

CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS

Estación Experimental del Zaidín



UNIVERSIDAD DE GRANADA

FACULTAD DE CIENCIAS

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular



TESIS DOCTORAL

Wilson Terán Pérez

Granada, 2005

REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DEL TRANSPORTADOR TtgABC DE
Pseudomonas putida DOT-T1E.
CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE SU REGULADOR TtgR.

Memoria que presenta el licenciado en Bioquímica, Wilson TERÁN PÉREZ,
para aspirar al título de Doctor en Bioquímica.

Fdo. Wilson Terán Pérez.

Vº Bº Los directores.

Fdo. D. Juan Luis Ramos Martín.
Doctor en Biología
Profesor Investigador del CSIC

Fdo. M^a Trinidad Gallegos Fernández
Doctora en Biología
Investigadora del CSIC.

UNIVERSIDAD DE GRANADA
2005

ISLA

*Aunque estoy a punto de renacer,
No lo proclamaré a los cuatro vientos
Ni me sentiré un elegido:
Sólo me tocó en suerte,
Y lo acepto porque no está en mi mano
Negarme, y sería por otra parte una descortesía
Que un hombre distinguido jamás haría.
Se me ha anunciado que mañana,
A las siete y seis minutos de la tarde,
Me convertiré en una isla,
Islas como suelen ser las islas.
Mis piernas se irán haciendo tierra y mar,
Y poco a poco igual que un andante chopiniano,
Empezarán a salirme árboles en los brazos,
Rosas en los ojos y arena en el pecho.
En la boca las palabras morirán
Para que el viento a su deseo pueda ulular.
Después, tendido como suelen ser las islas,
Miraré fijamente el horizonte,
Veré salir el sol, la luna,
Y lejos ya de la inquietud,
Diré muy bajito:
¿Así que era verdad?*

Virgilio Piñera, 1912 – 1979.

Agradecimientos

En una estancia de varios años en un centro de investigación como la Estación Experimental del Zaidín, siempre son muchas las personas que han contribuido a que esta llegue a su fin, y pocas las palabras que pueda yo escribir en este apartado para expresar toda mi gratitud.

A mis directores de Tesis, María Trinidad Gallegos Fernández y Juan Luis Ramos Martín, hago presente mis sinceros agradecimientos por permitirme realizar este trabajo bajo su dirección científica y por sus provechosos consejos. Recordaré como algo especial, el hecho de haberme recibido en el grupo, tras aquella anecdótica entrevista en el horno San Buenaventura de Sevilla...

A Tino Krell, Manolo Martínez y Silvia Marqués por sus continuas y apasionadas discusiones científicas. Tino por su apoyo y el especial optimismo con que mira cualquier cosa que pueda parecer negativa y bueno, por devolverme a las enredadas discusiones en francés; Manolo, por mirar y buscar siempre ese detalle que nadie había visto, y Silvia por su sinceridad y su inconformismo: ese que alimenta la auto-exigencia.

A Álvaro, por su generosidad y humor, pero sobretodo por hacerme percatar que el mundo científico es una selva peor que la que tenemos en Iquitos...

A los "seniors" Chechu y Jesús M por estar siempre predispuesto a contestar a cualquier duda o pregunta, dejando lo que hacen y siempre con interés.

También un merecido agradecimiento a todos mis compañeros de trabajo, todos han contribuido de alguna manera a que el día día de esta investigación sea más ameno. En especial, gracias a Euge, mi compañera de todos los experimentos y todos los altibajos, a Antonio por su toque gaitano y su teoría de la relatividad, a Dietmar y Vanina por haber logrado sacarme del lab hacia sierra nevada (o casi) en bici y hasta las luces porteñas del tango, a Patri D por entender las cosas sin que tenga que explicarlas. A Miao, Patri B y chica, Javi, Marichu 'prenda', y a todos de los que seguramente me olvido: gracias por compartir horas de trabajo, pases de *volley ball*, risas, salidas, tapeos, bodas y algo de "cotilleo".

Una mención también para mis compañeras de laboratorio de los últimos años, Toñi, Raquel y Jessica por aguantarme a diario.

A mis otros compañeros de radiactividad: Lola y Antonio con quien compartí muchas cpm...pero siempre con humor.

A Juanjo y Pepe por su disposición a la hora de asesorarme con el FPLC.

A Xiaodong por haberme recibido en esos dos meses calurosos en Londres y a Cuixang por su inestimable ayuda y largas charlas en algo que se parecía al inglés...

A Munim, por su sonriente apoyo y por recordarme algunas palabras de árabe.

Como olvidar a Pedro y Antonio, sin ellos los fines de semanas y festivos en los que tocaba venir al laboratorio no hubiesen sido igual.

A la memoria de Gilberto por ese primer desayuno en *La pajuana*, y esos primeros consejos de "toreo"...

También gracias a Mai, Carmen, Inés y Mosi por sus atenciones.

Por último un agradecimiento muy especial a mi familia de aquí, de Francia y de Colombia por su constante apoyo y por estar siempre de mi lado.

Pero sin duda si debo agradecer a una sólo persona el hecho de estar hoy escribiendo estas líneas, esa persona sería Mónica: gracias por esa mirada de confianza que siempre has depositado en mí, y por aguantarme todo este tiempo: esta tesis es también tuya.

Granada, Mayo 2005.

*A Balito,
a tía Teresita,
y a la fuerza de su cariño y sus vidas
siempre los recordaré.*

CONTENIDO	ix.
ABREVIATURAS	xii.
RELACIÓN DE TABLAS Y FIGURAS	xv.
INTRODUCCIÓN	p. 3.
OBJETIVOS	p. 31.
MATERIALES Y MÉTODOS	p. 35.
1. Estirpes bacterianas	p. 35.
2. Medios de cultivo y condiciones de crecimiento	p. 36.
2.1. Medios	p. 36.
2.2. Antibióticos y sales metálicas	p. 37.
3. Plásmidos	p.37.
4. Ensayos <i>in vivo</i>	p.41.
4.1. Resistencia a antibióticos	p. 41.
4.2. Ensayos de transporte <i>in vivo</i> por fluorescencia	p. 42.
4.3. Ensayo enzimático de la β -galactosidasa	p. 43.
5. Técnicas de manipulación de ADN	p. 44.
5.1. Aislamiento de ADN total	p. 45.
5.2. Aislamiento de ADN plasmídico	p. 45.
5.3. Electroforesis de ADN	p. 45.
5.4. Aislamiento de fragmentos de ADN de geles de agarosa	p. 45.
5.5. Reacción de amplificación en cadena con ADN polimerasa termorresistente (PCR)	p. 46.
5.6. Secuenciación de ADN	p. 47.
5.7. Transformación bacteriana	p. 47.
5.7.1. Transformación por choque térmico	p. 47.
5.7.2. Electroporación	p. 48.
5.8. Otras técnicas de manipulación de ADN	p. 49.
6. Técnicas de manipulación de ARN	p. 49.
6.1. Aislamiento de ARN	p. 49.
6.2. Aislamiento de ARN	p. 50.
6.3. Determinación de la concentración de ARN totales	p. 50.
6.4. Extensión reversa de cebador	p. 51.
6.4.1. Marcaje de cebadores	p. 51.
6.4.2. Hibridación y extensión reversa de cebador	p. 51.
6.4.3. Separación de las cadenas de ADNc mediante electroforesis	p. 52.
6.5. Extensión reversa y amplificación del ADNc con ADN polimerasa termoresistente (<i>RT-PCR</i>)	p. 53.
7. Purificación y análisis de proteínas	p. 54.
7.1. Sobreexpresión de proteínas	p. 54.
7.2. Cromatografía de proteínas	p. 54.
7.2.1. Cromatografía de proteínas	p. 55.
7.2.2. Cromatografía de afinidad en columna de heparina	p. 55.

7.2.3. Cromatografía de exclusión molecular	p. 56.
7.3. Electroforesis de proteínas	p. 57.
7.3.1. Electroforesis de proteínas en gel de poliacrilamida en condiciones no desnaturizantes	p. 57.
7.3.2. Electroforesis desnaturizante en gel de poliacrilamida en presencia de SDS (SDS- PAGE)	p. 57.
7.3.3. Tinción de proteínas con azul de Coomassie	p. 58.
7.3.4. Tinción de proteínas con plata	p. 58.
7.4. Determinación de la concentración en proteínas	p. 58.
8. Ensayos de retardo en gel	p. 59.
9. Ensayos de impronta <i>in vitro</i> (footprint)	p. 60.
9.1. <i>Footprint</i> de protección contra ADNasaI	p. 61.
9.2. <i>Footprint</i> de protección contra metilación por dimetil sulfato (DMS)	p. 61.
9.3. <i>Footprint</i> de protección contra radicales hidroxilos (OH [·])	p. 62.
9.4. Ensayo llamado del “nucleósido faltante” o <i>Missing nucleoside footprint</i>	p. 62.
10. Ultracentrifugación analítica por velocidad de sedimentación.	p. 63.
11. Calorimetría de titulación isotérmica	p. 65.
RESULTADOS	p. 69.
CAPÍTULO I. CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL <i>IN VIVO</i> DEL SISTEMA TtgABC-TtgR DE <i>P. putida</i> DOT-T1E.	p. 73.
1. Caracterización funcional de la bomba TtgABC como elemento de resistencia múltiple a antibióticos y agentes antimicrobianos	p. 73.
2. Estudio y caracterización de los promotores <i>PttgABC</i> y <i>PttgR</i>	p. 77.
2.1. Organización génica de los genes <i>ttgABC</i> en operón	p. 77.
2.2. Expresión <i>in vivo</i> del operón <i>ttgABC</i> y del gen regulador <i>ttgR</i> en respuesta a disolventes y antibióticos	p. 79.
2.3. Actividad de los promotores <i>P_{ttgABC}</i> y <i>P_{ttgR}</i> en función de la fase de crecimiento	p. 83.
2.4. Identificación de factores sigma implicados en la transcripción de los genes <i>ttgABC</i> y <i>ttgR</i> .	p. 85.
2.5. Efecto de diversos tipos de estrés sobre la expresión del operón <i>ttgABC</i> .	p. 88.
2.6. Identificación de nuevos tipos de inductores de la expresión de los genes <i>ttgABC-ttgR</i> .	p. 89.
3. Transporte a través de la bomba TtgABC.	p. 94.
CAPÍTULO II. CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL <i>IN VITRO</i> DEL REPRESOR TtgR.	p. 99.
1. Análisis computacional de la proteína TtgR.	p. 99.
2. Purificación de la proteína TtgR.	p. 102.

2.1. Sobre-expresión y purificación de las proteína TtgR-His y TtgR.	p. 102.
2.2. Purificación de la proteína TtgR-His.	p. 103.
2.3. Purificación de la proteína TtgR nativa.	p. 104.
3. Estado de oligomerización de TtgR.	p. 106.
4. Caracterización funcional de la unión de TtgR al ADN.	p 108.
4.1. Unión específica de TtgR a la región intergénica <i>ttgR-ttgABC</i> .	p. 109.
4.2. Determinación del sitio de unión de TtgR en la zona intergénica <i>ttgABC-ttgR</i>	p. 110.
4.3. Elementos determinantes en el operador para la unión y reconocimiento por TtgR.	p. 114.
4.4. Estequiometría de unión al ADN.	p. 119.
4.5. Microcalorimetría de la unión de TtgR a su operador.	p. 124.
5. Caracterización funcional de la unión de TtgR a sus efectores.	p. 129.
5.1. Identificación de efectores.	p. 129.
5.2. Caracterización bioquímica de la unión a efectores.	p. 133.
5.2.1. Microcalorimetría de la unión de TtgR a múltiples efectores.	p. 133.
5.2.2. Unión simultánea de dos efectores.	p. 139.
5.2.3. Unión de efectores a la proteína TtgR unida a su operador.	p. 140.
6. Competición con la ARN polimerasa por la región promotora.	p. 143.
DISCUSIÓN	p. 149
CONCLUSIONES	p. 171.
BIBLIOGRAFÍA	p. 175.
APENDICES	p. 190.

Abreviaturas

ADN	ácido desoxiribonucleico
ADNasa	desoxiribonucleasa
ADNc	ADN complementario
Ap	ampicilina
Api	apigenina
ARN	ácido ribonucleico
ARNasa	ribonucleasa
ARNt	ARN de transferencia
ATP	adenosina trifosfato
BrEt	bromuro de etidio
Cb	carbenicilina
CIM	concentración inhibitoria mínima
Cou	coumestrol
Cm	cloramfenicol
cpm	cuentas por minuto
ΔG	energía libre de Gibbs
ΔH	entalpía
ΔS	entropía
Da	Dalton o g/mol
DEPC	dietil piro carbonato
DMSO	dimetil sulfóxido
dNTPs	desoxinucleótidos trifosfato
DO₆₆₀	Densidad óptica medida a 660 nm de longitud de onda
DTT	di-tiotreitol
EDTA	tetra acetato de etilendiamina
Flo	floretina
Gen	genisteína
Gm	gentamicina
h	hora(s)
H₂O_d	agua destilada
H₂O_{DEPC}	agua destilada tratada con DEPC
HTH	helice-giro-helice
IPTG	isopropil β -D-tio galactopiranosido
ITC	calorimetría de titulación isotérmica
kb	kilobase(s)
K_D	constante de equilibrio de disociación
Km	kanamicina
LB	medio Luria Bertani
Lut	luteolina
MDR	Resistencia múltiple a fármacos

min	minutos
Nal	ácido nalidíxico
Nor	norfloxacina
Nar	naringenina
ONPG	
pb	pares de bases
pBen	butil paraben
PM	Peso molecular
PMA	Peso molecular aparente
P_{ttgABC}	Promotor del operón <i>ttgABC</i>
P_{ttgR}	Promotor del operón <i>ttgR</i>
p/v	peso/volumen
PSA	persulfato amónico
Qrc	quercetina
Rif	Rifampicina
SDS	dodecilsulfato sódico
SDS -PAGE	electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS
seg	segundos
Sm	estreptomicina
sty	estireno
Tc	tetraciclina
tol	tolueno
v/v	volumen/ volumen
wt	cepa silvestre
X-gal	5-bromo 4-cloro 3-indolil β-D- galactopiranosido

Relación de tablas y figuras

Tablas:

Tabla 1. Principales reguladores de bombas MDR en bacterias.	p. 18.
Tabla 2. Estirpes bacterianas.	p. 35.
Tabla 3. Plásmidos.	p. 37.
Tabla 4. Susceptibilidad de la cepa <i>P. putida</i> DOT-T1E y derivadas a agentes antimicrobianos.	p. 74.
Tabla 5. Susceptibilidad de la cepa <i>P. putida</i> DOT-T1E y derivadas a compuestos antimicrobianos de origen vegetal.	p. 76.
Tabla 6. Parámetros termodinámicos de la interacción de TtgR con diferentes fragmentos de ADN operador.	p. 128.
Tabla 7. Parámetros termodinámicos de la interacción de TtgR con distintos efectores.	p. 136.
Tabla 8. Parámetros termodinámicos de la interacción de TtgR con efectores de origen vegetal.	p. 137.
Tabla 9. Parámetros termodinámicos de la interacción de TtgR libre y TtgR unida a su operador con distintos efectores.	p. 142.

Figuras:

Figura 1. Modelo de la organización estructural de una bomba de la familia RND (según Eswaran <i>et al.</i> , 2004).	p. 11.
Figura 2. Detalle de la región intergénica <i>ttgR-ttgA</i> y de las regiones promotoras de <i>ttgR</i> y <i>ttgA</i> .	p. 27
Figura 3. Análisis mediante <i>RT-PCR</i> de la organización transcripcional de los genes colindantes <i>ttgABC</i> en <i>P. putida</i> DOT-T1E.	p. 79.
Figura 4. Expresión de los genes <i>ttgABC</i> y <i>ttgR</i> en la cepa silvestre DOT-T1E en respuesta a disolventes y antibióticos.	p. 80.
Figura 5. Expresión de los genes <i>ttgABC</i> y <i>ttgR</i> en la cepa mutante DOT-T1E13 en respuesta a disolventes y antibióticos	p. 82.
Figura 6. Efecto de la fase de crecimiento sobre la actividad de los promotores P_{ttgABC} y P_{ttgR} de <i>P. putida</i> DOT-T1E.	p.84.
Figura 7. Transcripción desde los promotores P_{ttgABC} y P_{ttgR} en la cepa <i>E. coli</i> UQ285 ($RpoD^{ts}$).	p. 86.
Figura 8. Actividad de P_{ttgABC} y P_{ttgR} en las cepas <i>P. putida</i> KT2440 y C1R1 ($rpoS^-$).	p. 87.
Figura 9. Efectos de diversos tipos de estrés sobre la expresión del operón <i>ttgABC</i> .	p. 89.

Figura 10. Actividad de los promotores P_{ttgABC} y P_{ttgR} en presencia de disolventes aromáticos, antibióticos y metabolitos secundarios de plantas.	p. 92.
Figura 11. Acumulación de bromuro de etidio en células enteras de <i>P. putida</i> DOT-T1E y derivadas.	p. 96.
Figura 12. Predicción de la estructura secundaria de la proteína TtgR.	p. 100.
Figura 13. Contenido en proteínas de las fracciones obtenidas durante la purificación de TtgR-His.	p. 103.
Figura 14. Contenido en proteínas de las fracciones obtenidas durante la purificación de TtgR.	p. 105.
Figura 15. Cromatografía analítica de la proteína TtgR.	p. 107.
Figura 16. Unión específica del represor TtgR a su operador dentro de la región intergénica <i>ttgR-ttgABC</i> .	p. 110.
Figura 17. Determinación del sitio de unión del represor TtgR en las regiones promotoras de los genes <i>ttgA</i> y <i>ttgR</i> .	p. 112.
Figura 18. Caracterización del operador de TtgR por mutagénesis dirigida.	p. 118.
Figura 19. Determinación del peso molecular del complejo represor TtgR –operador.	p. 120.
Figura 20. Ultracentrifugación analítica del complejo TtgR-operador.	p. 123.
Figura 21. Calorimetría de titulación isotérmica (ITC) de la unión de TtgR a diferentes fragmentos de ADN operador.	p. 126.
Figura 22. Identificación de efectores del represor TtgR que promueven su disociación del operador.	p. 130.
Figura 23. Calorimetría de titulación isotérmica de la proteína TtgR con distintos efectores.	p. 135.
Figura 24. Análisis termodinámico de la interacción de TtgR con efectores de origen vegetal estructuralmente relacionados.	p. 138.
Figura 25. Calorimetría de titulación isotérmica (ITC) de la unión de efectores al represor TtgR unido a su operador.	p. 141.
Figura 26. Competición entre el represor TtgR y la ARN-polimerasa por la región promotora del operón <i>ttgABC</i> .	p. 145.
Figura 27. Alineamiento del dominio N-terminal de TtgR con el de sus homólogos TetR y QacR.	p. 161.
Figura 28. Modelización del dominio de unión a ADN del represor TtgR.	p. 162.

INTRODUCCIÓN

1. Versatilidad del género *Pseudomonas*

Las bacterias del género *Pseudomonas* figuran entre las más expandidas en el medio ambiente, ya que es posible encontrarlas en todo tipo de suelos y aguas de distintas latitudes. Están clasificadas filogenéticamente dentro del grupo I de las γ -proteobacterias, como bacilos Gram-negativos quimiorganotróficos aerobios y móviles, con flagelos generalmente polares (Palleroni, 1984). Su peculiar capacidad de crecimiento en medios de cultivo muy simples, ha facilitado y permitido acumular, principalmente en las últimas cuatro décadas, numerosos y profundos estudios, tanto en el ámbito metabólico, como fisiológico y genético, acerca de este amplio grupo taxonómico. Hay que destacar que la “historia” del género *Pseudomonas* está estrechamente ligada a la evolución metodológica de la taxonomía de procariotas. Los estudios taxonómicos del género *Pseudomonas* han permitido validar los criterios fenotípicos de tipo nutricional (Stainer *et al.*, 1966) y posteriormente sentar las bases de la taxonomía molecular moderna basada en el ARNr, (Palleroni, 1973).

Los extensos estudios nutricionales destacaban la particular versatilidad metabólica de los miembros de este género (Stainer *et al.*, 1966), una característica que le otorga un papel protagónico en la mineralización y reciclado de la materia orgánica, tanto de origen biogénico como xenobiótico. El género incluye especies muy diversas, con actividades biológicas dispares, ya que hay cepas estimuladoras del crecimiento de plantas (*P. putida* y *P. fluorescens*), que actúan bien sea por movilización de elementos nutritivos del suelo, o ejerciendo una actividad de biocontrol contra patógenos de plantas (Lugtenberg, 2001); cepas patógenas de plantas (*P. syringae*), o patógenas oportunistas de animales y humanos (*P. aeruginosa*), particularmente implicadas en infecciones nosocomiales. La reciente secuenciación del genoma completo de 3 miembros de este género *P. aeruginosa* PAO1, (Stover *et al.*, 2000); *P. putida*

KT2440, (Nelson *et al.*, 2002); *P. syringae* pv *tomato* DC3000, (Buell *et al.*, 2003), ha abierto nuevos frentes para entender la singular capacidad adaptativa de este género oportunista, con importantes repercusiones, tanto en el ámbito ecológico y agronómico como clínico. Destaca el gran tamaño de sus genomas (entre 6 y 7 x 10⁶ pb), con unos 5500 genes, la mitad de los cuales no tienen función conocida. También destaca su alta proporción de genes reguladores: 450 ORF corresponden a reguladores, con 24 factores de transcripción, 19 de ellos de tipo ECF (*extra cytoplasmic function*) y 55 sensores de sistemas de dos componentes (Nelson *et al.*, 2002; Martínez-Bueno *et al.*, 2002), y el amplio repertorio de sistemas de transporte (más de 300) y porinas, que reflejan la gran capacidad de integración de señales y de adaptación a los cambios medioambientales de estas cepas, y que probablemente sean la explicación de su singular ubicuidad.

P. putida es una especie especialmente reconocida por ser, además de ubicua e inocua, muy versátil catabólicamente. Su potencial catabólico se ha visto corroborado por la extensa batería de rutas y enzimas catabólicos codificados por su genoma (Jiménez *et al.*, 2002; Nelson *et al.*, 2002). Frecuentemente aislada de aguas o suelos contaminados, su capacidad para reciclar tóxicos orgánicos, como hidrocarburos alifáticos y aromáticos ha sido ampliamente estudiada (Gibson *et al.*, 1970; Worsey y Williams, 1975; Shields *et al.*, 1989; Zylstra *et al.*, 1989; Cruden *et al.*, 1992; Van Beilen *et al.*, 1994; Ramos *et al.*, 1995), lo que ha despertado un gran interés biotecnológico tanto para fines de biorremediación (Gibson *et al.*, 1984; Timmis *et al.*, 1988; Ramos *et al.*, 1994), como de biocatálisis (De Smet *et al.*, 1983; Harbron *et al.*, 1986; Whited *et al.*, 1986; Witholt *et al.*, 1990; Aono *et al.*, 1994; Wery *et al.*, 2000; Rojas *et al.*, 2004).

Sin embargo, un factor limitante en la biodegradación de hidrocarburos aromáticos, ya sea en sitios contaminados con altas concentraciones de estos compuestos o a escala industrial en reactores y biofiltros, es su alta e inherente toxicidad. Entre los hidrocarburos aromáticos más tóxicos para los

microorganismos se encuentran los disolventes orgánicos tolueno, benceno, estireno o xilenos, debido a que su acumulación en la membrana citoplasmática, provoca efectos devastadores en la estructura y funciones vitales de ésta (pérdida de iones, metabolitos, lípidos y proteínas; disipación del gradiente protónico y potencial eléctrico; inhibición de proteínas de membrana), que conducen a la lisis celular (De Smet *et al.*, 1978; Sikkema *et al.*, 1995). No obstante, se han aislado y caracterizado varias cepas de *P. putida* por su tolerancia a estos disolventes orgánicos (Inoue y Horikoshi, 1989; Cruden *et al.*, 1992; Aono *et al.*, 1992; Weber *et al.*, 1993; Ramos *et al.*, 1995; Kim *et al.*, 1998; Fukumori *et al.*, 1998; Huertas *et al.*, 1998).

2. Mecanismo de tolerancia a disolventes orgánicos en bacterias.

La tolerancia de las bacterias a disolventes orgánicos ha sido muy estudiada en los últimos 15 años y se han propuesto varios mecanismos para explicar este fenómeno de gran interés biotecnológico (Ramos *et al.*, 2002). Los más significativos son por un lado la modificación de la composición lipídica de la membrana celular, que tiende a una mayor rigidificación, impidiendo parcialmente la penetración de los disolventes, y por otro la expulsión del disolvente orgánico mediante un proceso dependiente de energía en el que intervienen bombas o transportadores.

2.1. Modificaciones adaptativas de los lípidos de membrana.

Los disolventes orgánicos atraviesan rápidamente la envoltura celular de las bacterias Gram-negativas, acumulándose en la membrana citoplasmática, lo que provoca un aumento de la fluidez de ésta. Esto desencadena una respuesta compensatoria de la bacteria que incluye una rápida e inmediata isomerización *cis* a *trans* de los ácidos grasos insaturados (Keweloh *et al.*, 1990; Heipieper *et al.*, 1992; Weber *et al.*, 1994; Pinkart *et al.*, 1996; Junker y Ramos, 1999), acompañada de un cambio de los grupos de cabeza de los fosfolípidos de membrana (Weber

y de Bont, 1996). A más largo plazo se producen cambios en el grado de insaturación de los ácidos grasos a favor de los saturados y un aumento de la velocidad de síntesis de fosfolípidos (Pinkart y White, 1997). Cabe anotar que algunas de estas modificaciones no son específicas de disolventes orgánicos ya que ocurren en respuesta a otros agentes de estrés de membrana como alcoholes, temperatura o sales (Cronan *et al.*, 1968; Hamamoto *et al.*, 1994; Suutari y Laakso, 1994; Heipieper *et al.*, 1996; Keweloh y Heipieper, 1996).

2.2. Expulsión activa del disolvente por bombas.

La expulsión activa de disolventes orgánicos por bombas es el recurso más efectivo y determinante en la tolerancia de bacterias a estos compuestos. La primera evidencia de la implicación de un proceso dependiente de energía en la expulsión de disolventes orgánicos en bacterias, llegaba con los trabajos de Isken y de Bont (1996) y posteriormente de Ramos y colaboradores (1997), en las cepas tolerantes a disolventes *P. putida* S12 y DOT-T1E respectivamente. Posteriormente, se identificaron genéticamente diferentes transportadores, tras el aislamiento de mutantes sensibles a tolueno en las cepas *P. putida* S12 (Kieboom *et al.*, 1998); *P. putida* DOT-T1E (Ramos *et al.*, 1998), *P. putida* KT2442 (Fukumori *et al.*; 1998), y *P. putida* GM73 (Kim *et al.*, 1998), lo que confirmó la existencia de bombas de expulsión de disolventes orgánicos, y las definió como el mecanismo clave en la tolerancia a estos compuestos.

Al mismo tiempo se demostraba, en la cepa *Escherishia coli* K12, que la bomba de resistencia múltiple a antibióticos (MDR, *Multiple Drug Resistance*) AcrAB estaba implicada en la tolerancia intrínseca de esta cepa a disolventes orgánicos (White *et al.*, 1997; Aono, 1998), y que las también bombas de tipo MDR, MexAB-OprM, MexCD-OprJ y MexEF-OprN de *P. aeruginosa* eran capaces de expulsar disolventes orgánicos (Li *et al.*, 1998). Estos trabajos establecían por primera vez que disolventes orgánicos y antibióticos eran expulsados por un mismo transportador MDR, poniendo de manifiesto que la

resistencia bacteriana a múltiples antibióticos y la tolerancia a disolventes compartían un mismo mecanismo y determinante genético, una conexión que Aono y colaboradores habían vislumbrado unos años antes (Aono *et al.*, 1991 y 1995). De la misma manera, las bombas de expulsión de disolventes, de las cepas de *P. putida* DOT-T1E y KT2442 respectivamente, TtgABC (*toluene tolerance gene*) y MepABC (*multidrug efflux pump*), resultaron estar implicadas también en resistencia a múltiples antibióticos (Ramos *et al.*, 1998; Fukumori *et al.*, 1998). Además, el aislamiento de un mutante de *P. aeruginosa* tolerante a disolventes orgánicos, que mostraba un marcado aumento de su resistencia múltiple a antibióticos, debido a una desrepresión en la expresión de la bomba MexAB-OprM (Li y Poole, 1999), corroboraba que la tolerancia a disolventes era principalmente mediada por bombas MDR, caracterizadas por su amplia especificidad de sustrato.

Posteriormente, en este grupo de investigación, se identificaron otras dos bombas de expulsión de disolventes orgánicos en la cepa *P. putida* DOT-T1E, TtgDEF (Mosqueda y Ramos, 2000) y TtgGHI (Rojas *et al.*, 2001), que situaban a esta cepa entre las más tolerantes a disolventes orgánicos. Cabe anotar que todas las bombas de expulsión de disolventes orgánicos identificadas hasta ahora en bacterias Gram-negativas, pertenecen a la misma familia de transportadores RND (Resistencia Nodulación División celular) (Saier *et al.*, 1994; Tseng *et al.*, 1999).

3. Transportadores MDR en bacterias.

Los transportadores MDR han despertado un interés creciente en los últimos años, debido a la aparición de numerosas cepas bacterianas resistentes a múltiples antibióticos, convirtiéndose en un serio problema de salud pública. La resistencia bacteriana a antibióticos se describió por primera vez en 1940 en cepas de *E. coli* resistentes a penicilina (Abraham y Chain, 1940), y la transmisión genética de esa resistencia entre bacterias en 1952 (Lederberg y

Lederberg, 1952); pero la implicación de sistemas de transporte en la resistencia bacteriana a antibióticos fue descrita por primera vez en los años 80, con los trabajos pioneros del grupo de Levy y colaboradores sobre los sistemas de transporte Tet en *E. coli* (Mc Murry *et al.*, 1980; Levy, 1992), seguidos por la identificación de los transportadores MDR QacA y Smr en *Staphylococcus aureus* (Tennent *et al.*, 1989; Grinius *et al.*, 1992), Bmr en *Bacillus subtilis* (Neyfakh, 1992), Emr (Lomovskaya *et al.*, 1992) y Acr (Ma *et al.*, 1993) en *E. coli*, y MexAB en *P. aeruginosa* (Poole *et al.*, 1993). Desde entonces, numerosos estudios demostraron que estos sistemas son ubicuos en bacterias y que pueden conferir, no sólo resistencia a distintos antibióticos, sino a una amplia variedad de agentes antimicrobianos estructuralmente diferentes, como biocidas, disolventes orgánicos, detergentes o metales pesados (Lewis *et al.*, 1994; Nikaido, 1994 y 1996; Paulsen *et al.*, 1996 b; van Veen y Konings, 1997; Levy, 2002; Poole, 2001 y 2004; Ramos *et al.*, 2002). Este fenómeno de resistencia cruzada reveló que factores como el uso masivo de antibióticos, ya sea en terapia clínica o en producción agropecuaria, el uso generalizado y creciente de antisépticos y biocidas en productos domésticos de uso cotidiano o el vertido de residuos tóxicos industriales en el medioambiente, contribuyen a crear una presión selectiva de cepas multiresistentes (Witte, 1997; Levy, 2001; Russel, 2002). En este sentido, varios trabajos que describen la selección de cepas con fenotipo MDR, con diferentes tipos de agentes antimicrobianos (disolventes orgánicos o biocidas) demuestran que se puede llegar a seleccionar el mismo tipo de mutaciones causantes de una desrepresión de genes de transportadores MDR (Li y Poole, 1999; Chuanchuen *et al.*, 2001; Sánchez *et al.*, 2005).

