLIPDYQRPEAPVAAAYPQGQAYG----QNTGAAAVPAADIG
 TolC MQMKLLPILIGLSLSGSFSSLSQAENLMQVYQQARLSNPELR----KSAADRDAAFEKIN
 * * . * . * * : : :

TtgI AKEFFKDPALVRLLDAALENN-RDLRIAANKVESYRALYRIQRAERFPTLDGQASGNRTR
 SrpC AKEFFKDPALVRLLDAALENN-RDLRIAANKVESYRALYRIQRAERFPTLDGQASGNRTR
 TtgF WQVFFRDPVMRELIATALNNN-RDLRQTALNVEAYRALHRIERSALLPRANTGVGATRQR
 TtgC WRQFFHDPALQQLIQTSLVNN-RDLRVAALNLDAYRAQYRIQRADLFPVAVSATGSGSRQR
 ArpC WRQFFHDPALQQLIQTSLVNN-RDLRVAALNLDAYRAQYRIQRADLFPVAVSATGSGSRQR
 OprM WREFFRDPQLQQLIGVALENN-RDLRVAALNVEAFRAQYRIQRADLFPVAVSATGSGSRQR
 TolC EARSPLLPQLGLGADYTYSNGYRDANGINSNATSASLQLTQSI FDMSKWRALTLQEKAAG
 * : : * . * * . * :

TtgI LPDDLSPGTGDSRIDSQYQVGL-VTAYELDLFGRIRSLSNQALEKYLATEE--AQRSVQIA
 SrpC LPDDLSPGTGDSRIDSQYQVGL-VTAYELDLFGRIRSLSNQALEKYLATEE--AQRSVQIA
 TtgF LPADLSPTGEAGIQSQYDTTL-SMSYELDMFGRLRSLERAALQEYLAAAE--TQRSMQIA
 TtgC VPANMSQTGESGITSQYSATLGVSAYELDLFGRVRSLTEQALETYLSSEQ--ARRSTQIA
 ArpC VPANMSQTGESGITSQYSATLGVSAYELDLFGRVRSLTEQALETYLSSEQ--ARRSTQIA
 OprM LPGDLSTTGSPAISSQYGVTLGTTAWELDLFGRRLRSLRDQALEQYLATEEQ--AQRSAQTT
 TolC IQDVTYQTDQQTLLINTATAYFNVLNAIDVLSYTAQKEAIYRQLDQTTQRFNVGLVAIT
 : * . : : : * : : : : :

TtgI LIGDVATTYFLWRDQ--ALLELTEATLTSYVESLAMIESSAWAGTS-SELDVRQAR--T
 SrpC LIGDVATTYFLWRDQ--ALLELTEATLTSYVESLAMIESSAWAGTS-SELDVRQAR--T
 TtgF LIADVAIAYLSWRSDQ--AQLDLARSTLASYENSLNLIKSSREVGTA-SALDVRQAR--S
 TtgC LVASVANAYYTWQADQ--ALFKLTEETLKTYYEESYNLTRRSNEVGVA-SALDVSQAR--T
 ArpC LVASVANAYYTWQADQ--ALFKLTEETLKTYYEESYNLTRRSNEVGVA-SALDVSQAR--T
 OprM LVASVATAYLTLKADQ--AQLQLTKDTLGTQKSFDLTQRSYDVGVA-SALDLRQAQ--T
 TolC DVQNARAQYDTVLANEVTARNNLDNAVEQLRQITGNYYPELAALNVENFKTKDPQPVNAL
 : . . * : : * . * . : . . * *

TtgI LVNQAQAQQALYTRRIAQDVNALELLLGSK--IP-TDLPKNSPLAMSALGKVPAGLPADL
 SrpC LVNQAQAQQALYTRRIAQDVNALELLLGSK--IP-TDLPKNSPLAMSALGKVPAGLPADL
 TtgF LVETARVQQTLYTRQVAQDMNALQLLLGTK--LP-ADLP-ISDVLDQPLAALSTGLPADL
 TtgC AVEGARVKYSQYQRLVAQDVNSLTVLLGTG--IP-ADLAKPLELDADQLAEVPAGLPSDI
 ArpC AVEGARVKYSQYQRLVAQDVNSLTVLLGTG--IP-ADLAKPLELDADQLAEVPAGLPSDI
 OprM AVEGARATLAQYTRLVAQDQNALVLLLGSG--IP-ANLPQGLGLDQTLLEVPAGLPSDL
 TolC LKEAEKRNLSELLQARLSQDLAREQIRQAQDGHLPDLTASTGISDTSYSGSKTRGAAGT
 : : : : ** : . : * * . : : :

