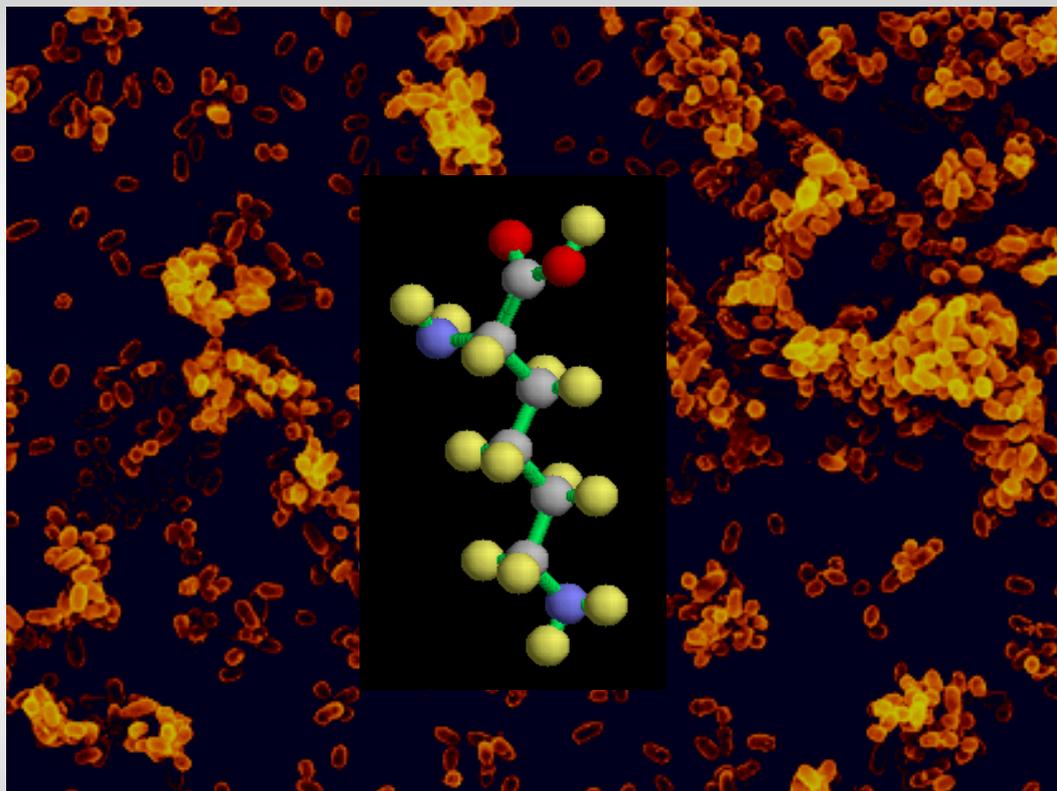


“CARACTERIZACIÓN DE LAS RUTAS DE CATABOLISMO DE L-LISINA EN *Pseudomonas putida* KT2440”



Editor: Editorial de la Universidad de Granada
Autor: Olga María Revelles López
D.L.: Gr. 790 - 2005
ISBN: 84-338-3385-5

CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS
ESTACIÓN EXPERIMENTAL DEL ZAIDÍN.



UNIVERSIDAD DE GRANADA
FACULTAD DE CIENCIAS

**“CARACTERIZACIÓN DE LAS
RUTAS DE CATABOLISMO DE L-
LISINA EN *Pseudomonas putida*
KT2440”**

TESIS DOCTORAL

OLGA M^a REVELLES LÓPEZ

2005

**“CARACTERIZACIÓN DE LAS RUTAS
DE CATABOLISMO DE L-LISINA EN
Pseudomonas putida KT2440”**

**MEMORIA QUE PRESENTA LA LICENCIADA
EN BIOLOGÍA, OLGA M^a REVELLES LÓPER,
PARA ASPIRAR AL TÍTULO DE DOCTORA.**

Fdo.: Olga M^a Revelles López.

V^oB^o del Director

V^oB^o del Director

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

**Fdo.: Manuel Espinosa-Urgel
Doctor en Biología
Contratado Ramón y Cajal**

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

A mi familia.

Agradecimientos

Antes de finalizar esta Tesis Doctoral quisiera mostrar mi más sincero agradecimiento a todas aquellas personas que de un modo u otro han contribuido al desarrollo de la misma.

En primer lugar quisiera agradecer a mis directores, Dr. Juan Luis Ramos y Manuel Espinosa-Urgel, su excelente labor de dirección, así como, el haber sido mis lazarillos científicos durante estos años de trabajo. A Juan Luis Ramos por haberme permitido formar parte de su grupo de trabajo y por su confianza mostrada durante estos años, así como, por su inagotable capacidad de trabajo de la que todos debemos aprender. A Manuel Espinosa siempre dispuesto a ayudar y a escuchar. Gracias por haber dirigido mis pasos por el mundo de la Biología Molecular.

A Nené, Ana, Dietmar, Javi, Isabel y Antonia que han vivido más de cerca estos años de trabajo con sus penas y alegrías, y han sido algo más que “compañeros de trabajo”. A la Dra. Ana Segura por estar siempre dispuesta a ayudar con una sonrisa. En definitiva al grupo de Degradación de Tóxicos Orgánicos, un excelente lugar de trabajo y de una elevada calidad científica, a todos vosotros por haberme aceptado durante estos años. Gracias.

Al Dr. Soeren Molin por brindarme la oportunidad de trabajar en el Departamento de Microbiología, en la Universidad Técnica de Dinamarca. Y al Dr. Uwe Sauer mi más sincero agradecimiento por haberme permitido trabajar en el Instituto de Biotecnología en Zürich. Han sido dos experiencias enriquecedoras no sólo en el plano profesional sino también en el personal. Gracias.

A Manuel González quisiera agradecer su inestimable paciencia y el haberme apoyado en los momentos más difíciles. Gracias haber sido mi báculo durante este tiempo.

Finalmente, y no por ello menos importante, a mi familia a quienes les debo todo.

ÍNDICE

ÍNDICE	i
ABREVIATURAS	vii
INTRODUCCIÓN	1
1. BIOLOGÍA DE <i>Pseudomonas</i> .	3
1.2 Breve Descripción de <i>P. putida</i> KT2440.	4
2. RIZOSFERA.	6
3. CATABOLISMO DE L-LISINA.	10
3.1 Catabolismo de lisina en plantas y animales.	11
3.2 Catabolismo de lisina en hongos y levaduras.	16
3.3 Catabolismo de lisina en bacterias	18
3.4 Catabolismo de L-lisina en <i>Pseudomonas</i> .	23
a) Catabolismo de lisina: Ruta monooxigenasa y de la cadaverina.	25
b) Catabolismo de L-lisina: Ruta de la D-lisina y/o L-pipecolato.	27
4. TRANSPORTE DE AMINOÁCIDOS BÁSICOS EN BACTERIAS.	30
OBJETIVOS	35
MATERIALES Y MÉTODOS	39
1. CEPAS BACTERIANAS Y SU CONSERVACIÓN.	41
1.1 Estirpes bacterianas empleadas	41
1.2 Conservación de estirpes bacterianas	42
2. PLÁSMIDOS.	43
3. CONDICIONES Y MEDIOS DE CULTIVO:	49
3.1 Medios de cultivo.	49
3.2 Aminoácidos y derivados.	50
3.3 Antibióticos.	51
3.4 Condiciones de cultivo.	51
4. CURVAS DE CRECIMIENTO	51
5. TRANSFERENCIA DE PLÁSMIDOS.	52
5.1 Transferencia por conjugación.	52
5.2 Transferencia por choque térmico.	53
5.2.1 Preparación de células competentes	53
5.2.2 Transformación	53
5.3 Transferencia por electroporación.	54
5.3.1 Preparación de células electrocompetentes	54
5.3.2 Electroporación	54
6. AISLAMIENTO DE ADN	55

6.1 Aislamiento de ADN plasmídico	55
6.2 Aislamiento de ADN cromosómico	55
7. TÉCNICAS COMUNES DE MANIPULACIÓN DE ADN.	56
7.1 Determinación de la concentración de ADN y ARN	56
7.2 Digestión de ADN con enzimas de restricción.	56
7.3 Desfosforilación de ADN con fosfatasa alcalina	57
7.4 Tratamiento de ADN con el fragmento Klenow de la ADN polimerasa I.	57
7.5 Electroforesis de ADN y ARN.	57
7.6 Recuperación de fragmentos de ADN de los geles de agarosa.	58
7.7 Secuenciación de ADN.	58
7.8 Reacción de amplificación en cadena con ADN polimerasa I termorresistente (“PCR”).	59
7.9 Reacción de amplificación en cadena con ADN polimerasa termorresistente acoplada a una reacción de transcripción reversa (RT-PCR).	60
7.10 PCR arbitrarias.	60
8. EXTRACCIÓN DE ARN.	61
9. TRANSFERENCIA DE ADN A MEMBRANA E HIBRIDACIÓN (“Southern blotting”).	62
9.1 Transferencia de ADN por capilaridad.	62
9.2. Marcaje no radioactivo de ADN lineal.	63
9.3 Prehibridación e hibridación.	63
9.4 Reacción inmunológica.	64
10. EXTENSIÓN REVERSA A PARTIR DE UN CEBADOR.	64
10.1 Marcaje de cebadores.	64
10.2 Reacción de extensión.	65
10.3 Separación de las cadenas extendidas de ADNc mediante electroforesis.	66
11. MEDIDA DE LA ACTIVIDAD β -GALACTOSIDASA.	67
12. MUTAGÉNESIS.	68
12.1 Mutagénesis por transposición.	68
12.2 Mutagénesis dirigida.	68
13. DETECCIÓN DE LA LUMINISCENCIA MEDIANTE UNA CÁMARA DETECTORA O CONTADORA DE FOTONES.	69
14. EXPERIMENTOS DE TRANSPORTE CON LISINA MARCADA CON ^{14}C .	70
15. MÉTODOS ANALÍTICOS.	70
15.1 Determinación de la producción de CO_2 .	70
15.2 Determinación de proteína.	71
16. ANÁLISIS DE INTERMEDIARIOS METABÓLICOS DE LA DEGRADACIÓN DE L-LISINA.	71
16.1 Obtención de metabolitos intracelulares de cultivos bacterianos.	71
16.2 Cromatografía de gases y espectrometría de masas.	71
16.3 Distribución del [^{13}C , ^{15}N] en el cultivo bacteriano a partir de [^{13}C , ^{15}N] L-lisina.	72
17. ANÁLISIS INFORMÁTICOS DE SECUENCIAS.	72

RESULTADOS	75
Capítulo I: CARACTERIZACIÓN DEL OPERÓN <i>davD-davT</i> IMPLICADO EN EL CATABOLISMO DE LISINA.	75
RESUMEN	75
1. ESTUDIO DE LA ORGANIZACIÓN TRANSCRIPCIONAL DE LOS GENES <i>davD-davT</i> DE <i>Pseudomonas putida</i> KT2440.	76
2. PATRÓN DE EXPRESIÓN DEL PROMOTOR DEL OPERÓN <i>davD-davT</i> .	79
2.1 Análisis de fusiones transcripcionales de los genes <i>davD-davT</i> de <i>P. putida</i> KT2440.	79
2.2 Identificación y caracterización del promotor de <i>davD-davT</i> .	80
2.3 Análisis de la inducción del operón <i>davDT</i> en presencia de distintos intermediarios del catabolismo de lisina.	83
3. REGULACIÓN DEL OPERÓN <i>davD-davT</i> .	84
3.1 Análisis de la participación de distintos factores transcripcionales en la expresión del operón <i>davD-davT</i> .	84
3.2 Búsqueda de factores que afectan la inducción del operón <i>davDT</i> .	85
3.2.1 Regulador de dos componentes.	85
3.2.2 Identificación de genes que influyen en la expresión de <i>davDT</i> .	87
3.2.3 Localización de la inserción del transposón miniTn5-Gm en los mutantes afectados en la inducción del operón <i>davDT</i> .	88
3.2.4 Secuenciación del ADN flanqueante al miniTn5 en cada uno de los mutantes derivados de rei2.	89
3.2.5 Descripción de los sistemas de transporte de L-lisina de tipo ABC en <i>P. putida</i> KT2440.	90
3.2.6 Transporte de [U- ¹⁴ C] L-lisina en los mutantes rei2-6 y rei2-7	92
Capítulo II: MULTIPLICIDAD DE RUTAS PARA EL CATABOLISMO DE LISINA E INTERCONEXIÓN DE LA MISMA EN <i>P. putida</i> KT2440.	95
RESUMEN	95
4. CARACTERIZACIÓN GLOBAL DE LA RUTA DEL CATABOLISMO DE L-LISINA EN KT2440.	96
4.1 El catabolismo de L-lisina implica al menos tres rutas.	96
4.2 Identificación de los genes <i>davA</i> y <i>davB</i> , implicados en la ruta oxidativa.	100
4.2.1 Caracterización de una hidrolasa codificada por el gen PP0382.	100
4.2.1.1 Construcción de un mutante <i>davA</i> (PP0382) de la cepa <i>P. putida</i> KT2440.	101
4.2.1.2 Caracterización fenotípica del mutante <i>davA</i> .	102
4.2.2 Construcción de un mutante afectado en el gen <i>davB</i> (PP0382).	104
4.2.3 Estudio de la organización transcripcional de los genes <i>davA-davB</i> de <i>P. putida</i> KT2440.	106
4.2.4 Análisis de la inducción del operón <i>davA-davB</i> .	108

4.2.5 Producción de CO ₂ en <i>P. putida</i> KT2440 y en su derivado isogénico <i>davB</i> .	108
4.2.6 Análisis de los metabolitos intracelulares en los mutantes <i>davA</i> y <i>rei2</i> .	109
4.2.7 Complementación de los mutantes <i>davA</i> y <i>davB</i> .	111
4.3 Ruta de la cadaverina. Lisina decarboxilasa.	112
4.3.1 Inactivación del gen PP4140.	114
4.3.2 Identificación de un fenotipo asociado a la mutación en el gen <i>ldc</i> .	114
4.3.3 Análisis de la acumulación de metabolitos intracelulares en <i>ldc</i> .	116
4.3.4 Expresión del promotor <i>davDT</i> en los mutantes afectados en las rutas que conducen a δ -aminovalérico.	117
4.4 Ruta del pipecolato.	118
4.4.1 Aislamiento de genes implicados en el catabolismo de L-lisina.	119
4.4.2 Caracterización de los mutantes deficientes en el catabolismo de L-lisina en <i>P. putida</i> KT2440: Mutantes afectados en el catabolismo del ácido pipecólico.	119
4.4.3 Identificación de los genes alterados en los mutantes <i>lys1-</i> , <i>lys2-</i> y <i>lys5-</i> .	123
4.4.3.1 Determinación de la localización del miniTn5 mediante hibridación.	123
4.4.3.2 Análisis de la secuenciación de ADN adyacente al miniTn5 en el mutante <i>lys1-</i> y <i>lys5-</i> .	123
4.4.3.3 Estudio de la organización transcripcional de los genes PP5257 y PP5258.	125
4.4.3.4 Análisis de la secuencia de ADN adyacente al miniTn5 en el mutante <i>lys2-</i> .	127
4.4.3.5 Análisis de la organización transcripcional del gen PP3596.	127
4.4.4 Análisis de la secuencia de ADN adyacente al miniTn5 en el mutante <i>lys4-</i> .	128
4.4.5 Acumulación de metabolitos intracelulares en los mutantes <i>lys5-</i> (<i>amaB</i>) y <i>lys1-</i> (<i>amaA</i>).	128
4.4.6 Estudio de la expresión del promotor del operón <i>davD-davT</i> en los distintos mutantes <i>lys1-</i> (<i>amaA</i>), <i>lys2-</i> y <i>lys5-</i> (<i>amaB</i>).	130
4.4.7 Complementación de la mutación de <i>P. putida</i> KT2440 <i>amaB</i> .	131
4.4.8 Transporte de L-lisina en <i>lys2-</i> .	133
4.5 Las dos rutas principales de degradación de L-lisina se encuentran conectadas a nivel del ácido glutámico.	134
DISCUSIÓN	137
1. ORGANIZACIÓN TRANSCRIPCIONAL DE LOS GENES <i>davDT</i> EN <i>P. putida</i> KT2440.	140

1.1 Análisis de la inducción del operón <i>davDT</i> en presencia de distintos intermediarios del catabolismo de L-lisina.	142
1.2 Búsqueda de factores que afectan la inducción del operón <i>davDT</i> .	142
2. CARACTERIZACIÓN GLOBAL DE LA RUTA DEL CATABOLISMO DE L-LISINA EN <i>Pseudomonas putida</i> .	148
2.1 El catabolismo de L-lisina implica al menos tres rutas.	148
2.2 Ruta Monooxidativa y de la Cadaverina.	148
2.3 Ruta del L-pipecolato.	151
3. LAS DOS RUTAS PRINCIPALES DE DEGRADACIÓN DE L-LISINA SE ENCUENTRAN CONECTADAS A NIVEL DEL ÁCIDO GLUTÁRICO.	154
4. ORGANIZACIÓN CROMOSÓMICA DE LOS GENES DEL CATABOLISMO DE L-LISINA.	159
5. DISTRIBUCIÓN DE LAS RUTA DEGRADACIÓN DE LISINA EN <i>Pseudomonas</i> .	160
CONCLUSIONES	163
BIBLIOGRAFÍA	167

ABREVIATURAS

ADNasa	desoxinucleasa	LB	Luria-Bertani
ADNc	ADN complementario	mg	miligramos
Ap	ampicilina	min	minutos
ARNasa	ribonucleasa	ml	mililitros
ARNm	ARN mensajero	µl	microlitros
ATP	adenosín trifosfato	ONPG	o-nitrofenil-β-D-galactopiranosido
Cm	cloramfenicol	PCR	reacción en cadena de la polimerasa
cpm	desintegraciones por minuto	pb	pares de bases
DEPC	dietil pirocarbonato	rpm	revoluciones por minuto
DMSO	dimetilsulfóxido	p/v	peso/volumen
dNTPs	desoxinucleótidos	RT-PCR	reacción en cadena de la polimerasa acoplada a una reacción de transcripción reversa
DO₆₆₀	densidad óptica media λ de 660 nm	SDS	dodecil sulfato sódico
DTT	ditiotreitól	seg	segundo(s)
EDTA	ácido etilendiaminotetraacético	SMC	sitio de múltiple clonaje
Gm	gentamicina	TEMED	N,N,N,N,-tetrametiletildiamina
h	horas	Tc	tetraciclina
H₂O_d	agua desionizada	TCA	tricarboxílicos
H₂O_{DEPC}	agua desionizada tratada con DEPC	Tris	tris(hidroximetil)aminometano
IPTC	isopropil-β-D-tiogalactopiranosido	UFC	unidades formadoras de colonias
kb	kilobases	v/v	volumen/volumen
Km	kanamicina	X-gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-galactopiranosido
Km	constante de Michaelis-Menten		
MATAB	bromuro de alquil-trimetilamonio		

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

1. BIOLOGÍA DE *Pseudomonas*.

El género *Pseudomonas* fue descrito por Migula (1894) en dos líneas como “Células con estructuras polares móviles. La formación de esporas se da en algunas especies, pero es un fenómeno raro”. Esta definición fue bastante aceptada durante largo tiempo, dando origen a que numerosas especies incluidas en otros géneros fueran asignadas al género *Pseudomonas*. Hasta los años 60 los intentos de clasificación de las bacterias se centraban en características morfológicas o fisiológicas (Palleroni 2003). Según la definición que aparece en la edición del Manual Bergey de Bacteriología Sistemática, las *Pseudomonas* son: “células en forma de bastón, curvadas o derechas, pero no helicoidales, de entre 0,5-0,1 μm de diámetro por 1,5-5,0 μm de longitud”. Sin embargo, con el desarrollo de técnicas tales como hibridación ADN/ADN, estudios nutricionales o más recientemente hibridación ARNr/ADN (Palleroni 1973) permitieron una clara división de las especies de *Pseudomonas*. Siguiendo esta última clasificación Palleroni propuso cinco grupos taxonómicos (ARN-I a ARN-V). Más tarde la secuenciación del ARNr 16S reflejó la diversidad de estos grupos. El grupo ARN-I, dentro de la subclase- γ de *Proteobacterias* (De Vos et al. ; Woese et al. 1985) fue reconocido como el que engloba a las verdaderas *Pseudomonas* (Krieg & Garrity 2001).

La mayoría de las especies no acumulan gránulos de poli- β -hidroxibutirato, pero pueden formar poli-hidroxialcanoatos cuya longitud es mayor de cuatro carbonos cuando las células se cultivan en alcanos o gluconato. No se conocen estados de células viables que no sean cultivables. Las *Pseudomonas* son gram-negativas, 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. La mayoría de las especies no pueden crecer bajo condiciones ácidas ($\text{pH} \leq 4,5$), y no requieren factores de crecimiento. Pueden ser oxidasas positivas o negativas, son catalasas positivas 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. El porcentaje de contenido en G-C del ADN está entre 58-69% en *Pseudomonas*.

El espectro nutricional de cada especie es característico presentando una menor variabilidad entre cepas de una misma especie. Este grupo de bacterias se caracteriza por su extrema versatilidad metabólica (Stanier et al. 1966; Palleroni 1986). Entre los compuestos orgánicos que son capaces de metabolizar se encuentran hidratos de carbono, ácidos alifáticos, aminas, amidas, aminoácidos, compuestos aromáticos y alcoholes.

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 et al. 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. 2002), *P. syringae* pv. tomato (Buell et al. 2003) 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.

Actualmente se discute la integridad como especie única de cepas que conforman las *Pseudomonas putida*, puesto que análisis de hibridación ADN-ADN entre diversas cepas de *P. putida*, por ejemplo *P. putida* DSM291^T y *P. putida* KT2440, dan un porcentaje de similitud de un 50 % (Regenhardt et al. 2002).

1.1 Breve Descripción de *P. putida* KT2440.

Pseudomonas putida KT2440, cepa de estudio de este trabajo, es una bacteria Gram negativa perteneciente al grupo de las *Pseudomonas* “fluorescentes”, denominadas así por la producción de pigmentos que emiten fluorescencia. Sus primeros estudios se remontan al año 1963 en Japón, donde fue aislada por Hosakawa (Nozaki et al. 1963), identificada como una cepa capaz de degradar meta-toluenos, de donde derivó el nombre mt-2, cepa parental de KT2440. En principio fue incluida dentro la especie *Pseudomonas arvilla* y no fue hasta 1974 cuando (Williams & Murray 1974) se introdujo dentro del especie *Pseudomonas putida*. En 1975 se comprobó que la cepa mt-2 portaba el plásmido TOL, el cual incluye los genes que codifican las enzimas

necesarias para la degradación de toluenos y xilenos (Worsey & Williams 1975). En 1981 aparece *Pseudomonas putida* KT2440 (Bagdasarian et al. 1981) como un derivado de mt-2 curado del plásmido pWW0 y presuntamente deficiente en el mecanismo de restricción de ADN exógeno, lo que hace que esta cepa sea ampliamente utilizada para la expansión de rutas catabólicas con fines degradativos (Bagdasarian & Timmis 1982; Ramos et al. 1994) y como hospedador en la clonación y expresión de genes heterólogos para su utilización en procesos de biotransformación de compuestos químicos con valor añadido (Delgado et al. 1992; Kraak et al. 1997; Kellerhals et al. 1999) o de interés farmacológico (Tan et al. 1997).

El 80% del cromosoma de *P. putida* KT2440 se caracteriza por su alto contenido en GC (63,3%), sin embargo, se han descrito 105 islas genómicas con un porcentaje distinto en GC (Weinel et al. 2002). Estas islas genómicas están principalmente implicadas en la captación y degradación de compuestos orgánicos, transporte de iones, síntesis y secreción de metabolitos secundarios, siendo las principales responsables de la elevada versatilidad metabólica presente en *P. putida*. En numerosas ocasiones dicha versatilidad metabólica se encuentra mantenida en plásmidos encargados de canalizar el sustrato hacia el metabolismo central. Por ejemplo, el plásmido TOL pWW0 (Williams & Murray 1974), el plásmido NAH7 (Dunn & Gunsalus 1973) y el plásmido CAM (Rheinwald et al. 1973) codifican los genes implicados en el catabolismo de tolueno/xilenos, naftaleno y alcanfor, respectivamente. En el cromosoma se han descrito rutas de degradación de compuestos orgánicos que en ocasiones aparecen como productos naturales o como metabolitos resultantes de la degradación parcial de lignina por hongos. Todas estas características contribuyen al espectro nutricional de esta especie, permitiéndole reproducirse en distintos ambientes y metabolizar una amplia gama de compuestos naturales y sintéticos.

Dentro de la especie *P. putida* no se conoce ninguna cepa que sea patógena de plantas o animales. Esto hace que actualmente se esté explotando en el desarrollo de numerosas técnicas biotecnológicas, como por ejemplo, el diseño de nuevas rutas catabólicas destinadas a la degradación de compuestos contaminantes (Ramos et al., 1986; Rojo et al. 1987; Ramos et al. 1987; Erb et al. 1997), producción de intermediarios en la síntesis química de moléculas complejas (Wubbolts & Timmis 1990) o en el mejoramiento de la calidad de combustible fósil, por desulfurización (Galan et al., 2000). A su vez, es un buen colonizador de rizosfera de maíz, trigo, fresa,

caña de azúcar y espinacas (Espinosa-Urgel et al. 2002). Hoy día, se está usando en el desarrollo de biopesticidas y como promotoras del crecimiento de plantas.

La ubicuidad de *P. putida* refleja su elevada capacidad para adaptarse a una enorme variedad de condiciones físico-químicas presentes en los distintos hábitats donde vive. Esta habilidad representa la capacidad que tiene la cepa de integrar las señales recibidas del medio extracelular con el estado fisiológico celular, conllevando la activación de una apropiada y compleja red de regulación que controla el metabolismo celular (Regenhardt et al. 2002).

2. RIZOSFERA.

Las bacterias del género *Pseudomonas*, y entre ellas *P. putida* KT2440, colonizan la superficie de la raíz de las plantas (Rodríguez-Herva et al. 1999; Molina et al. 2000) y el suelo que rodea a la raíz, nicho ecológico conocido como rizosfera. Este término fue introducido por Hiltner (Hiltner 1904) en 1904, definiéndola como la región del suelo en contacto directo con la raíz, estando bajo la influencia biológica y física de la misma. Éste, a su vez, se divide en “rizoplana” (superficie de la raíz), endorizosfera (partes internas de la raíz) y ectorizosfera (capa fina de tierra y suelo adherida a la raíz) (Lugtenberg 2004). Se trata de un entorno complejo y de elevada actividad metabólica, rico en nutrientes, donde aparecen aminoácidos, proteínas, ácidos grasos, flavonoides, hormonas, ácidos orgánicos, polisacáridos, compuestos orgánicos fosforados, purinas, pirimidinas, esteroides, azúcares incluyendo oligosacáridos, vitaminas y compuestos indefinidos que inhiben o estimulan el crecimiento de hongos, bacterias y nematodos (Curl & Truelove 1986; Lugtenberg et al. 1999; Lugtenberg & Dekkers 1999). Aproximadamente alrededor de un 20% del peso seco de la planta se libera a través de la raíz en forma de mucílagos, lisado, células desprendidas de la raíz, entre otros, que constituyen lo que se denomina como exudados de raíz. La naturaleza de estos compuestos y su cantidad no sólo varía de unas plantas a otras, sino que, dentro de una misma planta puede variar en función de la edad, estado fisiológico, así como, de las condiciones ambientales (Rovira 1969; Barber & Lynch 1977). En el caso del tomate se ha identificado la composición de exudado de raíz, como se muestra en la Tabla I.1 (Lugtenberg 2004), donde los ácidos orgánicos constituyen la fracción más importante, siendo el más abundante el citrato.

Tabla I.1: Concentración estimada (μM) en exudado de raíz de tomate para los ácidos orgánicos, azúcares y aminoácidos identificados.

Ácidos orgánicos		Azúcares		Aminoácidos	
Citrato	133	Glucosa	20	Glutamato	9
Málico	57	Xylosa	18	Aspártico	8
Láctico	56	Fructosa	7	Leucina	5
Succínico	32	Maltosa	5	Isoleucina	5
Oxálico	31	Sucrosa	4	Lisina	4
Piruvato	23	Ribosa	2		
Piroglutámico	5				

Análisis de los ácidos orgánicos y azúcares presentes en los exudados de césped, revelan que entre los ácidos orgánicos, el citrato y succinato son los más abundantes, mientras que en la fracción azucarada, lo son la fructosa y la glucosa (Kuiper et al. 2002). Estos datos son, por tanto, muy similares a los obtenidos para tomate. Cabe destacar que el análisis de los exudados de raíz tiene lugar *in vitro* dejando crecer la raíz sobre una solución isotónica. De tal modo, que no se sabe en qué medida esto es similar a lo que tendría que estar ocurriendo en el campo abierto donde la raíz se encuentra sometida a numerosos factores físico-químicos.

Determinados compuestos presentes en los exudados, a bajas concentraciones, actúan como quimioatrayentes para las bacterias que habitan la rizosfera. Así, el benzoato a concentración de 10^{-9} a 10^{-12} M atrae a especies de *Azospirillum* (Lopez-de-Victoria & Lovell 1993), la luteolina (10^{-9} M) atrae a *Agrobacterium tumefaciens* y *Rhizobium meliloti* (Caetano-Anolles et al. 1988; Bauer & Caetano-Anollés 1991; Dharmatilake & Bauer 1992). Ciertos aminoácidos (glutamato, treonina, serina, cisteína y arginina), a elevadas concentraciones (10^{-2} a 10^{-3} M) atraen a ciertas especies de *Pseudomonas*, como por ejemplo, *P. lachrymans* (Chet et al. 1973) y *P. aeruginosa* (Nikata et al. 1992).

El entorno rizosférico es altamente complejo con una elevada densidad microbiana, del orden de 10^9 células por g de suelo o raíz (Curl & Truelove 1986; Campbell & Greaves 1990); lo que supone cien a mil veces mayor, el número de microorganismos, al existente en el suelo no rizosférico. Aparecen, entre otros, nematodos, hongos y bacterias, aunque, el 95% de los microorganismos suelen ser no cultivables (Kowalchuk et al. 2002). Dentro de los microorganismos cultivables el 30-

Introducción

90% lo representan bacterias del género *Pseudomonas* (Vancura 1980). Numerosos factores físicos, como el tipo de suelo, pH, oxígeno y agua, afectan a la población microbiana en las rizosfera. Los microorganismos no se distribuyen de una forma uniforme a lo largo de la raíz, encontrándose restringidos al 6% del total de la superficie de la misma (Newman & Bowen 1974; Foster & Rovira 1976; Foster 1981; Foster 1982; Fukui et al. 1994).

Las interacciones plantas-microorganismos pueden ser de diferente tipo. Entre éstas, cabe destacar la importancia de los patógenos vegetales, responsables de la pérdida de hasta un 30% de las cosechas anuales. Hasta el momento, se han descrito al menos 120 géneros de hongos y 8 géneros de bacterias patógenos como *Pseudomonas*, *Erwinia* y *Xanthomonas*, entre otros. Determinados compuestos presentes en el exudado de maíz contribuyen al desarrollo de la respuesta infecciosa. Por ejemplo, los genes implicados en la virulencia (*vir*) de *Agrobacterium tumefaciens* se inducen por acetosiringonas (Melchers et al. 1989; Winans 1991; Winans 1992), los genes responsables de la reacción hipersensible y patogenicidad de *Erwinia amilovora* (Wei et al. 1992) y *Pseudomonas solanacearum* (Arlat et al. 1992) se inducen por un amplio espectro de compuestos presentes en exudado de maíz. Por otro lado, existe otro tipo de interacción que es beneficiosa para la planta, y donde la presencia de determinados compuestos también es importante. La expresión de los genes *nod* implicados en la nodulación de especies de *Rhizobium* son inducidos por flavonoides, vainilla e isovainilla (Lestrangle et al. 1990), entre otros.

Actualmente se propone el uso de estos microorganismos beneficiosos para la planta en el control de plagas como métodos menos agresivos que los pesticidas, ampliamente usados. Algunas bacterias promueven el crecimiento de las plantas, por ejemplo, facilitando la captación de nutrientes o produciendo fitohormonas (*Pseudomonas*, *Serratia*, *Azospirillum* y/o *Bacillus*). Otras actúan como agentes de control biológico (Montesinos et al. 2002) produciendo, por ejemplo, antifúngicos (Lugtenberg et al. 1999). No obstante como paso previo, es necesario que tenga lugar una efectiva colonización por parte del microorganismo en cuestión. Dicho proceso requiere el establecimiento del microorganismo en la raíz emergente, multiplicación del mismo y su posterior establecimiento (Kloepper et al. 1988).

Cada vez son más numerosos los estudios destinados al conocimiento de los mecanismos moleculares que operan en la interacción planta-microorganismo. La

rizosfera es un hábitat complejo donde existen fuentes de carbono y/o nitrógeno alternativas que conllevan que determinadas rutas, del microorganismo en cuestión, estén funcionando mientras que por el contrario, otras estén siendo inhibidas. Por ejemplo, la ruta de degradación de PHA está inhibida por exudado de raíz en *Pseudomonas putida* (Miya & Firestone 2000). En *P. fluorescens* se ha comprobado la expresión de genes implicados en el transporte y metabolismo de azúcares, transporte de aminoácidos, secreción y de respuesta a estrés oxidativo (Rainey 1999). En *P. putida* los genes implicados en la aglutinación y adhesión a raíz (*aggA*) se inducen por un amplio espectro de compuestos y en función del estado fisiológico de la planta (Buell & Anderson 1993).

Existe un interés especial por *P. putida* KT2440 no sólo por su versatilidad metabólica, como se indicó al comienzo de esta Introducción, sino porque además, posee la capacidad de colonizar la rizosfera de plantas a una alta densidad celular (Ramos et al. 2000). No obstante, los estudios realizados al respecto son limitados. Entre ellos, cabe destacar los realizados por Vílchez y colaboradores (2000), donde se demostró que los genes implicados en el catabolismo de prolina, *putA* y *putC*, se inducen por exudados de maíz. Los aminoácidos constituyen una fracción importante del total de los exudados de raíz, por ejemplo en *Brassica napus* pueden alcanzar el 60-85% del total (Svenningsson et al. 1990; Sundin et al. 1990). Prueba de ello son los experimentos llevados a cabo que reflejan cómo mutantes afectados en el catabolismo de aminoácidos están alterados en su capacidad para colonizar la raíz frente al parental (Bhagwat & Keister 1992; Bayliss et al. 1997; Espinosa-Urgel & Ramos 2001).

Con el fin de identificar promotores inducibles por exudados de raíz de maíz en *P. putida* KT2440, Espinosa-Urgel y Ramos (2001) llevaron a cabo una mutagénesis al azar con un transposón portador de los genes *lux* sin promotor, lo cual, permitía generar fusiones transcripcionales. Así, se aisló el mutante *rei2* (root exudate induction) donde el operón de los genes *lux* se había insertado en el gen *davT* (figura I.1). El gen *davT* codifica la enzima δ -aminovalerato aminotransferasa, directamente implicada en el catabolismo del aminoácido L-lisina. Quedó de manifiesto cómo el gen *davT* se inducía por exudado de raíz de plantas de maíz, concretamente por la L-lisina presente en exudado de raíz a una concentración de 0,42 mM. El mutante *rei2* era incapaz de utilizar tanto la L-lisina como el ácido δ -aminovalérico como fuente de carbono (Espinosa-

Urgel & Ramos 2001). A su vez estaba afectado en su capacidad de colonizar la raíz de *Zea mays* en competencia con la cepa parental (Espinosa-Urgel et al. 2000).

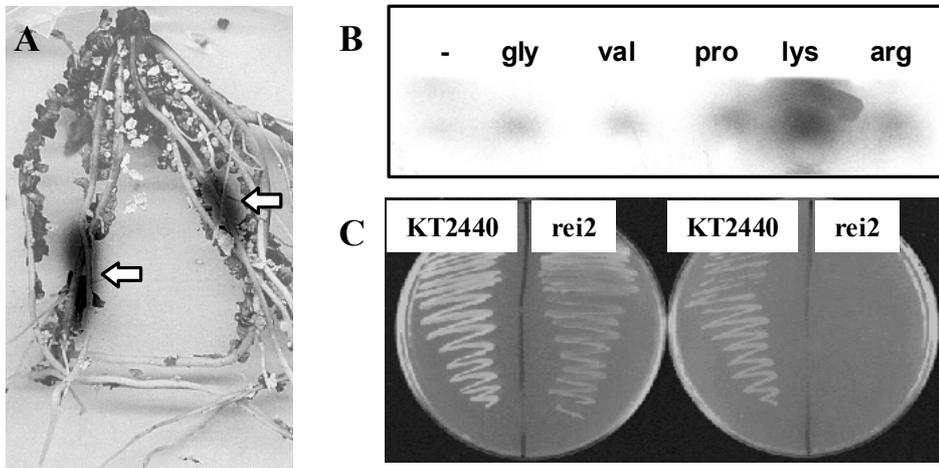


Figura 1.1. A. Expresión de la fusión *davT::lux* en respuesta a exudados radicales. Semillas de maíz inoculadas con la cepa *rei2* se sembraron en macetas con vermiculita. A los 15 días se extrajeron las raíces, se fotografiaron y se analizó la emisión de bioluminiscencia por exposición de una película autorradiográfica. La fotografía corresponde a la superposición de ambas imágenes, siendo la zona oscura (flechas) aquella en la que se detectó bioluminiscencia. **B. La expresión de *davT::lux* se induce en respuesta a lisina.** La cepa *rei2* se inoculó en medio mínimo en presencia del aminoácido indicado en cada caso, analizándose la emisión de bioluminiscencia como en la imagen anterior. **C. El mutante *rei2* es incapaz de utilizar la lisina como única fuente de carbono.** KT2440 y *rei2* se sembraron en placas de medio mínimo con lisina como única fuente de nitrógeno (izquierda) o de carbono (derecha).

De este modo quedó de manifiesto que la ruta de degradación de L-lisina es activa en *P. putida* KT2440 en presencia de exudado de maíz, y por lo tanto puede tener gran importancia en la adaptación de KT2440 a la rizosfera.

3. CATABOLISMO DE L-LISINA.

Existe una elevada variabilidad de rutas para el catabolismo de lisina en la naturaleza, conociéndose al menos nueve rutas distintas en el conjunto de los seres vivos. Ya que, aunque la mayoría de los organismos capaces de degradar la lisina la utilizan como fuente de carbono y/o nitrógeno, existen organismos que la usan exclusivamente o como fuente de carbono o como fuente de nitrógeno. A su vez, el aminoácido lisina puede ser usado en el metabolismo secundario como precursor de antibióticos, alcaloides, etc. Por ejemplo, el intermediario de la ruta de catabolismo de lisina, L-2-aminoadipato, es precursor de cefalosporinas y penicilinas; el ácido

pipecólico lo es de la síntesis de eslaframina y eswainsonina (Guengerich & Broquist 1973; Broquist 1985), etc.

Antes de pasar a describir el catabolismo de lisina, mencionamos la importancia de la L-lisina en el metabolismo secundario. Los organismos productores de antibióticos β -lactámicos, *Streptomyces clavuligerus*, *S. cattleta*, *Nocardia lactamdurans* o *Penicillium chrysogenum*, poseen la ruta de conversión de L-lisina en L-2-aminoadipato (Madduri et al. 1989; Esmahan et al. 1994; Rius & Demain 1997; de La Fuente et al. 1997), compuesto precursor de penicilinas y cefalosporina. La primera enzima de la ruta conocida como LAT (L-lisina 6-aminotransferasa), es la encargada de catalizar la desaminación del aminoácido rindiendo $^1\Delta$ -piperideina-6-carboxilato. Éste es a su vez el sustrato de la enzima piperideina-6-carboxilato deshidrogenasa, que cataliza la síntesis de L-2-aminoadipato (figura I.3). Estas enzimas son exclusivas de organismos productores de cefalosporinas y penicilinas. En *N. lactamdurans* y *S. clavuligerus* se ha identificado la enzima LAT cuyo gen forma parte del operón implicado en la síntesis de cefamicina C (Madduri et al. 1991; Coque et al. 1991).

En *Streptomyces virniae* se ha descrito la síntesis de virginiamicina (Namwat et al. 2001; Namwat et al. 2002). La L-lisina gracias a la actuación de la L-lisina 2-aminotransferasa, VisA, es convertida en 2-ceto-6-aminocaproato. Este de forma espontánea se cicla para dar $^1\Delta$ -piperideina-2-carboxilato. Este compuesto es precursor del 3-hidroxicicolínico (3-HPA) constituyente del antibiótico virginiamicina.

A continuación se describen las diferentes rutas descritas para el catabolismo de L-lisina en distintos organismos:

3.1 Catabolismo de lisina en plantas y animales.

Trigo, maíz y cebada fueron las primeras plantas donde se demostró el catabolismo de lisina a partir de ensayos realizados con ^{14}C -lisina, demostrándose que el ^{14}C se incorporaba en α -aminoadipato y glutamato (Sodek & Wilson 1970; Brandt 1975), lo que sugería que la ruta de degradación tenía lugar vía sacaropina. Esta ruta es similar a la descrita en hongos para la síntesis de lisina. En el primer paso de la reacción tiene lugar la condensación de una molécula de lisina con una de α -cetogluturato para formar una molécula de sacaropina. En el siguiente paso de la reacción se forma el

semialdehído del 2-aminoadipato junto con una molécula de glutamato (Figura I.2). Los dos primeros pasos enzimáticos están catalizados por la lisina α -cetoglutarato reductasa (LKR; EC 1.5.1.8) y la sacaropina deshidrogenasa (SDH; EC 1.5.1.9), identificadas y estudiadas en diferentes especies de plantas como *Phaseolus*, *Arabidopsis*, *Zea mays*, etc (Azevedo et al. 1997). Se trata de un polipéptido bifuncional con dominios separados, un dominio Ct-SDH, un dominio Nt-LKR y un interdominio de aproximadamente 100 residuos (Sabine Epelbaum et al. 1997). Las propiedades bioquímicas, de este polipéptido varían de una especie a otra. A través de estos dos pasos enzimáticos tiene lugar la transaminación del grupo ϵ -amino de la lisina al α -cetoglutarato originando una molécula de glutamato (Figura I.3). Una segunda molécula de glutamato se genera gracias a la α -aminoadipato aminotransferasa, en esta reacción el grupo α -amino del esqueleto de lisina es transferido desde el 2-aminoadipato al α -cetoglutarato (Arruda et al. 2000). A lo largo de estos dos pasos, los grupos amino de la lisina son utilizados para sintetizar dos moléculas de glutamato. El esqueleto carbonado de la lisina puede destinarse hacia la producción de glutamato vía Ciclo de Krebs.

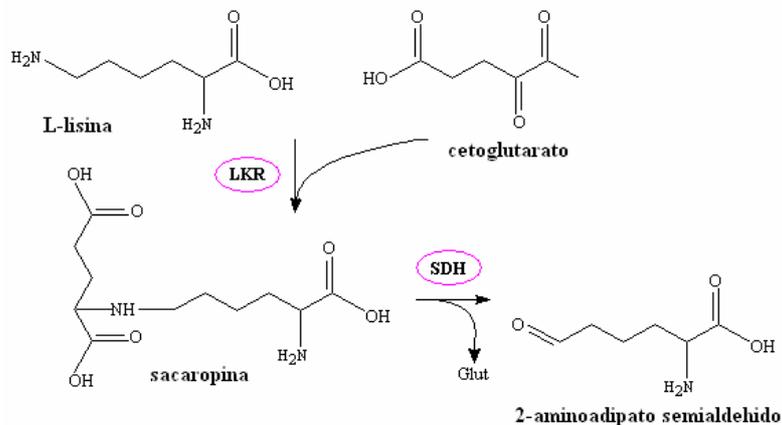


Figura I.3: Ruta de degradación de L-lisina en plantas. Las enzimas indicadas son lisina-cetoglutarato reductasa (LKR) y sacaropina deshidrogenasa (SDH). El semialdehído del 2-aminoadipato gracias a la deshidrogenasa del semialdehído del 2-aminoadipato y una aminoadipato aminotransferasa dará lugar a α -cetoadipato, que finalmente será degradado a través del ciclo de los ácidos tricarbónicos. Por otro lado, el semialdehído del 2-aminoadipato puede originar pipercolato.

Zacharius y colaboradores (1954) identificaron ácido L-pipecólico en frutos y semillas de leguminosas. Posteriormente, se desarrollaron trabajos que describían la presencia de este ácido en diferentes compuestos procedentes de plantas, por ejemplo,

4- y 5-hidroxipecólico, 4-ceto y 4-aminopipécólico (Fowden 1964). La función de dichos compuestos junto con la del pipicolato en el metabolismo de plantas no está clara.

Las enzimas SDH y LKR se han descrito en animales y hongos, manteniendo unas características generales. La ruta de la sacaropina es la vía principal de degradación de L-lisina en mamíferos (Markovitz & Chuang 1987; Papes et al. 1999). El polipéptido LKR/SDH se ha detectado en tejidos de mamíferos, principalmente en hígado y riñones (Markovitz et al. 1984; Papes et al. 1999), donde la lisina se convierte en cuerpos cetónicos. Chang Y. E (1978) demostró que en ratas la principal ruta de degradación de L-lisina tiene lugar vía pipicolato. Se ha observado (Rao et al. 1992; Papes et al. 2001) que en el sistema nervioso de ratas embrionarias la ruta principal de degradación de L-lisina es vía sacaropina, disminuyendo su actividad en el cerebro durante el desarrollo y pasando a ser la principal en hígado.

En humanos la ruta principal de degradación de lisina tiene lugar vía sacaropina en la mitocondria rindiendo acetyl-CoA, en cambio en los peroxisomas tiene lugar vía pipécólico. Esta última ruta es de menor importancia fisiológica y principalmente tiene lugar en el cerebro. La existencia de otras dos rutas, vía acetyl lisina y el ciclo lisina-urea, no están demostradas (Vianey-Liaud et al. 1991).

En *Trichoderma viridiae* se ha descrito la actividad lisina α -oxidasa que produce el ácido α -ceto- ϵ -aminocaproato. (Kusakabe et al. 1980), a partir de la L-lisina.

El catabolismo de lisina en plantas podría estar implicado en la regulación de la homeostasis de lisina, como sugieren estudios realizados en *Arabidopsis* (Zhu et al. 2001); en el desarrollo de la planta y en respuesta a estreses abióticos. Las dos primeras enzimas de la ruta (LKR-SDH) están sometidas a una compleja regulación durante el desarrollo de la planta y bajo condiciones de estrés. Dicha regulación implica un control transcripcional, postranscripcional y postranslacional.

Bajo condiciones normales de crecimiento el gen LKR-SDH es el de mayor expresión en órganos florales y semillas en desarrollo (Kemper et al. 1998; Kemper et al. 1999). Ensayos de hibridación *in situ*, sugieren que este polipéptido se está expresando en embriones en desarrollo y en las capas externas del endosperma, en *Arabidopsis* (Tang et al. 1997; Tang et al. 2000). En maíz tendría lugar predominantemente en capas externas del endosperma. En el endosperma de maíz y semillas de tabaco, la actividad del polipéptido LKR-SDH está temporalmente

coordinada con la acumulación de proteínas de reserva y la entrada de nitrógeno en la semilla (Arruda & Silva 1983; Tang et al. 1997). La expresión del polipéptido está mediada por el factor de transcripción Opaque 2, que a su vez controla algunas clases de genes conocidos como “*zein storage protein*”. La expresión de estos últimos, a su vez, está coordinada con la biosíntesis de lisina durante el desarrollo de la semilla. Así, el factor de transcripción Opaque 2, a través del polipeptido LKR-DSH, estaría regulando los niveles de lisina libre durante el desarrollo de la planta.

Otro tipo de regulación es a nivel postraduccional donde estaría implicado el Ca^{+2} intracelular y una cascada de fosforilación/desfosforilación proteica (Karchi et al. 1995). Mediante una serie de ensayos realizados *in vitro* se ha establecido la hipótesis de que la actividad LKR está negativamente regulada a través de la subunidad SDH, donde la región que une ambos dominios juega un papel esencial en su regulación (Kemper et al. 1999; Galili et al. 2001). En maíz, la lisina acumulada podría favorecer el estado de fosforilación de LKR, vía caseína quinasa, y así estimular su propia degradación (Miron et al. 1997). La fosforilación de LKR provocaría un cambio conformacional que dejaría expuesto su dominio catalítico, permitiendo la unión del sustrato (Kemper et al. 1998).

La región cromosómica que codifica el polipéptido LKR-SDH es larga y compleja (26 exones en maíz y 25 en *Arabidopsis*) (Epelbaum 1997; Kemper 1999). En *Arabidopsis* se han identificado dos péptidos SDH y LKR (Tang et al. 1997; Tang et al. 2000). La expresión de la enzima monofuncional SDH se regula por un promotor localizado en la región que codifica LKR/SDH. LKR se expresa bajo dos mecanismos distintos. Uno de ellos supone una poliadelinación interna de uno de los intrones de la región que une ambos dominios. Las subunidades LKR y SDH presentan una actividad óptima a distintos pHs, 6 y 7, respectivamente. Esto supone que en el citosol la subunidad SDH estaría funcionando por debajo del pH óptimo. La presencia de una subunidad alternativa podría explicar la existencia de una actividad SDH adicional (Galili et al. 2001).

Galili y colaboradores (Galili 2002) propusieron la existencia de dos flujos metabólicos para el catabolismo de L-lisina en plantas. Uno de ellos estaría regulado y operaría en tejidos donde la forma bifuncional LKR/SDH predomina, y otro, muy eficiente, que tendría lugar en tejidos donde la enzima monofuncional LKR es mayoritaria. Esto estaría en relación con la doble funcionalidad de la ruta del

catabolismo de lisina, controlar la homeostasis de lisina y regenerar glutamato. La producción de LKR-SDH, tendría lugar mayoritariamente en tejidos donde los niveles de lisina deben estar estrechamente regulados, por ejemplo, semillas o flores en desarrollo, para prevenir la toxicidad debida al acumulo de éste aminoácido. En tejidos senescentes o en situaciones de estrés, la presencia de LKR monofuncional puede ser crucial para asegurar una rápida conversión de lisina en glutamato.

En animales, la ruta de la sacaropina está implicada en el desarrollo y proliferación celular. La enzima bifuncional LKR-SDH ha sido detectada en embriones durante el desarrollo del sistema nervioso central (Rao et al. 1992). El aminoácido L-lisina es el principal precursor en la síntesis de novo de glutamato en el sistema nervioso central de mamíferos (Papes et al. 2001). Alteraciones en el catabolismo de L-lisina en humanos provoca una enfermedad conocida como hiperlisenemia, asociada con retraso mental (Woody 1964; Markovitz et al. 1984). Las hiperlisenemias de tipo I se caracterizan porque el paciente carece del polipéptido LKR/SDH. No obstante, en individuos con hiperlisenemias de tipo II se ha observado la acumulación de sacaropina sugiriendo la inactivación de la subunidad SDH (Markovitz & Chuang 1987). Aunque la ruta de la sacaropina es la principal en mamíferos, determinados desordenes clínicos (acidemia hiperpipecólica) asociados a anomalías neuronales (Thomas et al. 1975) sugieren un papel importante de la ruta del pipecolato en el catabolismo de lisina en humanos. La principal característica de este síndrome es la carencia de peroxisomas en el hígado y en riñón (Schutgens et al. 1986). La actividad pipecolato oxidasa se ha demostrado en hígado de seres humanos (Wanders et al. 1988; Mihalik et al. 1989).

En levaduras se ha observado que el α -aminoadipato- δ -semialdehído está implicado en la activación de la transcripción de genes dependientes de Lys14-implicados en la biosíntesis de lisina. Se postula un mecanismo similar en plantas donde este compuesto actuaría regulando la expresión de genes implicados en el metabolismo de lisina, así como, en el crecimiento y desarrollo. En animales, el aminoácido glutámico actúa en la comunicación celular a nivel del sistema nervioso central, a su vez, es requerido para un normal desarrollo de la sinapsis. En plantas se han encontrado receptores de este aminoácido con una alta similitud de secuencia con los descritos en animales. Se ha llegado a especular que el glutamato podría haberse preservado durante la evolución como un aminoácido biológicamente activo actuando en el desarrollo y comunicación celular. Desde este punto de vista, la ruta de la sacaropina, adquiere un

significado especial, ya que puede llegar a producir al menos dos moléculas de glutamato a partir de una molécula de lisina (Arruda et al. 2000).

3.2 Catabolismo de lisina en hongos y levaduras.

El catabolismo de lisina en levaduras es más complejo ya que existen especies que usan este aminoácido exclusivamente o como fuente de nitrógeno (*Rhodotorula glutinis* o *Hansenula saturnus*), o como fuente de carbono (*S. cerevisiae*).

De las 28 especies de levaduras estudiadas se han identificado dos rutas de degradación que dividen a estos organismos en tres grupos en función del primer paso enzimático que tenga lugar. En un primer grupo de organismos el primer paso enzimático rinde α -aminoadipato- δ -semialdehído, compuesto que está en equilibrio con $^1\Delta$ -piperideina-6-carboxilato. Este paso enzimático está catalizado por la L-lisina 6-aminotransferasa. En *R. glutinis* esta enzima puede usar como aceptor del grupo amino tanto α -cetoglutarato como piruvato. Sin embargo, en *Candida albicans*, capaz de utilizar la lisina como fuente de carbon y nitrógeno, acumulando grandes cantidades intracelulares del compuesto δ -semialdehído del 2-aminoadipato, o en *Kluyveromyces marxianus*, este paso está catalizado por la L-lisina ϵ -deshidrogenasa (Hammer et al. 1991), (Figura I.4).

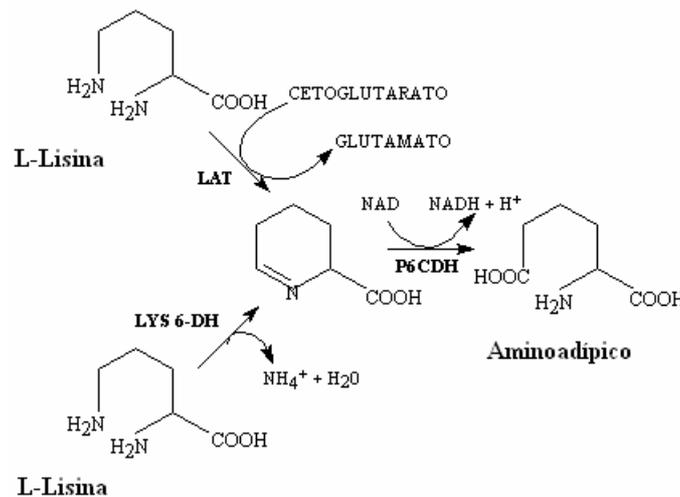


Figura I.4: Distintos pasos enzimáticos de conversión de L-lisina en 2-aminoadipato. Las enzimas indicadas son Lisina 6-deshidrogenasa (LYS 6-DH), Lisina 6-aminotransferasa (LAT) y Δ^1 -piperideina-6-carboxilato deshidrogenasa (P6CDH).

El segundo grupo degradativo tiene lugar a través de intermediarios acetilados (Figura I.5). En *N. crassa*, *S. cerevisiae* o *H. saturnus*, se ha observado la acumulación de L-ε-N-acetil-lisina marcada con ^{14}C , procedente de ^{14}C -lisina. A partir de este compuesto se obtiene δ-acetoamidovalerato que se produciría vía α-hidroxi-ε-acetamidohexanoico (Schweet et al. 1954; Rothstein 1965; Guengerich & Broquist 1976). En algunas especies el primer paso de la ruta estaría catalizado por la lisina N⁶-acetiltransferasa, paso que iría seguido de la pérdida de un grupo α-amino.

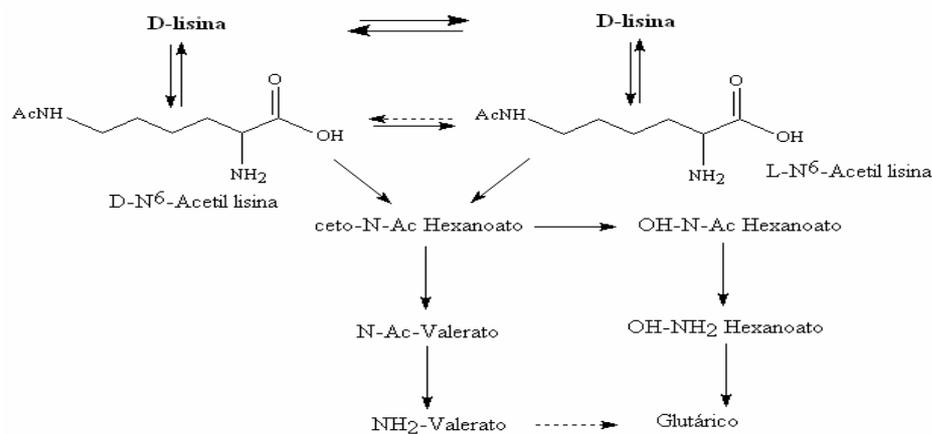


Figura I.5: Ruta propuesta para el catabolismo de L-lisina, a partir de intermediarios acetilados.