Las bombas MDR bacterianas se clasifican en cinco familias: (i) la amplia superfamilia MFS (*Major Facilitator Superfamily*, Pao *et al.*, 1998, Saier *et al.*, 1999), cuyos miembros QacA en *S. aureus* y Bmr en *Bacillus subtilis* (Brown y Skurray, 2001; Neyfakh, 1992) están entre los más caracterizados; (ii) la superfamilia ABC (*ATP Binding Cassette*, Saurin *et al.*, 1999; van Veen *et al.*, 2001); (iii) la familia

SMR (*Small Multidrug Resistance*, Paulsen *et al.*, 1996, a), cuyos miembros constituyen los transportadores más pequeños existentes (~ 100 residuos) como EmrE en *E. coli* y Smr en *S. aureus* (Schuldiner *et al.*, 2001; Grinius *et al.*, 1992); (iv) la familia MATE (*Multidrug And Toxic compound Extrusion*, Brown *et al.*, 1999), representada por el transportador NorM de *Vibrio parahaemolyticus* (Morita *et al.*, 2000), y (v) la superfamilia RND (Resistencia Nodulación y División celular, Tseng *et al.*, 1999), cuyos miembros Acr en *E. coli* y Mex en *P. aeruginosa* son los transportadores MDR mejor caracterizados genética, bioquímica y estructuralmente.

Exceptuando a la familia ABC, que utiliza la hidrólisis del ATP como fuente de energía para el transporte, las demás bombas funcionan como transportadores secundarios, acoplado la expulsión del sustrato a la entrada de un protón o catión (Na⁺). Algunos miembros de las familias MFS, ABC, y RND necesitan para su funcionamiento proteínas accesorias pertenecientes a las familias de proteínas de fusión de membrana (*Membrane Fusion Protein*, MFP; Dinh *et al.*, 1994), y de factores de membrana externa (*Outer Membrane Factor*, OMF; Paulsen *et al.*, 1997).

En bacterias Gram negativas, los miembros de la familia RND son los más relevantes desde el punto de vista clínico (Poole, 2001), ya que poseen la más amplia especificidad de sustrato, además de ser, como se ha señalado previamente, los únicos involucrados en tolerancia a disolventes orgánicos (Ramos *et al.*, 2002). Se han identificado miembros en bacterias oportunistas o patógenas de humanos como *P. aeruginosa*, *E. coli*, *Burkholderia* spp., *Stenotrophomonas maltophilia*, *Neisseria* spp., *Serratia marcescens*, *Klebsiella pneumoniae*, *Campylobacter jejuni*, *Haemophilus influenzae* o *Vibrio cholerae*; en patógenas y simbiontes de plantas como *Erwinia amylovora*, *Agrobacterium tumefaciens* o *Bradyrhizobium japonicum*; o en bacterias del suelo inocuas como *P. putida* o *P. fluorescens* (Poole, 2001 y 2003).

El transportador RND se localiza en la membrana citoplasmática y, se acopla a una proteína o factor de membrana externa (OMF), que se expande en el periplasma creando un canal continuo, de forma que el compuesto tóxico pueda ser expulsado atravesando directamente las dos membranas. Además, una proteína de fusión periplásmica (MFP) permite el acoplamiento físico y funcional entre los dos primeros componentes (Figura 1). Recientemente, se han obtenido las estructura tridimensionales de los tres componentes de este tipo de bomba tripartita: de la proteína OMF TolC (Koronakis *et al.*, 2000), los transportadores AcrB y VceC (Murakami *et al.*, 2002; Pos y Diederichs, 2002; Federici *et al.*, 2005) y la proteína de fusión periplásmica (MFP) MexA (Akama *et al.*, 2004; Higgins *et al.*, 2004). Aunque no todas pertenezcan a la misma bomba, las estructuras han aportado informaciones relevantes sobre el ensamblaje de estos tres componentes, la versatilidad en el perfil de reconocimiento de sustratos y el funcionamiento alostérico de la bomba (Eswaran *et al.*, 2004), informaciones de relación estructura-función que deberían permitir el diseño de nuevos fármacos destinados a inhibir estos transportadores MDR.

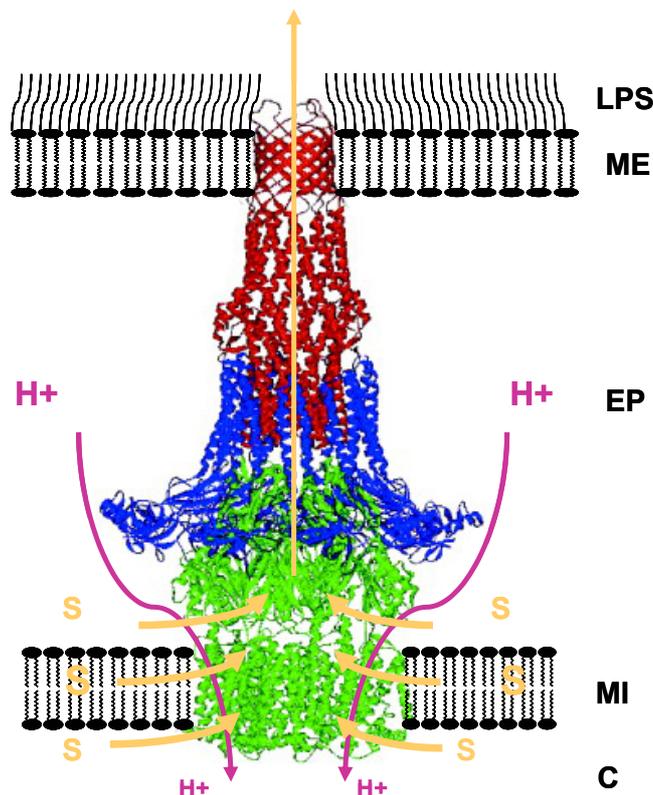


Figura 1. Modelo de la organización estructural de una bomba de la familia RND (según Eswaran *et al.*, 2004).

La bomba está compuesta por tres unidades estructurales: el componente transportador de membrana interna (verde), formado por un trímero que atraviesa la membrana interna con sus 36 segmentos helicoidales transmembrana (12 por monómero) y se expande dentro del espacio periplásmico, hasta contactar con el canal de membrana externa (OMF, en rojo). Éste, también trimérico, forma un verdadero cilindro desde la membrana externa, que atraviesa por medio de una estructura en barril β , expandiéndose a su vez en el espacio periplásmico. Un tercer componente periplásmico (azul), estaría compuesto por 9 monómeros de la proteína de fusión de membrana (MFP), y se encargaría de estabilizar el acoplamiento de los dos primeros componentes.

Los sustratos lipofílicos o anfifílicos (S) se acumulan principalmente en la membrana interna. Dado que el transportador posee un amplia cámara interna con aperturas tanto al citosol como a la membrana interna y al periplasma, se barajan varias hipótesis para la expulsión del sustrato al medio extracelular, pudiendo ser translocado desde el citoplasma, la misma membrana o el periplasma (Elkins y Nikaido, 2003). La energía necesaria a la translocación proviene del gradiente protónico y se lleva a cabo bajo un mecanismo de antiporte sustrato/ H^+ . El esquema está basado en las estructuras tridimensionales del transportador AcrB (Murakami *et al.*, 2002), la porina TolC de *E. coli* (Koronakis *et al.*, 2000) y la proteína de fusión MexA de *P. aeruginosa* (Akama *et al.*, 2004; Higgins *et al.*, 2004). [C, citosol; MI, membrana interna; EP, espacio periplásmico; ME, membrana externa; LPS, lipopolisacárido]. El tamaño de los símbolos H^+ y S reflejan la concentración de protones y sustrato en los diferentes compartimentos celulares.

La entrada en la era genómica de la microbiología con la publicación del genoma de *Haemophilus influenzae* (Fleischmann *et al.*, 1995) y su desarrollo a velocidades vertiginosas, ha permitido identificar numerosos nuevos miembros de estas familias de transportadores MDR, y establecer que estos son ubicuos en bacterias tanto patógenas como inocuas para el hombre. Además los estudios de genómica funcional han señalado que la mayoría de los transportadores MDR, caracterizados o potenciales, tanto en *E. coli* como en *B. subtilis*, se expresan a unos niveles basales detectables (Tao *et al.* 1999; Saier *et al.* 2002) lo que explica la relativa resistencia basal intrínseca de algunas bacterias a muchos agentes antimicrobianos, y sugiere que poseen un papel fisiológico aún por aclarar. Todos estos hechos, junto con la observación de que en las cepas multiresistentes tiene lugar una sobreexposición de sus genes MDR, han fomentado el estudio de la regulación de estos genes de resistencia.

4. Regulación de transportadores MDR bacterianos.

La necesidad de un sistema de regulación, que controle y prevenga la expresión excesiva de transportadores consumidores de fuerza protón motriz, ha sido puesta en evidencia por los efectos perjudiciales ocasionados en caso de una expresión desmesurada (Lee y Edlin, 1985; Nguyen *et al.*, 1989). Con excepción de los transportadores miembros de la familia SMR, cuya expresión parece ser constitutiva, la expresión de la mayoría de las bombas MDR está sometida a algún tipo de regulación. Aunque existen casos aislados de regulación traduccional, la expresión de genes MDR está generalmente controlada a nivel transcripcional. Se ha observado que la expresión de estos genes aumenta en presencia de sustratos de los transportadores, o en ciertas condiciones fisiológicas o medioambientales, con una gran diversidad de mecanismos y niveles de regulación (local o global) (Tabla 1), reflejo de las diferentes funciones celulares en las que pueden estar implicados estos transportadores MDR (Grkovic *et al.*, 2002).

Sin lugar a dudas, el estudio de la regulación de las bombas MDR, es relevante no sólo para descifrar las funciones celulares o fisiológicas de éstas, sino que ofrece, a través de la capacidad de algunos reguladores para reconocer múltiples antibióticos, un sistema más favorable para el estudio íntimo del fenómeno MDR mediante análisis bioquímicos y estructurales, debido a la dificultad de cristalizar proteínas de membrana (Schumacher y Brennan, 2002).

4.1. Regulación local

Casi la totalidad de los genes que codifican bombas MDR cuya expresión está regulado, se encuentran bajo el control de un regulador transcripcional local, ya sea activador o represor, y su gen es generalmente adyacente al gen (o genes) del transportador MDR. Entre estos figuran los extensivamente caracterizados reguladores TetR en *E. coli*, represor del gen del transportador de tetraciclinas *tetA* (Altenbuchner *et al.*, 1983), el activador BmrR del gen *bmr* en *B. subtilis* (Ahmed *et al.*, 1994) o el represor QacR de *S. aureus*, regulador local del gen del transportador *qacA* (Grkovic *et al.*, 1998). Todos ellos han sido cristalizados, tanto en su forma libre como unida a sus respectivos efectores, o a su operador de ADN, perfilándose, no sólo como proteínas modelo en la unión a antibióticos, sino como modelos de regulación transcripcional (Hillen y Berens, 1994; Hinrichs *et al.*, 1994; Kisker *et al.*, 1995; Orth *et al.*, 2000; Zheleznova *et al.*, 1997 y 1999; Heldwein y Brennan, 2001; Schumacher *et al.*, 2001 y 2002, Murray *et al.*, 2004). Ejemplos que reflejan por sí solos, la diversidad de mecanismos que pueden existir en la regulación local de genes de retadores MDR.

4.1.1. El represor TetR.

El represor TetR, que ha dado su nombre a la familia a la que pertenece, ejerce, en ausencia de tetraciclina, una fuerte represión de la transcripción del gen *tetA* y desde su propio gen, ya que ambos promotores son divergentes y

solapantes. TetR se une como dímero a dos operadores palindrómicos (*tetO1* y *tetO2*) de 18 pb cada uno situados entre las regiones -10 y -35 de cada promotor con una estequiometría de unión de un dímero por operador (Meier *et al.*, 1988). La inducción de los genes ocurre tras la unión del complejo tetraciclina-Mg²⁺ a cada monómero de TetR, provocando un cambio conformacional que causa la disociación del represor de su operador, y dejando vía libre a la ARN – polimerasa para transcribir. La altísima afinidad de TetR por su ligando tetraciclina-Mg²⁺ (forma intracelular de este antibiótico), del orden del nanomolar lograda gracias a una extensa red de puentes de hidrógeno entre el efector, y residuos polares del bolsillo (Hinrichs *et al.*, 1994), es otra característica de este sistema, que hace que se induzca la expresión del transportador TetA antes de que el antibiótico logre alcanzar su diana en el ribosoma. Esto ha hecho de este sistema regulador, uno de los mejores candidatos para la expresión controlada de genes de interés (Deuschle *et al.*, 1995; Berens y Hillen, 2003; Mortlock *et al.*, 2003).

4.1.2. El represor QacR

El represor QacR, es el segundo regulador de la familia de reguladores TetR (Aramaki *et al.*, 1995) mejor caracterizado, con un mecanismo global de represión e inducción del gen *qacA* muy similar al de TetR. Las diferencias, no obstante, son importantes, tanto en la unión a su operador, como en la unión a sus efectores: se necesitan dos dímeros de QacR, unidos de forma cooperativa y solapante a una secuencia palindrómica larga de 28 pb, para reprimir la transcripción de *qacA*. A diferencia de TetR, la represión alcanzada no es total, lo cual permite una expresión basal del transportador QacA, y tampoco existe autorregulación negativa por parte de QacR (Grkovic *et al.*, 1998 y 2001). Otra diferencia radica en la capacidad de QacR para unirse a múltiples agentes antimicrobianos de distinta estructura, con estequiometría de unión de un efector por dímero. Dichos efectores incluyen cationes hidrofóbicos sintéticos

(decualinio, bromuro de etidio, rodamina, entre otros) o naturales (berberina), todos sustratos del transportador QacA. Esta capacidad de reconocimiento múltiple es posible gracias a la presencia de un voluminoso bolsillo de unión a efectores, compuesto por dos subsitios distintos pero solapantes, en los que 4 glutamatos y numerosos residuos aromáticos e hidrofóbicos permiten distintas combinaciones de interacción con las cargas positivas y los anillos aromáticos de los efectores. Una vez acomodado en el bolsillo, el efector puede ser estabilizado por puentes de hidrógeno, en los que intervienen algunos residuos polares del bolsillo (Schumacher *et al.*, 2001; Murray *et al.*, 2004).

4.1.3 El activador BmrR.

El activador BmrR fue el primer regulador transcripcional, y por lo tanto la primera proteína soluble, en la que se observó la unión a múltiples agentes antimicrobianos (Markham *et al.*, 1996). Lo que sugirió que esta capacidad no era exclusiva de los transportadores MDR de membrana, abriendo nuevos frentes de investigación con vistas a desentramar un fenómeno tildado de “paradójico”, por su desafío a las bases de la Bioquímica, aún bajo la influencia del modelo “llave-cerradura”. La resolución de la estructura tridimensional de BmrR unida a distintos agentes antimicrobianos constituyó la primera gran contribución al entendimiento de los principios de reconocimiento múltiple de fármacos por parte de una misma proteína (Zheleznova *et al.*, 1999). Este activador homodimérico, miembro de la familia de reguladores MerR, es capaz de reconocer, al igual que QacR, múltiples cationes hidrofóbicos con distintas estructuras. Una vez producida la unión de éstos a sus respectivos bolsillos en la proteína (uno por monómero), el complejo activador se une a una secuencia pseudo-palindrómica de 22 pb situada entre las regiones -10 y -35 del promotor de *bmr*. En ausencia del activador, estas regiones están separadas por 19 pb, lo que provoca que estén situadas en lados opuestos de la doble hélice de ADN, una configuración incompatible con la unión de la ARN polimerasa. La

obtención de la estructura cristalina del complejo tripartito regulador-efector-operador, ha permitido revelar el mecanismo íntimo de activación de los reguladores de esta familia (Heldwein y Brennan, 2001). La unión del complejo activador-efector al operador genera una distorsión importante en el ADN que, acompañada del desapareamiento de un par de bases, tiene como resultado una reducción de la distancia entre -10 y -35 que permite la unión de la ARN polimerasa y la transcripción del gen del transportador MDR.

Por otro lado, aunque los sitios de unión a efectores de BmrR y QacR sean muy diferentes en términos de estructura, tanto secundaria como terciaria, comparten propiedades en la naturaleza de sus bolsillos que determinan su unión al mismo tipo de efectores catiónicos e hidrofóbicos: su flexibilidad, la presencia de residuos aromáticos e hidrofóbicos, y de residuos cargados negativamente. Estas características comunes se perfilan como principios del reconocimiento de múltiples compuestos por una misma proteína.

4.1.4. Otros reguladores locales de bombas MDR.

Aparte de estos tres reguladores aceptados como modelos por su extensa caracterización, se han identificado otros numerosos reguladores locales de sistemas MDR y de sistemas implicados en tolerancia a disolventes orgánicos particularmente en bacterias Gram-negativas, muchos de ellos reguladores de transportadores RND. La diversidad en los mecanismos de regulación se refleja, en un primer análisis, en la diversidad de las familias a las que pertenecen estos reguladores (Tabla 1). Aunque los miembros de la familia TetR sean los más abundantes hasta la fecha, existen otras familias de reguladores asociadas a estos genes de resistencia: MarR, IclR, LysR y LacI/GalR. Además, no existe conexión entre la familia o subfamilia a la que pertenecen el transportador y el respectivo regulador local, como se puede observar en el caso de los transportadores homólogos Mex de *P. aeruginosa* (Tabla 1).

No obstante, la mayoría de los reguladores locales identificados son represores, lo que ha permitido en muchos casos, la aparición de mutaciones en los genes reguladores o en las regiones promotoras donde ejercen su represión, que provocan la sobreexpresión de los genes de los transportadores, causante de un fenotipo de resistencia múltiple adquirida. Estos fenotipos adquiridos por inactivación de un gen represor, se han observado en numerosos casos de transportadores MDR de bacterias patógenas y oportunistas: en los sistemas Acr y Emr de *E. coli* (JellenRitter y Kern, 2001; Wang *et al.*, 2001; Lomovskaya *et al.*, 1995) o sus ortólogos en *Salmonella enterica* o *Klebsiella pneumoniae* (Schneiders *et al.*, 2003; Olliver *et al.*, 2004 y 2005); en el transportador MtrCDE de *N. gonorrhoeae* (Shafer *et al.*, 1995; Lucas *et al.*, 1997); en los sistemas MexAB, MexCD, MexJK, y MexXY de *P. aeruginosa* (Ziha-Sarifi *et al.*, 1999; Adewoye *et al.*, 2002; Poole *et al.*, 1996; Okazaki y Hirai, 1992; Beinlich *et al.*, 2001; Chuanchuen *et al.*, 2002) o SmeDEF de *S. maltophilia* (Alonso y Martínez, 2001; Sánchez *et al.*, 2002 b). También se ha descrito un caso similar de resistencia adquirida a disolventes orgánicos para la bomba SrpABC de la cepa inocua *P. putida* S12 (Wery *et al.*, 2001).

Tabla 1. Principales reguladores de bombas MDR en bacterias.

Organismo	Regulador	Familia ¹	Función	Efector(es) ²	Diana(s)	Familia	Referencias
<i>Acinetobacter baumannii</i>	AdeS- AdeR	S2C	activador	¿?	<i>adeABC</i>	RND	Magnet <i>et al.</i> , 2001
<i>Bacillus subtilis</i>	MtA	MerR	activador	¿?	<i>bmr, blt</i>	MFS	Baranova <i>et al.</i> , 1999
	BmrR	MerR	activador	cationes lipofílicas	<i>bmr</i>	MFS	Markham <i>et al.</i> , 1996
	BltR	MerR	activador	¿?	<i>blt</i>	MFS	Ahmed <i>et al.</i> , 1995
<i>Burkholderia pseudomallei</i>	AmrR	TetR	represor	¿?	<i>amrAB-oprA</i>	RND	Moore <i>et al.</i> , 1999
	BpeR	TetR	represor	¿?	<i>bpeAB-oprB</i>	RND	Chan <i>et al.</i> , 2004
<i>Escherichia coli</i>	AcrR	TetR	represor	¿?	<i>acrAB</i>	RND	Ma <i>et al.</i> , 1993 y 1996
	AcrS	TetR	represor	¿?	<i>acrEF</i>	RND	
	EmrR	MarR	represor	DNP, CCCP, FCCP, BrEt, NaI, salicilato	<i>emrAB</i>	MFS	Lomovskaya <i>et al.</i> , 1995
	MarA, Rob, SoxS	AraC/ XylS	activador global	estrés general	<i>acrAB</i> y <i>tolC</i>	RND	Ma <i>et al.</i> , 1995
	MarR	MarR	activador	DNP, plumbalagina, salicilato,...	<i>acrAB</i> via <i>marA</i>	RND	Aono <i>et al.</i> , 1998
	BaeS-BaeR	S2C	activador	¿?	<i>mdtABCD</i>	RND MFS	Baranova <i>et al.</i> , 2002;
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	EvgS-EvgA	S2C	activador*	¿?	<i>emrKY yhiUV</i>	MFS RND	Nishino y Yamagoshi, 2001 y 2002
	TetR	TetR	represor	Tc	<i>tetA</i>	MFS	Altenbuchner <i>et al.</i> , 1983
	SdiA	LuxR	activador global	QS	<i>acrAB</i>	RND	Rahmati <i>et al.</i> , 2002
	MtrR	TetR	represor*	agentes hidrofóbicos?	<i>mtrCDE</i> <i>farR</i>	RND	Pan y Spratt, 1997
	FarR	MarR	represor	ácidos grasos?	<i>farAB</i>	MFS	Lee <i>et al.</i> , 2003
	MtrA	AraC/ XylS	activador global	agentes hidrofóbicos?	<i>mtrCDE</i> <i>farAB</i>	RND MFS	Rouquette <i>et al.</i> , 1999
	MexR	MarR	represor	¿?	<i>mexAB-oprM</i>	RND	Poole <i>et al.</i> , 1996, b
	NfxB	LacI/ GalK	represor	¿?	<i>mexCD-oprJ</i>	RND	Poole <i>et al.</i> , 1996, a
	MexZ	TetR	represor	¿?	<i>mexXY</i>	RND	Aires <i>et al.</i> , 1999
	MexT	LysR	activador	¿?	<i>mexEF-oprN</i>	RND	Kohler <i>et al.</i> , 1999
<i>Pseudomonas putida</i>	MexL	TetR	represor	¿?	<i>mexJK</i>	RND	Chuanchen <i>et al.</i> , 2002
	TtgR	TetR	represor	¿?	<i>ttgABC</i>	RND	Duque <i>et al.</i> , 2001
	TtgT	IclR	represor	¿?	<i>ttgDEF</i>	RND	Ramos <i>et al.</i> , 2002
	TtgV	IclR	represor*	disolventes orgánicos	<i>ttgGHI</i>	RND	Rojas <i>et al.</i> , 2003;
	TtgW	TetR	represor truncado	¿?	¿?		Rojas <i>et al.</i> , 2003
	SrpS	IclR	represor	tol, est?	<i>srpABC</i>	RND	Wery <i>et al.</i> , 2001
	SrpR	TetR	represor?		¿?		

Organismo	Regulador	Familia ¹	Función	Efactor(es) ²	Diana(s)	Familia	Referencias
<i>Staphylococcus aureus</i>	ArlS-ArlR	S2C	activador	¿?	<i>norA</i>	MFS	Fournier <i>et al.</i> , 2000
	QacR	TetR	represor	cationes lipofílicos	<i>qacA</i>	MFS	Grkovic <i>et al.</i> , 1998
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	SmeT	TetR	represor	¿?	<i>smeDEF</i>	RND	Sánchez <i>et al.</i> , 2002
	SmeSR	S2C	activador	¿?	<i>smeABC</i>	RND	Li <i>et al.</i> , 2002

¹ Familia a la que pertenece el regulador: S2C, sistema de dos componentes.

² Efactor(es) o en su caso, señales medioambientales que modulen la actividad reguladora: DNP, dinitrofenol; CCCP, carbonil cianida *m*-clorofenilhidrazona; FCCP, carbonil cianida *p*- (trifluorometoxi)fenilhidrazona; BrEt, bromuro de etidio; Nal, ácido nalidíxico, ¿?, desconocido.

* Reguladores locales para los que se ha demostrado capacidad de regulación a distancia de otros genes.

También se han identificado represores por mutagénesis dirigida de los genes adyacentes de varios sistemas MDR. Es el caso, por ejemplo, de los represores de las bombas de expulsión de disolventes orgánicos TtgABC, TtgDEF y TtgGHI de *P. putida* DOT-T1E (Duque *et al.*, 2001; Ramos *et al.*, 2002; Rojas *et al.*, 2003) y del transportador FarAB de *N. gonorrhoeae* (Lee *et al.*, 2003).

En general, los represores descritos (Tabla 1) están codificados por genes situados aguas arriba del operón que regulan y se transcriben divergentemente con respecto a los genes estructurales. Según los casos más estudiados, parecen ejercer su acción represora de forma similar, uniéndose a su operador situado en la región intergénica, obstruyendo el acceso de la ARN-polimerasa a las regiones promotoras de los genes estructurales y, a veces, ejerciendo una autorregulación negativa (Ma *et al.*, 1996; Lucas *et al.*, 1997; Xiong *et al.*, 2000; Evans *et al.*, 2001, Sánchez *et al.*, 2002, b; Rojas *et al.*, 2003; Matsuo *et al.*, 2004). Por otro lado y a pesar de los numerosos casos de reguladores negativos descritos, se dispone de poca información sobre los mecanismos de inducción y los efectores que modulan su actividad (Tabla 1). El represor EmrR de *E. coli* constituye una excepción ya que, se ha caracterizado por su capacidad de unión a múltiples efectores, asemejándose a BmrR y QacR.

Descubrimientos recientes señalan que la función de estos reguladores puede salirse de su marco local. Este es el caso del represor MtrR de *N.*

gonorrhoeae: si bien aparece como regulador local de los genes *mtrCDE*, se ha demostrado que también regula positivamente y a distancia otro operón de genes de resistencia, *farAB*. Esta regulación positiva se consigue de manera indirecta, a través de su acción represora sobre la expresión del también regulador negativo FarR (Lee *et al.*, 2003). Otro caso muy reciente es la aparente regulación cruzada entre dos de los tres sistemas de expulsión de disolventes orgánicos de *P. putida* DOT-T1E (Segura *et al.* 2003). Así pues, no queda descartado que otros reguladores clasificados como locales puedan ejercer una regulación a distancia sobre otros genes MDR.

Aunque minoritariamente, también se han identificado casos de regulación local positiva, ya sea a través de un activador o de sistemas de dos componentes. En estos casos la regulación también sobrepasa el área "local". Así, se ha demostrado en *P. aeruginosa*, que el regulador MexT, no sólo activa la expresión del operón *mexEF-oprN*, sino que regula, también, negativamente la expresión de la porina OprD, tanto a nivel transcripcional como post-transcripcional, con unos mecanismos aún por esclarecer (Köhler *et al.*, 1999). A esto se añade la probable existencia de un gen *mexS*, llamado supresor, que impediría la sobreexpresión de MexT y, por ende, la de los genes de resistencia (Maseda *et al.*, 2000). En *B. subtilis*, se ha descrito un activador transcripcional llamado BltR, que activa la expresión del gen de resistencia *blt* adyacente uniéndose a su región promotora (Ahmed *et al.*, 1995). BltR es homólogo al extensamente caracterizado BmrR de la misma cepa; sin embargo, no se ha logrado identificar sus efectores.

Entre los sistemas de dos componentes caracterizados, se encuentran el sistema ArlS-ArlR de *S. aureus* (Fournier *et al.*, 2002), que controla la expresión del transportador NorA; el sistema SmeS-SmeR de *S. maltophilia* (Li *et al.*, 2002), que controla el operón *smeABC*; el sistema AdeS-AdeR de *Acinetobacter baumannii* (Marchand *et al.*, 2004) que regula los genes *adeABC*; y, por último, los sistemas BaeS-BaeR y EvgS-EvgA de *E. coli*. El regulador de respuesta BaeR

activa la expresión del operón MdtABCD (Baranova *et al.*, 2002; Nagabuko *et al.*, 2002), que contiene los genes de dos transportadores RND (MdtB y MdtC) y de su respectiva y compartida proteína de fusión MdtA, mientras que el gen *mdtD* codifica una bomba de tipo MFS de función desconocida. El segundo sistema EvgS-EvgA regula también dos operones de transportadores pertenecientes a dos familias distintas, cuyos genes están físicamente separados: EmrKY (familia MFS) y YhiUV (familia RND), pero que, casualmente, requieren del mismo canal de membrana externa TolC (Nishino y Yamagoshi, 2001 y 2002). Sin embargo, lo más curioso de este sistema es que también sobrepasa sus funciones locales induciendo hasta 37 genes en *E. coli*, la mayoría de los cuales son genes de resistencia a ácido (Masuda y Church, 2002).

En resumen, una constante en la regulación de las bombas MDR es que su expresión es inducible, independientemente de que exista o no cierta expresión basal. Es decir, parece ser primordial para la célula que estos sistemas no se expresen a altos niveles salvo cuando se requieran sus funciones de bombeo: en determinadas condiciones y en respuesta a determinadas moléculas señal. La otra constante es la enorme diversidad de mecanismos de regulación local, con diferentes grados de complejidad, de modo que existe casi una modalidad única para cada bomba.

4.2. Regulación global

Los anteriores datos mencionados señalaban algunos casos donde reguladores locales de genes de transportadores, también regulaban la expresión de otros operones a distancia. Tal vez el auge de los estudios de genómica funcional, tanto *in vitro* como *in silico*, contribuyan a descubrir funciones adicionales para reguladores descritos como locales, como ha sido el caso para los sistemas EvgS-A o MtrR, o conduzcan a localizar genes MDR ya caracterizados dentro de redes de regulación global. Sin duda, *E. coli* es el organismo donde más se ha estudiado la implicación de reguladores globales

en el control de genes MDR. Tras identificar los genes *acrAB*, Ma y colaboradores (1995) señalaron que este transportador se inducía por distintos tipos de estrés (osmótico, etanólico o la entrada en fase estacionaria) por un proceso independiente del regulador local AcrR (Ma *et al.* 1995 y 1996). Estudios adicionales en cepas que expresaban constitutivamente los reguladores globales MarA, SoxS y Rob (Ma *et al.*, 1995; Miller y Sulavik, 1996; Okusu *et al.*, 1996; Tamaka *et al.*, 1997; White *et al.*, 1997; Alekshun y Levy, 1997) señalaron que el operón *acrAB* estaba controlado por estos reguladores globales, y que era clave tanto en el fenotipo *mar* (*multiple antibiotic resistance*) como en el fenotipo de resistencia a disolventes orgánicos de estas cepas. A su vez, el gen regulador activador global *marA* está controlado localmente por el represor MarR que forma parte del operón *marRAB* (Cohen *et al.*, 1993) y modulado por el regulador accesorio Fis (Martin y Rosner, 1997). MarR es capaz de inducir la expresión de *marA* y por tanto de los genes *acrAB*, al unirse a diversos compuestos antimicrobianos (Alekshun y Levy, 1999). Fis es otro regulador global que modula la actividad transcripcional de promotores en función de las condiciones de crecimiento (Travers *et al.*, 2001). De manera que a través de los reguladores MarR, Rob, SoxS y del modulador Fis, el transportador AcrAB puede estar llamado a responder tanto a la presencia de compuestos deletéreos para la célula, como a condiciones de crecimiento o medioambientales adversas de distinto tipo. Además también se ha demostrado que AcrAB está regulada positivamente por SdiA, una proteína asociada a *quorum sensing* cuya expresión depende de la fase de crecimiento (Rand *et al.*, 2002), y que regula genes involucrados en la división celular (Rahmati *et al.*, 2002), sugiriendo un probable papel de esta bomba en la exportación de señales de *quorum sensing*. En conjunto, la cantidad y diversidad de reguladores globales que controlan el operón *acrAB* en función de un amplio abanico de condiciones, parecen indicar que la función principal del transportador AcrAB-TolC es la expulsión de una

gran variedad de compuestos tóxicos derivados de distintos tipos de estrés o de su propio metabolismo, característicos del hábitat natural hostil de *E. coli*.