TtgI LLNRPRIRSAEHQLMAANANIGAARAAFFPRISLTASAGSASSDLDGLFNSGSDSWSFAP
 SrpC LLNRPDIRSAEHQLMAANANIGAARAAFFPRISLTASAGSASSDLDGLFNSGSDSWSFAP
 TtgF LLHRPDIRAAEHLLAANANIGAARAAFFPSITLTAAAGTASHELDGLFEGGSLWAFMP
 TtgC LQRRPDIQEAHLLKAANANIGAARAAFFPSISLTANAGSLSPDMGHLLFAGGQGTWLFQF
 ArpC LQRRPDIQEAHLLKAANANIGAARAAFFPSISLTANAGSLSPDMGHLLFSGGQGTWLFQF
 OprM LQRRPDILEAEHQLMAANASIGAARAAFFPSISLTANAGTMSRQLSGLFDAGSGSWLFQF
 TolC QYDDSNMGQNKVGLSFLPIYQGGMVNSQVKQAQYNFVGASEQLESASHRVSVVQTVRSSFN
 . : : * : . . . : . * : . . .

TtgI QISVPIFNAGKLRANLDYAELOKDVGVATYEKSIETAFREVADGLAARGTYGKQLSAQSE
 SrpC QISVPIFNAGKLRANLDYAELOKDVGVATYEKSIQTAFAREVADGLAARGTYGKQLSAQSE
 TtgF RINLPIFTAGRLRGNLDYRNVIKDINVAEYEKSIQTAFAREVADGLAARGTFGEQLQAQRD
 TtgC QINLPIFNAGSLKASLDYSKIQKDINVAKYEKTIQTAFAQEVSDGLAARKTFEEQLQAQRD
 ArpC QINLPIFNAGSLKASLDYSKIQKDINVAKYEKTIQTAFAQEVSDGLAARKTFEEQLQAQRD
 OprM SINLPIFTAGSLRASLDYAKIQKDINVAQYKAIQTAFAQEVADGLAARGTFTEQLQAQRD
 TolC NINASISSINAYKQAVVSAQSSLDAMEAGYSVGTTRTIV-DVLDATTTLYNAKQELANARY
 * . * . : : : * * * . * . : * * . : : *

TtgI LVDNYKAYFSLAQQRDYDQGVDSYLTVLDAQRELFSSQKLLNDQLDQINSEVQLYKALG-
 SrpC LVDNYKAYFSLAQQRDYDQGVDSYLTVLDAQRELFSSQKLLNDQLDQINSEVQLYKALG-
 TtgF LVDNNAQAYYKLAYQRYDEGVDNYLPVLDAQRELFSSQKLLNDQLDQINSEVQLYKALG-
 TtgC LVQANQDYRRLAERRYRIGIDSNLTLFLDAQRNLFSAQQALIGDRLSOLTSEVNLYKALG-

CLUSTAL W (1.74) multiple sequence alignment

```

TtgW      MARKTAAEAKE-TRQRI IDAALEVFVAQGVDPATLDQIARKAGVTRGAVYWHFNGKLEVL
SrpR      MARKTAAEAE-TRQRI IDAALEVFVAQGVSDATLDQIARKAGVTRGAVYWHFNGKLEVL
AcrR      MARKTKQEAQE-TRQHILDVALRLFSQQGVSSSTSLGEIAKAAGVTRGAIYWHFKDKSDLF
TtgR      MVRRTKEEAQE-TRAQI IEAAERAFYKRGVARTTLADIAELAGVTRGAIYWHFNNKAELV
ThnB      MARLTRAETQERNRDKVLDAAAREEFAERGYRDARIDAI AERAGLTRGAVYSNFP GKRALY
MtrR      -MRKTKTEALK-TKEHMLLAALET FYRKGIARTSLNE IAQAAGVTRGALYWHFKNKEDLF
QacR      -----MN-LKDKILGVAKELFIKNGYNATTTGEIVKLSSESSKGNLYYHFKTENLF
           :   :   :   :   . * . * . *   :   * . . :   : * : * : *   :

```

```

TtgW      QAVLASRQH---PLELDFTPDLG---IERSWEAVVAMLDVHSPQSKQFSEILIIY--QG
SrpR      QAVLASRQH---PLELDFTPDLG---IERSWEAVVAMLDVHSPQSKQFSEILIIY--QG
AcrR      SEIWELSES NIGELELEYQAKFPGDPLSVLREILIHVLESTVTEERRLLMEIIFHKCEF
TtgR      QALLDSLHETHDHLARASESEDEVDPLGCMRKL LLLQVFNELVLDARTRRINEILHKKCEF
ThnB      FAVLAALAERVPEGPPPRPVRSGGDALAAFARAWVSRLPPAGDDGPGPARLAMDMPEVI
MtrR      DALFQRICDDIENCIAQDAADAEGGSWTVFRHTLLHFFERLQSNDIHYKFHNILFLKCEH
QacR      LEILNIEES---KWQEQWKKEQIK--CKTNREKIFYLYNELSLTTEYYYYPLQNAIIEFYTE
           :