En *Nerurospora crassa* (Schweet et al. 1954; Meister et al. 1957; Guengerich & Broquist 1976) se ha observado la conversión de L-lisina en L-pipecolato (Figura I.6), aunque no se ha podido demostrar la formación de 2-aminoadipato a partir de L-lisina o L-pipecolato. En este organismo se ha descrito una vía mayoritaria de conversión de L-lisina en D-lisina, y viceversa, que iría vía pipecolato (Fangmeier & Leistner 1980), no obstante, no se descarta la existencia de una lisina racemasa descrita en numerosos organismos.

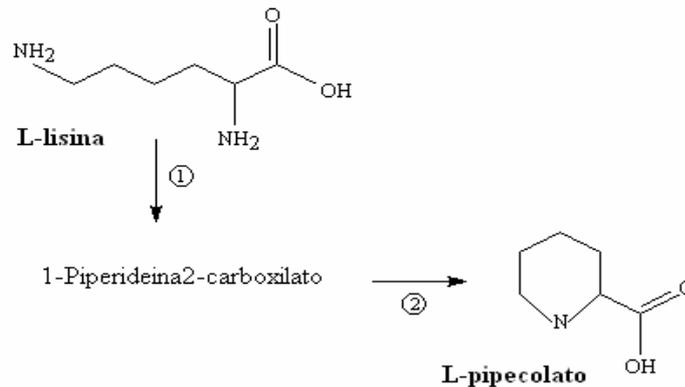


Figura I.6: Ruta de catabolismo de L-lisina propuesta en *N. crassa* y *Rasltonia leguminicola*, esta última descrita más adelante.

3.3 Catabolismo de lisina en bacterias.

Dentro de este grupo de organismos existe una gran variabilidad de rutas para el catabolismo de lisina, teniendo incluso que distinguir entre aerobiosis y anaerobiosis. Muchas de las rutas aquí descritas se analizarán con más detalle en el apartado dedicado a *Pseudomonas*.

Una primera vía de degradación es la ruta monooxidativa. Tiene lugar mediante una decarboxilación oxidativa catalizada por la lisina 2-monooxigenasa, cuyo producto de la reacción es δ -aminovaleramida. Este compuesto es transformado en δ -aminovalérico gracias a una amidohidrolasa. Esta ruta ha sido descrita en distintas especies del género *Pseudomonas*, y se analizará con mayor profundidad en el apartado dedicado a *Pseudomonas*.

Otra vía de degradación de L-lisina tiene lugar gracias a la enzima L-lisina 6-aminotransferasa que cataliza la transaminación del grupo ϵ -amino de la L-lisina a una molécula aceptora de α -cetoglutarato. El producto de la reacción es el α -semialdehido-2-aminoadipato, que se encuentra en equilibrio con la $^1\Delta$ -piperideina-6-carboxilato. Esta actividad ha sido descrita en *Flavobacterium* sp (Yagi et al. 1980; Fujii et al. 2000); *Achromobacter liquidum* o *Pseudomonas*, entre otros.

La racemización del aminoácido lisina, gracias a una lisina racemasa, parece darse en numerosas bacterias de distintas familias, Pseudomonadaceae, Enterobacterias, Lactobacterias, Corinebacterias, etc (Huang & Davisson 1958). La degradación del aminoácido D-lisina se describe en el apartado dedicado a *Pseudomonas*.

En *Rashtonia leguminicola* la degradación del aminoácido L-lisina tiene lugar vía pipercolato (Guengerich & Broquist 1973; Guengerich & Broquist 1976) siguiendo la misma ruta que la propuesta en *N. crassa*. En este organismo se ha descrito la presencia de una lisina racemasa, que permite la conversión de D-lisina en L-lisina (Guengerich & Broquist 1973), y viceversa. En la ruta de degradación de D-lisina este aminoácido es convertido en D- ϵ -N-acetil-lisina, que vía α -ceto- ϵ -acetamida-hexanoico, es convertido en δ -acetoamidovalerato (Figura I.5).

En *Bacillus sphaericus* se ha descrito la transaminación del grupo α -amino de la D-lisina a piruvato rindiendo $^1\Delta$ -piperideina-2-carboxilato. Este compuesto es la forma cíclica del α -ceto- ϵ -aminocaproato (Soda et al. 1974; Yonaha et al. 1975).

Distintas bacterias, entre ellas *Streptomyces* sp. y *Pseudomonas aeruginosa*, degradan L-lisina hasta CO₂ y H₂O vía cadaverina (Madduri et al. 1989; Rius & Demain 1997). La conversión de lisina en cadaverina está catalizada por la lisina descarboxilasa.

Las descarboxilasas en *E. coli* han adquirido un significado especial gracias a sus propiedades fisiológicas. Este tipo de enzimas se clasifican en dos grupos independientes. Por un lado, las denominadas biosintéticas. Este conjunto de enzimas son constitutivas y poseen un bajo nivel de expresión. Lisina descarboxilasas constitutivas se han purificado en *Selenomonas ruminantium* (Kamio & Terawaki 1983; Takatsuka et al. 2000), anaerobio estricto Gram negativo, *E. coli* (Kikuchi et al. 1997; Lemonnier & Lane 1998) y *Bacterium cadaveris* (Soda & Moriguchi 1969).

En *S. ruminantium* esta enzima posee la misma afinidad por lisina que por ornitina, presentando homología con las ornitina descarboxilasas de eucariotas (Takatsuka et al. 2000). En *E. coli* esta enzima está codificada por el gen *ldc* (Lemonnier & Lane 1998), es activa a pH entre 6 y 8, y termosensible (Goldemberg 1980; Kikuchi et al. 1997; Lemonnier & Lane 1998). El promotor *ldc* es muy débil permitiendo una baja expresión del gen. El gen *ldc* podría estar sometido a diferentes niveles de regulación, ya que, los ARNm que se han encontrado son muy cortos, indicando una rápida degradación o una terminación prematura de éste. A su vez, determinadas mutaciones que dan lugar a cepas resistentes a S-aminoetil-L-cisteína, un análogo de L-lisina, provocan un aumento en la expresión de este gen sugiriendo la presencia de un posible represor (Kikuchi et al. 1997; Lemonnier & Lane 1998). El hecho de que *E. coli* tenga una descarboxilasa constitutiva que asegure una continua

producción de cadaverina podría deberse a las propiedades fisiológicas de este compuesto. Ya que, por ejemplo, es un constituyente del peptidoglicano, encontrándose unido covalentemente al grupo carboxilo del aminoácido D-glutámico en diferentes especies Gram- como, por ejemplo, *Selenomonas ruminantum* (Kamio et al. 1981; Kamio et al. 1982; Kamio et al. 1986), *Veillonella alcalescens* (Kamio 1987), *Veillonella parvula* (Kamio 1987) o *Anerovirio lipolytica* (Hirao et al. 2000). También, las poliaminas, grupo al que pertenece la cadaverina, son necesarias para un adecuado funcionamiento del ribosoma (Tabor & Tabor 1985).

El segundo tipo de descarboxilasas es el conocido propiamente como lisinas descarboxilasas. Estas son inducidas por una elevada acidez extracelular (Gale 1946), baja tensión de oxígeno y concentraciones elevadas del aminoácido en cuestión (Sabo et al., 1974). Forman parte del sistema de respuesta a tolerancia ácida (acid tolerance response, ATR), este sistema es bastante complejo desencadenando múltiples respuestas. Se ha descrito en bacterias que ocupan distintos nichos ecológicos sometidos a estrés por ácidos (Foster & Hall 1991), y, en ciertas ocasiones está relacionado con virulencia bacteriana (Miller et al. 1987). El papel de estas descarboxilasas es el de mantener el pH interno y se describió por primera vez en *E. coli*, donde una arginina descarboxilasa inducible confería resistencia a las células de *E. coli* sometidas a un pH de 2,5 (Lin et al. 1995). El gen *cadA*, que codifica la lisina descarboxilasa, se ha descrito en múltiples bacterias del tracto intestinal: *E. coli* (Auger et al. 1989; Meng & Bennett 1992a; Meng & Bennett 1992b); *Vibrio cholerae* (Merrell & Camilli 1999; Eun Rhee et al., 2002), *Salmonella thypimurium* (Park et al. 1996), entre otros. En *E. coli* la lisina descarboxilasa, codificada por el gen *cadA*, cataliza la decarboxilación del aminoácido L-lisina, rindiendo una molécula de CO₂ y una molécula de cadaverina, con el consecuente consumo de un protón, provocando un aumento de pH. CadA es activa a 5.7 y termoestable (Kikuchi et al. 1997). La cadaverina es exportada al medio extracelular gracias a un sistema antiporter lisina/cadaverina, codificado por el gen *cadB* (Auger et al. 1989; Meng & Bennett 1992b). Ambos genes se encuentran formando una unidad transcripcional cuya expresión está mantenida por el promotor P_{cad} (Watson et al. 1992) inducido en presencia de L-lisina, anaerobiosis y/o pH ácido (Neely & Olson 1996). Meng y colaboradores (Meng & Bennett 1992a) identificaron la región de dicho promotor que podría estar sometida a regulación por pH. A 125 pb del inicio de la transcripción de *cadB* aparece un sitio de unión para un activador conocido como CadC

(Watson et al. 1992; Meng & Bennett 1992a; Neely et al. 1994), de expresión constitutiva, perteneciente al subgrupo RO_{II} y en cuya estructura aparece en extremo N-terminal con un dominio de unión a ADN, mientras que el Carboxilo terminal es periplásmico (Watson et al. 1992; Dell et al. 1994). El dominio periplásmico es el encargado de sensar la acidez del medio y mediante un cambio conformacional en su estructura activaría su función reguladora comprendida en el N-terminal, uniéndose al promotor P_{cad} y activando su expresión (Dell et al. 1994). Por otro lado, se ha descrito un transportador de lisina (*cadR* o *lysP*) implicado en este sistema. LysP afecta negativamente la expresión de *cadAB* en ausencia de lisina. Sin embargo, se reprime en presencia de lisina, lo que permitiría eliminar el efecto represor de este sobre *cadAB*, no habiéndose observado ningún efecto del pH del medio sobre su expresión (Tabor et al. 1980; Popkin & Maas 1980; Shi et al. 1993; Neely et al. 1994; Neely & Olson 1996). Se postula que en el proceso de represión de *cadAB* podría tener lugar una interacción entre LysP y CadC, proceso donde estaría implicado L-lisina (Neely et al. 1994; Neely et al. 1994; Neely & Olson 1996), no obstante, hasta el momento no se ha probado ninguna interacción directa entre ambas proteínas. La cadaverina actúa como efector negativo de *cadBA*, proceso mediado por *cadC* e independiente de LysP (Neely et al. 1994), y reduce el flujo de metabolitos a través de porinas (de la Vega & Delcour 1995; Samartzidou & Delcour 1999; Samartzidou et al. 2003). El gen *cadA* debe tener alguna función durante el proceso de división celular, ya que, es inducido por el regulador transcripcional FlhD, implicado en la división celular (Pruss et al., 1997). En *S. typhimurium* se ha descrito el operón *cadAB*, los genes *cadC* y *lysP* (Foster et al. 1994; Park et al. 1996) sugiriendo un mecanismo de regulación similar a *E. coli*.

Las bacterias anaerobias son capaces de fermentar aminoácidos, y en particular la L-lisina. La degradación de aminoácidos por microorganismos anaerobios tiene lugar, generalmente, a través de desaminaciones oxidativas, transaminaciones y oxidaciones de α -cetoácidos. *Clostridium suterminale* y *C. sticklandii* utilizan la lisina como la principal fuente de energía degradándola hacia acetato, butirato y amonio. En principio, se han descrito tres rutas más o menos independientes (Figura I.7). Tanto en la primera como en la segunda se obtienen acetato y butirato, pero, mientras que en la primera la ruptura de la molécula se produce entre el C₂ y C₃ de la molécula de lisina, en la segunda tiene lugar entre el C₄ y C₅ de la misma. El tercer caso descrito implicaría la formación de butirato y grupos acetil (Baker et al. 1973).

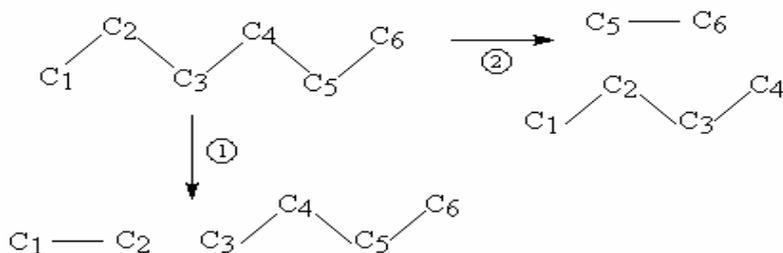


Figura I.7: Ruta de degradación de L-Lisina en *Clostridium*. En ambas rutas se obtiene una molécula de acetato y otra de butirato a partir del esqueleto carbonado de la L-lisina. En la primera ruta la ruptura tiene lugar entre el carbono 2 y 3 de la lisina, mientras que en la segunda se dá entre el 4 y el 5.

La primera de las tres rutas ha sido la más estudiada en *Clostridium* (Costilow et al. 1966; Turner & Stadtman 1973; Baker et al. 1973; Yorifuji et al. 1977) y *Fusobacterium* (Barker et al. 1982), habiéndose identificado los distintos pasos de la ruta, así como las enzimas implicadas. El primer paso de la ruta, catalizado por la L-lisina 2,3-aminomutasa, produciría L-β-lisina (3,6-diaminohexanoato), que a su vez, gracias a la L-β-lisina 5,6-aminomutasa, daría lugar a la formación 3,5-diaminohexanoato. A partir de éste, y mediado por la 3,5-diaminohexanoato deshidrogenasa, se obtiene 3-ceto-5-aminohexanoato. La degradación de este último tiene lugar mediante una reacción enzimática que implica una molécula de acetyl-CoA. La enzima responsable de dicha reacción ha sido ampliamente estudiada e incluso purificada. El producto de dicha reacción sería: una molécula de acetoacetato, cuyo C₁ y C₂ provienen del C₁-C₂ del 3-ceto-5-aminohexanoato, y C₃-C₄ del acetylCoA, y una molécula de L-3-aminobutirilCoA cuyos carbonos provienen de los restantes del 3-ceto-5-aminohexanoato. En *C. subterminale* se ha descrito la enzima encargada de llevar a cabo la deaminación del L-3-aminobutiril-CoA hacia crotonil-CoA. Se piensa que este último compuesto daría lugar a butiril-CoA a través de una reacción enzimática no identificada. Este reaccionaría con acetoacetato para dar butirato y acetoacetyl-CoA. Este último es convertido en acetato vía acetyl-CoA y acetylfosfato.

La segunda posibilidad para la degradación de L-lisina se especula que tendría lugar mediante la previa conversión en D-lisina. Sin embargo, estudios más rigurosos han de llevarse a cabo puesto que esta ruta supone todavía una incógnita.

Dohner y colaboradores (Dohner & Cardon 1954) aislaron dos cepas de *E. coli* de rumen bovino, observando su capacidad de fermentar L-lisina hasta butirato y

acetato en una proporción 1:1. Esto ocurría siempre que dichas cepas fueron inoculadas juntas a partir de un cultivo ya crecido.

3.4 Catabolismo de L-lisina en *Pseudomonas*.

Las diferentes especies de *Pseudomonas* son capaces de utilizar el aminoácido L-lisina como fuente de carbono y/o nitrógeno (Chang & Adams 1977; Espinosa-Urgel & Ramos 2001). En el caso de *P. putida*, *P. fluorescens*, *P. multivorans* o *P. aeruginosa*, si bien, esta última presenta un tiempo de duplicación en fase exponencial muy largo (Fothergill & Guest 1977). Sin embargo, no sólo son capaces de degradar la L-lisina, sino que también su isómero D-lisina, aunque dicha capacidad en algunas ocasiones está mantenida en un plásmido (Cao et al. 1993). Existe una interconexión entre ambas rutas a nivel de la lisina racemasa. Las rutas de degradación de L-lisina en *P. aeruginosa* o *P. putida* se describieron en la década de los setenta a nivel bioquímico, no obstante, hasta el momento no se sabía nada acerca de los genes implicados en el catabolismo de lisina.

Como se muestra en la Figura 1.8, existen varias rutas operativas para el catabolismo de lisina que se describen a continuación.

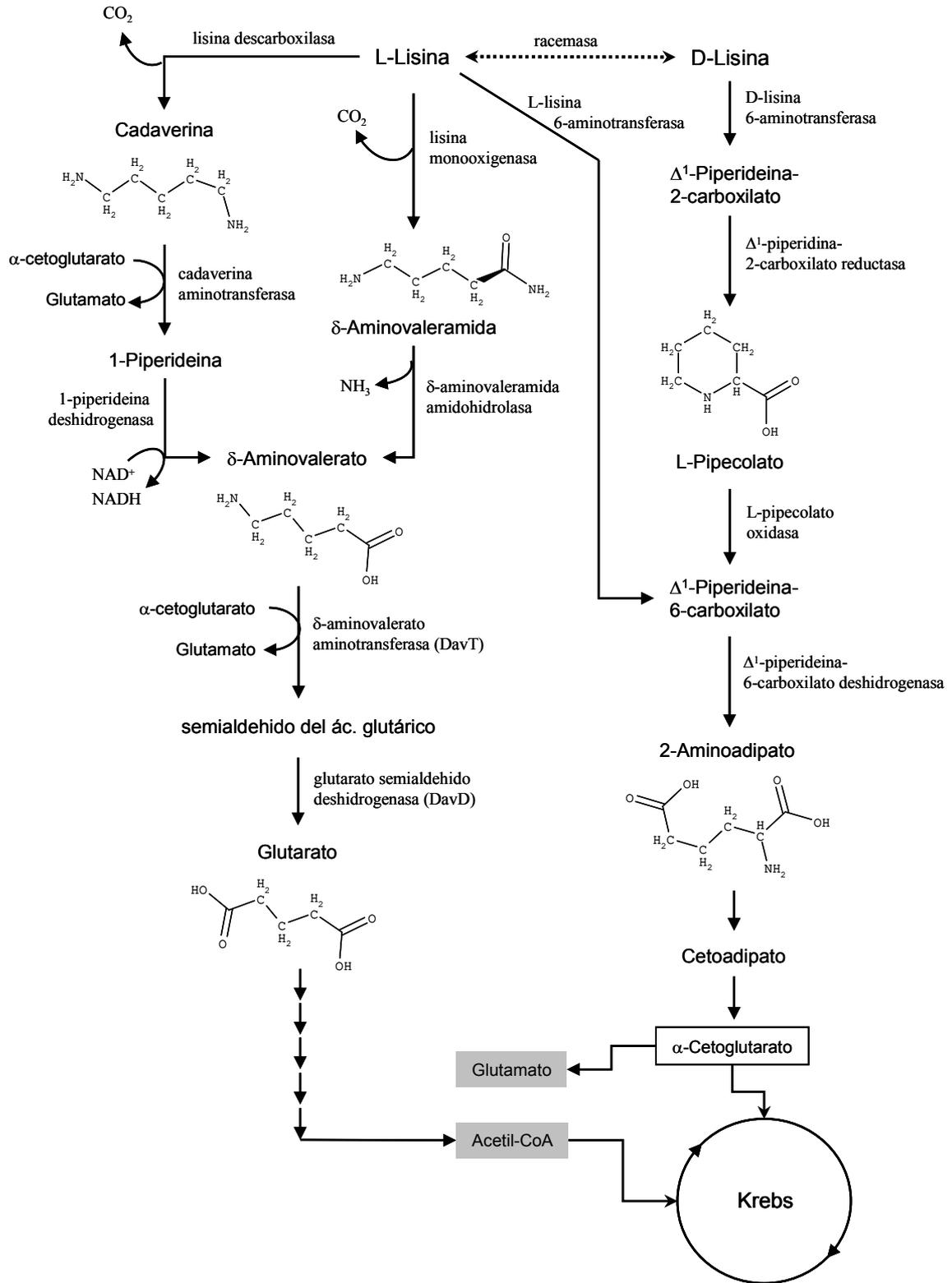


Figura I.8: Esquema de las rutas de degradación de L-lisina propuestas en *Pseudomonas*. Los distintos pasos enzimáticos se describen con más detalle en el texto.

a) Catabolismo de lisina: Ruta monooxigenasa y de la cadaverina.

Como se observa en la Figura I.8 ambas rutas comparten unas características comunes: descarboxilación del grupo carboxílico de la lisina y producción de un compuesto intermediario, δ -aminovalérico, donde convergen ambas. En estos primeros pasos se captura un grupo $-\text{NH}_2$ de la lisina. En la ruta de la cadaverina (Figura I.9): tiene lugar a nivel de la cadaverina aminotransferasa, enzima que transfiere el grupo $-\text{NH}_2$ de la cadaverina a una molécula de α -cetoglutarato rindiendo un compuesto cíclico, 1-piperideina, este a su vez, por la acción de la piperideina dehidrogenasa da lugar a δ -aminovalérico.

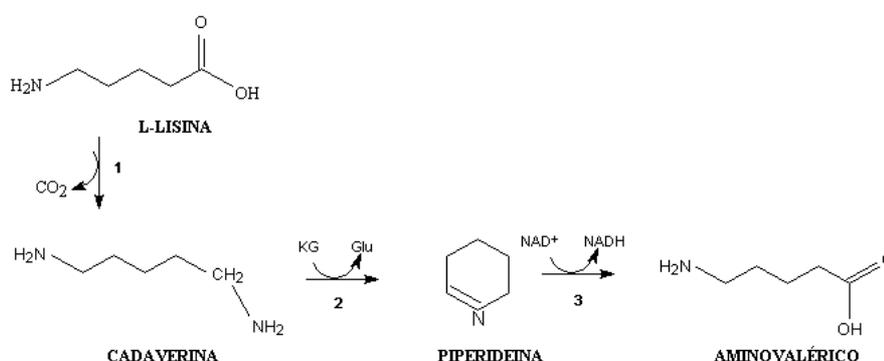


Figura I.9: Ruta propuesta para el catabolismo de lisina. Ruta de la cadaverina. Las enzimas implicadas en los distintos pasos de la ruta son: L-Lisina descarboxilasa (1) E.C:4.1.1.18; Cadaverina aminotransferasa (2) y 1-Piperideina deshidrogenasa (3).

En la ruta de la monooxigenasa (Figura I.10), la lisina 2-monooxigenasa es la responsable de la descarboxilación oxidativa de la lisina rindiendo δ -aminovaleramida; ésta a su vez sufre una desaminación formándose el ácido δ -aminovalérico, paso catabolizado por la enzima δ -aminovaleramida amidohidrolasa (Reitz & Rodwell 1970). El ácido δ -aminovalérico es metabolizado por la enzima δ -aminovalerato aminotransferasa, codificada por el gen *davT*. Esta reacción implica la transaminación del segundo grupo $-\text{NH}_2$ al α -cetoglutarato. El resultado de dicha reacción es el semialdehído del ácido glutárico, el cual, bajo la acción de una deshidrogenasa codificada por el gen *davD*, da lugar a ácido glutárico. Éste será oxidado hasta CO_2 y H_2O a través del Ciclo de Krebs. Al inicio de esta tesis los genes *davD* y *davT* eran los únicos descritos en el catabolismo de lisina en *Pseudomonas*. Mutantes afectados en los genes *davD-davT* son incapaces de catabolizar el ácido δ -aminovalérico (Espinosa-

Urgel & Ramos 2001), mostrando la ausencia de rutas alternativas para el catabolismo de dicho ácido.

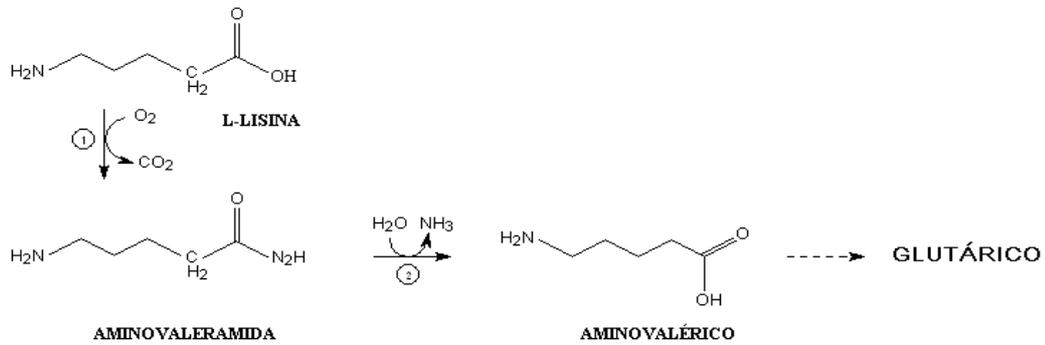


Figura I.10: Ruta de degradación de L-Lisina. Las enzimas implicadas en los primeros pasos de la ruta oxidativa son: (1) L-Lisina 2-monooxigenasa (EC. 1.13.12.2) y (2) 5-aminovaleramida amidasa (EC. 3.5.1.-).

A pesar, de que ambas rutas existen en *Pseudomonas* parece haber una preferencia por una u otra vía en las distintas especies, pudiendo incluso coexistir ambas (Tabla 1.1). En *P. aeruginosa* la ruta de la cadaverina es la ruta principal para el catabolismo de lisina, no detectándose actividad de la enzima lisina monooxigenasa (Fothergill & Guest 1977). En *P. aeruginosa* la cadaverina se usa como fuente de carbono de un modo más eficiente que la lisina (Fothergill & Guest 1977; Rahman & Clarke 1980). Mientras que por el contrario, en determinadas cepas de *Pseudomonas putida* (Miller & Rodwell 1971b; Fothergill & Guest 1977) la L-lisina parece ser degradada principalmente a través de la ruta de la monooxigenasa, detectándose actividad lisina descarboxilasa en algunas cepas. En el caso de *P. fluorescens* ambas rutas están presentes, sin que se observe una preferencia por alguna de las dos (Friede & Henderson 1976; Fothergill & Guest 1977).

Tabla I.1: Actividades enzimáticas y vías de catabolismo de lisina en diferentes especies de *Pseudomonas*.

Organismo	Lisina descarboxilas a	Lisina monooxigenasa	L-lisina 6- aminotransferasa	Lisina racemasa	Ruta principal
<i>P. fluorescens</i> ^{1,2}	++	+++	+ -	+	Cadaverina/monooxigenasa/racemasa
<i>P. putida</i> KT2440	-	+++	?	¿?	Monooxigenasa
<i>P. putida</i> ATCC12633 ¹	-	++	+ -	¿?	Monooxigenasa
<i>P. putida</i> ATCC17472 ¹	-	++	+	¿?	Monooxigenasa/aminotransferasa
<i>P. aeruginosa</i> PAC1 ¹	++	-	+	¿?	Cadaverina
<i>P. multivorans</i> ¹	+ -	-	+	¿?	aminotransferasa/racemasa ?
<i>P. syringae</i>	(-)	¿?	¿?	¿?	Sin determinar

¹(Fothergill & Guest 1977).

²(Friede & Henderson 1976). +: actividad presente; + -: presente pero minoritaria; -: ausente; (-): no aparece ningún gen homólogo y la actividad no ha sido analizada.

b) Catabolismo de L-lisina: Ruta de la D-lisina y/o L-pipecolato.

Existen otras dos vías alternativas descritas en *Pseudomonas* que convergen en la ruta del catabolismo del ácido pipecólico. Una de ellas tiene lugar a través de la enzima lisina 6-aminotransferasa, la cual actúa directamente sobre L-lisina rindiendo piperideina-6-carboxilato, un intermediario cíclico del catabolismo del ácido pipecólico. Por otro lado, *Pseudomonas* es capaz de degradar D-lisina a través de la ruta del ácido pipecólico o bien mediante la lisina racemasa dando lugar a L-lisina. La enzima lisina racemasa es reversible pudiendo catalizar la reacción de racemización en uno u otro sentido. La capacidad de *P. putida* para utilizar ambas formas isoméricas de la lisina como fuente de carbono ha permitido preguntarse si existe una ruta predominante de degradación, donde la lisina racemasa permitiría la interconversión del aminoácido, o si por el contrario ambas rutas son independientes. Sin embargo, aunque dicha enzima se detecta en el medio extracelular su actividad no parece ser suficiente como para soportar el crecimiento, ya que mutantes afectados en la ruta de la L-lisina son incapaces de catabolizar L-lisina (Chang & Adams 1974). Si bien, permitiría cierta conexión como

refleja los efectos de inducción de la L-lisina sobre determinadas enzimas de la ruta de la D-lisina.

En *Pseudomonas oleovorans* la racemasa junto con las enzimas de la ruta de la D-lisina se encuentran localizadas en un plásmido llamado OCT (Cao et al. 1993). La eliminación de este plásmido, supone la pérdida de la capacidad de catabolizar D-lisina, así como, una reducción en el transporte de dicho aminoácido. Esto sugiere que en dicho plásmido no sólo se encuentran los genes de la ruta de la D-lisina, sino también, un transportador específico de la misma.

La ruta para el catabolismo del ácido piperólico ha sido ampliamente estudiada en *Pseudomonas*. Estudios realizados con piperolato marcado con ^{14}C (Rao & Rodwell 1962) en *P. putida* mostraron la acumulación de α -aminoadipato y glutamato marcado con ^{14}C . El α -amino(6- ^{14}C)adipato rendía un 80% de (6- ^{14}C)glutamato, verificando la vía propuesta para el catabolismo del ácido piperólico, no obstante, la detección de un 11% de (1- ^{14}C)glutamato sugiere la existencia de una ruta alternativa aunque minoritaria (Perfetti et al. 1972).

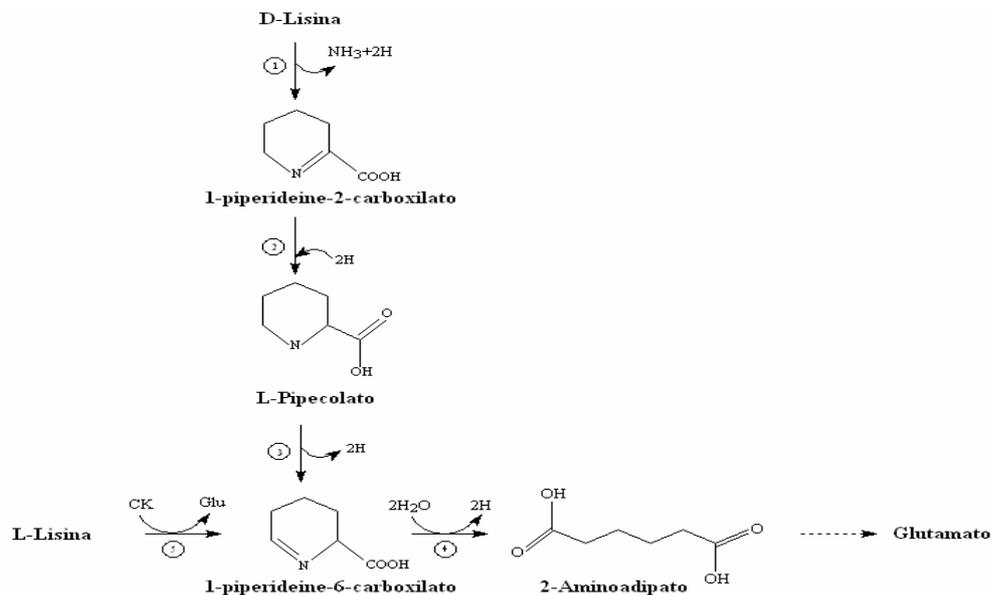


Figura I.11: Ruta de degradación de lisina. Ruta del pipecolato y de la enzima 6-aminotransferasa. Las enzimas implicadas en los pasos de la ruta son: (2) $^1\Delta$ -piperideina-2-carboxilato reductasa (EC, 1.5.1.-); (3) L-pipecolato deshidrogenasa (EC, 1.5.99.3); (4) $^1\Delta$ -piperideina-6-carboxilato deshidrogenasa (EC, 1.5.1.-); (5) L-lisina 6-aminotransferasa (EC, 2.6.1.36). A su vez la lisina racemasa (EC, 5.1.1.5) permite la conversión de D-lisina en L-lisina y viceversa.

Hasta el momento, poco se sabe acerca de los mecanismos de regulación que controlan las rutas del catabolismo de lisina. La L-lisina y el ácido pipercolico inducen, no sólo las enzimas del catabolismo de la L-lisina, tales como pipercolato oxidasa, lisina oxidasa o δ -aminovaleramidasa, sino también, el transporte de ambas. Análisis de la incorporación de ^{14}C -lisina a la fracción proteica muestran que el catabolismo del mismo está siendo principalmente usado como fuente de carbono y/o nitrógeno (Miller & Rodwell 1971b).

A nivel de la ruta monooxidativa existe inducción de las actividades enzimáticas de las enzimas lisina oxigenasa y 5-aminovaleramidasa por parte de la L-lisina (Chang 1977), de la δ -aminovalerato aminotransferasa por parte del δ -aminovalerato, y de la deshidrogenasa del semialdehído del ácido glutárico por parte del glutarato.

En la ruta del pipercolato, tanto la D-lisina como la L-lisina, inducen la $^1\Delta$ -piperideina 6-carboxilato deshidrogenasa y la pipercolato deshidrogenasa. Si bien, en presencia de un inhibidor de la lisina racemasa, tan sólo la $^1\Delta$ -piperideina 6-carboxilato deshidrogenasa es inducida por L-lisina. También, destacar el excelente papel inductor del pipercolato sobre la pipercolato oxidasa (Payton 1982).

En *P. aeruginosa* el catabolismo de lisina presenta ciertas diferencias con respecto a *P. putida*. *P. aeruginosa*, la capacidad de degradar la L-lisina vía cadaverina es limitada (Denis et al. 1977; Fothergill & Guest 1977), habiéndose detectado solo bajos niveles de lisina descarboxilasa. Rahman y Clarke (Rahman & Clarke 1980) sugirieron la presencia de un gen regulador, *lyuR*, que controlaría la expresión de la lisina descarboxilasa y una permeasa de lisina, ya que es posible aislar mutantes capaces de usar la lisina de una forma constitutiva. Similares resultados se han obtenido en *E. coli*, donde una mutación puntual en el gen *lysP* provoca la represión del transportador general de aminoácidos básicos (LAO), del transportador específico de lisina y la desrepresión de la lisina descarboxilasa (Popkin & Maas 1980). El gen *lysP* codifica una permeasa de lisina (Steffes et al. 1992), desconociéndose hasta el momento el posible papel regulador de esta proteína.

Las enzimas restantes de la ruta de la cadaverina, cadaverina aminotransferasa y $^1\Delta$ -piperideina deshidrogenasa, se regularían de forma independiente a la lisina descarboxilasa, siendo inducidos por cadaverina.

4. TRANSPORTE DE AMINOÁCIDOS BÁSICOS EN BACTERIAS.

Los sistemas de transporte de aminoácidos son ubicuos en el conjunto de seres vivos, apareciendo tanto en eucariotas como en procariotas. Puesto que los aminoácidos pueden ser utilizados en el catabolismo, en la síntesis proteica y/o en la transducción de señales. El transporte de un único aminoácido está mediado por múltiples sistemas con distinto grado de especificidad (Oxender 1972). En general las bacterias poseen transportadores de alta afinidad específicos para un aminoácido o una familia de aminoácidos relacionados estructuralmente, y, transportadores generales de aminoácidos.

A continuación se describen los distintos sistemas de transporte implicados según la organización propuesta por Busch y Saier (2002):

Canales o poros: Implicados en procesos de difusión pasiva en los que el sustrato atraviesa la membrana a través de un poro o canal sin que haya asociado un gasto de energía. Dentro de esta clase nos encontramos las porinas. Estas proteínas se encuentran en la membrana externa formando láminas β antiparalelas conocidos como barriles β (Hancock & Brinkman 2002). A su vez, las porinas se dividen en distintas familias. Por su interés en el transporte de lisina cabe destacar en *P. aeruginosa* OprD2, directamente implicada en el transporte de aminoácidos básicos y péptidos de pequeño tamaño que contienen estos aminoácidos (Trias & Nikaido H. 1990). Esta proteína está regulada por múltiples sistemas que implican a MexT, salicilato y represión por catabolito (Kohler et al. 1997; Ochs et al. 1999). Se activa por arginina/ArgR y otra serie de aminoácidos que actúan como fuente de carbono y/o nitrógeno (Ochs et al. 1999).

Transportes energizados por potencial electroquímico. Se trata de un sistema de transporte secundario ya que la energía utilizada para el mismo está acoplada a la fuerza protón motriz o sodio motriz. Generalmente presentan una estereoespecificidad estricta. En *Corynebacterium glutamicum*, bacteria Gram +, se ha descrito un sistema de transporte altamente específico para lisina con una K_m de 10 μ M (Broer & Kramer 1991). Se trata de un sistema de intercambio de lisina o “antiporte”. Cuando existe una demanda de lisina intracelular, este sistema actúa intercambiando valina, alanina o leucina intracelular por lisina extracelular. Cuando se alcanza una concentración

intracelular de lisina óptima, actúa intercambiando lisina-lisina sin que exista un transporte neto (Broer & Kramer 1991; Burkovski & Mer 2002). El transportador de lisina está codificado por el gen *lysI*, y posee un alto grado de similitud con el “antiporter” lisina-arginina (Seep-Feldhaus et al. 1991). En ocasiones, *C. glutamicum* puede transportar péptidos ricos en lisina al medio intracelular, provocando que la concentración en el interior celular de este aminoácido sea alta, puesto que carece de las enzimas necesarias para catabolizarlo. Esto origina que se active un sistema de translocación de este aminoácido al exterior celular (Erdmann et al. 1993). El translocador de lisina está codificado por el gen *lysE* (Vrljic et al. 1995; Vrljic et al. 1996), en sentido 5' se encuentra su regulador transcripcional *lysG* encargado de activar la transcripción de *lysE*, ambos genes se transcriben en sentido opuesto existiendo solapamiento de la región promotora (Bellmann et al. 2001). Los aminoácidos L-lisina, L-arginina, L-histidina y/o L-citulina son requeridos para la expresión de *lysE*, sin embargo, este sistema sólo excreta lisina o arginina (Bellmann et al. 2001). La K_m de LysE para el aminoácido L-lisina es tres veces mayor que la del transportador LysI (Broer & Kramer 1991). Hasta el momento no se ha descrito ningún sistema de exportación de aminoácidos básicos en otras bacterias.

Transportadores primarios. Encargados del transporte activo que suele ir en contra de gradiente, usando para ello una fuente primaria de energía. Dentro de esta clase se encuentran los sistemas de tipo ABC, acoplados a la hidrólisis de grupo fosfato.

Los sistemas de transporte de tipo ABC (ATP binding cassette) están ampliamente extendidos en el conjunto de seres vivos. Presentan una organización típica constituida por: una o dos proteínas integrales de membrana (permeasas), una proteína periplásmica (o lipoproteína en Gram +) de unión a sustrato y una o dos proteínas de unión a ATP, encargadas de llevar a cabo la hidrólisis de la misma. (Tam & Saier 1993; Saurin & Dassa 1994). Los genes que codifican estos componentes frecuentemente se disponen formando un operón (Higgins 1992).

La proteína de unión a ATP es el componente más conservado (Ames et al. 1990) y constituye el elemento energizador del sistema de transporte ya que posee un dominio de unión a ATP y/o de hidrólisis del ATP, se trata de una región de unos 200 aminoácidos que posee dos sitios conservados que constituyen este dominio. Se trata de proteínas hidrofílicas localizadas en la cara citoplasmática de la membrana asociados a

componentes de la membrana (Young & Holland 1999). Pueden presentarse formando homo, hetero o pseudodímeros. Las medidas *in vivo* de la estequiometría de la hidrólisis de moléculas de ATP por molécula de sustrato transportado indican un valor de 2 (Mimmack et al. 1989) sugiriendo la existencia de dos subunidades ATPasa por complejo de membrana. Aunque existe cierta variabilidad al respecto.

La proteína de unión a sustrato es el componente de mayor especificidad del sistema, siendo la más abundante y con una elevada afinidad por el sustrato (di Guan et al. 1988). En algunas ocasiones existe más de una proteína periplásmica capaz de interaccionar con el complejo de membrana (Adams et al. 1990).

Las proteínas integrales de membrana suelen presentar seis segmentos transmembranas (hélices α hidrofóbicas) separadas por fragmentos hidrofílicos. Se trata del componente menos conservado del sistema de transporte. No obstante, se ha podido definir un dominio conservado de 90 aminoácidos en el extremo carboxílico terminal conocido como lazo EAA (Saurin & Dassa 1994). Podría tratarse de la zona de unión de esta proteína con el dominio ABC (Mourez et al. 1997).

En bacterias Gram negativas se han descrito varios transportadores activos para lisina: un sistema general de transporte de aminoácidos básicos (lisina, arginina y ornitina) y uno específico para lisina, descritos en *E. coli* (Rosen 1971; Celis et al. 1973; Rosen 1973) y *Pseudomonas* (Miller & Rodwell 1971a; Fan et al. 1972).

Transporte general de aminoácidos básicos: Los primeros estudios de transporte en *Pseudomonas* se remontan a los años 70. En *P. putida* (Miller & Rodwell 1971a) se identificó un transportador común para L-lisina, L-arginina y/o L-oritina a partir de células preincubadas con L-lisina, observando la inducción del transporte para estos aminoácidos. La presencia de las formas isoméricas D y L, inhibían el transporte de estos aminoácidos, sugiriendo que este transportador es común para ambas formas o la rápida racemización de las mismas. Este transportador posee una elevada K_m y un amplio espectro de especificidad por sustrato. Por ejemplo, para lisina la K_m es 7.3×10^{-6} M y la V_{max} de 128 nmoles por minuto por mg de proteína. En células de *P. putida* incubadas con L-arginina deja de estar inducido este sistema dando paso a un transportador específico para L-arginina (Chang 1972).

En *E. coli* también se ha descrito este transportador (Rosen 1971; Celis et al. 1973) denominado LAO (lisina, arginina y ornitina). A diferencia del sistema de

transporte definido en *P. putida*, en *E. coli* este sistema se inhibe por L-arginina, L-ornitina y L-histidina y sólo transporta L-lisina ($K_m = 1,0 \times 10^{-7} M$) y L-ornitina (Rosen 1971; Rosen 1971; Celis et al. 1973; Rosen 1973; Steffes et al. 1992). El sistema LAO pertenece a la familia de permeasas de aminoácidos básicos sensible a choque osmótico (Ames et al. 1990).

En *Salmonella typhimurium* se ha cristalizado la proteína de unión a Arg, Lys y Orn (LAO) perteneciente a este sistema de transporte (Kang et al. 1991). El gen que codifica esta proteína, *argT*, es adyacente a *hisJ* (implicada en el transporte de histidina) (Kustu et al. 1979; Higgins & Ames 1981; Higgins & Ames 1981). Ambas proteínas poseen un alto grado de similitud. Se postula que los genes *hisJ* y *argT* podrían haberse originado a partir de una duplicación en tandem y haber llevado una evolución divergente transportando distintos sustratos, y, manteniendo su capacidad para interaccionar con el mismo complejo de transporte (Higgins & Ames 1981), en concreto, con el componente de unión a membrana (proteína P).

Transporte de diaminoácidos: En *P. putida* (Chang 1972) y en *E. coli* (Rosen 1973) se ha descrito un segundo sistema de transporte específico para L-lisina y L-ornitina. Chang (1972) observó que células de *P. putida* incubadas con bajas concentraciones de lisina tenían inducido un sistema de transporte específico para L-lisina ($K_m = 4,1 \times 10^{-7} M$; $V_{max} = 25$) y L-ornitina ($K_m = 1,3 \times 10^{-7}$; $V_{max} = 100$). Este sistema se inhibe por las formas D y L de estos aminoácidos, incluyendo la D-arginina.

En *E. coli* se ha descrito un transportador específico para L-lisina ($K_m = 5 \times 10^{-6} M$), LysP (Rosen 1971; Steffes et al. 1992). Este sistema es inhibido por análogos de lisina, pero no por ornitina o arginina (Rosen 1971). Parece existir una relación en cuanto a la expresión de los dos transportadores de L-lisina descritos en *E. coli*, LysP y LAO (Rosen 1971; Rosen 1973). Cuando las células de *E. coli* son incubadas en un medio salino, a pH neutro y bajo condiciones aeróbicas, ambos sistemas contribuyen en la misma proporción al transporte de lisina, sin embargo, cuando son cultivadas en un medio rico en nutrientes predomina el sistema LysP. Steffes y colaboradores (1992) demostraron que la expresión de LysP se inducía a pH ácidos, anaerobiosis y/o en presencia de L-lisina. Sin embargo, estudios más reciente revelaron que la expresión de dicha proteína es independiente de pH, reduciéndose su expresión en presencia de L-lisina (Neely & Olson 1996). Mutaciones en el gen LysP desencadenan un efecto

Introducción

pleiotrópico provocando, entre otros, una desregulación de la lisina descarboxilasa CadA, desreprimiéndola (Tabor et al. 1980; Popkin & Maas 1980; Steffes et al. 1992). La proteína LysP es un miembro de la familia de permeasas de aminoácidos aromáticos y básicos presentes en eucariotas y procariotas, cercanas a las permeasas de aminoácidos básicos de hongos (Steffes et al. 1992). Ellis y colaboradores (Ellis et al. 1995) propusieron que esta proteína posee doce dominios transmembrana, con sus dominios carboxi y amino terminales situados en el citosol.

El transporte de lisina en levaduras, *Saccharomyces cerevisiae*, es similar al descrito en bacterias con una permeasa específica de lisina, Lyp1, homologa a la de *E. coli* (Grenson 1966; Sychrova & Chevallier 1993), una permeasa común para L-lisina, L-arginina y L-ornitina (Grenson et al. 1970), y una permeasa general de aminoácidos (Grenson et al. 1970). El último sistema se diferencia de los otros dos en que no se inhibía por amonio.

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 un gen cuya expresión era inducible por exudado de raíz. Espinosa-Urgel y Ramos (2001) comprobaron que dicho gen (*davT*) codificaba una proteína implicada en el catabolismo de L-lisina, concretamente, en la ruta de degradación de δ -aminovalerato a glutarato. Se trataba del primer gen del catabolismo de lisina identificado en *Pseudomonas* hasta el momento. Estos estudios fueron la base sobre las que se establecieron los objetivos de esta Tesis Doctoral:

1. Caracterización del promotor del operón *davT*, que incluye, estudio de la región promotora, análisis de la expresión de P_{dav} , determinación de aquellos factores implicados en su expresión.
2. Elucidación de las distintas rutas implicadas para el catabolismo de L-lisina en *Pseudomonas putida* KT2440, e identificación de aquellos genes implicados en dichas rutas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales y Métodos.

1. CEPAS BACTERIANAS Y SU CONSERVACIÓN:

1.1.-Estirpes bacterianas empleadas:

En este trabajo se han utilizado cepas bacterianas de la colección del grupo de Biodegradación de Tóxicos Orgánicos de la Estación Experimental del Zaidín (CSIC-Granada), y cepas cedidas por otros grupos de investigación. Las estirpes utilizadas en este trabajo, junto con su fenotipo o sus características genotípicas más relevantes, se recogen en la Tabla M.1.

Tabla M.1: Estirpes bacterianas.

<i>Pseudomonas putida</i>	Características	Referencia
KT2440	<i>hsdMR</i> , Ben ⁺ , Cm ^R	(Franklin et al. 1981)
KT2440-rpoN ⁻	KT2440, <i>rpoN::Km</i> , Km ^R	(Kohler et al. 1989)
KT2440-C1R1	KT2440, <i>rpoS::Km::luxAB</i> , Km ^R	(Ramos-Gonzalez & Molin 1998)
KT2440 <i>davA</i>	KT2440 con el plásmido pCHESI integrado en el cromosoma (inserción en el gen <i>davA</i>), Km ^R .	Este trabajo
KT2440 <i>davB</i>	Mutante de la cepa KT2440 incapaz de utilizar L-lisina como fuente de carbono; obtenido por inserción cromosómica de un miniTn5-Km, Km ^R .	Este trabajo
KT2440 <i>ldc</i>	KT2440 con el plásmido pCHESI integrado en el cromosoma (inserción en el gen <i>ldc</i>), Km ^R .	Este trabajo
KT2440 <i>amaA</i>	Mutante de la cepa KT2440 incapaz de utilizar L-lisina como fuente de carbono; obtenido por inserción cromosómica de un miniTn5-Km, Km ^R .	Este trabajo

KT2440 <i>dpkA</i>	Mutante de la cepa KT2440 incapaz de utilizar L-lisina como fuente de carbono; obtenido por inserción cromosómica de un miniTn5-Km, Km ^R .	Este trabajo
KT2440 <i>amaB</i>	Mutante de la cepa KT2440 incapaz de utilizar L-lisina como fuente de carbono; obtenido por inserción cromosómica de un miniTn5-Km, Km ^R .	Este trabajo
KT2440 <i>rei2-6</i>	Mutante derivado de <i>rei2</i> afectado en su capacidad para transportar L-lisina; obtenido por inserción cromosómica de un miniTn5-Gm, Km ^R y Gm ^R .	Este trabajo
KT2440 <i>rei2-7</i>	Mutante derivado de <i>rei2</i> afectado en su capacidad para transportar L-lisina; obtenido por inserción cromosómica de un miniTn5-Gm, Km ^R y Gm ^R .	Este trabajo
KT2440- <i>rei2</i>	Derivada de KT2440, miniTn-5-Km- <i>luxCDEAB</i>	(Espinosa-Urgel <i>et al.</i> 2000)

<i>Escherichia coli</i>	Características	Referencia
S17-1 λ pir	<i>RecA</i> , <i>thi</i> <i>pro</i> <i>hsdR</i> M ⁺ Tn7, λ pir.	RP4:2-Tc:Km (Ramos et al. 1994)
HB101 RK2073	<i>supE44</i> <i>hsdS20</i> (<i>r_B⁻m_B</i>) <i>recA13</i> <i>ara-14</i> <i>proA2</i> <i>lacY1</i> <i>galK2</i> <i>rpsL20</i> (<i>Sm^R</i>) <i>xyl-5</i> <i>mtl-1</i>	(Boyer & Roulland-Dussoix 1969)
JM109	<i>recA1</i> <i>supE44</i> <i>endA1</i> <i>hsdR17</i> (<i>r_K⁻m_K⁺</i>) <i>gyrA96</i> (Nal ^R) <i>relA1</i> <i>thi</i> Δ (<i>lac-proAB</i>) F'[<i>traD36</i> <i>proAB⁺</i> <i>lacI^f</i> <i>lacZ</i> Δ M15]	(Yanisch-Perron et al. 1985)
DH5 α	<i>supE44</i> Δ <i>lacU169</i> (ϕ 80 <i>lacZ</i> Δ M15) <i>hsdR17</i> (<i>r_B⁻m_B</i>) <i>recA1</i> <i>endA1</i> <i>gyrA96</i> (Nal ^R) <i>thi-1</i> <i>relA1</i> .	(Hanahan 1983)

1.2.-Conservación de las estirpes bacterianas.

La conservación a corto plazo se realizó mediante estría en placa, en medios selectivos, almacenados a 4°C durante un periodo máximo de un mes. Para su

almacenamiento a más largo plazo se mantuvieron congeladas a -80°C con glicerol al 30% (v/v).

2. PLÁSMIDOS.

En la Tabla M.2 se muestran los plásmidos usados en este trabajo así como sus características más relevantes. A continuación se describen con más detalle las características de dichos plásmidos.

Tabla M.2. Plásmidos utilizados en este trabajo.

Plásmido	Característica	Referencia
pBBR1MCS-5	Gm ^R ; oriTRK2, α -complementación	(Kovach et al. 1995) GenBank: U25061
pBSaphA	Plásmido pSB que porta un casete de resistencia a Km	(Ménard et al. 1993)
pUC18	Ap ^R ; oriColE1, <i>rop</i> ⁻ , α -complementación	(Norrander et al. 1983) GenBank: L08752
pUC18Not	Ap ^R ; idéntico a pUC18 pero con sitios <i>NotI</i> flanqueando el SMC de pUC18	(Herrero et al. 1990)
pGEMT	Ap ^R ; vector de clonaje para fragmentos de PCR.	Promega
pKNG101	Sm ^R ; <i>oriR6K</i> ; <i>oriTRK2</i> ; <i>sacB</i>	(Kaniga et al. 1991)
pCHESIΩKm	Ap ^R , Km ^R ; pUNØ18 con fragmento <i>HindIII</i> de pHP45ΩKm (interposón Ω-Km), <i>oriTRP4</i>	(Llamas et al, 2003)
pMP220	Tc ^R ; IncP, amplio espectro de huésped, porta 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)

pBBR1MCS5: plásmido de 4.768 pb de medio número de copias (30-40 copias/célula en *E. coli*) y de amplio espectro de huésped, derivado de pBBR1MCS (Kovach et al. 1995). Este último plásmido deriva a su vez de un plásmido de *Bordetella bronchiseptica* (Antoine & Locht 1992). El plásmido pBBR1MCS-5 posee el SMC y las regiones *lac* de pBluescript-II-KS que permiten la α -complementación. Flanqueando al SMC, el plásmido posee los promotores de los bacteriófagos T3 y T7. Este plásmido, que se replica en bacterias del género *Escherichia*, *Pseudomonas* y *Rhizobium* entre otros, es compatible con otros plásmidos de amplio espectro de huésped pertenecientes a los grupos de incompatibilidad IncP, IncW e IncQ, y también con aquellos que poseen

orígenes de replicación de ColEI o de p15A. Además, se puede transferir por conjugación a otras bacterias cuando se aportan las funciones de movilización de RK2 en *trans*. El plásmido pBBR1MCS-5 confiere resistencia gentamicina (Figura M.1).

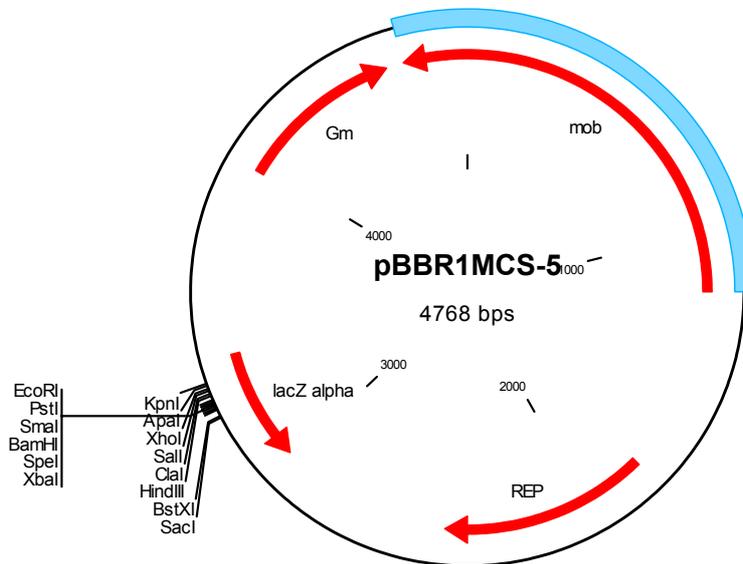


Figura M.1: Plásmido pBBR1MCS-5. Los sitios de restricción indicados son únicos y están localizados en el SMC dentro del gen *lacZ'*. Se muestra la localización: del gen *rep*, que codifica una proteína esencial para la replicación, del gen *mob*, que codifica una proteína esencial para la movilización por conjugación, y del gen de resistencia a gentamicina. Las flechas indican el sentido de la transcripción de los genes.