En *P. aeruginosa* varios indicios sugieren que algún regulador global controla la expresión de sus numerosas bombas MDR. La inducción de la expresión de la bomba MexAB-OprM en fase estacionaria (Evans *et al.*, 2001; Sánchez *et al.*, 2002a), así como su implicación en el transporte de moléculas señal de *quorum sensing* (Evans *et al.*, 1998; Pearson *et al.*, 1999), y más recientemente, en el transporte de moléculas asociadas a virulencia (Hirakata *et al.*, 2002), son elementos a favor de esta hipótesis y de un probable papel fisiológico de este transportador. El aislamiento de mutantes *nalC* que sobreexpresan los genes *mexAB*, pero que no están afectados ni en el correspondiente regulador MexR, ni en las regiones promotoras correspondientes, han permitido identificar la interrupción de un gen regulador, cuyo producto es un represor de la familia TetR. Este regulador reprimiría la expresión de un operón de dos genes (PA2720-PA371), cuyo producto sería responsable de este fenotipo *nalC* (Cao *et al.*, en preparación; Poole, 2004).

Por último, también se ha detectado la intervención de reguladores globales en otros microorganismos (Tabla 1): en *B. subtilis*, los dos genes de transportadores MDR, *bmr* y *blt*, están controlados por el regulador global Mta; en *N. gonorrhoeae* el operón *mtrCDE* se activa en respuesta al detergente tritón X-103 a través del regulador global MtrA (Shafer *et al.*, 2001).

Por lo tanto, las bombas MDR parecen estar sometidas a diferentes niveles de regulación local y global. Aunque cada bomba parezca estar implicada en una función específica, la existencia de una regulación global y compleja es indicadora de la necesidad de una expresión coordinada de estos sistemas con perfiles de sustrato solapantes, que parece ajustarse a momentos fisiológicos precisos, estrechamente relacionados tanto con el crecimiento como con el entorno medioambiental.

5. Una cepa *P. putida* DOT-T1E tolerante a tolueno

5.1. Identificación de bombas de expulsión de disolventes.

Como se ha mencionado anteriormente, la cepa *P. putida* DOT-T1E fue aislada de una muestra proveniente de una planta de tratamiento de aguas residuales, por su capacidad para utilizar el disolvente orgánico tolueno como fuente de carbono, y para crecer en presencia de altas concentraciones (90 % [v/v]) de este disolvente tóxico (Ramos *et al.*, 1995). En este trabajo se puso en evidencia que la tolerancia a tolueno era un fenómeno inducible, ya que la exposición a bajas concentraciones de este hidrocarburo aromático permitió una viabilidad celular del 100% frente a un choque de tolueno, en contraste con el 0,1 % obtenido cuando las células no preexpuestas. Se pudo establecer, más adelante, que esta tolerancia era debida a la expulsión del disolvente orgánico por medio de una bomba, gracias al aislamiento de un mutante sensible a tolueno por mutagénesis al azar con transposición (Ramos *et al.*, 1998). En esta cepa mutante, *P. putida* DOT-T1E18, el gen interrumpido por el transposón codificaba un transportador de la familia RND (*ttgB*), que se encontraba en un probable operón *ttgABC*, donde *ttgA* codificaba una probable proteína de fusión (MFP) y *ttgC*, un canal de membrana externa (OMF). Las secuencias polipeptídicas deducidas para los productos de estos genes presentaban altas similitudes (entre 58% y 73% de identidad) con las proteínas correspondientes al sistema MexAB-OprM de *P. aeruginosa* y AcrAB-TolC de *E. coli*. Una comparación actualizada de las secuencias de las proteínas TtgA, TtgB y TtgC con proteínas homólogas presentes en las bases de datos SWISSPROT y TREMBL se recoge en la Tabla 2. Cabe destacar que este transportador está presente en varias cepas de *P. putida*, ya que tiene homólogas con un 99% de identidad de secuencia en la cepa *P. putida* S12 (ArpABC, Kieboom *et al.*, 2001), en la cepa *P. putida* KT2442 (MepABC, Fukumori *et al.*, 1998), y está también

presente en el recientemente secuenciado genoma de *P. putida* KT2440 TtgABC, (Nelson *et al.*, 2002).

Los ensayos de viabilidad celular a un choque de tolueno llevados a cabo con la cepa mutante DOT-T1E18, establecieron que el transportador TtgABC tenía una expresión constitutiva, ya que la pérdida de viabilidad celular respecto al silvestre fue mucho más drástica en células no preexpuestas, que en células preexpuestas a tolueno (Ramos *et al.*, 1998). Lo que condujo a creer en la existencia de al menos otra probable bomba de disolventes, inducible por tolueno y responsable del aumento de la viabilidad celular en ese mutante por una preposición a tolueno. También se demostró la implicación de la bomba TtgABC en la resistencia intrínseca de la cepa silvestre, a varios antibióticos como ampicilina, cloramfenicol y tetraciclina, ampliándose su rango de sustratos a otros agentes antimicrobianos.

La hipótesis de la existencia de otras bombas de expulsión de disolventes postulada anteriormente, fue corroborada por la identificación de otros dos transportadores de la familia RND, TtgDEF y TtgGHI, cuya expresión se inducía en presencia de tolueno (Mosqueda y Ramos, 2000; Rojas *et al.*, 2001). Mutantes generados en cada uno de estos transportadores, así como combinaciones de mutantes dobles, y un mutante triple deficiente en las tres bombas, permitieron establecer que las tres bombas participaban en la resistencia a disolventes orgánicos de manera diferente pero complementaria (Rojas *et al.*, 2001). La expresión constitutiva de la bomba TtgABC, le confiere un papel significativo en la resistencia intrínseca a disolventes, mientras que la expresión basal del transportador TtgGHI y su significativa inducción en respuesta a tolueno, lo convierten en el transportador clave en la resistencia intrínseca e inducible de esta cepa a disolvente orgánicos, enmascarando el discreto papel de la bomba TtgDEF, consecuencia de su expresión basal nula, y sus bajos niveles de inducción respecto a TtgGHI (Mosqueda y Ramos, 2000; Rojas *et al.*, 2001). A su vez, de los tres transportadores Ttg, sólo la bomba

TtgABC resultó implicada en la resistencia intrínseca de *P. putida* DOT-T1E a varios antibióticos, convirtiéndola en un candidato de interés para el estudio de la resistencia cruzada xenobióticos/antibióticos.

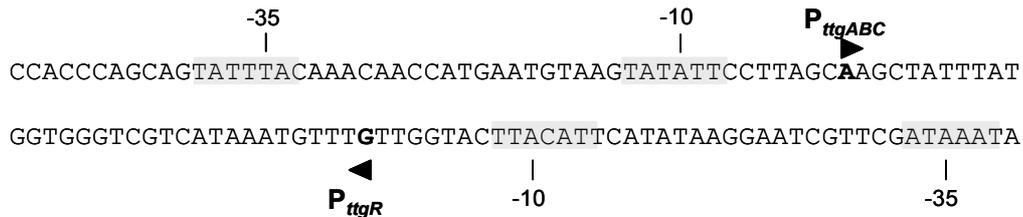
5.2. Regulación transcripcional de las bombas Ttg

El análisis de la secuencia en 5' colindante a los genes estructurales de cada transportador Ttg, permitió la identificación de sus probables genes reguladores. Transcritos de manera divergente respecto a los genes de los transportadores, se identificaron el gen *ttgR* para el sistema *ttgABC* (Duque *et al.*, 2001), el gen *ttgT* para el sistema *ttgDEF* (Segura *et al.*, 2003) y el operón de genes reguladores *ttgVW* para el sistema *ttgGHI* (Rojas *et al.*, 2001). Los genes TtgV y TtgT, miembros de la familia IclR de reguladores transcripcionales, reprimen la expresión de sus correspondientes operones *ttgGHI* (Rojas *et al.*, 2003) y *ttgDEF* (Terán *et al.*, 2005). Sin embargo, no se ha encontrado una función reguladora para la proteína TtgW (Rojas *et al.*, 2003), probablemente porque se trata de una proteína truncaada por inserción de un codón terminador dentro de la secuencia polipeptídica de esta proteína en la cepa silvestre (Segura *et al.*, 2003). La fuerte identidad entre TtgT y TtgV en su secuencia polipeptídica (63%), así como la existente entre las regiones promotoras de los respectivos operones que controlan, sugirió la posibilidad de una regulación cruzada de los operones *ttgDEF* y *ttgGHI* por parte de estos dos reguladores, hecho que ha sido confirmado recientemente (Terán *et al.*, 2005).

Respecto al primer sistema identificado, Duque *et al.*, 2001, señalaron que los genes *ttgABC* se expresaban con un cierto nivel basal que disminuía en respuesta a la presencia de tolueno en el medio de cultivo. Mientras la expresión del gen *ttgR* aumentaba entre 4 y 8 veces en respuesta al disolvente aromático. Al mismo tiempo, se determinaron los sitios de inicio de la transcripción de los genes *ttgR* y *ttgA* revelando que estaban separados por sólo 29 pb, y que ambos promotores divergentes solapaban en sus regiones -10 y -35

(Figura 2). Tras analizar las secuencias de estas dos regiones promotoras se comprobó que exhibían cierto grado de similitud con el consenso establecido para promotores reconocidos por el factor σ^{70} , especialmente en las regiones -10 (Duque *et al.*, 2001, Figura 2).

A



B

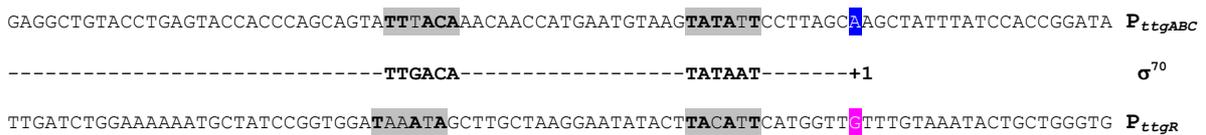


Figura 2. Detalle de la región intergénica *ttgR-ttgA* y de las regiones promotoras de *ttgR* y *ttgA*.

A. Secuencia de la región intergénica *ttgR-ttgA* en la que figuran los puntos de inicio de la transcripción de los promotores divergentes P_{ttgA} y P_{ttgR} (triángulos) y sus respectivas regiones -10 y -35 (Duque *et al.*, 2001).

B. Alineamiento de las secuencias correspondientes a las regiones -10 y -35 de P_{ttgA} y P_{ttgR} con el consenso de promotores dependientes de σ^{70} (Henge-Aronis, 2002).

Por otra parte, Duque y colaboradores (2001) construyeron un mutante carente del gen regulador *ttgR* (cepa *P. putida* DOT-T1E13), en el que los niveles basales de ARNm del gen *ttgA* aumentaron diez veces, sugiriendo una probable represión transcripcional de los genes del transportador por parte de TtgR. Además los niveles de ARNm de *ttgR* aumentaron en esta cepa mutante, indicando la existencia de autorregulación negativa. El análisis fenotípico *in vivo* de esta cepa mutante DOT-T1E13, manifestó un comportamiento similar a la cepa silvestre en términos de viabilidad celular tras un choque con tolueno. Sin embargo la cepa presentó un aumento en sus niveles de resistencia a varios

antibióticos como ampicilina, tetraciclina, cloramfenicol, debido a la desrepresión de los genes del transportador, corroborando su implicación en resistencia múltiple a antibióticos (Duque *et al.* 2001).

En esta cepa no se detectaron variaciones en los niveles de expresión, tanto basales como inducidos por tolueno, de los operones *ttgDEF* y *ttgGHI* en la cepa mutante, descartándose, así, una probable regulación a distancia de estos genes por parte de TtgR (Duque *et al.*, 2001; Gallegos MT, comunicación personal). La secuencia de la proteína TtgR era similar a la de otras proteínas de la familia de reguladores de TetR (Aramaki *et al.*, 1995), AcrR (Ma *et al.*, 1993), EnvR (Klein *et al.*, 1990); MtrR (Pan y Spratt, 1994) o MexZ (Ramos-Aires y Plesiat, 1999), también involucrados en regulación de bombas (Apéndice 2).

OBJETIVOS

Objetivos:

El objetivo principal de este trabajo es el estudio de la regulación de la expresión del transportador TtgABC de *Pseudomonas putida* DOT-T1E, centrado en la caracterización bioquímica, molecular y funcional del regulador TtgR. Para ello, se fijaron los siguientes objetivos:

1. Caracterización funcional de la bomba TtgABC y de su regulador TtgR *in vivo*.
2. Caracterización molecular de los promotores P_{TtgABC} y P_{TtgR} .
3. Purificación y caracterización bioquímica y funcional de la proteína reguladora TtgR en su unión a ADN y a efectores.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Estirpes bacterianas

Este trabajo se centra en el estudio de los genes *ttgABC-ttgR* de la cepa *Pseudomonas putida* DOT-T1E perteneciente al biovar A de *Pseudomonas putida*. Estos genes están presentes en la cepa *P. putida* KT2440 (99 % de identidad), por lo que también hemos hecho algunos estudios en esta, con la ventaja de poder disponer de la secuencia completa de su genoma (Nelson *et al.*, 2002) en libre acceso (<http://www.ncbi.nih.org>).

Las demás estirpes bacterianas utilizadas incluyen una colección de mutantes de *P. putida* DOT-T1E de interés y distintas cepas de *Escherichia coli* empleadas principalmente como hospedadoras de plásmidos para estudios de regulación o para la expresión de proteínas. La lista de cepas se recoge en la tabla 1.

Tabla 1. Estirpes bacterianas

Estirpe	Genotipo y descripción	Referencia
<i>Escherichia coli</i>		
JM109	<i>recA1 supE44 endA1 hsdR17 gyrA96 (Nal^R) relA1 thi Δ(lac-proAB) F' (traD36 proAB+ lacI^q lacZΔM15)</i> Hospedadora de plásmidos	Yanisch-Perron <i>et al.</i> (1985)
DH5α	<i>recA1 supE44 endA1 hsdR17 gyrA96 (Nal^R) relA1 thi-1 ΔlacUI169 (Φ80 lacZΔM15)</i> Hospedadora de plásmidos	Hanahan (1983)
CC118	Δ (<i>ara-leu</i>) <i>araD ΔlacX74 galE galK phoA20 thi1 rpsE (Sp^R) rpoB (Rif^R) argE recA1</i> Hospedadora para estudios de regulación	Manoil y Beckwith (1985)
UQ285	<i>thi lacZ4 argG75 rpoD285 (Ts)</i> RpoD (σ70) termosensible	Harris <i>et al.</i> (1978) Nakamura <i>et al.</i> (1983)
B834 (DE3)	F- <i>ompT hsdS (r_B m_B) gal dcm met (DE3)</i> Expresión de proteínas	Novagen
<i>Pseudomonas putida</i>		
DOT-T1E	Derivado Rif ^R de DOT-T1	Ramos <i>et al.</i> (1998)
DOT-T1E18	<i>ttgB::phoA</i>	Ramos <i>et al.</i> (1998)
DOT-T1E13	<i>ttgRΩKm</i>	Duque <i>et al.</i> (2001)
DOT-T1E30	<i>ttgDΩTel, ttgHΩSm</i>	Rojas <i>et al.</i> (2001)

DOT-T1E34	<i>ttgB::phoA, ttgDΩTel, ttgHΩSm,</i>	Rojas <i>et al.</i> (2001)
KT2440	Ap ^r , Cm ^r	Franklin <i>et al.</i> (1981)
KT2440 C1R1	<i>rpoS</i>	Ramos-Gonzalez <i>et al.</i> (1998)

2. Medios de cultivo y condiciones de crecimiento

2.1. Medios

Para el crecimiento en las condiciones habituales de laboratorio, las estirpes tanto de *P.putida* como de *E.coli* se cultivaron a 30°C y 37°C respectivamente en medio rico Luria-Bertani (LB) [bactotripton, 10 g; extracto de levadura, 5 g; cloruro sódico, 10 g; H₂O_d, hasta 1 litro tras ajustar a pH 7.0] (Sambrook *et al.*, 1989). Para la preparación de medios sólidos en cajas Petri, se añadió bacto-agar a una concentración final del 1,5% (p/v). Para la sobre-expresión de proteínas en base a su purificación, se utilizó el medio 2xYT [bactotripton, 16 g; extracto de levadura, 10 g; cloruro sódico, 5 g; H₂O_d, hasta 1 litro tras ajustar a pH 7.0] (Sambrook *et al.*, 1989). El medio SOC (Sambrook *et al.*, 1989) se utilizó ocasionalmente para el crecimiento de cepas recién electroporadas (véase apartado 5.7.2 de ésta sección).

Los medios tanto líquidos como sólidos se esterilizaron en autoclave a 115°C y 1 atmósfera de presión durante 20 minutos.

2.2. Antibióticos y sales metálicas

Los antibióticos, al igual que la sal potásica de telurito, se prepararon en soluciones mil veces concentradas en agua destilada (H₂O_d), excepto el cloramfenicol que se preparó en etanol, y la rifampicina y tetraciclina que se disolvieron en metanol. Las soluciones preparadas en agua se esterilizaron por filtración y se almacenaron en pequeñas alícuotas a -20°C.

Los antibióticos se usaron a las siguientes concentraciones finales (µg/ml): ácido nalidíxico 10; ampicilina 100; cloramfenicol 30; estreptomicina 50; kanamicina 25; rifampicina 10; tetraciclina 10. El telurito potásico se empleó a una concentración final de 15 µg/ ml.

3. Plásmidos

Las características principales de los plásmidos utilizados y construidos en este trabajo se recogen en la tabla 2.

Tabla 2. Plásmidos

Plásmido	Características	Referencia / Fuente
pGEM-T	Vector de clonaje para ligar productos de PCR (A-T), alto número de copias, Ap ^R	Promega
pET29a(+)	Vector de expresión inducible, permite la fusión de una cola de hexa-histidina en el extremo C-terminal de la proteína cuyo gen es insertado, Km ^R	Novagen
pMP220	amplio espectro de huésped, portador del gen <i>lacZ</i> sin promotor, para la construcción de fusiones transcripcionales, bajo número de copias, Tc ^R	Spaink <i>et al.</i> (1987)
pED13*	Fusión transcripcional <i>ttgR::lacZ</i> , el promotor P _{<i>ttgR</i>} se insertó entre los sitios <i>EcoRI</i> y <i>PstI</i> de pMP220, Tc ^R	Terán <i>et al.</i> (2003)
pED14*	Fusión transcripcional <i>ttgA::lacZ</i> , el promotor P _{<i>ttgA</i>} se insertó entre los sitios <i>EcoRI</i> y <i>PstI</i> de pMP220, Tc ^R	Terán <i>et al.</i> (2003)
pTGF1*	pET29a(+) con el gen <i>ttgR</i> (fragmento <i>NdeI-XhoI</i> amplificado por PCR) insertado en fase con la cola de hexa-histidina, Km ^R	Este trabajo, Terán <i>et al.</i> (2003)
pWilR1*	pGEM-T:: <i>ttgR</i> (<i>NdeI / HindIII</i>), Ap ^R	Este trabajo
pWilR2*	pET29a(+) con el gen <i>ttgR</i> (fragmento <i>NdeI-HindIII</i> de pWilR1) insertado, no está en fase con la cola de hexa-histidina, Km ^R	Este trabajo
pWTR-*	Colección de plásmidos idénticos a pWilR1 pero	Este trabajo

con el gen *ttgR* mutagenizado por PCR solapante para obtener sustituciones determinadas de residuos en la secuencia de la proteína TtgR. Las últimas letras definen el tipo de sustitución o mutación portada por cada plásmido pWTR-, Ap^R

* plásmidos construidos en este trabajo

pMP220:

Plásmido de aproximadamente 10,5 kb derivado del vector pTJS75 (Schmidhauser y Helsinki, 1985) perteneciente al grupo de incompatibilidad IncP. Posee el sitio múltiple de clonación (*polylinker*) de pIC20H (Marsh *et al.*, 1984) y contiene el gen *lacZ* de *E. coli* sin promotor y con el sitio de unión al ribosoma del gen *cat*. La clonación de promotores delante del gen *lacZ* permite medir la expresión transcripcional desde los mismos como actividad β -galactosidasa (Spaink *et al.*, 1987). Lleva un gen de resistencia a tetraciclina.

pGEM-T:

Derivado comercial del vector pGEM^R-T5Zf(+), él mismo basado en pUC18, cortado con EcoRV y al que se le añade una timidina en cada extremo 3', para facilitar la ligación de productos de PCR. Contiene el origen de replicación del fago filamentoso f1 por lo que puede ser utilizado para producir ADN de cadena sencilla. El sitio de clonación múltiple está flanqueado por los promotores de la RNA polimerasa del fago T7 y SP6 y se encuentra dentro de la región codificante del péptido α de la β -galactosidasa. Esto permite que la inserción de un fragmento pueda ser identificada por coloración de colonias en un medio sólido que contenga 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido (X-gal) en cepas *lacZ* Δ M15 que permitan la α -complementación: si no hay inserto, se produce un péptido α , hay complementación y producción de una enzima β -galactosidasa funcional que dará el color azul a las colonias. De lo contrario la inserción conduce a la producción de un péptido α no funcional,

por lo tanto a una cepa sin actividad β -galactosidasa cuyas colonias serán blancas. Confiere resistencia a ampicilina.

pED13:

Plásmido que porta la fusión transcripcional $P_{ttgR}::lacZ$ que se obtuvo clonando en pMP220 un fragmento *EcoRI* – *PstI* de 194 pb, generado por PCR con los cebadores TtgR-*EcoRI* (5'-CCCGGAATTCAAGAGTAATGGA-3') y TtgR-*PstI* (5'-AAAACTGCAGCGCGTGCGG-3') a partir de ADN cromosómico de *P.putida* DOT-T1E. La secuencia insertada corresponde a la región promotora del gen *ttgR* entre las posiciones – 88 y + 106 respecto al punto de inicio de la transcripción.

pED14:

Plásmido que porta la fusión transcripcional $P_{ttgA}::lacZ$ que se obtuvo clonando en pMP220 un fragmento *EcoRI* – *PstI* de 184 pb, generado por PCR con los cebadores TtgA-*EcoRI* (5'-CCGGAATTCGTGCGGGGAAC-3') y TtgA-*PstI* (5'-AAAACTGCAGTAATGGAAGAG-3') a partir de ADN cromosómico de *P.putida* DOT-T1E. La secuencia insertada corresponde a la región promotora del operon *ttgABC* entre las posiciones – 129 y + 55 respecto al punto de inicio de la transcripción.

pET29 a(+):

Vector comercial de expresión traduccional que permite clonar un gen fusionado o no a una cola de hexa-histidina (His-tag) en el extremo C-terminal. La proteína de fusión así generada pudiéndose purificar por cromatografía de afinidad quelante de níquel. También permite una fusión del extremo N-terminal a una diana de la proteína S (S-tag).

La expresión del gen clonado está bajo el control del promotor *T7lac*, promotor del fago T7 con el sitio *lacO* del represor *Lacl*, por lo que para la

expresión se necesitó por un lado pasar el plásmido a la cepa B834 (λ DE3 lisogénica) portadora del gen de la ARN polimerasa del fago T7, el mismo bajo el control del promotor *lacUV5*. Y por otro lado, tanto para inducir la expresión de la T7 ARN polimerasa, como la del gen de interés clonado, se requirió la adición del inductor IPTG al medio de cultivo. De esta manera se logra obtener el nivel de expresión deseado y en el momento deseado del gen clonado.

pTGF1 y pWilR2:

Estos dos plásmidos se construyeron de manera equivalente, ambos derivan del vector pET29 a(+) al que se le insertó el gen *ttgR* entre los sitios *NdeI* y *XhoI* (pTGF1), o *NdeI* y *HindIII* (pWilR2). El plásmido pTGF1 lleva clonado el gen *ttgR* con su marco de lectura en fase con la cola His-tag del vector, para ello se amplificó por *PCR* el ADN codificante con el par de cebadores TtgR5'-*NdeI* (5'-NNNNNNCATATGGTCCGTCGAACCAAAG-3') y TtgR3'-*XhoI* (5'-NNNNNNCTCGAGTTTCGCCAGAGCCGGGCTC-3') utilizando como molde ADN cromosómico. Para el plásmido pWilR2 portador del gen *ttgR* con su propio codón terminador, la amplificación por *PCR* se hizo con el par TtgR5'-*NdeI* y TtgR3'-*HindIII* (5'-NNNNNNAAGCTTCTACTATTCGCCAGAGCCGGGCTC-3').

Los productos de amplificación, de aproximadamente 650 pb se purificaron y cortaron con los enzimas de restricción *NdeI* y *XhoI*, o *NdeI* y *HindIII* según el caso, y se ligaron al vector pET29(a+), previamente cortado con los respectivos enzimas de restricción, generando así los plásmidos pTGF1 y pWilR2. La correcta inserción e integridad de los genes insertados se comprobaron por secuenciación.

4. Ensayos *in vivo*

4.1. Resistencia a antibióticos

Los estudios de resistencia a antibióticos se llevaron a cabo utilizando el método de la concentración inhibitoria mínima (CIM) (Amsterdam, 1991), en placas de microtítulo de 96 pocillos con fondo en forma de U (*Sarstedt*, ref. 83.1837.500). Los antibióticos se prepararon concentrados cincuenta veces con respecto a la concentración inicial a ensayar. Las soluciones de antibióticos concentrados se diluyeron cincuenta veces en medio LB, y 200 µl de las mismas se depositaron en los pocillos de la primera columna de las placas de cultivo. En el resto de los pocillos de la placa se añadieron 100 µl de medio de LB. Con ayuda de una pipeta multicanal, se realizaron diluciones seriadas de los antibióticos, mezclando 100 µl de la solución de antibiótico de la primera columna con los 100 µl de LB de la segunda columna, y así sucesivamente. De esta manera, la concentración de antibiótico de cada columna de pocillos se diluye a la mitad con respecto a la anterior. Después de preparar las placas de cultivo con los antibióticos, se añadieron a cada uno de los pocillos 10 µl de un cultivo de células de *P. putida* tomado en fase de crecimiento exponencial y diluido aproximadamente a 5×10^4 células / µl. Las placas se incubaron a 30°C durante 20 horas y se determinó la concentración mínima de antibiótico capaz de inhibir en un 90% el crecimiento bacteriano, analizando la turbidez en los pocillos de la placa de cultivo.

Este método se empleó también para estudiar la resistencia del microorganismo a otros compuestos antibacterianos no clasificados como antibióticos, como agentes antimicrobianos de origen vegetal, o disolventes orgánicos.

4.2. Ensayos de transporte *in vivo* por fluorescencia

Este ensayo se optimizó para la cepa *P.putida* DOT-T1E a partir de los métodos descritos por Bolhuis *et al.* (1994), Ocaktan *et al.* (1997) y Mine *et al.* (1999). Tanto la preparación de las células como las condiciones de realización

del ensayo deben ser mantenidas constantes e idénticas para la obtención y comparación correcta de los resultados.

Preparación de las células: Cultivos celulares de las cepas de interés se incubaron a 30°C durante 13-14 h en medio rico LB, se diluyeron 100 veces en 10 ml del mismo medio y se incubaron en agitación a 30°C. Las células se recogieron en plena fase exponencial de crecimiento ($DO_{660}=0,5$) y se sedimentaron por centrifugación a 7000 g durante 10 min a 25°C. El sedimento celular se lavó una vez en tampón fosfato 50 mM (pH 7.0), NaCl 100mM y se resuspendió en el mismo tampón a una DO_{660} de 0,3.

Medida fluorescente de la acumulación de bromuro de etidio: El bromuro de etidio (BrEt) es un agente fluorescente que se intercala en las moléculas de ADN de forma reversible. Emite baja fluorescencia en soluciones acuosas libres de ADN (exterior de la célula), pero se vuelve fuertemente fluorescente al entrar en la célula e intercalarse en el ADN celular. Estos cambios en la intensidad de fluorescencia permiten seguir la acumulación en tiempo real de BrEt en células vivas en suspensión.

Las medidas se realizaron con agitación a 30°C, preincubando 3 ml de suspensión celular durante 5 min, tras lo cual se añadió BrEt a una concentración final de 10 μ M. La fluorescencia se midió durante 10-15 min a unas longitudes de onda de excitación y emisión de 520 ± 5 nm y 590 ± 10 nm respectivamente en un espectrofotómetro de fluorescencia.

4.3. Ensayo enzimático de la β -galactosidasa

La medida de actividad β -galactosidasa se llevó a cabo en células permeabilizadas según el método descrito por Miller (1972). Este método se basa en una reacción colorimétrica en la que el *o*-nitrofenil- β -D-galactopiranosido (ONPG), sustrato incoloro de la enzima β -galactosidasa, es

hidrolizado, produciendo galactosa y *o*-nitrofenol. Este último compuesto es de color amarillo y su concentración puede determinarse por espectrofotometría. Cultivos celulares incubados a 30°C durante 10-14 horas, se diluyeron 100 veces en 10 ml de medio LB (o de medio mínimo M9) y se incubaron a 30°C en agitación. Tras un periodo de incubación variable, se recogieron e incubaron en hielo fracciones alícuotas de 100 µl de los cultivos y se añadieron 20 µl de SDS al 0,1% (p/v) y otros 20 µl de cloroformo para permeabilizar las células. Esporádicamente, se recogieron fracciones de 1,5 ml de los cultivos, los cuales centrifugaron a 17.000 g durante un minuto. Los sobrenadantes se decantaron y los sedimentos celulares se resuspendieron en 100µl de LB, tras lo cual se permeabilizaron las células de manera idéntica con SDS y cloroformo.

Se añadieron 0,8 ml de tampón Z (60 mM Na₂HPO₄; 40 mM NaH₂PO₄; 10 mM KCl; 1 mM MgSO₄ y 50 mM β-mercaptoetanol) y 0,2 ml de una solución de ONPG (4 mg/ml en tampón fosfato 0,1 M, pH 7,0). La solución de ONPG es estable a 4°C y en oscuridad durante dos semanas. La mezcla de reacción se incubó a 30°C hasta la aparición de color (entre dos minutos y una hora) y se detuvo añadiendo 2 ml de una solución de Na₂CO₃ 0,5 M. La concentración de *o*-nitrofenol y la contribución de la turbidez celular en la reacción se determinaron espectrofotométricamente, midiendo la absorbancia a 420 nm y 550 nm respectivamente. Además se determinó la densidad celular de los cultivos, midiendo su turbidez a 660 nm. Los ensayos de β-galactosidasa se realizaron por triplicado para cada condición. La actividad β-galactosidasa, expresada en unidades Miller (UM), se calculó de acuerdo con la siguiente ecuación:

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

Donde t representa el tiempo en minutos y V el volumen en ml de la suspensión bacteriana utilizado en la impermeabilización.