```

```

TtgW      LDESGLIHNRMVQASDRFLQYIR-----
SrpR      LDESGLIHNRMVQASDRFLQYIHQVLRH-----AVTQGELPINLDLQTSIGVFKG
AcrR      VGemAVVQQAQRNLCLESYDRIEQLKH-----CIEAKMLPADLMTRRAAIIMRG
TtgR      TDDMCEIRQQRQSAVLDCHKGITLALAN-----AVRRGQLPGELDAERA AVAMFA
ThnB      TDAATTRPFAQLLKLDAILLGLALERLEPAGRPARMVRVAEAVLTALHGTAQLAAAAPG
MtrR      TEQNAAVIAIARKHQAIWREKITAVLTE-----AVENQDLADDLDKETAVIFIKS
QacR      YYKTNSINEKMNKLENKYIDAYHVFIFKE-----GNLNGEWCINDVNAVSKIAANA

```

```

TtgW      -----
SrpR      LITGLLYEGLRSKDQQAQIIKVALGSFWALLREPPRFLLCEEAQIKQVKSFE-----
AcrR      YISGLMENWLFAP---QSFDLKKEARDYVAILLEMYLLCPTLRNPATNE-----
TtgR      YVDGLIRRWLLLP---DSVDLLGDVEKWVDTGLDMLRLSPALRK-----
ThnB      FLDPLDAVRVCERLAGLPLDDDPPPAPGLPPVHHVDEPWSPPPATDAVTGDPLPADGEPD
MtrR      TLDGLIWRWFSSG---ESFDLGKTAPRIIGIMMDNLENHPCLRRK-----
QacR      VNGIVTFTHEQNIN---ERIKLMNKFSQIFLNGLSK-----

```

```

TtgW      -----
SrpR      -----
AcrR      -----
TtgR      -----
ThnB      QVVTVLGLHRLEAAEDAVRAAPPDTPVTAVLVTADPGELGALARLSVAELCGCLRQAFPA
MtrR      -----
QacR      -----

```

```

TtgW      -----
SrpR      -----
AcrR      -----
TtgR      -----
ThnB      SARPPLRVVHDPGAFAAAAGVPAVDDRRTETAIRLASARVTARAQGPGAARAVAATPRRG
MtrR      -----
QacR      -----

```


CLUSTAL W (1.74) multiple sequence alignment

```

TtgV -----MNQSDENIGKAGGIQVIAR
SrpS -----MNQSDENVGKAGGIQVIAR
TtgT -----MSDSEESSARHGGIQVIAR
SepR -----MSDSEESSARHGGIQVIAR
KdgR MIFNRSVTYSNARLPYSKRSLYTKTRVLFLLKQKILSRVTTKMAIADLDKQPDVSSVLK
PcaR -----MSDETLVNDPVNPEPARPASAAMAPPIVASPAKRIQAFTGDPDFMTSLAR
IclR -----MKMISTIQQKETVMVAPIPAKRGRKPAVATAPATGQVQSLTR
PcaU -----MWSNMDDKKVKEEKILHNSTNKKIIRHEDFVAGISK
AttJ -----MGQRGQVCQGKCMMAEDQOSSQISDTVPALRR

```

```

TtgV AASIMRALGSHPHGLSLAAIAQLVGLPRSTVQRI INALEEEFLVEALGPAGGFRLGPAFG
SrpS AASIMRALGSHPHGLSLAAIAQLVGLPRSTVQRI INALEEEFLVEALGPAGGFRLGPAFG
TtgT AASIMRALGSHPHGLSLAAIAQLVGLPRSTVQRI INALGAEHLVEALGPSGGFRLGPAFG
SepR AASIMRALGSHPHGLSLAAIAQLVGLPRSTVQRI INALGAEHLVEALGPSGGFRLGPAFG
KdgR VFGILQALG-EEREIGITELSQVMMSKSTVYRFLQTMKSLGYVAQEGESEKYSLTLKLF
PcaR GLAVIQAFQERKRHLTIAQISHRTEIPRAAVRRCLHTLIKLYATS DGR--TYSLLPKVL
IclR GLKLEWIAESNGSVALTELAQQAGLPNSTTHRLTTMQQQGFVRQV GELGHWAIGAHAF
PcaU GMAILDSFGTDRHRLNITMAAEKTMTRAAARRHLLTLEYL GYLES DGH--YFYLTPKIL
AttJ AVRILDLVAGSPRDLTAAELTRFLDLPKSSAHGLL-AVMTELDLLARSADGTLRIGPHSL