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 permite identificar directamente los clones recombinantes mediante selección por color. El vector [pGEM-T5Zf(+)] cortado con *EcoRV* y al que se le añade una timidina en cada extremo 3', que mejora la eficiencia de la ligación de los productos de PCR.

pCHES Ω Km: plásmido de 5.673 pb derivado de pUC18, caracterizado por poseer el origen de replicación *oriT* de RP4, lo cual permite transferirlo a otras bacterias en

presencia de las funciones de movilización en *trans*. Posee el interposón Ω -Km, del plásmido pHP45 Ω -Km, insertado en el sitio *Hind*II del SMC en dirección 5' del promotor P_{lac}. Gracias al origen *ori*ColE1 permite la generación de mutantes en bacterias gram negativas en las que no se repliquen los plásmidos con tal origen, tratándose de plásmidos suicidas en estas bacterias. Para la obtención de dichos mutantes es necesario la clonación de un fragmento interno del gen a mutar en el SMC del plásmido. Los mutantes obtenidos se seleccionan y mantienen gracias a la resistencia a Km y Ap. Se pueden obtener mutaciones polares si el fragmento se clona en dirección del P_{lac}, o no polares, si se encuentra en la dirección contraria (Figura M.2)

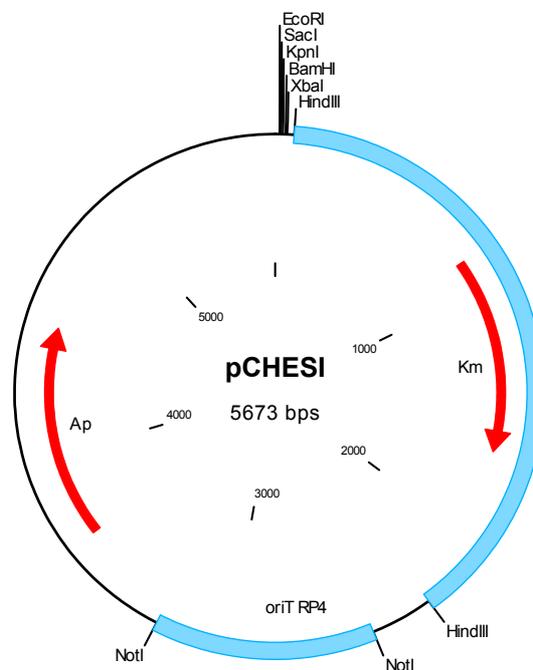


Figura M.2: Plásmido pCHESI Ω Km. Los sitios de restricción únicos se indican en negrita. Se muestra la localización del origen de transferencia (*ori*TRP4), del gen de resistencia a ampicilina y del interposón Ω Km. Las flechas indican el sentido de transcripción de los genes.

pKNG101: plásmido suicida utilizado en experimentos de intercambio alélico que permite la selección positiva de eventos de doble recombinación en bacterias gram negativas. Posee el origen de replicación del plásmido R6K, que es dependiente de la proteína π codificada por el gen *pir* y, por tanto, sólo se mantiene en bacterias que

producen dicha proteína (por ejemplo, *E. coli* CC118 λ pir). Presenta el origen de transferencia de RK2, lo que permite transferirlo a otras bacterias si se aportan las funciones de movilización en *trans*. Posee los genes *strA* y *strB* de resistencia a estreptomicina, que sirven como marcador de selección de la integración del vector en el cromosoma de la bacteria huésped. Su característica más relevante es que porta el gen *sacB* de *Bacillus subtilis* como marcador contra-seleccionable, lo que permite seleccionar positivamente la escisión del vector del cromosoma. Este gen, codifica una levan-sacarasa que cataliza la hidrólisis de sacarosa así como la síntesis de levanos que, en bacterias gram negativas, se acumulan en el periplasma y producen la muerte celular cuando la concentración de sacarosa es mayor o igual al 5% (p/v).

pMP220: plásmido de 10.5 kb, aproximadamente, derivado del vector pTJS75 (Schmidhauser & Helinski 1985) perteneciente al grupo de incompatibilidad IncP. Posee el SMC de pIC20H (Marsh et al. 1984), así como, el gen *lacZ'* de *E. coli* desprovisto de promotor y con el sitio de unión al ribosoma del gen *cat* (que codifica la enzima cloramfenicol acetiltransferasa). Esta característica permite realizar fusiones transcripcionales de promotores al gen *lacZ'* en el SMC y llevar a cabo un estudio de expresión de tales promotores mediante análisis de la actividad β -galactosidasa. Confiere resistencia a tetraciclina (Figura M.3).

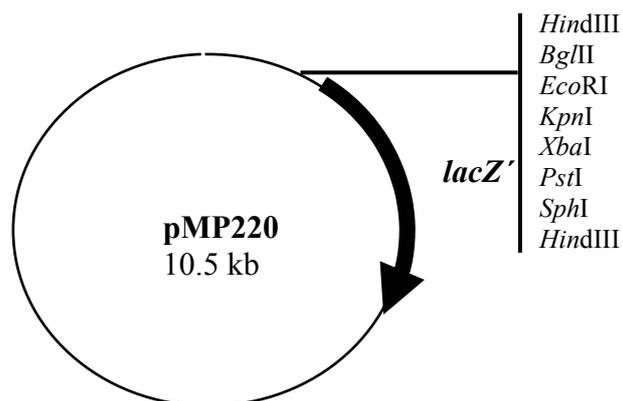


Figura M.3: Esquema del plásmido pMP220. Los sitios e restricción indicados son únicos y están localizados en el SMC. En sentido 5' del gen *lacZ'* se encuentra el sitio de unión al ribosoma derivado el gen cloramfenicol acetil transferasa.

RK600: se trata de un plásmido auxiliar que confiere las funciones necesarias para la movilización de plásmidos *mob⁺tra⁻*. Se trata de un plásmido suicida en *Pseudomonas*, ya que posee el origen de replicación *oriColE1*. Confiere resistencia a cloramfenicol.

pUC18: vector de clonación de 2.686 pb que combina fragmentos de pBR322 y de vectores de la serie M13mp. Carece del gen *rop* implicado en el control del número de copias de plásmidos que contienen el origen de replicación de ColE1, y como consecuencia, presenta un alto número de copias (más de 700) por célula. Confiere resistencia a ampicilina, y posee un sitio de clonación múltiple (SMC) 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 *lac-Z* 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 sólido suplido con ampicilina y con 25 μ 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 μ M de isopropil- β -D-tiogalactopiranosido (IPTG).

pUT: se trata de una serie de plásmidos, construidos a partir del vector pGP704 (Herrero 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 (IS/O e IS/I), 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.

pUTKm1: plásmido de la serie pUT, portador del miniTn5-Km1. El gen de resistencia a kanamicina deriva del transposón Tn903, carece de los terminadores de la transcripción. El sitio *NotI*, único en el plásmido, se encuentra delante del promotor del

gen que codifica resistencia a la kanamicina. Es un plásmido suicida en *Pseudomonas*, al poseer el origen de replicación del plásmido R6K, lo que permite su utilización para mutagénesis al azar con el transposón (Figura M.4).

pUTGm: plásmido de la serie pUT portador del miniTn5Gm.

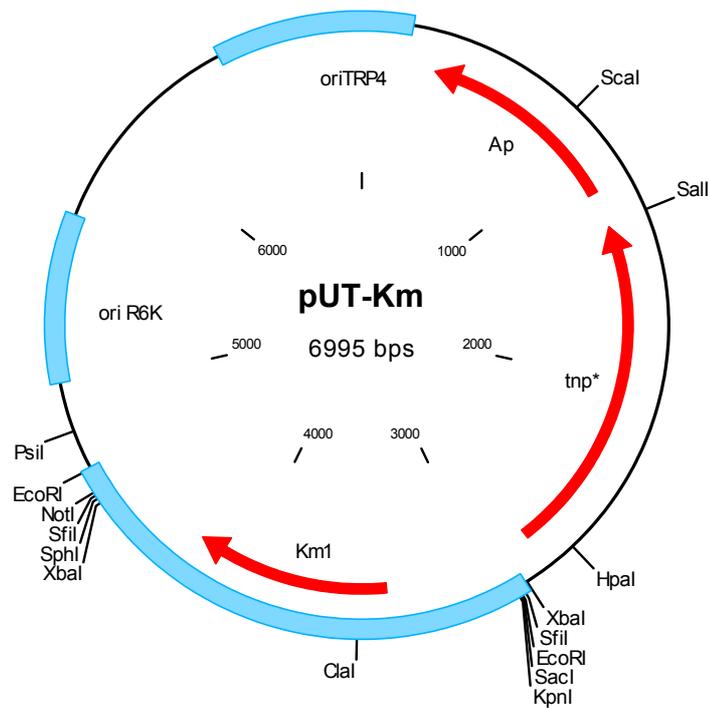


Figura M4: Plásmido de la serie pUT portador del miniTn5-km1. En el mapa se indican los sitios de restricción más relevantes, los orígenes de replicación y de transferencia, el gen de resistencia a ampicilina y el gen *tnp**. Este gen es un derivado de *tnp* (que codifica la transposasa de IS50_R) en el cual se ha eliminado un sitio *NotI* interno. Las unidades móviles que se muestran están clonadas en el pUT como fragmentos *XbaI-EcoRI*. Ambos sitios son externos a los extremos del minitransposón, indicado en azul, y no son transportados con éste durante el evento de transposición.

Tabla M.3. Plásmidos que se han construido en este trabajo.

Plásmido	Características	Referencia/fuente
pOR1	Fusión transcripcional de la región intergénica <i>davDT</i> a <i>lacZ'</i> en el pMP220; región intergénica amplificada mediante PCR introduciendo los sitios <i>EcoRI-KpnI</i> .	Capítulo I
pOR2	Fusión transcripcional de la región promotora de <i>davDT</i> a <i>lacZ'</i> en el pMP220; región promotora amplificada por PCR introduciendo los sitios de restricción <i>EcoRI-KpnI</i> .	Capítulo I
pOR3	Fusión transcripcional de la región promotora de <i>davAB</i> a <i>lacZ'</i> en el pMP220; región promotora amplificada por PCR introduciendo los sitios de restricción <i>EcoRI-KpnI</i> .	Capítulo II
pGEM-davDT	Fragmento de 1 Kb amplificado por PCR clonado en pGEMT; contiene el gen <i>davA</i> .	Capítulo I
pBBama	Fragmento de 3,5 Kb derivado de un cósmido y clonado en pBBR1MCS-5. Contiene los genes <i>amaAB</i> .	Capítulo II
pBBdav	Fragmento derivado de un cósmido y clonado en pBBR1MCS-5. Contiene los genes <i>davAB</i> .	Capítulo II

3. CONDICIONES Y MEDIOS DE CULTIVO.

Los medios de cultivo y soluciones fueron previamente esterilizados bajo calor húmedo, en autoclave, siendo sometidos a una temperatura de 121°C y una atmósfera de presión. Los antibióticos, aminoácidos y derivados, se esterilizaron por filtración. Para ello se utilizaron filtros estériles de nitrocelulosa o policarbonato de 0,22 µm de diámetro de poro. A continuación se detalla la composición de los medios.

3.1 Medios de cultivo:

Como medio habitual de crecimiento se utilizó el medio Luria-Bertani (LB) (Sambrook et al. 1989), cuya composición es la siguiente: 10 g de bacto-triptona, 5 g de extracto de levadura, 10 g de NaCl. Se ajusta el pH a 7, y se enrasa con agua desionizada hasta 1 litro. 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.

Para el cultivo de células en medio mínimo se usó una variante del medio M9 (Maniatis et al. 1982). Para preparar 1 litro de solución M9 se añadieron los siguientes medios en las cantidades indicadas: 100 ml 10 x M9; 2,5 ml solución A; 1 ml MgSO₄ 1 M; 1 ml hierro-citrato 0,6% (p/v); finalmente se enrasó hasta 1 litro con H₂O. Previamente deben haber sido autoclavados M9, solución A y el agua, mientras que los restantes se filtraron.

Se han usado dos tipos de medios: M9 y M8.

10 x M9 (Maniatis et al. 1982): Na₂HPO₄·12H₂O 70 g, KH₂PO₄ 30 g; NH₄Cl 10 g; NaCl 5 g, H₂O hasta 1 litro.

10 x M8: Su composición es idéntica al M9, sin embargo, carece de fuente de nitrógeno. No se añade NH₄Cl lo cual nos permite añadir otras sustancias que actuarían como fuente de nitrógeno.

Solución A9 de oligo elementos: HBO₃ 300 mg; ZnCl₂ 50 mg; MnCl₂ 30 mg; CaCl₂ 200 mg; CuCl₂ 10 mg; NiCl₂ 20 mg; NaMoO₄·2H₂O 30 mg. Se lleva a un volumen final de un litro con agua.

Estos medios van suplidos con una fuente de carbono, previamente esterilizada:

Glucosa: Se prepara una solución concentrada 1,12 M, para obtener una concentración final de 28 mM en el medio de cultivo. Se almacena a 4°C.

Benzoato: Se prepara una solución concentrada a 0,5 M a pH 7,0. La concentración final utilizada es de 15 mM en medio líquido y 5 mM en placa. Se almacena a temperatura ambiente. Esta fuente de carbono se añade cuando la cepa que cultivamos es *Pseudomonas*.

Otras fuentes de carbono utilizadas: citrato 15 mM; succinato 15 mM, glutarato 15 mM y lisina 20 mM.

3.2 Aminoácidos y derivados:

Los aminoácidos se disolvieron en agua desionizada (H₂O_d) y se esterilizaron por filtración. La lisina, el δ-aminovalérico, el 2-aminoadipato y el pipercolato se usaron partiendo de una solución madre de 40 mg/ml. La cadaverina se preparó a una concentración 8 M en agua.

3.3 Antibióticos:

Los antibióticos se prepararon en agua desionizada (H_2O_d) concentrados 1.000 veces y se esterilizaron por filtración. La tetraciclina (Tc), rifampicina (Rif) y nalidixico (Nal) se prepararon en metanol, y el cloramfenicol (Cm) en etanol. Se almacenaron a 4°C, con excepción de aquellos resuspendidos en etanol y metanol que se almacenaron a -20°C. Las concentraciones finales usadas fueron las siguientes:

Piperacilina (Pip) 90 µg/ml; ampicilina (Ap) 100 µg/ml; estreptomicina (Sm) 50 µg/ml (para *E.coli*) o 100 (para *P. putida*); kanamicina (Km) 25 µg/ml (para *E.coli*) o 50 µg/ml (para *P. putida*); cloranfenicol (Cm) 30 µg/ml; tetraciclina (Tc) 10 µg/ml (para *E.coli*) o 20 µg/ml (para *P. putida*); rifampicina (Rif) 10 µg/ml (para *E.coli*) o 20 µg/ml (para *P. putida*); nalidixico (Nal) 10 µg/ml; gentamicina (Gm) 10 µg/ml (para *E.coli*) o 40 µg/ml (para *P. putida*).

3.4 Condiciones de cultivo:

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

4. CURVAS DE CRECIMIENTO.

Las cepas a estudiar se cultivaron a 30°C con agitación continua durante 10-14 horas en medio mínimo M9 suplido con la fuente de carbono y antibióticos correspondientes. Los cultivos se diluyeron 1:100, hasta una turbidez a 660 nm (DO_{660}) comprendida entre 0,02 y 0,05, en el medio de estudio. Se siguió el incremento de la turbidez hasta que el cultivo alcanzó la fase estacionaria de crecimiento.

El tiempo de generación se calculó según la siguiente fórmula:

$$g = \ln 2(t-t_0) / \ln (DO / DO_0)$$

Donde: g es el tiempo de generación; t , el tiempo transcurrido hasta alcanzar la fase logarítmica tardía; t_0 , tiempo inicial en fase logarítmica temprana; DO , turbidez del cultivo a tiempo t ; y DO_0 , turbidez del cultivo a tiempo t_0 .

5. TRANSFERENCIAS DE PLÁSMIDOS.

5.1 Transferencia por conjugación.

La movilización a *P. putida* de los plásmidos no autotransferibles con el origen de transferencia del plásmido RP4 (*oriTP4*) o del plásmido RK2 (*oriTRK2*) se realizó mediante conjugación. Se transfiere el ADN desde una cepa donadora a una receptora, gracias a la existencia de una tercera cepa auxiliar que permite que la transferencia se lleve a cabo con éxito. Este sistema se llama tripartito o triparental (Ramos et al. 1994). La movilización del ADN plasmídico se realiza gracias a una cepa que porta un plásmido auxiliar autotransferible (pRK600) no replicable en *Pseudomonas*, portador de los genes *tra*, y por tanto, de las funciones de transferencia.

A partir de cultivos que habían estado creciendo durante toda la noche, en LB, con agitación continua a 30°C (cepa donadora, receptora y la portadora del plásmido auxiliar), se mezclaron 5×10^8 células de cada cultivo y se centrifugaron a 12.000 x g durante 2 minutos. Se lavaron dos veces y finalmente se resuspendieron en 50 μ l de LB, depositándose sobre un filtro de nitrocelulosa estéril de 0,22 μ m de diámetro de poro, dispuesto sobre una placa de LB sólido. Se dejaron durante 12 h a 30°C, para que tuviera lugar la conjugación. Transcurrido este tiempo se recogió el filtro y las células se resuspendieron en 1 ml de LB. Los transconjugantes se seleccionaron en un medio adecuado portador del correspondiente antibiótico. Como control debe plaquearse el receptor, donador y la cepa portadora del plásmido auxiliar en el medio selectivo que hemos usado. La frecuencia de transconjugantes se obtiene a partir de la relación existente entre el número de transconjugantes obtenidos y el número de células receptoras de partida.

5.2 Transferencia por choque térmico.

Existe una serie de estrategias que nos permiten introducir plásmidos o fragmentos de ADN, en células que han sido tratadas previamente mediante una serie de mecanismos que las hacen susceptibles de admitir ADN extraño, adquiriendo un estado que se denomina competente. Estas estrategias se llevan a cabo en cepas de *E.coli*.

5.2.1.-Preparación de células competentes.

Para preparar células competentes existen distintos métodos, uno de los más usados fue el descrito por Nishimura y colaboradores (1990). Se detalla a continuación. Partimos de un cultivo que haya estado creciendo durante 12 h a 37°C con agitación, en LB suplido con sus correspondientes antibióticos. De éste se inocularon 0,5 ml en 50 ml de solución A junto con su correspondiente antibiótico, se cultivó a 37°C con agitación (es importante que exista suficiente aireación). Cuando el cultivo alcanzó la fase exponencial de crecimiento con una turbidez a D.O₆₆₀ de 0,5-0,6, se transfirió a hielo y se incubó durante 20 minutos. A partir de este momento es importante trabajar en frío pues aumenta la eficiencia de transformación. Transcurrido este tiempo se centrifugó a 3200 g a 4°C durante 15 minutos. Finalmente las células se resuspendieron en 0,5 ml de solución A y 2,5ml de solución B, frías, y fue alicuotado en 0,2 ml. Estas células se guardaron a -80°C.

La composición de las soluciones usadas fue la siguiente:

Solución A: LB suplementado con MgSO₄x7H₂O 10 mM y glucosa al 0,2%. Esta solución es extemporánea y debe ser preparada en el momento de ser usada, mantenerla a 4°C durante este tiempo.

Solución B: LB junto con glicerol al 36% (v/v), polietilenglicol (PEG)-7500 al 12% (p/v) y MgSO₄x7H₂O 12 mM. Mantener a 4°C.

5.2.2.-Transformación.

Se sigue el método descrito por Nishimura y colaboradores (1990). A una alícuota de la suspensión celular preparada anteriormente, mantenida a -80°C, y a la que se le añadió el ADN plasmídico que queríamos transformar, se dejó en hielo durante 20

minutos. Pasado este tiempo se aplicó choque térmico a la mezcla, sometiéndola a 42°C durante 1-2 minutos. Posteriormente se añadió 1 ml de medio SOC y se dejó a 37°C en agitación durante aproximadamente una hora. Durante este tiempo tiene lugar la expresión de genes, entre los cuales estarán los de resistencia a antibióticos del plásmido introducido. Cuando se trató de ampicilina, se dejaron incubando menos de una hora de recrecimiento, dado que es bacteriostático, y puede dar problemas en la selección. Las células transformantes se seleccionaron recreciéndolas en placas de LB junto con el agente selectivo apropiado durante 12 h a 37°C.

5.3.-Transferencia por electroporación.

Este método es el más utilizado para transferir DNA a las cepas de *Pseudomonas*. Para llevarlo a cabo es necesario que las células que van a ser electroporadas sean electrocompetentes.

5.3.1.-Preparación de células electrocompetentes.

Para ello se siguió el siguiente protocolo (Enderle & Farwell 1998). Se partió de un cultivo reciente de *Pseudomonas putida* en medio sólido incubado a 30°C durante 10-14 horas (no debe mantenerse a 4°C pues baja la eficiencia). 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, recogándose 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.

5.3.2.-Electroporación.

Antes de llevar a cabo la electroporación la muestra de ADN plasmídico a electroporar debe estar libre de sales, para ello se dializó o fenolizó dicha muestra. Se añadieron 5-50 ng de ADN plasmídico en 5-10 µl de agua miliQ o TE, a las células electrocompetentes. Se dejaron 1 minuto en hielo y posteriormente se transfirieron a una

cubeta de electroporación de 1 mm de anchura previamente enfriada. La muestra se sometió a un pulso eléctrico de 18 kV/cm en un electroporador modelo Gene Pulser Apparatus (Bio-Rad, ref 165-2098). Rápidamente se resuspendieron en un 1 ml de medio SOC. A partir de aquí el procedimiento seguido fue el mismo que el indicado anteriormente.

6. AISLAMIENTO DE ADN.

6.1 Aislamiento de ADN plasmídico.

La cepa bacteriana portadora del plásmido de interés se cultivó con agitación durante 10-14 h a su temperatura en medio líquido LB con sus correspondientes antibióticos. Para la extracción del plásmido se usó el Kit “QIAprep-spin Plasmid Kit” (QIAGEN-27104) siguiendo las instrucciones del fabricante.

6.2 Extracción de ADN cromosómico.

Se utilizó el método descrito por Ausubel y colaboradores (1991), partiendo de 1,5-3 ml de cultivo bacteriano. Tras recoger las células por centrifugación y lavarlas con TE (Tris-HCl 10 mM pH 8, EDTA 1 mM), éstas fueron resuspendidas en 567 µl de la misma solución, a la que se le añadió posteriormente, 30 µl de SDS al 10% (vol/vol) y 3 µl de proteinasa K (20 mg/ml). Tras 1 h de incubación a 37°C, se les añadieron 100 µl de NaCl 5 M, agitando vigorosamente, y 80 µl 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 miliQ estéril y se cuantificó.

7. MANIPULACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS.

7.1. 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 H₂O o TE, dependiendo del solvente utilizado en la disolución del ácido nucleico. La concentración de ADN o ARN de la muestra se calculó respecto al valor estándar de $A_{260nm}=1$ para soluciones con 50 µg/ml de ADN de cadena doble o 40 µg/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.

En otros casos, se estimó la concentración de ADN tras electroforesis en gel de agarosa, mediante análisis comparativo con una muestra patrón de concentración conocida.

7.2. Digestión de ADN con enzimas de restricción.

Las digestiones de ADN con enzimas de restricción se realizaron en las condiciones óptimas para cada enzima indicadas por el fabricante. Las reacciones de restricción se efectuaron teniendo en cuenta que una unidad de enzima puede digerir 1 mg de ADN en un volumen final de 50 ml durante una hora. En la mezcla de reacción añadimos 0,1 volúmenes del tampón de restricción correspondiente, la casa comercial lo suministra diez veces concentrado. En los casos requeridos, se añadió albumina comercial. Se llevaron a un volumen final con agua miliQ o TE, y se incubaron durante 2-3 h a la temperatura adecuada, para ADN plasmídico, mientras que para ADN cromosómico se incubaron 12-16 h. Cuando fue necesario el enzima de restricción se inactivó por calor, por extracción fenólica, o por purificación del ADN tras electroforesis en gel de agarosa

7.3. Desfosforilación de ADN con fosfatasa alcalina.

Partimos de ADN lineal, previamente digerido con enzimas de restricción. Se añadió 1 unidad de fosfatasa alcalina de gamba ártica (USB. Amercham, ref E70092Z) por cada 5-10 pmoles de extremos 5'. Como tampón de dilución se utilizó 50 mM Tris-HCl, pH 8.0 suministrado por el fabricante. A la mezcla se añadió 0,1 volúmenes del tampón (200 mM Tris-HCl, pH 8.0, 100 mM MgCl₂) y se incubó 1 h a 37°C. Finalmente la reacción se detuvo por calor (10 minutos a 65°C) o mediante extracción fenólica.

7.4. Tratamiento del ADN con el fragmento Klenow de la ADN polimerasa I.

Este fragmento posee actividad ADN polimerasa y exonucleasa 3'→5' de la ADN polimerasa I de *E. coli*, por otro lado, carece de la actividad 5'→3' exonucleasa. Esta enzima es usada para generar extremos romos a partir de protuberantes 3'.

Partimos de 0,1 a 4 µg de ADN digeridos con sus correspondientes enzimas de restricción, en un volumen final de 20 µl. Se añadió 1 µl de cada dNTP 0,5 mM. Seguidamente se añadió de 1 a 5 unidades del fragmento Klenow e incubamos a 30°C durante 15 minutos. Detuvimos la reacción por calor (75°C durante 10 minutos) o añadiendo 1 µl de EDTA 0,5 M.

7.5. Electroforesis de ADN y ARN.

La electroforesis de ADN se llevó a cabo según Sambrook y colaboradores (1989), utilizando los geles de agarosa preparados en tampón Tris/Acetato/EDTA (TAE). La concentración de agarosa usada variaba entre 0,8-2% (p/v) en función del tamaño de los fragmentos que se deseaba separar. Como patrones de peso molecular se usaron los fragmentos de ADN del fago lambda cortado con las enzimas *Hind*III, *Bst*EII, o *Hind*III más *Eco*RI, y los marcadores comerciales VIII y X (Roche Molecular Biochemicals, ref. 1336045 y ref. 1498037, respectivamente). La separación se realizó por electroforesis horizontal sumergida a un voltaje de 5-10 V/cm.

Las moléculas de ADN se tiñeron por inmersión en una solución con bromuro de etidio. Tras lavar con agua para eliminar el exceso de bromuro de etidio, el ADN se visualizó mediante la exposición del gel a luz ultravioleta (245 nm). Las imágenes se recogieron en una video-cámara acoplada a una impresora térmica, utilizando el equipo Gel-Doc de BioRad.

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 H_2O . El tampón TAE se preparó en una solución autoclavada 1:1000 de DEPC en H_2O . La concentración de la agarosa en el gel fue de 1,5% (p/vol) y se acompañó de 0,1% (p/vol) SDS. Todo el material de vidrio para preparar soluciones se trató previamente con cloroformo para eliminar posibles contaminaciones con ARNasas.

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

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

7.7. Secuenciación de ADN.

La secuenciación de ADN se realizó tanto de forma manual como automática. Cuando se llevó a cabo la secuenciación manual se siguieron las instrucciones del sistema comercial “T7 Sequencing Kit” (Amersham Pharmacia Biotech, ref. 27-1682-01) basado en el método de Sanger y colaboradores (1977), usando la ADN polimerasa del fago T7 como se describe en el apartado 10.1.

Por otro lado, la secuenciación automática se realizó en el servicio de secuenciación automática del Grupo de Degradación de Tóxicos Orgánicos de la Estación Experimental del Zaidín del CSIC en Granada, donde disponen del secuenciador ABI PRISM™ (modelo 310) de Perkin Elmer. En el proceso de secuenciación se utilizó el sistema “ADN Sequencing Kit AmpliTaq DNA polymerase” (Perkin-Elmer, ref. 402122), basado en la utilización de dideoxinucleótidos con cromóforos fluorescentes. Los oligonucleótidos empleados como cebadores en la secuenciación se sintetizaron en los laboratorios Roche Molecular Biochemicals.

7.8. Reacción de amplificación en cadena con ADN polimerasa termorresistente (“PCR”).

La reacción de amplificación en cadena de una región concreta de ADN se llevó a cabo cuando los objetivos perseguidos eran amplificar un fragmento determinado de ADN para su posterior clonaje o comprobar la existencia de un fragmento de ADN determinado. Tal reacción incluye: ADN molde (0,2 ng de ADN cromosómico o 10 pg de ADN plasmídico); cebadores (50-100 pmoles, las temperaturas de hibridación deben ser parecidas); tampón que permita el correcto funcionamiento de la ADN-polimerasa Taq (KCl 50 mM; MCl₂ 1,5 mM; Tris-HCl 10 mM pH 9); dNTPs (100-200 μM cada uno); Taq ADN polimerasa (0,5 U/100 μl) (Amersham Pharmacia Biotech, ref. 27-0799-02); ajustada hasta un volumen final 100 μl con agua. La reacción de amplificación se desarrolló en un termociclador, que permitió ajustar las condiciones bajo las cuales se realizó tal reacción. Las condiciones estándar fueron las siguientes: En primer lugar, se desnaturalizó el ADN, para lo cual se sometió a 94 °C durante 3 minutos. Seguidamente se llevaron a cabo 20-30 ciclos de amplificación. Se mantuvo la muestra a una temperatura de hibridación adecuada para los cebadores durante un minuto, y se amplificó a 72 °C, temperatura idónea para el buen funcionamiento de la Taq, el tiempo de extensión se ajustó en función del tamaño a amplificar, teniendo en

cuenta que es necesario un minuto por cada 2 kb del mismo. Finalmente se realizó una extensión a 72 °C durante 10 minutos. En aquellos casos, en los que se diseñaron cebadores que presentaban dianas colgantes en 5', que no hibridaban con el ADN molde, se llevaron a cabo tres ciclos a una temperatura de hibridación estimada sin incluir tal diana, y, finalmente, se realizaron 30 ciclos a una temperatura de hibridación calculada para el cebador completo. Cuando la reacción estándar no resultó satisfactoria se combinaron distintas modificaciones, como cambiar la concentración de MgCl₂ (incrementándola a 3 ó 4,5 mM) y/o añadir ciertos compuestos a la mezcla de reacción, por ejemplo, se utilizó glicerol al 10% (v/v) o DMSO al 5% (v/v).

El producto obtenido tras la amplificación se purificó utilizando el sistema comercial “QIAquick PCR Purification Kit” (QIAGEN, ref. 28104) para eliminar los cebadores y los dNTPs.

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

Con las muestras de ARN libres de ADN se llevaron a cabo reacciones de amplificación utilizando el kit “Titan One Tube RT-PCR System” (Roche Molecular Biochemicals, ref. 1855476) con los oligonucleotidos adecuados para cada caso. La transcripción reversa se realizó incubando las muestras a 50 °C durante 30 minutos. Las condiciones estándar de la reacción de amplificación fueron las siguientes: tras una desnaturalización inicial a 94 °C durante 5 minutos, se realizaron 30 ciclos en las siguientes condiciones: 94 °C, 30 seg; 55-65 °C, 30 seg; 68 °C, 1 min, y finalmente se realizó una extensión a 68°C durante 10 minutos. La temperatura de hibridación se modificó en función de los cebadores utilizados. Todos los ensayos fueron realizados con sus correspondientes controles negativos, los cuales carecían de la retrotranscriptasa inversa. A su vez, se comprobó el correcto funcionamiento de los cebadores.

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.

7.10. PCR arbitrarias.

El ADN flanqueante a las inserciones de transposones se amplificó mediante PCR a partir de cebadores. En esta técnica, la región de ADN adyacente a la inserción, se enriquece tras dos rondas de amplificación. En la primera ronda se utiliza un cebador específico del transposón utilizado y otro, denominado ARB1, con parte de la secuencia degenerada. Esta reacción se llevo a cabo en 100 µl de volumen y los componentes de la mezcla fueron los mismos a los anteriormente citados para las reacciones estándar de amplificación. Las condiciones de la primera ronda de amplificación fueron las siguientes: tras una desnaturalización inicial a 94 °C durante 5 min, se realizaron 6 ciclos en las siguientes condiciones: 94 °C, 10 seg; 30 °C, 30 seg; 72 °C, 1,5 min; y otros 30 ciclos como sigue: 94 °C, 30 seg; 30 °C, 45 seg; 72 °C, 2 min; y finalmente se realizó una extensión a 72 °C durante 10 min. La segunda ronda de amplificación se hizo utilizando el ADN amplificado en la primera ronda, diluido 1:100, como ADN molde. Los cebadores en esta segunda ronda fueron ARB2 cuya secuencia es idéntica a la del extremo 5' de ARB1; y un cebador complementario al extremo del transposón y con una localización más externa que la del utilizado en la primera ronda. Las condiciones de esta segunda ronda de amplificación fueron las siguientes: tras una desnaturalización inicial a 94 °C durante 5 min, se realizaron 30 ciclos en las siguientes condiciones: 94 °C, 10 seg; 45 °C, 30 seg; 72 °C, 2 min; y finalmente se realizó una extensión a 72 °C durante 10 min.

8. EXTRACCIÓN DE ARN.

Es importante usar guantes durante todo el proceso de extracción y cambiarlos frecuentemente, puntas sin autoclavar obtenidas de una bolsa recién abierta, material de vidrio tratado previamente con cloroformo y soluciones tratadas con dietilpirocarbonato (DEPC) o preparadas en H₂O_d tratada con DEPC (H₂O_{DEPC}) para evitar la degradación del ARN por ribonucleasas. El H₂O_{DEPC} se obtiene tras esterilizar por autoclave una solución de DEPC al 0,1 % (v/v) en H₂O_d incubada previamente al menos durante 60 min a temperatura ambiente y en agitación

Para la preparación de ARN se recogieron 10 ml de cultivos celulares a una determinada densidad óptica que se estimó como máxima para la expresión del transcrito en cuestión. Los cultivos se recogieron en tubos de centrifuga previamente enfriados en nitrógeno líquido. Se eliminó el sobrenadante por centrifugación a 4°C. Los

sedimentos celulares se congelaron con nitrógeno líquido y se almacenaron a -80°C hasta la extracción del ARN. La extracción de ARN se llevó a cabo usando el reactivo TRI REAGENT-LS. Para ello a las muestras de ARN resuspendidas en $200\ \mu\text{l}$ de $\text{H}_2\text{O}_{\text{DEPC}}$ se le añadieron $750\ \mu\text{l}$ de este reactivo y se dejaron incubar durante 10 minutos a $60\ ^{\circ}\text{C}$. Pasado este tiempo se centrifugaron a $16.000\ \times\ \text{g}$ a $4\ ^{\circ}\text{C}$. Se recogió el sobrenadante, al cual se le añadió $200\ \mu\text{l}$ de cloroformo y se agitaron los tubos vigorosamente, tras lo cual se dejaron reposar durante 5-10 minutos a temperatura ambiente. Pasado este tiempo se centrifugaron a $16.000\ \times\ \text{g}$ durante 15 minutos a $4\ ^{\circ}\text{C}$. El sobrenadante, donde se encuentra el ARN, se recogió y se precipitó mediante la adición de $500\ \mu\text{l}$ de isopropanol. Transcurrido 5-10 minutos a temperatura ambiente se centrifugó durante 8 minutos a $16.000\ \times\ \text{g}$ a $4\ ^{\circ}\text{C}$. Finalmente las muestras se lavaron con etanol al 70% y se dejaron secar en una estufa a 37°C . Estas fueron resuspendidas en $30\ \mu\text{l}$ de agua DEPC.

Para eliminar el ADN presente en las muestras estas fueron tratadas con ADNasa I de páncreas bovino. A cada una de las muestras se le añadieron $25\ \mu\text{l}$ de una solución de $\text{H}_2\text{O}_{\text{DEPC}}$ que contenía 20 U de inhibidor de ARNasas (“RNase-Inhibitor”, Roche Molecular Biochemicals, ref. 799025), ditioneitol (DTT) 4 mM, MgCl_2 40 mM y 10 U de ADNasa I libre de ARNasas (Roche Molecular Biochemicals, ref. 776785). La mezcla de reacción se incubó durante 1 hora a 37°C . En otras ocasiones se hizo uso del Kit de Qiagen (RNeasy Mini Kit 50, Cat. No. 74104) para la extracción de ARN.

9. TRANSFERENCIA DE ADN A MEMBRANA E HIBRIDACIÓN (“SOUTHERN BLOTTING”).

9.1. Transferencia de ADN por capilaridad.

El ADN, previamente digerido con enzimas de restricción y separado en un gel de agarosa 0,8% (p/v), se transfirió por capilaridad a una membrana de nailon cargada positivamente (Roche Molecular Biochemicals, ref 1417240). Tras la electroforesis el gel fue sumergido en una solución de HCl 0,2 N, durante 10 minutos, hasta que se produjo el viraje del azul de bromofenol a amarillo. Este tratamiento introduce mellas en el ADN depurinándolo, lo cual facilita su 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 de amarillo a azul.

Sobre un cristal se colocó una tira de papel Whatman 3MM, del mismo ancho que el gel, donde los extremos quedaban sumergidos en la solución de transferencia (NaOH 0,5 M), colocada en un reservorio inferior. Sobre éste se colocó el gel en posición invertida y sobre éste la membrana de nailon, finalmente se pusieron tres tiras de papel Whatman 3MM previamente humedecido, abundante papel absorbente y un peso equivalente a 0,5 Kg. Así, la solución de transferencia ascendió por capilaridad a través del gel arrastrando el ADN hasta la membrana, donde quedó retenido. La transferencia se realizó durante 12-16 horas. Transcurrido este tiempo, la membrana se lavó con 2 x SSC durante 5 minutos permitiendo su neutralización y eliminación de posibles restos de agarosa. Las membranas pueden mantenerse a temperatura ambiente selladas en bolsas de plástico hasta su ulterior utilización.

9.2. Marcaje no radioactivo de ADN lineal.

El marcaje de la sonda se realizó con digoxigenina mediante PCR usando DIG-11-dUTP (Roche Molecular Biochemicals, ref. 1093088). La proporción dTTP:DIG-11-dUTP utilizada fue 9:1. La mezcla de reacción contenía: ADN molde, 0,05-1 µg; cebador 25 pmoles; tampón Taq ADN-polimerasa (10x) 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 1,2 U y H₂O hasta 50 µl.

9.3. Prehibridación e hibridación.

Se utilizó un horno de hibridación (Techne Hybridiser HB-1D, Cambridge). Se mantuvieron 2-8 horas de prehibridación a 60 °C con 20 ml de solución de hibridación por cada 100 cm² de membrana, transcurrido el cual la solución de hibridación se retiró parcialmente, manteniéndose 2,5 ml/100 cm². Entontes, se añadieron 20-200 ng de sonda marcada y desnaturalizada dejando la mezcla durante 6-15 horas a 60 °C, para que tuviera lugar la hibridación. Finalmente los lavados se realizaron bajo las siguientes condiciones de fuerza iónica y temperatura: dos lavados de 10 minutos cada uno a

temperatura ambiente en 2 x SSC más 0,1% (p/v) de SDS; dos lavados de 15 minutos a 68 °C en 0,1 x SSC más 0,1% (p/v) de SDS.

Las composiciones de las soluciones de hibridación fue la siguiente: 5 x SSC; formamida, 50% (v/v); 0,02% (p/v) SDS; 5% (p/v) agente bloqueante (suministrado por el fabricante); H₂O hasta 20 ml.

9.4. Reacción inmunológica.

El revelado se llevó a cabo del siguiente modo: se lavaron los filtros con solución tampón-1 durante 1 minuto. Seguidamente se dejaron incubando durante 30 minutos con solución tampón 2 (100 ml). Transcurrido este tiempo, se repitió el primer paso y se incubó con 20 ml de solución de anticuerpo (anti-digoxigenina-fosfatasa alcalina conjugado) diluido 1:5000 en tampón-1 durante 30 minutos. Se realizaron dos lavados de 15 minutos con 100 ml de tampón-1 para eliminar el anticuerpo no unido. Finalmente, la membrana se equilibró con 20 ml de solución tampón-3 durante 2 minutos y se incubó con 10 ml de la solución colorante en oscuridad hasta observar las bandas. La reacción se detuvo lavando con 50 ml de TE durante 5 minutos.

La composición de las soluciones utilizadas en este proceso fueron las siguientes:

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

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

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

Solución de anticuerpo: anticuerpo anti-digoxigenina-fosfatasa alcalina conjugado, preparado en 20 ml de tampón-1 a concentración final 150 mU/ml.

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

10. EXTENSIÓN REVERSA A PARTIR DE UN CEBADOR.

10.1. Marcaje de cebadores.

Los oligonucleótidos utilizados como cebadores se marcaron por fosforilación en su extremo 5' con [γ -³²P]ATP (Amersham Pharmacia Biotech, ref. AA0068). Cada reacción contenía en un volumen final de 10 µl: 1 µl del tampón de la enzima

polinucleótido quinasa concentrado 10 veces (Tris 0,5 M pH 7,6; MgCl₂ 0,1M; DTT 50 mM; espermidina 1 mM; EDTA 1 mM), 10 pmol de oligonucleótido, 1 µl de [γ -³²P]ATP (>3.000 mCi/mmol) y 1 U de la enzima polinucleótido quinasa del fago T4 (Roche Molecular Biochemicals, ref. 838292). Las mezclas de reacción se incubaron durante una hora a 37 °C. La quinasa se eliminó tratando la mezcla con fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1), y el exceso de [γ -³²P]ATP se eliminó por filtración a través de una columna comercial con gel de poliacrilamida en Tris 10 mM pH 7,4 (“Micro Bio-Spin 6 Column Tris”, ‘bio-Rad, ref. 732-6222) siguiendo las instrucciones del fabricante.

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

10.2. Reacción de extensión.

Como cebadores complementarios a las cadenas de ARNm se utilizaron los oligonucleótidos correspondientes en cada caso. Los cebadores hibridaban con secuencias próximas al extremo 5' de los genes en estudio, generalmente 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, 10⁵ dpm del oligonucleótido marcado y 20 µg de ARN total en un volumen final de 10 µl. La mezcla se incubó a 85°C durante 5 minutos, posteriormente se pasó a un baño a 65°C y se dejó enfriar, lentamente, hasta 45°C. La reacción de extensión se realizó añadiendo 40 µl de una solución que contenía el tampón de la transcriptasa reversa, los 4 desoxinucleótidos a 1 mM cada uno, 20 U de inhibidor de ARNasas, 3 µg de actinomicina D y 7 U de la transcriptasa reversa del virus de la mieloblastosis de ave (Roche Molecular Biochemicals, ref. 109118). La mezcla de reacción se incubó a 44°C durante una hora. La reacción se detuvo mediante la adición de 5 µl de acetato sódico 3 M pH 4,8 y 150 µl de etanol frío (-20°C), la muestra se dejó precipitando durante 10-14 horas a -20°C.

La concentración de las soluciones utilizadas fue la siguiente:

Tampón de hibridación: NaCl 2M 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.

10.3. Separación de las cadenas extendidas de ADNc mediante electroforesis.

Las reacciones se precipitaron por centrifugación a 12.000 x g durante 15 min a 25 °C. Se lavaron con etanol frío al 70% y se dejaron secar a 90 °C durante 3 minutos. Finalmente fueron resuspendidas en 4 µl de TE y 2 µl de tampón de carga con formamida. Las muestras se desnaturalizaron mediante exposición a 90 °C durante 2 minutos y se enfriaron en hielo antes de su separación por electroforesis.

La separación de las cadenas de ADNc de distinta longitud se llevó a cabo mediante electroforesis desnaturalizante en geles de poliacrilamida (40x20 cm) al 6,5% (p/v) en TBE a potencia fija de 40 W y voltaje variable entre 1.500 y 2.000 V. Una vez finalizada la separación, el gel se transfirió a un papel de filtro Whatman 3MM, se cubrió con papel de plástico transparente y se secó al vacío en un secador Bio-Rad a 80 °C durante 30 minutos. Las bandas de ANDc del gel se visualizaron por autorradiografía utilizando métodos estándar tras al menos 48 horas de exposición a -80 °C. Alternativamente, la radiactividad acumulada en el gel se cuantificó con un Molecular Imager model GS-525 (Bio-Rad).

La composición de las soluciones utilizadas se detalla a continuación:

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

Solución concentrada de acrilamida 40%: acrilamida 38 g, N,N'-metilenbisacrilamida 2 g y H₂O hasta 100ml. Esta solución se filtró a través de una membrana de nailon mediante vacío. La solución filtrada se almacenó en oscuridad a 4°C.

Acrilamida desnaturalizante 6% (p/v): acrilamida 40% (p/v) 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 10% (p/v) y 125 µl de TEMED.

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

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 y colaboradores (1972). Se trata de una reacción colorimétrica, en la que el sustrato de la reacción es el *o*-nitrofenil- β -D-galactopiranosido (ONPG), el cual es hidrolizado por la enzima β -galactosidasa. Como producto de la reacción se obtiene galactosa y *o*-nitrofenol. Este último es un compuesto de color amarillo que permite llevar a cabo un análisis cuantitativo en un espectrofotómetro.

Cultivos celulares incubados a 30 °C durante 10-14 horas se diluyeron 100 veces en 10 ml de medio mínimo M9, suplido con benzoato como fuente de carbono, y se incubaron a 30°C en agitación continua a 200 rpm. Transcurrida 1 hora y 30 minutos se añadió el inductor en aquellos casos en los que se indique. Tras un periodo de incubación variable, se recogieron fracciones alícuotas de 100 μ l de los cultivos y se añadió el volumen de una solución que contenía 2 mg/ml del detergente bromuro de alquil-trimetil-amonio (MATAB) en Tris-HCl 0,2 M pH 8, con objeto de permeabilizar las células. 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 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 la turbidez celular. Rutinariamente los ensayos de actividad β -galactosidasa se realizaron por triplicado.

La actividad, expresada en unidades Miller, se calcula de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$\text{Unidades } \beta\text{-galactosidasa} = (A_{420} - 1,7 \times A_{550} / t \times V \times D.O_{.660}) \times 1000$$

donde “t” representa el tiempo de reacción en minutos y “V” el volumen (en ml) de células utilizadas.

Tampón Z: 60 mM Na₂H₂PO₄, 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. MUTAGÉNESIS.

12.1 Mutagénesis por transposición.

Para la obtención de mutantes afectados en el catabolismo de lisina se utilizó el plásmido pUT portador del miniTn5-Km, cuyo origen de replicación es oriR6K, por tanto, suicida en *P. putida* KT2440. Dicho proceso se realizó mediante una conjugación tripartita utilizando las siguientes cepas: *Pseudomonas putida* KT2440 (receptora); *E.coli* S17-1-λpir (portadora del plásmido pUT-Km) (donadora); HB101 (pRK600) (cepa auxiliar). El plásmido pRK600 permite la movilización del plásmido suicida pUT-Km a la cepa *P. putida* KT2440, donde tendrá lugar la transposición. Tras ocho horas de incubación a 30°C la mezcla de conjugación se extendió en medio mínimo M9, con glucosa 20 mM, Cm y Km como agentes selectivos. Las colonias obtenidas, se picaron en M9, lisina 20 mM, Cm y Km, seleccionándose aquellas incapaces de crecer.

En otra ocasión se buscaron mutantes que estuvieran afectados en la expresión de los genes *davD-davT*, para ello se utilizó como cepa receptora KT2440-rei2, la cual posee una fusión transcripcional del miniTn5 Km1 *luxCDABE* al gen *davT*. Como cepa donadora se usó la portadora del plásmido pUT-miniTn5-Gm. Dicha cepa fue cedida por el laboratorio de Søren Molin, de la Universidad Técnica de Dinamarca. Se seleccionaron aquellos transconjugantes afectados en la emisión de luz bajo la presencia del agente inductor.

12.2 Mutagénesis dirigida.

Para la construcción de mutantes de *P. putida* KT2440 por recombinación homóloga se utilizaron los vectores pUC18, pUC18Not, o pGEM-T, en los cuales se clonaron los genes que interesaba mutar interrumpidos por un gen marcador (los interposones Ω -Km 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 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 PCR. 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 a 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 eliminado el vector y seleccionar las que portaban la copia mutada (a los que llamamos clones resueltos). Finalmente, se confirmó la mutación mediante PCR.

13. DETECCIÓN DE LA LUMINISCENCIA MEDIANTE UNA CÁMARA DETECTORA O CONTADORA DE FOTONES.

Estos experimentos se realizaron en el laboratorio de Søren Molin. Para la visualización de la bioluminiscencia se usó una cámara CCD Hamamatsu C-2400. Los transconjugantes derivados de *rei2* descritos en el apartado anterior se incubaron en medio mínimo M9 suplido con citrato y con el agente inductor, lisina 1 mM, en aquellos casos en los que se indique. Tras 10-12 horas las muestras se introdujeron en una cámara oscura, en la que estaba situada la cámara CCD. Para la toma de una fotografía de transmisión, se encendió el dispositivo de iluminación interna de la cámara oscura y las muestras se expusieron a un campo luminoso durante 3-5 segundos. Posteriormente, las muestras se expusieron a un campo oscuro durante 5 minutos. Las imágenes obtenidas por la cámara CCD se procesaron con el “software” Argus-10 y se sometieron

a un posterior tratamiento mediante el uso del programa Adobe Photoshop. Los niveles de expresión de los genes *lux* se dan en valores relativos, en función de la D.O.₆₆₀.

14. EXPERIMENTOS DE TRANSPORTE CON LISINA MARCADA CON ¹⁴C.

Pseudomonas putida KT2440, así como, sus correspondientes mutantes fueron cultivados en medio mínimo M9 suplido con 15 mM de benzoato, y en aquellos casos en que se indique con lisina 5 mM, hasta alcanzar la fase exponencial tardía (DO₆₆₀ ~0,7~0,8) tras lo cual fueron centrifugados a 3500 g durante 15 minutos a 4 °C dos veces. Se resuspendieron en medio mínimo M9 suplido con 15 mM de benzoato a una DO₆₆₀ entre 0,2-0,3. Tras preincubar dichas muestras en un baño a 30°C con agitación durante 5 minutos se añadió [U-¹⁴C]-lisina. Se recogió 1 ml del cultivo y se filtró a través de un filtro de 0,45 µm de diámetro de poro (Millipore, ref. HAWP02500) con ayuda de un aparato de filtración por vacío (“1225 Sampling Manifold”, Millipore, ref. XX27-025-50). El filtro se lavó dos veces con 3 ml de 1 x M9 frío.

Como control negativo del experimento y para determinar la radiactividad inespecífica que quedaba retenida en los filtros, se siguió el mismo procedimiento que el mencionado arriba, pero a partir de muestras incubadas en agua-hielo sin agitación. Los filtros se incubaron con 4 ml de líquido de centelleo durante 3-5 horas. Finalmente, se contabilizó el número de cuentas por minuto (cpm). A su vez, se tomó 1 ml del cultivo para determinar los mg de proteína totales.

Con el fin de determinar los µmoles de compuesto acumulados por las células, se calculó también la radioactividad de la solución de lisina utilizada en el ensayo. Por tanto, se contabilizó el número de cuentas por minuto (cpm) de 1 µl de la solución utilizada en el ensayo. Los valores así obtenidos se utilizaron como referencia para el cálculo de la cantidad total de compuesto retenido por las células en los filtros. Los resultados del experimento de transporte se expresaron como nmol/ml mg prot.

15. MÉTODOS ANALÍTICOS.

15.1. Determinación de la producción de CO₂ a partir de L-¹⁴C-Lisina.

P. putida KT2440 y su derivado isogénico *davB* fueron inoculados en medio mínimo M9 suplido con benzoato 15 mM y L-lisina 5 mM, como agente inductor. Tras alcanzar la fase exponencial de crecimiento (DO_{660} 0,7) los cultivos se recogieron y se diluyeron a una DO_{660} de 0,3 en medio mínimo M9 suplido con 15 mM de benzoato. Las muestras se incubaron a 30°C bajo agitación continua con 7,8 μ Ci de [U - ^{14}C] L-lisina en matraces cerrados con una trampa de NaOH. A los cinco minutos se detuvo la producción de CO_2 . Las muestras se analizaron en un contador de centelleo marca Pakard.

15.2. Determinación de proteína.

Para la determinación de la concentración proteica en células enteras se utilizó el método de Lowry y colaboradores (1951).

16. ANÁLISIS DE INTERMEDIARIOS METABÓLICOS DE LA DEGRADACIÓN DE L-LISINA.

16.1. Obtención de metabolitos intracelulares de cultivos bacterianos.

P. putida y sus derivados isogénicos fueron inoculados en matraces de 500 ml con 50 ml de medio mínimo M8 suplido con L-lisina 5 mM y glucosa 0,5 % (p/v). Las muestras se incubaron a 30°C bajo agitación continua hasta alcanzar la fase exponencial tardía ($DO_{660} \approx 1$). La biomasa fue recogida tras centrifugar el cultivo a 4000 x g y 4 °C durante 8 minutos, la muestra se dividió en dos fracciones alicuotas para analizarlas por separado. El precipitado se resuspendió en metanol previamente calentado a 70 °C. Las muestras se incubaron a 30 °C durante 30 minutos a 500 rpm. Tras enfriarlas se centrifugaron a 20000 x g durante 10 minutos. El extracto se secó con un sistema de evaporación por vacío (HetoVac VR-1 con una bomba de vacío Alcatel y un condensador CT110).

16.2. Cromatografía de gases y espectrometría de masas.

Los metabolitos intracelulares se analizaron utilizando un cromatógrafo de gases acoplado a un espectrómetro de masas. Los metabolitos extraídos y/o hidrolizados se disolvieron en 30 μ l de dimetil formamida 99,8% antes de ser analizados. Para la reacción de derivatización se añadió 30 μ l de N-metil-N-(tert-butildimetilsilil)-trifluoroacetamida, este compuesto es capaz de reaccionar con grupos hidroxilos, tioles, aminas primarias, amidas y grupos carboxilos. La mezcla de reacción se incubó a 85 °C con agitación (550 rpm) durante 60 minutos. 1 μ l del producto de reacción se inyectó en un Cromatógrafo de gases Serie 8000 acoplado a un espectrómetro de masas MD 800. Como patrón interno se añadió a la reacción de derivatización ácido trópico a una concentración final 2 mM.

16.3. Distribución del [^{13}C , ^{15}N] en el cultivo bacteriano a partir de [^{13}C , ^{15}N] L-lisina.

P. putida KT2440 y sus derivados isogénicos fueron inoculados en 10 ml de medio mínimo M8 suplido con glucosa 0,5% (p/v) y [U- ^{13}C , U- ^{15}N] L-lisina 5 mM en matraces de 50 ml. Las muestras se incubaron a 30 °C bajo agitación continua. Tras alcanzar una $\text{DO}_{660} \approx 1$ se recogieron alicuotas de 5 ml y se centrifugaron a 1200 x g y 4 °C durante 20 minutos. El precipitado celular se lavó 2 veces con NaCl 0,9% (p/v). Una de las alicuotas de cada duplicado se conservó para analizar los metabolitos δ -aminoadipato, δ -aminovalerato, L-pipecolato y glutarato, tal y como se indica en el apartado 16.1 y 16.2. La otra alicuota se hidrolizó con 1,5 ml de HCl durante 24 h a 110°C en tubos eppendorf de 2 ml. El hidrolizado se secó a 85 °C durante toda la noche. La reacción de derivatización se llevó tal y como se indica en el apartado 16.2 salvo que el hidrolizado se resuspendió en 50 μ l de dimetil formamida 99,8% y 30 μ l de agente derivatizante.

Del espectro de masas resultante de los aminoácidos derivatizados, leucina y glutámico, se corrigió la abundancia natural de todos los isótopos estables, así como, la fracción de biomasa no marcada procedente del inóculo de partida. Para ello, se usó el programa MATLAB Fiat Flux Version 1.04. También se usó para calcular la abundancia relativa de cada isótopo de los diferentes fragmentos.

17. ANÁLISIS INFORMÁTICOS 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, composición de aminoácidos, etc.) se emplearon los programas informáticos DNA Strider v.13 (Marck 1988) y SeqEd v. 1.0.3 (Applied Biosystems, Inc., 1992).

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

La comparación de nuevas secuencias (de nucleótidos y aminoácidos) con las distintas bases de datos, se realizó con la ayuda de los programas BLAST (Altschul et al. 1990) disponible en el servidor de internet del NCBI, y FASTA3 (Pearson & Lipman 1988) disponible en el servidor de internet del EMBL-EBI (Tabla M.5). El alineamiento de secuencias se realizó con el programa Clustal W (Thompson et al. 1994).

Tabla M.5: Direcciones de internet.

Programa	Dirección de internet
Determinación de Tm	http://alces.med.umn.edu/rawtm.html
BLAST	http://ulrec3.unil.ch/software/WUBLAST_form.html
FASTA3	http://www2.ebi.ac.uk/fasta3/
Clustal W	http://pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_clustalw.html

RESULTADOS

Capítulo I.

CARACTERIZACIÓN DEL OPERÓN *davD-davT*, IMPLICADO EN EL CATABOLISMO DE LISINA.

RESUMEN

En *P. putida* KT2440 se han descrito distintas rutas para el catabolismo de L-lisina. Una de ellas comprende la conversión de L-lisina en glutarato a través de dos rutas distintas, la ruta de la cadaverina y la ruta monooxidativa, que convergen en δ -aminovalerato. Éste compuesto se convierte en glutarato gracias a la actuación de la δ -aminovalerato aminotransferasa, DavT, y de la deshidrogenasa del semialdehído del ácido glutárico, DavD. Los genes que codifican dichas enzimas fueron identificados en *P. putida* KT2440 por Espinosa-Urgel y Ramos (2001). Los resultados de este capítulo muestran que ambos genes forman un operón cuya expresión, desde P_{dav} , es inducible por L-lisina, δ -aminovalerato y cadaverina, intermediarios de la ruta de degradación de L-lisina. P_{dav} es un promotor dependiente σ^{70} que presenta una posible región de unión de un regulador. Además se han identificado dos transportadores tipo ABC responsables del transporte de L-lisina al citoplasma, y necesarios para que se alcancen altos niveles de inducción del promotor P_{dav} .