5. Técnicas de manipulación de ADN

5.1. Aislamiento de ADN total

Para la preparación de ADN total se utilizó una modificación del método descrito por Kado y Liu (1981). Las células se cultivaron con agitación durante 10-14 horas en medio LB, recogiendo 0,5-1 ml del cultivo por centrifugación a 17.000g durante 1 minuto. Después de eliminar el sobrenadante, las células se resuspendieron en 400 μ l de una solución de Tris-HCl 25 mM, pH 8,0; EDTA 25 mM; sacarosa 20% (p/v) y se incubaron a 4°C durante 5 min. A continuación, se añadieron 200 μ l de una solución con SDS 2% (p/v) y NaOH 0,3 N, y la suspensión se mezcló por inversión hasta conseguir la lisis celular. Posteriormente, se añadió una décima parte del volumen de MgCl₂ 0,1 M y el contenido del tubo se volvió a mezclar. Tras centrifugar la mezcla a 17.000 g durante 10 minutos, el ADN se extrajo con 1 volumen de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1). La extracción se repitió tres veces. Finalmente, el ADN de la fase acuosa se precipitó añadiendo 2 volúmenes de etanol absoluto frío y se concentró por centrifugación a 17.000 g durante 15 minutos. El sedimento se lavó con 1 ml de etanol 70% (v/v) y se centrifugó a 17000 g durante 1 minuto, tras lo cual se dejó secar y se resuspendió en 50 μ l de H₂O_d.

5.2. Aislamiento de ADN plasmídico

Para la obtención de ADN plasmídico de forma rutinaria se usó el método llamado de lisis alcalina descrito en el manual de Sambrook y colaboradores (1989). Para la obtención de ADN de alta pureza, para su uso posterior en reacciones de secuenciación y/o clonación, se utilizó el sistema

comercial “*QIAprep-spin Plasmid Kit*” (QIAGEN, ref. 27104) siguiendo las instrucciones del fabricante. En cualquier caso se partió de 3-5 ml de un cultivo en medio LB de la cepa portadora con los antibióticos necesarios y a temperatura óptima, en agitación durante 10-14 horas.

5.3. Electroforesis de ADN

La electroforesis de ADN se llevó a cabo utilizando geles de agarosa preparados en tampón Tris/ acetato/ EDTA (TAE) (Sambrook *et al.*, 1989). Como patrones de peso molecular se usaron los fragmentos de ADN del fago lambda, cortado con los enzimas *HindIII* o bien el marcador comercial X (*Roche Molecular Biochemicals*, ref. 1498037).

5.4. Aislamiento de fragmentos de ADN de geles de agarosa

Para este fin se fabricaron columnas de lana de vidrio en tubos de PCR de 0,5 ml previamente perforados en el fondo con una aguja, tras lo cual se rellenaron con lana de vidrio que se compactó hasta rellenar la mitad del tubo aproximadamente. Estas “columnas” se esterilizaron en autoclave para su uso posterior.

Los trozos de agarosa cortados que contienen el ADN a extraer se introducen en estas columnas que a su vez se introducen en un tubo *Eppendorf* de 1,5 ml. El ADN se recupera en los tubos tras una doble centrifugación de 2 minutos a 7000 g. El ADN es luego precipitado siguiendo protocolos básicos (Sambrook *et al.*, 1989).

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

Este método se empleó para la amplificación de fragmentos de ADN del cromosoma de *P. putida* o de plásmidos portadores de genes o regiones de interés, y en algunos análisis de colonias obtenidas tras la transformación de

ligaciones, para detectar de forma rápida el ADN insertado. La reacción de amplificación contenía: ADN molde (0,2 ng/μl para el ADN cromosómico o 10 pg/μl para el ADN plasmídico), cebadores (0,5 μM cada uno), tampón de reacción (Tris-HCl 10 mM, pH 8,3; KCl 50 mM; MgCl₂ 1,5 mM), dNTPs (100 μM cada uno) y ADN polimerasa *Taq* (*Amersham Pharmacia*, ref. 27-0799-02) (0,02 U/μl).

Estas son las condiciones estándar de la reacción de amplificación que fueron empleadas: en un primer lugar, tras la desnaturalización inicial a 94° C durante cinco minutos, se realizaron entre 25 y 30 ciclos en condiciones de 94°C, 10 segundos; 50°C, 10 segundos; 72°C, 1 minuto/ kb; para finalmente realizar una extensión final a 72°C durante 10 minutos. La temperatura de hibridación fue ajustada en función del cebador utilizado.

Cuando la reacción estándar no resultó satisfactoria se combinaron distintas modificaciones, como el cambio de concentración de MgCl₂ – incrementándola a 3 o 4,5 mM. Del mismo modo, se añadieron ciertos compuestos a la concentración de reacción (glicerol al 10% [v/v] o DMSO al 5% [v/v], por ejemplo). En algunas ocasiones el producto obtenido tras la amplificación se purificó utilizando el sistema comercial “*QIAquick PCR Purification Kit*” (*QIAGEN*, ref. 28104) para eliminar tanto la polimerasa como los cebadores y los dNTPs o bien tras aislarlo de gel de agarosa por el método descrito en el apartado anterior.

5.6. Secuenciación de ADN

La secuenciación de ADN se realizó tanto de forma manual como automática. Para la secuenciación manual se siguieron las instrucciones del sistema comercial “*T7 sequencing kit*” (*Amersham Pharmacia*) basado en el método de Sanger y colaboradores (1977), usando la ADN polimerasa del fago T7, y añadiendo una modificación: en lugar de usar [α-³²P]-ATP, se utilizaron 5-

10 pmoles de un cebador marcado en su extremo 5' con [γ - 32 P]-ATP (véase apartado 6.4. de esta sección).

La secuenciación automática de ADN se realizó en el servicio de secuenciación automática de ADN, utilizando un aparato ABI PRISM™ (modelo 310) de *Perkin Elmer*. Para ello se empleó el sistema comercial “DNA sequencing kit with AmpliTaq DNA polymerase” (Perkin Elmer) basado en la utilización de dideoxinucleótidos acoplados a fluoróforos.

5.7. Transformación bacteriana

5.7.1. Transformación por choque térmico

Para la transformación de cepas de *E. coli* por choque térmico se prepararon células competentes según el método de Nishimura *et al.* (1990). De una caja Petri fresca con la cepa de interés, se inoculó un cultivo líquido de 3 ml de LB con los antibióticos necesarios y se incubó a 37°C durante 12-14h en agitación. Este se diluyó 100 veces en 50 ml de solución A y se incubó nuevamente a 37°C hasta alcanzar la fase exponencial de crecimiento ($DO_{660} = 0,4 - 0,6$). A partir de ese momento las células se mantuvieron siempre en frío para obtener la mayor eficiencia de transformación. Se incubaron en hielo durante 10 min antes de recogerlas por centrifugación a 12000 g – 5 min a 4°C. El sedimento celular se resuspendió cuidadosamente en 0,5 ml de solución A fría, para mezclarlo suavemente con otros 2,5 ml de solución B fría. Finalmente la suspensión bacteriana se repartió en alícuotas de 125 μ l que se conservaron a -70°C para su posterior uso.

Las soluciones A y B se prepararon y conservaron a 4°C tras esterilizarlas por filtración:

Solución A: LB suplementado con $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 10 mM y glucosa 0,2% (p/v).

Solución B: LB suplementado con glicerol 36% (v/v); polietilenglicol-8000, 12% (p/v) y $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 12 mM.

5.7.2. Electroporación

Para la transformación bacteriana de cepas de *P. putida*, se utilizó la técnica de electroporación siguiendo el método de Enderle y Farwell (1998). Se partió siempre de una caja Petri fresca (no almacenada a 4°C) de medio LB con la cepa de interés, incubada 10-14 h a 30°C: se recogió directamente de la superficie de agar aproximadamente 3 mg de biomasa para resuspenderlos en 0,5 ml de H₂O_a estéril. Las células se lavaron dos veces con 0,5 ml de H₂O_a estéril y finalmente se resuspendieron en 50 µl de H₂O_a estéril e incubaron en hielo hasta el momento del pulso eléctrico. Entre 5 y 15 ng de ADN plasmídico sin sales se mezclaron con la suspensión celular anterior y la mezcla se transfirió a una cubeta de electroporación (*Biorad*, ref. 165-2086) previamente enfriada a 4°C y se sometió a un pulso eléctrico de 2,5 kV en un electroporador (*Biorad*, 165-2100). Las células se recogieron inmediatamente añadiendo 1 ml de medio SOC (Sambrook *et al.*, 1989) y se incubaron 1 hora a 30°C antes de sembrar diluciones en medio sólido selectivo de los transformantes.

5.8. Otras técnicas de manipulación de ADN

Las técnicas básicas de manipulación y análisis de ADN como digestión por enzimas de restricción, desfosforilación, precipitación o ligación se realizaron según los protocolos descritos por Sambrook y colaboradores (1989).

6. Técnicas de manipulación de ARN

6.1. Aislamiento de ARN

Para la extracción de ARN total se siguió un protocolo de Chomczynski y Sacchi (1987), modificado por Marqués y colaboradores (1994). De un cultivo crecido en LB en las condiciones de interés y hasta una DO₆₆₀ = 1, se tomaron

alícuotas de 15 ml que se enfriaron rápidamente en nitrógeno y se centrifugaron a 4°C a 12000 g durante 5 minutos. El sedimento celular se resuspendió en 7 ml de solución de lisis *ARNol Yellow* por pipeteo repetido y agitación en vortex y se repartieron en alícuotas de 1,4 ml.

La solución *ARNol Yellow* contiene 20 ml de solución D (tiocianato de guanidinio 4 M; citrato sódico 25 mM; N-lauril sarcosina 0,5% (p/v); 0,36 ml de β-mercaptoetanol en 50 ml de H₂O_{DEPC}); a los que se añaden 4,2 ml de acetato sódico 2M (pH 4.8) y 20 ml de fenol (pH 4.5) saturado en H₂O_{DEPC}.

Los tubos se incubaron a 60°C durante 10 minutos agitándolos con vortex de vez en cuando. Se añadieron entonces 0,28 ml de cloroformo y se agitaron en vortex hasta homogenización de las fases. Posteriormente, las muestras se centrifugaron 10 minutos a 10000 g, a 4°C, y se recuperó la fase acuosa (aproximadamente 0,85 ml) en tubos nuevos a los que se añadieron 0,66 ml de isopropanol. Tras mezclar se incubó 15 minutos a temperatura ambiente, para permitir la precipitación de los ácidos nucleicos (mayoritariamente ARN). Estos se recuperaron por centrifugación a 12000 g a 4°C durante 15 minutos; el sedimento se lavó en etanol: H₂O_{DEPC} 70% (vol/vol) y se dejó secar antes de resuspenderlo en 75 µl de H₂O_{DEPC}.

6.2. Tratamiento con ADNasa I y proteinasa K

Para eliminar los restos contaminantes de ADN se trata las muestras anteriores con 25 µl de una mezcla de ADNasa I de pancreas bovino libre de ARNasas (*Roche Molecular Biochemicals*, ref. 776785) (20 U de inhibidor de ARNasas - *Roche Molecular Biochemicals*, ref. 799025; MgCl₂ 40 mM; DTT 4 mM; ADNasa I, 10 U) durante 1 hora a 37°C.

A continuación, tratamos con 110 µl de una mezcla de Proteínasa K de *Tritirachium album* (*Roche Molecular Biochemicals*, ref. 1373200) (Tris HCl 190 mM, pH 7.0; NaCl 90 mM; SDS 0,36 % p/v; EDTA 18,2 mM; 0,5 U de proteínasa K

libre de ARNasas) durante 1 hora a 37°C para eliminar las proteínas de la muestra.

Se extraen entonces el ARN con 250 µl de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico 25:24:1 (v/v/v) tres veces y una última vez con cloroformo: alcohol isoamílico 24:1 (v/v).

El ARN presente se precipitó añadiendo 0,1 volumen de acetato sódico 3M (pH 4,8) y 2,5 volúmenes de etanol frío. Se incubó 30 minutos a -80°C y centrifugó 15 minutos a 12000 g. El sedimento se lavó en etanol: H₂O_{DEPC} 70% (v/v) y se dejó secar antes de resuspenderlo en 30 µl de H₂O_{DEPC} para su cuantificación o almacenamiento a -80°C.

6.3. Determinación de la concentración de ARN totales

La concentración de ARN y la pureza de la extracción (contaminación de proteínas y/o fenol) se midieron de manera equivalente al ADN, previa dilución 1/300 en H₂O_{DEPC}, por espectrofotometría en luz ultravioleta a una longitud de onda de 260 nm y 280 nm. La pureza se refleja en la relación DO₂₆₀/DO₂₈₀ que debe tener un valor entre 1,7 y 2,0 y la concentración se calcula en base a la DO₂₆₀ (1 unidad de DO₂₆₀=40 µg/ml de ARN). (Sambrook *et al.* 1984).

6.4. Extensión reversa de cebador

6.4.1. Marcaje de cebadores:

El marcaje de los oligonucleótidos se realizó por fosforilación. La reacción, catalizada por el enzima polinucleótido quinasa del fago T4 (PNK), (Roche Molecular Biochemicals, ref. 838292), permite la incorporación de un

fosfato radiomarcado, situado en posición γ de una molécula de adenosina trifosfato (ATP), al extremo 5'-OH del cebador.

Se marcan 10 - 20 pmoles de oligonucleótido en un volumen final de 10 μ l de tampón de fosforilación (Tris HCl 50 mM, pH 7.5; MgCl₂ 10 mM; DTT 1mM; EDTA 0,1 mM; espermidina 0,1 mM) con 1U de PNK y 1 μ l de γ^{32} P-ATP (3000 mCi/ mmol), incubándose a 37°C durante 1 hora.

Se incuba la mezcla otros 10 minutos a 70°C para inactivar la quinasa y se le añade 10 μ l de H₂O_{DEPC}, antes de pasar el volumen resultante por una columna Micro bio spin 6 (Biorad, ref. 732-6222), para eliminar el exceso de ATP radiactivo.

El marcaje se cuantifica en un contador de centelleo "Tri-Carb 1500 liquid Scintillation Analyzer" de Packard. (0,5 μ l de oligonucleótido marcado en 4 ml de líquido de centelleo deben darnos al menos 100 000 cpm).

6.4.2. *Hibridación y extensión reversa a partir de cebador:*

Para la hibridación se mezclan en un volumen final de 10 μ l en H₂O_{DEPC}, 10 o 20 μ g de ARN total, un volumen equivalente 200000 cpm del cebador marcado (0,5 a 2 μ l) y 2 μ l de tampón de hibridación (Pipes 50 mM, pH 7.0; NaCl 2M). Se incuba la mezcla de hibridación 5 minutos a 85°C, se pasa a un baño de 65°C otros 5 minutos para la hibridación y se deja enfriar lentamente hasta alcanzar 44°C.

La extensión se inicia añadiendo 40 μ l de una mezcla de extensión conteniendo: 1 mM de dNTPs, 12 U de inhibidor de ARNasas (*Roche Molecular Biochemicals*, ref. 799025), 3 μ g de actinomicina D y 7 U de transcriptasa reversa de virus de mieloblastosis de ave (AMV – *Roche Molecular Biochemicals*, ref. 109118) en tampón de la transcriptasa reversa (Tris-HCl 62,5 mM, pH 8,2; MgCl₂ 10 mM; KCl 37,5 mM, DTT 1,5 mM). Esta reacción se incubó 1 hora a 44°C, y se detuvo añadiendo 5 μ l de acetato sódico a 3M (pH 4,8) y 150 μ l de etanol frío.

Los ácidos nucleicos se dejan precipitar al menos 30 minutos en hielo seco o una noche a -20°C . Se centrifuga 15 minutos a 12000g y se lava el sedimento en etanol 70% (v/v) frío. Una vez seco, el sedimento se resuspende en 4 μl de TE (Tris-HCl 10mM, pH 8,0; EDTA 1mM) y 2 μl de tampón de carga con formamida [(0,3% (p/v) azul de bromofenol; 0,3% (p/v) xilencianol; 10 mM EDTA; 97,5% (v/v) formamida desionizada].

Antes de analizarlas por electroforesis, las muestras se desnaturalizan 3 minutos a 90°C y se mantienen en hielo.

6.4.3. Separación de las cadenas de ADNc mediante electroforesis:

La separación de las cadenas de ADNc extendidas a partir del cebador marcado se realiza por electroforesis en un gel de secuenciación de poli(acrilamida/bis acrilamida) al 6,5% (p/v), desnaturalizante (urea 7 M), preparado en tampón TBE (Tris-base 54 g/l; ácido bórico 27,5 g/l; EDTA 10 mM). La electroforesis se realizó en el mismo tampón TBE a potencia fija de 40W, voltaje 1800 V, y durante 1 hora 30 aproximadamente.

El gel se transfiere a un papel de filtro *Whatman* 3MM por adhesión, se cubre con un papel de plástico transparente y se seca al vacío a 80°C durante 20 minutos.

Las bandas de ADNc extendidas y separadas se visualizan o bien por autoradiografía, utilizando películas *Kodak X-OMAT AR* con tiempos de exposición de al menos 24 horas, o bien por exposición en pantallas IP (*Fuji*) utilizando un equipo *Phosphor Imager Personal FX (Biorad)*. La cuantificación de la intensidad de las bandas analizadas se realizó con el programa informático *Quantity One (Biorad)*.

6.5. Extensión reversa y amplificación del ADNc con ADN polimerasa termoresistente (RT-PCR)

La transcripción reversa y la posterior reacción de amplificación del ADN_c se realizaron utilizando el sistema comercial “*Titan One Tube RT-PCR System*” (Roche Molecular Biochemicals, ref. 1855476) y siguiendo las instrucciones del fabricante. La transcripción reversa se realizó incubando las muestras a 50°C durante treinta (30) minutos. Las condiciones estándar de la reacción de amplificación fueron las siguientes: tras una desnaturalización a 94°C durante cinco minutos, se realizaron treinta (30) ciclos en las siguientes condiciones: 94°C, 30 segundos; 45-65°C, 30 segundos; 68°C, 1 minuto; para finalmente realizar una extensión a 68°C durante 10 minutos. La temperatura de hibridación se varió en función de los cebadores utilizados. En todos los ensayos se llevaron a cabo controles negativos para detectar posibles falsos positivos en la reacción de extensión, debido a la presencia de ADN en las muestras de ARN. Como controles negativos se realizaron, por un lado, una reacción de transcripción reversa y amplificación sin la muestra de ARN, y por el otro, una reacción de amplificación en ausencia de transcriptasa reversa por lo tanto únicamente en presencia de *Taq* ADN polimerasa. Esta última se realizó sistemáticamente para descartar cualquier contaminación con ADN.

7. Purificación y análisis de proteínas

7.1. Sobreexpresión de proteínas

La sobreexpresión tanto de la proteína TtgR-(His)₆ (TtgR con una cola de hexa-histidina en el extremo C-ter), como de la proteína TtgR silvestre, se

realizó de forma recombinante en la cepa receptora *E. coli* B834 (DE3) transformada con los plásmidos pTGF1 o pWilR2 respectivamente. Las células transformadas fueron puestas a crecer a 30°C, en 2 x 1 litros de medio rico 2 X YT suplementado con 50 µg/ml de kanamicina, hasta una turbidez (DO₆₀₀) comprendida entre 0,5 y 0,6. Se indujo entonces la sobre expresión de la proteína añadiendo al medio 1 mM del inductor IPTG y pasando los cultivos a 20°C. Las células se recogieron por centrifugación a 10 000 g a 4°C, después de 3 h de inducción. El sedimento celular se resuspendió en 40 ml de tampón de lisis (solución A para la proteína TtgR-(His)₆, solución HA para la proteína TtgR silvestre) – véase siguiente apartado “7.2 cromatografía de proteínas” – suplementado con una pastilla de cóctel de inhibidores de proteasas *Complete* (Roche Molecular biochemicals, Ref. 1873580), tras lo cual las células se rompieron en una prensa de French a una presión de 15000 psi. Por último, el lisado se sometió a centrifugación a 20000 g, durante 45 min, a 4°C y la fracción soluble, constituida por el sobrenadante, se recuperó y pasó por un filtro de 0,4 µm.

Para comprobar tanto la sobre-expresión de la proteína de interés como su presencia en la fracción soluble, se tomaron alícuotas tanto del cultivo antes y después de la inducción como de la fracción soluble, y se analizó su contenido en proteínas por gel de electroforesis de poliacrilamida (*SDS-PAGE*).

7.2. Cromatografía de proteínas

Todas las cromatografías de proteínas de llevaron a cabo en un equipo FPLC (*Fast Protein Liquid Chromatography*) (ÄKTA, Amersham Pharmacia) dotado de un colector de fracciones automático.

7.2.1. Cromatografía de afinidad en columna de níquel

Esta técnica se empleó para la purificación rápida de la proteína TtgR (His)₆ utilizando una columna quelante de níquel *HiTrap chelating Sepharose* (5 ml) (*Amersham Pharmacia*, Ref.17-0409-01), que permite la retención de proteínas portadoras de una cola de histidinas. La columna fue previamente cargada en níquel con una solución de cloruro de níquel (0,12 g/ml en acetato amónico 100 mM), posteriormente lavada según instrucciones del fabricante, y equilibrada en solución A (NaH₂PO₄ 25 mM, pH 7,0; glicerol 5% [vol/vol]; NaCl 0,5 M). Tras cargar en la columna la fracción soluble preparada en la misma solución A (véase apartado anterior), la elución de las proteínas retenidas se realizó en un gradiente lineal de imidazol (0 a 1 M de imidazol en 10 volúmenes de columna). Se recogieron fracciones de 3 ml cuyo contenido en proteína fue analizado por *SDS PAGE*. Las fracciones que contenían la proteína TtgR-(His)₆ (PMA de 24.8 kDa) de forma homogénea se reunieron y sometieron a diálisis en tampón de almacenamiento (Tris-HCl 10 mM, pH 7,5; NaCl 250 mM; glicerol 50 % [vol/vol]; EDTA 0,1 mM; DTT 5 mM) durante 12 h a 4°C, y se almacenaron a -20°C.

7.2.2. Cromatografía de afinidad en columna de heparina

Este método se empleó durante el primer paso de la purificación de la proteína TtgR silvestre utilizando una columna de heparina *HiTrap Heparin HP* (5 ml) (*Amersham-Pharmacia*, Ref. 17-0407-01), que permite la retención de proteínas que interaccionan con el ADN, debido al establecimiento de interacciones electroestáticas entre la heparina y los residuos básicos normalmente sobre-representados en los sitios de unión al ADN de dichas proteínas. La columna fue previamente lavada según instrucciones del fabricante y equilibrada en tampón HA (Tris-HCl 10 mM, pH 6,4; NaCl 20 mM; glicerol 5 % [vol/vol]; EDTA 0,1 mM). Tras cargar en la columna la fracción soluble preparada en la misma solución HA (véase apartado anterior), la elución de las proteínas retenidas se realizó en un gradiente lineal de NaCl (0 a

0,5 M de NaCl en 25 volúmenes de columna). Se recogieron fracciones de 5 ml cuyo contenido en proteína fue analizado por *SDS PAGE*. Las fracciones que contenían mayoritariamente la proteína TtgR (PMA de 23.8 kDa) se colectaron y el volumen resultante se concentró por ultrafiltración a través de una membrana-filtro con poro de exclusión de 10 000 Da (*Amicon Millipore*, ref. 13622). Para ello se empleó un dispositivo de ultrafiltración, modelo 8050 (*Amicon Millipore*, ref. 5122), conectado a una fuente de gas N₂ comprimido según instrucciones del fabricante. Una vez alcanzado un volumen de aproximadamente 2 ml, este se sometió a diálisis en tampón GF (Tris-HCl 20 mM, pH 7,5; NaCl 250 mM; glicerol 10 % [vol/vol]; EDTA 0,1 mM; DTT 1 mM) durante 12 h a 4°C, antes de proseguir con el siguiente paso de purificación.

7.2.3. Cromatografía de exclusión molecular

Para el segundo paso de la purificación de la proteína TtgR se llevo a cabo una cromatografía de exclusión molecular a través de una columna *Superdex 75 HR 10/30* (*Amersham-Pharmacia*, Ref. 17-5154-01) que permite la separación de las proteínas según su peso molecular o volumen globular. Esta columna permite la separación óptima de proteínas cuyo peso molecular está comprendido entre 3 kDa y 70 kDa, el tamaño de exclusión siendo de 100 kDa. Además, tras calibrar la columna con proteínas globulares de peso molecular conocido, se obtiene una curva patrón que permite determinar el peso molecular aparente de una proteína globular en su forma nativa, a partir de su volumen de elución.

La columna fue previamente lavada según instrucciones del fabricante y equilibrada en tampón GF (Tris-HCl 20 mM, pH 7,5; NaCl 250 mM; glicerol 10 % [vol/vol]; EDTA 0,1 mM; DTT 1 mM). Se inyectó entre 0,5 y 0,75 ml de muestra proteica y se colectaron fracciones de 1 ml. El contenido proteico de las fracciones se analizó por *SDS-PAGE*, tras lo cual se colectaron las fracciones que contenían la proteína TtgR con una pureza superior al 95%. Por último el

volumen colectado se concentró entre 3 y 5 veces por ultrafiltración (veáse apartado anterior) y se sometió a diálisis en tampón de almacenamiento (Tris-HCl 10 mM, pH 7,5; NaCl 250 mM; glicerol 50 % [vol/vol]; EDTA 0,1 mM; DTT 5 mM) durante 12 h a 4°C. Finalmente se repartió la muestra en alícuotas de 0,2 ml que se almacenaron a -80°C.

7.3. Electroforesis de proteínas

Para la separación electroforética de proteínas se utilizó el equipo de electroforesis vertical "Mini-PROTEAN II" (*Biorad*, ref. 165-2940) siguiendo las instrucciones indicadas por el fabricante.

7.3.1. Electroforesis de proteínas en gel de poliacrilamida en condiciones no desnaturalizantes

Las electroforesis se realizaron en geles de poliacrilamida de 1,0 mm de espesor preparados en tampón Tris-glicina 1X (Tris-HCl 25 mM, pH 8,0; glicina 200 mM). La concentración de poliacrilamida estuvo comprendida entre el 4,5 % y el 12 % (p/v). A 10 µl de muestras de proteínas (o complejo proteína-ADN), se añadieron 2 µl de tampón de carga no desnaturalizante (Tris-HCl 40 mM, pH 8,0; glicerol 40 % [p,v]; NaCl 100 mM; EDTA 0,1 mM; azul de bromofenol 0,2 % [p/v]). Las electroforesis se hicieron en el mismo tampón Tris-glicina 1X, a 60 V y durante 2 h.

7.3.2. Electroforesis desnaturalizante en gel de poliacrilamida en presencia de SDS (SDS- PAGE)

Las electroforesis se realizaron utilizando geles discontinuos de poliacrilamida de 0,75 o 1,0 mm de espesor, de acuerdo con el método descrito por Laemmli (1970). Cada gel constó de un segmento superior concentrador

(Tris-HCl 100 mM, pH 6,8; poliacrilamida 3,6 % [p/v]; SDS 0,1 % [p/v]) y un segmento inferior separador (Tris-HCl 350 mM, pH 8,8, poliacrilamida 10 % [p/v]; SDS 0,1 % [p/v]). A 10 µl de muestra se añadió un volumen equivalente de tampón de carga 2X para SDS-PAGE (Tris-HCl 100 mM, pH 6,8; β mercaptoetanol 10 % [v/v]; azul de bromofenol 0,2 % [p/v]; glicerol 20 % [v/v]; SDS 4 % [p/v]), y se calentó a 85°C durante 5 min. La electroforesis se hizo en tampón Laemmli 1X (Tris HCl 25 mM, pH 8,3; glicina 250 mM; SDS 0,1 % [p/v]), a 120 V durante 45 minutos.

7.3.3. *Tinción de proteínas con azul de Coomassie*

Las proteínas se visualizaron directamente en el gel mediante tinción con una solución de azul de Coomassie (0,25 % [p/v] de azul de Coomassie en una mezcla de metanol:ácido acético:agua en proporción 45:10:45 [v/v/v]). En lugar de las dos a cuatro horas necesarias por el método tradicional, la tinción se aceleró calentando en microondas el gel sumergido en la solución anterior justo hasta que comenzó a hervir. El gel se agitó entonces durante cinco minutos, a temperatura ambiente, en esta solución. Después se agitó a temperatura ambiente en una solución de decoloración (idéntica a la anterior pero sin azul de Coomassie) que se cambió frecuentemente por solución fresca, hasta que las bandas de proteínas se visualizaron con nitidez.

7.3.4. *Tinción de proteínas con plata*

Para el revelado de los geles de proteínas en condición no desnaturizante, se prefirió la tinción con plata, que ofrece la doble ventaja de ser más sensible y de teñir el ADN en el caso de electroforesis de complejos

proteína-ADN. Para ello se utilizó el *kit* comercial “*Silver stain kit*” (*Biorad*, Ref. 161-0443) siguiendo las instrucciones del fabricante.

7.4. Determinación de la concentración en proteínas

La concentración de proteínas se determinó por espectrofotometría mediante el ensayo de Bradford (1976), utilizando un reactivo de Bradford comercial (*Biorad* 500-006). En cada ensayo, se realizó en paralelo una curva patrón con una solución fresca de albumina de suero bovino, siguiendo el protocolo “*micro assay*” descrito en las instrucciones del fabricante.

8. Ensayos de retardo en gel

El ensayo se basa en la diferencia de movilidad electroforética entre un fragmento de ADN y el complejo formado por una proteína unida a ese fragmento: en este caso la migración del ADN se ve “retardada” al unírsele una macromolécula globular de poca movilidad electroforética. En este método se utilizaron tanto un fragmento de ADN generado por *PCR* conteniendo la región intergénica *ttgABC-ttgR*, como fragmentos de entre 40 y 24 pb, obtenidos hibridando oligonucleótidos complementarios de síntesis. El fragmento de *PCR* se obtuvo de ADN cromosómico de *P. putida* DOT-T1E utilizando los cebadores TtgABC1 (5'-AACGCTCCGGGGGGCACC-3') y TtgABC2 (5'-GGGAGACGCTCAAGAG-3'). El fragmento amplificado de 189 pb se purificó y se procedió a su marcaje radiactivo. En el caso de los oligonucleótidos complementarios, se mezclaron cantidades equimolares de ambos y se hibridaron incubándolos 5 minutos a 96°C y dejando bajar la temperatura lentamente hasta alcanzar la temperatura ambiente.

El marcaje se hizo por el mismo método de marcaje de cebadores (véase apartado 6.4.1 de esta misma sección) por fosforilación con $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP (3000 mCi/mmol) y polinucleótido quinasa.

El ADN marcado (10 000 cpm equivalentes a unos 5 nM) se incubó durante 10 minutos con cantidades variables de proteína TtgR purificada (entre 50 nM y 3 μ M) en 10 μ l finales de tampón de unión (Tris-HCl 10 mM, pH 7,0; acetato magnésico 10 mM; KCl 10 mM; glicerol 5 % [v/v]; EDTA 0,1 mM; DTT 1 mM), adicionado de ADN inespecífico (poli dI-dC, 20 μ g/ml) y proteína inespecífica (albúmina de suero bovina, 200 μ g/ml). Cuando se utilizaron efectores en los ensayos, estos se añadieron a la mezcla de unión en concentraciones finales que variaban de 0,2 a 1,5 mM. Transcurrido el tiempo de incubación, las reacciones se pasaron a 4°C (hielo), se les añadió 2 μ l de tampón de carga no desnaturizante y las muestras se corrieron por electroforesis en gel de poliacrilamida al 6% en condiciones no desnaturizantes (véase apartado 7.3.1 de esta sección), en tampón Tris-glicina 1x, durante 2 horas y a 60 V. Los geles se secaron y se analizaron como se ha descrito anteriormente (sección 6.4.3), utilizando el equipo *Phosphor imager personal FX (Biorad)*.

9. Ensayos de impronta *in vitro* (footprint)

En todos los ensayos se empleó el mismo fragmento de ADN de 189 pb utilizado en los ensayos de retardo en gel, que contiene la región intergénica *ttgABC-ttgR*. Este fragmento se obtuvo por PCR utilizando por lo tanto los mismos cebadores TtgABC1 y TtgABC2 (véase apartado anterior), con la diferencia de que uno de ellos fue previamente radio-marcado por fosforilación con polinucleótido quinasa y γ^{32} P-ATP (3000 mCi/ mmol) (véase apartado 6.4.1 de esta misma sección). Así, para analizar la cadena o hebra superior, se marcó únicamente el cebador TtgABC1, mientras que para analizar la hebra complementaria, se marcó el cebador TtgABC2.