```

```

TtgV QLIN--QAQTDILSLVKPYLRSLAEELDESVC LASLAGD--KIYVLDR-IVSERELRVV-
SrpS QLIN--QAQSDILSLVKPYLRSLAEELDESVC LASLAGD--KIYVLDR-IVSERELRVV-
TtgT RLIT--QAQTDIISLVRPHLIALSEQVYESTCLLSLSGE--KIYVLDR-VVAERELRVV-
SepR RLIT--QAQTDIISLVRPHLIALSEQVYESTCLLSLSGE--KIYVLDR-VVAERELRVV-
KdgR ELGAKALQNVDLIRSADIQMRELSALTRET IHLGALDED--SIVYIHK-IDSMYNLRMY-
PcaR TLGHAYLSSTPLAISAQPYLDRISDQLHEAANMATLEGD--DILYIARSATVERLISVD-
IclR MVGSSFLQSRNLLAIVHPILRNLMEESGETVNMAVLDQSDHEAIIIDQ-VQCTHLMRMS-
PcaU KFSGSYLGGAQLPKISQPLLNLTTQTSLIYSVMVLDGY--EAITIARSAHQQTDRVNP
AttJ RWANGFLSHLDIVSTFNDHLAQRHLDLPYTVTLTVREGG--EVVYIGC-RNSAQPLGHT-

```

```

TtgV --FPIGINVPAAATAAGKVLLAALPDETLQAALG-EQLPVLTSNTLG-RKALVKQLSEVR
SrpS --FPIGINVPAAATAAGKVLLAALPDETLQAALG-EQLPVFTSNTLR-RKALVKQLSEVR
TtgT --FPIGIHVPATAVSGGKVLLAELSEEAAQQALLP-DPLPVCTPRSVA-REALLEQLKTIK
SepR --FPIGIHVPATAVSGGKVLLAELSEEAAQQALLP-DPLPVCTPRSVA-REALLEQLKTIK
KdgR --SRIGRRNPLHSTAIGKVLLAWRDREEVKEILSQVEFKRTTVHTIGSTEELLPQLDLVR
PcaR --LSVGGRLPAYCTSMGRILLAAMDDTSLREYLGRADLKARTSRTLHDPELFCIQQVR
IclR --APIGGKLPMHASGAGKAFLAQLSEEQVTKLLHRKGLHAYTHATLVSPVHLKEDLAQTR
PcaU YGLHLGNRLPAHATSAGKILLAYLDDHAQQEWLNQYPLQRLTKYTYTNNIDFLRLLSEIK
AttJ --FRIGMRLPAPFTATGKILLSDLGPGELRMLFSQFPQPLTSRSVAG-LSQLEEEELALTR

```

```

TtgV QSGVASDLDEHIDGVCSFATLLD TYLGYYS--LAI VMPSSRAS-KQS-DLIKKALLQSKL
SrpS QSGFASDLDEHIDGVCSFATLLD TYLGYYS--LAV VMPSSRAS-KQS-DLIKKALLQSKQ
TtgT SGGVADDHDEYIEGLCSYSVLLD TYLGHYS--VSIVAPNSRAT-TRV-AEFQQALQACKQ
SepR SGGVADDHDEYIEWLCSYSVLLD TYLGHYS--VSIVAPNSRAT-TRV-AEFQQALQACKQ
KdgR QQGYGEDNEEQEGLRCIAVPVDFRFGVVIAGLSISFPTIRFS-EDNKHEYVAMLHTAAR
PcaR AQGWCVVDQELEQGLRSIAVPIYDASGQVLAALNVSTHVGRVTRSELEQRFLPILLAASR
IclR KRGYSFDDEEHALGLRCLAACIFDEHREPFAAISISGPISRIT-DDRVTEFGAMVIKAAK
PcaU EQGWCYSSEEHELGVHALAVPIYGQQSRVVAALNIVSPTMRTTKEYLIQHILPLLQETAR
AttJ ARGYSIDDGQIREGM-----

```

```

TtgV NIERAIGRASKKAP-
SrpS NIERAIGRASKKAP-
TtgT NIEVTIGRAPREFAG
SepR NIEVTIGRAPREFAG
KdgR NISDQMGYHDYPF--
PcaR DLCHQLFG-----
IclR EVTLAYGGMR-----
PcaU ELRNIL-----
AttJ -----

```