1. ESTUDIO DE LA ORGANIZACIÓN TRANSCRIPCIONAL DE LOS GENES *davD-davT* DE *Pseudomonas putida* KT2440.

Espinosa-Urgel y Ramos (2001) describieron la organización física de los genes *davD-davT*, anotando que, ambos genes se encontraban asociados en el cromosoma y que presentaban la misma dirección transcripcional. No obstante, no se sabía si ambos genes formaban un operón. Estos genes codifican la deshidrogenasa del semialdehído del ácido glutárico y la δ -aminovalerato aminotransferasa, respectivamente.

Mediante análisis computacional del genoma de *P. putida* KT2440, se concretó el entorno genético de *davD-davT*. En sentido 5' de estos genes aparecen tres marcos abiertos de lectura, *orf1*, *orf2* y *orf3* (PP0209, PP0210 y PP0211, respectivamente), que se transcriben en el mismo sentido que *davD-davT*. A su vez en 3' con respecto a *davT* aparece otro marco abierto de lectura *orf4* (PP0215), cuyo sentido de la transcripción es el mismo que el mencionado. Finalmente, aguas abajo de *orf4* aparece otro marco abierto de lectura, *orf5* (PP0216), que se transcribe divergentemente con respecto a éste (Figura C.I.1).

El marco de lectura *orf1* presentó un tamaño de 852 pb, codificando una posible proteína con un elevado grado de similitud (75%) con el componente de unión a ATP de sistemas de transporte de tipo ABC. El mayor grado de similitud corresponde al sistema de transporte de nitrato de *Methanococcus janaschii* y *Synechocistis* sp, así como el sistema de transporte de sulfonato de *Methanosarcina acetivorans* (Bult et al., 1996; Galagan et al., 2002; Kaneko et al., 1996). Por otro lado, el codón de finalización de la traducción solapa con el codón de iniciación de la *orf2*. El marco de lectura *orf2* posee un tamaño de 966 pb, codificando una posible proteína que presentaría cierta similitud con ficobiliproteínas. Sin embargo, la función de dicha proteína es desconocida. En cuanto al producto del marco de lectura de *orf3* se desconoce su función. El codón de terminación de dicho marco de lectura, dista 487 pb del codón de iniciación de *davD*. La región intergénica comprendida entre *davD* y *davT* es de 293 pb. El codón de terminación de la traducción de *davT* está separado por 138 pb del codón de inicio de la traducción del siguiente marco abierto de lectura, *orf4* que daría lugar al polipéptido PP0215. La posible proteína PP0215 presentaría similitud con sistemas de dos componentes. Estos datos se recojen en la tabla C.I.1.

Tabla C.I.1: Marcos de lectura abiertos encontrados en la región de 8 kb del cromosoma de *P. putida* KT2440 que engloba a los genes *davD* y *davT*. Se indica el número de asignación de dichas *orf*, el tamaño, el número de acceso a la base de datos de GenBank y la posible función asignada.

orf	Tamaño (pb)	Tamaño (aa)	Homólogos	Porcentaje de identidad	N° de acceso (GenBank)
			Transportadores		
<i>orf1</i>	0209	283	ABC de nitrato, componente de unión a ATP.	75%	AAN65842.1
<i>orf2</i>	0210	321	Ficocianina	40%	AAN65843.1
<i>orf3</i>	0211	93	Proteína hipotética	58%	AAN65844.1
<i>davD</i>	0213	480	*Succinato-semialdehído DH	86%	AAN65845.1
<i>davT</i>	0214	425	*4-aminobutirato aminotransferasa	85%	AAN65846.1
<i>orf4</i>	0215	419	Regulador de dos componentes.	52%	AAN65847.1
<i>orf5</i>	0216	328	Dominio sensor de un sistema de dos componentes.	70%	AAN65848.1

*Espinosa-Urgel et al. (2001) demostraron que los genes *davD* y *davT* codifican la deshidrogenasa del semialdehído del ácido glutárico y la δ -aminovalerato aminotransferasa, respectivamente.

Con objeto de estudiar la organización transcripcional de los genes mencionados se llevaron a cabo ensayos de RT-PCR a partir de ARN total, aislado de la cepa *P. putida* KT2440. Dicho ARN se aisló a partir de un cultivo de *P. putida* KT2440 que había crecido en M9 benzoato y lisina 5 mM, las células se recogieron en la fase exponencial tardía. La L-lisina se utilizó en este ensayo como inductor de la expresión del gen *davT*. En las RT-PCRs se usaron parejas de oligonucleótidos enfrentados que hibridaban con el inicio y la terminación de la traducción de cada dos genes adyacentes, del entorno genético descrito. El producto de PCR se analizó por electroforesis en gel de

agarosa al 1,5%. Únicamente se observaron productos de amplificación de los tamaños esperados para las regiones intergénicas *orf1/orf2* y *davD/davT*. Cabe destacar que no encontramos transcrito de *orf3* bajo las condiciones ensayadas. Estos resultados indican que los seis marcos abiertos de lectura se encuentran formando tres unidades transcripcionales, donde *davD-davT* se transcribe independientemente de *orf4* y *orf1/orf2*. (Figura C.I.1).

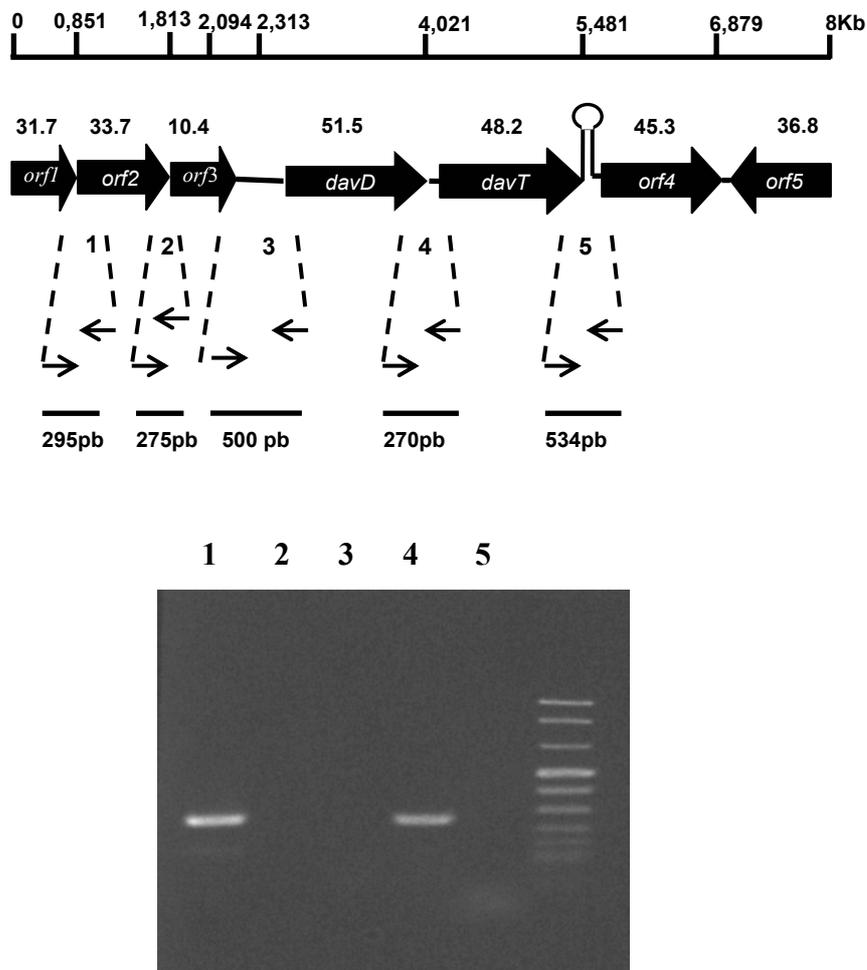


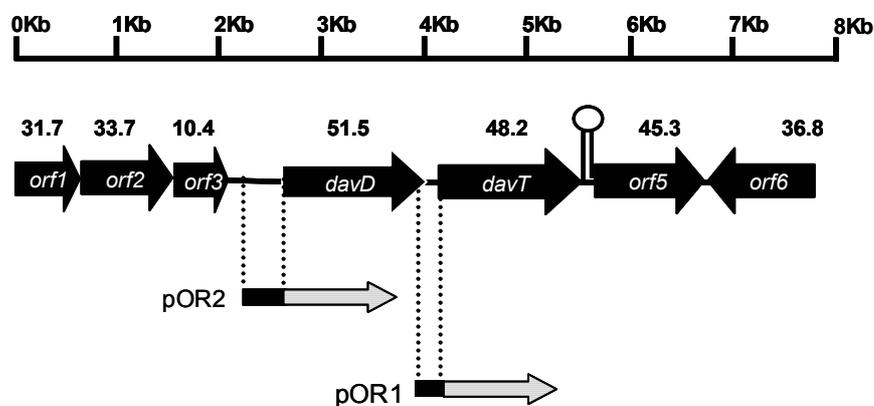
Figura C.I.1: A, Esquema de la región de 8 kb del cromosoma de *P. putida* KT2440 que contiene a los genes *davD-davT*. Las flechas indican las diferentes fases de lectura abierta y su sentido de transcripción. El tamaño de las proteínas producto de su correspondiente marco de lectura se indican encima de cada flecha. A su vez los números 1, 2, 3, 4 y 5 reflejan las RT-PCR llevadas a cabo. El resultado de los mismos se muestra en el panel B.

2. PATRÓN DE EXPRESIÓN DEL PROMOTOR DEL OPERÓN *davD-davT*.

2.1 Análisis de fusiones transcripcionales de los genes *davD-davT* de *P. putida* KT2440.

Los resultados, anteriormente mencionados, indicaban que *davD-davT* se disponen formando una única unidad transcripcional. Para confirmar estos datos decidimos llevar a cabo fusiones transcripcionales de la región 5' de *davD* así como de la región intergénica *davD-davT* al gen *lacZ'* del plásmido pMP220, obteniéndose los plásmidos pOR2 (portador de un fragmento de 468 pb) y pOR1 (fragmento de 293), respectivamente (Figura C.I.2). Dichos plásmidos se electroporaron en *P. putida* KT2440, para determinar la expresión de estas posibles regiones promotoras como actividad β -galactosidasa. Para ello cepas de KT2440 portadoras de los plásmidos pOR1 y pOR2 se cultivaron en medio mínimo M9 con benzoato 15 mM, y con L-lisina 5 mM como agente inductor en aquellos casos en los que se indica. Tal y como se muestra en la Figura I.2, no se encontró actividad β -galactosidasa en KT2440 (pOR1), mientras que por el contrario pOR2 presentaba un nivel de expresión basal, habiendo inducción en presencia de L-lisina (Figura C.I.3). Estos resultados, junto con los de RT-PCR, permitieron concluir que *davD-davT* forman un operón, donde la expresión de dicho transcrito tiene lugar a partir del promotor en 5' con respecto a *davD*.

A)



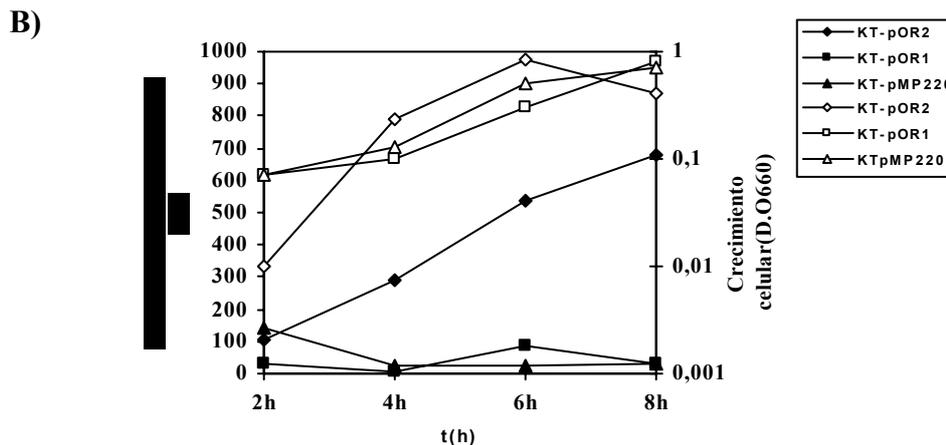


Figura C.I.2: A, Análisis de la organización transcripcional de los genes *davD* y *davT*. Regiones amplificadas para el diseño de los plásmidos pOR2 (fragmento de 468 pb) y pOR1 (fragmento de 293 pb). **B, Ensayo de la actividad β-galactosidasa de los plásmidos pOR2 y pOR1 en *P. putida* KT2440.** Los cultivos se inocularon en medio mínimo M9 suplido con Benzoato 15 mM en presencia de L-lisina 1mM (símbolos cerrados). Los símbolos abiertos representan las densidades ópticas correspondientes. El plásmido pMP220 se refiere al control portador del gen reportero *lacZ'* sin fusión.

2.2 Identificación y caracterización del promotor de *davD-davT*.

Para definir el promotor del operon *davDT* y determinar el punto de inicio de la transcripción de *davDT* se realizaron ensayos de extensión de ARN a partir de un cebador localizado a 60 pb del punto de inicio de la traducción. *P. putida* KT2440 se cultivó en medio mínimo M9 con benzoato y en presencia de L-lisina 5 mM hasta alcanzar la fase exponencial tardía de crecimiento, momento en el cual se recogieron fracciones alícuotas de 10 ml y se aisló el ARN total. El ensayo de extensión a partir de cebador se realizó utilizando 20 μg de ARN total. La electroforesis desnaturante en gel de policrilamida del ADNc obtenido, se desarrolló en paralelo a una reacción de secuenciación de dicha región de ADN a partir del cebador. Nuestros resultados revelaron un único punto de inicio de la transcripción situado a 66 pb del punto de inicio de la traducción. Un estudio detallado de dicha región, reveló una región -10 con una secuencia (5'-TAGCAT-3') con un alto grado de similitud con la región -10 típica (5'-TATAcT-3') para promotores de *P. putida* KT2440 reconocidos por σ^{70} (Domínguez y Marqués, 2004). En negrita se representan las bases más conservadas. A su vez, la región -35 (5'-TTGTCC-3') también está bastante conservada con respecto a la propuesta para σ^{70} (TTGAcC) en este microorganismo (Figura C.I.3).

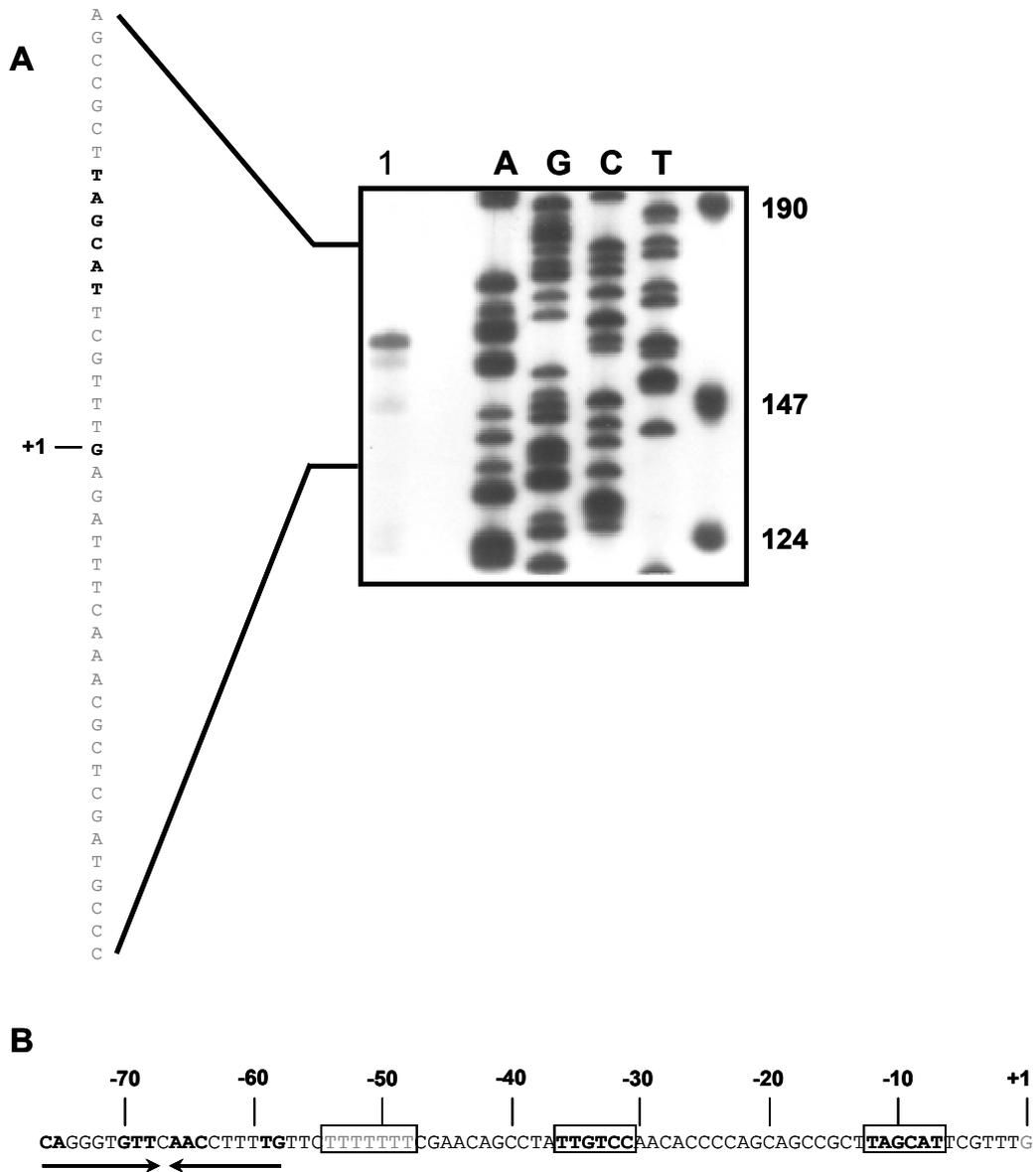


Figura C.I.3: Punto de inicio de la transcripción del promotor *davD* y secuencia proximal 5'. (A) Punto de inicio de la transcripción del gen *davD*. Calle 1, ARN procedente de células cultivadas en medio mínimo M9 suplidis con L-lisina 5 mM. La secuencia correspondiente a dicho promotor se representa a la izquierda de la imagen. El punto +1 se representa en negrita, junto a la región -10 propuesta. (B) Región promotora *davD*. La región -10 y -35 aparecen sombreadas. A su vez, existe una región rica en A T encerradas en una caja clara. Las flechas negras indican una posible región invertida repetida.

Con objetivo de determinar la región promotora mínima necesaria para que tenga lugar la expresión de *davD* se diseñaron fusiones a pMP220 de diferentes

fragmentos de dicha región promotora amplificados mediante PCR (Figura C.I.4). En todos ellos se mantuvo el mismo cebador en 3', modificándose el cebador en 5', así obtuvimos progresivamente fragmentos de menor tamaño. Los plásmidos resultantes fueron electroporados a KT2440. Los ensayos de actividad β -galactosidasa se realizaron a partir de muestras, portadoras de dichos plásmidos, cultivadas en medio mínimo M9 con benzoato como fuente de carbono y, en aquellos casos en los que se indique, con el compuesto inductor. Los resultados, así obtenidos, revelaron que era necesario al menos 81 pb en sentido 5' con respecto al punto de inicio de la transcripción para que el promotor fuese activo. Un análisis detallado de dicha región revela una zona rica en Ts, concretamente aquella que comprende la región -48/-62, pudiendo tratarse de un elemento UP o de un elemento de curvatura. Por otro lado, también se observó una región repetida invertida localizada entre -76/-58, lo cual sugería una posible diana de reconocimiento de un regulador.

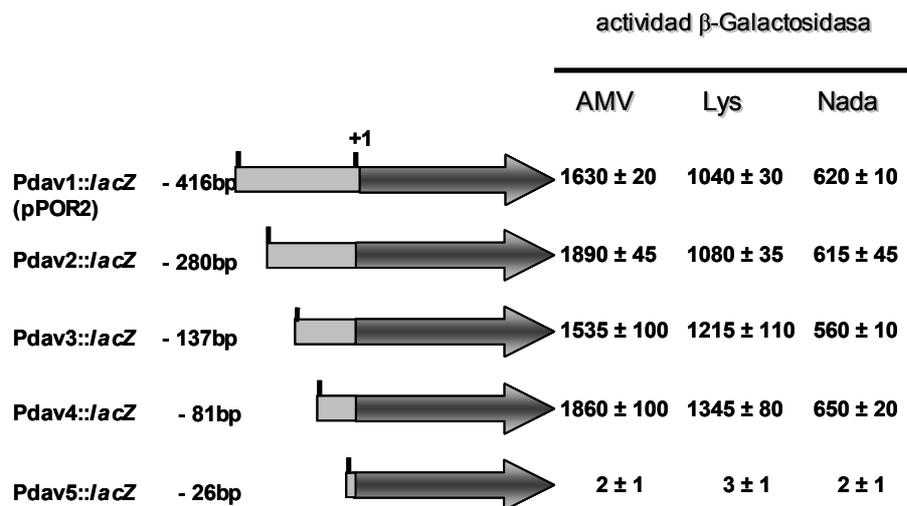


Figura C.I.4: Identificación de la unidad mínima promotora de *davDT* que permite su expresión. La región intergénica comprendida entre *davD* y *orf3* se amplificó mediante PCR usando para ello el mismo cebador en 3' (proporciona un sitio *KpnI*) y diferentes cebadores en 5' (con un sitio *EcoRI*). Los productos de PCR, una vez digeridos con las enzimas de restricción indicadas, rindieron los fragmentos de 416, 280, 137, 81 y 26 pb desde el punto de inicio de la transcripción. *P. putida* KT2440 portadora de tales fusiones se cultivó en medio mínimo M9 con benzoato, y en aquellos casos donde se indica fue suplida con δ -aminovalérico 5 mM o L-lisina 5 mM. Los resultados representan la media de tres ensayos independientes.

2.3 Análisis de la inducción del operón *davDT* en presencia de distintos intermediarios del catabolismo de lisina.

Con el fin de identificar si además de la L-lisina otros intermediarios de la ruta eran capaces de inducir la expresión de *davDT* se llevaron a cabo ensayos de actividad β -galactosidasa en cepas de KT2440 portadoras del plásmido pOR2, cultivadas en medio mínimo M9 con benzoato como fuente de carbono. Los sustratos analizados fueron: L-lisina 5 mM (primer sustrato de la ruta); ácido δ -aminovalérico 5 mM (sustrato de *DavD*); cadaverina 2,5 mM (sustrato intermediario de una de las rutas de degradación de lisina) y ácido glutárico 5 mM (producto final del catabolismo del ácido aminovalérico). El estudio de la actividad β -galactosidasa reflejaba que mientras el ácido glutárico carecía de efecto inductor, los otros tres compuestos eran inductores. El δ -aminovalérico proporcionó la mayor inducción y más rápida que la L-lisina, mientras que la cadaverina fue el efector más débil. No se pudo concluir, a la vista de tales resultados, si el efecto de estos inductores era directo o indirecto. Es decir, los análisis no permitían saber si de la L-lisina y la cadaverina eran inductores per se o como resultado de su conversión en δ -aminovalérico.

Tabla C.I.2: Inducción del promotor *davD* en *P.putida* KT2440^a.

Actividad β -Galactosidasa (Unidades Miller \pm DS)					
Cepa	Nada	L-lisina	Cadaverina	δ -aminovalérico	Glutárico
KT2440	620 \pm 10	1,280 \pm 100	930 \pm 60	1,730 \pm 20	600 \pm 10

^a *P. putida* KT2440 fue cultivada en medio mínimo M9 con benzoato como fuente de carbono. En aquellos casos donde se indica los cultivos fueron suplidos con L-lisina 5 mM, cadaverina 2,5 mM, δ -aminovalérico 5 mM y glutárico 5 mM. La actividad β -galactosidasa se determinó 7 h tras la inducción, estando las células en fase exponencial. La actividad se expresa en Unidades Miller, y los valores son el resultado de una media procedente de tres ensayos independientes.

3. REGULACIÓN DEL OPERÓN *davD-davT*.

3.1 Análisis de la participación de distintos factores transcripcionales en la expresión del operón *davD-davT*.

El análisis de la región en sentido 5' del punto de inicio de la transcripción reveló una elevada similitud con la secuencia consenso reconocida por el factor de transcripción σ^{70} , observándose una clara región -10 y -35. Algunos promotores pueden transcribirse *in vivo* por los factores σ^{70} o σ^{38} dependiendo de la fase de crecimiento. Dado que el promotor de *davDT* en ausencia de inductor presenta un incremento en su expresión al final de la fase exponencial de crecimiento, una característica propia de los promotores σ^{38} dependientes, se decidió comprobar si el factor σ^{38} intervenía en la transcripción del operón *davDT*. Para ello, se transfirió el plásmido pOR2 a la cepa *P. putida* C1R1, un mutante en el gen *rpoS*, y por tanto deficiente en σ^{38} . Se estudió la actividad β -galactosidasa en dicha cepa a distintos tiempos, en medio mínimo M9 con benzoato 15 mM, en presencia o ausencia de 5 mM de ácido δ -aminovalérico. Los resultados se presentan en la Tabla C.I.3.

Tabla C.I.3: Inducción del promotor *davD* en *P. putida* KT2440 y en su mutante isogénico C1R1^a.

Actividad β -galactosidasa (Unidades Miller \pm DS)		
Cepa	---	L-lisina
KT2440	600	1200
C1R1	580	1100

^a*P. putida* se cultivó en medio mínimo M9 con benzoato como fuente de carbono. En aquellos casos donde se indica los cultivos fueron suplidos con L-lisina 5 mM. La actividad β -galactosidasa se determinó 7 h tras la inducción, estando las células en fase exponencial. La actividad se expresa en Unidades Miller, y los valores son el resultado de una media procedente de tres ensayos independientes.

A la vista de los resultados se concluyó que el comportamiento del mutante *rpoS* no difiere del silvestre y, por tanto, la expresión de este promotor es independiente de tal subunidad para el inicio de la transcripción.

Por otro lado, Köhler y colaboradores (1989) observaron como un mutante en el gen *rpoN*, deficiente en la subunidad σ^{54} , era incapaz de catabolizar la L-lisina. A pesar

de que el promotor del operón *davDT* es dependiente de σ^{70} , su expresión podría estar influenciada por σ^{54} si éste forma parte de una cascada de regulación, como se ha comprobado para el caso del catabolismo del 3-metilbenzoato descrito en el plásmido TOL de *P. putida* cuando se encuentra en el medio *m*-xileno. Para corroborar tal hipótesis transferimos el plásmido pOR2 a *P. putida* TK19 (mutante en el gen *rpoN*) y determinamos la actividad β -galactosidasa tanto en ausencia como en presencia de L-lisina, cadaverina y δ -aminovalérico, del mismo modo que se ha descrito anteriormente. Los resultados en la Tabla C.I.4, revelaron un orden de inducción cercano al 2, nivel similar al obtenido para la cepa parental. Esto nos permitió concluir que σ^{54} no estaba implicado ni directa ni indirectamente en la expresión de *davDT* y, por tanto, la inhabilidad de dicho mutante para catabolizar la L-lisina estaría adcrita a otros segmentos catabólicos de dicha ruta.

Tabla C.I.4: Inducción del promotor *davD* en *P. putida* KT2440 y en su mutante isogénico TK19 (*rpoN*).

Cepa	Actividad β -galactosidasa (Unidades Miller \pm DS)				
	---	L-lisina	Cadaverina	δ -aminovalérico	Glutámico
KT2440	620 \pm 10	1280 \pm 100	930 \pm 60	1730 \pm 20	600 \pm 10
TK19	620 \pm 40	1450 \pm 30	1370 \pm 100	1800 \pm 50	550 \pm 10

^a *P. putida* KT2440 y su derivado isogénico fueron cultivados en medio mínimo M9 con benzoato como fuente de carbono. En aquellos casos donde se indica los cultivos fueron suplidos con L-lisina 5 mM, cadaverina 2,5 mM, δ -aminovalérico 5 mM y glutámico 5mM. La actividad β -galactosidasa se determinó 7 h tras la inducción, estando las células en fase exponencial. La actividad se expresa en Unidades Miller, y los valores son el resultado de una media procedente de tres ensayos independientes.

3.2 Búsqueda de factores que afectan la inducción del operón *davDT*.

3.2.1 Regulador de dos componentes (PP0215).

En sentido 3' de *davT* existen dos marcos abiertos de lectura PP0215 y PP0216 homólogos a proteínas reguladoras que forman parte de sistemas de dos componentes. El gen PP0215 es homólogo al componente regulador del sistema, mientras que, PP0216 lo es al dominio sensor. Ya que es frecuente la proximidad entre un gen

catabólico y su regulador, se decidió estudiar la implicación de este regulador en la expresión de P_{dav} .

A partir de ensayos de extensión a partir de cebador y de RT-PCR se comprobó que el en PP0215 se transcribía de forma independiente al operón *davD-davT*.

Se construyó un mutante *orf4::Km* mediante el uso del plásmido pCHESI-4 (Materiales y Métodos) portador de un fragmento interno (500 pb) del gen *orf4* de *P. putida* KT2440, insertado en el mismo sentido de la transcripción que el promotor P_{lac} . Dicha construcción se transfirió por conjugación tripartita a *P. putida* KT2440. Los transconjugantes, que poseían integrado el plásmido en el cromosoma, se seleccionaron en medio mínimo con benzoato (5 mM) y kanamicina (50 μ g/ml). Entre los distintos clones resistentes a kanamicina, se seleccionó uno donde la inserción cromosómica del plásmido pCHESI-4 se confirmó mediante PCR.

Para estudiar el efecto de la inactivación de *orf4* sobre el catabolismo de lisina se cultivó *P. putida* KT2440 y su derivado isogénico *orf4::Km* en medio mínimo M8 suplido con L-lisina 20 mM, y se estimó el tiempo de duplicación en fase exponencial. Los resultados (Figura C.I.7) indicaron que ambas cepas crecían con un tiempo de generación similar y del orden de 90 minutos.

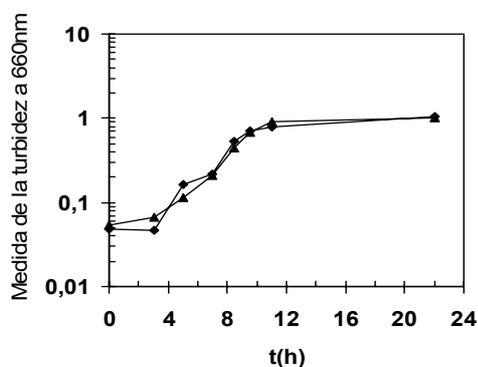


Figura C.I.7: Crecimiento de *P. putida* KT2440 y su derivado isogénico *orf4*. La cepa silvestre *P. putida* KT2440 (triángulos) y su mutante *orf4* (rombos) se cultivaron en medio mínimo M8 suplido con L-lisina 20 mM.

Se transfirió el plásmido pOR2, portador de la fusión de P_{dav} al gen *lacZ'*, al mutante *orf4::Km*, y la expresión de dicho promotor se determinó en este fondo genético. Los valores de actividad β -galactosidasa en el mutante fueron similares a los determinados en la cepa parental (Tabla C.I.6).

Tabla C.I.6: Inducción del promotor *davD* en *P. putida* KT2440 y *P. putida orf4::Km*^a.

Actividad B-galactosidasa (Unidades Miller \pm DS)		
Cepa	---	δ -aminovalerato
KT2440	620 \pm 10	1600 \pm 50
<i>orf4::Km</i>	660 \pm 40	1515 \pm 45

^a*P. putida* KT2440 y su derivado isogénico fueron cultivados en medio mínimo M9 con benzoato como fuente de carbono. En aquellos casos donde se indica los cultivos fueron suplidos con L-lisina 5 mM, cadaverina 2,5 mM, δ -aminovalerato 5 mM y glutarato 5 mM. La actividad β -galactosidasa se determinó en células en fase exponencial. La actividad se expresa en Unidades Miller, y los valores son la media de tres ensayos independientes.

Todos estos datos indican que el posible sistema de dos componentes PP0215/PP0216 no participa en la regulación de P_{dav} .

3.2.2 Identificación de genes que influyen en la expresión de *davDT*.

El mutante *rei2* posee una fusión transcripcional del gen *davT* al operón de los genes *luxABCDE*, de tal modo, que emitía luz cuando se exponía a L-lisina. Esta característica permitía buscar reguladores u otros elementos genéticos que tuvieran una influencia sobre la expresión de *davDT*, mediante mutagénesis y selección de clones que no emitieran luz. Se llevó a cabo una mutagénesis al azar de *rei2* por inserción del transposón mini-Tn5Gm mediante conjugación triparental entre las cepas *P. putida rei2* como receptora, *E. coli* S17-1 λ pir (pUT-Gm) como donadora y HB101 (pRK600) como auxiliar. El plásmido pRK600 permite movilizar el plásmido suicida pUT-Gm portador del transposón mini-Tn5Gm. Tras la conjugación se seleccionaron aquellos transconjugantes que estaban afectados en la emisión de luz en presencia de lisina, esperándose que dichos mutantes estuvieran alterados en el transporte de L-lisina del medio extracelular o en la capacidad de inducir el operón. De este modo, se identificaron cinco mutantes, donde dos de ellos eran totalmente oscuros. En la Figura C.I.5 se muestra el patrón de emisión de luz tanto en ausencia como en presencia de L-lisina.

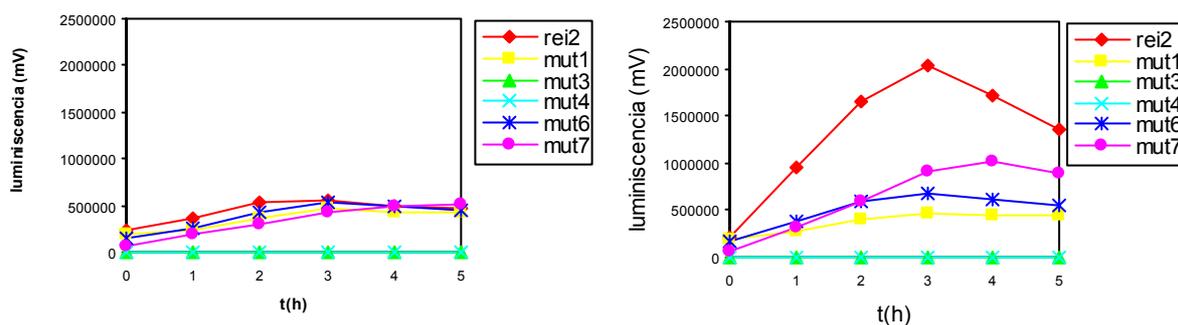


Figura C.I.5: Expresión de los genes *lux* en función del tiempo en *rei2* y en los distintos mutante isogénicos. En la figura de la izquierda se muestra la expresión del operón *lux* en ausencia de L- lisina, mientras que en la figura de la derecha refleja la expresión del operón *lux* en cultivos que han crecido en presencia de L- lisina a una concentración 5 mM.

De entre estos mutantes cabe destacar la cepa *rei2-1*, ya que no presenta inducción del operón *lux* cuando se adiciona L-lisina al medio, presentando unos niveles similares al basal. Por otro lado, los mutantes *rei2-6* y *rei2-7* poseían un cierto nivel de inducción, si bien, menor al parental *rei2*. Finalmente, *rei2-3* y *rei2-4* son totalmente oscuros. En estos mutantes el miniTn5 se insertó en los genes *lux* y no se consideraron posteriormente. En la Tabla C.I.5 se indica el orden de inducción de los mutantes aquí mencionados.

Tabla C.I.5: Niveles de emisión de luz relativos de *rei2* y sus respectivos mutantes^a.

Cepa	Unidades de luz relativas \pm DS		Incremento (Δ)
	- Lys	+ Lys	
<i>rei2</i>	$5 \pm 0,1$	$20 \pm 0,2$	4
<i>rei2-1</i>	$5 \pm 0,1$	$5 \pm 0,1$	1
<i>rei2-6</i>	$5 \pm 0,1$	$6 \pm 0,1$	1,2
<i>rei2-7</i>	$5 \pm 0,1$	$7,5 \pm 0,1$	1,5

^aLas células fueron cultivadas en medio mínimo M9 con citrato como fuente de carbono sin (-) y con (+) L-lisina (lys) 5 mM durante 3 h a 30°C. La emisión de luz fue determinada con un luminómetro.

3.2.3 Localización de la inserción del transposón miniTn5-Gm en los mutantes afectados en la inducción del operón *davDT*.

Como primera aproximación en la localización de los sitios de inserción del miniTn5 en cada uno de los mutantes se decidió determinar mediante hibridación si

había tenido lugar más de un evento de inserción del mini-Tn5Gm. Para ello se usó como sonda la correspondiente al gen *aacC1* que codifica la resistencia a Gm. Se realizaron dos tandas de restricciones de ADN cromosómico obtenido de la cepa *rei2* y de los correspondientes mutantes con las enzimas de restricción *SalI* y *NotI*, respectivamente. La elección de estas enzimas se basó en el hecho de que el transposón mini-Tn5 no posee ninguna diana para dichas enzimas. Tras la digestión y la separación electroforética se llevó a cabo la hibridación en southern usando como sonda (600 pb) la arriba descrita. El resultado de la hibridación (Figura C.I.6) reveló una única banda en todos los mutantes, y, por tanto, una sólo inserción del miniTn5.

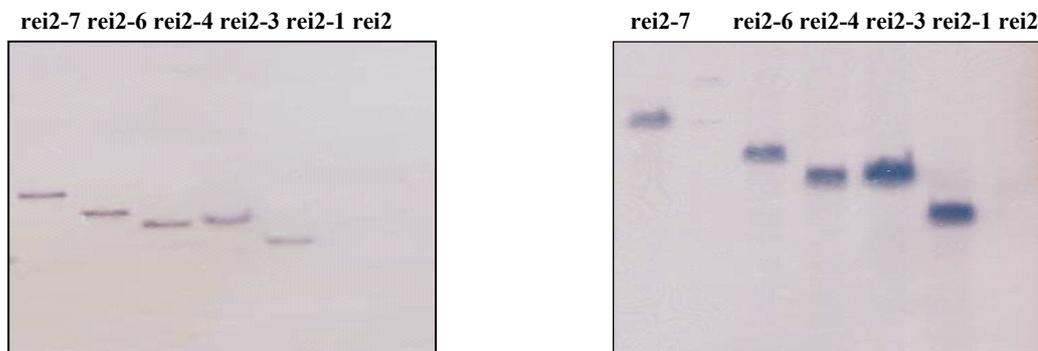


Figura C.I.6: Hibridación de la región de ADN donde está el miniTn5-Gm. En la imagen de la izquierda se muestran los resultados de hibridación tras digerir el ADN con la enzima de restricción *SalI*, mientras que en la imagen de la derecha se muestran los digeridos con *SalI* y *NotI*.

3.2.4 Secuenciación del ADN flanqueante al miniTn5 en cada uno de los mutantes derivados de *rei2*.

Para identificar con precisión el sitio de inserción del mini-Tn5 en los distintos mutantes se utilizó la estrategia conocida como PCR arbitraria, descrita en Materiales y Métodos. Una vez obtenida la secuencia génica adyacente al miniTn5-Gm, se comparó mediante el paquete de programas BLAST con la base de datos del NCBI, donde aparece la secuencia completa del genoma de *P. putida* KT2440. Esto nos permitió identificar el marco de lectura afectado así como conocer su entorno genético. Seguidamente, se hizo un alineamiento múltiple de las secuencias proteicas con la base

de datos existente en el GenBank a través del programa BLASTP, lo cual nos rinde información acerca de las familias de proteínas más próximas evolutivamente.

En rei2-1 el miniTn5 está insertado en un marco abierto de lectura de 795 pb (PP0382). Esta secuencia se comparó con la existente en la base de datos de GenBank mediante el programa BLAST, dando una alta similitud con secuencias que codificaban hidrolasas. Esta secuencia presentaba un 49% de identidad con una hidrolasa de *S. coelicolor* A3 (2); un 33% de identidad con una hidrolasa de *Pyrococcus abyssi*; y un 35% de identidad con una amidohidrolasa N-carbamil-D-aminoácido de *M. thermotrophicus*. Este mutante se seleccionó para posteriores análisis, que se describen más adelante.

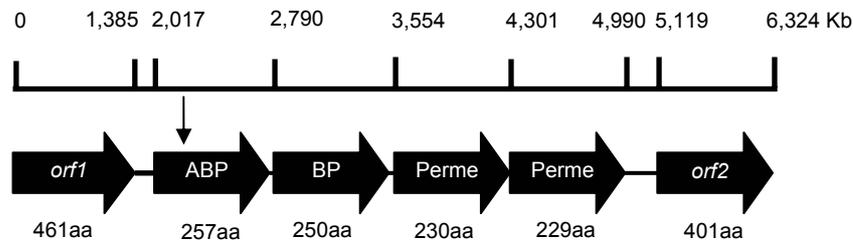
En rei2-6 y rei2-7 el miniTn5 interrumpió un marco abierto de lectura de 753pb (PP0283) y 885pb (PP4486), respectivamente. Análisis comparativos de secuencia pusieron de manifiesto como dichos marcos abiertos de lectura estaban implicados en el transporte de L-lisina, perteneciendo a sistemas de transporte de tipo ABC (Hosie et al. 2002; Montesinos et al. 1997; Saier, 2000; Saurin et al. 1999). En el mutante rei2-6 el gen inactivado (PP0283) presentaba un alto grado de homología con la proteína de unión a ATP de distintos transportadores: sistema de transporte arginina/ornitina de *P. aeruginosa* (94% de similitud); transportador de ABC de histidina de *P. syringae* pv tomatate cepa DC3000 (92% de similitud) y *E. coli* (79% de similitud); transportador de ornitina de *S. typhimurium* LT2 (79% de similitud). Por otro lado, en el mutante rei2-7 había sido inactivado en la proteína periplásmica de unión a sustrato (PP4486) perteneciente a un sistema de transporte de aminoácidos básicos (Higgins and Ames, 1981; Oh et al. 1993) perteneciente al sistema LAO (lisina/arginina/ornitina) (Kang et al. 1991). A la luz de tales resultados se propone que el defecto en la inducción del operón *davDT* en dichos mutantes era debido a un menor nivel de L-lisina intracelular.

3.2.5 Descripción de los sistemas de transporte de L-lisina de tipo ABC en *P. putida* KT2440.

En el apartado anterior se han descrito dos mutantes afectados en sistemas de transporte de tipo ABC. El mutante rei2-6 (PP0283) posee insertado un miniTn5-Gm en el gen que codifica una proteína de unión a ATP. En rei2-7 el gen inactivado (PP4486) codifica una proteína de unión a sustrato. Generalmente estos sistemas se encuentran

formando una unidad transcripcional que incluiría al conjunto de genes que constituyen el sistema de transporte (Figura C.1.7).

Transportador tipo ABC de aminoácidos



Transportador tipo ABC de aminoácidos básicos

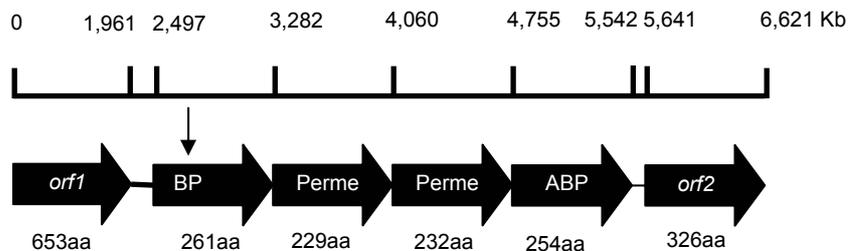


Figura C.I.7: Organización transcripcional de dos sistemas de transporte de tipo ABC. Se trata de dos sistemas implicados en el transporte de L-lisina, afectados en los mutantes rei2-6 y rei2-7. Se indican los puntos de inserción del miniTn5 en cada caso.

En la Figura C.I.7 se muestra la organización genómica de estos dos sistemas de transporte de tipo ABC. La figura superior presenta la organización genómica de rei2-6, donde el gen inactivado codifica la proteína de unión a ATP. Este sistema tiene homología con transportadores de diaminoácidos o transportadores específicos de aminoácidos básicos. Esto hacía suponer que se trataba del sistema de transporte para L-lisina y L-ornitina descrito en *Pseudomonas putida* (Introducción). La figura inferior muestra la organización genómica del mutante rei2-7. En rei2-7 el miniTn5 está insertado en la proteína de unión a sustrato. Este sistema presenta homología con transportadores generales de aminoácidos básicos (lisina, arginina y ornitina) pudiendo tratarse de transportador LAO (lisina/arginina/ornitina) definido en *Pseudomonas putida*.

3.2.6 Transporte de [U-¹⁴C] L-Lisina en los mutantes rei2-6 Y rei2-7.

Para confirmar que en el transporte de L-lisina están involucrados al menos estos dos sistemas de tipo ABC, se calculó la velocidad de transporte de [U-¹⁴C] L-lisina tanto en *P. putida* KT2440 como en los mutantes rei2, rei2-6 y rei2-7. Las células de *P. putida* KT2440 y sus derivados isogénicos se cultivaron en medio mínimo M9 suplido con benzoato como fuente de carbono y al que se le adicionó L-lisina (5 mM) como inductor. Tras alcanzar la fase de crecimiento exponencial ($DO_{660} \approx 0,6-0,7$) los cultivos se centrifugaron y se resuspendieron en medio mínimo M9 con benzoato 15 mM. El ensayo de transporte se realizó como se indicó en el apartado 14 de la sección Materiales y Métodos. A su vez, se tomó 1 ml del cultivo para determinar la concentración de proteínas totales de cultivo.

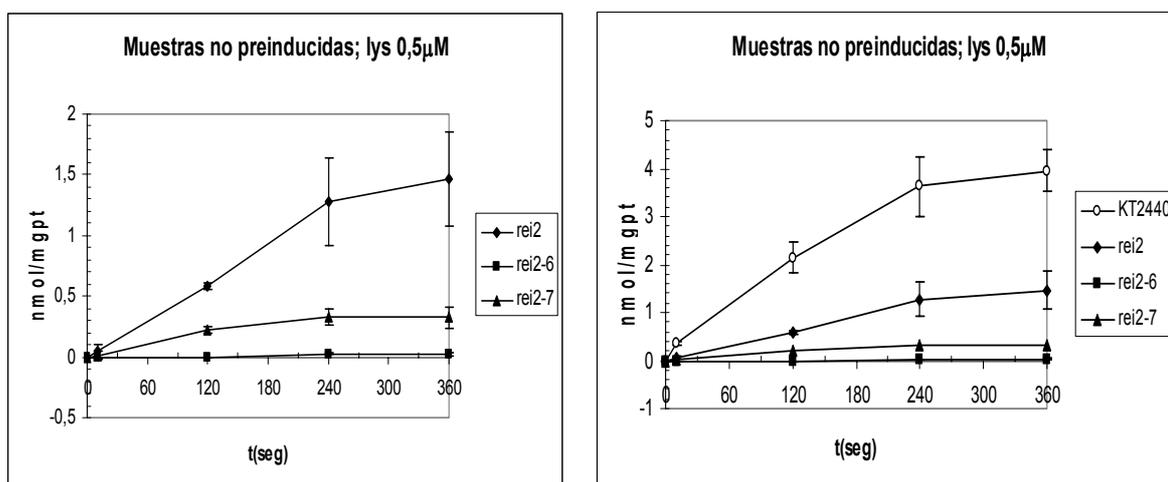


Figura C.I.8: Transporte de [U-¹⁴C] L-lisina en *P. putida* KT2440 y en los mutantes rei2, rei2-6 y rei2-7. Las células de *P. putida* KT2440 (símbolos abiertos), rei2 (rombos cerrados), rei2-6 (cuadrados cerrados) y rei2-7 (triángulos cerrados) se cultivaron en medio mínimo M9 suplido con benzoato 15 mM y L-lisina 5 mM, hasta alcanzar una $DO_{660} \approx 0,6-0,7$. Se recogieron las células por centrifugación y el experimento de transporte se realizó como se describió en el apartado 14 de la sección Materiales y Métodos. En las gráficas se representan los valores medios obtenidos de tres ensayos independientes, junto con sus desviaciones típicas.

Se observó que, para la concentración de L-lisina ensayada, el transporte era lineal durante los tres primeros minutos tras añadir el aminoácido. La velocidad de transporte en los mutantes rei2-6 y rei2-7 fue significativamente menor que en su cepa parental rei2 (Figura C.I.8). Curiosamente, rei2 presenta a su vez una menor velocidad de transporte que la cepa silvestre KT2440. Esto podría indicar un efecto negativo de la

acumulación de AMV sobre el transporte de su precursor, lisina. La velocidad de transporte para *P. putida* KT2440 fue del orden de 2,5 nmol de [U¹⁴C] L-lisina por mg de proteína y por minuto.

Capítulo II.

MULTIPLICIDAD DE RUTAS PARA EL CATABOLISMO DE LISINA E INTERCONEXIÓN DE LA MISMAS EN *P. putida* KT2440. RESUMEN

Las posibles rutas del catabolismo de L-lisina fueron descritas en distintas cepas de *Pseudomonas* en los años 70, gracias a una serie de ensayos bioquímicos que revelaron las distintas actividades enzimáticas. Sin embargo, al inicio de esta Tesis Doctoral no se conocían los genes que codifican dichas enzimas. A lo largo de esta tesis se ha analizado a nivel genético el catabolismo de L-lisina en *P. putida* KT2440. El análisis de distintos mutantes ha revelado la existencia de tres rutas catabólicas, así como la interconexión entre ellas. Mediante ensayos con ^{13}C L-lisina se ha demostrado la conexión de la ruta de la D y L-lisina, a nivel de lisina racemasa y del ácido glutámico. La ruta de degradación de D-lisina es crucial en la degradación de su forma isomérica L, al igual que la ruta monooxidativa. Sin embargo, la ruta de la cadaverina es una ruta minoritaria, y por tanto, de menor importancia en la utilización de este aminoácido.

4. CARACTERIZACIÓN GLOBAL DE LA RUTA DEL CATABOLISMO DE L-LISINA EN KT2440.

4.1 El catabolismo de L-lisina implica al menos tres rutas.

En cepas del género *Pseudomonas* se han llegado a identificar hasta cuatro rutas distintas para la degradación del aminoácido L-lisina. Estas rutas se describen en la Introducción y se conocen como vía de la cadaverina, vía de la δ -aminovaleramida, vía del piperolato y vía L-lisina 6-aminotransferasa (Figura C.II.1).

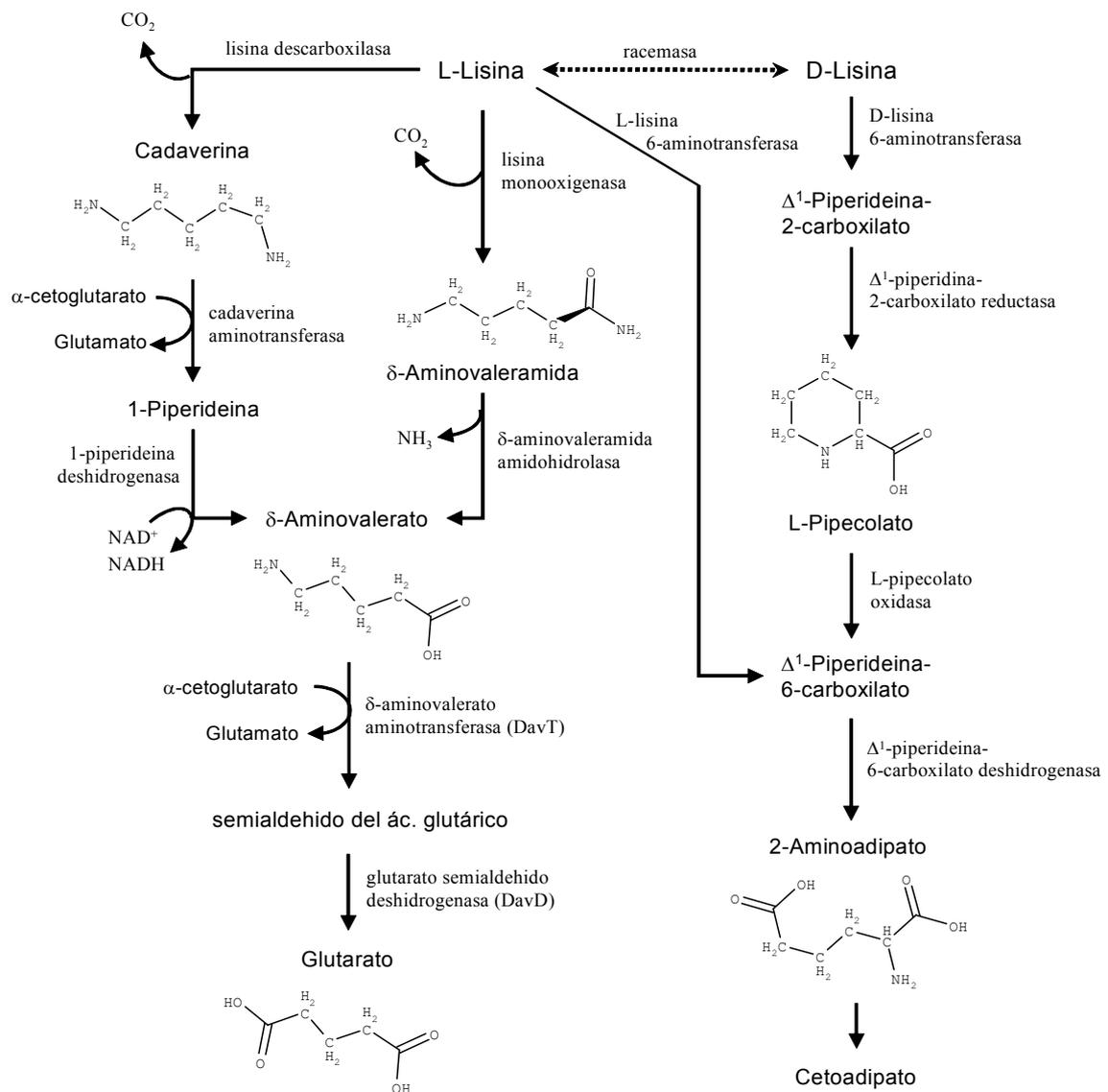


Figura II.1: Esquema de las rutas de degradación de L-lisina propuestas en *Pseudomonas*. Los distintos pasos enzimáticos se describen con más detalle en la Introducción.

Para identificar si estas rutas existían y eran operativas en *P. putida* KT2440 se analizó la presencia de δ -aminovalerato, glutarato, L-pipecolato y 2-aminoadipato en extractos celulares. Los metabolitos celulares se analizaron por cromatografía de gases y los productos separados se sometieron a ionización química para analizar su patrón de fragmentación en un espectrómetro de masas. Previamente, se obtuvieron curvas estándar a partir de distintas concentraciones conocidas de los compuestos L-pipecolato, δ -aminovalerato, δ -aminoadipato y glutarato. Para los ensayos de acumulación de intermediarios, cultivos de *P. putida* KT2440 crecidos en medio mínimo se diluyeron 1:100 en medio mínimo M8 suplido con L-lisina 5 mM y glucosa al 0,5 %. Estos se incubaron a 30°C en agitación continua hasta alcanzar la fase exponencial tardía ($D.O_{660} \approx 1$), momento en que se recogieron las células y se extrajeron los compuestos intracelulares, los cuales fueron analizados según se indica en Materiales y Métodos. En estos extractos se identificó L-pipecolato, δ -aminovalerato y δ -aminoadipato (Figura C.II.2) La concentración de éstos compuestos en pmoles/mg de proteína fue de $22 \pm 6,5$; $6 \pm 1,5$ y $4 \pm 0,5$ para L-pipecolato, δ -aminovalerato y 2-aminoadipato, respectivamente. No se detectó glutarato. Por otro lado, la cadaverina no pudo ser identificada con este método.