Para los ensayos de impronta por protección, aproximadamente 20 000 cpm (20 nM) del fragmento de ADN marcado y purificado se incubaron a 30°C,

en presencia o no de cantidades variables de proteína TtgR (y en presencia o no de efector), en tampón de unión, al igual que para los ensayos de retardo en gel (véase apartado anterior). Tras 10 minutos de unión, la mezcla se sometió al tratamiento de impronta deseado (véase siguientes apartados). Después del tratamiento, las muestras de ADN se precipitaron y el sedimento resultante se preparó y analizó por electroforesis en gel desnaturizante de poliacrilamida al 6,5 % (p/v), de la misma manera que para el ensayo de extensión reversa (véase apartados 6.4.2. y 6.4.3.), con el cuidado especial de utilizar el mismo número de cpm (~ 5000 cpm) en cada carril del gel.

Para el ensayo llamado del “nucleósido faltante”, el ADN fue previamente tratado según se describe a continuación (véase apartado 9.4.), para luego ser sometido a un ensayo de retardo en gel (véase apartado anterior), a razón de unas 30000 cpm por ensayo y utilizando concentraciones de proteína que dieran aproximadamente 50% de unión. Tras la electroforesis, el gel resultante se cubrió con una película de plástico transparente antes de ser revelado. Las bandas de poliacrilamida correspondientes al ADN total (control en ausencia de proteína), ADN libre, y ADN unido se recortaron del gel y su contenido en ADN se extrajo en 0,5 ml de tampón TE por difusión a 37°C, durante 12-14 h. El ADN contenido en el sobrenadante se concentró por evaporación al vacío y las muestras se precipitaron y analizaron por electroforesis en gel desnaturizante de poliacrilamida al 6,5 % (p/v).

9.1. *Footprint* de protección contra ADNasaI

A 10 µl de reacción de unión, se añadieron 40 µl de una mezcla de ADNasa I (ADNasa I diluida a 10^{-5} U/µl en Tris-HCl [pH 8,0] 10 mM, KCl 100 mM, MgCl₂ 5 mM, CaCl₂ 1 mM, DTT 2 mM). Tras 5 min a 30°C, la reacción se

detuvo añadiendo 2 μl de EDTA (0,5 M) y el ADN se extrajo con fenol. El ADN fue luego precipitado en etanol y preparado para ser analizado por electroforesis en gel de poliacrilamida.

9.2. *Footprint* de protección contra metilación por dimetil sulfato (DMS)

A 10 μl de reacción de unión, se añadieron 2 μl de dimetil sulfato diluido al 1,5 % (v/v) en tampón de unión. Tras 2 min a 30°C, la reacción se paró añadiendo 20 μl de solución DMS Stop (acetato amónico 2,5 M; β -mercaptoetanol 1M; EDTA 1mM; ARNt de levadura 100 mg/L). El ADN se extrajo con fenol, fue precipitado en etanol y resuspendido en 30 μl de H_2O_d , antes de ser sometido a corte durante 30 min a 90°C en 10 % (v/v) de piperidina. Tras este tratamiento, las muestras se congelaron en N_2 líquido y se secaron al vacío. Para eliminar todo resto de piperidina, los sedimentos fueron lavados dos veces en 100 μl de H_2O_d , secados al vacío, y por último resuspendidos nuevamente en 10 μl de TE para su posterior análisis por electroforesis.

9.3. *Footprint* de protección contra radicales hidroxilos ($\text{OH}\cdot$)

Para este ensayo de protección, tanto la solución de proteína como el tampón de unión deben carecer de glicerol, ya que interfiere con el radical $\text{OH}\cdot$, por lo que se utilizó tampón de unión libre de glicerol. A su vez, el tampón de la proteína fue cambiado utilizando columnas Micro bio Spin 6 (Biorad, ref. 732-6222) según instrucciones del fabricante. La reacción está basada en el protocolo de Tullius *et al.* (1986): a 10 μl de reacción de unión, se añadieron de manera sucesiva: 4 μl de H_2O_d , 2 μl de solución férrica ($\text{FeSO}_4\text{NH}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) 100 μM , EDTA 200 μM , 2 μl de ascorbato sódico a 20 mM y 2 μl de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) al 0,3 % (p/v). Tras 3 min de incubación a 30°C, la reacción se paró añadiendo 12 μl de solución OH STOP (6 μl de tiourea [100 mM]; 2 μl de

EDTA 0,2 M; 4 µl de acetato sódico 3M [pH 4,8]). A continuación el ADN se extrajo con fenol y fue luego precipitado en etanol para ser analizado por electroforesis.

9.4. Ensayo llamado del “nucleósido faltante” o *Missing nucleoside footprint*

En esta técnica se trata previamente el ADN con radicales OH·, generando cortes aleatorios en todo el fragmento de ADN que provocan la eliminación física de un único nucleósido en el sitio de corte. Tras el tratamiento se genera una colección de fragmentos de ADN doble cadena que contienen interrupciones (*gaps*) repartidas aleatoriamente. Esta colección de ADN tratado se somete a una “selección” *in vitro* por parte de la proteína de interés (ensayo de retardo en gel), ya que esta no podrá unirse a todas aquellas moléculas de ADN cuyas bases imprescindibles para la unión hayan sido eliminadas por el tratamiento. Este tipo de moléculas se encontrará preferentemente en la banda de ADN libre tras el ensayo de retardo en gel, mientras que las moléculas cuyas bases eliminadas no sean indispensables para la unión quedarán en la banda de ADN unido.

Se preincubaron a 30°C, 25 µl de ADN marcado (~ 150000 cpm) con 45 µl de H₂O_d durante 5 min, tras lo cual se añadió de manera sucesiva: 10 µl de solución férrica (FeSO₄NH₄ [H₂O]₆ 100 µM, EDTA 200 µM), 10 µl de ascorbato sódico a 20 mM y 10 µl de peróxido de hidrógeno (H₂O₂) al 0,3 % (p/v). Tras 3 min de incubación a 30°C, la reacción se paró con 50 µl de solución STOP (30 µl de tiourea [100 mM]; 10 µl de EDTA 0,2 M; 20 µl de acetato sódico 3M [pH 4,8]). A continuación, se añadió 0,5 ml de etanol 100% y se dejó precipitar al menos 30 min en hielo seco o 12 h a -20°C. Se centrifugó 20 min a 10 000 g, el sedimento se lavó dos veces en etanol al 70 % (vol/vol) y se resuspendió en 25 µl de TE. A

continuación, se llevaron a cabo los ensayos de retardo en gel, para la identificación y corte de las bandas de poliacrilamida a analizar.

10. Ultracentrifugación analítica por velocidad de sedimentación.

La técnica de ultracentrifugación analítica es el método más apropiado para la determinación de la masa molecular y forma global aproximada de macromoléculas y, sobre todo, para la detección y la caracterización cuantitativa (estequiometría, afinidad, reversibilidad) de interacciones macromoleculares en disolución. En la modalidad de velocidad de sedimentación las macromoléculas son fraccionadas en campos centrífugos elevados en base a las diferencias en coeficiente de sedimentación (una función de la masa, la densidad, y la forma macromolecular). La primera información que estos experimentos nos darán es el grado de homogeneidad o heterogeneidad de los complejos macromoleculares. Este fraccionamiento también puede ser muy útil para detectar y cuantificar la estequiometría y la afinidad de dichos complejos. El análisis de la dependencia con el tiempo de los gradientes de soluto permite estimar el coeficiente de sedimentación y la masa molecular de cada especie que sedimenta. De esta información podemos también estimar y determinar la forma aproximada de las distintas especies moleculares que sedimentan (tanto los componentes libres como los complejos formados).

Procedimiento experimental:

La detección de la formación de complejos TtgR-ADN, y su posterior cuantificación, se llevó a cabo mediante velocidad de sedimentación. La estrategia experimental consistió en determinar el comportamiento en sedimentación de la proteína en ausencia y en presencia de ADN. La

concentración de ADN en estos experimentos se mantuvo fija (1 μM), mientras que la proteína se varió entre 1 y 30 μM . Los experimentos de velocidad de sedimentación se realizaron a 20°C en tampón de unión (Tris-HCl 10 mM, pH 7,0; acetato magnésico 10 mM; KCl 10 mM; glicerol 5 % [v/v]; EDTA 0,1 mM; con 1 mM TCEP en lugar de DTT). Las muestras se centrifugaron a 50,000 rpm en una ultracentrífuga modelo XL-A (Beckman-Coulter Inc.), equipada con un sistema óptico UV-VIS para la detección de la concentración de solutos, empleando un rotor An60Ti y piezas centrales de doble sector fabricadas en Epon-charcoal, de 12mm de paso óptico. Los perfiles de sedimentación se midieron cada cinco minutos a una absorbancia de 260 y 275 nm. El análisis de los perfiles de velocidad de sedimentación se realizó mediante el modelado global de los frentes de sedimentación a la ecuación de transporte de Lamm, de acuerdo con los procedimientos numéricos implementados en el programa SEDFIT. Este análisis permitió calcular las correspondientes distribuciones de coeficiente de sedimentación, $c(s)$ (Laue *et al.*, 1992). Estos valores de coeficientes de sedimentación fueron corregidos a condiciones estándar (20°C y agua, denominado $s_{20,w}$; van Holde, 1986) usando el programa SEDNTERP (Laue *et al.*, 1992). El posterior análisis hidrodinámico tanto de los componentes individuales como del complejo nucleoproteico, se realizó mediante el programa SEDFIT. Así, por ejemplo, se han podido determinar las correspondientes relaciones de fricción translacional (f/f_0 , donde f_0 denota la fricción de la esfera equivalente en tamaño), que nos da información sobre el grado de compactación de la especie macromolecular que sedimenta (Waxman *et al.*, 1993).

11. Calorimetría de titulación isotérmica

Los ensayos de calorimetría de titulación isotérmica se llevaron a cabo en un microcalorímetro *VP-ITC (MicroCal Inc.)*, haciendo variar, según el caso, la temperatura de la titulación, o el tampón del ensayo. El equipo consta de dos celdas idénticas de 1,4204 ml, una de referencia y otra que recibe la muestra a titular (p. ej. proteína), y de una jeringuilla o inyector micrométrico de 300 μ l de capacidad, que se rellena con la solución titulante (p. ej. ligando) y sirve el mismo de agitador. Todo el sistema está termostateado, el equipo mide por lo tanto la diferencia de calor entre las dos celdas generada por cada inyección.

Para la titulación de la proteína TtgR con sus efectores o su ADN diana, el ensayo se hizo generalmente en sentido *reverso* (solución de proteína en la celda, titulada con una solución de efector o ADN), aunque, para la unión al ADN, también se realizaron ensayos en sentido *directo* (solución de ADN en la celda, titulada con una solución de proteína).

Los tampones utilizados fueron: tampón de unión (Tris-HCl 10 mM, pH 7,0; acetato magnésico 10 mM; KCl 10 mM; glicerol 5 % [v/v]; EDTA 0,1 mM; DTT 1 mM) o, en el caso de algunos ensayos de unión a efectores, tampón Pipes (pipes 25 mM, pH 7,0; NaCl 250 mM; acetato magnésico 10 mM; KCl 10 mM; glicerol 5 % [v/v]; EDTA 0,1 mM; DTT 1 mM).

Preparación de las muestras:

La proteína se sometió a diálisis (2-5 ml) en 1 litro de tampón, a 4°C durante al menos 6 h. A continuación la solución de proteína se filtró (filtro de 0,4 μ m) y cuantificó (Bradford). Para la titulación de proteína con ADN, se utilizaron fragmentos de ADN de entre 30 y 40 pb generados por anillamiento de oligonucleótidos complementarios. Ambas soluciones (proteína y ADN) se sometieron a diálisis conjuntamente. Las concentraciones, tanto de proteína como de ADN, se ajustaron por dilución en el mismo tampón de diálisis

filtrado, previa cuantificación. Por su parte, las soluciones de efectores se prepararon al momento en tampón de diálisis filtrado.

Todas las soluciones se desgasificaron al vacío durante al menos 5 min, al momento de iniciar el ensayo en el microcalorímetro, siguiendo las instrucciones del equipo.

Titulación:

Las titulaciones consistieron en 30 – 90 inyecciones de entre 3 a 10 μl (la primera de 2 μl siendo descartada debido a la difusión durante el equilibrio), separadas entre ellas por 4 min, y con una velocidad de inyección de 0,5 $\mu\text{l}/\text{seg}$. La agitación del inyector se fijó a 300 rpm para todo el ensayo.

Análisis de datos:

La integración de los picos correspondientes al calor de cada inyección y su posterior análisis se hicieron con los algoritmos contenidos en el programa Origin (*MicroCal*) suministrado con el equipo. Se utilizaron los modelos *one binding site* (un solo tipo de sitio de unión independiente), o *sequential binding sites* (dos o más tipos de sitios de unión dependientes) según el caso, que permiten determinar las constantes ΔH (entalpía de unión) y K_A (constante de equilibrio de unión). Conociendo estas dos constantes, se deduce fácilmente la constante ΔS (entropía de unión) por la ecuación de la energía libre de Gibbs (ΔG):

$$\Delta G = -RT \ln K_A = \Delta H - T\Delta S \quad \Delta S = (\Delta H - \Delta G) / T$$

Por último, otro parámetro de interés dado esta vez por la curva de titulación misma, es la estequiometría de unión (n).

RESULTADOS

CAPÍTULO I

CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL *IN VIVO* DEL SISTEMA

TtgABC –TtgR de *P. putida* DOT-T1E

1. Caracterización funcional de la bomba TtgABC como elemento de resistencia múltiple a antibióticos y agentes antimicrobianos

Los primeros estudios de tolerancia a disolventes orgánicos llevados a cabo en la cepa *P. putida* DOT-T1E (Ramos *et al.*, 1998) indicaban ya la implicación de la bomba TtgABC en la resistencia a algunos antibióticos como cloramfenicol, ampicilina y tetraciclina. La posterior identificación de un segundo transportador homólogo, TtgDEF (Mosqueda *et al.* 2000), y, posteriormente, de un tercero, TtgGHI (Rojas *et al.* 2001), ambos implicados junto con TtgABC en la tolerancia a disolventes orgánicos, hacía necesario definir y caracterizar el grado de implicación de cada uno de estos transportadores en la resistencia múltiple a antibióticos. El estudio del sistema TtgABC-TtgR se realizó entonces en las cepas DOT-T1E silvestre, la cepa DOT-T1E13 (*ttgR*⁻), la cepa DOT-T1E30 (*ttgD*⁻, *ttgH*⁻) que porta únicamente la bomba TtgABC, y la cepa DOT-T1E34 (*ttgD*⁻, *ttgH*⁻, *ttgB*⁻) deficiente en los tres transportadores. Se utilizó el método de diluciones seriadas para determinar la concentración inhibitoria mínima (CIM) de distintos tipos de antibióticos y agentes biocidas o mutagénicos (ampicilina, carbenicilina, cloramfenicol, tetraciclina, ácido nalidíxico, norfloxacin, estreptomycin, triclosan y bromuro de etidio), así como de otros compuestos con capacidad antimicrobiana, de origen vegetal (cumestrol, berberina, quercetina, floretina, naringenina). Los resultados se recogen en las tablas 4 y 5.

Tabla 4. Susceptibilidad de la cepa *P. putida* DOT-T1E y derivadas a agentes antimicrobianos.

Cepa	CIM ($\mu\text{g/ml}$)									
	Ap	Cb	Cm	Ctx	Nal	Nor	Sm	Tc	Tcl	BrEt
DOT-T1E	128	256	64	16	64	2,5	12	4	>2000	2500
DOT-T1E18	8	8	8	2	8	0,625	3	0,25	16	625
DOT-T1E30	128	256	64	16	64	1,25	R	2	>2000	2500
DOT-T1E34	4	4	8	0,25	4	0,313	R	0,125	<2	625
DOT-T1E13	256	512	128	32	128	5	24	8	>2000	5000

R, resistente (la cepa lleva un marcador de resistencia al antibiótico); Ap, ampicilina; Cb, carbenicilina; Cm, cloramfenicol; Ctx, cefotaxima; Nal, ácido nalidíxico; Nor, norfloxacina; Sm, estreptomicina; Tc, tetraciclina; Tcl, triclosan; BrEt, bromuro de etidio.

Se observó que los valores de CIM, para todos los antibióticos y compuestos ensayados, eran muy superiores en la cepa silvestre T1E en comparación con los de la cepa T1E18, deficiente en el transportador TtgABC, siendo una evidencia clara de que este transportador confiere resistencia a múltiples antibióticos (Tabla 4). Así, TtgABC es capaz de expulsar una amplia batería de antibióticos clínicamente importantes y de distintos tipos y estructuras, además de otros agentes como el potente biocida triclosan o bromuro de etidio, un agente mutagénico.

No obstante, se podría pensar que la diferencia de susceptibilidad entre las cepa DOT-T1E y DOT-T1E18 no era consecuencia directa de la falta del transportador TtgB, sino debida a un efecto pleiotrópico de la mutación por alteración del equilibrio de las proteínas de membrana. Sin embargo esta hipótesis se descartó al observar que la resistencia de la cepa DOT-T1E30, una cepa mutante deficiente en dos de los tres transportadores homólogos Ttg, resultaba ser comparable a la de la cepa silvestre. Este resultado, junto con los obtenidos en el mutante DOT-T1E34, para el cual se observaron valores de CIM muy bajos y comparables a los de la cepa T1E18, muestran que de los tres transportadores homólogos Ttg identificados en *P. putida* DOT-T1E, sólo la

bomba TtgABC es necesaria y suficiente para alcanzar los altos niveles de resistencia a antibióticos observados.

Por otro lado, en la cepa DOT-T1E13, mutante deficiente en el represor TtgR del operón *ttgABC*, se observó que los valores de CIM de los compuestos ensayados eran superiores a los de la cepa silvestre, un resultado ya observado previamente para algunos antibióticos (Duque *et al.* 2001), y que indica que el aumento de la expresión de un transportador, en este caso por falta de represión ejercida por el regulador TtgR, provoca un aumento del nivel de resistencia. Este último resultado corrobora la implicación de la bomba TtgABC en la expulsión de antibióticos y biocidas de distinto tipo y estructura, constituyéndose como un elemento fundamental en la resistencia múltiple a antibióticos de la cepa *P. putida* DOT-T1E.

Siendo *P. putida* una bacteria ubicua en el suelo y capaz de colonizar tanto semillas como raíces de plantas (Espinosa-Urgel *et al.*, 2002) y dada la fuerte similitud de la bomba TtgABC con transportadores existentes en otras bacterias del suelo asociadas a plantas, para alguno de los cuales se ha demostrado su implicación en la resistencia frente a agentes antimicrobianos vegetales (Burse *et al.*, 2004; Palumbo *et al.*, 1998), surgió la inquietud de saber si TtgABC también podía conferir a *P. putida* DOT-T1E este tipo de resistencia. Se realizaron para ello los ensayos de determinación de CIM (tabla 5), con algunas modificaciones, ya que, la actividad antibacteriana de algunos antibióticos de origen vegetal sólo es visible con el uso combinado de inhibidores de transportadores (Tegos *et al.*, 2002), un recurso utilizado en la naturaleza por las mismas plantas para luchar contra bacterias patógenas (Stermitz *et al.*, 2000 a,b). Por lo tanto, las determinaciones de CIM se realizaron en ausencia y presencia del inhibidor MC₂₀₇₁₁₀ (fenilalanina-arginina- β -naftilamida), un compuesto descrito como inhibidor de transportadores de tipo RND (Renau *et al.*, 1999).

Tabla 5. Susceptibilidad de la cepa *P. putida* DOT-T1E y derivadas a compuestos antimicrobianos de origen vegetal.

CEPA	CIM ($\mu\text{g/ml}$)				
	Flo	Quer	Cum	Berb	Nar
T1E	2240	1080	400	1060	29000
T1E18	560	67,5	400	1060	3600
T1E13	2240	1080	400	1060	29000
T1E *	280	33,8	12,5	580	880
T1E18 *	35	4,2	0,78	580	110
T1E13 *	280	33,8	12,5	580	880

Flo, floretina; Quer, quercetina; Cum, cumestrol; Berb, berberina; Nar, naringenina; * : ensayos realizados en presencia del inhibidor MC₂₀₇₁₁₀ a una concentración sub letal (10 $\mu\text{g/ml}$).

En ausencia del inhibidor, los valores de CIM obtenidos para este grupo de compuestos vegetales frente a la cepa silvestre fueron superiores a los obtenidos en el caso de antibióticos clásicos, valores que superaban en algunos casos el orden del mg/ml (tabla 5), cercanos al límite de solubilidad. Un perfil similar presentó la cepa mutante DOT-T1E13, sin que se observara variación alguna en las CIM de estos compuestos. Por tanto *P. putida* DOT-T1E parecía altamente resistente a este tipo de compuestos de origen vegetal. En la cepa mutante DOT-T1E18, no se observaron cambios en la susceptibilidad frente a cumestrol y berberina, sugiriendo que ninguno de estos dos compuestos era expulsado por la bomba TtgABC. No obstante, en esta misma cepa se observó un claro aumento de susceptibilidad frente a los compuestos floretina, quercetina y naringenina (Tabla 5), indicando que eran sustratos de la bomba TtgABC. Incluso, en el caso de la quercetina, se obtuvo una CIM de 67,5 $\mu\text{g/ml}$, un valor equiparable al obtenido para antibióticos clásicos, lo que lo convierte en un compuesto vegetal con actividad antibacteriana significativa sobre la cepa DOT-T1E18. Este último resultado constituye la primera evidencia de la implicación de la bomba TtgABC en la resistencia de *P. putida* DOT-T1E a agentes antimicrobianos derivados de plantas.

La presencia del inhibidor MC₂₀₇₁₁₀, adicionado a una concentración subletal, potenció significativamente la actividad antimicrobiana sobre la cepa silvestre, no sólo de la quercetina, la naringenina, y la floretina, sino también del cumestrol. Además, los valores correspondientes de CIM fueron inferiores a los que se habían obtenido en la cepa DOT-T1E18 en ausencia del inhibidor (Tabla 5). Lo cual indica que estas moléculas señal de plantas tienen una actividad antibacteriana potencial sobre *P. putida* DOT-T1E, y al mismo tiempo, pone en evidencia la existencia de transportadores de tipo RND adicionales en esta cepa, que confieren, junto con TtgABC, resistencia frente a esta clase de agentes antimicrobianos de origen vegetal. La berberina fue el único compuesto ensayado, cuya acción no fue potenciada significativamente en presencia del inhibidor.

En la cepa DOT-T1E13, los valores de CIM en presencia del inhibidor fueron idénticos a los de la cepa silvestre, sin embargo, en la cepa DOT-T1E18 se observó un significativo aumento de la susceptibilidad a floretina, quercetina, cumestrol y naringenina, comparado con la cepa silvestre (Tabla 5). Esta pérdida de resistencia debida a la ausencia del transportador TtgABC, indica que el inhibidor MC₂₀₇₁₁₀ no inhibe completamente la actividad de este transportador, al menos en las condiciones del ensayo, al mismo tiempo que confirma la participación de la bomba TtgABC en la resistencia de *P. putida* DOT-T1E frente a estos agentes antimicrobianos de origen vegetal.

2. Estudio y caracterización de los promotores *PttgABC* y *PttgR*

2.1 Organización génica de los genes *ttgABC* en operón

El análisis de las secuencias de los genes *ttgA*, *ttgB* y *ttgC* (veáse apéndice 1) daba por evidente la organización en operón de estos tres genes, ya que el codón iniciador del gen *ttgC* solapa con el codón terminador del gen *ttgB*, y el codón iniciador del gen *ttgB* está separado del codón terminador del gen *ttgA*

por tan sólo 3 bases. Sin embargo, no se habían aportado evidencias experimentales para mostrar que *ttgABC* fuera una unidad única de transcripción. Para demostrarlo, se realizaron ensayos de transcripción reversa acoplada a una reacción en cadena de la polimerasa (*RT-PCR*) a partir de ARN total aislado de células de *P. putida* DOT-T1E cultivadas en medio rico LB. Los oligonucleótidos utilizados se diseñaron por pares correspondientes al final y principio de dos genes consecutivos (*ttgA-ttgB* y *ttgB-ttgC*, figura 3A). Los productos de *RT-PCR* y sus respectivos controles se analizaron por electroforesis en gel de agarosa (figura 3B). Se obtuvieron amplificaciones del tamaño esperado para cada par de oligonucleótido (526 pb para el par RTAB+/RTAB- y 368 pb para el par RTBC+/RTBC-), no obteniéndose amplificación en los controles negativos correspondientes, cuya mezcla no contenía transcriptasa reversa, pero si ADN polimerasa termoresistente (*Taq* polimerasa). Se demostró así la existencia de un mensajero único para los genes *ttgA* y *ttgB* por una parte, y *ttgB* y *ttgC* por otra, con lo cual quedaba demostrado que los genes *ttgABC* formaban parte de una misma unidad transcripcional.

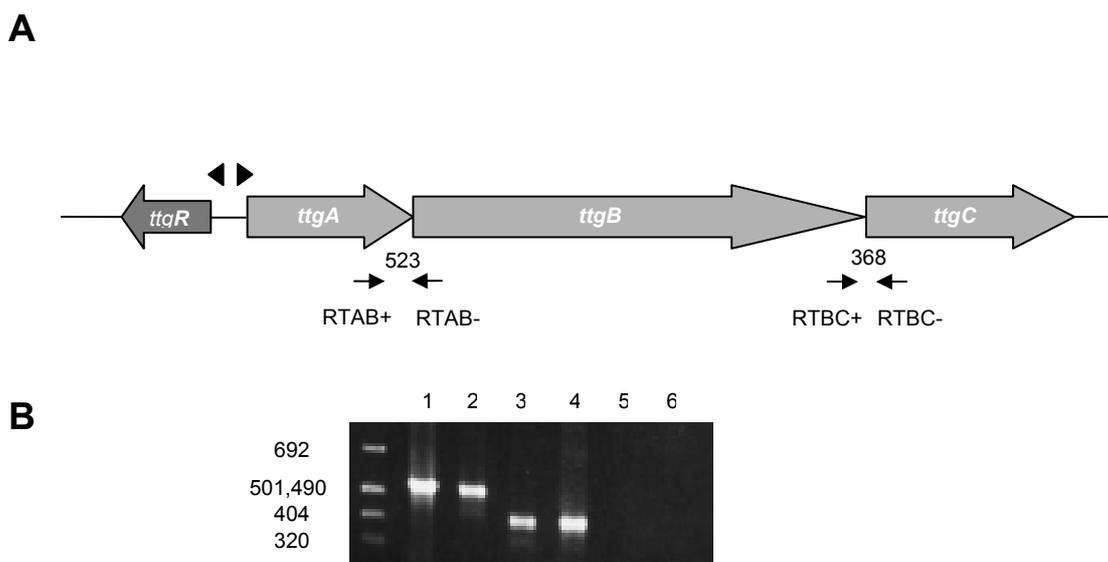


Figura 3. Análisis mediante RT-PCR de la organización transcripcional de los genes colindantes *ttgABC* en *P. putida* DOT-T1E.

A. Esquema de la localización de los cebadores utilizados en cada amplificación dentro de los genes *ttgABC* (para más detalles de la secuencia, véase anexo 1). Los triángulos indican la localización de los puntos de inicio de la transcripción de los genes *ttgR* y *ttgA* y su dirección de transcripción. Las flechas representan los cebadores utilizados en los ensayos de RT-PCR y los números el tamaño esperado del ADN amplificado.

B. Fotografía del gel de agarosa con los productos de RT-PCR.

Amplificaciones con el par de cebadores RTAB+ y RTAB- utilizando como molde ADN cromosómico (1) o ARN total (2). Amplificaciones con el par de cebadores RTBC+ y RTBC- utilizando como molde ADN cromosómico (4) o ARN total (3). Controles negativos de las reacciones 2 y 3 utilizando una mezcla desprovista de transcriptasa reversa pero con *Taq* ADN polimerasa (5 y 6 respectivamente).

En el margen izquierdo se indican los tamaños en pb de los patrones de peso molecular.

2.2 Expresión *in vivo* del operón *ttgABC* y del gen regulador *ttgR* en respuesta a disolventes y antibióticos

Estudios previos habían mostrado que la expresión basal del operón *ttgABC* disminuía en respuesta a la presencia de tolueno en el medio de crecimiento, a diferencia del gen *ttgR*, cuya expresión basal aumentaba al menos 4 veces en respuesta a tolueno (Duque *et al.*, 2001). Con la finalidad de corroborar este resultado y realizar estudios similares de expresión en respuesta a otros compuestos de interés, se midió la actividad de los promotores del operón *ttgABC* (P_{ttgABC}), y del gen *ttgR* (P_{ttgR}), cuantificando los niveles de ARNm

correspondientes a cada uno de ellos por extensión reversa a partir de cebador (figura 4). El ARN total fue aislado de cultivos de la cepa silvestre T1E crecida en medio rico (LB), en presencia o no de distintos sustratos de la bomba TtgABC a concentraciones sub letales (tolueno, estireno, cloramfenicol, ampicilina, tetraciclina, estreptomycin, carbenicilina, ácido nalidíxico). Las células se recogieron en fase exponencial tardía ($DO_{660}=1$) y el ARN total se aisló y cuantificó según se describe en Materiales y Métodos.

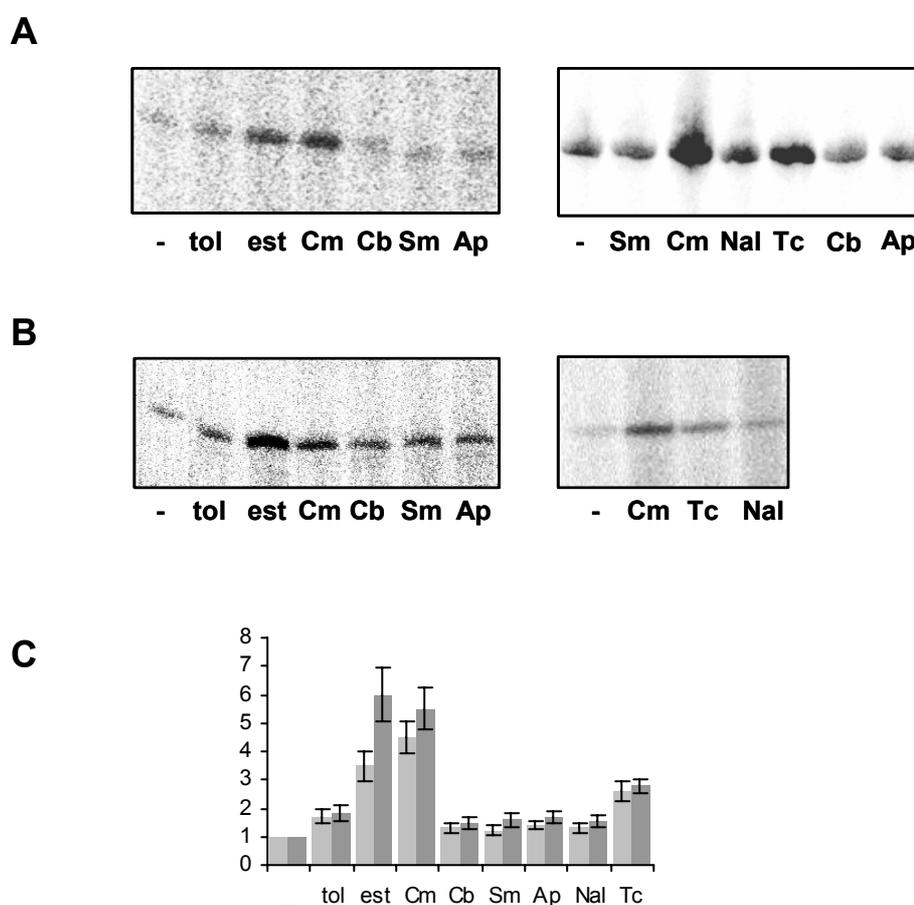


Figura 4. Expresión de los genes *ttgABC* y *ttgR* en la cepa silvestre DOT-T1E en respuesta a disolventes y antibióticos.