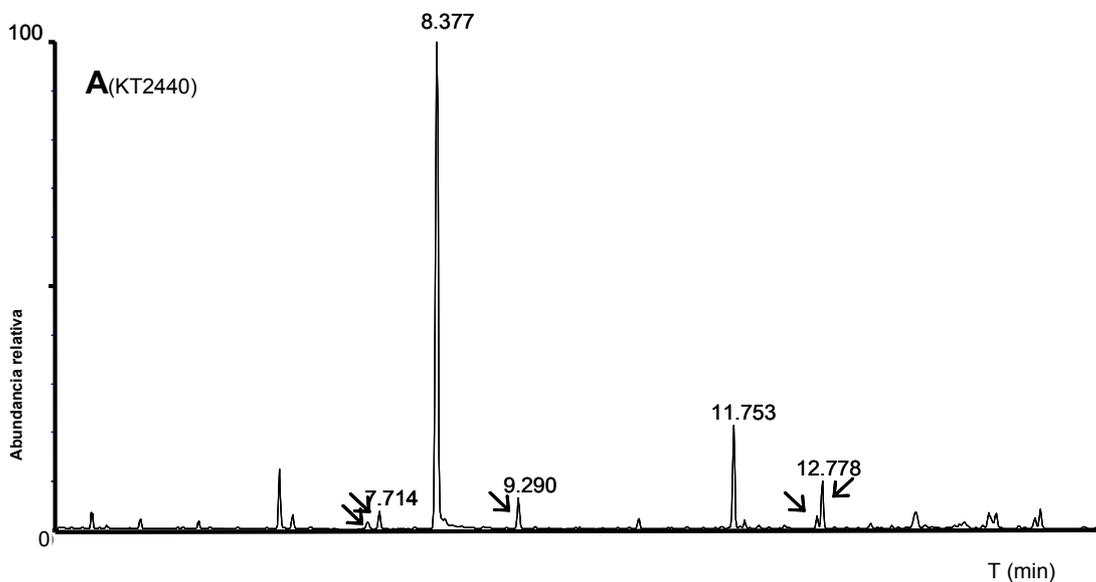


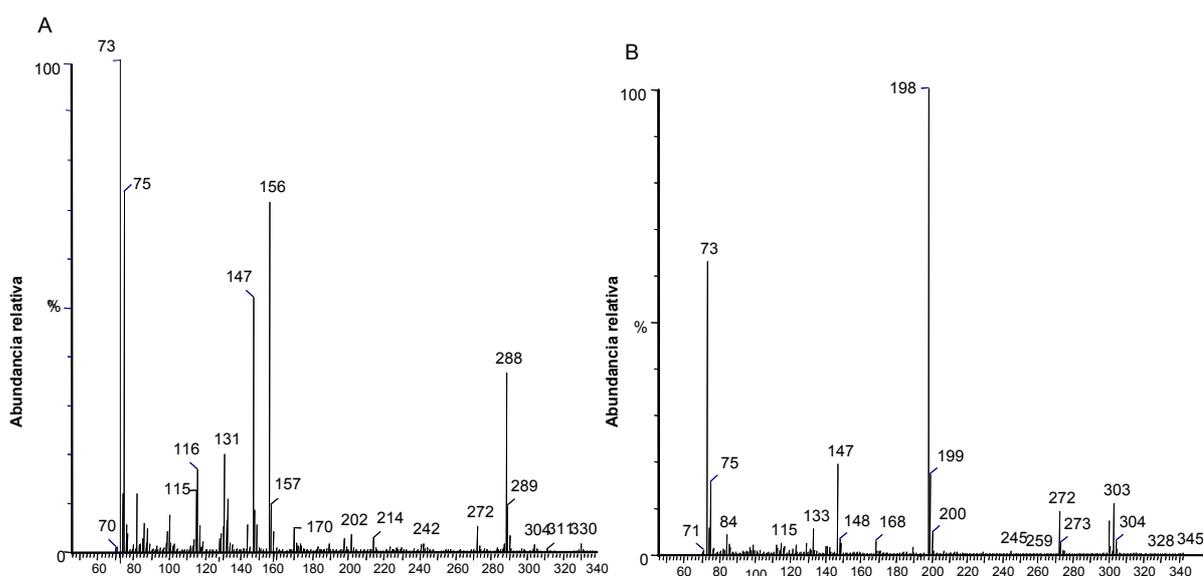
Figura C.II.2: Cromatografía de gases correspondiente a extracciones intracelulares de un cultivo de *P. putida* KT2440 en M8 suplido con L-lisina 5 mM y glucosa 0,5%. El análisis de CG se realizó como se indica en Materiales y Métodos. Los picos detectados a los distintos tiempos de retención corresponden a: L-pipecolato (TR 7,56); δ -aminovalerato (TR 7,71); ácido trópico (TR 9,3); δ -aminoadipato (TR 12,6) y L-lisina (TR 12,7).

. El patrón de fragmentación de los compuestos analizados se presenta en la Figura C.II.3 y las características relevantes se describen a continuación:

L-pipecolato: Tiempo de retención de 7,56 minutos. El fragmento de mayor masa que se originó fue 357 m/z, y es el producto de la reacción de dos moléculas de agente derivatizante con el grupo carboxilo y con el grupo amino del pipecolato. Los distintos fragmentos que se observaron son el resultado de distintas combinaciones entre el agente derivatizante y el ácido pipecólico.

δ-aminovalerato: Tiempo de retención de 7,71 minutos. En este caso, el agente derivatizante reacciona tanto con el grupo amino como con el grupo carboxilo de la molécula. El fragmento de mayor masa es 330 m/z, producto de la reacción de dos moléculas de agente derivatizante con una de aminovalerato.

2-aminoadipato: Tiempo de retención 12,69 minutos. El pico de mayor masa es 503 m/z, producto de la reacción de tres moléculas de agente derivatizante con una molécula de aminoadipato.



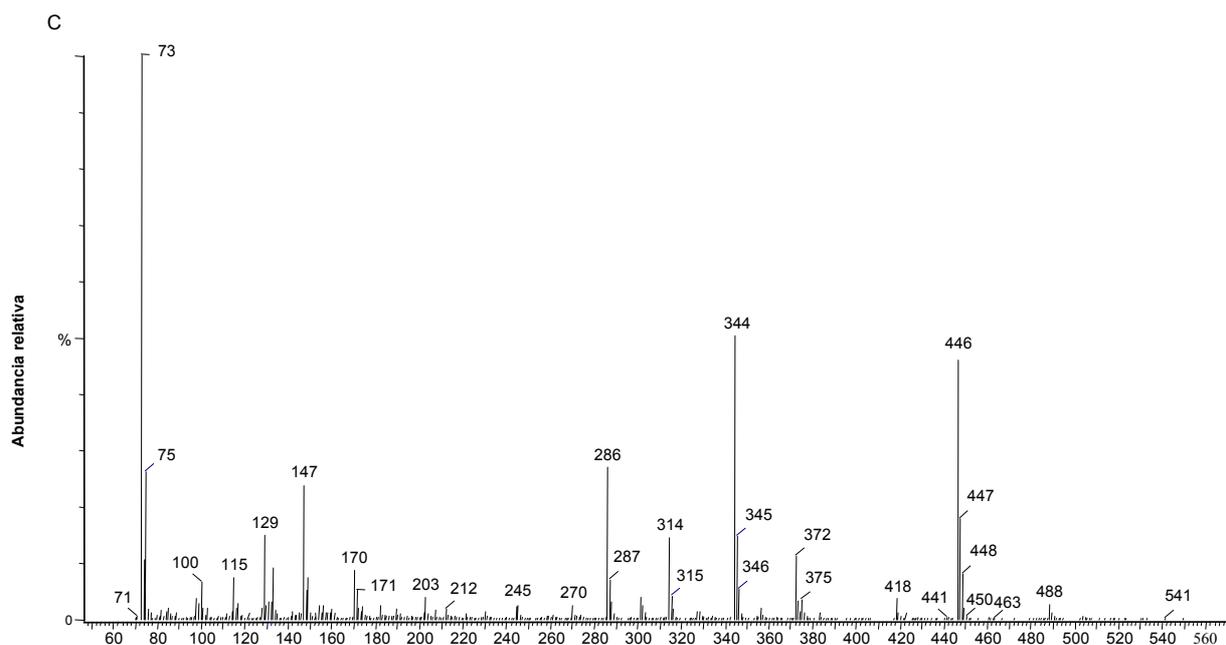


Figura C.II.3: Espectros de masas de los productos analizados por cromatografía de gases (CG). Los espectros corresponden a compuestos intracelulares extraídos de un cultivo de *P. putida* KT2440 crecido en M8 suplido con L-lisina 5 mM y Glucosa 0,5%. Los espectros corresponden a los siguientes productos: A aminovalerato, B pipercolato y C 2-aminoadipato.

Cuando los cultivos se suplieron con ^{13}C L-lisina se detectó el aumento de masa correspondiente al ^{13}C en los compuestos analizados.

Los resultados de estos ensayos sugerían que el aminoácido L-lisina se metabolizaría por más de una ruta y que requería de una lisina racemasa ya que aparecen intermediarios de la ruta de la D-lisina. Por otro lado, podrían estar implicadas simultáneamente la ruta de la cadaverina y la ruta monooxidativa que rendirían δ -aminovalérico. Estos resultados contrastaban con lo esperado ya que, como se indica en la Introducción, el mutante *rei2* que no puede metabolizar el δ -aminovalérico es incapaz de utilizar la L-lisina como fuente de carbono.

4.2 Identificación de los genes *davA* y *davB*, implicados en la ruta oxidativa.

En el capítulo anterior se ha descrito la obtención, mediante mutagénesis al azar con el miniTn5-Gm, de un mutante (*rei2-1*) afectado en su capacidad para inducir el promotor P_{dav} a partir de L-lisina. Mediante PCR arbitraria se demostró que el miniTn5 se había insertado en el gen PP0382 que codifica una amidohidrolasa, según revelaron los análisis de BLAST. En este capítulo se demuestra que este gen está implicado en la ruta de la monooxigenasa y que la síntesis del ácido δ -aminovalérico ocurre mayoritariamente vía δ -aminovaleramida.

4.2.1. Caracterización de una hidrolasa codificada por el gen PP0382.

En la ruta monooxidativa de degradación de L-lisina (Figura C.II.4), la conversión de δ -aminovaleramida a δ -aminovalerato está catalizada por la enzima 5-aminovaleramida amidohidrolasa. Esto llevó a establecer como hipótesis que el gen PP0382 codificaba dicha enzima, y la incapacidad de inducir el promotor P_{dav} por parte de la L-lisina era debido a que estaba afectada la conversión de L-lisina en δ -aminovalérico.

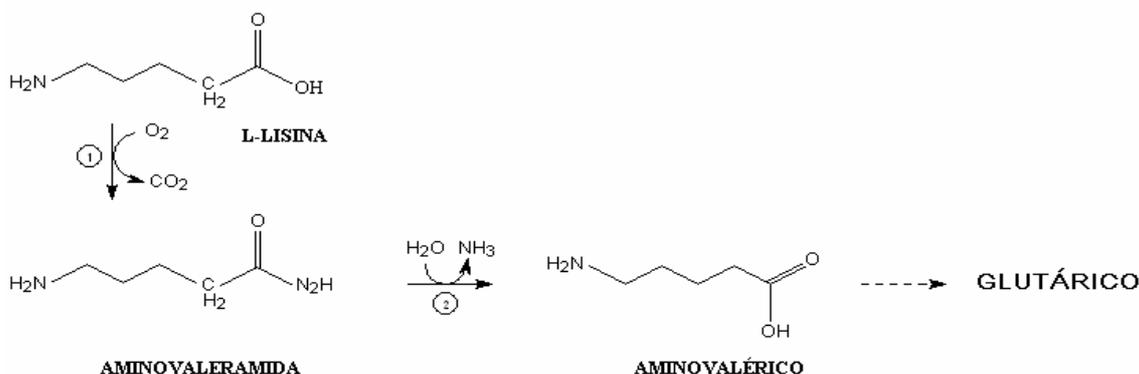


Figura C.II.4. Ruta de degradación de L-Lisina. Las enzimas implicadas en los primeros pasos de la ruta oxidativa son: (1) L-Lisina 2-monooxigenasa (EC. 1.13.12.2) y (2) 5-aminovaleramida amidasa (EC. 3.5.1.-).

El plásmido pOR2 porta una fusión del promotor del operón *davDT* a *lacZ'* y con objeto de estudiar la inducción de este promotor en el mutante deficiente en el gen PP0382 se introdujo pOR2 en las cepas *rei2* y *rei2-1*. Se determinó la actividad β -

galactosidasa en células cultivadas en M9 suplido con benzoato y en presencia de L-lisina, cadaverina y δ -aminovalérico. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla C.II.1.

Tabla C.II.1: Medida de la actividad β -galactosidasa del plásmido pOR2 en *rei2* y *rei2-1*^a.

Cepa	Actividad β -galactosidasa (Unidades Miller \pm DS)		
	---	L-Lys	AMV
<i>rei2</i>	600	1134	1300
<i>rei2-1</i>	500	600	1500

^a*rei2* y *rei2-1* portadores del plásmido pOR2 fueron cultivadas en medio mínimo M9 con benzoato como fuente de carbono. En aquellos casos en los que se indica se añadió L-lisina 5 mM, δ -aminovalérico 5 mM y cadaverina 2,5 mM como agente inductor. La actividad β -galactosidasa se da en Unidades Miller a partir de la media de tres ensayos independientes.

Se observó que en contraste con la cepa parental *rei2* la L-lisina no inducía el promotor de *davDT* en *rei2-1* mientras que con δ -aminovalérico y cadaverina se obtenía inducción. Este resultado corroboraba la propuesta de que en *rei2-1* la síntesis de δ -aminovalérico a partir de L-lisina está limitada debido a una mutación en la ruta monooxidativa.

4.2.1.1 Construcción de un mutante *davA* (PP0382) de la cepa *P. putida* KT2440.

Dado que *rei2* posee ya un fondo genético que no permite utilizar la L-lisina como fuente de carbono, se decidió generar un mutante deficiente en PP0382 en el fondo genético silvestre y caracterizar el mismo con respecto a la utilización de la lisina. Para ello se utilizó el plásmido pCHESI-H, un derivado CHESI Ω Km que contenía un fragmento interno de unas 500 pb del gen PP0382 de *P. putida* KT2440 insertado en el mismo sentido de transcripción que el promotor P_{lac}. El plásmido pCHESI-H se transfirió desde *E. coli* DH5 α a *P. putida* KT2440 por conjugación tripartita. Los transconjugantes, que adquirirían el plásmido en el cromosoma, se seleccionaron en medio mínimo con benzoato (5 mM) y kanamicina (50 μ g/ml). Entre los distintos clones resistentes a kanamicina, se seleccionó uno donde la inserción cromosómica del

plásmido pCHESI-H se confirmó mediante PCR (Figura C.II.5). Finalmente, el producto de la amplificación se secuenció usando por un lado el oligonucleótido REV y por otro el Hid-bis, confirmando la inserción del plásmido pCHESI-H en el gen PP0382. El gen en el que se insertó el minitransposón se denominó *davA* (δ -aminovalearamida amidohidrolasa), ya que el PP0382 no tenía asignación.

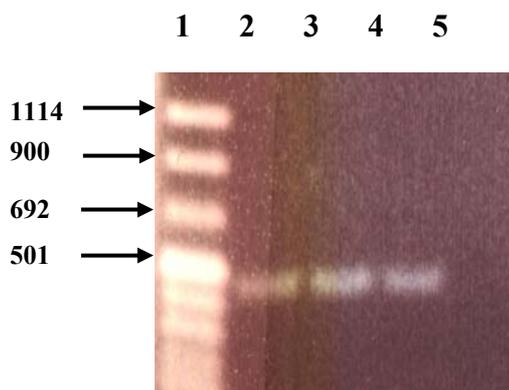


Figura C.II.5. Análisis por PCR de la región donde se encuentra el gen mutado *davA*. PCR de colonias de uno de los mutantes *davA* obtenido tras el hecho de recombinación. Como cebadores se utilizaron los oligonucleótidos REV (5'-CACAGGAAACAGCTATGAC-3') y Hid- (CGGGATCCACCATGCGCATC) que hibridan con el SMC del plásmido pCHESI-B y con el extremo 3' del fragmento del gen clonado en este plásmido, respectivamente. En la amplificación se utilizaron condiciones estándar y una temperatura de hibridación de 55°C. En la calle 1 aparece el marcador VIII, en cuyo margen derecho se indican los tamaños (kilobases) correspondientes a los fragmentos del patrón de peso molecular separados tras la electroforesis. Calle 2 se muestra el control que corresponde al plásmido pCHESI-H; calle 2 y 3 corresponden a las muestras problema procedentes de dos colonias independientes y la calle 4 muestra el control *P. putida* KT2440.

4.2.1.2 Caracterización fenotípica del mutante *davA*.

Para estudiar el efecto que suponía la inactivación del gen *davA* sobre el catabolismo de lisina se decidió estudiar el crecimiento de dicho mutante en medio mínimo con L-lisina como fuente de carbono y/o nitrógeno. Para ello, se siguió la curva de crecimiento en medio mínimo M8 con glucosa como fuente de carbono y L-lisina 5 mM como fuente de nitrógeno (Figura C.II.6), y en M8 con L-lisina 20 mM (Figura C.II.7). Como control de los ensayos se incluyó la cepa silvestre KT2440. En el medio en el que la L-lisina era la única fuente de nitrógeno se observó crecimiento de ambas cepas, aunque el tiempo de generación en fase de crecimiento exponencial de la cepa parental fue de 75 minutos, mientras que el del mutante *davA* fue de 115 minutos.

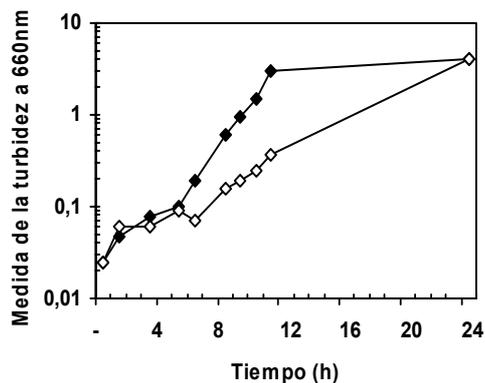


Figura C.II.6: Crecimiento de *P. putida* KT2440 y su derivado isogénico *davA*. La cepa silvestre *P. putida* KT2440 (rombos cerrados) y su mutante *davA* (rombos abiertos) se cultivaron en medio mínimo M8 suplido con L-lisina 5 mM, como única fuente de nitrógeno, y glucosa al 0,5%, como fuente de carbono.

En medio mínimo M8 con L-lisina el tiempo de generación de la cepa parental fue de 90 ± 10 minutos, mientras que el mutante *davA* era incapaz de crecer (Figura C.II.7). Estos datos sugieren que la ruta oxidativa es muy importante para la utilización de este aminoácido como fuente de carbono. Sin embargo, el mutante *davA* es capaz de utilizar la L-lisina como fuente de nitrógeno, lo cual, conduce a la existencia de otra(s) ruta(s) alternativa(s) que permiten metabolizar como fuente de nitrógeno los grupos α - o ϵ -NH₂ de la L-lisina.

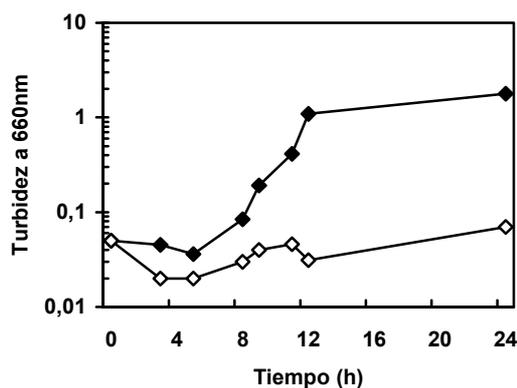


Figura C.II.7: Crecimiento de *P. putida* KT2440 y su derivado isogénico *davA* en M8 suplido con lisina 20mM. Tanto *P. putida* KT2440 como su derivado isogénico fueron preincubados en M9 suplido con benzoato 15 mM, tras alcanzar una fase estacionaria se inocularon M8 suplido con L-lisina 20 mM como única fuente de carbono y nitrógeno, y a lo largo del tiempo se determinó la turbidez del cultivo.

Los ensayos de inducción del promotor P_{davD} en el fondo genético *rei2-1* demostraron que en presencia de cadaverina se inducía dicho promotor. Esto sugería la existencia de una ruta de conversión de cadaverina en δ -aminovalerato. Por otro lado la incapacidad del mutante *davA* de utilizar L-lisina como fuente de carbono, pero no como fuente de nitrógeno nos llevó a determinar el crecimiento de *davA*, *rei2*, *rei2-1* y la cepa parental con cadaverina 5 mM como fuente de nitrógeno (Figura C.II.8). Los tiempos de generación de la cepa silvestre y del mutante *davA* fueron de aproximadamente 100 ± 10 minutos, mientras que para el mutante *rei2* fue de 220 ± 20 minutos. Una posible explicación es que el mutante *rei2* que era incapaz de metabolizar el ácido δ -aminovalérico, podía sustraer un grupo $-\text{NH}_2$ de la cadaverina, gracias a la cadaverina aminotransferasa, sin embargo, era incapaz de recuperar como amonio el segundo grupo $-\text{NH}_2$. Esto explicaría el mayor tiempo de generación que presenta este mutante en L-lisina con respecto al silvestre.

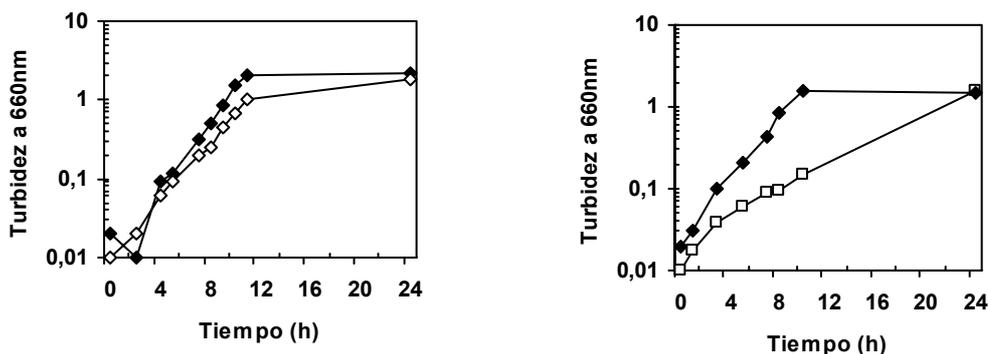


Figura C.II.8: Medida de la turbidez a 660nm de *P. putida* KT2440 y sus derivados isogénicos *rei2* y *davA* en M8 suplido con cadaverina y benzoato. La cepa silvestre *P. putida* (símbolos cerrados) y sus derivados isogénicos (símbolos abiertos, *davA* izquierda y *rei2* derecha) se cultivaron en M8 suplido con cadaverina 5 mM, como fuente de nitrógeno, y benzoato 15 mM, como fuente de carbono.

4.2.2. Construcción de un mutante afectado en el gen *davB* (PP0383).

Un análisis detallado del entorno genético del gen *davA* reveló en 5' un marco abierto de lectura (PP0383) cuyo sentido de la transcripción era el mismo que el gen *davA*. Los estudios de comparación de la secuencia de aminoácidos con las existentes en la base de datos de Genbank, reveló un alto grado de identidad con genes de distintas cepas de *Pseudomonas* que codifican proteínas con potencial actividad como

monooxigenasas. El producto de dicho gen había sido anotado como posible triptófano 2-monooxigenasa, no obstante, no existían pruebas experimentales a favor de dicha propuesta.

Tabla C.II.2. Identidad de secuencia entre el producto del gen PP0383 y las existentes en la base de datos GenBank.

Proteína	Función	% identidad	Organismo	Nº de acceso (GenBank)
Pflu4097	Monoamina oxidasa	87%	<i>P. fluorescens</i>	ZP_00086824
Psyr023373	Monoamina oxidasa	85%	<i>P. syringae</i>	ZP_00126831
PSPTO0518	Trp-2-monooxigenasa	85%	<i>P. syringae</i>	AAO54061
iaaM	Trp-2-monooxigenasa	28%	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	NP_396528

Se decidió inactivar dicho gen y estudiar el efecto que ello producía sobre el catabolismo de la L-lisina. La estrategia llevada a cabo fue similar a la mencionada anteriormente. En este caso se usó el plásmido pCHES-T, cuya diferencia con el anterior, es que este portaba una región interna del gen PP0383 para que permitiera un evento de recombinación a nivel de este gen en el cromosoma de KT2440. Finalmente, entre los distintos clones resistentes a kanamicina se seleccionó uno de ellos al que se le llamó *P. putida* KT2440-davB. La secuenciación de dicho mutante reveló la correcta inserción del plásmido en el gen PP0383.

Posteriormente, se comparó el crecimiento del mutante *P. putida* davB en medio mínimo M8 con L-lisina 20 mM como fuente de carbono y nitrógeno con su parental. El tiempo de generación en fase de crecimiento exponencial para KT2440 fue de 90 ± 10 minutos, mientras que el mutante era incapaz de crecer en dicho medio. Por otro lado se ensayó el crecimiento de la cepa cuando la L-lisina se utilizó como fuente de nitrógeno, para ello se utilizó medio M8 con glucosa al 0,5% (p/v) y 5 mM de L-lisina. Se observó que en fase exponencial la cepa silvestre crecía con un tiempo de generación de 75 minutos y el mutante más lentamente ya que se duplicó con un tiempo de generación de

160 ± 10 minutos (Figura C.II.9). Estos resultados sugerían que el gen *davB* codifica la lisina monooxigenasa.

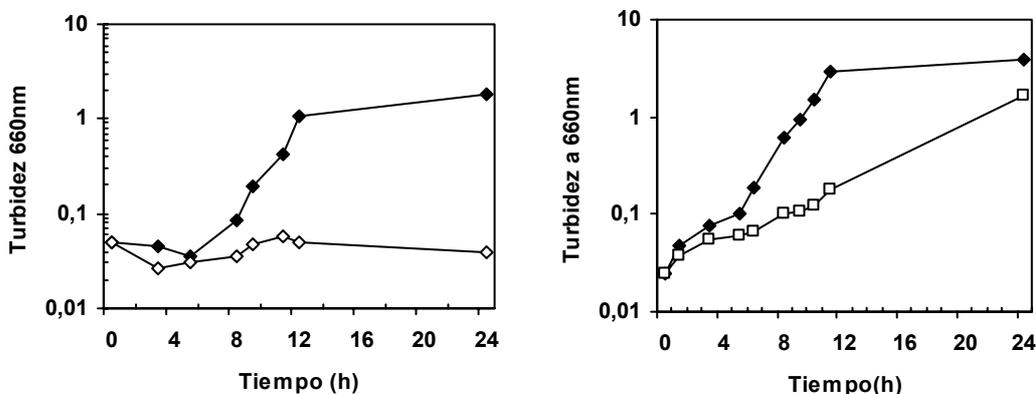


Figura C.II.9: Crecimiento de *P. putida* KT2440 y su derivado isogénico *davB* en M8 suplido con lisina. La cepa silvestre *P. putida* KT2440 (símbolos cerrados) y su derivado isogénico (símbolos abiertos) fueron cultivados en M8 suplido con L-lisina 20 mM, como única fuente de carbono y nitrógeno, como se muestra en la imagen situada a la izquierda. La imagen de la derecha refleja el crecimiento en M8 suplido con L-lisina 5 mM, fuente de nitrógeno, y glucosa al 0,5%, fuente de carbono.

4.2.3.-Estudio de la organización transcripcional de los genes *davB-davA* de *Pseudomonas putida* KT2440.

Se analizó el entorno génico del gen *davA* (PP0382) con objeto de deducir del mismo si existía una agrupación de genes del metabolismo de la lisina. En 5' con respecto a PP0382 y, a tan sólo 18 pb, se encuentra *davB* (PP0383). Aguas arriba de PP0383 pero separado por 257 pb se localizó PP0384 y a 133 pb en sentido 3' con respecto a PP0382 se identificó PP0381. Se utilizó el programa BLASTX (Altschul et al. 1990) para comparar las secuencias de proteínas deducidas, de los distintos genes a analizar, con las bases de datos de proteínas TREMBL y SwissProt. Como se mencionó en los apartados anteriores, PP0382 y PP0383, poseían homología con hidrolasas y monooxigenasas, respectivamente. Las proteínas PP0384 y PP0381 presentaron homología con un regulador transcripcional de la familia AsnC y con la proteína PqqF, respectivamente (Table C.II.3).

Tabla C.II.3: Marcos de lectura abiertos encontrados en la región de 6 kb del cromosoma de *P. putida* KT2440 que engloba a los genes *davB* y *davA*. Se indica el número de asignación de dichos *orf*, el tamaño, el número de acceso a la base de datos de GenBank y la posible función asignada.

orf	PP	Tamaño (pb)	Homólogos	Nº de acceso (GenBank)
<i>orf1</i>	0385	552	Proteína hipotética	AAN66016.1
<i>orf2</i>	0384	459	Regulador transcripcional Familia AsnC	AAN66015.1
<i>lmoA</i>	0383	1680	monooxigenasa	AAN66014.1
<i>davA</i>	0382	792	amidohidrolasas	AAN66013.1
<i>pqqF</i>	0381	2289	Coenzima PQQ	AAN66012.1

El análisis de la secuencia génica *davA-davB* indicaba que probablemente se encontraban formando un operón. Se aisló ARN total de *P. putida* KT2440 a partir de células en fase de crecimiento exponencial tardía cultivada en medio mínimo M9 suplido con benzoato 15 mM e inducidas con L-lisina 5 mM y se llevaron a cabo ensayos de RT-PCR. Los ensayos revelaron que los ARNm *davA* y *davB* rendían una banda del tamaño esperado. No se observó banda en las regiones intergénicas comprendidas entre los genes *AsnC-davB*, pero sí, entre *davA-ppQ*.

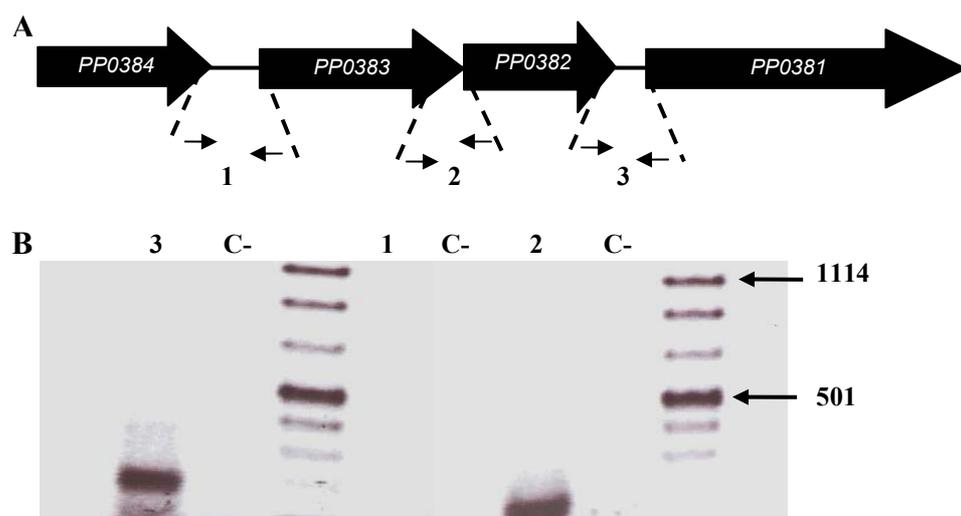


Figura C.II.9. Entorno físico del agrupamiento génico *davA-davB* y la evidencia de que *davA* y *davB* forman un operón. A. Esquema de la organización de los dos operones y del entorno genético. Las flechas indican el sentido de la transcripción. B. El producto resultante de las distintas RT-PCR se separó

en un gel de agarosa, como se describe en Materiales y Métodos. La calle 1 corresponde al producto de amplificación de las regiones intergénica PP0384-PP0383; calle 2 al de las regiones PP0383-PP0382 y la calle 3 PP0382-PP0381. Cada reacción de RT-PCR lleva su control correspondiente con la misma reacción de RT-PCR pero sin transcriptasa inversa C-.

Los ensayos de RT-PCR revelaron como los genes *davA-davB* se disponían formando una unidad transcripcional.

4.2.4 Análisis de la inducción del operón de *davA-davB*.

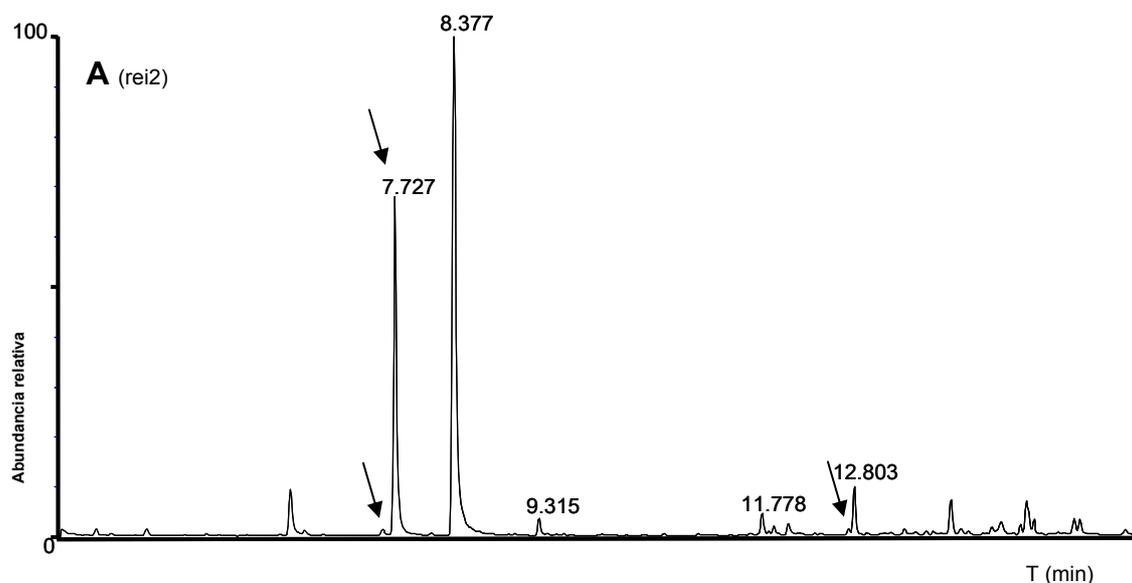
Para estudiar el efecto inductor de la L-lisina sobre la expresión del operón *davA-davB* se llevo a cabo una fusión transcripcional de la región 5' de *davB* al gen *lacZ'* del plásmido pMP220, obteniéndose el plásmido pOR3. Éste se transfirió a *P. putida* KT2440 y a los mutantes *davA* y *davB*. Las medidas de actividad β -galactosidasa se realizaron en células cultivadas en medio mínimo M9 suplido con benzoato 15 mM, al que se le añadió el agente inductor L-lisina 5 mM, en los casos donde se indiquen. La actividad β -galactosidasa se determinó 7 horas tras la inducción, estando las células en fase exponencial. En aquellos casos donde no se añadió L-lisina la actividad β -galactosidasa fue de 150 U.M., mientras que en presencia de ésta fue de 1950 U.M.

4.2.5 Producción de CO₂ en *P. putida* KT2440 y en su derivado isogénico *davB*.

La enzima L-lisina 2-monooxigenasa cataliza el primer paso enzimático de la ruta monooxidativa, se trata de una descarboxilación oxidativa que rinde δ -aminovaleramida con la consecuente producción de una molécula de CO₂. Ya que propusimos que el gen *davB* codifica tal enzima decidimos analizar los niveles de ¹⁴CO₂ producidos a partir de [U¹⁴C] L-lisina tal como se describió en la sección 15.1 de Materiales y Métodos. Los valores obtenidos a los cinco minutos de la inducción con [U¹⁴C] L-lisina fueron de 14.250 cpm por unidad de D.O₆₆₀ para *P. putida* KT2440 y 765 cpm/unidad de D.O₆₆₀ para *davB*. Estos ensayos se han hecho a partir de células preinducidas con L-lisina 5 mM.

4.2.6. Análisis de los metabolitos intracelulares en los mutantes *davA* Y *rei2*.

Se decidió analizar los niveles de los metabolitos intracelulares δ -aminoadipato, L-pipecolato y δ -aminovalerato en los mutantes *rei2* y *davA*. En el mutante *rei2* la ruta de degradación de δ -aminovalerato está bloqueada. Por otro lado, en el mutante *davA* está obstruida la ruta principal que da lugar a δ -aminovalerato, como muestran los ensayos de inducción del promotor *davDT*. La acumulación de metabolitos en estos mutantes nos podría dar información sobre la contribución relativa de las distintas vías en el catabolismo de lisina. Los metabolitos intracelulares se analizaron como se indicó en la sección 16 de Materiales y Métodos. Los mutantes *rei2* y *davA* se inocularon en 50 ml de medio mínimo M8 con L-lisina 5 mM y glucosa 0,5 % en matraces de 500 ml de volumen. Tras alcanzar la fase exponencial tardía se recogieron las células y se llevó a cabo la extracción y la reacción de derivatización. A partir de las curvas estándar, previamente establecidas, se determinó la concentración de cada uno de los metabolitos L-pipecolato, δ -aminovalerato y δ -aminoadipato. En la figura C.II.11, se muestran los espectros obtenidos para los mutantes *rei2* y *davA*, mientras que en la Tabla C.II.4 aparece la concentración de los diferentes compuestos acumulados en *rei2* y *davA* en función de la concentración de proteínas.



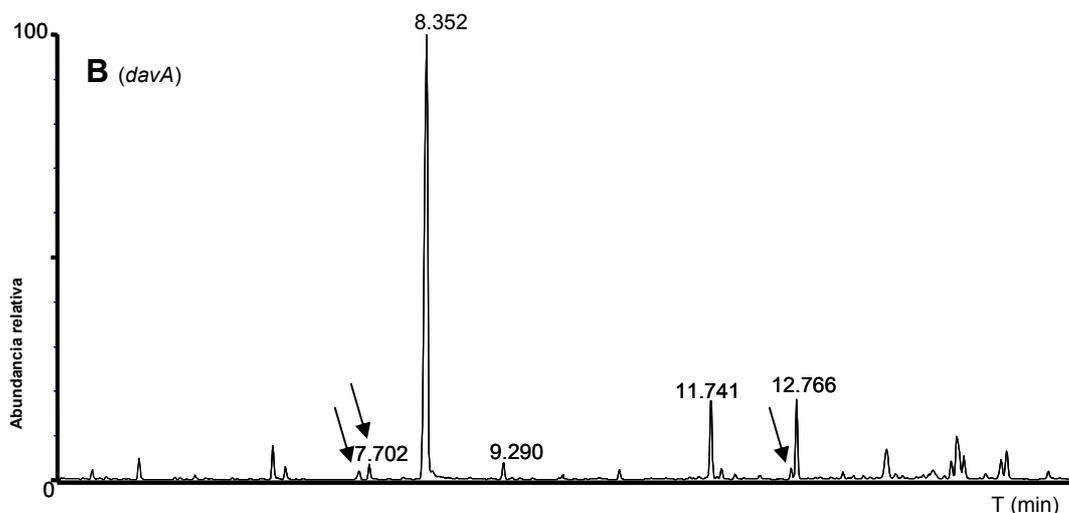


Figura C.II.11. Cromatografía de gases correspondiente a extracciones intracelulares de un cultivo procedente de los mutantes *rei2* y *davA*. Los cromatogramas corresponden a compuestos intracelulares extraídos de los mutantes *rei2* y *davA* tras alcanzar la fase exponencial de crecimiento en medio mínimo M8 suplido con L-lisina 5mM y glucosa 0,5%. La figura A corresponde a *rei2* y la B a *davA*. Los picos detectados a los distintos tiempos de retención corresponden a: L-pipecolato (TR 7,56); δ -aminovalerato (TR 7,71); ácido trópico (TR 9,3); δ -aminoadipato (TR 12,6) y L-lisina (12,7).

Tabla C.II.4: Cantidades intracelulares de los distintos intermediarios del catabolismo de L-lisina en *P. putida* KT2440 y su derivado isogénico *davA*^a.

Cepa	pmoles/mg de proteína		
	δ -aminovalérico	L-pipecolato	δ -aminoadipato
<i>P. putida</i> KT2440	6 \pm 1,5	22 \pm 6,5	4 \pm 0,5
<i>rei2</i>	205 \pm 125	6 \pm 1,5	3,2 \pm 0,3
<i>davA</i>	5,5 \pm 0,5	21 \pm 2	4 \pm 0,5

^a*P. putida* KT2440 y sus derivados isogénicos fueron inoculados en 50 ml de cultivo M8 suplido con L-lisina 5mM y glucosa 0,5% tras alcanzar la fase exponencial tardía se recogieron los cultivos y se procedió a su extracción y derivatización, tal como se indica en Materiales y Métodos.

Como se describió en la Introducción de esta Tesis Doctoral, existen al menos tres rutas para el catabolismo de L-lisina en las bacterias del género *Pseudomonas*, vía cadaverina, vía aminovaleramida y/o vía pipecolato o D-lisina. Al analizar los intermediarios del catabolismo de L-lisina en *P. putida* KT2440 se observó que tanto la ruta del δ -aminovalerato como la de la D-lisina estaban operativas. Por otro lado, en el mutante *davA*, bloqueado en la ruta monooxidativa, se detectó δ -aminovalerato a niveles

similares a los de la cepa parental, sugiriendo que la ruta de la cadaverina era funcional. Finalmente, los elevados niveles de δ -aminovalerato en *rei2* demostraron que la ruta de degradación de dicho ácido estaba bloqueada.

4.2.7 Complementación de los mutantes *davA* y *davB*.

Para confirmar que el defecto en la capacidad de metabolizar la L-lisina en los mutantes *davA* y *davB* era debida a la inactivación de los genes PP0382 y PP0383, respectivamente, se usó la genoteca de *P. putida* KT2440 construida mediante clonación de los fragmentos resultantes de una digestión parcial de su cromosoma con *PstI* en el vector pLARF3 (Ramos-Gonzalez et al. 1993). Para ello se usó como sonda los genes *davA* y *davB* y se seleccionaron aquellas colonias procedentes de la genoteca que poseían tales genes. Se extrajeron dichos cósmidos y volvieron a hibridarse con la sonda *davA* tras digerirlos con *EcoRI*, la banda resultante de 3,5 Kb portadora de ambos genes se clonó en el vector pBBR1MCS-5. La Figura C.II-12 muestra los cósmidos procedentes de seis colonias independientes producto de la digestión con *EcoRI*, hibridados con la sonda *davA*.

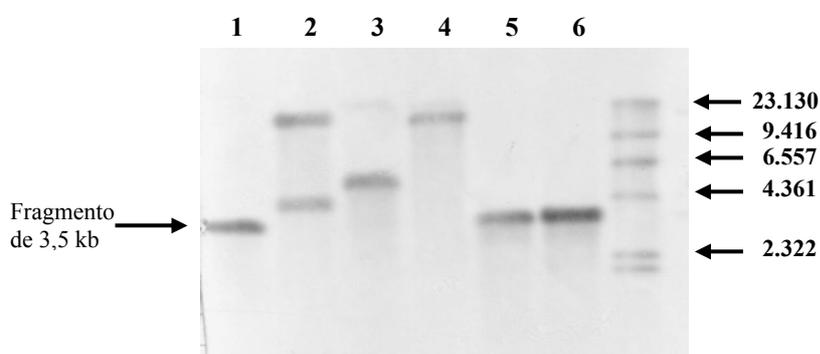


Figura C.II.12: Detección de los cósmidos portadores del gen *davA* mediante hibridación. El ADN de los cósmidos fue digerido con *EcoRI* y se separó mediante electroforesis en gel de agarosa. Posteriormente se transfirió el ADN a una membrana de nylon. Como sonda de ADN se utilizó la correspondiente al gen *davA*. El tamaño del fragmento *EcoRI* portador de los genes *davA* y *davB* era de 3,5 kb, de tal modo que sólo la calle 1, 5 y 6 se seleccionaron.

El plásmido portador del fragmento de 3,5 kb se transfirió a *P. putida* KT2440-*davA*, los transconjugantes fueron seleccionados en medio mínimo M8 suplidos con L-lisina 10 mM, Km y Gm. Para comprobar que recupera su fenotipo, se pusieron

cultivos de KT2440 y su cepa isogénica complementada, en medio mínimo M8 suplido con L-lisina 20 mM y se estudió el tiempo de generación de ambos. El mutante *davA* complementado con el plásmido recuperaba su capacidad de catabolizar la L-lisina con un tiempo de generación mayor a la cepa parental, 100 ± 20 minutos.

4.3 Ruta de la cadaverina. Lisina descarboxilasa.

En *P. aeruginosa* se describió la ruta de la cadaverina que permite su oxidación completa hasta CO_2 y H_2O (Figura C.II.13). A lo largo de este estudio se han obtenido evidencias experimentales que sustentan la posible existencia de dicha ruta en *P. putida* KT2440. Así *P. putida* KT2440 utilizaba cadaverina como fuente de carbono y/o nitrógeno. El mutante *rei2*, incapaz de catabolizar el ácido aminovalérico, se duplicaba en medio en M8 suplido con cadaverina 5 mM y benzoato 15 mM con un tiempo de generación de 220 ± 20 minutos, mientras que la cepa parental lo hacía con un tiempo de generación de 100 ± 10 minutos. La cadaverina en el mutante *rei2* y en el mutante *davA* inducía el promotor del operón *davDT*. Por último, en el mutante *davA* se observó δ -aminovalérico a unas concentraciones intracelulares similares a la cepa parental.

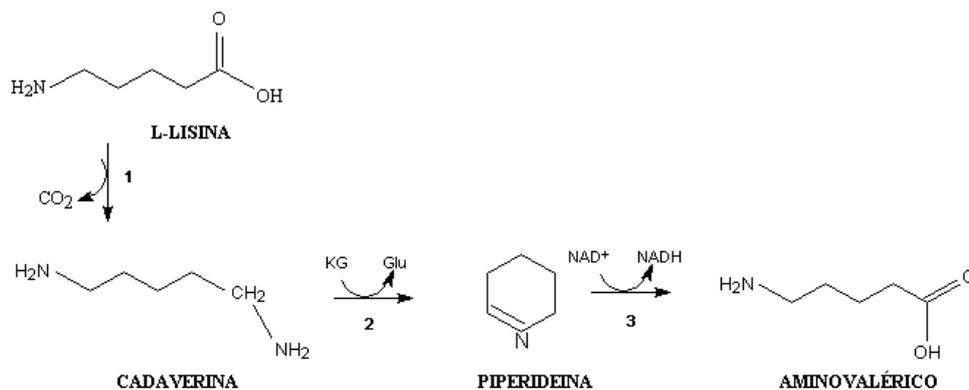


Figura C.II.13: Ruta propuesta para el catabolismo de lisina. Ruta de la cadaverina. Las enzimas implicadas en los distintos pasos de la ruta son: L-Lisina descarboxilasa (1) E.C:4.1.1.18; Cadaverina aminotransferasa (2) y 1-Piperideína deshidrogenasa (3).

Todos los estudios realizados hasta el momento sobre el catabolismo de L-lisina en *Pseudomonas* están hechos a nivel enzimático desconociéndose, por tanto, qué genes están implicados. Por esta razón, se decidió estudiar otros organismos cercanos a *P.*

putida KT2440 donde se conociera la secuencia codificante de dichas proteínas. *E. coli* es incapaz de metabolizar la L-lisina hasta CO₂ y H₂O, sin embargo, posee la capacidad de sintetizar cadaverina a partir de L-lisina gracias a la existencia de dos lisina descarboxilasas. Una de ellas, *cadA*, es inducible por lisina, bajos niveles de pH y condiciones de anoxia, mientras que, por el contrario, la otra, *ldc*, es constitutiva aunque su nivel de expresión es bajo. La comparación de la secuencia de ambas isoenzimas con el genoma de *P. putida* KT2440 reveló un marco abierto de lectura, PP4140, que presentaba un 60% de similitud con dichas isoenzimas (Tabla C.II.5). Las dos isoenzimas presentan un alto grado de similitud, de tal modo que, ambas rindieron el mismo marco abierto de lectura en *P. putida* KT2440 cuando se realizó el análisis con los programas BLAST

Los estudios de comparación de la secuencia de proteínas resultante del gen PP4140 con las existentes en la base de datos de GenBank, mostraron el alto grado de identidad que tenía con genes de distintas cepas de *Pseudomonas* con potencial actividad como descarboxilasas, no existiendo ninguna evidencia experimental que sustentara tal actividad.

Tabla C.II.5: Proteínas similares a la codificada por el gen PP4140. La tabla recoge información sobre el porcentaje de identidad, organismo al que pertenece y nº de acceso a la base de datos de GenBank de las proteínas homólogas a la secuencia del gen PP4140.

Proteína	Función	Porcentaje de similitud	Organismo	Nº de acceso (Genbank)
Pflu3270	Arg/Orn/Lys descarboxilasa	90%(80% ident)	<i>P. fluorescens</i>	ZP00265398
Paer385201	Arg/Orn/Lys descarboxilasa	88%(78% ident)	<i>P. aeruginosa</i>	ZP00139475.1
ldcC	Lisina descarboxilasa	60%(43% ident)	<i>S. typhimurium</i>	NP459239
ldcC	Lisina descarboxilasa	60%(43% ident)	<i>E. coli</i>	NP752172

El *orf* PP4140 es de 2248 pb y codificaría una proteína de 749 aa. En sentido 5', y a 131 pb, aparece el codón de terminación de la transcripción del gen *dnaQ*, que

codifica la subunidad ϵ de la ADN polimerasa III, (756 pb) cuyo producto es una proteína de 252 aa; en sentido 3', a 10 pb, del codón de terminación del PP4140 aparece un marco abierto de lectura de 216 pb. Este se transcribe en sentido opuesto al gen PP4140 y el resultado de la traducción es una proteína de 72 aa.



Figura C.II.14: Esquema de la estructura del entorno genético del gen PP4140 de *P. putida* KT2440. Aquellas flechas que aparecen rellenas de negro poseen asignada una posible función, mientras que las que están de blanco se trata de marcos abiertos de lectura sin función conocida.

4.3.1. Inactivación del gen PP4140.

Con el fin de estudiar la función del gen PP4140, así como, su implicación en la ruta de la cadaverina se decidió inactivar dicho gen y analizar el fenotipo resultante. Para ello, se usó el plásmido pCHES-L, un derivado del plásmido pCHES Ω Km portador de un fragmento interno de 500pb del gen PP4140 en el mismo sentido de transcripción del P_{lac}. El plásmido pCHESI-L se transfirió desde *E. coli* DH5 α a *P. putida* KT2440 por conjugación tripartita. La selección de los transconjugantes y la verificación de los mutantes se realizaron de igual modo al mencionado en los casos anteriores. Finalmente, se seleccionó un transconjugante que poseía insertado el plásmido pCHESI-L en el gen PP4140, al cual se le llamó *P. putida* KT2440 ldc.

4.3.2. Identificación de un fenotipo asociado a la mutación en el gen *ldc*.

Para determinar la implicación de dicho gen en el catabolismo de L-lisina se determinó el tiempo de generación de dicho mutante con respecto al silvestre tanto en M8 suplido con L-lisina 5 mM y glucosa al 0,5%, como en M8 suplido con L-lisina 20 mM (Figura C.II.15). La metodología empleada para ello ha sido la misma que la descrita a lo largo de los ensayos explicados en los apartados anteriores. De la pendiente de las curvas de crecimiento se calculó que el tiempo de generación en M8 suplido con L-lisina 5 mM y glucosa al 0,5% fue de 63 ± 10 minutos para la cepa parental, mientras

que para su derivado isogénico ldc era de 78 ± 2 minutos. A su vez, en M8 suplido con lisina 20 mM fue de 90 ± 10 minutos y 125 ± 15 minutos, respectivamente.

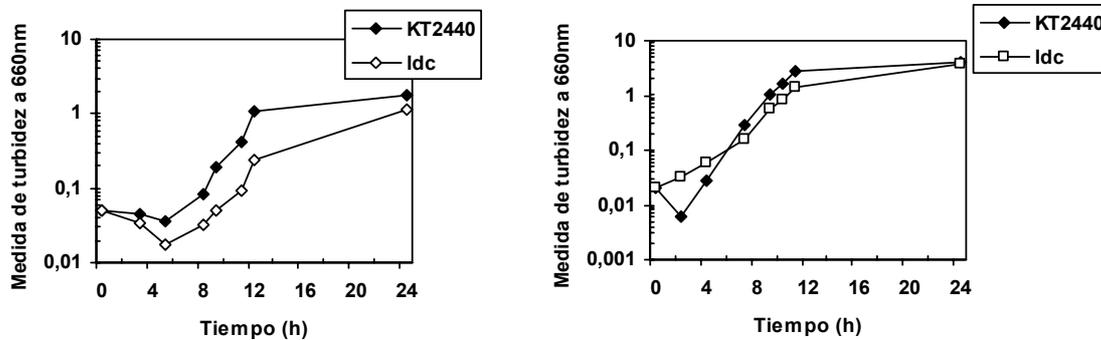


Figura C.II.15: Medida de la turbidez a 660nm de *P.putida* KT2440 y su derivado isogénico ldc. *P. putida* KT2440 (símbolos cerrados) y el mutante (símbolos abiertos) se cultivaron en M8 suplido con lisina 20 mM (izquierda) y en M8 suplido con L-lisina 5 mM y con glucosa 0,5% (derecha).

El tiempo de generación del mutante ldc, ligeramente superior al de la cepa parental, apoya su participación en el catabolismo de lisina, pero parece que su papel es minoritario con respecto a la ruta oxidativa, ya que mutantes en el gen *davB* y *davA* son incapaces de usar L-lisina como fuente de carbono y nitrógeno. Existe por tanto, una intervención, ya sea directa o indirecta, de dicho gen en el catabolismo de lisina. No obstante, ya que dicho gen tiene homología con la Lys/Arg/Orn descarboxilasa de *P. aeruginosa* y para descartar su implicación en el catabolismo de arginina, se decidió estudiar el tiempo de generación de dicho mutante en presencia de arginina. Para ello se establecieron cultivos de ambas cepas, parental y mutante, en medio líquido M9 con benzoato 15 mM y su correspondiente antibiótico a 30°C, durante 12 horas y con agitación continua. Transcurrido este tiempo se diluyeron en medio mínimo M8 suplido con arginina 20 mM y se determinó así el tiempo de generación (Figura C.II.16). Este fue de 70 minutos en ambas cepas.

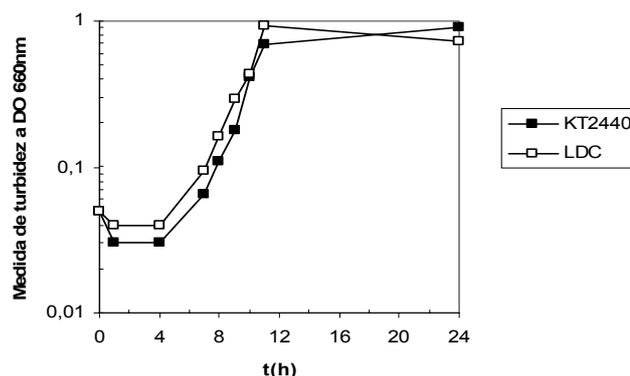


Figura C.II.16: Medida de la turbidez a 660nm de *P.putida* KT2440 y su derivado isogénico ldc en M8 suplido con arginina 20mM. La cepa silvestre (símbolos cerrados) y el mutante ldc (símbolos abiertos) se cultivaron en M8 suplido con arginina 20 mM según las condiciones detalladas en el texto.

4.4.3 Análisis de la acumulación de metabolitos intracelulares en ldc.

Los metabolitos intracelulares se analizaron como se indicó en la sección 16 de Materiales y Métodos. El mutante ldc fue inoculado en 50 ml de medio mínimo M8 con L-lisina 5 mM y glucosa 0,5 % en matraces de 500 ml de volumen. Tras alcanzar la fase exponencial tardía se recogieron los cultivos y se llevó a cabo la extracción y la reacción de derivatización. A partir de las curvas estándar, previamente analizadas, se determinó la concentración de cada uno de los metabolitos L-pipecolato, δ -aminovalerato y 2-aminoadipato. En la Figura C.II.17, se muestran el cromatograma de gase obtenido para el mutante ldc, mientras que en la Tabla C.II.6 aparece la concentración de los diferentes compuestos acumulados en ldc.

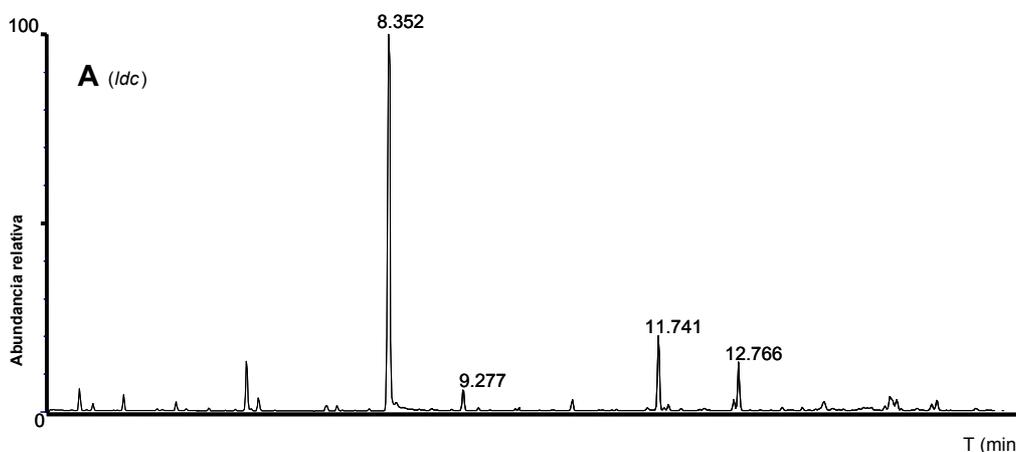


Figura C.II.17. Cromatografía de gases correspondiente a extracciones intracelulares de un cultivo procedente del mutante ldc. Los picos detectados a los distintos tiempos de retención corresponden a:

L-pipecolato (TR 7,56); δ -aminovalerato (TR 7,71); ácido trópico (TR 9,3); 2-aminoadipato (TR 12,6) y L-lisina (12,7).

Tabla C.II.6: Cantidades intracelulares de los distintos intermediarios del catabolismo de L-lisina en *P. putida* KT2440 y su derivado isogénico *ldc*^a.

Cepa	pmoles/mg de proteína		
	δ -aminovalérico	L-pipecolato	δ -aminoadipato
<i>P. putida</i> KT2440	6 \pm 1,5	22 \pm 6,5	4 \pm 0,5
<i>ldc</i>	10 \pm 4,5	24 \pm 6	3,5 \pm 1

^a*P. putida* KT2440 y su derivado isogénicos fueron inoculados en 50 ml de cultivo M8 suplido con L-lisina 5mM y glucosa 0,5% tras alcanzar la fase exponencial tardía se recogieron los cultivos y se procedió a su extracción y derivatización, tal como se indica en Materiales y Métodos.

4.3.4 Expresión del promotor *davDT* en los mutantes afectados en las rutas que conducen a δ -aminovalérico.

El plásmido pOR2 porta una fusión del promotor *davDT* a *lacZ'* y con objeto de estudiar la inducción de este promotor en el fondo genético de los distintos mutantes afectados en las rutas que conducen a δ -aminovalérico, se transfirió mediante electroporación, a los mutantes *davA*, *davB* y *ldc* y se estudió la actividad β -galactosidasa (Tabla C.II.7).

Tabla C.II.7: Medida de la actividad β -galactosidasa del plásmido pOR2 en KT2440 y su derivados isogénicos *davA*, *lmoA* y *ldc*^a.

Cepa	Actividad β -galactosidasa (Unidades Miller \pm DS)			
	---	L-Lys	AMV	Cadaverina
KT2440	620 \pm 10	1280 \pm 100	1730 \pm 20	930 \pm 60
<i>ldc</i>	485 \pm 20	740 \pm 10	1700 \pm 10	945 \pm 80
<i>davA</i>	470 \pm 10	530 \pm 30	1700 \pm 120	840 \pm 10
<i>davB</i>	565 \pm 95	490 \pm 70	1650 \pm 20	900 \pm 20

^aKT2440, *davA*, *lmoA* y *ldc* portadores del plásmido pOR2 fueron cultivadas en medio mínimo M9 con benzoato como fuente de carbono. En aquellos casos en los que se indica se añadió L-lisina 5 mM, δ -aminovalérico 5 mM y cadaverina 2,5 mM, como agente inductor. La actividad β -galactosidasa se da en Unidades Miller a partir de la media de tres ensayos independientes.

Al comparar el patrón de inducción del promotor *davDT*, se observó que los mutantes *davA* y *davB* estaban afectados en su capacidad de inducción con L-lisina. En presencia del ácido δ -aminovalérico se restaura la inducción de P_{dav} . A su vez, la inducción por L-lisina, del promotor P_{dav} en el mutante *ldc* es un 25 % menor que en la cepa parental.

4.4 Ruta del pipecolato.

Al analizar los metabolitos intracelulares existentes en *P. putida* KT2440 en presencia de L-lisina se detectó la acumulación de L-pipecolato y 2-aminoadipato, compuestos procedentes de la ruta de degradación de D-lisina. Esto indicaba, que la L-lisina se estaba catabolizando también a través de otra ruta alternativa que implicaría la conversión de L-lisina en D-lisina, paso que estaría catabolizado por la lisina racemasa, y su posterior degradación vía L-pipecolato. Dichas rutas, habían sido descritas a nivel bioquímico en los años 70. Sin embargo, hasta el momento no se había descrito en *P. putida* ningún gen que codificara enzimas implicadas en tales rutas. Por tanto, decidimos llevar a cabo una serie de experimentos que nos permitieran comprobar la existencia de rutas alternativas para el catabolismo de lisina.

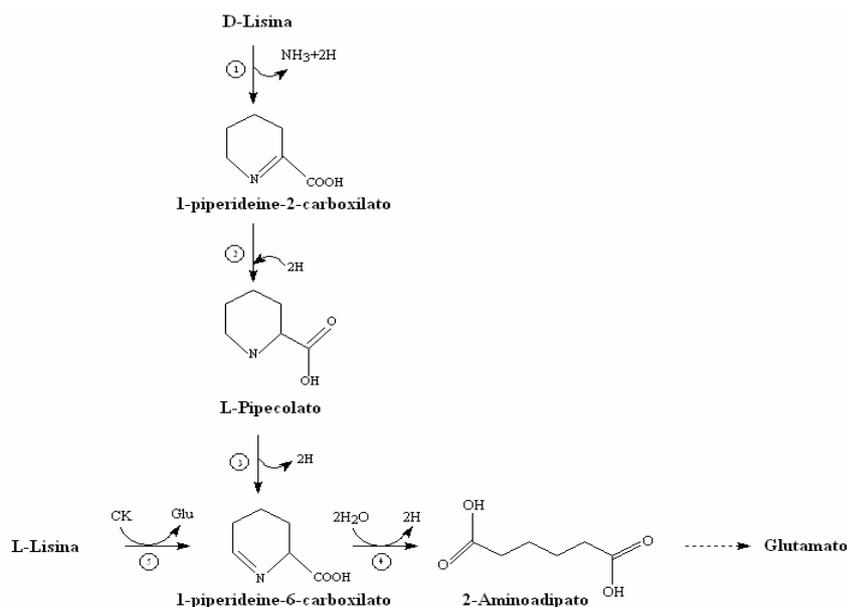


Figura II.18: Ruta de degradación de lisina. Ruta del pipecolato y de la enzima 6-aminotransferasa. Las enzimas implicadas en los pasos de la ruta son: (2) $^1\Delta$ -piperideina-2-carboxilato reductasa (EC,

1.5.1.); (3) L-pipecolato deshidrogenasa (EC, 1.5.99.3); (4) Δ -piperideina-6-carboxilato deshidrogenasa (EC, 1.5.1.-); (5) L-lisina 6-aminotransferasa (EC, 2.6.1.36). A su vez la lisina racemasa (EC, 5.1.1.5) permite la conversión de D-lisina en L-lisina y viceversa.

4.4.1 Aislamiento de genes implicados en el catabolismo de L-lisina.

Para la obtención de mutantes de *P. putida* KT2440 afectados en la utilización de lisina se utilizó el plásmido pUT portador del mini-Tn5Km, cuyo origen de replicación es *oriR6K* y que, por tanto, no se replica en *P. putida* KT2440. Se realizó una conjugación tripartita utilizando las cepas *Pseudomonas putida* KT2440 como receptora; *E. coli* S17-1- λ pir (pUT-Km) como donadora y HB101 (pRK600) como cepa auxiliar, tal y como se detalla en Materiales y Métodos. Las cepas se mezclaron en proporción 1:1:1 y tras ocho horas de incubación a 30°C, las células se resuspendieron en 1xM9 y se sembraron diluciones seriadas en medio mínimo M9, con glucosa 20 mM, Cm y Km. Las colonias obtenidas, se repicaron en este medio que servía de control y en M8, con 20 mM de L-lisina como fuente de carbono y nitrógeno, Cm y Km, para buscar mutantes afectados en la utilización de L-lisina como fuente de carbono. Finalmente, se obtuvieron 5 colonias incapaces de utilizar L-lisina como fuente de carbono y/o nitrógeno. Dichas colonias se seleccionaron para análisis posteriores. Los mutantes seleccionados se denominaron de *lys1* a *lys5*.

4.4.2 Caracterización de los mutantes deficientes en el catabolismo de L-lisina en *P. putida* KT2440: Mutantes afectados en el catabolismo del ácido pipecólico.

Para definir el fenotipo de cada uno de los mutantes se determinó el tiempo de generación en presencia de diferentes intermediarios del catabolismo de D- y/o L-lisina que actuarían como fuente de carbono y/o nitrógeno. En estos estudios no se incluyó el mutante *lys3*, ya que se comprobó mediante secuenciación que la enzima inactivada correspondía a una Helicasa y por tanto no se trataba de ninguna enzima implicada en el catabolismo de lisina. Tampoco se mencionó *lys4* ya que los análisis de BLAST daban homología con una malato deshidrogenasa, sin embargo, durante este trabajo en un estudio realizado por Muramatsu y colaboradores (2004) se comprobó que el gen

afectado en este mutante codifica la enzima Δ -piperideina-2-carboxilato deshidrogenasa, responsable del segundo paso de degradación de la ruta de la D-lisina.

Se estimaron los tiempos de generación en fase de crecimiento exponencial de *P. putida* KT2440 y de los mutantes lys, en medio mínimo M8 suplido con L-lisina 20 mM como única fuente de carbono y nitrógeno. La cepa silvestre y los mutantes se cultivaron en medio líquido M9 con benzoato 15 mM y su correspondiente antibiótico a 30°C, durante 12 horas con agitación. Transcurrido este tiempo se diluyeron cien veces en medio M8 suplido con L-lisina 20 mM como única fuente de carbono y nitrógeno. Se determinó el incremento de la turbidez del cultivo a 660 nm así como el número de UFC/ml de las cepas a lo largo del tiempo. Los resultados obtenidos se presentan en la Figura C.II.19, y la Tabla C.II.8 resume los tiempos de generación. El tiempo de generación en fase de crecimiento exponencial para *P. putida* KT2440 fue de 90 ± 10 minutos, presentando una larga fase de latencia. Los mutantes lys1, lys2 y lys5 fueron incapaces de crecer en este medio.

Posteriormente se determinó el tiempo de generación de la cepa silvestre y de los distintos mutantes en presencia del ácido δ -aminovalérico, intermediario del catabolismo de L-lisina (Figura I.7, Introducción). El experimento se realizó como se acaba de describir en el ensayo anterior, excepto que se utilizó medio de cultivo M9 con 15 mM δ -aminovalérico. Los resultados se muestran en la Figura C.II.19 y en la Tabla C.II.8. El tiempo de generación de la cepa parental fue de 75 ± 10 minutos, siendo el tiempo de generación de los tres mutantes ensayados del mismo orden. Este resultado sugería que ninguno de los mutantes aislados se encontraba afectado en un paso posterior a la ruta del catabolismo del ácido δ -aminovalérico.

Para comprobar si la ruta de la cadaverina estaba afectada en alguno de estos mutantes, se determinó el tiempo de generación en presencia de cadaverina. El medio de cultivo utilizado fue M8 con benzoato 15 mM y cadaverina 5 mM, en este caso la cadaverina fue aportada al medio como fuente de nitrógeno. A su vez, los resultados se presentan en la Figura C.II.19 y Tabla C.II.8. El tiempo de generación de la cepa parental y de los mutantes (100 ± 10 minutos) indica que la ruta de la cadaverina permanece inalterada.

Tabla II.8: Tiempo de generación de *P. putida* KT2440 y los mutantes derivados crecidos en presencia de diferentes fuentes de carbono y nitrógeno^a.

Cepa	M8 L-lys	M9lys	M8 lys Gluc	M9+ AMV	M8Cad Bz	M8Dlys Bz	M9Pipec
KT2440	80±10	75	70±5	75±10	100±10	90	65±5
lys1	no	no	115 ± 10	70±5	105±5	116	no
lys2	no	no	145 ± 25	75±5	100±5	365	65
lys5	no	no		80±10	115±25	160	No

^aCélulas *P. putida* KT2440 y sus respectivos mutantes fueron cultivadas en medio mínimo M9 con benzoato 15 mM durante 12 h a 30°C, posteriormente se hicieron diluciones alicuotas en los medios indicados. Los valores son el resultado de una media procedente de tres ensayos independientes.

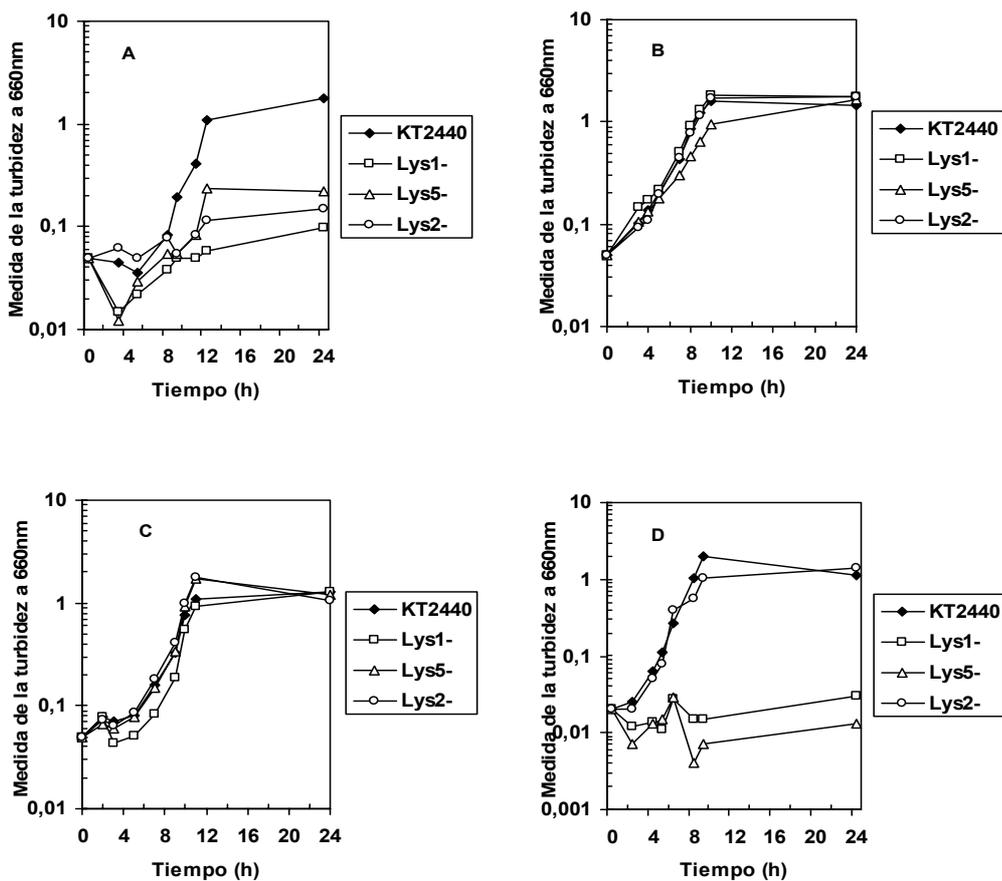


Figura C.II.19: Crecimiento de *P. putida* KT2440 y sus derivados isogénicos lys1-, lys5- y lys2- en distintos medios. *P. putida* KT2440 (símbolos cerrados) y sus derivados isogénicos (símbolos abiertos) lys1 (cuadrados), lys5 (triángulos) y lys2 (círculos) fueron cultivados en: M8 suplido con L-lisina 20 mM

como única fuente de carbono y nitrógeno (panel A); M8 más cadaverina 5 mM y benzoato 15 mM (panel B); M9 suplido con δ -aminovalérico 15 mM (panel C) y M9 más pipecólico 15 mM (panel D).

Finalmente se analizó el tiempo de generación en M8 suplido con D-lisina 20 mM, aportada como única fuente de carbono y nitrógeno, ya que esta puede formarse directamente de la L-lisina gracias a la lisina racemasa (Figura C.II.12). En este caso, el tiempo de generación de la cepa parental fue 75 ± 5 mientras que los mutantes *lys* fueron incapaces de metabolizar la D-lisina. Al ser el ácido pipecólico un intermediario de la ruta de degradación de la D-lisina se analizó el tiempo de generación en medio mínimo M9 suplido con ácido pipecólico 15 mM. Este fue 65 ± 5 para KT2440 y *lys2* (Tabla II.8), mientras que los mutantes *lys1* y *lys5* se vieron fuertemente afectados en su capacidad para metabolizar el ácido pipecólico y no se observó crecimiento alguno. Finalmente, los ensayos realizados con el 2-aminoadipato indicaron que este compuesto restauraba el crecimiento de los mutantes *lys1* y *lys5*, lo cual confirmaba que en los mutantes *lys1* y *lys5* la ruta de pipecolato hacia 2-aminoadipato estaba afectada.

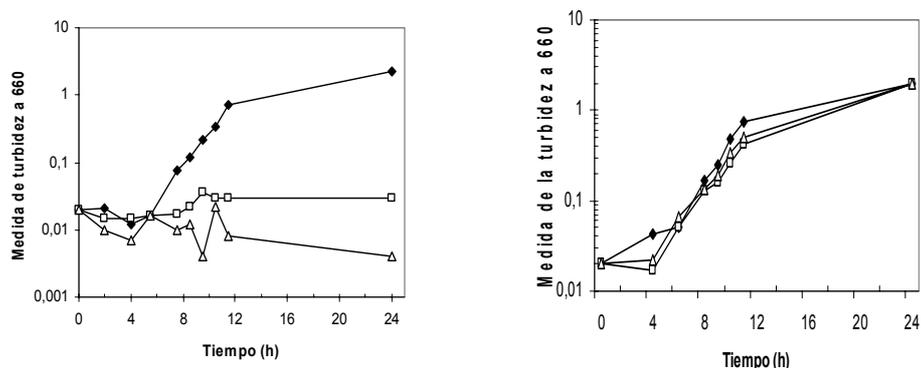


Figura C.II.20: Crecimiento de *P. putida* KT2440 y sus derivados isogénicos *davA*, *ldc*, *lys1* y *lys5*. *P. putida* KT2440 (símbolos cerrados) y sus derivados isogénicos (símbolos abiertos) fueron cultivados en M8 suplido con D-lisina 20 mM como única fuente de carbono y nitrógeno. En el panel de la izquierda se representan los mutantes *lys1* (cuadrados) y *lys5* (triángulos); en el de la derecha *davB* (cuadrados) y *ldc* (triángulos)

Para comprobar si los mutantes descritos en los apartados anteriores, *davB* y *ldc*, se encontraban afectados en su capacidad para metabolizar la D-lisina se estimó el tiempo de generación en fase exponencial de estos mutantes en medio mínimo M8 suplido con D-lisina 20 mM (Figura C.II.20). El tiempo obtenido fue 100 ± 10 minutos, algo superior al de la cepa parental. Esto ponía de manifiesto que los mutantes afectados

en la ruta de la cadaverina o en la ruta monooxidativa mantienen su capacidad para catabolizar D-lisina.

4.4.3 Identificación de los genes alterados en los mutantes *lys1*, *lys2*, y *lys5*.

4.4.3.1. Determinación de la localización del *miniTn5* mediante hibridación.

Mediante hibridación se comprobó que cada mutante era el resultado de un único evento de transposición en la cepa parental. Se usó como sonda de hibridación el gen de resistencia a kanamicina (*Km1*). El cromosoma de los distintos mutantes, y del silvestre, fue digerido con *NotI*, *KpnI* y *NotI-KpnI*. Tras la digestión y separación electroforética se llevó a cabo una hibridación usando dicha sonda marcada con digoxigenina. Los resultados obtenidos se presentan en la Figura C.II.21, observándose una única banda en todos los mutantes, lo cual, confirmaba que sólo se había insertado una única copia del transposón en el cromosoma de KT2440.



Figura C.II.21: Hibridación de ADN cromosómico de los distintos derivados isogénicos de *P. putida* KT2440 usando como sonda la derivada del gen kanamicina 1. El AND cromosómico digerido con *NotI* se muestra a la izquierda del gel, mientras que el digerido con *KpnI* esta en el centro de la imagen flanqueado por el marcador λ *HindIII*, finalmente el proveniente de una digestión doble *KpnI-NotI* está situado a la derecha de la imagen. En las calles 1, 6 y 11 se muestran el ADN cromosómico de *P. putida* KT2440, calles 2, 7 y 12 de *lys1*; calles 3, 8 y 13 de *lys2*; calles 4, 9 y 14 de *lys3* y calles 5, 10 y 15 de *lys5*.

4.4.3.2 Análisis de la secuencia de ADN adyacente al *miniTn5* en *lys1* y *lys5*.

Mediante PCR arbitrarias se obtuvieron fragmentos entre 200 y 600 nucleótidos que permitieron analizar la secuencia de la región cromosómica adyacente al *mini-*

transposón. En el mutante lys1 el miniTn5 se encontraba insertado en el gen PP5257. Un alineamiento múltiple de la secuencia proteica con las disponibles en la base de datos de GenBank reveló una identidad de secuencia alrededor del 30% con oxidasas de D-aminoácidos en *B. fungorum*, *P. aeruginosa* o *R. sphaeroides*.

Tabla C.II.9: Identidad de secuencia entre el producto del gen PP5257 y las existentes en la base de datos de GenBank.

<i>Proteína</i>	<i>Función</i>	<i>Porcentaje de Identidad</i>	<i>Organismo</i>	<i>Nº de acceso (GenBank)</i>
Bcep6117	Gly/D-aminoácido oxidasa	32%	<i>Burkholderia fungorum</i>	ZP 00033247
	Gly/D-aminoácido oxidasa	32%	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ZP 00140988
Rsph1252	Gly/D-aminoácido oxidasa	31%	<i>Rhodobacter sphaeroides</i>	ZP 00005356

Por otro lado, en el mutante lys5 el gen inactivado era el PP5458, situado en sentido 5' con respecto al PP5257. Los análisis de BLAST revelaron una elevada homología con la proteína $^1\Delta$ -piperideina-6-carboxilato-deshidrogenasa. Dicha enzima cataliza la síntesis de 2-aminoadipato a partir de $^1\Delta$ -piperideina-6-carboxilato, compuesto procedente tanto del catabolismo del aminoácido D-lisina como de la desaminación de su isómero L-lisina.

Tabla C.II.10: Proteínas similares a la codificada por el gen PP5258.

<i>Proteína</i>	<i>Función</i>	<i>Porcentaje de Identidad</i>	<i>Organismo</i>	<i>Nº de acceso (GenBank)</i>
	Aldehído deshidrogenasa dependiente de NAD	78%	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ZP 00138609
	Piperideina-6- carboxilato deshidrogenasa	65%	<i>Brucella sp</i>	NP541366
Pcd	Piperideina-6- carboxilato deshidrogenasa	54%	<i>Flavobacterium Lutescens</i>	BAB191801
MII2867	Aldehído deshidrogenasa	64%	<i>Mesorhizobium loti</i>	BAB49892

4.4.3.3 Estudio de la organización transcripcional de los genes PP5257 y PP5258.

El gen PP5257 con un tamaño de 1284 pb, codificaría una proteína de 428 aa con un peso molecular de 51692. Dicha proteína tendría un centro de unión para el cofactor FAD. A 161 pb del codón de inicio de la traducción, en sentido 5', estaría el codón de terminación del gen PP5258 que con un tamaño de 1488 pb codificaría una proteína de 496 aa con un peso molecular de 53106.

En sentido 5' del gen PP5258 aparecía un marco abierto de lectura (PP5259) con un tamaño de 888 pb. Éste codificaría una proteína de 296 aminoácidos (33076) con homología con reguladores transcripcionales de la familia LysR. Finalmente, en sentido 3' del gen PP5257 existía un marco abierto de lectura de 1425 pb que codifica una proteína de 475 aminoácidos (55179) con homología con proteínas de unión a nucleótidos. Ambos genes, se transcribían en sentido opuesto a los genes PP5257-8.

Tabla C.II.11: Marcos de lectura abiertos encontrados en la región de 5 kb del cromosoma *P. putida* KT2440 que engloba a los genes PP5258 y 5257.

orf	PP	Tamaño (pb)	Homólogos	Nº de acceso (GenBank)
<i>orf1</i>	5259	888	Familia LysR	AAN70824.1
<i>lys5</i>	5258	1488	Familia de las aldehido deshidrogenasas	AAN70823.1
<i>lys1</i>	5257	1284	oxidorreductasas	AAN70822.1
<i>orf2</i>	5256	1425	Proteína de unión a nt cíclicos	AAN70821.1

Puesto que estos genes estarían implicados en la ruta que da lugar a 2-aminoadipato a *lys1* y *lys5* se les denominará *amaA* y *amaB*, respectivamente.

Se comprobó mediante RT-PCR si los genes *amaA* y *amaB* se disponían formando una unidad transcripcional. Para ello, se aisló ARN a partir de células cultivadas en medio mínimo M9 y suplido con benzoato 15 mM y L-lisina 5 mM tras alcanzar la fase exponencial de crecimiento. La amplificación entre los genes *amaA* y *amaB* dio lugar a una banda de tamaño esperado, confirmándose que ambos genes formaban un operón (Figura C.II.22).

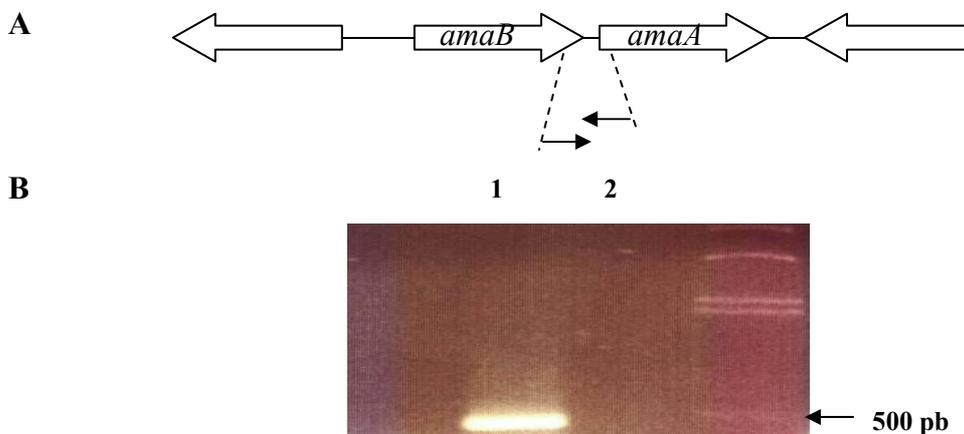


Figura C.II.22: Organización física del agrupamiento génico *amaA-amaB* y evidencia de que ambos genes se disponen formando una unidad transcripcional. A. Esquema de la organización génica *davA-davB* y su entorno genético. B. El producto resultante de la RT-PCR se separó en un gel de agarosa, como

se describe en Materiales y Métodos. En la calle 1 aparece el producto de amplificación de la región intergénica comprendida entre los genes *amaA* y *amaB*. En la calle 2 aparece el control negativo, corresponde a la misma reacción de RT-PCR pero sin transcriptasa reversa.

4.4.3.4 Análisis de la secuencia de ADN adyacente al miniTn5 en el mutante lys2.

En el caso del mutante lys2 el minitransposón se había insertado en el gen PP3596, el cual presentaba alta homología con D-aminoácido deshidrogenasas. Este gen forma parte de una agrupación génica con genes que en su conjunto codifican un sistema de transporte de aminoácidos de tipo ABC. Es de suponer que la inserción del transposón tiene un efecto polar afectando a dicho transportador.

Tabla C.II.12: Proteínas similares a la codificada por el gen PP3596. La tabla recoge información sobre el porcentaje de identidad, organismo al que pertenece y nº de acceso a la base de datos de GenBank de las proteínas homólogas a la secuencia adyacente al minitransposón miniTn5 en el mutante lys2.

Nombre de la proteína	Función	Porcentaje de Identidad	Organismo	Nº de acceso (GenBank)
DadA	D-aa DH	51%	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	AI2599
	D-aa DH	29%	<i>Brucella melitensis</i>	NP 539174
Mll6285	D-aa DH, pequeña subunidad	26%	<i>Mesorhizobium loti</i>	BAB52607
Rsph2364	Gly/D-aa DH (deaminación)	31%	<i>Rhodobacter sphaeroides</i>	ZP 00006446

4.4.3.5. Análisis de la organización transcripcional del gen PP3596.

El gen PP3596 (1242 pb) codificaría una proteína de 414 aa (45133) con homología con deshidrogenasas específicas de D-aminoácidos, en sentido 5' aparecían tres genes de los cuatro que constituyen un sistema de transporte de aminoácidos ABC. Por otro lado, en sentido 3' de dicho gen se encontró el cuarto gen de dicho transportador. Dicha organización se refleja en la figura C.II.23.

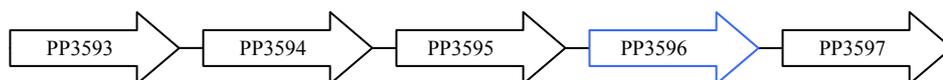


Figura C.II.23: Esquema de la región de xKb del cromosoma de *P. putida* KT2440 que contiene el gen **PP3596**. El gen PP3594 codifica una proteína periplasmática de unión a sustrato. Por otro lado, tanto el gen PP3594 como PP3595 codifican una permeasa respectivamente. Finalmente, el gen PP3597 codifica una proteína de unión a ATP.

4.4.4 Análisis de la secuencia de ADN adyacente al miniTn5 en el mutante *lys4*-.

En el mutante *lys4*, el miniTn5 inactivaba el gen PP3591. Los análisis de BLAST mostraban homología con malato deshidrogenasa. No obstante, Muramatsu y colaboradores (2004) demostraron la implicación de dicha enzima en el catabolismo de D-lisina. Se trata del gen *dpkA* que codifica la enzima piperideina-2-carboxilato deshidrogenasa, que cataliza el paso de $^1\Delta$ -piperideina-2-carboxilato a L- pipercolato.

El gen *dpkA* (996 pb) codificaría una proteína de 332 aa. En sentido 5' a 166 pb se localizó el gen *tyrB-2* (1194 pb, 398 aa) y en sentido 3' a 119 existe un marco abierto de lectura con homología con reguladores de la familia RpiR, éste se transcribiría en sentido opuesto a *dpkA* y *tyrB-2* (Figura C.II.24).

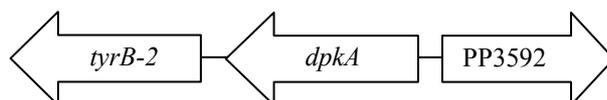


Figura C.II.24: Esquema de la región del cromosoma de *P. putida* KT2440 que contiene al gen *dpkA*. Los genes *dpkA*, *tyrB-2* y PP3592 codifican las enzimas piperideina-2-deshidrogenasa, aminotransferasa de aminoácidos aromáticos y un regulador de la familia RpiR, respectivamente.

4.4.5 Acumulación de metabolitos intracelulares en los mutantes *lys5* (*amaB*) y *lys1* (*amaA*).

Ya que la secuencia aminoácidica del gen PP5257, correspondiente al mutante *lys1* (*amaA*), reveló una alta similitud con oxidasas y el gen PP5258, mutante *lys5* (*amaB*), mostraba homología con la enzima piperideina-6-carboxilato deshidrogenasa, y a su vez dichos mutantes eran incapaces de catabolizar el ácido pipercolico, se postuló

que el gen PP5257 y PP5258 codificaban la pipercolato deshidrogenasa y piperideina-6-carboxilato deshidrogenasa, respectivamente. Para confirmar que en los mutantes *lys1* (*amaA*) y *lys5* (*amaB*) se había bloqueado la ruta del pipercolato a nivel de la pipercolato oxidasa y $^1\Delta$ -piperideina-6-carboxilato deshidrogenasa, respectivamente, se decidió analizar los niveles intracelulares de L-pipercolato y 2-aminoadipato. Los metabolitos intracelulares se analizaron como se indica en la sección 6 del Materiales y Métodos. Los mutantes en *amaB* y *amaA* se inocularon en 50 ml de medio mínimo M8 con L-lisina 5 mM y glucosa 0,5 % en matraces de 500 ml de volumen. Tras alcanzar una fase exponencial tardía se recogieron los cultivos y se llevó a cabo la extracción y la reacción de derivatización. A partir de las curvas estándar, previamente analizadas, se determinó la concentración de cada uno de los metabolitos L-pipercolato, δ -aminovalerato y 2-aminoadipato. En la Figura C.II.25 se muestran los espectros obtenidos para los mutantes *amaA* y *amaB*.

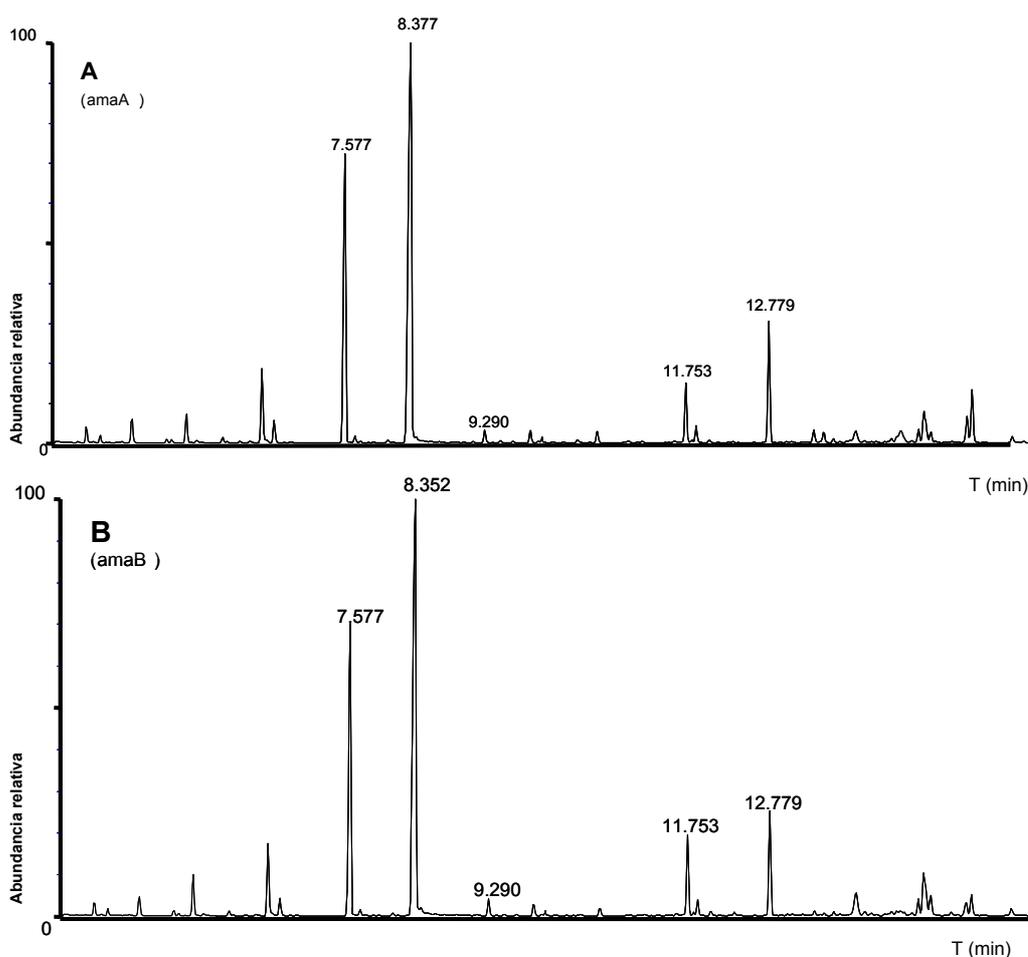


Figura C:II.25. Cromatografía de gases correspondiente a extracciones intracelulares de cultivos procedentes de los mutantes *lys1* (*amaA*) y *lys5* (*amaB*). Los cromatogramas corresponden a compuestos intracelulares extraídos de los mutantes *amaA* y *amaB* tras alcanzar la fase exponencial de

crecimiento en medio mínimo M8 suplido con L-lisina 5mM y glucosa 0,5%. Las figuras A y B se refieren a *amaA* y *amaB*, respectivamente. Los picos detectados a los distintos tiempos de retención corresponden a: L-pipecolato (TR 7,56); δ -aminovalerato (TR 7,71); ácido trópico (TR 9,3); δ -aminoadipato (TR 12,6) y L-lisina (12,7).

En la Tabla C.II.13 aparece la concentración de los diferentes compuestos acumulados en los mutantes *lys1 (amaA)* y *lys5 (amaB)*. Estos resultados mostraban que estos mutantes acumulaban unas cantidades elevadas de pipecolato, no detectándose 2-aminoadipato. Así pudimos concluir que los genes *amaA* y *amaB* codifican la pipecolato oxidasa y la piperideina-6-carboxilato deshidrogenasa, respectivamente, encargadas de catalizar la conversión de L-pipecolato en 2-aminoadipato.

Tabla C.II.13: Cantidades intracelulares de los distintos intermediarios del catabolismo de L-lisina en *P. putida* KT2440 y sus derivados isogénicos *amaA* y *amaB*^a.

Cepa	pmoles/mg proteína		
	δ -aminovalérico	L-pipecolato	2-aminoadipato
<i>P. putida</i> KT2440	6 \pm 1,5	22 \pm 6,5	4 \pm 0,5
<i>lys1 (amaA)</i>	7,4 \pm 0,1	1300 \pm 500	0
<i>lys5 (amaB)</i>	15 \pm 9	1025 \pm 25	0
<i>lys2</i>	6,5 \pm 0,7	30 \pm 7	3 \pm 0,5

^a*P. putida* KT2440 y sus derivados isogénicos fueron inoculados en 50 ml de cultivo M8 suplido con L-lisina 5mM y glucosa 0,5% tras alcanzar la fase exponencial tardía se recogieron los cultivos y se procedió a su extracción y derivatización, tal como se indica en Materiales y Métodos.

4.4.6 Estudio de la expresión del promotor del operón *davD-davT* en los distintos mutantes *lys1 (amaA)*; *lys2* y *lys5 (amaB)*.

El plásmido pOR2 es un derivado de pMP220 portador del promotor del operón *davD-davT*, usado para estudios de expresión de dicho promotor mediante actividad β -galactosidasa. Gracias a ensayos anteriores, se estableció la capacidad inductora de distintos intermediarios del catabolismo de lisina siendo estos: cadaverina, L-lisina y δ -aminovalérico.

Ya que los mutantes *lys1 (amaA)*, *lys2* y *lys5 (amaB)*, eran incapaces de degradar la L-lisina analizamos la expresión de P_{dav} para descartar una posible represión de este promotor debida al acúmulo de algún compuesto. Se transfirió el plásmido pOR2

mediante electroporación a los mutantes *lys* y se estudió el efecto inductor de los distintos metabolitos ya mencionados. Los mutantes, portadores del plásmido pOR2, así como el silvestre se cultivaron en medio líquido M9 con benzoato 15 mM como fuente de carbono a 30°C con agitación durante 12 horas. Transcurrido este tiempo se diluyeron en medio líquido M9 benzoato 15 mM, y se establecieron subcultivos del mismo. Tras dos horas de incubación a 30°C con agitación, se añadió el agente inductor: 5 mM δ -aminovalérico; 5 mM L-lisina o 2,5 mM de cadaverina. En la Tabla C.II.14 se presentan los valores máximos de actividad β -galactosidasa. Se puede observar que los niveles de inducción en los distintos mutantes fueron similares a los obtenidos para el silvestre. Estos resultados eran esperables, puesto que el ácido δ -aminovalérico parece ser el inductor del operón *davDT* y en estos mutantes las rutas que dan lugar a dicho compuesto no estarían afectadas.

Tabla C.II.14: Inducción del promotor *davDT* en *P. putida* KT2440 y en sus respectivos mutantes *lys1*-, *lys2*-, y *lys5*-^a.

Cepa	Actividad β -Galactosidasa (Unidades Miller)			
	----	L-Lys	AMV	Cadav
KT2440	620 \pm 10	1280 \pm 100	1730 \pm 20	1000 \pm 60
<i>lys1</i>	555 \pm 30	970 \pm 150	1465 \pm 400	N.D
<i>lys5</i>	620 \pm 135	1010 \pm 150	1685 \pm 125	1275 \pm 125
<i>lys2</i>	510 \pm 10	925 \pm 50	1440 \pm 60	1510 \pm 100

^aKT2440 y sus respectivos mutantes portadores del plásmido pOR2 fueron cultivados en medio mínimo M9 con benzoato como fuente de carbono. En aquellos casos en los que se indique, los cultivos fueron suplidos con L-lisina (Lys) 5 mM, δ -aminovalérico (AMV) 5 mM y cadaverina 2,5 mM. La actividad β -galactosidasa se representa en Unidades Miller, los valores son el resultado de una media de tres ensayos independientes.

4.4.7 Complementación de la mutación de DE *P. putida* KT2440 *amaB*.

Para complementar la mutación del mutante *amaB* se utilizó la genoteca de *P. putida* KT2440 construida mediante clonación de los fragmentos resultantes de una digestión parcial de su cromosoma con *PstI* en el vector pLARF3 (Ramos-Gonzalez et al. 1993). El cósmido portador del gen *amaB* se rescató de la genoteca tras una

hibridación a partir de colonia usando como sonda el gen *amaB* marcado con digoxigenina. Tras la separación mediante electroforesis y transferencia a una membrana de nailon cargada positivamente de los fragmentos resultantes de la digestión del cósmido con *EcoRI-HindIII*, se realizó una hibridación en condiciones estrictas usando como sonda un fragmento que contenía los genes *amaA* y *amaB*. Se utilizó como control positivo el producto de la digestión con *EcoRI-HindIII* del cromosoma de *P. putida* KT2440 (Figura II.26).

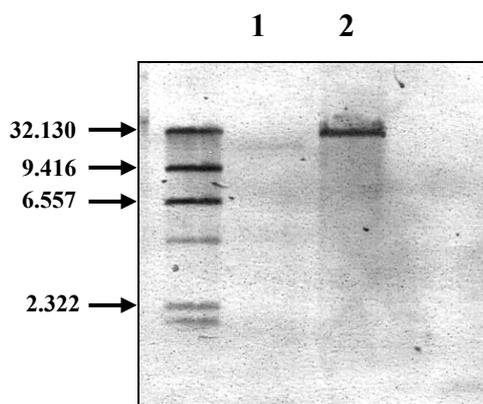


Figura C.II.26: Localización de los genes PP5257 y PP5258 de *P. putida* en el cósmido mediante hibridación con una sonda PP5257 de *P. putida* KT2440. La calle 1 muestra el resultado de la digestión del cromosoma de *P. putida* KT2440 con *EcoRI-HindIII*. La calle 2 revela el resultado de la digestión del cósmido con *EcoRI-HindIII*. El marcador que observamos corresponde al cromosoma lambda digerido con *HindIII*.

El producto de la digestión del cósmido con *EcoRI-HindIII*, que incluía los genes *amaA* y *amaB*, se clonó en el gen pBBR1MCS-5 y se transfirió por conjugación a los mutantes *lys5 (amaB)* y *lys1 (amaA)*. Los transconjugantes se seleccionaron en medio mínimo M8 suplido con L-lisina 10 mM, Km y Gm. Posteriormente se analizó su capacidad de catabolizar la L-lisina. Se pusieron cultivos celulares de *P. putida* KT2440 y de sus cepas isogénicas *amaB* y *amaA* complementadas con el fragmento de 3,5 kb, en medio mínimo M8 suplido con L-lisina 20 mM y se estudió el tiempo de generación de ambos, (Figura C.II.27). La cepa parental tenía un tiempo de generación de 85 minutos, mientras que el mutante *lys5 (amaB)* y *lys1 (amaA)* complementados presentaron un tiempo de generación de 101 ± 5 minutos, con una mayor fase de latencia que la cepa parental.

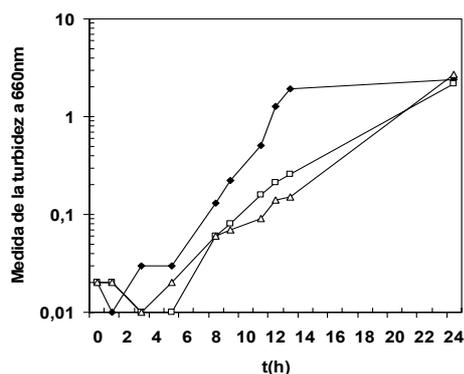


Figura C.II.27: Medida de la turbidez de *P. putida* KT2440 y su derivados isogénicos amaB y amaA portador del cósmido. Tanto *P. putida* KT2440 (símbolos cerrados) como sus derivados isogénicos amaA (cuadrados) y amaB (triángulos) portadores del fragmento de 3,5 kb fueron preincubados en medio mínimo M9 suplido con benzoato 15 mM, tras alcanzar la fase estacionaria se inocularon en medio mínimo M8 suplido con L-lisina 20 mM y se siguió el aumento de la turbidez con respecto al tiempo tal y como se muestra en la figura.

4.4.8 Transporte de L-lisina en *lys2*

En el mutante *lys2* el miniTn5 se había insertado en el gen que codifica una D-aminoácido deshidrogenasa. Ya que este gen se encuentra intercalado en un sistema de transporte de aminoácidos tipo ABC y a su vez, estos sistemas se organizan formando un operón, se planteo la hipótesis de que la inserción de miniTn5 pudiera estar afectando el transporte del aminoácido L-lisina. Se determinó la velocidad de transporte de [U-¹⁴C] L-lisina tanto en *P. putida* KT2440 como en el mutante *lys2*. Las células de *P. putida* KT2440 y su derivado isogénico se cultivaron en medio mínimo M9 suplido con benzoato como fuente de carbono y al que se le adicionó L-lisina 5 mM. Tras alcanzar la fase de crecimiento exponencial ($DO_{660} \approx 0,6-0,7$) los cultivos se centrifugaron y se resuspendieron en medio mínimo M9 suplido con benzoato 15 mM. El ensayo de transporte se realizó como se indicó en el apartado 14 de la sección Materiales y Métodos. Los resultados de los ensayos de transporte se representan en la Figura C.II.28.

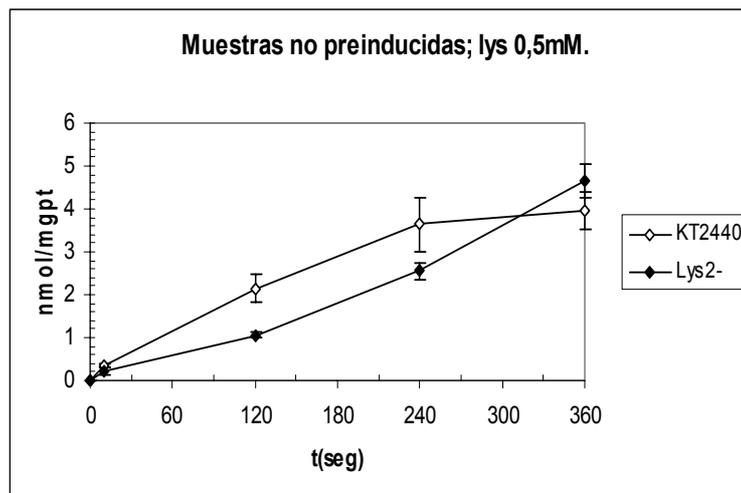


Figura C.II.28: Transporte de [U¹⁴C] L-lisina en *P. putida* KT2440 y en el mutante *lys2*. Las células de *P. putida* KT2440 (rombos abiertos) y *lys2* (rombos cerrados) se cultivaron en medio mínimo M9 suplido con Bz 15 mM y L-lisina 5 mM, hasta alcanzar una $DO_{660} \approx 0,6-0,7$. Se recogieron las células por centrifugación y el experimento de transporte se realizó como se describió en el apartado 14 de la sección Materiales y Métodos. En las gráficas se representan los valores medios obtenidos a partir de tres experimentos independientes, junto con sus desviaciones típicas.

La velocidad de transporte en el mutante *lys2* era inferior a la obtenida para la cepa parental. Sin embargo, no pudimos concluir que dicha alteración fuera debida al propio transportador que estuviera afectado debido a la inserción del miniTn5 o fuera un efecto secundario como consecuencia de la alteración del catabolismo de L-lisina.

4.5 Las dos rutas principales de degradación de L-lisina se encuentran conectadas a nivel del ácido glutárico.

La completa degradación de L-lisina, había quedado demostrada gracias a la conversión de este aminoácido en glutárico vía δ -aminovalerato, o través, del α -cetoglutarato vía pipercolato. No obstante, existían evidencias de una posible ruta de conversión de 2-aminoadipato en glutarato (Perfetti et al. 1972), si bien, minoritaria y desconocida en *Pseudomonas*. Para demostrar la conexión entre ambas rutas a nivel de glutarato, se realizaron experimentos con [U¹³C; U¹⁵N] L-lisina y glucosa, y se siguió la incorporación del ¹³C en el esqueleto carbonado de los aminoácidos glutamato, alanina y leucina, tanto en *P. putida* KT2440 como en sus derivados isogénicos descritos a lo largo de esta Tesis Doctoral.

Se pusieron cultivos de *P. putida* KT2440 y sus derivados isogénicos en medio mínimo M8 suplido con L-lisina 5 mM y glucosa 0,8 %. Tras alcanzar la fase exponencial a una $DO_{660} \approx 1$, se recogieron los cultivos y se centrifugaron durante 20 minutos a 4 °C. Las muestras se lavaron con NaCl, y seguidamente se hidrolizaron. Las muestras se analizaron como se indicó en la sección 16.3 de Materiales y Métodos. En la Tabla C.II.15 se muestran los porcentajes relativos de ^{13}C en los aminoácidos alanina, glutamato y leucina.

Tabla C.II.15: Porcentaje relativo de ^{15}N , ^{13}C marcado en los aminoácidos glutamato, alanina y leucina, en *P. putida* KT2440 y sus derivados isogénicos rei2 y amaB incubados con $[\text{U}^{13}\text{C};\text{U}^{15}\text{N}]$ L-lisina^a.

	% Glutamato (m_{15}) \pm DS							
	m_0	m_1	m_2	m_3	m_4	m_5	m_6	
KT2440	-0,5	32,3	18,2	17,5	11,5	5,2	15,9	
Rei2	0,2	33,6	19,1	17,2	10,9	4,3	14,7	
amaB	-0,7	40,8	22,0	25,5	8,8	2,3	1,4	
	% Alanina (m_{15}) \pm DS							
	m_0	M_1	m_2	m_3	M_4	m_5	m_6	m_7
KT2440	0,67	80,1	8,5	5,0	5,0	0	0	0
Rei2	0,83	80,9	8,09	4	5,1	0	0	0
amaB	0,6	87,0	8,3	3,5	0,6	0	0	0
	% Leucina (m_{15}) \pm DS							
	m_0	m_1	m_2	m_3	m_4	m_5	m_6	m_7
KT2440	-0,5	42,2	19,0	28,5	7,1	3,4	0,3	0
Rei2	0,6	44,6	20,3	25,5	6,3	2,5	0,1	0
amaB	-0,5	49,3	19,3	26,1	5,4	0,4	-0,1	0,1

^aLas condiciones de cultivo y los análisis se especifican en Materiales y Métodos. No existe prácticamente m_0 ya que en todos los aminoácidos está aumentado en +1 unidad de masa debido al grupo ^{15}N , los restantes incrementos se deben al ^{13}C incorporado en el esqueleto carbonado. La desviación estándar fue en todos los casos inferior al 5%.

En *P. putida* KT2440 la síntesis de glutamato está mediada por la glutamato sintetasa y la glutamato deshidrogenasa utilizando α -cetoglutarato como aceptor de un grupo amino. El ^{13}C α -cetoglutarato puede formarse vía aminoadipato o

vía ciclo de Krebs. En el primer caso se hereda todo el esqueleto carbonado de la lisina, mientras que en el segundo, no todos los carbonos estarán marcados, ya que, se está incorporando ^{12}C procedente de la glucosa. La tabla C.II.19 muestra que para el aminoácido glutamato en *P. putida* KT2440 por encima de un 15% del total aparecían todos los carbonos marcados con el isotopo ^{13}C . No obstante, y de acuerdo con nuestra hipótesis en el mutante *lys5 (amaB)* menos de 1,5 % del glutamato tenía todos los carbonos marcados, porcentaje que podría deberse al producido por el TCA.

La síntesis de L-leucina implica la condensación de piruvato y acetil-CoA. El ^{13}C de la leucina se forma a partir del acetilCo-A vía δ -aminovalerato. Sin embargo, la distribución relativa de ^{13}C fue similar tanto en *P. putida* KT2440 como en *rei2*. Lo cual resultó sorprendente, ya que en el mutante *rei2* se encontraba bloqueada la conversión de δ -aminovalérico en glutarato, reduciéndose considerablemente el flujo de ^{13}C desde L-lisina hacia acetil-CoA. Estos resultados muestran que en el mutante *rei2* la ruta del amino adipato contribuía a la síntesis de acetil-Co, pudiendo deberse a la decarboxilación de α -cetoadipato originando glutarato, quedando así ambas rutas conectadas. Estos resultados coincidían con los obtenidos por Perfetti (Perfetti et al. 1972), donde una cepa de *P. putida* P2, rendía cantidades traza de ^{14}C -glutarato a partir de α -amino [$6\text{-}^{14}\text{C}$] adipato.

El esqueleto carbonado de la alanina proviene del piruvato. Existe una vía que podría estar contribuyendo a la producción de ^{13}C -piruvato y así enmascararía los resultados obtenidos de la L-leucina. La PEP carboxiquinasa cataliza la conversión de oxalacetato en PEP. El ^{13}C -oxalacetato podría estar originándose a partir del ^{13}C - α -cetoglutarato, vía ciclo de Krebs. Los resultados mostraron que más del 80 % del total de alanina se formaba a partir de la glucosa, pudiendo asumirse que esta ruta estaba prácticamente inoperativa.

DISCUSIÓN

DISCUSIÓN GENERAL

Por encima de un 30 % de las cosechas mundiales se pierden como consecuencia de las enfermedades de plantas, suponiendo una fuerte disminución de los recursos agrícolas naturales. Durante largo tiempo se ha hecho frente a las enfermedades de plantas mediante el uso de pesticidas, compuestos químicos que en numerosos casos afectan a la salud de seres vivos. A la larga acaban apareciendo estirpes patógenas resistentes a fungicidas y bactericidas, lo que requiere elevar progresivamente la dosis de los mismos. Una estrategia más atractiva supone el control biológico de patógenos con microorganismos antagonistas. Dentro del género *Pseudomonas* existen especies que reducen las infecciones de la planta causadas por organismos como *Fusarium*, *Gaeumannomyces*, *Rhizoctonia* o *Rossellinia*. Los mecanismos a través de los cuales puede actuar como biopesticida se pueden dividir en cuatro: antibiosis, competición por nutrientes o nicho ecológico, colonización de las hifas de hongos o por inducción de la resistencia sistémica en plantas.

La especie *P. putida* presenta un interés adicional derivado de su versatilidad metabólica (introducción) que permite no sólo tolerar sino también degradar tóxicos orgánicos a menudo presentes como contaminantes en el medio ambiente. La posibilidad de combinar ambas características, colonización de la rizosfera y biodegradación, ha dado lugar al concepto de rizadorremediación, es decir, aprovechar el asentamiento en la raíz de poblaciones bacterianas estables gracias a los nutrientes liberados por las raíces, para procesos de descontaminación biológica de suelos.

El desarrollo de las aplicaciones mencionadas requiere asegurar el correcto y duradero establecimiento del microorganismo sobre la raíz de la planta, así como, garantizar la expresión de las funciones deseadas en condiciones medioambientales. Para ello es necesario un mayor conocimiento acerca de los mecanismos moleculares que tienen lugar durante la colonización, establecimiento y desarrollo del microorganismo sobre la raíz. El uso de marcadores proteicos, β -galactosidasa, luciferasa o más recientemente el uso de proteínas autofluorescentes ha permitido ahondar más en el conocimiento de estos mecanismos (Shaw et al., 1992; Toyota & Kimura 1993; Chabot et al., 1996; Chin-A-Woeng et al., 1997; Tombolini et al., 1999; Unge et al., 1999; Bloemberg et al., 2000). Espinosa-Urgel y Ramos (Espinosa-Urgel & Ramos 2001) demostraron que mediante el uso del transposón miniTn5-*lux* podían identificarse genes de *Pseudomonas*

que estuvieran inducidos por exudado de maíz. De este modo se aisló el mutante *rei2* en el cual el miniTn5 está insertado en un gen (*davT*) cuya expresión responde a exudados. Un análisis detallado permitió establecer que este gen era inducible por el aminoácido lisina. El mutante *rei2* estaba afectado en su capacidad para usar L-lisina como fuente de carbono, lo que permitió establecer la participación del gen *davT* en el catabolismo de L-lisina.