Actividad de los promotores P_{ttgABC} (A) y P_{ttgR} (B) en respuesta a disolventes y antibióticos presentes en el medio de cultivo a las concentraciones siguientes: tolueno, 3 mM (tol); estireno, 3 mM (est); cloramfenicol, 30 $\mu\text{g/ml}$ (Cm); carbenicilina, 120 $\mu\text{g/ml}$ (Cb), estreptomycin, 6 $\mu\text{g/ml}$ (Sm); ampicilina 64 $\mu\text{g/ml}$ (Ap); ácido nalidíxico 30 $\mu\text{g/ml}$ (Nal); tetraciclina, 1 $\mu\text{g/ml}$ (Tc). Las calles (-) corresponden al nivel basal de expresión en medio LB. En cada ensayo de extensión reversa se utilizaron 10 y 20 μg de ARN total para P_{ttgR} y P_{ttgABC} respectivamente. C, niveles relativos de inducción de P_{ttgABC} (■) y P_{ttgR} (■) respecto al nivel basal tras la cuantificación de las bandas de ADNc (promedio de dos series de experimentos independientes).

Los resultados obtenidos tras la cuantificación de la intensidad de las bandas de ADNc (figura 4 C) muestran en promedio que la expresión del operón *ttgABC* aumenta respecto al nivel basal en presencia de tolueno (1,7 veces), estireno (3,5 veces), cloramfenicol (4,5 veces) y tetraciclina (2,6 veces), y no varía significativamente en presencia de los demás antibióticos ensayados (ampicilina, carbenicilina, ácido nalidíxico y estreptomicina; <1,5 veces), aún siendo éstos sustratos de la bomba TtgABC. Se debe por lo tanto establecer una distinción entre compuestos que son sustratos de la bomba TtgABC y los que, a su vez, inducen un aumento en la expresión de ésta. Estos resultados difieren de los que hasta ahora describían la expresión de este transportador como constitutiva (Ramos *et al.*, 1998; Duque *et al.*, 2001; Rojas *et al.*, 2001), ya que se obtienen niveles de inducción de hasta 4,5 veces. Otra diferencia que cabe señalar, es la respuesta a disolventes orgánicos: la presencia de tolueno y de manera más significativa de estireno, promovió un aumento de la expresión del operón *ttgABC*, lo que contrasta con los anteriores ensayos con tolueno, en los que se describía una disminución de la expresión de la bomba (Duque *et al.*, 2001).

Por su parte, la actividad del promotor P_{ttgR} presentó el mismo perfil de expresión que el de la bomba (figura 4 B), con unos niveles de expresión globalmente superiores (se utilizó la mitad de ARN total en cada ensayo), y unos niveles de inducción mayores, pero con tendencias similares. En efecto, se observó un aumento en los niveles de ARNm de 1,8 veces en respuesta a tolueno, pero el factor de inducción fue mayor en presencia de estireno (6 veces) y de antibióticos como cloramfenicol (5,5 veces) o tetraciclina (2,8 veces). En presencia de los demás antibióticos ampicilina, carbenicilina, ácido nalidíxico y estreptomicina, la inducción fue similar o inferior a la del tolueno (< 1,7 veces).

Así, de esta primera serie de resultados hay que destacar, primero, que el tolueno no parece ser un disolvente orgánico que induzca significativamente la expresión de ambos promotores, segundo, que antibióticos como cloramfenicol

o tetraciclina son claros inductores de la expresión de estos genes, y tercero, que transportador y regulador presentan un perfil muy similar de la expresión de sus genes, lo que sugiere una co-regulación probablemente consecuencia del solapamiento de sus regiones promotoras.

El análisis de la expresión en el mutante DOT-T1E13 (*ttgR*) muestra, tal y como se había descrito anteriormente, una desrepresión de la expresión basal de los genes de la bomba TtgABC y del regulador TtgR (figura 5 A), confirmando tanto el carácter represor de este regulador, como la autoregulación negativa de éste.

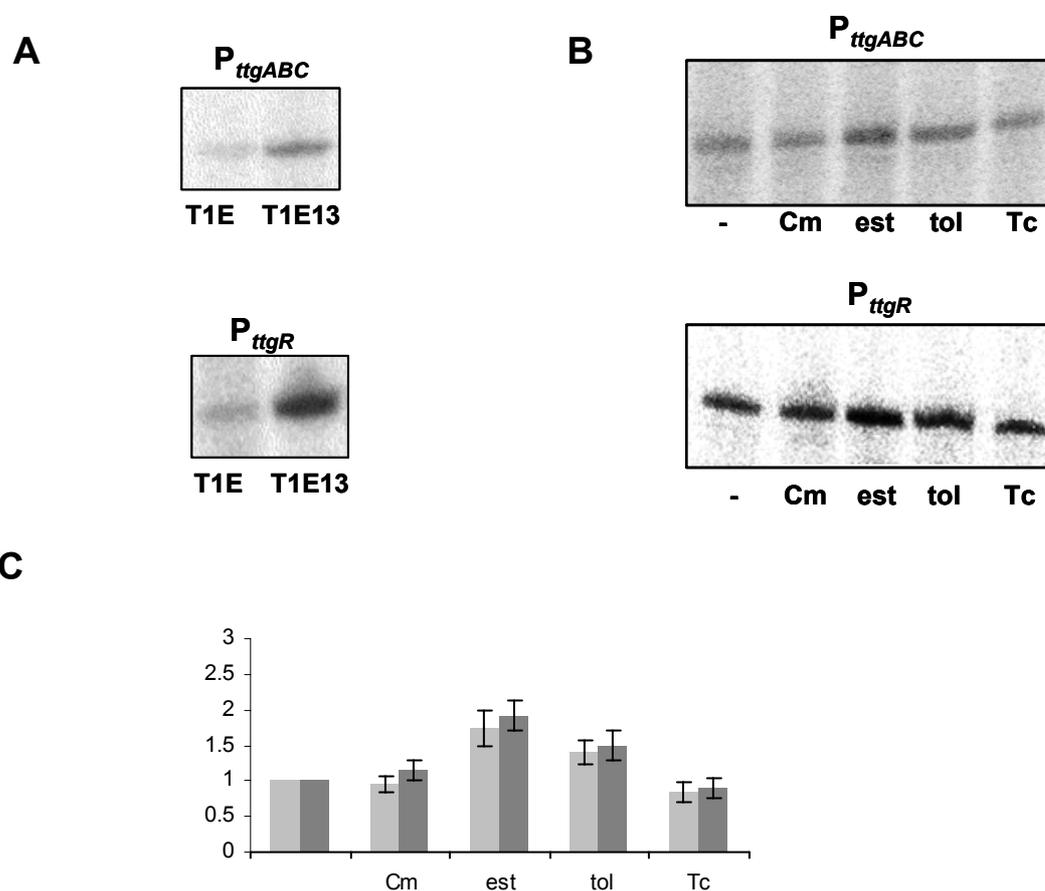


Figura 5. Expresión de los genes *ttgABC* y *ttgR* en la cepa mutante DOT-T1E13 en respuesta a disolventes y antibióticos.

A, actividad basal en la cepa silvestre DOT-T1E y mutante DOT-T1E13 de los promotores P_{ttgABC} y P_{ttgR} . B, actividad de los promotores P_{ttgABC} y P_{ttgR} en la cepa DOT-T1E13, en respuesta a disolventes y antibióticos presentes en el medio de cultivo. Nivel basal (-); tolueno, 3 mM (tol); estireno, 3 mM (est); cloramfenicol, 30 μ g/ml (Cm); tetraciclina 1 μ g/ml (Tc). C, niveles relativos de inducción de P_{ttgABC} (■) y P_{ttgR} (■) respecto al nivel basal, tras la cuantificación de las bandas de ADNc (promedio de dos series de experimentos independientes).

Los niveles de desrepresión alcanzados para ambos promotores (6 y 8 veces para P_{ttgABC} y P_{ttgR} respectivamente (figura 5 A), fueron mayores que los niveles de inducción máximos obtenidos en la cepa silvestre (4 y 6 veces respectivamente, figura 4 C), sugiriendo que, aún en presencia de inductores, TtgR sigue ejerciendo cierto grado de represión en ambos promotores. La presencia de inductores no consigue en este caso la desrepresión total de estos promotores, probablemente debido al aumento paralelo de la expresión del represor TtgR, previniéndose así una sobreexpresión descontrolada de la bomba que podría ser perjudicial para la célula en términos energéticos y de integridad de membrana (Lee y Edlin, 1985; Nguyen *et al.*, 1989).

Por otro lado, la expresión tanto del operón *ttgABC* como del regulador *ttgR*, en presencia de antibióticos y disolventes en el mutante DOT-T1E13 (figura 5, B y C), resultó ser prácticamente constitutiva, con niveles de inducción bajos (entre 0,85 y 1,45), excepto para el estireno (1,75 – 1,92). Esta ausencia de una inducción significativa de la expresión génica en presencia de inductores, así como la desrepresión observada en ausencia de TtgR, apuntan hacia la implicación directa del represor TtgR en la regulación tanto por antibióticos como por disolventes orgánicos de los genes *ttgABC* y *ttgR*.

2.3 Actividad de los promotores P_{ttgABC} y P_{ttgR} en función de la fase de crecimiento

La expresión de transportadores de antibióticos y disolventes, homólogos a TtgABC, codificados por los operones *acrAB* en *E. coli* y *mexAB* en *P. aeruginosa*, depende de la fase de crecimiento, ambos alcanzando un máximo nivel de expresión en fase exponencial tardía (Ma *et al.*, 1995 y 1996; Evans *et al.*, 1995; Sánchez *et al.*, 2002). Con objeto de analizar este aspecto en *P. putida* DOT-T1E, se utilizaron los plásmidos pED14 y pED13, que portan las fusiones transcripcionales $P_{ttgABC}::'lacZ$ y $P_{ttgR}::'lacZ$, respectivamente. Estas construcciones

se introdujeron en la cepa T1E mediante electroporación, y la actividad basal de los promotores se cuantificó midiendo la actividad β -galactosidasa a lo largo de la curva de crecimiento (Figura 6). Ambos promotores presentaron un comportamiento similar, alcanzando un nivel de expresión basal máximo en fase exponencial tardía (45 ± 4 UM y 111 ± 9 UM para P_{ttgABC} y P_{ttgR} respectivamente), nivel que fue disminuyendo paulatinamente conforme las células entraban en fase estacionaria. A pesar de esta disminución, ambos promotores mantuvieron cierto nivel de actividad después de 10 horas iniciada la fase estacionaria (34 ± 5 UM y 91 ± 8 UM para P_{ttgABC} y P_{ttgR} respectivamente).

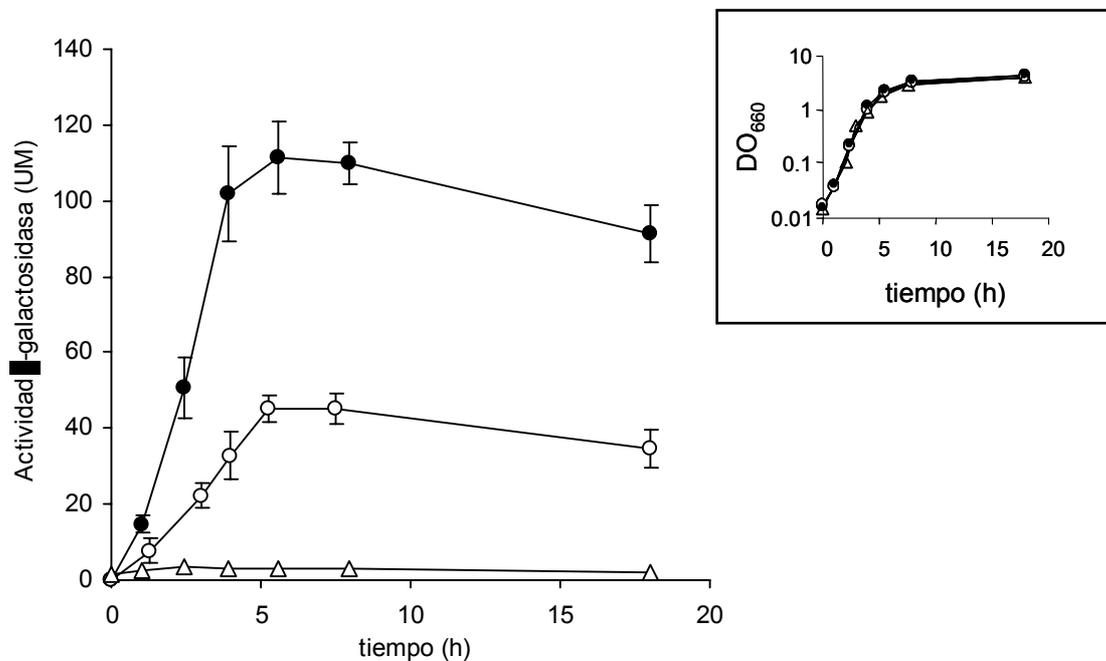


Figura 6. Efecto de la fase de crecimiento sobre la actividad de los promotores P_{ttgABC} y P_{ttgR} de *P. putida* DOT-T1E.

Células de *P. putida* DOT-T1E portando los plásmidos pED14 ($P_{ttgA}::lacZ$, ●), pED13 ($P_{ttgR}::lacZ$, ○), y pMP220 (Δ), fueron puestas a crecer en medio LB con tetraciclina, a 30°C y en agitación durante 18 h. La turbidez celular (DO_{660} , gráfico insertado) y la actividad β -galactosidasa (unidades Miller, UM), se midieron cada hora hasta alcanzar la fase estacionaria, y a las 10 h después de haber entrado en esta fase. Los resultados corresponden al promedio de 3 experimentos con su correspondiente desviación estándar.

2.4 Identificación de factores sigma implicados en la transcripción de los genes *ttgABC* y *ttgR*.

Los resultados anteriores reflejaban la expresión basal a nivel transcripcional de *ttgABC* y *ttgR* a lo largo de la curva de crecimiento. Estos genes se transcriben en fase exponencial alcanzando su máxima expresión al final de ésta. Una vez entrado en fase estacionaria, aunque la actividad parece ir disminuyendo, sigue habiendo un nivel de transcripción basal significativo. Estas características, junto con la gran similitud de secuencia que presentan las regiones -10 y -35 de ambos promotores con las correspondientes secuencias consenso de promotores dependientes del factor de transcripción σ^{70} (figura 1.B, Duque *et al.*, 2001), sugerían que la transcripción podía ser dependiente del factor σ^{70} y de σ^5 en fase estacionaria, como se ha descrito para algunos promotores dependiente de σ^{70} (Ishihama, 1999, Henge-Aronis, 2002).

Para corroborar esta hipótesis, se utilizaron cepas mutantes en cada uno de estos factores sigma como hospedadoras de los plásmidos pED13 y pED14. Por un lado, la cepa *E. coli* UQ285 mutante termosensible en *rpoD*, en la que el factor σ^{70} es funcional a temperaturas permisivas (30 - 37°C) y no funcional a 42°C (Nakamura *et al.*, 1983). Y por otro lado, la cepa *P. putida* C1R1, derivada de *P. putida* KT2440 deficiente en el factor σ^5 (Ramos-Gonzalez *et al.*, 1998).

En la cepa *E. coli* UQ285, la actividad de los promotores P_{ttgABC} y P_{ttgR} portados por los plásmidos pED14 y pED13 respectivamente, se midió cuantificando los niveles de ARNm por extensión reversa a partir de cebador (figura 7). El ARN total se aisló a partir muestras celulares de las cepas transformadas, cultivadas en medio rico (LB) y a 37°C, tomadas en dos condiciones: una en fase exponencial (DO660=0,4) y otra a principios de fase estacionaria (DO660=3,2) (figura 7 A). Tras dividir las muestras en dos partes alícuotas, cada una fue sometida a una incubación de 30 min a 37°C y 42°C

respectivamente, con objeto de comprobar el efecto de la inactivación de σ^{70} sobre la actividad transcripcional de los promotores P_{ttgABC} y P_{ttgR} .

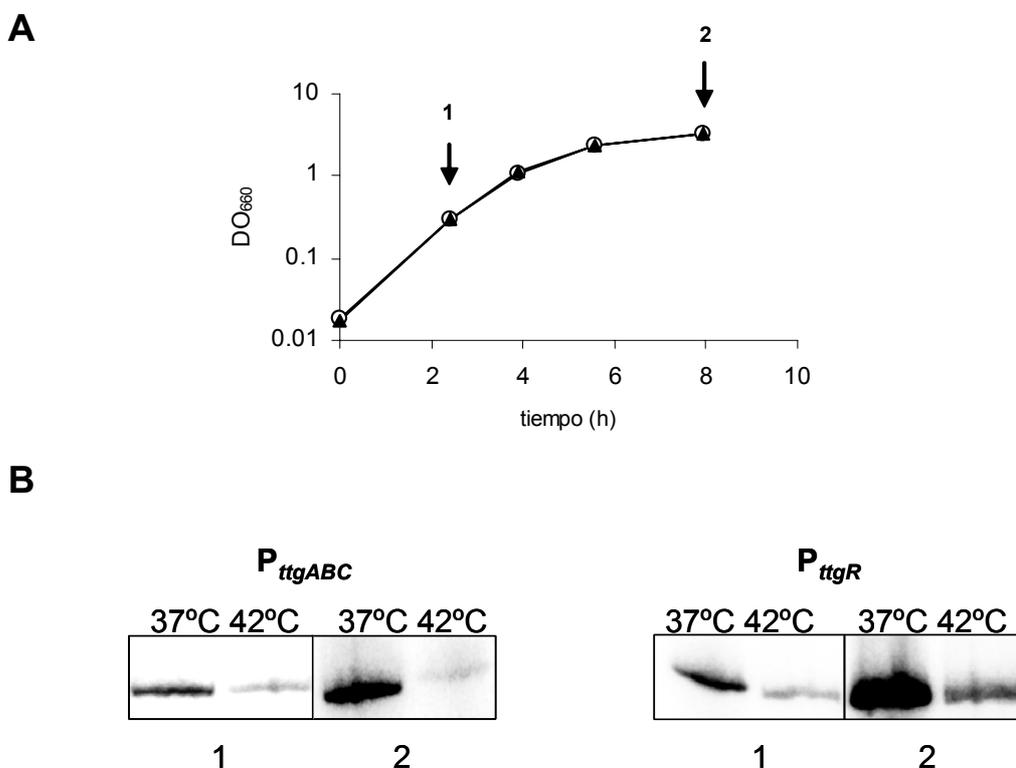


Figura 7. Transcripción desde los promotores P_{ttgABC} y P_{ttgR} en la cepa *E. coli* UQ285 ($RpoD^{ts}$).

A. Curvas de crecimiento de cultivos de *E. coli* UQ285 portando los plámidos pED13 (▲), y pED14 (○). Las flechas ilustran la toma de muestras en fase exponencial (1) y estacionaria (2).

B. Niveles de mensajeros transcritos desde los promotores P_{ttgABC} y P_{ttgR} en la cepa *E. coli* UQ285. Las muestras (1 y 2) de cada cultivo fueron divididas en dos, y cada mitad fue incubada a 37°C y 42°C durante 30 minutos, antes de aislar el ARN total. Los resultados mostrados son representativos de dos experimentos independientes.

La cuantificación de las bandas de ADNc correspondientes a los mensajeros transcritos desde los promotores P_{ttgABC} y P_{ttgR} reveló una notable disminución (>80 %) de los niveles de mensajeros en las muestras incubadas a 42°C, ya sean de fase exponencial o tardía. Estos resultados evidencian por lo tanto que ambos promotores dependen del factor σ^{70} para su transcripción tanto en fase exponencial como en fase estacionaria. Por otro lado, la mayor intensidad de las bandas de ADNc observada en fase estacionaria, es acorde con los resultados de β -galactosidasa en *P. putida* DOT-T1E, en los que se

obtuvo un máximo nivel de expresión en este mismo momento de la fase de crecimiento.

Para ver, esta vez, el papel del factor σ^S sobre la transcripción de estos genes, se utilizaron las cepas isogénicas *P. putida* KT2440 (silvestre) y *P. putida* C1R1 (*rpoS*), transformadas con los plásmidos pED13 y pED14, se midió la actividad β -galactosidasa, a lo largo de la curva de crecimiento, tal y como se hizo para la cepa *P. putida* DOT-T1E (figura 8). No se detectaron diferencias significativas en los perfiles de actividad de los promotores P_{ttgABC} y P_{ttgR} entre la cepa mutante C1R1 y la cepa silvestre, en toda la curva de crecimiento, incluso en fase estacionaria. Lo que muestra que la transcripción desde estos dos promotores no es dependiente del factor σ^S .

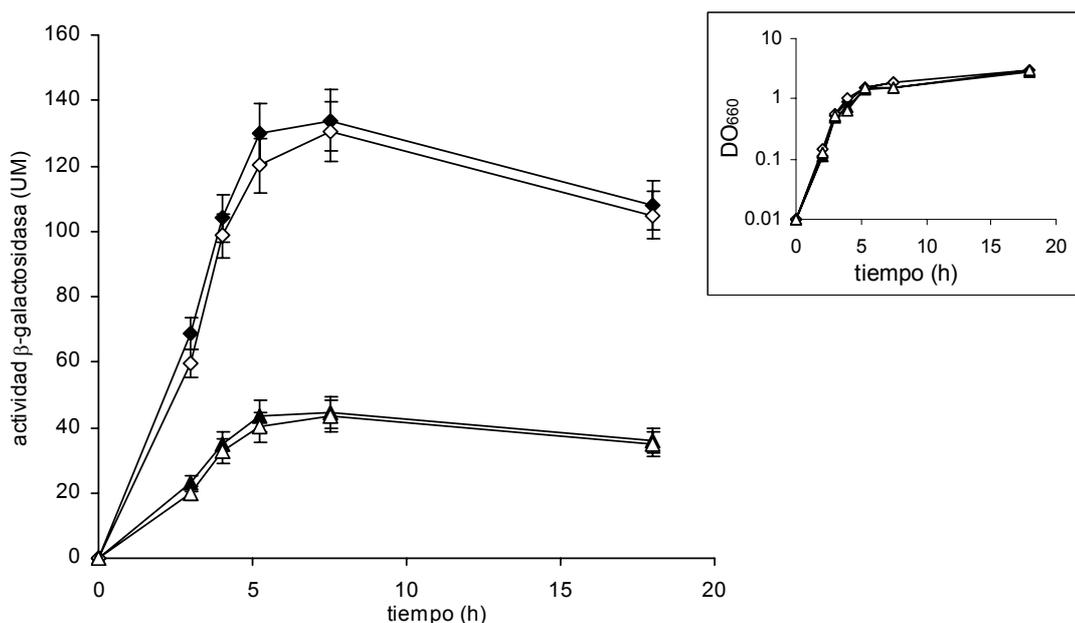


Figura 8. Actividad de P_{ttgABC} y P_{ttgR} en las cepas *P. putida* KT2440 y C1R1 (*rpoS*).

Células de *P. putida* KT2440 (símbolos negros) y *P. putida* C1R1 (símbolos blancos) portando los plásmidos pED13 (rombos), y pED14 (triángulos) fueron puestas a crecer en medio LB con tetraciclina, a 30°C y en agitación durante 18 h. La turbidez celular (DO_{660} , gráfico insertado) y la actividad β -galactosidasa (unidades Miller, UM), se midieron cada hora hasta alcanzar la fase estacionaria, y a las 10 h después de haber entrado en esta fase. Los resultados corresponden al promedio de 3 experimentos, con su correspondiente desviación estándar.

2.5 Efecto de diversos tipos de estrés sobre la expresión del operón *ttgABC*.

La expresión del sistema de transporte AcrAB de *E. coli*, homólogo a TtgABC, aumenta en respuesta a condiciones de estrés general (Ma *et al.* 1995; Aono, 1998). Con el fin de explorar esta posibilidad en *P. putida* DOT-T1E, se midió la actividad de su promotor en células sometidas a distintos tipos de estrés. Se evaluaron las respuestas a estrés por choque oxidativo (peróxido de hidrógeno 0,1% [p/v]), etanólico (etanol 4% [v/v]), osmótico (NaCl 0,5 M), térmico (42°C), o por detergentes (SDS 0,03% [p/v] y triton 0,1% [v/v]) (figura 9).

De todos los tipos de estrés a que fue sometida la cepa DOT-T1E, sólo el choque etanólico produjo un aumento significativo de la expresión del operón *ttgABC* (1,7 veces). Por otro lado, la obtención de una inducción similar en el mutante DOT-T1E13 (resultado no mostrado), demostraba que este aumento de la expresión de *ttgABC* era independiente del regulador TtgR. No obstante, al no detectarse un comportamiento similar en respuesta a ningún otro tipo de estrés, quedaba descartado que el operón *ttgABC* estuviera situado en una cascada o red de regulación global por estrés.

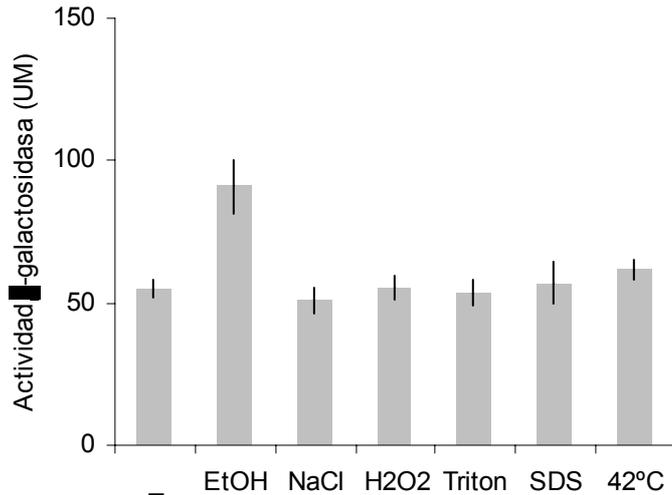


Figura 9. Efectos de diversos tipos de estrés sobre la expresión del operón *ttgABC*.

Células de *P. putida* DOT-T1E portando el plásmido pED14 (PttgABC::lacZ) fueron puestas a crecer en LB con tetraciclina, a 30°C hasta alcanzar una $DO_{660}=0,4$, tras lo cual el cultivo fue dividido en partes alícuotas, y cada una sometida a un tipo de estrés distinto. La actividad β-galactosidasa se midió tras 2 horas en condiciones de estrés. EtOH, etanol al 4 % (v/v); NaCl 0,5 M; H2O2, peróxido de hidrógeno a 40 μM; Tritón al 0,1 % (v/v); SDS al 0,03 % (p/v).

2.6 Identificación de nuevos tipos de inductores de la expresión de los genes *ttgABC-ttgR*.

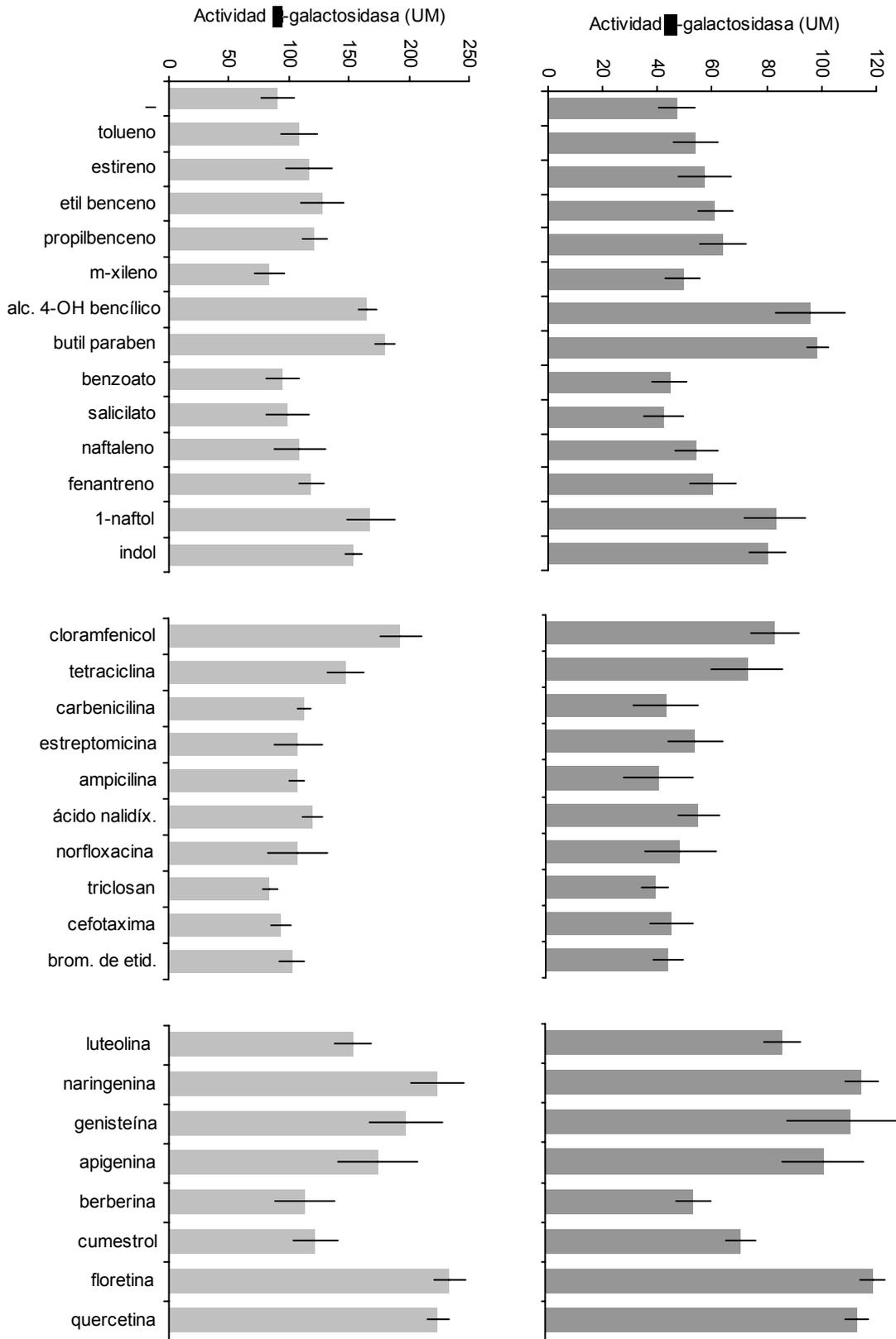
Los estudios de expresión de los genes *ttgABC* y *ttgR* en respuesta a algunos disolventes orgánicos y a antibióticos en la cepa silvestre *P. putida* DOT-T1E (véase apartado 2) permitieron identificar algunos inductores de la expresión de estos genes, como estireno, cloramfenicol, tetraciclina, y, en un segundo plano, tolueno. Los mismos ensayos llevados a cabo en la cepa mutante T1E13 (*ttgR*), lograron por su parte especificar si dicha inducción era o no mediada por el regulador TtgR. Esta misma estrategia se empleó con el propósito de identificar nuevos inductores de la expresión de los genes de resistencia *ttgABC*, y por lo tanto, efectores potenciales de TtgR. Para ello se utilizaron nuevamente los plásmidos pED13 y pED14, introduciéndolos en las cepas DOT-T1E y DOT-T1E13. Aunque la medida de la actividad β-galactosidasa resultó ser un método mucho menos sensible que la técnica de

extensión reversa de cebador previamente utilizada, este método ofreció la ventaja de poder cuantificar los niveles de expresión de forma repetida y rutinaria.

Los compuestos ensayados se añadieron a los cultivos celulares en fase exponencial ($DO_{660}=0,4 - 0,5$), y siempre a concentraciones sub letales, para que no afectaran el crecimiento de la cepa con respecto al control (cultivo sin inductor añadido), buscando ver principalmente su efecto sobre la expresión transcripcional de los genes estudiados y su regulación por parte de TtgR, e intentando descartar un efecto de tipo estrés como se observó para el etanol. Se ensayaron tres tipos de compuestos: disolventes y aromáticos diversos, algunos utilizados como agentes bacteriostáticos o bactericidas como el butil paraben o el alcohol bencílico, antibióticos y biocidas identificados como sustrato de la bomba TtgABC (véase apartado 1), y por último, moléculas señal de origen vegetal, algunas también identificadas como sustrato de la bomba TtgABC y con propiedades antibacterianas (véase apartado 1 de esta sección). Varias de estas han sido descritas como inductoras de la expresión de sistemas de transporte homólogos a TtgABC en bacterias asociadas a plantas (Burse *et al.*, 2004; Palumbo *et al.*, 1998).

Una característica global de estos ensayos, fue que los factores de inducción se situaron entre 1 y 2,3 veces (figura 10), inferiores a los obtenidos por extensión de cebador (hasta 6 veces), lo mismo ocurrió con el nivel basal en la cepa DOT-T1E13: la desrepresión respecto a la cepa silvestre se situaba alrededor de un factor 2,5 (<6-8 en ARNm). Un fenómeno frecuente en este tipo de sistemas con promotores portados por plásmidos, probablemente debido al aumento del número de copias de promotores por proteína reguladora. No obstante, el bajo número de copias de este plásmido (Spaink *et al.*, 1991), le da validez a su uso en estos ensayos, ya que lo que se busca es una comparación, en términos relativos, del efecto de diferentes inductores.

A



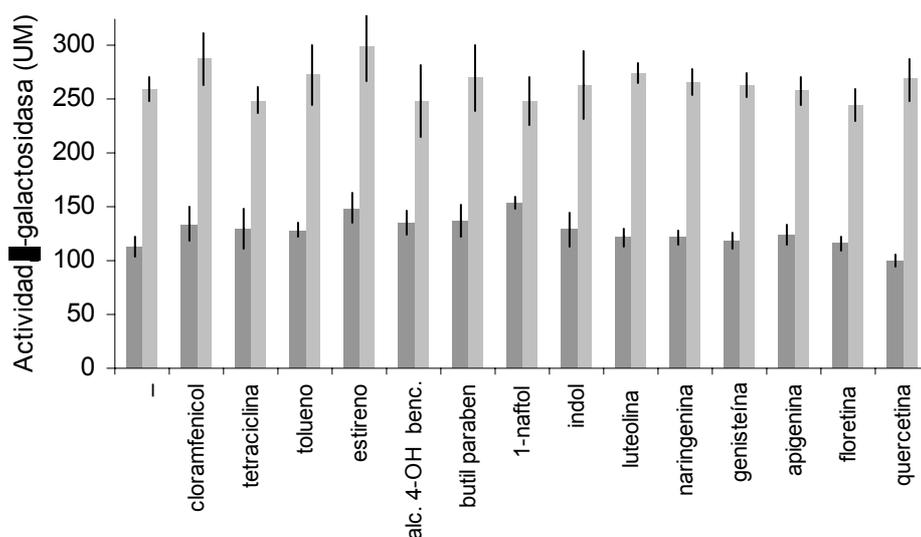
B

Figura 10. Actividad de los promotores P_{ttgABC} y P_{ttgR} en presencia de disolventes aromáticos, antibióticos y metabolitos secundarios de plantas.

Células de *P. putida* DOT-T1E (A) o DOT-T1E13 (B), portando los plásmidos pED14 (P_{ttgABC}::lacZ, ■) y pED13 (P_{ttgR}::lacZ, ■) fueron puestas a crecer en LB, a 30°C, hasta alcanzar una DO₆₆₀=0,5, tras lo cual el cultivo fue dividido en partes alícuotas. A cada una, se le añadió el compuesto indicado (antibióticos, ¼ de la CIM correspondiente; disolventes aromáticos y compuestos derivados de plantas, 1 mM) y se incubaron nuevamente a 30°C por 2 horas adicionales, antes de medir la actividad β-galactosidasa. alc. 4-OH benc., alcohol 4-hidroxibencílico; ácido nalidíx., ácido nalidíxico; brom. de etid., bromuro de etidio.

Claramente, se pudo observar que los genes *ttgABC* y *ttgR* presentaron un perfil de expresión similar en condiciones de cultivo idénticas (Figura 10A), algo que ya se había presenciado en el apartado 2. de este capítulo, y que lleva implícito la co-regulación de ambos operones. La respuesta a antibióticos o biocidas mostró un perfil acorde con los datos de extensión de cebador (exceptuando los valores numéricos de inducción), ya que sólo los antibióticos cloramfenicol y tetraciclina fueron capaces de aumentar significativamente la expresión transcripcional de *ttgABC* y *ttgR* (aumento de 1,9 y 1,5 veces respectivamente, figura 10A). Los demás antibióticos, algunos ensayados anteriormente como carbenicilina, estreptomycin, ampicilina, o ácido nalidíxico, y otros identificados como nuevos sustratos para TtgABC

(norfloxacin, cefotaxima, triclosan o bromuro de etidio), no promovieron un aumento significativo de la expresión (entre 0,9 y 1,2 veces).

Entre los compuestos aromáticos ensayados, figuran hidrocarburos derivados del benceno (tolueno, estireno, *m*-xileno, propil- y etil-benceno), todos sustratos de la bomba TtgABC (Rojas *et al.*, 2001), alcoholes bencílicos, benzoatos, aromáticos policíclicos como naftaleno o fenantreno y derivados. Los hidrocarburos derivados del benceno no resultaron ser los mejores inductores (figura 10 A). El estireno, por ejemplo, provocó una inducción de sólo 1,3 veces en ambos promotores. De entre todos los compuestos aromáticos ensayados los mejores inductores de la expresión resultaron ser el butil paraben (2,0 veces), el alcohol 4-hidroxibencílico (1,9 veces), el 1-naftol (1,8 veces) y el indol (1,7 veces).

Por último y de manera sorprendente, las moléculas señal de plantas resultaron ser el grupo con mejores inductores de la expresión de los genes *ttgABC* y *ttgR* (Figura 10A). En efecto, los niveles de expresión alcanzados en presencia de algunos de estos compuestos de origen vegetal (inducciones de hasta 2,3 veces en presencia de moléculas de tipo flavonoide como naringenina, fletina o quercetina) resultaron muy próximos a los alcanzados en la cepa DOT-T1E13, es decir en condiciones de total desrepresión. Otros, como apigenina o cumestrol mostraron un efecto inductor más discreto sobre la expresión de los genes, o casi nulo, como el caso de la berberina.

Para comprobar que estas inducciones eran dependientes del regulador TtgR, e identificar efectores potenciales de TtgR, se analizó la actividad de ambos promotores en la cepa mutante DOT-T1E13. Se seleccionaron aquellos compuestos que inducían más de 1,5 veces, además de los disolventes tolueno y estireno, utilizados como controles (Figura 10B). No se logró detectar inducción alguna de los genes *ttgABC* ni *ttgR* en esta cepa mutante, ya que la inducción fue, en promedio, de $1,03 \pm 0,09$ para todos los compuestos. Esto

demuestra que todos los inductores identificados mediante estos ensayos parecen ser efectores de la proteína reguladora TtgR.

3. Transporte a través de la bomba TtgABC.

Los resultados de las secciones anteriores han permitido elucidar nuevas capacidades de la bomba de expulsión TtgABC, constituyéndose como un elemento esencial de resistencia múltiple frente a agentes antibacterianos, ya sean antibióticos de uso clínico, biocidas o metabolitos secundarios de plantas presentes de forma más natural en el suelo, el hábitat de *P. putida* DOT-T1E. Además, quedó demostrado que los genes *ttgABC* respondían a algunos de estos agentes antimicrobianos a través de su regulador TtgR, aumentando su expresión transcripcional. Faltaba por lo tanto definir la relevancia funcional de ese aumento en la expresión génica. Para ello, se realizaron ensayos de transporte *in vivo*, midiendo la acumulación en tiempo real de bromuro de etidio (BrEt), sustrato de la bomba TtgABC, en células de *P. putida* DOT-T1E. El BrEt es un agente fluorescente que se intercala entre las bases nitrogenadas del ADN. En este estado es cuando emite mayor fluorescencia, por lo tanto, una vez dentro de la célula. Esto permite seguir la acumulación de BrEt en células vivas y en tiempo real, registrando el aumento de fluorescencia de una suspensión celular a la que se añade BrEt. Si existe un sistema transportador que expulse el BrEt, su acumulación intracelular será más lenta en función del tiempo, lo que se verá reflejado en la curva de medida de la fluorescencia.

Las células fueron cultivadas en medio LB, en condiciones normales o en presencia de dos inductores de la expresión identificados anteriormente (cloramfenicol y naringenina). Como controles, también se utilizaron células de las cepas mutantes DOT-T1E18 (*ttgB*⁻) y DOT-T1E13 (*ttgR*⁻).

La acumulación de BrEt fue claramente mayor en la cepa mutante T1E18 (Figura 11, curva a) que en la cepa silvestre (curva b), lo que revela la expulsión activa de bromuro de etidio por el transportador TtgABC. Por su parte la

acumulación en la cepa mutante T1E13 (curva e) fue más lenta, que en la cepa silvestre, indicando que la desrepresión de los genes *ttgABC* a nivel transcripcional, se refleja en una menor acumulación del BrEt en la célula, o lo que viene a ser lo mismo, en un fuerte aumento del transporte por parte de TtgABC. Más aún, la presencia, en los cultivos de la cepa DOT-T1E, de inductores de la expresión de los genes *ttgABC* (cloramfenicol y naringenina, curvas c y d respectivamente) provoca un desplazamiento de la curva de acumulación hacia la curva de la cepa T1E13, lo que indica un aumento de la expulsión debido a la inducción de la expresión de la bomba por estos compuestos. Cabe advertir que la pre-incubación con naringenina, mejor inductor del operón *ttgABC* que el cloramfenicol (Figura 10), permitió obtener una menor acumulación de BrEt (curva d) que el cloramfenicol (curva c). Estos resultados ponen en evidencia que existe una relación directa entre la expresión transcripcional del operón *ttgABC*, y la efectividad de la expulsión por parte de la bomba TtgABC.

La adición de azida sódica, un potente agente disipador de la fuerza protón-motriz, provocó un marcado aumento en la acumulación de bromuro de etidio en las cepas DOT-T1E y DOT-T1E13, lo que confirma la existencia de un proceso de transporte dependiente de energía y hacia el medio extra celular. En la cepa DOT-T1E18, este efecto no fue tan marcado (curva a), lo que proporcionó validez al ensayo, ya que demostró que se estaba observando mayoritariamente la actividad de la bomba TtgABC.

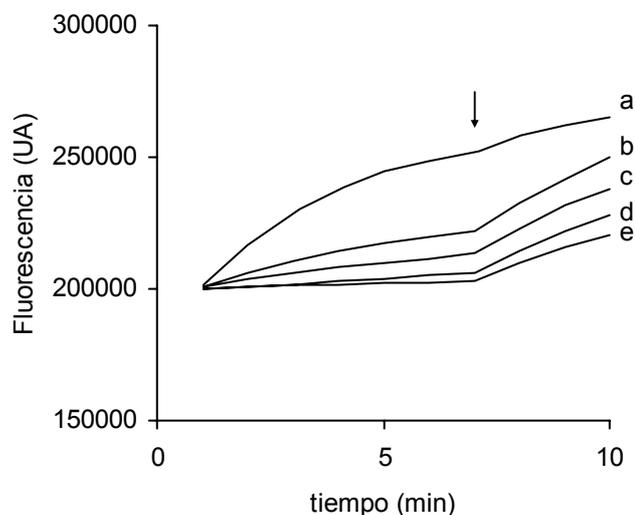


Figura 11. Acumulación de bromuro de etidio en células enteras de *P. putida* DOT-T1E y derivadas.

Acumulación en células de *P. putida* DOT-T1E cultivadas en ausencia (b), o presencia de 30 µg/ml de cloramfenicol (c), o 0,5 mM de naringenina (d). La acumulación intracelular de bromuro de etidio se midió en tiempo real por fluorescencia, como se describe en Materiales y Métodos. Como controles, se utilizaron células de las cepas mutantes DOT-T1E18 (a), y DOT-T1E13 (e), cultivadas en ausencia de inductor (en presencia de estos, no hubo diferencias significativas en las curvas de acumulación por lo que se han omitido para mayor claridad). A los 7 minutos, se añadió 10 mM de azida sódica (flecha) a las suspensiones celulares.

Estos resultados, al poner de manifiesto la estrecha relación entre el nivel de transcripción de los genes *ttgABC* y la actividad de sus productos, sitúan al regulador TtgR en una posición central en este proceso, ya que es el que ejerce el control transcripcional, permitiendo la modulación del transporte por moléculas señal. Los mecanismos moleculares de dicho control transcripcional por parte de TtgR serán explorados en el siguiente capítulo.

CAPÍTULO II

CARACTERIZACIÓN *IN VITRO* DE LA PROTEÍNA REGULADORA TtgR

1. Análisis computacional de la proteína TtgR.

El gen *ttgR* codifica la proteína represora TtgR de 210 residuos con un peso molecular teórico de 24854 Da y un punto isoeléctrico de 5,83 (<http://bo.expasy.org/tools/protparam.html>). La proteína posee en su primer tercio un dominio de 47 amino ácidos (residuos 13 a 59, código PFAM: PF00440) muy conservado entre los miembros de la familia de reguladores TetR (Aramaki *et al.*, 1995; Hillen y Berens, 1995; Ramos *et al.*, 2005). Las estructuras tridimensionales obtenidas para 4 miembros de esta familia cuya función biológica está definida (TetR, QacR, CprB y EthR) (Hinrichs *et al.*, 1994; Kisker *et al.*, 1995; Orth *et al.*, 2000; Schumacher *et al.*, 2001 y 2002; Natsume *et al.*, 2004; Dover *et al.*, 2004), revelan que este dominio contiene un motivo de unión al ADN de tipo hélice giro hélice (*Helix Turn Helix*, HTH) muy conservado estructuralmente. Los dos tercios restantes, poco conservados en secuencia dentro de la familia, constituyen tanto el dominio de unión al efector (residuos 60 a 210), como de dimerización (Aramaki *et al.*, 1995; Hillen y Berens, 1995; Ramos *et al.*, 2005).

Una predicción por métodos computacionales de la estructura secundaria utilizando dos algoritmos diferentes (SCRATCH, <http://www.igb.uci.edu/tools/scratch/> y PSIPRED, <http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/cgi-bin/psipred/>), reveló que la proteína TtgR estaría conformada por 9 α -hélices (figura 12), al igual que QacR y EthR, y a diferencia de TetR y CprB que poseen 10 α -hélices. Entre ellas, las hélices 1 a 3 y parte de la hélice 4 constituirían el dominio de unión al ADN (residuos 1 a 59), cuyo motivo HTH estaría formado por las hélices cortas 2 y 3 (residuos 34 a 51). El resto, constituido por parte de la hélice 4 y las hélices restantes, conformaría el dominio de unión al efector y dimerización. En esta última estarían implicadas las α -hélices 8 y 9 (figura 12).

regulador potencial de la bomba de expulsión de múltiples antibióticos ArpABC de la cepa tolerante a disolventes *P. putida* S12 (Kieboom *et al.*, 2001), idéntico en secuencia al regulador potencial TtgR de *P. putida* KT2440 (Q89N29) y al regulador MepR de la bomba de disolventes y antibióticos MepABC de *P. putida* KT2442 (Fukumori *et al.*, 1998). Un segundo grupo, con un 70% de identidad, está formado por la proteína reguladora EmhR (Q6V6Y0) del transportador de aromáticos policíclicos EmhABC en *P. fluorescens* cLP6A, una cepa aislada del suelo capaz de degradar hidrocarburos aromáticos (Hearn *et al.*, 2003), y por un regulador potencial (Q87X86) de la cepa patógena de plantas *P. syringae* pv *tomato* DC3000, cuyo genoma ha sido recientemente secuenciado (Buell *et al.*, 2003). Le sigue un tercer grupo de reguladores presentes en bacterias del suelo, patógenas, con un 44% de identidad y hasta un 60% de similitud: AcrR (Q7WTR1), regulador del transportador AcrAB de *Erwinia amylovora* (Burse *et al.*, 2004), y su homólogo en *Erwinia carotovora*, ambas patógenas de plantas. BpeR (Q6VV70), regulador de un transportador múltiple de antibióticos en *Burkholderia pseudomallei* (Chan *et al.*, 2004) y su homólogo en *Burkholderia mallei*, ambas patógenas oportunistas de humanos presentes también en el suelo. El cuarto grupo de proteínas con un 37% de identidad y un 57% de similitud, está constituido por los reguladores AcrR presentes en enterobacterias patógenas como *E. coli*, *Shigella flexneri*, *Yersinia sp.*, *Salmonella sp.*, *Enterobacter aerogenes* y *Klebsiella pneumoniae*. Por último, otros reguladores de transportadores de antibióticos en cepas de importancia clínica, que presentaron similitudes significativas con TtgR fueron: MtrR (Q59608) de *N. gonorrhoeae*, SmeT (Q84LP4) de *S. maltophilia*, AmrR o MexZ de *P. aeruginosa*, y EnvR de *E. coli* (33 a 34% de identidad, 49 a 55% de similitud). Hay que destacar por tanto que todas las proteínas homólogas de TtgR resultaron ser reguladores potenciales de sistemas de transportadores de tipo RND, ya sea en bacterias patógenas de plantas, como de humanos, o en bacterias no patógenas como es el caso de las cepas de *P. putida*.

Un resultado similar se obtiene realizando una búsqueda de proteínas homólogas al componente transportador TtgB de la bomba TtgABC (Apéndice 3), lo que indica por un lado que existe una estrecha relación evolutiva entre el gen regulador y los genes de resistencia que regula, confirmándose la importancia de que estos transportadores MDR estén regulados, y por otro lado, que la singular plasticidad génica y funcional de estas parejas bomba-regulador, han sido un factor importante en la adaptación de cada especie a su entorno particular.

2. Purificación de la proteína TtgR

2.1. Sobreexpresión y purificación de las proteínas TtgR-His y TtgR.

Se realizaron dos construcciones plasmídicas que permitieron la sobreexpresión y purificación de TtgR (véase sección Materiales y Métodos). La primera, pTGF1, para la producción de la proteína fusionada en su extremo C-terminal a una cola de hexa-histidina (TtgR-His₆, Terán *et al.*, 2003), y la segunda, pWilR2, en la que el gen *ttgR* portaba su propio codón terminador, para la producción de la proteína TtgR silvestre.

La producción de las proteínas TtgR-(His)₆ y TtgR se llevó a cabo de forma controlada en la cepa *E. coli* B834 (DE3), receptora de pTGF1 o pWilR2, previa puesta a punto de las condiciones óptimas de expresión (véase sección Materiales y Métodos). La posterior purificación de las proteínas TtgR-(His)₆ y TtgR se realizó a partir de la fracción soluble de los extractos celulares en los que se encontraba entre un 60 y un 70% del total de la proteína recombinante producida.

2.2. Purificación de la proteína TtgR-(His)₆.

La purificación por cromatografía de afinidad en columna de níquel utiliza la capacidad de interacción de la cola de hexa-histidina con cationes metálicos divalentes. De esta manera, la proteína de fusión presente en el extracto celular es retenida en la columna de níquel empleada en la cromatografía.

La proteína TtgR-(His)₆, cuyo peso molecular aparente (PMA) es de 24,8 kDa, predomina claramente en la fracción soluble total (figura 13, carril T). Durante la cromatografía en columna de níquel, la proteína de interés no apareció ni en la fracción de proteínas no retenidas durante la inyección (fracciones I1 e I2, figura 13), ni en el posterior lavado de la columna previo a la elución (fracciones L1 y L2), por lo que el rendimiento de purificación es casi del 100% si se parte de la fracción soluble del extracto. Las fracciones A8 y A9 contienen la proteína TtgR-(His)₆ en forma pura. Estas fueron colectadas y sometidas a diálisis en un tampón de almacenamiento para su uso posterior.

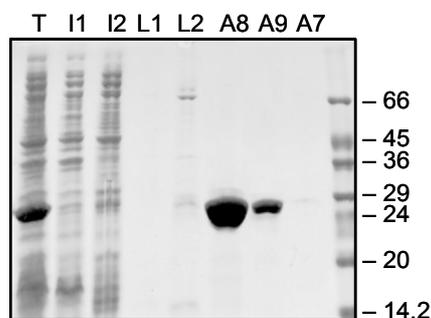


Figura 13. Contenido en proteínas de las fracciones obtenidas durante la purificación de TtgR-His.

El análisis de las fracciones se hizo por electroforesis en gel de poliacrilamida al 10% (p/v) con SDS. En el margen derecho se indican los tamaños en kDa correspondientes a los marcadores de peso molecular. En el margen superior se indican las muestras analizadas: T, extracto soluble total; I1 e I2, fracciones correspondientes a la inyección de la muestra; L1 y L2, lavado con 5% (p/v) imidazol; A8 y A9, fracciones correspondientes al único pico de absorbancia obtenido al aplicar el gradiente de elución.

2..3 Purificación de la proteína TtgR silvestre (nativa).

La purificación de la proteína TtgR se hizo por doble cromatografía: una primera cromatografía de afinidad en columna de heparina, donde quedan retenidas las proteínas que se unen al ADN, generalmente con dominios ricos en residuos básicos cargados positivamente, seguida de una segunda cromatografía de exclusión molecular, que permite la separación de las proteínas según su tamaño o volumen globular en solución.

En la figura 14A se muestra el gel desnaturalizante con las fracciones de la cromatografía en columna de heparina. La proteína TtgR, cuyo peso PMA es de 23,8 kDa, predominó en la fracción soluble total (carril T). Durante la inyección y lavado, se observó que parte de la proteína TtgR no era retenida en la columna (carriles I y L), con la consecuente pérdida en el rendimiento de purificación. No obstante, la mayor parte de la proteína TtgR quedó retenida en la columna junto con otras proteínas, y fueron eluidas tras aplicar el gradiente de cloruro sódico. Para la segunda cromatografía, se seleccionaron las fracciones en donde la banda correspondiente a la proteína TtgR era mayoritaria (fracciones A10 a B2).

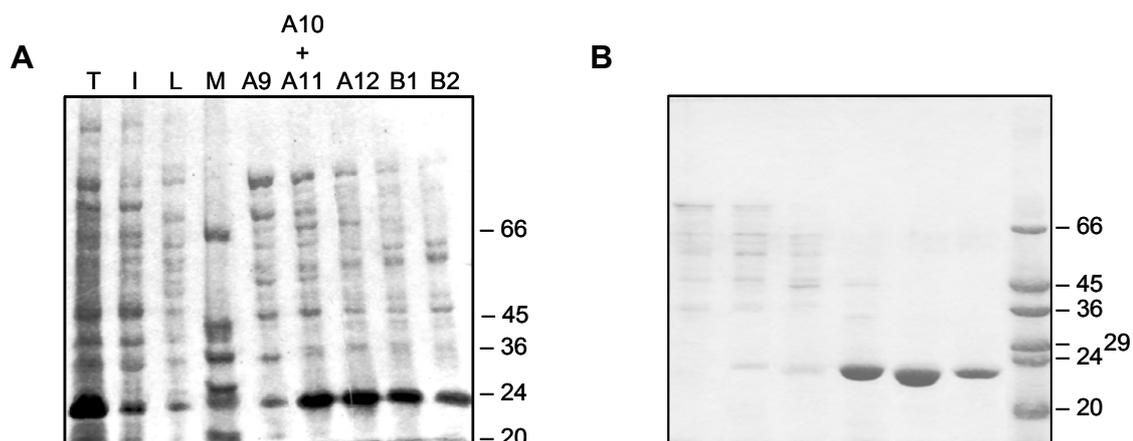


Figura 14. Contenido en proteínas de las fracciones obtenidas durante la purificación de TtgR.

El análisis de las fracciones se hizo por electroforesis en gel de poliacrilamida al 10% (p/v) con SDS.

A: Cromatografía del extracto total en columna de heparina, en el margen superior se indican las fracciones correspondientes: T, extracto total soluble inyectado; I, fracción correspondiente a la inyección de la muestra; L, lavado; M, marcadores de peso molecular; A9 a B2, fracciones correspondientes al pico de absorbancia de mayor intensidad obtenido al aplicar el gradiente de elución.

B: Cromatografía de exclusión molecular de las fracciones seleccionadas (A10 a B2), tras someterlas a diálisis y concentrarlas.

En el margen derecho se indican los tamaños en kDa correspondientes a los marcadores de peso molecular.

La siguiente cromatografía de exclusión molecular permitió separar la proteína TtgR de las otras proteínas de distinto peso molecular, obteniéndose fracciones que contenían TtgR en forma homogénea (figura 14B). Las últimas dos fracciones, con una pureza cercana al 100%, fueron colectadas, concentradas, y sometidas a diálisis en tampón de almacenamiento para su uso en los ensayos de microcalorimetría y ultracentrifugación analítica. La fracción restante, que contiene TtgR pura en un 97 % aproximadamente, fue utilizada en otros ensayos *in vitro*.

Cabe aclarar que ambas proteínas (TtgR-His y TtgR) se comportaron de manera idéntica en los ensayos *in vitro* realizados en esta tesis (retardos en gel, *footprint*), no detectándose diferencia alguna, ni en la unión a ADN, ni en la

unión a efectores. Este hecho, le da validez a una primera serie de resultados *in vitro* obtenidos con la proteína TtgR-(His)₆ (Terán *et al.*, 2003). Para el resto de los experimentos *in vitro*, y en particular para los estudios termodinámicos, se utilizó exclusivamente la proteína TtgR en su forma silvestre, tras haber desarrollado este protocolo de purificación relativamente sencillo y con buen rendimiento.

3. Estado de oligomerización de TtgR.

Las proteínas de la familia TetR cristalizadas hasta el momento (TetR, QacR, CprB, EthR) son dímeros en solución, no habiéndose detectado hasta la fecha otro grado de oligomerización de la proteína sola en solución. Para analizar el estado oligomérico de TtgR, se realizó una cromatografía analítica de exclusión molecular, utilizando la misma columna de filtración en gel empleada durante la purificación (figura 15).

En primer lugar, se calibró la columna con proteínas globulares nativas de PMA conocido (figura 15 A). El volumen de elución obtenido con la muestra de TtgR fue de 9,95 ml (figura 15 B), lo que corresponde a un PMA de 44,4 kDa, valor que cercano al peso molecular de un dímero de TtgR (PM teórico por monómero = 23839 Da). Aparece también un pico muy minoritario con un volumen de elución de 8,73 ml (equivalente a 74 kDa), que podría corresponder con un trímero de TtgR, pero su área representa menos del 5 % del área del pico mayoritario y esta proporción no varió inyectando concentraciones superiores de TtgR (resultado no mostrado). En cualquier caso, no fue posible detectar un pico correspondiente a la forma monomérica (volumen de elución teórico de 11,4 ml).

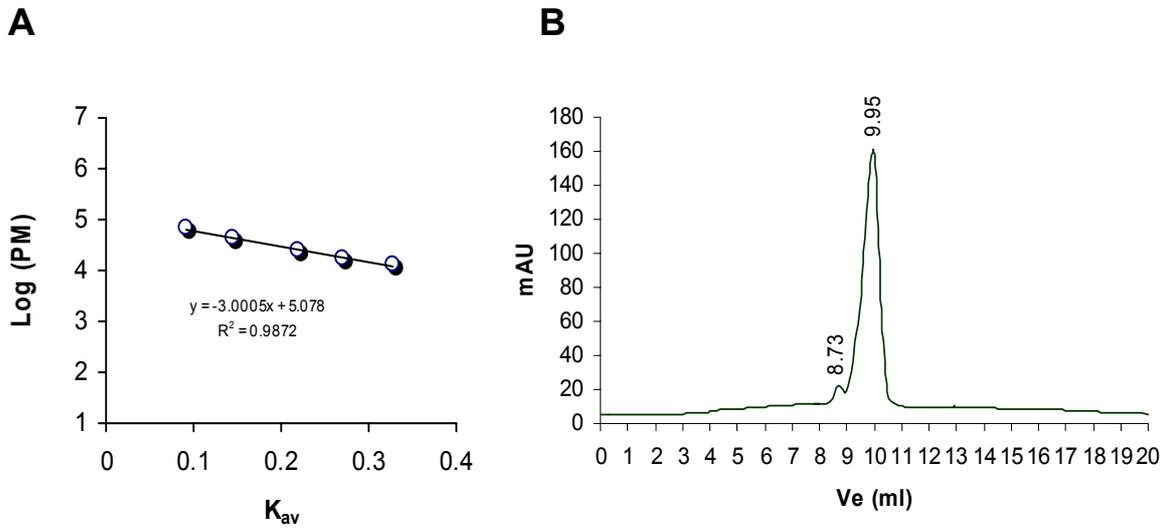


Figura 15. Cromatografía analítica de la proteína TtgR.

A. Curva de calibración de la columna de exclusión molecular Superdex 75HR (Amersham) con proteínas patrón (albúmina de suero bovino, 67 kDa; ovo albúmina, 44 kDa; quimotripsinógeno, 25 kDa; mioglobina, 17 kDa; ribonucleasa A, 13,7 kDa). El volumen de exclusión V_0 corresponde al volumen de elución del azul dextran. El K_{av} (coeficiente de retención) se calcula con la siguiente fórmula: $K_{av} = (V_e - V_0) / (V_c - V_0)$, donde V_e es el volumen de elución de la proteína, y V_c el volumen total o capacidad de la columna.

B. Perfil de elución de la proteína TtgR pura. Se inyectaron 100 μ l de TtgR a 0,5 mg/ml (20 μ M), se indica el correspondiente V_e en ml para los dos picos observados. mAU, unidades arbitrarias de absorbancia a 280 nm detectadas durante la cromatografía.

Por lo tanto, los resultados indican que la proteína TtgR, al igual que los demás miembros de la familia TetR caracterizados, adopta una forma homodimérica en su estado nativo en solución.

4. Caracterización funcional de la unión de TtgR al ADN.

Los experimentos *in vivo* mostraban que TtgR reprimía la transcripción del operón *ttgABC* y de su propio gen *ttgR*. Partiendo de la hipótesis de un mecanismo de represión directa, y dada la orientación divergente de estos genes y el solapamiento de sus regiones promotoras, era de esperar que TtgR ejerciera su acción represora uniéndose a la región intergénica. Uno de los objetivos fundamentales de este trabajo era por tanto determinar, no sólo el sitio de unión del represor TtgR en la secuencia promotora de ambos genes, sino también las características de esta unión; es decir la afinidad, el modo de unión y la especificidad de secuencia de ADN, todos necesarios para entender el mecanismo de represión de esta proteína.