Al principio de esta tesis doctoral se desconocían los genes implicados en el catabolismo de lisina, tan sólo se había identificado el gen *davT*. Ya que este gen está activos en exudado de raíz se decidió estudiar más a fondo su expresión, así como, el esclarecimiento de esta ruta a nivel genético.

1. ORGANIZACIÓN TRANSCRIPCIONAL DE LOS GENES *davDT* en *P. putida* KT2440.

Cuando Espinosa-Urgel y Ramos (2001) aislaron el mutante *rei2*, comprobaron que el miniTn5-*lux* se había insertado en el gen *davT*. El producto de este gen presentaba homología con aminotransferasas. Puesto que el mutante *rei2* era incapaz de utilizar δ -aminovalérico como fuente de carbono, se propuso que esta proteína correspondía con la δ -aminovalerato aminotransferasa. En sentido 3' de *davT*, se identificó un marco abierto de lectura que se denominó *davD* y que correspondía con la glutarato semialdehído deshidrogenasa. A lo largo de esta tesis se demuestra que ambos genes se encuentran formando un operón, así como, su implicación en la degradación de δ -aminovalerato.

Análisis genómicos, ensayos de RT-PCR y fusiones de las regiones intergénicas *davD* y *davT* al gen reportero *lacZ* demuestran que el gen *davT* forma una unidad transcripcional con *davD*. El punto de inicio de la transcripción del promotor *davD* ha sido identificado detectándose una región -10 (5'-TAGCAT-3') y -35 (5'-TTGTCC-3') similar a la propuesta para promotores σ^{70} en *P. putida*, con una secuencia -10 (5'-TATAcT-3') y -35 (5'-TTGAcC-3') [Domínguez 2004]. Ya que el promotor P_{*davD*} se induce por L-lisina exógena proponemos la participación de un regulador todavía no identificado que podría unirse a la región -58/-60 donde aparece una secuencia repetida invertida. A pesar de que esta región está lejos de la zona de unión de la ARN polimerasa, la existencia de un posible elemento UP en la región -50/-60 facilitaría el

contacto entre la ARN polimerasa y un posible regulador (Ozoline et al. 1997). Este tipo de organización ha sido descrita en *E. coli* para los promotores regulados por CRP (Ross et al. 1993; Busby & Ebright 1999). Estos elementos UP se han encontrado en la mayoría de los promotores σ^{70} analizados [Domínguez 2004]. A su vez, ensayos de delección de la región promotora demuestran que al menos se requiere un fragmento de 80 pb desde el punto de inicio de la transcripción para que tenga lugar la expresión de este promotor. Este fragmento incluiría no sólo las regiones -10 y -35 del promotor, sino también los posibles elementos UP.

La expresión a partir del promotor P_{dav} se induce al entrar los cultivos en la fase exponencial tardía. Se han descrito promotores que pueden transcribirse *in vivo* por los factores σ^{70} o σ^{38} . Este último es responsable de la expresión de numerosos genes al inicio de la fase estacionaria, lo cual condujo a comprobar si σ^{38} estaba implicada en la transcripción del promotor *davD*. El análisis de la expresión de P_{dav} en un fondo σ^{38} demostró que la expresión de este promotor es independiente de tal subunidad para el inicio de la transcripción. Por tanto, la inducción de P_{dav} al entrar en una fase exponencial tardía se debe a otra serie de factores independientes de esta subunidad.

El factor σ^{54} (RpoN) regula el inicio de la transcripción de genes bacterianos implicados en el metabolismo del nitrógeno. Un mutante *rpoN* en *P. syringae* se caracteriza por su incapacidad de usar un elevado número de fuentes de nitrógeno, siendo incapaz de crecer a bajos niveles de amonio (Hendrickson et al. 2000). A su vez, Köhler (Kohler et al. 1989) demostraron que un mutante *rpoN* de *P. putida*, no crece en presencia de L-lisina. Esto nos llevó a pensar que la expresión del promotor P_{dav} podría estar influenciada por RpoN. Análisis de inducción del promotor P_{davD} en un fondo *rpoN* reflejan un patrón de inducción similar al parental. Estos resultados sugieren que el factor σ^{54} no afecta la expresión de la ruta del aminoalérgico. Estudios posteriores realizados en nuestro grupo revelaron la incapacidad del mutante *rpoN* de metabolizar el glutarato (Revelles, no publicado), producto final de la ruta del aminoalérgico.

1.1 Análisis de la inducción del operón *davDT* en presencia de distintos intermediarios del catabolismo de L-lisina.

Para el estudio de la expresión de P_{dav} se analizó la actividad β -galactosidasa obtenida de las fusiones transcripcionales construidas entre el gen reportero *lacZ'* y la región promotora P_{dav} (pOR2). El seguimiento de la actividad β -galactosidasa en cepas de *P. putida* portadoras de la fusión $P_{dav}::lacZ$ (pOR2) demostró que la presencia en el medio de L-lisina, cadaverina o δ -aminovalérico hace que aumente la expresión de P_{dav} , del orden de 2 veces en presencia de L-lisina, de 3 veces en presencia de δ -aminovalérico y 1.6 veces con cadaverina. Esto hace pensar que el verdadero inductor es el δ -aminovalérico. Ensayos posteriores confirmaron este hecho. El producto de la reacción catalizada por DavD y DavT, glutámico, no afecta la expresión de este promotor.

La inducción que experimenta P_{dav} es independiente de la cantidad de inductor utilizado por encima de una concentración de 5 mM, lo cual indica que puede existir una saturación por sustrato de los transportadores y/o del propio P_{dav} .

1.2 Búsqueda de factores que afectan la inducción del operón *davDT*.

Ya que los resultados anteriormente mencionados indicaban la presencia de un regulador se decidió analizar posibles factores que influyeran sobre la expresión del operón *davDT*. En sentido 3' de *davT* existe un marco abierto de lectura, *orf4*, cuyo producto de la transcripción muestra homología con reguladores pertenecientes a la familia de dos componentes. Un mutante *orf4:: Ω Km* muestra un patrón de expresión de *davDT* similar al parental, descartando así la implicación de este gen en la regulación del promotor *davDT*. Se diseñó una alternativa para identificar el regulador de este promotor. El mutante *rei2* posee insertado el miniTn5-*lux* en el gen *davT*, de tal modo, que en presencia de L-lisina emite luz. Un mutante afectado en el regulador, sobre el fondo genético *rei2*, provocaría una disminución de luz en presencia del agente inductor. Tras una mutagénesis al azar con miniTn5-Gm se obtuvieron 5000 transconjugantes, de los que sólo 3 exhibían bajos niveles de inducción. Análisis de estos genes reflejaban que dos de ellos estaban afectados en el transporte de L-lisina lo cual indica que la expresión de *davDT* está modulada en función de los niveles

intracelulares de lisina. Estos mutantes se denominaron rei2-6 y rei2-7. Hasta la fecha no ha sido posible identificar un regulador de la expresión de *davDT*.

El transporte de L-lisina en *Pseudomonas putida* esta mediado por al menos dos sistemas de tipo ABC (Introducción): uno general para aminoácidos básicos y otro específico de L-lisina. En la figura C.I.7 se muestra la organización genética de estos dos transportadores. En el mutante rei2-6 el gen inactivado corresponde con una proteína de unión a ATP, que está seguida por la proteína de unión a sustrato y dos proteínas integrales de membrana. En el mutante rei2-7 el gen afectado corresponde a una proteína de unión a sustrato. En este sistema de tipo ABC los genes que codifican las dos permeasas se encuentran insertados entre la proteína de unión a sustrato y la proteína de unión a ATP. Es de suponer que ambos sistemas se disponen formando un operón, característica general de los sistemas de tipo ABC.

Análisis de BLAST revelan que el sistema de transporte inactivado en el mutante rei2-6, posee alta similitud con transportadores arginina/ornitina de *P. aeruginosa* y de histidina de *E. coli* o *P. syringae*. La proteína de unión a ATP es el componente más conservado de los transportadores de tipo ABC, siendo el componente más específico la proteína de unión a sustrato. Por ello se utilizó esta proteína para analizar la homología de este sistema con otros descritos. En la Tabla D.1 se muestra el resultado del alineamiento múltiple de esta proteína (PP0282) con la disponible en la base de datos de GenBank.

Tabla D. 1: Identidad de secuencia entre el producto del gen PP0282 y las existentes en las bases de datos de GenBank.

Organismo	Proteína	Función	Porcentaje de identidad	Nº de acceso (GenBank)
<i>P. aeruginosa</i>	AotJ	Transporte de Arginina y Ornitina	43 % (63 % similitud)	NC002516
<i>E. coli</i>	ArtJ	Transportador específico de Arginina	42% (60 % similitud)	CAA60105
<i>S. typhimurium</i>	ArtJ	Transportador específico de Arginina	43% (60 % similitud)	NP 459863

Figura D.1: Alineamiento múltiple de la proteína de unión a sustrato PP0282 del sistema de transporte de tipo ABC, identificado en el mutante rei2-6, con los homólogos encontrados en *E. coli*, *P. aeruginosa* y *S. typhimurium*. La figura muestra el resultado del alineamiento entre la proteína PP0282 con sus homólogos: AotJ de *P. aeruginosa*, ArtJ de *E. coli* y AotJ de *S. typhimurium*. El alineamiento se realizó usando el programa Clustal W. Para que una base forme parte de la secuencia consenso debe estar presente en las tres secuencias alineadas.

Por otro lado, en el mutante rei2-7 el miniTn5 se habría insertado en un sistema de transporte general para aminoácidos básicos, como sugirieron los análisis de BLAST, tratándose del grupo LAO (Lisina, Arginina y Ornitina).

Tabla D. 2: Identidad de secuencia entre el producto del gen PP4486 y las existentes en las bases de datos de GenBank.

Organismo	Proteína	Función	Porcentaje de identidad	Nº de acceso (GenBank)
<i>P. aeruginosa</i>	AotJ	Transporte de Arginina y Ornitina	60 % (71 % similitud)	NP 249579
<i>E. coli</i>	LAO	Transportador de lisina/arginina/ornitina	43% (61 % similitud)	NP 416813.1
<i>S. typhimurium</i>	LAO	Transportador de lisina/arginina/ornitina	43% (60 % similitud)	AAA75577

Los sistemas LAO de *E. coli* y *Salmonella typhimurium* han sido descritos (Introducción) como transportadores de lisina y ornitina. El gen *argT* codifica la proteína LAO, implicada en el transporte de arginina, lisina y ornitina en estos microorganismos. La proteína AotJ transporta arginina en *P. aeruginosa*. Se encuentra formando un operón con seis marcos abiertos de lectura. Cuatro de ellos codifican un sistema de transporte de tipo ABC para arginina y ornitina pero no lisina, aunque este último es capaz de inducir este sistema de transporte. De los dos restantes genes uno de ellos codifica el regulador ArgR, implicado en el metabolismo de arginina, que modula la expresión de este operón en presencia de arginina (Takayuki Nishijyo et al. 1998). En *P. putida* KT2440 en sentido 3' del sistema de transporte afectado en rei2-7 aparece un marco abierto de lectura con homología con distintos reguladores, y en concreto con

Discusión

ArgR. Análisis computacionales de predicción de promotores σ^{54} (Cases et al. 2003) proponen el promotor del gen PP4486 como posible σ^{54} dependiente. Estos promotores suelen requerir de un activador de la transcripción, sugiriendo así un mecanismo de regulación similar al descrito para *aotJ*. En la siguiente imagen se muestra el alineamiento entre estas proteínas.

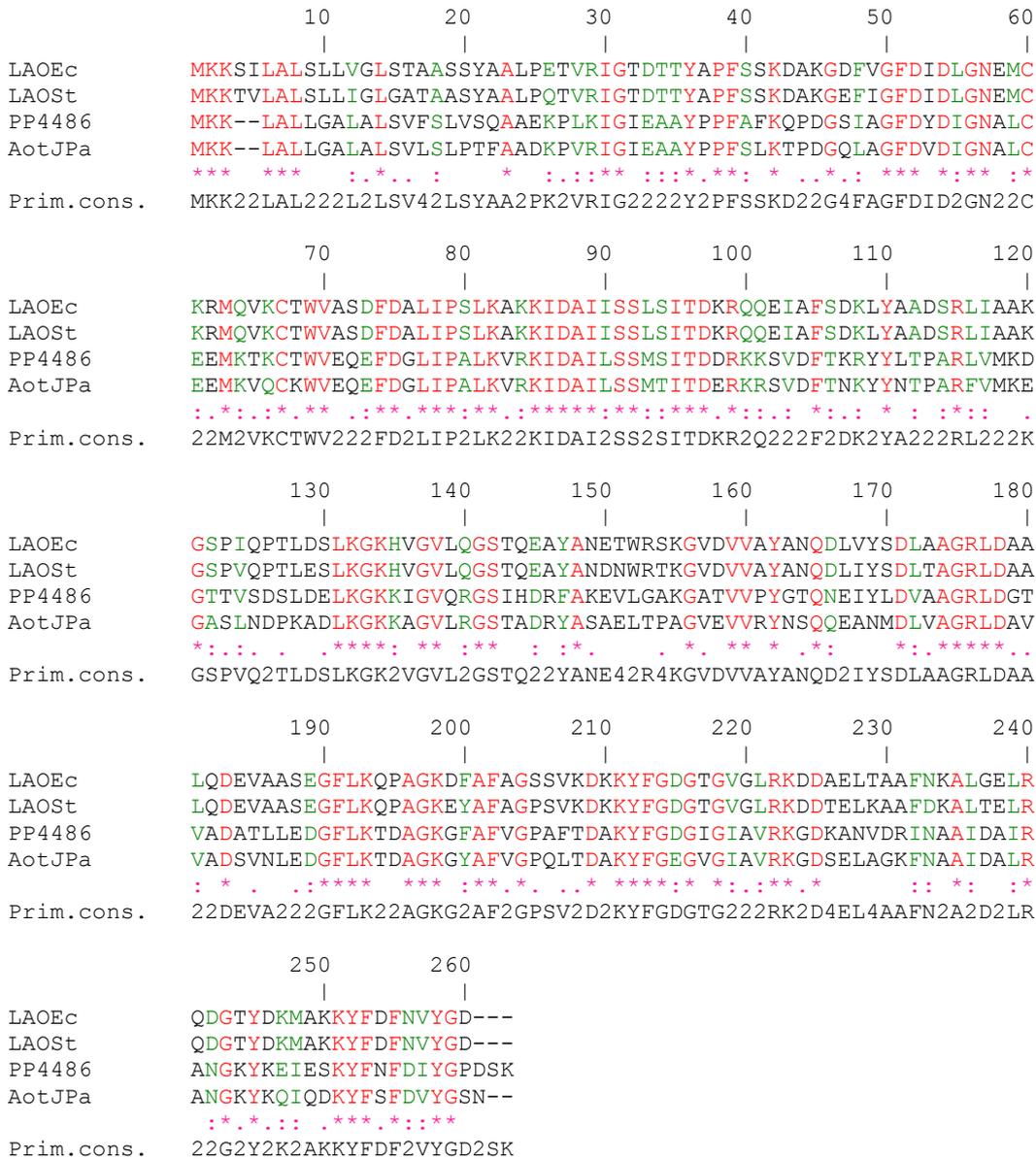


Figura D.2: Alineamiento múltiple de la proteína de unión a sustrato PP4486 del sistema de transporte de tipo ABC, identificado en el mutante *rei2-7*, con los homólogos encontrados en *E. coli*, *P. aeruginosa* y *S. typhimurium*. La figura muestra el resultado del alineamiento entre la proteína PP4486 con sus homólogos: AotJ de *P. aeruginosa*, LAO de *E. coli* y LAO de *S. typhimurium*. El

alinamiento se realizó usando el programa Clustal W. Para que una base forme parte de la secuencia consenso debe estar presente en las tres secuencias alineadas.

La inactivación de cada uno de los dos sistemas de transporte conlleva una reducción significativa en el transporte de L-lisina y una consecuente disminución en el nivel de inducción de P_{dav} . Un estudio detallado del transporte de $[U^{14}C]$ L-lisina en *rei2-6* y *rei2-7* refleja una clara diferencia entre ambos, bajo las condiciones analizadas. En el mutante *rei2-6* no existe transporte de lisina a los 120 segundos de añadir el aminoácido. Esto nos lleva a suponer que el transportador afectado en *rei2-6* es mucho más específico para L-lisina que el interrumpido en *rei2-7*. En el mutante *rei2-7* el porcentaje relativo de captación de L-lisina es de un 38%, con respecto a *rei2*, debida al transportador específico de lisina. Sin embargo, la velocidad de transporte es significativamente inferior a los de *rei2*, sugiriendo una importante contribución en el transporte de L-lisina debida al transportador general de aminoácidos básicos. Estos resultados concuerdan con los niveles de inducción de la expresión de P_{dav} en para estos mutantes, habiendo un mayor incremento en *rei2-7* con respecto a *rei2-6*.

Tabla D.3: Transporte de $[U^{14}C]$ L-lisina en *P. putida* KT2440 y en los mutantes *rei2*, *rei2-6* y *rei2-7*. Porcentaje relativo del transporte de L-lisina a los 120 segundos de añadir $[U^{14}C]$ L-lisina.

Transporte de $[U^{14}C]$ Lisina a (%)	
<i>rei2</i>	100 %
<i>rei2-6</i>	0
<i>rei2-7</i>	38%

Aunque en *rei2* no se encuentra afectado ningún sistema de transporte, existe una marcada disminución del mismo con respecto a la cepa silvestre. En este mutante se ha observado un elevado nivel de inducción de P_{davD} debido a la acumulación de δ -aminovalérico. Cabe pensar que en este mutante está teniendo lugar la acumulación de intermediarios del catabolismo de L-lisina, y posiblemente del propio aminoácido, pudiendo reprimir su transporte.

Estos resultados parecen indicar: el sistema de transporte afectado en el mutante *rei2-6* corresponde al transportador específico de lisina, el sistema de transporte afectado en el mutante *rei2-7* es el transportador lisina/arginina/ornitina, y, bajo las

condiciones de transporte analizadas, 0,5 μM de L-lisina, el transportador específico de lisina rei2-6 es crucial para asegurar la captación de este aminoácido al interior celular, lo cual coincide con los resultados obtenidos por Chang y colaboradores 1972 (1972).

2. CARACTERIZACIÓN GLOBAL DE LA RUTA DEL CATABOLISMO DE L-LISINA EN *Pseudomonas putida* KT440.

2.1 El catabolismo de L-lisina implica al menos tres rutas.

Gracias a una serie de ensayos bioquímicos realizados en la década de los 70, se describieron cuatro rutas diferentes para el catabolismo de L-lisina en *Pseudomonas* (Introducción). Uno de nuestros objetivos consistía en esclarecer qué rutas existían en *P. putida* KT2440 y, bajo qué condiciones se expresaban.

Como primera aproximación al problema se analizaron los metabolitos intracelulares mediante CG-SM, encontrándose: δ -aminovalérico, L-pipecolato y 2-aminoadipato. Estos resultados, se comprobaron utilizando [$^{15}\text{N}_2$; $^{13}\text{C}_6$] L-lisina, detectándose ^{13}C L-pipecolato, ^{13}C 2-aminoadipato y ^{13}C δ -aminovalerato. Queda demostrado, que no sólo la ruta del aminovalérico es activa, sino también, que la L-lisina se degrada vía pipecolato. Estos resultados fueron sorprendentes, ya que, aunque en *Pseudomonas* se ha demostrado la existencia de una lisina racemasa (Introducción) los niveles de expresión descritos son muy bajos no pudiendo permitir el crecimiento en L-lisina de mutantes afectados en la ruta de la L-lisina. Se cuantificaron estos compuestos encontrándose en el orden de los nmoles por gramo de proteína. Se ha detectado del orden de 3 a 4 veces más pipecolato que δ -aminovalerato o 2-aminoadipato, sin embargo, a raíz de estos resultados no podemos concluir que se esté canalizando la L-lisina principalmente hacia de una de estas rutas puesto que para ello sería necesario conocer las actividades enzimáticas de ambas rutas.

2.2 Ruta Monooxidativa y de la Cadaverina.

El mutante rei2 fue usado en una segunda tanda de mutagénesis para identificar mutantes afectados en la emisión de luz en presencia de L-lisina. Puesto que el δ -aminovalérico parece ser el inductor de P_{dav} , esto podría permitir identificar genes

implicados en los pasos desde lisina hasta δ -aminovalérico. De este modo, se obtuvo un mutante denominado *rei2-1*, afectado en una amidohidrolasa. En la ruta monooxidativa el segundo paso de reacción, conversión de δ -aminovaleramida en δ -aminovalérico, está catalizado por la enzima 5-aminovaleramida amidohidrolasa. Al gen identificado, PP0382, se le denominó *davA* (δ -aminovaleramida amidohidrolasa).

Análisis de la organización cromosómica reveló en sentido 5' de este gen un marco abierto de lectura (PP0383) con homología con aminoácido descarboxilasas. A este gen se le denominó *davB*. Los genes *davB* y *davA* por tanto, codificarían la enzima lisina descarboxilasa y la enzima 5-aminovaleramida amidohidrolasa, que catalizan la conversión de L-lisina en δ -aminovalérico. Estos genes no habían sido previamente descritos en ningún organismo.

La liberación de $^{14}\text{CO}_2$ a partir de $[\text{U}^{14}\text{C}]$ L-lisina en el mutante *davB* es un 5% respecto a *P. putida* KT2440, lo que confirmaría que *davB* codifica la enzima L-lisina descarboxilasa. Los mutantes *davA*, *davB* o *rei2* (*davT*) son incapaces de utilizar el aminoácido L-lisina como fuente de carbono. Cuando el aminoácido L-lisina es suministrado como fuente de nitrógeno estos mutantes son capaces de crecer a expensas de los grupos amino de este aminoácido, si bien, con un tiempo de generación mayor que el de la cepa parental. Análisis de los niveles intracelulares de L-pipecolato, 2-aminoadipato y δ -aminovalerato revelaron cantidades similares para *P. putida* KT2440 y su derivado isogénico *davA*. Esto indicaba la existencia de la ruta de la cadaverina como la alternativa para la producción de δ -aminovalerato. La presencia de esta ruta se apoya también en la capacidad de la cadaverina para inducir 1,5 veces el promotor *davDT*, y, en el tiempo de generación de *rei2*, que en presencia de cadaverina como fuente de carbono es el doble del obtenido para *P. putida* KT2440.

Para identificar esta ruta a nivel genético se llevaron a cabo dos estrategias. Una de ellas consistió en una mutagénesis al azar usando el miniTn5-Km y seleccionando aquellos mutantes incapaces de utilizar la cadaverina como fuente de nitrógeno pero que a su vez pudieran utilizar el δ -aminovalerato. De los 5000 mutantes analizados sólo dos presentaban estas características. Análisis de secuenciación revelaron que se trataban: de un posible transportador de putrescina y de la glutamato sintetasa. La putrescina pertenece a la misma familia de compuestos que la cadaverina, tratándose ambas de diaminas de bajo peso molecular, por otro lado, no existe ningún dato experimental que apoye que dicho transportador es específico de putrescina. Esto sugiere que el

transportador afectado estaría implicado en la captación de cadaverina. La glutamato sintetasa podría estar implicada en la utilización de los grupos amino de la lisina como fuente de nitrógeno. No se obtuvo ningún mutante afectado en las enzimas L-lisina descarboxilasa, cadaverina aminotransferasa o 1-piperideina deshidrogenasa.

De estas tres enzimas, tan sólo la L-lisina descarboxilasa ha sido identificada a nivel genético en *E. coli* y *Salmonella typhimurium* (Introducción). Se usaron dichas secuencias para la búsqueda de un posible homólogo en el cromosoma de *P. putida* KT2440. De este modo, se encontró un gen que presentaba un 60% de similitud con la L-lisina descarboxilasa de *E. coli*. Se construyó un mutante en este gen denominado *ldc*, el cual presentó un tiempo de duplicación 1,5 veces mayor que la cepa parental en medio mínimo suplido con L-lisina como fuente de carbono y nitrógeno.

Los análisis de expresión del P_{dav} en los mutantes *ldc*, *davA* y *davB* reflejan que en todos ellos los niveles de inducción en presencia de L-lisina son inferiores a los observados en *P. putida* KT2440 restaurándose cuando el δ -aminovalérico es el inductor (Tabla D.4). Así se concluye, que el verdadero inductor de P_{dav} es el δ -aminovalérico, y que la capacidad inductora de la L-lisina es debido a su conversión en δ -aminovalérico. La cadaverina mantiene los mismos niveles de inducción tanto en *P. putida* como en sus derivados isogénicos, no podemos asegurar que la inducción de P_{dav} en presencia de cadaverina sea debida a la propia cadaverina o a su conversión en δ -aminovalérico. En todos los mutantes los niveles de inducción basal son ligeramente inferiores al obtenido en *P. putida*, esta ligera diferencia puede deberse a la propia L-lisina endógena.

Cuando la L-lisina es la única fuente de carbono y nitrógeno presente en el medio los mutantes *davA* y *davB* son incapaces de crecer, sin embargo, el mutante *ldc* posee un tiempo de duplicación de 1,4 veces el obtenido para *P. putida* KT2440. Esto supone que la ruta de la cadaverina es minoritaria para el catabolismo de L-lisina. Siendo así, los resultados de inducción de P_{dav} en el mutante *ldc* en presencia de L-lisina fueron más bajos de lo esperado, 1,5 veces el nivel basal ya que en este mutante está operativa la principal ruta de producción de δ -aminovalérico, el verdadero de inductor de P_{dav} . Estos resultados pueden indicar que es necesario un mayor tiempo exposición con L-lisina para obtener unos niveles de inducción mayores. En los mutantes *davA* y *davB* no se ha detectado incremento en la expresión de P_{dav} , puesto que esta ruta es la principal encargada en la síntesis de δ -aminovalérico. No obstante, no se descarta que

un mayor tiempo de exposición en presencia de L-lisina conlleve un incremento en los niveles de inducción, puesto que en estos mutantes, *davA* y *davB*, se ha detectado δ -aminovalérico.

Tabla D.4: Incremento de la inducción del promotor *davD* en *P. putida* KT2440 y en sus derivados isogénicos^a.

Cepa	Incremento en la inducción de P_{dav} con respecto al nivel basal			
	---	L-Lys	AMV	Cadaverina
KT2440	1	2	2,8	1,5
ldc	0,78	1,5	3,5	1,9
<i>davA</i>	0,75	1,12	3,6	1,8
<i>davB</i>	0,8	0,8	3	1,6

^a*P. putida* KT2440 y sus derivados isogénicos fueron cultivados en medio mínimo M9 con benzoato como fuente de carbono. En aquellos casos donde se indica los cultivos fueron suplidos con L-lisina 5 mM, cadaverina 2,5 mM y δ -aminovalerato 5 mM. La actividad β -galactosidasa se determinó 7 h tras la inducción, estando las células en fase exponencial. La actividad se expresa en Unidades Miller, y los valores son el resultado de una media procedente de tres valores independientes.

En *P. aeruginosa*, como se describe en la introducción, se han detectado bajos niveles de lisina descarboxilasa, presentando un bajo crecimiento en presencia de lisina. Esta enzima parece ser limitante en el catabolismo de lisina, pudiendo ocurrir lo mismo en *P. putida* KT2440.

2.3 Ruta del L-pipecolato.

Al analizar los metabolitos intracelulares en *P. putida* KT2440 en presencia de L-lisina se detectó la acumulación de L-pipecolato y 2-aminoadipato, productos procedentes de la degradación de D-lisina. Esta ruta ya había sido descrita a nivel bioquímico (Introducción) pero hasta el momento no se había identificado a nivel genético. Mediante mutagénesis al azar con miniTn5-Km, se obtuvieron cuatro mutantes incapaces de catabolizar el aminoácido lisina, *lys1* (*amaA*), *lys2*, *lys4* (*dpkA*), *lys5* (*amaB*).

Los mutantes *lys1* y *lys5*, no pueden degradar el ácido pipecólico pero sí el 2-aminoadipato. Los análisis de secuenciación revelaban que estos genes presentaban

homología con una pipecolato oxidasa y con la $^1\Delta$ -piperideina-6-deshidrogenasa, respectivamente, enzimas encargadas de convertir el pipecolato en 2-aminoadipato. Los niveles intracelulares de L-pipecolato en estos mutantes estaban por encima de los 1000 nmoles por gramo de proteína, cinco veces superior a los niveles de δ -aminovalerato encontrados en rei2. No se detectó 2-aminoadipato en ninguno de los mutantes. Estos resultados coincidían con los estudios fisiológicos realizados en distintas fuentes de carbono y/o nitrógeno.

En el mutante lys4 (*dpkA*) se encuentra inactivado un gen similar a la malato deshidrogenasa. Recientemente (Muramatsu et al. 2004) se ha demostrado en *P. putida* que este gen, *dpkA*, codifica la enzima $^1\Delta$ -piperideina-2-carboxilato reductasa. Esta enzima cataliza el segundo paso de reacción del catabolismo de D-lisina.

Los mutantes lys1 (*amaA*), lys2, lys4 (*dpkA*) y lys5 (*amaB*) están afectados en la ruta de la D-lisina, siendo incapaces de utilizar este aminoácido cuando se adiciona como única fuente de carbono y nitrógeno. Sin embargo, estos mutantes son incapaces de utilizar el isómero L como fuente de carbono. Decidimos analizar la expresión de P_{dav} para descartar una posible represión de este promotor debida al acúmulo de algún compuesto. Los estudios de expresión de P_{dav} reflejan un patrón de expresión similar a *P. putida* KT2440: tanto la cadaverina como la L-lisina mantienen sus niveles de inducción. Esto supone que en estos mutantes la ruta monooxidativa es activa y que se está sintetizando DavD y DavT.

Estos resultados demuestran la implicación de la ruta de la D-lisina en la degradación de su forma isomérica L. La L-lisina racemasa no ha sido aislada en *Pseudomonas*, pero su actividad ha sido medida en extractos celulares. Nuestros resultados sugieren que está presente en *P. putida* KT2440 y es activa bajo las condiciones analizadas, permitiendo una activa degradación de este aminoácido a nivel de la ruta de la D-lisina. Sin embargo, el hecho de que los mutantes en la ruta de la D-lisina no puedan crecer en L-lisina, y, los mutantes en la ruta de la L-lisina sí puedan catabolizar D-lisina, sugiere un mecanismo de actuación de la Lisina racemasa preferente. La pipecolato oxidasa se induce por L-lisina gracias a la actuación de la lisina racemasa (Introducción), sin embargo, no se ha observado ningún efecto inductor por la D-lisina en las enzimas de la ruta de la L-lisina. Transportadores de L-lisina se inhiben por D-lisina, pudiendo ser debido a la rápida racemización del mismo

(Introducción). Este conjunto de resultados parece sugerir que la racemasa cataboliza preferentemente la conversión de L-lisina en D-lisina.

El mutante *lys2*- permanece como una incógnita. En este mutante se ha afectado una posible D-aminoácido deshidrogenasa, según muestran los análisis de BLAST. Dicho mutante es incapaz de utilizar el aminoácido D-lisina como fuente de carbono. Sin embargo, cuando el aminoácido es aportado como fuente de nitrógeno el tiempo generacional es cuatro veces el de la cepa parental y 2,5 veces el de los mutantes *lys1*- (*amaA*) y *lys5*- (*amaB*). En un principio, se pensó que podría tratarse de la D-lisina 6-aminotransferasa, partiendo de esta hipótesis la producción de L-pipecolato debería estar bloqueada. Sin embargo, los niveles intracelulares de L-pipecolato y 2-aminoadipato son similares a los obtenidos para *P. putida* KT2440. Al estar este gen formando parte de un agrupamiento que incluye un transportador de tipo ABC para aminoácidos, podría verse afectado el transporte de L-lisina. No obstante, aunque a tiempos cortos el transporte de L-lisina en *lys2*- es menor que en su cepa parental, los niveles finales de este son similares.

En la introducción se describe un paso alternativo para la síntesis de $^1\Delta$ -piperideina-2-carboxilato. Se trata de la Lisina α -oxidasa que utiliza el piruvato como aceptor del grupo amino de la D-lisina para sintetizar α -ceto- ϵ -aminocaproico. Este compuesto se cicla espontáneamente para dar $^1\Delta$ -piperideina-2-carboxilato. Es posible que el gen afectado en *lys2* participe en esta ruta.

Tabla D.5: Tiempos de generación en distintas fuentes de carbono y/o nitrógeno de *P. putida* KT2440 y sus derivados.

Cepa	Tiempo de generación (minutos)		
	M9; L-Lys 10 mM	M8; L-Lys 20 mM	M8; L-Lys 5 mM; Glc 0,5%
KT2440	75 ±	90 ± 19	70 ± 5
<i>davB</i>	> 24h	Nada	150± 10
<i>davA</i>	> 24h	Nada	130 ± 10
<i>ldc</i>	95 ± 10	125 ± 15	100 ± 20
<i>amaA</i>	Nada	Nada	140 ± 40
<i>amaB</i>	Nada	Nada	170 ± 30

3. LAS DOS RUTAS PRINCIPALES DE DEGRADACIÓN DE L-LISINA SE ENCUENTRAN CONECTADAS A NIVEL DEL ÁCIDO GLUTÁRICO.

Nos encontramos ante dos rutas para el catabolismo de L-lisina, aminovalérico y pipecolato, que contribuyen significativamente en su degradación. En la ruta del pipecolato, los dos grupos amino de la L-lisina son transferidos a dos moléculas de α -cetoglutarato con la consecuente formación de dos moléculas de glutamato, pero a su vez, el esqueleto carbonado de la lisina es usado para la síntesis de una molécula de glutamato. En la ruta del aminovalérico el esqueleto carbonado de la lisina se utiliza para la síntesis de glutámico y Acetil-CoA, que puede ser degradado hasta CO_2 y H_2O vía Ciclo de Krebs. Esto podría indicar que la ruta del pipecolato está principalmente destinada a la producción de glutamato, mientras que, la ruta del aminovalérico es la principal destinada para la utilización de lisina como fuente de carbono. Con el fin de analizar esta hipótesis, se realizó un estudio de flujos metabólicos.

El estudio de flujos metabólicos se ha llevado a cabo mediante el uso de ^{13}C , administrando un sustrato marcado con ^{13}C y analizando los productos metabólicos con métodos que permiten distinguir entre diferentes patrones de marcaje isotópico, Resonancia Magnética Nuclear o Espectrometría de Masas (Szyperski 1998; Wittmann et al. 2002). Esta tecnología se ha usado durante largo tiempo en bioquímica para estimar rutas o reacciones individuales (Szyperski 1998). En los últimos años se han desarrollado otra serie de interpretaciones analíticas a partir del patrón de marcaje isotópico de aminoácidos proteínogénicos (Szyperski 1995; Fischer & Sauer 2003). Utilizando esta metodología se analizó el patrón de marcaje isotópico en los aminoácidos glutamato, alanina y leucina tanto en *P. putida* KT2440 como en sus mutantes isogénicos *amaB*, *ldc* y *rei2*, a partir de [U^{13}C ; U^{15}N] L-lisina y glucosa al 0,5 %.

En *P. putida* la síntesis de glutamato está mediada por la glutamato sintetasa y la glutamato deshidrogenasa, que utilizan como aceptor de un grupo amino α -cetoglutarato (Caballero et al. 2005). Esto supone que el ^{13}C α -cetoglutarato se formará a partir de la ruta del aminoácido o vía Ciclo de Krebs (Figura D.3). El ^{13}C α -aminoácido formado a partir de la ruta del pipecolato posee el esqueleto carbonado de la lisina. Sin embargo, el originado a partir del Acetil-CoA vía ciclo de Krebs tendrá parte del esqueleto carbonado de la ^{12}C glucosa y parte de la ^{13}C L-lisina. De tal modo, que no

todos los carbonos estarán marcados con ^{13}C . El porcentaje relativo de glutamato marcado en todos los carbonos (m6) en *P. putida* KT2440 es 15,9 %, sin embargo, en el mutante *amaB* es tan sólo de 1,4 %. Estos resultados nos permiten verificar que el esqueleto carbonado del aminoácido [^{13}C ; ^{15}N] L-lisina es usado en la síntesis de glutamato vía pipercolato. Sin embargo, en *rei2* el patrón de marcaje con ^{13}C para el glutamato es similar a *P. putida* KT2440.

La síntesis de L-leucina implica la condensación de piruvato y acetil-CoA. El ^{13}C de la leucina vendrá del acetil-CoA formado vía aminovalerato. Sin embargo, el porcentaje relativo de ^{13}C de este aminoácido tanto en *P. putida* como en sus derivados isogénicos, es parecido. Esto sugiere que en el mutante *rei2* (bloqueado en la ruta del aminovalerato) debe existir alguna ruta que dirija el esqueleto carbonado de la L-lisina hacia acetil-CoA. Perfetti y colaboradores (Perfetti et al. 1972) observaron cantidades traza de ^{14}C -glutarato en células de *P. putida* incubadas con [6- ^{14}C] adipato. A partir de la decarboxilación de α -ceto adipato puede obtenerse glutarato conectando la ruta del aminovalerato con la del amino adipato

Existe una vía que podría estar contribuyendo a la formación de ^{13}C piruvato y enmascarar estos resultados. La PEP carboxikinasa cataliza la formación de PEP a partir de OAA. Para confirmar si dicha ruta es activa en las condiciones ensayadas, se analizó la alanina. Este aminoácido mantiene el esqueleto carbonado del piruvato, ya que, se forma a partir de este. Los resultados obtenidos reflejan que más del 80% del porcentaje relativo de alanina posee el isótopo 12 en todos sus carbonos.

En resumen la ruta de degradación de L-lisina (Figura D.3) se encuentra conectada con la D-lisina a nivel del glutarato y de la lisina racemasa. La lisina racemasa parece ser una enzima periplásmica, mientras que el resto de las enzimas del catabolismo de lisina son citoplasmáticas. La acción de esta enzima antes de que se produzca el transporte de L-lisina al interior celular, puede ser crítica para determinar la ruta metabólica que va a dirigir este aminoácido. La acumulación de δ -aminovalerato, pipercolato y 2-amino adipato, indican que constituyen cuellos de botella en la degradación de L-lisina, suponiendo puntos de regulación de estas rutas.

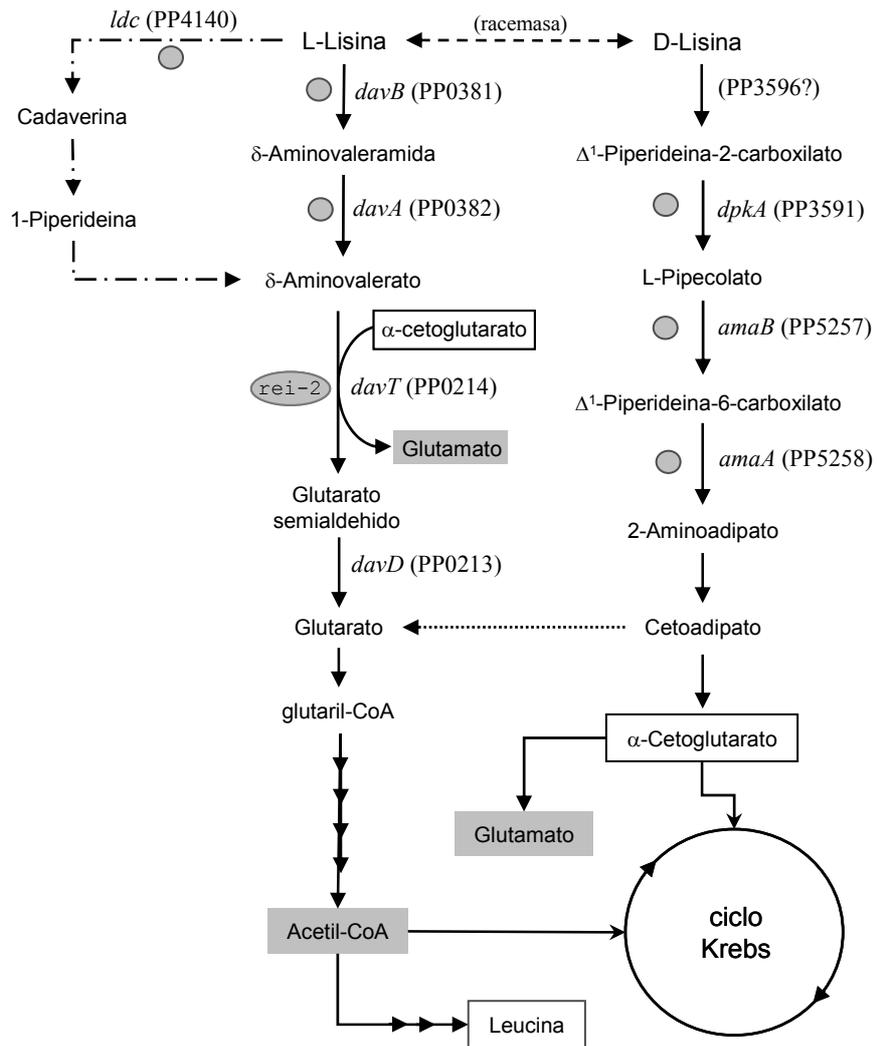


Figura D. 3: Rutas del catabolismo de L-lisina en *P. putida* KT2440. Estas rutas son las propuestas a partir de los metabolitos intracelulares detectados, derivados de ^{13}C analizados y la distribución de ^{13}C en los aminoácidos L-glutamato, L-leucina y L-valina. Se indican los genes identificados y estudiados en esta tesis.

En la Figura D.3 se muestran las principales rutas de degradación de lisina. Ambas rutas parecen contribuir significativamente a la degradación de lisina, pues, la deficiencia de algunas de las enzimas indicadas en la figura supone una marcada reducción en la capacidad de utilizar la lisina. Sin embargo, existen distintos factores que nos llevan a considerar la ruta del pipecolato como la principal en la degradación de L-lisina. Los mutantes *lys1* (*amaA*) o *lys5* (*amaB*) acumulan cuatro veces más pipecolato que *rei2* δ -aminovalerato. El porcentaje de distribución del ^{13}C en los distintos aminoácidos analizados es ligeramente diferente en *lys5* (*amaB*) que en *rei2* con respecto a *P. putida* KT2440. En la búsqueda de mutantes incapaces de utilizar la L-lisina como fuente de carbono y nitrógeno siempre aparecen afectados en la ruta de

la D-lisina. No obstante, no podemos descartar que éste teniendo lugar algún efecto de represión o de toxicidad por el acúmulo de algún compuesto. Nuestros resultados reflejan que una fracción importante de L-lisina es metabolizada vía aminovalerato. Es posible que el acúmulo de D-lisina desencadene algún efecto represor en la degradación de L-lisina, ya que, curiosamente el mutante *lys2*, donde existe producción de pipercolato y 2-aminoadipato, no puede catabolizar L-lisina. Independientemente de la importancia relativa de estas rutas, parece imprescindible la funcionalidad de ambas para un eficiente catabolismo de la lisina.

No descartamos la existencia de una funcionalidad diferencial en las rutas descritas en *Pseudomonas*. En la ruta del pipercolato con siete reacciones se obtiene una molécula de glutamato a partir del esqueleto carbonado de la lisina. Sin embargo, en la ruta del aminovalerato se requieren 10 reacciones para sintetizar Acetil-CoA y, a partir de aquí a través del ciclo de los tricarbónicos, se puede sintetizar glutamato. Esto parece indicar que en aquellas situaciones de estrés que requieran de forma inmediata glutamato la ruta del pipercolato estaría favorecida ya que parece ser la vía más rápida.

La ruta de la cadaverina, parece una ruta minoritaria en la degradación de lisina en *P. putida* KT2440. *P. aeruginosa* carece de la ruta monooxidativa para degradar L-lisina, haciéndolo vía cadaverina. La capacidad de degradar este aminoácido es pobre, creciendo mejor en presencia de cadaverina o glutarato. De hecho los niveles de lisina descarboxilasa son bajos, siendo esta enzima un factor limitante en la degradación de lisina vía cadaverina. Los resultados obtenidos en *P. putida* reflejan una situación similar. La lisina descarboxilasa, Ldc, descrita en *E. coli* es constitutiva y se expresa a un nivel basal muy bajo. En el sistema CadA existe una mayor producción de cadaverina, sin embargo, existe un antiporter encargado de excretar la cadaverina del medio intracelular pudiendo evitar así un exceso de cadaverina. Esta vía de controlar la producción de cadaverina podría deberse a la toxicidad de la misma, ya que, se ha comprobado que una concentración por encima de 5 mM resulta tóxica.

La existencia de esta ruta en *P. putida* puede tener un sentido evolutivo. Las poliaminas (putrescina, cadaverina, espermidina, etc) están presentes en exudados de raíz constituyendo una fuente importante de nitrógeno. Gracias a la ruta de la cadaverina, *P. putida* puede utilizar esta poliamina presente en la rizosfera como fuente de nitrógeno.

Un objetivo de esta tesis fue el análisis de flujos metabólicos, para estimar la contribución de cada ruta en el catabolismo de L-lisina. Sin embargo, el hecho de que ambas rutas estén conectadas a nivel del mismo compuesto, ácido glutárico, ha hecho imposible tal análisis.

La complejidad en el metabolismo de lisina en *P. putida* no es única. En eucariotas tales como hongos, plantas y animales este aminoácido puede metabolizarse a través de diferentes rutas o su degradación puede ser específica de tejido o de orgánulo (introducción). Galili (Galili 2002) propone la existencia de dos flujos metabólicos para el catabolismo de L-lisina en plantas. Uno de ellos estaría altamente regulado y operaría en tejidos donde la forma bifuncional LKR/SDH predomina, y otro, muy eficiente que tendría lugar en tejidos donde la enzima monofuncional LKR es mayoritaria. Este hecho está en relación con la doble funcionalidad de la ruta del catabolismo de L-lisina, regular la homeostasis de lisina y generar glutamato. La producción de LKR-SDH tendría lugar mayoritariamente en tejidos donde los niveles de lisina deben estar estrechamente regulados, semillas o flores en desarrollo. Mientras que la forma monofuncional LKR sería crucial en situaciones de estrés para asegurar una rápida conversión de lisina en glutamato. En animales se han descrito dos rutas: la ruta de la sacaropina y la ruta del pipecolato. El aminoácido L-lisina es el principal precursor en la síntesis de novo de glutamato en el sistema nervioso central de mamíferos (Papes et al. 2001). La ruta de la sacaropina rinde al menos dos moléculas de glutamato (Introducción), adquiriendo un significado especial ya que es una fuente importante en la producción de glutamato. Hasta el momento se desconoce la importancia de la ruta del pipecolato en mamíferos, aunque alteraciones en éste provocan anomalías en el sistema nervioso central. En seres humanos se ha visto que la ruta del pipecolato es activa en peroxisomas, mientras que la de la sacaropina lo es en mitocondrias. En ratas se ha observado que la ruta de la sacaropina es activa durante el desarrollo embrionario en el sistema nervioso central. En el individuo adulto, ésta es relegada al hígado, siendo más activa en el cerebro la ruta del pipecolato.

4. ORGANIZACIÓN CROMOSÓMICA DE LOS GENES DEL CATABOLISMO DE L-LISINA.

Los genes del catabolismo de lisina están distribuidos en el genoma de *P. putida* KT2440 a ambos lados del origen de replicación del cromosoma (Figura D.4). Esta distribución permite a la célula activar diferentes segmentos de la ruta de degradación de L-lisina en respuesta a diferentes situaciones nutricionales. De hecho, *P. putida* KT2440 puede crecer en aminovalerato o pipicolato como única fuente de carbono (Perfetti et al. 1972; Revelles et al. 2004), no induciéndose la ruta monooxidativa o la de la D-lisina hacia pipicolato. Estos resultados están de acuerdo con la propuesta de que las distintas rutas del catabolismo de lisina se encuentran organizadas en bloques: lisina a aminovalerato; aminovalerato a glutarato y pipicolato a amino adipato.

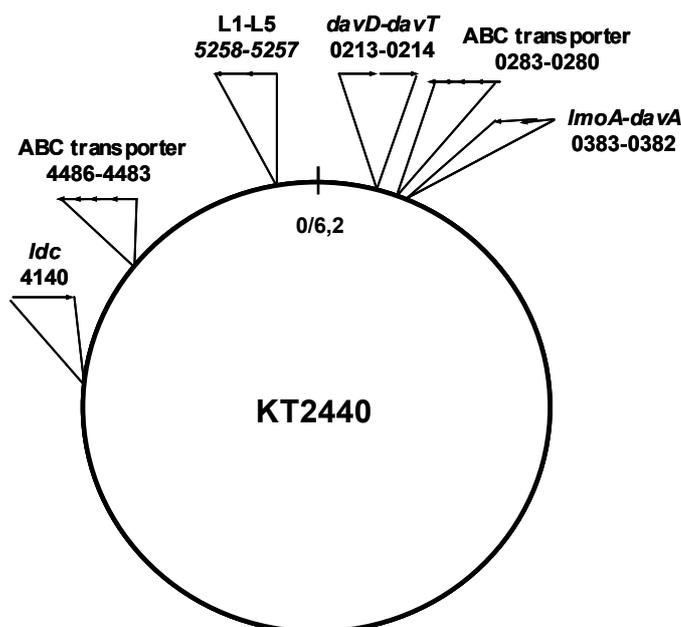


Figura D.4: Organización física en el cromosoma de *P. putida* KT2440 de los genes implicados en el metabolismo de L-lisina. La localización está basada en la secuencia genómica disponible en la página www.tigr.org.

Los genes que codifican las enzimas de la primera ruta (lisina-aminovalérico), *davA* y *davB*, se encuentran organizados formando una unidad transcripcional. Estos genes están regulados por L-lisina y su expresión es independiente de δ -aminovalerato. Los genes de la ruta del aminovalerato forman un operón, *davD* y *davT*, que se inducen

por δ -aminovalerato, debiéndose la inducción por L-lisina a su conversión en δ -aminovalerato. En la ruta del pipecolato, los genes también se disponen formando un operón cuya expresión está regulada por el pipecolato. Algunos intermediarios de estas rutas están presentes en el medio. Por ejemplo, el pipecolato se ha identificado en tejido vegetal, en muestras de suelo (Grobbelaar et al. 1954; Zacharius et al. 1954) y en exudado de raíz (Guirguis et al. 1969; Vancura et al. 1969).

5. DISTRIBUCIÓN DE LA RUTA DE LAS DE DEGRADACIÓN DE LISINA EN *Pseudomonas*.

A lo largo de este trabajo se han identificado numerosos genes de la ruta de degradación de lisina, así como, genes implicados en el transporte de L-lisina. Decidimos analizar si estos genes se encontraban en el genoma de otras especies de *Pseudomonas* que ya habían sido secuenciadas (Stover et al. 2000; Nelson et al. 2002; Buell et al. 2003). Utilizando el programa BLAST enfrentamos cada uno de estos genes con el genoma de *P. aeruginosa*, *P. syringae* y *P. fluorescens* (tabla). En todas las *Pseudomonas* analizadas se identificaron los dos sistemas de transporte descritos en esta tesis. En *P. aeruginosa* los genes *davA* y *davB* no aparecen, lo que es consistente con la ausencia de la ruta monooxidativa en esta bacteria. A su vez, se identificó el gen *ldc* perteneciente a la ruta de la cadaverina (Rahman & Clarke 1980). En *P. syringae* no se identificó *ldc*, pero sí los genes *davA* y *davB*, indicando que en esta cepa la degradación de L-lisina tiene lugar vía monooxidativa. Finalmente, *P. fluorescens* posee ambas rutas sugiriendo un catabolismo similar para L-lisina al descrito en *P. putida* KT2440. En todas las *Pseudomonas* analizadas se han identificado los genes *davD* y *davT*, así como los implicados en el catabolismo de pipecolato. La capacidad de estas cepas de degradar el aminoácido L-lisina vía pipecolato depende de la existencia de una racemasa. Aunque esta enzima no ha sido identificada *Pseudomonas*, su actividad se ha detectado en células de *P. putida* previamente incubadas con L-lisina. El paso de L-lisina a $^1\Delta$ -piperideina 6-carboxilato puede tener lugar a través de la enzima L-lisina 6-aminotransferasa (Introducción). Forthegill *et al.*, (Fothergill & Guest 1977) proponen la existencia de esta enzima, sin embargo, a lo largo de esta tesis no ha podido ser indentificada. A su vez, en el mutante pipecolato oxidasa no se observa 2-aminoadipato en el medio intracelular. Una de las posibles explicaciones es que *P. putida* carezca de la

enzima LAT y, por tanto, no se esté produciendo Δ^1 -piperideina 6-carboxilato, sustrato de la P6C deshidrogenasa. Por otro lado, puede ocurrir que en este mutante *amaA* no esté produciendo *amaB* (P6C deshidrogenasa).

La conexión entre la ruta de degradación de L-lisina y D-lisina a nivel del glutarato en estas especies de *Pseudomonas* permanece sin ser aclarada.

Tabla D. 6: Genes del catabolismo de lisina consevados en distintas *Pseudomonas*. Entre corchetes se indica el número polipeptídico asignado según la anotación de la secuencia genómica en *P. aeruginosa*, *P. syringae* y *P. fluorescens*.

% de similitud entre las distintas especies de <i>Pseudomonas</i> .					
Nombre del gen	Función	<i>P. putida</i> KT2440	<i>P. aeruginosa</i> PAO1	<i>P. syringae</i> sv syringae	<i>P. fluorescens</i> PflO-1
<i>davD</i> (PP0213)	Glutarato semialdehido deshidrogenasa	100	91 (PA0265)	91 (PSPTO0300)	91 (PflO2004773)
<i>davT</i> (PP0214)	δ -aminovalerato aminotransferasa	100	89 (PA0266)	92 (PSPTO0301)	92 (PflO2004774)
<i>davB</i> (PP0383)	Lisina monooxigenase	100	nada	91 (PSPTO0518)	91 (PflO2005316)
<i>davA</i> (PP0382)	δ -aminovaleramida amidohidrolasa	100	nada	75 (PSPTO0517)	73 (PflO2005317)
<i>amaA</i> (PP5257)	L-Pipecolato Oxidasa	100	86 (PA1027)	90 (PSPTO1891)	84 (PflO2000241)
<i>AmaB</i> (PP5258)	Δ^1 -Piperideina-6-carboxilato deshidrogenasa	100	79 (PA1028)	73 (PSPTO1892)	75 (PfluO2000242)
<i>ldc</i> (PP4140)	Lisina descarboxilasa	100	88 (PA1818)	nada	90 (PfluO2001874)
Proteína periplásmica (PP0282)	Transportador específico de lisina (rei2-6)	100	86 (PA5153)	82 (PSPTO5358)	62 (PfluO2003365)
Proteína periplásmica (PP4486)	Transportador de aminoácidos básicos (Rei2-7)	100	94 (PA0892)	92 (PSPTO1830)	92 (PfluO2003361)

CONCLUSIONES

1. Los genes *davD* y *davT* codifican las enzimas glutarato semialdehído deshidrogenasa y la δ -aminovalerato aminotransferasa, respectivamente. Ambos genes se disponen formando un operón cuya expresión está mediada por la ARN polimerasa con σ^{70} . La expresión desde dicho promotor se induce por δ -aminovalérico, sustrato de la ruta.

2. Para el transporte de L-lisina se requieren al menos dos sistemas de transporte de tipo ABC, uno específico y otro general de aminoácidos básicos. Para que tenga lugar una completa inducción de P_{dav} es necesaria la actuación de estos dos sistemas. Bajo las condiciones analizadas el transportador específico de L-lisina es el principal implicado en el transporte de L-lisina.

3. El catabolismo de lisina implica en *P. putida* KT2440 al menos tres rutas de degradación: Ruta de la cadaverina, ruta monooxidativa y la ruta de la D-lisina. Las rutas mayoritarias de degradación de L-lisina son la de la monooxidasa y la ruta de la D-lisina. Se postula la existencia de una lisina racemasa activa que permite la continua racemización de L-lisina en D-lisina. La ruta de degradación de lisina se encuentra conectada a nivel de la lisina racemasa y en el paso de 2-aminoadipato a glutarato.

4. Se han caracterizado a nivel genético las rutas de catabolismo de lisina. Así, se han identificado:

a) Los genes *dpkA*, *amaA* y *amaB*, de la ruta de la D-lisina, que codifican las enzimas Δ^1 -piperideina-2-carboxilato reductasa, pipercolato oxidasa y Δ^1 -piperideina-2-carboxilato deshidrogenasa, respectivamente.

b) Los genes *davA* y *davB*, codifican las enzimas L-lisina 2-monooxigenasa y δ -aminovaleramida amidohidrolasa.

c) El gen *ldc* que codifica la lisina descarboxilasa implicada en la ruta de la cadaverina.

5. Los genes del catabolismo de lisina se encuentran organizados en unidades transcripcionales que incluirían *davD-davT* para el catabolismo del δ -aminovalerato, *amaA-amaB* para el catabolismo de pipercolato y al menos *davA-davB* para el catabolismo de L-lisina hacia δ -aminovalerato. Dicha organización parece común en las distintas especies de *Pseudomonas*.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

- Adams M, Wagner L, Graddis T, Landick R, Antonucci T, Gibson A, Oxender D (1990) Nucleotide sequence and genetic characterization reveal six essential genes for the LIV-I and LS transport systems of *Escherichia coli*. *J Biol Chem*. 265: 11436-11443.
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Meyers EW, Lipman DJ (1990) Basic Local Alignment Search Tool. *J Mol Biol* 215: 403-410.
- Ames GF, Mimura CS, Shyamala V (1990) Bacterial periplasmic permeases belong to a family of transport proteins operating from *Escherichia coli* to human: Traffic ATPases. *FEMS Microbiol Rev* 6: 429-446
- Antoine R, Loch C (1992) Isolation and molecular characterization of a novel broad-host-range plasmid from *Bordetella bronchiseptica* with sequence similarities to plasmids from gram-positive organisms. *Mol Microbiol* 6: 1785-1799
- Arlat M, Gough CL, Zischek C, Barberis PA, Trigalet A, Boucher CA (1992) Transcriptional organization and expression of the large *hrp* gene cluster of *Pseudomonas solanacearum*. *Mol Plant Microbe Interact* 5: 187-193
- Arruda P, Silva WJ (1983) Lysine-ketoglutaric acid reductase activity in maize: its possible role on lysine metabolism of developing endosperm. *Phytochemistry* 22: 206-208
- Arruda P, Kemper EL, Papes F, Leite A (2000) Regulation of lysine catabolism in higher plants. *Trends Plant Science* 5: 324-330.
- Auger EA, Redding KE, Plumb T, Childs LC, Meng SY, Bennett GN (1989) Construction of lac fusions to the inducible arginine- and lysine decarboxylase genes of *Escherichia coli* K12. *Mol Microbiol* 3: 609-320
- Ausubel FM, Brent R, Kingston RF, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K (1991) Current protocols in molecular biology. Greene Publishing Associated. New York.
- Azevedo RA, Arruda P, Turner WL, Lea PJ (1997) The biosynthesis and metabolism of the aspartate derived amino acids in higher plants. *Phytochemistry* 46: 395-419.
- Bagdasarian M, Lurz R, Ruckert B, Franklin FC, Bagdasarian MM, Frey J, Timmis KN (1981) Specific-purpose plasmid cloning vectors. II. Broad host range, high copy number, RSF1010-derived vectors, and a host-vector system for gene cloning in *Pseudomonas*. *Gene* 16: 237-247
- Bagdasarian M, Timmis KN (1982) Host:vector systems for gene cloning in *Pseudomonas*. *Curr Top Microbiol Immunol* 96: 47-67
- Baker JJ, van der Drift C, Stadtman TC (1973) Purification and properties of -lysine mutase, a pyridoxal phosphate and B12 coenzyme dependent enzyme. *Biochemistry* 12: 1054-1063
- Barber DA, Lynch JM (1977) Microbial growth in rhizosphere. *Soil Biol Biochem* 9: 305-308
- Barker HA, Kahn JM, Hedrick L (1982) Pathway of lysine degradation in *Fusobacterium nucleatum*. *J Bacteriol* 152: 201-207
- Bauer WD, Caetano-Anollés G (1991) Chemotaxis, induced gene expression and competitiveness in the rhizosphere. The rhizosphere and plant growth. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands. In D. L. Kleister and P. B. Cregan (ed): 155-162

Bibliografía

- Bayliss C, Bent E, Culham DE, MacLellan S, Clarke AJ, Brown GL, Wood JM (1997) Bacterial genetic loci implicated in the *Pseudomonas putida* GR12-2R3--canola mutualism: identification of an exudate-inducible sugar transporter. *Can J Microbiol* 43: 809-818
- Beckerich JM, Lambert M, Heslot H (1979) Genetic control of lysine permeases in *Saccharomycopsis lipolytica*. *Arch Microbiol* 122: 201-205
- Bellmann A, Vrljic M, Patek M, Sahn H, Kramer R, Eggeling L (2001) Expression control and specificity of the basic amino acid exporter LysE of *Corynebacterium glutamicum*. *Microbiology* 147: 1765-1774.
- Bhagwat AA, Keister DL (1992) Identification and cloning of *Bradyrhizobium japonicum* genes expressed strain selectively in soil and rhizosphere. *Appl Environ Microbiol* 58: 1490-1495
- Bloemberg GV, Wijffjes AH, Lamers GE, Stuurman N, Lugtenberg BJ (2000) Simultaneous imaging of *Pseudomonas fluorescens* WCS365 populations expressing three different autofluorescent proteins in the rhizosphere: new perspectives for studying microbial communities. *Mol Plant Microbe Interact* 13: 1170-1176
- Boyer HW, Roulland-Dussoix D (1969) A complementation analysis of the restriction and modification of DNA in *Escherichia coli*. *J Mol Biol* 41: 459-472
- Brandt AB (1975) In vivo incorporation of (14-C) lysine into the endosperm proteins of wild type and high-lysine barley. *FEBS Lett* 52: 288-291
- Breslauer KJ, Frank R, Blocker H, Marky LA (1986) Predicting DNA duplex stability from the base sequence. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83: 3746-3750
- Broer S, Kramer R (1991) Lysine Excretion by *Corynebacterium-Glutamicum* .1. Identification of a specific secretion carrier system. *Eur J Biochem* 202: 131-135
- Broquist HP (1985) The indolizidine alkaloids, slaframine and swainsonine: contaminants in animal forages. *Annu Rev Nutr* 5: 391-409
- Buell CR, Anderson AJ (1993) Expression of the *aggA* locus of *Pseudomonas putida* in vitro and in planta as detected by the reporter gene, *xyIE*. *Mol Plant Microbe Interact* 6: 331-340
- Buell CR, Joardar V, Lindeberg M, Selengut J, Paulsen IT, Gwinn ML, Dodson RJ, Deboy RT, Durkin AS, Kolonay JF, Madupu R, Daugherty S, Brinkac L, Beanan MJ, Haft DH, Nelson WC, Davidsen T, Zafar N, Zhou L, Liu J, Yuan Q, Khouri H, Fedorova N, Tran B, Russell D, Berry K, Utterback T, Van Aken SE, Feldblyum TV, D'Ascenzo M, Deng W-L, Ramos AR, Alfano JR, Cartinhour S, Chatterjee AK, Delaney TP, Lazarowitz SG, Martin GB, Schneider DJ, Tang X, Bender CL, White O, Fraser CM, Collmer A (2003). The complete genome sequence of the *Arabidopsis* and tomato pathogen *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000. *PNAS* 100: 10181-10186.
- Burkovski A, Kramer R (2002) Bacterial amino acid transport proteins: occurrence, functions, and significance for biotechnological applications. *58*: 265-274.
- Busby S, Ebright RH (1999) Transcription activation by catabolite activator protein (CAP). *Jour of Mol Biol* 293: 199-213.
- Busch W, Saier MH Jr (2002) The transporter classification (TC) system, 2002. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 37: 287-337
- Caballero A, Esteve-Nunez A, Zylstra GJ, Ramos JL (2005) Assimilation of nitrogen from nitrite and trinitrotoluene in *Pseudomonas putida* JLR11. *J Bacteriol* 187: 396-399
- Caetano-Anolles G, Crist-Estes DK, Bauer WD (1988) Chemotaxis of *Rhizobium meliloti* to the plant

flavone luteolin requires functional nodulation genes. *J Bacteriol* 170: 3164-3169

Campbell R, Greaves MP (1990) Anatomy and community structure of the rhizosphere. *The Rhizosphere*, John Wiley and Sons.

Cao X, Kolonay JrJ, Saxton KA, Hartline RA (1993) The OCT plasmid encodes D-lysine membrane transport and catabolic enzymes in *Pseudomonas putida*. *Plasmid* 30: 83-89.

Cases I, Ussery DW, de Lorenzo V (2003) The sigma54 regulon (sigmulon) of *Pseudomonas putida*. *Environ Microbiol* 5: 1281-1293

Celis TFR, Rosenfel.hj, Maas WK (1973) Mutant of *Escherichia coli* K-12 defective in transport of basic amino-acids. *J Bacteriol* 116: 619-626

Chabot R, Antoun H, Kloepper J, Beauchamp C (1996) Root colonization of maize and lettuce by bioluminescent *Rhizobium leguminosarum* biovar phaseoli. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 2767-2772.

Chang YF (1978) Lysine metabolism in the rat brain: blood-brain barrier transport, formation of pipercolic acid and human hyperpipercolatemia. *J Neurochem* 30: 355-360

Chang YF, Adams E (1974) D-lysine catabolic pathway in *Pseudomonas putida*: interrelations with L-lysine catabolism. *J Bacteriol* 117: 753-764

Chang YF, Adams E (1977) Glutarate semialdehyde dehydrogenase of *Pseudomonas*. Purification, properties, and relation to L-lysine catabolism. *J Biol Chem.* 252: 7979-7986.

Chet I, Zilberstein Y, Henis Y (1973) Chemotaxis of *Pseudomonas lachrymans* to plant extracts and to water droplets collected from the leaf surfaces of resistant and susceptible plants. *Physiol. Plant Pathol* 3: 473-479

Chin-A-Woeng TFC, de Priester W, van der Bij AJ, Lugtenberg BJ (1997) Description of the colonization of a gnotobiotic tomato rhizosphere by *Pseudomonas chlororaphis* biocontrol strain WCS365 using scanning electron microscopy. *Mol. Plant-Microbie Interact.* 10: 79-86

Coque JJ, Liras P, Laiz L, Martin JF (1991) A gene encoding lysine 6-aminotransferase, which forms the beta-lactam precursor alpha-aminoadipic acid, is located in the cluster of cephamycin biosynthetic genes in *Nocardia lactamdurans*. *J Bacteriol* 173: 6258-6264

Costilow RN, Rochovansky OM, Barker HA (1966) Isolation and Identification of beta-Lysine as an Intermediate in Lysine Fermentation. *J Biol Chem.* 241: 1573-1580.

Curl EA, Truelove B (1986) *The Rhizosphere*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg.

de La Fuente JL, Rumbero A, Martin JF, Liras P (1997) Delta-1-piperideine-6-carboxylate dehydrogenase, a new enzyme that forms alpha-aminoadipate in *Streptomyces clavuligerus* and other cephamycin C-producing actinomycetes. *Biochem J* 327: 59-64

De Vos P, Landschoot AV, Segers P, Tytgat R, Gillis M, Bauwens M, Rossau R, Goor M, Por B, Kerster K, Lizzaraga P, De Ley J Genotypic relationships and taxonomic localization of unclassified *Pseudomonas*-like strains by deoxy-ribonucleic acid: ribosomal ribonucleic acid hybridations. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 39: 35-49

delaVega AL, Delcour AH (1995) Cadaverine induces closing of *E. coli* porins. *EMBO J* 14: 6058-6065

Delgado A, Duque E, Ramos JL (1992) Behavior in agricultural soils of a recombinant *Pseudomonas bacterium* that simultaneously degrades alkyl- and haloaromatics. *Microb Releases* 1: 23-8

Dell CL, Neely MN, Olson ER (1994) Altered pH and lysine signalling mutants of cadC, a gene encoding

Bibliografía

a membrane-bound transcriptional activator of the *Escherichia coli* cadBA operon. Mol Microbiol 14: 7-16

Denis F, Al Delaimi K, Chiron JP (1977) Lysine decarboxylase in *Pseudomonas aeruginosa*. C R Seances Soc Biol Fil 171: 484-487

Dharmatilake A, Bauer W (1992) Chemotaxis of *Rhizobium meliloti* towards Nodulation Gene-Inducing Compounds from Alfalfa Roots. Appl. Environ. Microbiol. 58, 1153-1158.

di Guan C, Li P, Riggs PD, Inouye H (1988) Vectors that facilitate the expression and purification of foreign peptides in *Escherichia coli* by fusion to maltose-binding protein. Gene 67: 21-30

Dohner PM, Cardon BP (1954) Anaerobic fermentation of lysine. J Bacteriol 67: 608-611

Domínguez-Cuevas P, Marqués S (2004) Compiling σ^{70} -dependent promoters. The pseudomonads. Vol I: Virulence and gene regulation. Kluwer Publishing. 273-292

Dunn NW, Gunsalus IC (1973) Transmissible plasmid coding early enzymes of naphthalene oxidation in *Pseudomonas putida*. J Bacteriol 114: 974-979

Ellis J, Carlin A, Steffes C, Wu J, Liu J, Rosen BP (1995) Topological analysis of the lysine-specific permease of *Escherichia coli*. Microbiology 141: 1927-1935

Enderle PJ, Farwell MA (1998) Electroporation of freshly plated *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* cells. Biotechniques 25: 954-6, 958

Epelbaum S, McDevitt R, Falco SC (1997) Lysine-ketoglutarate reductase and saccharopine dehydrogenase from *Arabidopsis thaliana*: nucleotide sequence and characterization. Plant Mol Biol. 35: 735-748

Erb RW, Eichner CA, Wagner-Dobler I, Timmis KN (1997) Bioprotection of microbial communities from toxic phenol mixtures by a genetically designed pseudomonad. Nat Biotechnol. 15: 378-382.

Erdmann A, Weil B, Kramer R (1993) Lysine secretion by wild-type *Corynebacterium glutamicum* triggered by dipeptide uptake. J Gen Microbiol 139: 3115-3122

Esmahan C, Alvarez E, Montenegro E, Martin JF (1994) Catabolism of lysine in *Penicillium chrysogenum* leads to formation of 2-aminoadipic acid, a precursor of penicillin biosynthesis. Appl Environ Microbiol 60: 1705-1710

Espinosa-Urgel M, Ramos JL (2001) Expression of a *Pseudomonas putida* aminotransferase involved in lysine catabolism is induced in the rhizosphere. Appl. Environ. Microbiol. 67: 5219-5224.

Espinosa-Urgel M, Kolter R, Ramos JL (2002) Root colonization by *Pseudomonas putida*: love at first sight. Microbiology 148: 341-343

Espinosa-Urgel M, Salido A, Ramos JL (2000) Genetic Analysis of Functions Involved in Adhesion of *Pseudomonas putida* to Seeds. J Bacteriol. 182: 2363-2369

Eun Rhee J, Haeng Rhee J, Youl Ryu P, Ho Choi S (2002) Identification of the cadBA operon from *Vibrio vulnificus* and its influence on survival to acid stress. FEMS Microbiology Letters 208: 245-251

Fan CL, Miller DL, Rodwell VW (1972) Metabolism of basic amino acids in *Pseudomonas putida*. Transport of lysine, ornithine and arginine. J Biol Chem. 247: 2283-2288

Fangmeier N, Leistner E (1980) A ¹⁵N NMR study on D-lysine metabolism in *Neurospora crassa*. J. Biol Chem 255: 10205-10209

- Fischer E, Sauer U (2003) Metabolic flux profiling of *Escherichia coli* mutants in central carbon metabolism using GC-MS. *Eur Jour Biochem* 270: 880-891
- Foster JW, Hall HK (1991) Inducible pH homeostasis and the acid tolerance response of *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol* 173: 5129-5135
- Foster JW, Park YK, Bang IS, Karem K, Betts H, Hall HK, Shaw E (1994) Regulatory circuits involved with pH-regulated gene expression in *Salmonella typhimurium*. *Microbiology* 140: 341-352
- Foster RC (1981) The Ultrastructure and Histochemistry of the Rhizosphere. *New Phytologist* 89: 263-273
- Foster RC (1982) The Fine-Structure of Epidermal-Cell Mucilages of Roots. *New Phytologist* 91: 727-740
- Foster RC, Rovira AD (1976) Ultrastructure of Wheat Rhizosphere. *New Phytologist* 76: 343-352
- Fothergill JC, Guest JR (1977) Catabolism of L-lysine by *Pseudomonas aeruginosa*. *J Gen Microbiol* 99: 139-155
- Fowden L (1964) The chemistry and metabolism of recently isolated aminoacids. *Annu Rev Biochem* 33: 173-204
- Franklin FC, Bagdasarian M, Bagdasarian MM, Timmis KN (1981) Molecular and functional analysis of the TOL plasmid pWWO from *Pseudomonas putida* and cloning of genes for the entire regulated aromatic ring meta cleavage pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 78: 7458-7462
- Friede JD, Henderson LM (1976) Metabolism of 5-hydroxylysine in *Pseudomonas fluorescens*. *J Bacteriol* 127: 1239-1247
- Fujii T, Narita T, Agematu H, Agata N, Isshiki K (2000) Characterization of L-lysine 6-aminotransferase and its structural gene from *Flavobacterium lutescens* IFO3084. *J Biochem* 128: 391-397.
- Fukui R, Poinar EI, Bauer PH, Schroth MN, Hendson M, Wang XL, Hancock JG (1994) Spatial colonization patterns and interaction of bacteria on inoculated sugar-beet seed. *Phytopathology* 84: 1338-1345
- Galan B, Diaz E, Garcia JL (2000) Enhancing desulphurization by engineering a flavin reductase-encoding gene cassette in recombinant biocatalysts. *Environ Microbiol* 2: 687-694.
- Gale EF (1946) The bacterial amino acid decarboxylases. *Adv. Enzymol.* 6: 1-32
- Galili G (2002) New insights into the regulation and functional significance of lysine metabolism in plants. *Annu Rev Plant Biol* 53: 27-43
- Galili G, Tang G, Zhu X, Gakiere B (2001) Lysine catabolism: a stress and development super-regulated metabolic pathway. *Current Opinion in Plant Biology* 4: 261-266.
- Goldemberg SH (1980) Lysine decarboxylase mutants of *Escherichia coli*: evidence for two enzyme forms. *J Bacteriol* 141: 1428-1431
- Grenson M (1966) Multiplicity of the amino acid permeases in *Saccharomyces cerevisiae*. II. Evidence for a specific lysine-transporting system. *Biochim Biophys Acta* 127: 339-346
- Grenson M, Hou C, Crabeel M (1970) Multiplicity of the amino acid permeases in *Saccharomyces cerevisiae*. IV. Evidence for a general amino acid permease. *J Bacteriol* 103: 770-777
- Grobbelaar N, Zacharius RM, Steward FC (1954) The bulk isolation of L(-)pipecolic acid from *Phaseolus*

Bibliografia

vulgaris and its quantitative determination. J Am Chem Soc 76: 2912-2915

Guengerich FP, Broquist HP (1973) Biosynthesis of slaframine, (1S,6S,8aS)-1-acetoxy-6-aminoctahydroindolizine, a parasymphomimetic alkaloid of fungal origin. II. The origin of pipercolic acid. Biochemistry 12: 4270-4274

Guengerich FP, Broquist HP (1976) Lysine catabolism in *Rhizoctonia leguminicola* and related fungi. J Bacteriol 126: 338-347

Guirguis MA, Vancura V, Kunc F (1969) Oxidation of pipercolic acid in soils and in rhizosphere soil of different plants. Folia Microbiol 14: 13-22

Hammer T, Bode R, Birnbaum D (1991) Occurrence of a novel yeast enzyme, L-lysine epsilon-dehydrogenase, which catalyses the first step of lysine catabolism in *Candida albicans*. J Gen Microbiol 137: 711-715

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

Hancock RE, Brinkman FS (2002) Function of pseudomonas porins in uptake and efflux. Annu Rev Microbiol 56: 17-38

Hendrickson EL, Guevera P, Ausubel FM (2000) The Alternative Sigma Factor RpoN Is Required for *hrp* Activity in *Pseudomonas syringae* pv. Maculicola and Acts at the Level of hrpL Transcription. J Bacteriol. 182: 3508-3516.

Herrero M, de Lorenzo V, Timmis KN (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

Higgins CF (1992) ABC transporters: from microorganisms to man. Annu Rev Cell Biol 8: 67-113

Higgins CF, Ames GF (1981) Two periplasmic transport proteins which interact with a common membrane receptor show extensive homology: complete nucleotide sequences. Proc Natl Acad Sci U S A 78: 6038-6042

Hiltner L (1904) Über neuere erfahrungen und probleme auf dem gebiete der bodenbakteriologie unter besonderer berücksichtigung der gründung und brache. Arb. Dtsch. Landwirtschaft. Ges. Berl. 98: 59-78

Hirao T, Sato M, Shirahata A, Kamio Y (2000) Covalent linkage of polyamines to peptidoglycan in *Anaerovibrio lipolytica*. J Bacteriol. 182: 1154-1157

Huang HT, Davisson JW (1958) Distribution of lysine racemase in bacteria. J Bacteriol 76: 495-498

Kamio Y (1987) Structural specificity of diamines covalently linked to peptidoglycan for cell growth of *Veillonella alcalescens* and *Selenomonas ruminantium*. J Bacteriol 169: 4837-4840

Kamio Y, Itoh Y, Terawaki Y (1981) Chemical structure of peptidoglycan in *Selenomonas ruminantium*: cadaverine links covalently to the D-glutamic acid residue of peptidoglycan. J Bacteriol 146: 49-53

Kamio Y, Poso H, Terawaki Y, Paulin L (1986) Cadaverine covalently linked to a peptidoglycan is an essential constituent of the peptidoglycan necessary for the normal growth in *Selenomonas ruminantium*. J Biol Chem 261: 6585-6589

Kamio Y, Terawaki Y (1983) Purification and properties of *Selenomonas ruminantium* lysine decarboxylase. J Bacteriol 153: 658-664

Kamio Y, Terawaki Y, Izaki K (1982) Biosynthesis of cadaverine-containing peptidoglycan in *Selenomonas ruminantium*. J Biol. Chem 257: 3326-3333.

- Kang C, Shin W, Yamagata Y, Gokcen S, Ames G, Kim S (1991) Crystal structure of the lysine-, arginine-, ornithine-binding protein (LAO) from *Salmonella typhimurium* at 2.7-Å resolution. *J Biol Chem* 266: 23893-23899
- Kaniga K, Delor I, Cornelis GR (1991) A wide-host-range suicide vector for improving reverse genetics in gram-negative bacteria: inactivation of the *blaA* gene of *Yersinia enterocolitica*. *Gene* 109: 137-41
- Karchi H, Miron D, Ben-Yaacov S, Galili G (1995) The lysine-dependent stimulation of lysine catabolism in tobacco seed requires calcium and protein phosphorylation. *Plant Cell* 7: 1963-1970
- Kellerhals MB, Kessler B, Witholt B (1999) Closed-loop control of bacterial high-cell-density fed-batch cultures: production of mcl-PHAs by *Pseudomonas putida* KT2442 under single-substrate and cofeeding conditions. *Biotechnol Bioeng* 65: 306-15
- Kemper EL, Cord-Neto G, Capella AN, Goncalves-Butruile M, Azevedo RA, Arruda P (1998) Structure and regulation of the bifunctional enzyme lysine-oxoglutarate reductase-saccharopine dehydrogenase in maize. *Eur J Biochem* 253: 720-729
- Kemper EL, Neto GC, Papes F, Moraes KCM, Leite A, Arruda P (1999) The role of opaque2 in the control of lysine-degrading activities in developing maize endosperm. *Plant Cell* 11:1981-1994
- Kessler B, de Lorenzo V, Timmis KN (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
- Kikuchi Y, Kojima H, Tanaka T, Takatsuka Y, Kamio Y (1997) Characterization of a second lysine decarboxylase isolated from *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 179: 4486-92
- Kloepper JW, Hume DJ, Scher FM, Singleton C, Tipping B, Laliberte M, Frauley K, Kutchaw T, Simonson C, Lifshitz R, Zaleska I, Lee L (1988) Plant growth-promoting rhizobacteria on *Canola* (Rapeseed). *Plant Disease* 72: 42-46
- Kohler T, Harayama S, Ramos JL, Timmis KN (1989) Involvement of *Pseudomonas putida* RpoN sigma factor in regulation of various metabolic functions. *J Bacteriol* 171: 4326-33
- Kohler T, Michea-Hamzehpour M, Henze U, Gotoh N, Curty LK, Pechere JC (1997) Characterization of MexE-MexF-OprN, a positively regulated multidrug efflux system of *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol* 23: 345-54
- Kovach ME, Elzer PH, Steven Hill D, Robertson GT, Farris MA, Roop IRM, Peterson KM (1995) Four new derivatives of the broad-host-range cloning vector pBBR1MCS, carrying different antibiotic-resistance cassettes. *Gene* 166: 175-176.
- Kowalchuk GA, Buma DS, de Boer W, Klinkhamer PG, van Veen JA (2002) Effects of above-ground plant species composition and diversity on the diversity of soil-borne microorganisms. *Antonie Van Leeuwenhoek* 81: 509-20
- Kraak M, Smits T, Kessler B, Witholt B (1997) Polymerase C1 levels and poly(R-3-hydroxyalkanoate) synthesis in wild- type and recombinant *Pseudomonas* strains. *J Bacteriol* 179: 4985-4991
- Krieg NR, Garrity GM (2001) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. In D. R. Boone, R. W. Castensholz, and G. M. Garrity (ed.) Vol. I. Springer Verlag, New York: 15-19
- Kuiper I, Kravchenko LV, Bloemberg GV, Lugtenberg BJ (2002) *Pseudomonas putida* strain PCL1444, selected for efficient root colonization and naphthalene degradation, effectively utilizes root exudate components. *Mol Plant Microbe Interact* 15: 734-41
- Kusakabe H, Kodama K, Kuninaka A, Yoshino H, Misono H, Soda K (1980) A new antitumor enzyme,

Bibliografía

- L-lysine alpha-oxidase from *Trichoderma viride*. Purification and enzymological properties. J Biol Chem. 255: 976-981
- Kustu SG, McFarland NC, Hui SP, Esmon B, Ames GF (1979) Nitrogen control of *Salmonella typhimurium*: co-regulation of synthesis of glutamine synthetase and amino acid transport systems. J Bacteriol 138: 218-34
- Lambert MA, Moss CW (1973) Use of gas chromatography for detecting ornithine and lysine decarboxylase activity in bacteria. Appl Microbiol 26: 517-20
- Lemonnier M, Lane D (1998) Expression of the second lysine decarboxylase gene of *Escherichia coli*. Microbiology 144: 751-760
- Lestrangle KK, Bender GL, Djordjevic MA, Rolfe BG, Redmond JW (1990) The *Rhizobium* strain Ngr234 Nod1 gene-product responds to activation by the simple phenolic-compounds vanillin and isovanillin present in wheat seedling extracts. Mol Plant-Microbe Interac 3: 214-220
- Lin J, Lee I, Frey J, Slonczewski J, Foster J (1995) Comparative analysis of extreme acid survival in *Salmonella typhimurium*, *Shigella flexneri*, and *Escherichia coli*. J Bacteriol. 177: 4097-4104
- Llamas MA, Ramos JI, Rodríguez-Herva JJ (2003) Transcriptional organization of the *Pseudomonas putida* tol-oprL genes. 185: 184-195
- Lopez-de-Victoria G, Lovell C (1993) Chemotaxis of *Azospirillum* species to aromatic compounds. Appl. Environ Microbiol. 59: 2951-2955
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193: 265-275
- Lugtenberg BJJ, Bloemberg GV (2004) Life in the rhizosphere. The Pseudomonads. Vol.I: Genomics , life style and molecular architecture. Kluwert Publishing 403-430
- Lugtenberg BJJ, Dekkers LC (1999) What makes *Pseudomonas* bacteria rhizosphere competent? Environmental Microbiology 1: 9-13
- Lugtenberg BJJ, Kravchenko LV, Simons M (1999) Tomato seed and root exudate sugars: composition, utilization by *Pseudomonas* biocontrol strains and role in rhizosphere colonization. Environmental Microbiology 1: 439-446
- Madduri K, Stuttard C, Vining LC (1989) Lysine catabolism in *Streptomyces* spp. is primarily through cadaverine: beta-lactam producers also make alpha-aminoadipate. J Bacteriol 171: 299-302
- Madduri K, Stuttard C, Vining LC (1991) Cloning and location of a gene governing lysine epsilon-aminotransferase, an enzyme initiating beta-lactam biosynthesis in *Streptomyces* spp. J Bacteriol 173: 985-8
- Maniatis T, Fritsch EF, Sambrook J (1982) Molecular cloning: a laboratory manual. Gold Spring Harbor Laboratory Press. New York
- 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: 1829-36
- Markovitz P, Chuang D (1987) The bifunctional aminoadipic semialdehyde synthase in lysine degradation. Separation of reductase and dehydrogenase domains by limited proteolysis and column chromatography. J Biol Chem. 262: 9353-9358
- Markovitz P, Chuang D, Cox R (1984) Familial hyperlysinemias. Purification and characterization of the bifunctional aminoadipic semialdehyde synthase with lysine-ketoglutarate reductase and saccharopine

- dehydrogenase activities. *J Biol Chem.* 259: 11643-11646
- Marsh JL, Erfle M, Wykes EJ (1984) The pic plasmid and phage vectors with versatile cloning sites for recombinant selection by insertional inactivation. *Gene* 32: 481-485
- Meister A, Radhakrishnan AN, Buckley SD (1957) Enzymatic synthesis of l-pipecolic acid and l-Proline. *J. Biol. Chem.* 229: 789-800.
- Melchers LS, Regensburg-Tuink AJ, Schilperoort RA, Hooykaas PJ (1989) Specificity of signal molecules in the activation of *Agrobacterium virulence* gene expression. *Mol Microbiol* 3: 969-77
- Menard R, Sansonetti PJ, Parsot C (1993) Nonpolar mutagenesis of the *ipa* genes defines IpaB, IpaC, and IpaD as effectors of *Shigella flexneri* entry into epithelial cells. *J Bacteriol.* 175: 5899-5978
- Meng SY, Bennett GN (1992a) Regulation of the *Escherichia coli* cad operon: location of a site required for acid induction. *J Bacteriol* 174: 2670-8
- Meng S, Bennett G (1992b) Nucleotide sequence of the *Escherichia coli* cad operon: a system for neutralization of low extracellular pH. *J Bacteriol.* 174: 2659-2669
- Merrell DS, Camilli A (1999) The *cadA* gene of *Vibrio cholerae* is induced during infection and plays a role in acid tolerance. *Mol Microbiol* 34: 836-849
- Migula W (1894) Ueberein neues system der bakterien. *Arb. Bakteriologie. Ins. Karlsruhe.* 1: 235-238
- Mihalik SJ, Moser HW, Watkins PA, Danks DM, Poulos A, Rhead WJ (1989) Peroxisomal L-pipecolic acid oxidation is deficient in liver from Zellweger syndrome patients. *Pediatr Res* 25: 548-552
- Miller DR, Rodwell VW (1971a) Metabolism of the inducible lysine transport system. *J Biol Chem.* 246: 1763-1771
- Miller DL, Rodwell VW (1971b) Metabolism of basic amino acids in *Pseudomonas putida*. Catabolism of lysine by cyclic and acyclic intermediates. *J Biol Chem.* 246: 2758-2764
- Miller J (1972) *Experiments in molecular genetics.* Cold Spring Harbor, New York, USA.
- Miller VL, Taylor RK, Mekalanos JJ (1987) Cholera toxin transcriptional activator *toxR* is a transmembrane DNA binding protein. *Cell* 48: 271-279
- Mimmack ML, Gallagher MP, Pearce SR, Hyde SC, Booth IR, Higgins CF (1989) Energy coupling to periplasmic binding protein-dependent transport systems: stoichiometry of ATP hydrolysis during transport in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86: 8257-8261
- Miron D, Ben-Yaacov S, Karchi H, Galili G (1997) In vitro dephosphorylation inhibits the activity of soybean lysine-ketoglutarate reductase in a lysine-regulated manner. *Plant Journal* 12: 1453-1458
- Miya RK, Firestone MK (2000) Phenanthrene-degrader community dynamics in rhizosphere soil from a common annual grass. *J Environ Qual* 29: 584-592
- Molina L, Ramos C, Duque E, Ronchel MC, García JM, Wyke L, Ramos J (2000) Survival of *Pseudomonas putida* KT2440 in soil and in the rhizosphere of plants under greenhouse and environmental conditions. *Soil Biol Biochem* 32: 315-312
- Montesinos E, Bonaterra A, Badosa E, Frances J, Alemany J, Llorente I, Moragrega C (2002) Plant-microbe interactions and the new biotechnological methods of plant disease control. *Int Microbiol* 5: 169-175
- Mourez M, Hofnung M, Dassa E (1997) Subunit interactions in ABC transporters: a conserved sequence

Bibliografia

in hydrophobic membrane proteins of periplasmic permeases defines an important site of interaction with the ATPase subunits. *EMBO J* 16: 3066-3077

Muramatsu H, Mihara H, Kakutani R, Yasuda M, Ueda M, Kurihara T, Esaki N (2005) The putative malate/lactate dehydrogenase from *Pseudomonas putida* is a NADPH-dependent delta1-piperidine-2-carboxylate/delta1-pyrroline-2-carboxylate reductase involved in the catabolism of D-lysine and D-proline. *J Biol Chem* 280: 5329-35

Namwat W, Kinoshita H, Nihira T (2002) Identification by heterologous expression and gene disruption of VisA as L-lysine 2-aminotransferase essential for virginiamycin S biosynthesis in *Streptomyces virginiae*. *J Bacteriol* 184: 4811-8

Namwat W, Lee C-K, Kinoshita H, Yamada Y, Nihira T (2001) Identification of the *varR* Gene as a transcriptional regulator of virginiamycin S resistance in *Streptomyces virginiae*. *J Bacteriol.* 183: 2025-2031

Neely MN, Dell CL, Olson ER (1994) Roles of LysP and CadC in mediating the lysine requirement for acid induction of the *Escherichia coli* cad operon. *J Bacteriol* 176: 3278-3285

Neely M, Olson E (1996) Kinetics of expression of the *Escherichia coli* cad operon as a function of pH and lysine. *J. Bacteriol.* 178: 5522-5528

Nelson KE, Weinel C, Paulsen IT, Dodson RJ, Hilbert H, Martins dos Santos VAP, Fouts DE, Gill SR, Pop M, Holmes M, Brinkac L, Beanan M, DeBoy RT, Daugherty S, Kolonay J, Madupu R, Nelson W, White O, Peterson J, Khouri H, Hance I, Lee PC, Holtzapple E, Scanlan D, Tran K, Moazzez A, Utterback T, Rizzo M, Lee K, Kosack D, Moestl D, Wedler H, Lauber J, Stjepandic D, Hoheisel J, Straetz M, Heim S, Kiewitz C, Eisen J, Timmis KN (2002) Complete genome sequence and comparative analysis of the metabolically versatile *Pseudomonas putida* KT2440. *Environ Microbiol* 4: 799-808

Newman EI, Bowen HJ (1974) Patterns of Distribution of Bacteria on Root Surfaces. *Soil Biol Biochem* 6: 205-209

Nikata T, Sumida K, Kato J, Ohtake H (1992) Rapid Method for Analyzing Bacterial Behavioral Responses to Chemical Stimuli. *Appl Environ Microbiol.* 58: 2250-2254

Nishimura A, Morita M, Nishimura Y, Sugino Y (1990) A rapid and highly efficient method for preparation of competent *Escherichia coli* cells. *Nucleic Acids Res* 18: 6169

Norlander J, Kempe T, Messing J (1983) Construction of improved M13 vectors using oligodeoxynucleotide-directed mutagenesis. *Gene* 26: 101-106

Nozaki M, Kagamiyama H, Hayaishi O (1963) Crystallization and some properties of metapyrocatechase. *Biochem Biophys Res Commun* 11: 65-69

Ochs MM, Lu C-D, Hancock REW, Abdelal AT (1999) Amino acid-mediated induction of the basic amino acid-specific outer membrane porin OprD from *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol.* 181: 5426-5432

Oxender DL (1972) Membrane transport. *Annu Rev Biochem* 41: 777-814

Ozoline O, Deev A, Arkhipova M (1997) Non-canonical sequence elements in the promoter structure. Cluster analysis of promoters recognized by *Escherichia coli* RNA polymerase. *Nucl. Acids Res.* 25: 4703-4709

Palleroni NJ (1973) Nucleic acid homologies in the genus *Pseudomonas*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 23: 333-339

Palleroni NJ (1986) Taxonomy of *Pseudomonas*. In "The Bacteria". Academic Press. London Vol. X.: 3-

- Palleroni NJ (2003) Prokaryote taxonomy of the 20th century and the impact of studies on the genus *Pseudomonas*: a personal view. *Microbiology* 149: 1-7
- Papes F, Kemper EL, Cord-Neto G, Langone F, Arruda P (1999) Lysine degradation through the saccharopine pathway in mammals: involvement of both bifunctional and monofunctional lysine-degrading enzymes in mouse. *Biochem J* 344: 555-63
- Papes F, Surpili MJ, Langone F, Trigo JR, Arruda P (2001) The essential amino acid lysine acts as precursor of glutamate in the mammalian central nervous system. *FEBS Letters* 488: 34-38
- Park Y-K, Bearson B, Bang SH, Bang IS, Foster JW (1996) Internal pH crisis, lysine decarboxylase and the acid tolerance response of *Salmonella typhimurium*. *Mol Microbiol* 20: 605-611
- Payton CW, Chang YF (1982) delta-1-piperideina-2-carboxylate reductase of *Pseudomonas putida*. *J Bacteriol.* 149: 864-871
- Pearson WR, Lipman DJ (1988) Improved tools for biological sequence comparison. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85: 2444-2448
- Perfetti R, Campbell RJ, Titus J, Hartline RA (1972) Catabolism of pipercolate to glutamate in *Pseudomonas putida*. *J Biol Chem.* 247: 4089-4095
- Popkin PS, Maas WK (1980) *Escherichia coli* regulatory mutation affecting lysine transport and lysine decarboxylase. *J Bacteriol* 141: 485-492
- Pruss B, Markovic D, Matsumura P (1997) The *Escherichia coli* flagellar transcriptional activator flhD regulates cell division through induction of the acid response gene cadA. *J Bacteriol.* 179: 3818-3821
- Rahman M, Clarke PH (1980) Genes and enzymes of lysine catabolism in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Gen Microbiol* 116: 357-369
- Rainey PB (1999) Adaptation of *Pseudomonas fluorescens* to the plant rhizosphere. *Environ Microbiol* 1: 243-257
- Ramos C, Molina L, Molbak L, Ramos JL, Molin S (2000) A bioluminescent derivative of *Pseudomonas putida* KT2440 for deliberate release into the environment. *FEMS Microbiol. Ecol.* 34: 91-102.
- Ramos-Gonzalez MI, Molin S (1998) Cloning, sequencing, and phenotypic characterization of the *rpoS* gene from *Pseudomonas putida* KT2440. *J Bacteriol.* 180: 3421-3431
- Ramos JL, Diaz E, Dowling D, de Lorenzo V, Molin S, O'Gara F, Ramos C, Timmis KN (1994) The behavior of bacteria designed for biodegradation. *Biotechnology (N Y)* 12: 1349-1356
- Ramos JL, Stolz A, Reineke W, Timmis KN (1986) Altered effector specificities in regulators of gene expression: TOL plasmid *xyIS* mutants and their use to engineer expansion of the range of aromatics degraded by bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83: 8467-71
- Ramos JL, Wasserfallen A, Rose K, Timmis KN (1987) Redesigning metabolic routes: manipulation of TOL plasmid pathway for catabolism of alkylbenzoates. *Science* 235: 593-596
- Rao DR, Rodwell VW (1962) Metabolism of pipercolic acid in a *Pseudomonas* Species. I. alpha-aminoadipic and glutamic acids. *J Biol Chem.* 237: 2232-2238
- Rao VV, Pan X, Chang YF (1992) Developmental changes of L-lysine-ketoglutarate reductase in rat brain and liver. *Comp Biochem Physiol B* 103: 221-224

Bibliografía

- Regenhardt D, Heuer H, Heim S, Fernandez DU, Strompl C, Moore ERB, Timmis KN (2002) Pedigree and taxonomic credentials of *Pseudomonas putida* strain KT2440. *Environ Microbiol* 4: 912-915
- Reitz MS, Rodwell VW (1970) Delta-Aminovaleramidase of *Pseudomonas putida*. *J Biol Chem.* 245: 3091-3096
- Revelles O, Espinosa-Urgel M, Molin S, Ramos JL (2004) The davDT operon of *Pseudomonas putida*, involved in lysine catabolism, is induced in response to the pathway intermediate delta-aminovaleric acid. *J Bacteriol* 186: 3439-3446
- Rheinwald JG, Chakrabarty AM, Gunsalus IC (1973) A transmissible plasmid controlling camphor oxidation in *Pseudomonas putida*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 70: 885-889
- Rius N, Demain AL (1997) Lysine epsilon-aminotransferase, the initial enzyme of cephalosporin biosynthesis in actinomycetes. *J Microbiol Biotechnol* 7: 95-100
- Rodriguez-Herva JJ, Reniero D, Galli E, Ramos JL (1999) Cell envelope mutants of *Pseudomonas putida*: physiological characterization and analysis of their ability to survive in soil. *Environ Microbiol* 1: 479-488
- Rojo F, Pieper DH, Engesser KH, Knackmuss HJ, Timmis KN (1987) Assemblage of ortho cleavage route for simultaneous degradation of chloro- and methylaromatics. *Science* 238: 1395-1398
- Rosen BP (1973) Basic amino acid transport in *Escherichia coli*: properties of canavanine-resistant mutants. *J Bacteriol* 116: 627-635
- Rosen BP (1971) Basic amino acid transport in *Escherichia coli* (1971) *J Biol Chem.* 246: 3653-3662
- Rosen BP Basic amino acid transport in *Escherichia coli*. II. Purification and properties of an arginine-specific binding protein (1973) *J Biol Chem.* 248: 1211-1218
- Ross W, Gosink KK, Salomon J, Igarashi K, Zou C, Ishihama A, Severinov K, Gourse RL (1993) A third recognition element in bacterial promoters: DNA binding by the alpha subunit of RNA polymerase. *Science* 262: 1407-1413
- Rothstein M (1965) Intermediates of lysine dissimilation in the yeast, *Hansenula saturnus*. *Arch Biochem Biophys* 111: 467-476
- Rovira AD (1969) Plant root exudates. *Bot. Rev* 35: 35-57
- Sabine Epelbaum, Raymond McDevitt, S. Carl Falco (1997) Lysine-ketoglutarate reductase and saccharopine dehydrogenase from *Arabidopsis thaliana*: nucleotide sequence and characterization. 35: 735-748
- Sabo DL, Boeker EA, Byers B, Waron H, Fischer EH (1974) Purification and physical properties of inducible *Escherichia coli* lysine decarboxylase. *Biochemistry* 13: 662-670
- Samartzidou H, Delcour AH (1999) Excretion of endogenous cadaverine leads to a decrease in porin-mediated outer membrane permeability. *J Bacteriol.* 181: 791-798
- Samartzidou H, Mehrazin M, Xu Z, Benedik MJ, Delcour AH (2003) Cadaverine inhibition of porin plays a role in cell survival at acidic pH. *J Bacteriol.* 185: 13-19
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) *Molecular cloning: a laboratory manual*. Gold Spring Harbor Laboratory Press. New York
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74: 5463-5467

- Saurin W, Dassa E (1994) Sequence relationships between integral inner membrane proteins of binding protein-dependent transport systems: Evolution by recurrent gene duplications. *Protein Sci* 3: 325-344.
- Schmidhauser TJ, Helinski DR (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
- Schutgens RB, Heymans HS, Wanders RJ, van den Bosch H, Tager JM (1986) Peroxisomal disorders: a newly recognised group of genetic diseases. *Eur J Pediatr* 144: 430-440
- Schweet RS, Holden JT, Lowy PH (1954) The metabolism of lysine in *Neurospora*. *J Biol Chem*. 211: 517-529
- Seep-Feldhaus AH, Kalinowski J, Pühler A. (1991) Molecular analysis of the *Corynebacterium glutamicum lysi* gene involved in lysine uptake. *Mol Microbiol*. 5: 2995-3005
- Shaw JJ, Dane F, Geiger D, Kloepper JW (1992) Use of bioluminescence for detection of genetically engineered microorganisms released into the environment. *Appl Environ Microbiol* 58: 267-273
- Shi X, Waasdorp B, Bennett G (1993) Modulation of acid-induced amino acid decarboxylase gene expression by *hns* in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*. 175: 1182-1186
- Soda K, Moriguchi M (1969) Crystalline lysine decarboxylase. *Biochem Biophys Res Commun* 34: 34-39
- Soda K, Yonaha K, Misono H (1974) Purification and crystallization of D-amino acid aminotransferase of *Bacillus sphaericus*. *FEBS Lett* 46: 359-363
- Sodek L, Wilson CM (1970) Incorporation of leucine-14C and lysine-14C into protein in the developing endosperm of normal and opaque-2 corn. *Arch Biochem Biophys* 140: 29-38
- Spaink HP, Okker RJH, Wijffelman CA, Pees E, Lugtenberg BJJ (1987) Promoters in the Nodulation Region of the Rhizobium-Leguminosarum Sym Plasmid Prl1ji. *Plant Mol Biol* 9: 27-39
- Stanier RY, Palleron NJ, Doudoroff M (1966) The aerobic pseudomonads: a taxonomic study. *J Gen Microbiol*. 43: 159-271
- Steffes C, Ellis J, Wu J, Rosen BP (1992) The *lysP* gene encodes the lysine-specific permease. *J Bacteriol* 174: 3242-3249
- Stover CK, Pham XQ, Erwin AL, Mizoguchi SD, Warrenner P, Hickey MJ, Brinkman FS, Hufnagle WO, Kowalik DJ, Lagrou M, Garber RL, Goltry L, Tolentino E, Westbrook-Wadman S, Yuan Y, Brody LL, Coulter SN, Folger KR, Kas A, Larbig K, Lim R, Smith K, Spencer D, Wong GK, Wu Z, Paulsen IT, Reizer J, Saier MH, Hancock RE, Lory S, Olson MV (2000) Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PA01, an opportunistic pathogen. *Nature* 406: 959-964
- Sundin P, Valeur A, Olsson S, Odham G (1990) Interactions between bacteria-feeding nematodes and bacteria in the rape rhizosphere: effects on root exudation and distribution of bacteria. *FEMS Microbiol Ecol*. 73: 13-22
- Svenningsson H, Sundin P, Liljenberg C (1990) Lipids, carbohydrates and amino-acids exuded from the axenic roots of rape seedlings exposed to water-deficit stress. *Plant Cell Environ* 13: 155-162
- Sychrova H, Chevallier MR (1993) Cloning and sequencing of the *Saccharomyces cerevisiae* gene LYP1 coding for a lysine-specific permease. *Yeast* 9: 771-782
- Szyperski T (1995) Biosynthetically directed fractional 13C-labeling of proteinogenic amino acids. An efficient analytical tool to investigate intermediary metabolism. *Eur J Biochem* 232: 433-448

Bibliografia

- Szyperski T (1998) ^{13}C -NMR, MS and metabolic flux balancing in biotechnology research. Q Rev Biophys 31: 41-106
- Tabor CW, Tabor H (1985) Polyamines in microorganisms. Microbiol Rev 49: 81-99
- Tabor H, Hafner EW, Tabor CW (1980) Construction of an *Escherichia coli* strain unable to synthesize putrescine, spermidine, or cadaverine: characterization of two genes controlling lysine decarboxylase. J Bacteriol 144: 952-956
- Takatsuka Y, Yamaguchi Y, Ono M, Kamio Y (2000) Gene cloning and molecular characterization of lysine decarboxylase from *Selenomonas ruminantium* delineate its evolutionary relationship to ornithine decarboxylases from eukaryotes. J Bacteriol. 182: 6732-6741
- Takayuki Nishijyo, Seung-Moon Park, Chung-Dar Lu, Yorhifumi Itoh, Ahmed T. Abdelal. (1998) Molecular characterization and regulation of an operon encoding a system for transport of arginine and ornithine and the ArgR regulatory protein in *Pseudomonas aeruginosa*. J Bacteriol. 180: 5559-5566
- Tam R, Saier MH Jr (1993) Structural, functional, and evolutionary relationships among extracellular solute-binding receptors of bacteria. Microbiol Rev 57: 320-46
- Tan Y, Xu M, Tan X, Tan X, Wang X, Saikawa Y, Nagahama T, Sun X, Lenz M, Hoffman RM (1997) Overexpression and large-scale production of recombinant L-methionine-alpha-deamino-gamma-mercaptomethane-lyase for novel anticancer therapy. Protein Expr Purif 9: 233-245
- Tang G, Miron D, Zhu-Shimoni JX, Galili G (1997) Regulation of lysine catabolism through lysine-ketoglutarate Reductase and Saccharopine Dehydrogenase in Arabidopsis. Plant Cell 9: 1305-1316
- Tang G, Zhu X, Tang X, Galili G (2000) A novel composite locus of *Arabidopsis* encoding two polypeptides with metabolically related but distinct functions in lysine catabolism. Plant J 23: 195-203.
- Thomas GH, Haslam RH, Batshaw ML, Capute AJ, Neidengard L, Ransom JL (1975) Hyperpipecolic acidemia associated with hepatomegaly, mental retardation, optic nerve dysplasia and progressive neurological disease. Clin Genet 8: 376-382
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ (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
- Tombolini R, van der Gaag DJ, Gerhardson B, Jansson JK (1999) Colonization pattern of the biocontrol strain *Pseudomonas chlororaphis* MA 342 on barley seeds visualized by using green fluorescent protein. Appl Environ Microbiol. 65: 3674-3680
- Toyota K, Kimura M (1993) Colonization of chlamydospores of *Fusarium oxysporum* F Sp raphani by soil bacteria and their effects on germination. Soil Biol Biochem 25: 193-197
- Trias J, Nikaido H. (1990) Protein D2 channel of the *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane has a binding site for basic amino acids and peptides*. J Biol Chem. 265: 15680-15684.
- Turner DC, Stadtman TC (1973) Purification of protein components of the clostridial glycine reductase system and characterization of protein A as a selenoprotein. Arch Biochem Biophys 154: 366-381
- Unge A, Tombolini R, Molbak L, Jansson JK (1999) Simultaneous monitoring of cell number and metabolic activity of specific bacterial population with a dual *gfp-luxAB* marker system. Appl. Environ. Microbiol. 65: 813-821
- Vancura V (1980) *Fluorescent pseudomonads* in the rhizosphere of plants and their relation to root exudates. Folia Microbiol. 25: 168-173

- Vancura V, Stanek M, Hanzlikova A (1969) Effect of seed and root exudates on the growth of *Xanthomonas phaseoli* var. *fuscans*. *Folia Microbiol.* 14: 23-26
- Vianey-Liaud C, Divry P, Poinas C, Mathieu M (1991) Lysine metabolism in man. *Ann Biol Clin (Paris)* 49: 18-26
- Vilchez S, Molina L, Ramos C, Ramos JL (2000) Proline catabolism by *Pseudomonas putida*: cloning, characterization, and expression of the put genes in the presence of root exudates. *J Bacteriol* 182: 91-99
- Vrljic M, Kronemeyer W, Sahn H, Eggeling L (1995) Unbalance of L-lysine flux in *Corynebacterium glutamicum* and its use for the isolation of excretion-defective mutants. *J. Bacteriol.* 177: 4021-4027
- Vrljic M, Sahn H, Eggeling L (1996) A new type of transporter with a new type of cellular function: L-lysine export from *Corynebacterium glutamicum*. *Mol Microbiol* 22: 815-826
- Wanders RJ, Romeyn GJ, van Roermund CW, Schutgens RB, van den Bosch H, Tager JM (1988) Identification of L-pipecolate oxidase in human liver and its deficiency in the Zellweger syndrome. *Biochem Biophys Res Commun* 154: 33-38
- Watson N, Duniak D, Rosey E, Slonczewski J, Olson E (1992) Identification of elements involved in transcriptional regulation of the *Escherichia coli* cad operon by external pH. *J Bacteriol* 174: 530-540
- Wei Z, Sneath B, Beer S (1992) Expression of *Erwinia amylovora* *hrp* genes in response to environmental stimuli. *J Bacteriol* 174: 1875-1882
- Weinel C, Nelson KE, Tumbler B (2002) Global features of the *Pseudomonas putida* KT2440 genome sequence. *Environ Microbiol* 4: 809-818
- Williams PA, Murray K (1974) Metabolism of benzoate and the methylbenzoates by *Pseudomonas putida* (arvilla) mt-2: evidence for the existence of a TOL plasmid. *J Bacteriol* 120: 416-423
- Winans SC (1991) An *Agrobacterium* two-component regulatory system for the detection of chemicals released from plant wounds. *Mol Microbiol* 5: 2345-2350
- Winans SC (1992) Two-way chemical signaling in *Agrobacterium*-plant interactions. *Microbiol Rev* 56: 12-31
- Wissenbach U, Six S, Bongaerts J, Ternes D, Steinwachs S, Uden G (1995) A third periplasmic transport system for L-arginine in *Escherichia coli*: molecular characterization of the *artPIQMJ* genes, arginine binding and transport. *Mol Microbiol* 17: 675-686
- Wittmann C, Hans M, Heinzle E (2002) In vivo analysis of intracellular amino acid labelings by GC/MS. *Anal Biochem* 307: 379-382
- Woese CR, Weisburg WG, Hahn CM, Paster BJ, Zablen LB, Lewis BJ, Macke TJ, Ludwig W, Stackebrandt E (1985) The Phylogeny of Purple Bacteria - the Gamma-Subdivision. *Syst Appl Microbiol* 6: 25-33
- Woody NC (1964) Hyperlinsinemia. *Am J Dis Child* 108: 543-553
- Worsey MJ, Williams PA (1975) Metabolism of toluene and xylenes by *Pseudomonas* (putida) (arvilla) mt-2: evidence for a new function of the TOL plasmid. *J Bacteriol* 124: 7-13
- Wubbolts MG, Timmis KN (1990) Biotransformation of substituted benzoates to the corresponding cis-diols by an engineered strain of *Pseudomonas oleovorans* producing the TOL plasmid-specified enzyme toluate-1,2-dioxygenase. *Appl Environ Microbiol* 56: 569-571
- Yagi T, Yamamoto T, Soda K (1980) A novel purification procedure of L-lysine 6-aminotransferase from

Bibliografia

Flavobacterium lutescense. Biochim Biophys Acta 614: 63-70

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

Yonaha K, Misono H, Yamamoto T, Soda K (1975) D-amino acid aminotransferase of *Bacillus sphaericus*. Enzymologic and spectrometric properties. J Biol Chem. 250: 6983-6989

Yorifuji T, Jeng IM, Barker HA (1977) Purification and properties of 3-keto-5-aminohexanoate cleavage enzyme from a lysine-fermenting *Clostridium*. J Biol Chem. 252: 20-31

Young J, Holland IB (1999) ABC transporters: bacterial exporters-revisited five years on. Biochim Biophys Acta (BBA) - Biomembranes 1461: 177-200

Zacharius RM, Thompson JF, Steward FC (1954) The detection, isolation and identification of L(-)pipecolic acid in the non-protein fraction of beans (*Phaseolus vulgaris*). J Ame Chem Soc 76: 2908-2912

Zhu X, Tang G, Granier F, Bouchez D, Galili G (2001) A T-DNA insertion knockout of the bifunctional lysine-ketoglutarate reductase/saccharopine dehydrogenase gene elevates lysine levels in *Arabidopsis* Seeds. Plant Physiol. 126: 1539-1545

Las bacterias del género *Pseudomonas*, y entre ellas *P. putida* KT2440, colonizan la superficie de la raíz de plantas y el suelo que las rodea, nicho conocido como rizosfera. Se trata de un entorno complejo y de elevada actividad metabólica.

P. putida KT2440 presenta un interés especial tanto por su versatilidad metabólica como por su capacidad para colonizar la rizosfera de plantas a una alta densidad celular, siendo por ello objeto de estudio en este trabajo. Al principio de esta Tesis y con objeto de identificar promotores que se indujeran por exudado de raíz, se aisló un gen (*davT*) que se inducía por L-lisina, un aminoácido muy abundante en exudado de maíz. Dicho gen codificaba una enzima implicada en el catabolismo de lisina.

A través del desarrollo experimental descrito en esta Tesis Doctoral se caracterizan a nivel genético tres rutas de degradación de L-lisina: ruta de la cadaverina, ruta monooxidativa y ruta de la D-lisina. Los genes de dichas rutas se encuentran formando unidades transcripcionales distribuidas a lo largo del cromosoma de *P. putida* KT2440.

La completa degradación del aminoácido L-lisina hasta CO₂ y H₂O requiere del correcto funcionamiento de la ruta monooxidativa y de la ruta de la D-lisina, siendo la ruta de la cadaverina minoritaria.

A lo largo de este trabajo se han identificado dos transportadores de tipo ABC implicados en la captación de L-lisina, uno específico de este aminoácido y otro general de aminoácidos básicos que incluye arginina, lisina y ornitina.