La estrategia de estudio fue la siguiente: en primer lugar, se partió de un fragmento de ADN de 189 pb, generado por PCR, que abarcaba la región intergénica *ttgABC-ttgR*, y por tanto las dos regiones promotoras. Con este fragmento se pusieron a punto las condiciones para la unión de TtgR a su diana de ADN *in vitro*, por ensayos de retardo en gel (sección 4.1). Esta técnica permitió una primera determinación de la afinidad de la proteína TtgR por su operador. Una vez halladas las condiciones óptimas para esta unión, se utilizó el mismo fragmento en ensayos de *footprint* (sección 4.2) para determinar con precisión el sitio de unión, así como bases importantes en el reconocimiento de esta secuencia por TtgR, lo que a su vez permitió el diseño de fragmentos de ADN más cortos, y de operadores mutantes (sección 4.3), nuevamente ensayados con objeto de ahondar más en este aspecto molecular.

4.1. Unión específica de TtgR a la región intergénica *ttgR-ttgABC*.

Como esperado, la proteína TtgR fue capaz de unirse a un fragmento de ADN que contenía la región intergénica *ttgABC-ttgR*. En los ensayos de retardo en gel (figura 16A) se observó que aparecía una banda de ADN retardada, únicamente en presencia de TtgR, correspondiente a un solo tipo de complejo TtgR/ADN. Más aún, la intensidad de esta banda fue aumentando con la concentración de TtgR en la mezcla de unión y la formación de este complejo no se vio alterada al añadir un exceso de ADN competidor inespecífico (fragmento de PCR de tamaño similar con una secuencia promotora de otro gen¹, además de poli dI-dC presente en todas las reacciones – figura 16A, carril C1). De lo contrario, la adición de un exceso del mismo ADN competidor no marcado, a la mezcla de unión, provocó una clara disminución de la formación del complejo marcado, confirmando que la unión observada en el ensayo era específica.

La cuantificación de las bandas correspondientes al ADN libre y unido en ensayos de retardo similares, permitieron realizar un análisis de esta interacción por medio de la representación de Hill correspondiente (figura 16B). Para ello se consideró al ADN como la macromolécula principal, y TtgR (dímero) como el “ligando”, ya que se ha demostrado (véase apartado 3) que se trata de una proteína homodimérica. La constante de afinidad aparente (K_D) determinada con este método fue de 613 nM y el coeficiente de Hill (n_H) fue de $3,25 \pm 0,5$, lo que indica una fuerte cooperatividad positiva para la unión de TtgR al ADN.

¹ Fragmento de 210 pb correspondiente a la región intergénica *ttgDEF-ttgT* de *P.putida* DOT-T1E.

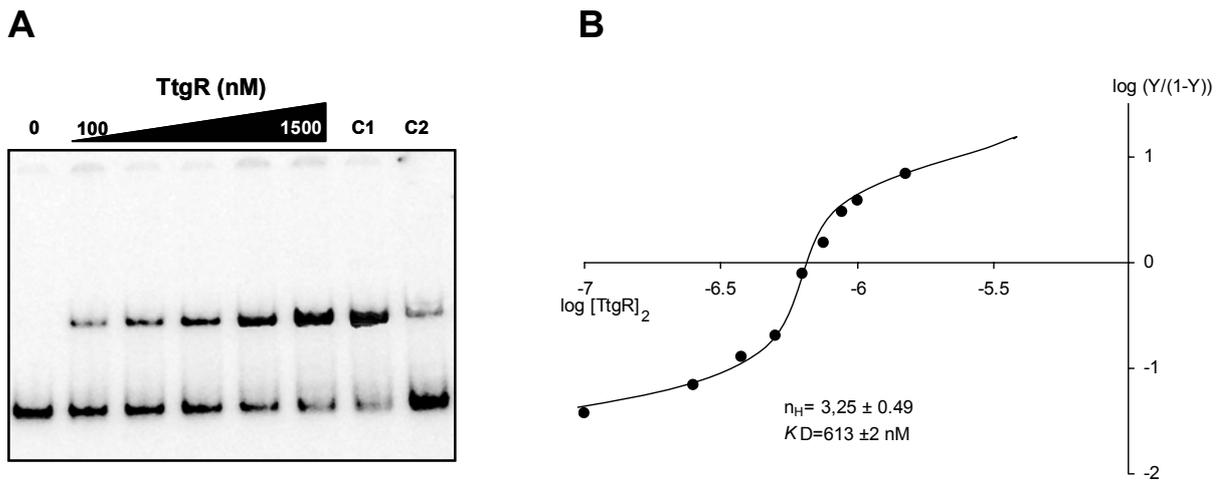


Figura 16. Unión específica del represor TtgR a su operador dentro de la región intergénica *ttgR-ttgABC*.

A. Los ensayos de retardo en gel se hicieron como se describe en Materiales y Métodos: el ADN (5 nM) fue incubado con concentraciones crecientes de TtgR (concentraciones dimericas: 150, 300, 500, 800, 1500 nM), en 10 μ l de tampón de unión y en presencia de ADN inespecífico (poli dI-dC) y BSA. En los experimentos control (C1 y C2) se utilizó TtgR a 1500 nM y se añadió a la mezcla un exceso molar (50 nM) de un fragmento de ADN competidor similar al empleado en el ensayo, pero cuya secuencia correspondía a un promotor ajeno al regulador TtgR (C1), o del mismo fragmento de ADN no marcado (C2).

B. Representación de Hill derivada del análisis de la unión de TtgR a su operador por ensayo de retardo en gel. La intensidad de las bandas fue cuantificada y se graficó $\log(Y/(1-Y))$ en función de $\log [TtgR]_2$, donde Y es la fracción de ADN unido y $[TtgR]_2$, la concentración de TtgR en su forma dimerica usada en el ensayo.

4.2. Determinación del sitio de unión en la zona intergénica *ttgABC-ttgR*.

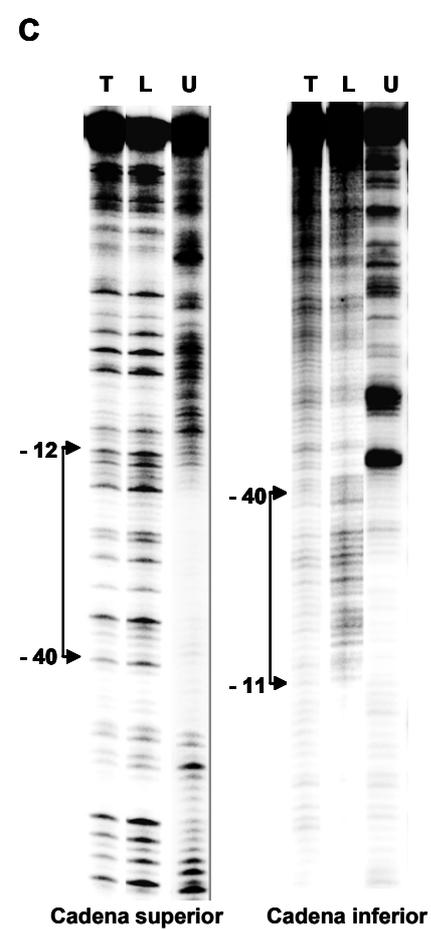
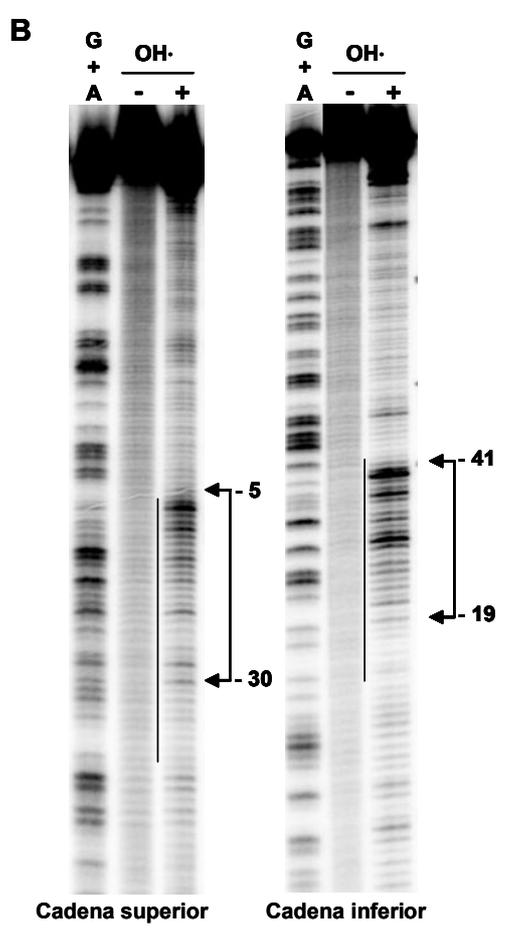
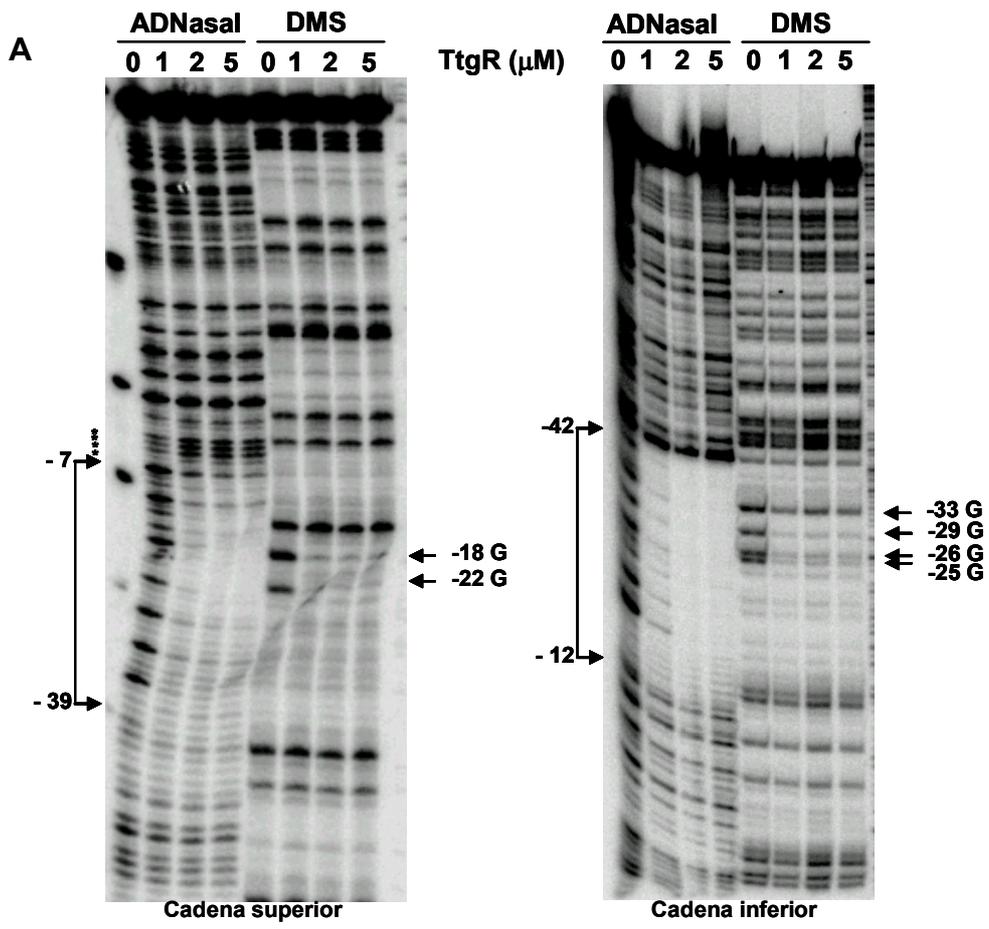
Para determinar el operador de TtgR en las regiones promotoras de los genes *ttgABC* y *ttgR* se llevaron a cabo distintos tipos de ensayos de *footprint*, con el fragmento utilizado anteriormente. El *footprint* con ADNasa I (figura 17A) reveló la protección por parte de TtgR de una única zona de aproximadamente 36 pb que cubre ambas regiones promotoras solapantes y en cuyo interior se identificó una secuencia parcialmente palindrómica de 28 pb como probable sitio de reconocimiento (figura 17D).

La zona protegida por TtgR cubre las regiones -10 de cada promotor y la región -35 de P_{ttgABC} , una disposición que permite la represión conjunta de

ambos promotores. Es importante resaltar que el tamaño de esta zona se puede calificar de grande, ya que la protección equivalente obtenida con otros represores de la familia TetR fue de 22 pb, tanto en el caso de TetR (Klock y Hillen, 1986) como de CamR (Aramaki *et al.*, 1995), protección conferida por la unión de un único dímero, o bien de 28 pb en el caso de QacR, debido a la unión simultánea de dos dímeros (Grkovic *et al.*, 1998 y 2001). Esto constituye una primera indicación acerca de la estequiometría de unión de TtgR al ADN, sugiriendo la unión de al menos dos dímeros por operador.

Algunas bases en el límite de esta zona presentaron una hipersensibilidad al corte por ADNasa I, lo que refleja una distorsión importante de la doble hélice de ADN en estas zonas, que podría facilitar el corte enzimático. Esto es indicador de que la interacción de la proteína TtgR a su operador provoca cambios importantes en la conformación y/o topología de la doble hélice de ADN, al origen de este tipo de constricciones que probablemente se acumulan en los límites de unión, convirtiéndolas en zonas más vulnerables al corte.

La unión de TtgR a su operador también protegió de la metilación por DMS, algunas bases de guanidinas localizadas dentro de esta zona y dispuestas de manera simétrica respecto al palíndromo identificado (Figura 17A). El DMS reacciona con el N7 del núcleo indol de las guanidinas, orientado al surco mayor de la doble hélice de ADN. Por lo tanto, este tipo de *footprint* revela para cada base de guanidina protegida, si no un probable contacto, un punto de fuerte proximidad entre el ADN y la proteína, en el surco mayor del ADN. El resultado obtenido con TtgR indica que los contactos más íntimos se producen en el centro del operador y siguiendo cierta simetría, lo que insinúa que intervienen en ese centro dos monómeros, orientados a su vez simétricamente (Figura 17D).



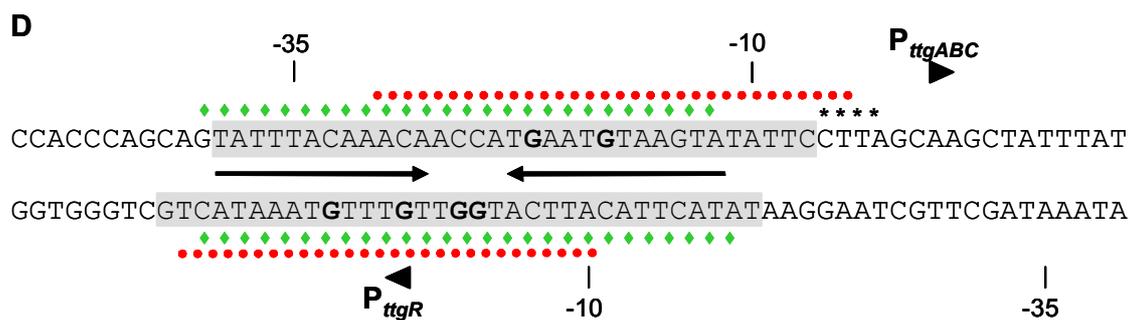


Figura 17. Determinación del sitio de unión del represor TtgR en las regiones promotoras de los genes *ttgA* y *ttgR*.

Los ensayos de impronta *in vitro* o *footprint* de protección contra ADNasa I, metilación por DMS y radical hidroxilo, así como el llamado “del nucleósido faltante” se llevaron a cabo como descrito en Materiales y Métodos.

A. *Footprint* de protección contra ADNasa I y metilación por DMS de las cadenas superior e inferior del fragmento de ADN de 189 pb, en ausencia y presencia de concentraciones crecientes de proteína TtgR (indicadas en el margen superior).

B. *Footprint* de protección contra radicales hidroxilos (carriles OH⁻) de las cadenas superior e inferior, en ausencia (-) y presencia (+) de 3 μ M de proteína TtgR. A modo de comparación las respectivas zonas de protección contra ADNasa I están representadas por una línea vertical entre los carriles. Las posiciones de los nucleósidos de interés, respecto al punto de inicio de la transcripción del promotor P_{ttgABC}, figuran en los márgenes laterales de cada fotografía. Las escaleras G+A sirvieron para identificar las posiciones de las bases dentro de la secuencia.

C. *Footprint* del nucleósido faltante con radicales hidroxilos de las cadenas superior e inferior. El ADN fue aislado de un ensayo de retardo en gel (véase Materiales y Métodos). T, ADN total aislado en ausencia de TtgR; L, muestra aislada como ADN libre; U, muestra aislada como ADN unido.

D. Secuencia de las regiones promotoras de *ttgABC* y *ttgR*. Las regiones protegidas por TtgR del corte con ADNasa I están resaltadas en gris y las hipersensibles indicadas con asteriscos. Las guanidinas protegidas de la metilación con DMS están en negrita. Las bases afectadas en el *footprint* de protección con radicales OH⁻ están resaltadas con puntos y las reveladas por el método del nucleósido faltante, con rombos. Las flechas representan la secuencia pseudo-palindrómica probablemente reconocida por TtgR. Los puntos de inicio de la transcripción (triángulos) así como los puntos -10 y -35 de cada promotor también están indicados.

El resultado obtenido en el *footprint* de protección con radicales hidroxilos (Figura 17B) sorprendió en cuanto no hubo protección sino una hipersensibilidad de algunas bases situadas dentro de la región revelada anteriormente. Curiosamente la hipersensibilidad es mayor en las bases situadas hacia los extremos 3' de cada cadena que conforma el operador, lo que apoya la hipótesis de la unión simétrica de TtgR a su operador. Por otra parte, se observa un cambio general en el patrón de corte a lo largo de toda la

secuencia de ADN y a distancia del sitio de unión, lo que confirma que la unión de TtgR, aunque localizada y limitada a una zona de 36 pb, provoca cambios conformacionales y distorsiones importantes que afectan al enrollamiento de la doble hélice de ADN en todo el fragmento de 189 pb.

Por su parte el ensayo de *footprint* del nucleósido faltante, técnica que identifica las bases necesarias para la unión (véase apartado 9.4 de Materiales y Métodos), reveló contactos potenciales con 29-30 nucleósidos de cada cadena, obteniéndose un mapa de contacto perfectamente ajustado en sus límites con la secuencia pseudo-palindrómica de 28 pb identificada (Figura 17C). Un resultado consistente con los anteriores y que afianza este palíndromo como la secuencia reconocida por TtgR en la región intergénica *ttgABC-ttgR*.

4.3.Elementos determinantes en el operador para la unión y reconocimiento por TtgR

Con el propósito de profundizar en la organización y definición del operador de TtgR, se decidió explotar su simetría palindrómica en el diseño de nuevos operadores. Se realizaron por un lado mutaciones en el operador con objeto de lograr una secuencia simétrica perfecta y estudiar así su efecto sobre la afinidad de TtgR. Y por el otro se analizaron operadores delecionados en sus extremos, a fin de obtener la secuencia mínima necesaria para la unión de un dímero de TtgR. El análisis se hizo mediante ensayos de retardo en gel con fragmentos de ADN de entre 24 y 40 pb que portaban distintos fragmentos del operador, así como mutaciones puntuales en ésta (Figura 18).

TtgR fue capaz de unirse un fragmento de 40 pb que contenía el operador silvestre (WT-40) con una afinidad equivalente a la obtenida utilizando el fragmento de ADN de 189 pb (K_D aparente de 700 nM, figura 16 y 18). Este fragmento WT-40 se utilizó de aquí en adelante como referencia para comparar la afinidad de TtgR con los distintos fragmentos de ADN ensayados.

En su secuencia se observa un palíndromo imperfecto de 24 pb, separado por una secuencia de 4 pb (5'-ACCA-3', figura 19). Los fragmentos IR1 e IR2 fueron diseñados para obtener un palíndromo de 24 pb perfecto, conservando uno u otro de los semipalíndromos silvestres. Sin embargo, ambos cambios afectaron a la unión de TtgR y la afinidad descendió un 70% y 90% respectivamente, sugiriendo que el semipalíndromo reconocido por TtgR podría ser una combinación de ambos. Esto se confirmó tras diseñar el operador M-40, portador de una sustitución única en cada semipalíndromo, y comprobar que la afinidad de TtgR era unas 1,4 veces mayor que por el operador silvestre (Figura 18). Un aumento adicional de la afinidad del represor por el operador se obtuvo extendiendo el palíndromo a la secuencia espaciadora; así, la afinidad de unión de TtgR para el operador IR3, portador de un palíndromo perfecto de 26 pb, resultó ser 2 veces superior a la del operador silvestre. Este resultado, junto con los datos obtenidos en los ensayos de *footprint* con DMS (véase apartado 4.2.), parecen indicar que TtgR contacta con algunas de las bases de la secuencia espaciadora, y que la secuencia silvestre no permite una unión óptima del represor a su operador. Grkovic y colaboradores (2001), llegaron a una conclusión similar analizando por mutagénesis el llamado espaciador de la secuencia del operador en *qacA* al observar que algunas sustituciones aumentaban la afinidad de dicha unión. Hecho que fue confirmado posteriormente con la estructura cristalina de QacR unido a un operador perfectamente palindrómico, y en donde se demostraba que la secuencia de 6 pb equivalente a la espaciadora albergaba 1/4 de los contactos bases específicos (Schumacher *et al.*, 2002). Esta similitud, junto con el tamaño de la secuencia palindrómica obtenida (26-28 pb), sugieren una estequiometría de unión de más de un dímero de TtgR por operador, una observación ya mencionada a raíz de los resultados de *footprint*. Por tanto, y considerando que al operador se podrían unir dos dímeros de TtgR de manera solapante, tal y como ocurre en el caso de QacR (Schumacher *et al.*, 2002), se analizó la secuencia de cada semipalíndromo.

En efecto, según este modo de unión, dos monómeros pertenecientes a dímeros distintos se unen a un mismo semipalíndromo (Schumacher *et al.*, 2002), lo que puede determinar la presencia de cierto motivo repetido en la secuencia. En IR3 se identificó el motivo 5'-(A/T)TACA-3' como probable secuencia repetida en ambos semi-sitios, un motivo muy similar al encontrado en el operador de QacR (5'-A(T/C)(A/C)GA-3'). Así, se diseñó el operador IR4, que lleva el motivo 5'-ATACA-3' repetido perfectamente en cada semi-sitio, lo que determinó un aumento de la afinidad de unión de TtgR de 2 veces con respecto a IR3, y de 4 veces con respecto al operador silvestre. Este resultado apoya la hipótesis de que TtgR se une a su operador de un modo similar al de su homólogo QacR.

El operador IR5 fue diseñado al igual que IR3 con una secuencia palindrómica de idéntico tamaño (26 pb), pero en la cual las bases de guanidinas identificadas como probables contactos de TtgR por el *footprint* con DMS, y presentes en la secuencia palindrómica (G -33, -29, -22 y -18), fueron sometidas a una transversión (G→C): el resultado fue una ausencia total de unión del represor TtgR como se puede apreciar en el ensayo de retardo correspondiente, lo que confirma que esas 4 guanidinas –o al menos alguna de ellas– son indispensables para la unión de TtgR.

Por otro lado, también fueron diseñadas una serie de deleciones en los extremos del fragmento WT-40, obteniéndose operadores de 24 pb, tanto centrados en el eje de simetría del operador (WT-24), como desplazados hacia un extremo u otro para contener medio palíndromo completo (HA y HB). Estas no permitieron la unión de TtgR al no detectarse ninguna alteración en la movilidad electroforética del ADN (geles no enseñados en la figura). Incluso deleciones menores de los extremos, que generaban operadores de 28 pb, uno de ellos con toda la secuencia palindrómica (Op28), manifestaron igualmente una ausencia total de unión al represor TtgR (figura 18A). Por tanto, el tamaño mínimo del operador que permitió la unión de TtgR fue de 30 pb, con una afinidad que fue ligeramente inferior al del fragmento de 40 pb (WT-40).

Este resultado, sorprendente, ya que cabía la posibilidad de unión de al menos un solo dímero de TtgR en alguno de los operadores truncados, es a su vez acorde con la alta cooperatividad positiva obtenida para la unión de dímeros de TtgR al ADN (véase sección 4.1.). En efecto, este modo de unión cooperativa parece requerir de los sitios de unión de los dos dímeros para hacer posible su unión de manera simultánea. Una cooperatividad similar ha sido descrita para la unión de dos dímeros de QacR al ADN (Schumacher *et al.*, 2002), en donde los autores habían también experimentado previamente la imposibilidad de obtener la unión de un único dímero a un operador truncado (Grkovic *et al.*, 2001).

4.4. Estequiometría de unión al ADN

Los resultados anteriores si bien apuntaban hacia una estequiometría de unión de dos dímeros de TtgR a su operador, hacían necesario determinar con exactitud esta estequiometría, para conocer mejor el mecanismo de represión de esta proteína reguladora. En una primera aproximación se llevaron a cabo una serie de electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones no desnaturizantes, de proteínas nativas patrón junto con el complejo TtgR-ADN, y a distintas concentraciones de poliacrilamida. Para ello se utilizó el fragmento WT-40 cuyo peso molecular teórico es de 24485 Da. El logaritmo de la distancia de migración relativa (Rf) para cada compuesto (proteína, ADN o complejo) varía linealmente con respecto al porcentaje de poliacrilamida empleado para la electroforesis, obteniéndose una pendiente, también llamada coeficiente de retardo, que depende únicamente del peso molecular de la partícula en migración. Gracias a las proteínas estándar, se pudo obtener la curva patrón correspondiente (Figura 19): el peso molecular aparente para el ADN fue de 28,7 kDa, un valor bastante próximo al teórico, lo mismo que para la proteína TtgR cuyo peso molecular aparente fue de 51,0 kDa, también acorde con el peso molecular teórico de un dímero (47,7 kDa). Finalmente, para el complejo TtgR-ADN se determinó un peso molecular aparente de 124,2 kDa, valor que sólo puede obtenerse tras la unión de dos dímeros de TtgR a una molécula de ADN (peso teórico 120,2 kDa). Este resultado corrobora las observaciones anteriores que apuntaban hacia un modo de unión cooperativa de dos dímeros de TtgR por operador.

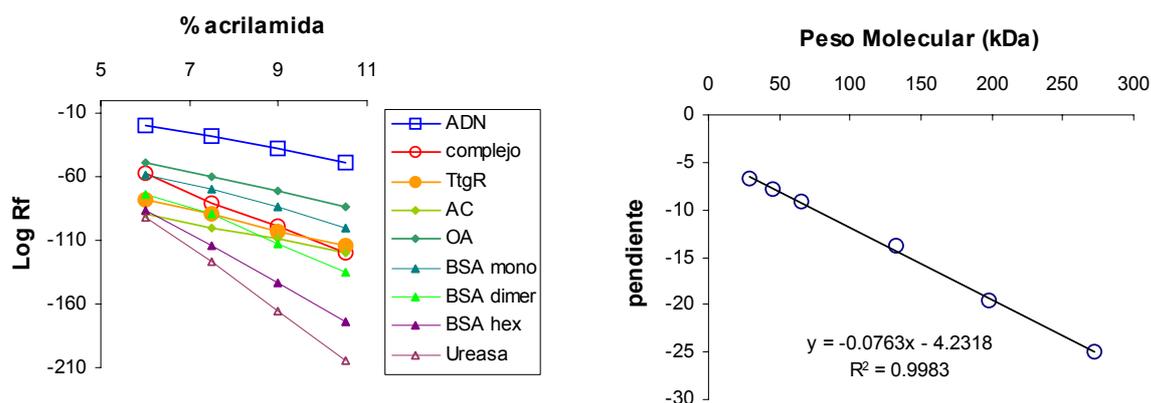


Figura 19. Determinación del peso molecular del complejo represor TtgR – operador.

Electroforesis no desnaturizantes en geles de poliacrilamida (6%; 7,5%; 9% y 10,5% [p/v]) de la proteína TtgR (8 μ M) en ausencia o presencia del ADN operador (WT-40 a 1 μ M) fueron llevadas a cabo conjuntamente con 5 μ g de distintas proteínas globulares nativas de peso molecular conocido. El logaritmo de la distancia de migración para cada proteína o complejo, se representó en función del porcentaje de acrilamida empleado (A), obteniéndose las rectas características correspondientes. Las pendientes de estas son una función lineal del peso molecular de la partícula sometida a electroforesis, lo que permitió obtener la curva patrón (B). Las proteínas patrón utilizadas fueron: anhidrasa carbónica (AC, 29 kDa), ovalbúmina (OA, 45 kDa), albúmina de suero bovina (BSA monómero, 66 kDa; dímero 132 kDa; trímero 198 kDa) y ureasa (272 kDa).

No obstante, la aparición en algunos ensayos de retardo en gel, de bandas adicionales de menor movilidad electroforética, por encima de la banda mayoritaria correspondiente al complejo (TtgR)₄-ADN (véase geles de retardo de la figura 18A), insinuaban la posibilidad de formación de complejos proteína-ADN de mayor orden o estequiometría de unión. Por tanto, se decidió estudiar esta posible heterogeneidad de complejos de unión al ADN por ultracentrifugación analítica. La técnica empleada fue la de velocidad de sedimentación: la sedimentación de cada especie (ADN, proteína, y complejo(s) proteína-ADN) se sigue en tiempo real, lo que permite determinar su coeficiente de sedimentación *S*, directamente relacionado con su peso molecular por la ecuación de Svedberg (ver sección Materiales y Métodos para más detalles sobre esta técnica). En los ensayos, se utilizó una muestra de proteína

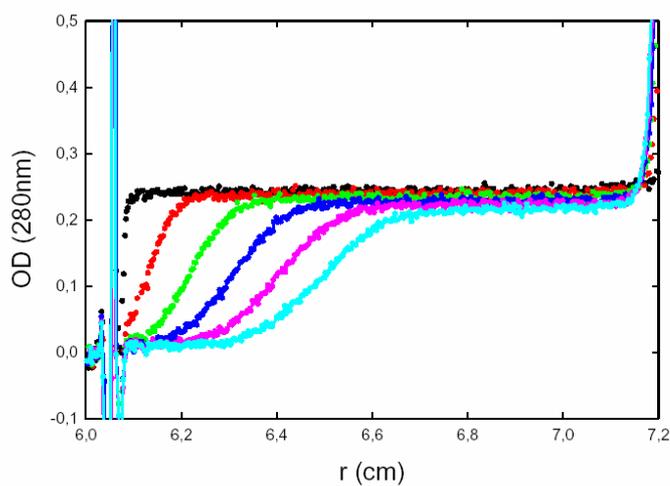
TtgR recientemente purificada y sólo almacenada en alícuotas a -80°C , y como operador el fragmento de ADN WT-40. Además de los experimentos control para asegurarse de la homogeneidad tanto de la proteína TtgR, como del ADN, se realizaron experimentos con diferentes *ratios* de TtgR:ADN. El coeficiente de sedimentación obtenido para TtgR fue de 3,7 S (Figura 20C), detectándose una única forma oligomérica con un evento de sedimentación claramente monofásico (Figura 20A). Este coeficiente de sedimentación corresponde a un PMA de 48 kDa, es decir que corrobora que TtgR es un homodímero en solución. Además, el mismo experimento realizado a concentraciones mayores de TtgR (hasta $40\ \mu\text{M}$), no reveló aparición alguna de formas oligoméricas de mayor orden (resultado no mostrado).

El análisis realizado tras la incubación de TtgR con su operador con un *ratio* TtgR:ADN de 10:1, reveló la aparición de una única especie con un coeficiente de sedimentación de 7,8 S correspondiente al complejo, acompañado de una disminución de intensidad del pico correspondiente al dímero de TtgR (Figura 20C). Este coeficiente corresponde a una partícula de 125 kDa de PMA y confirma la formación de un complejo represor homogéneo con una estequiometría de 2 dímeros de TtgR por operador. No se detectaron formas oligoméricas de mayor orden al repetir el mismo experimento con un *ratio* TtgR:ADN de 20:1 o 30:1 (resultado no mostrado).

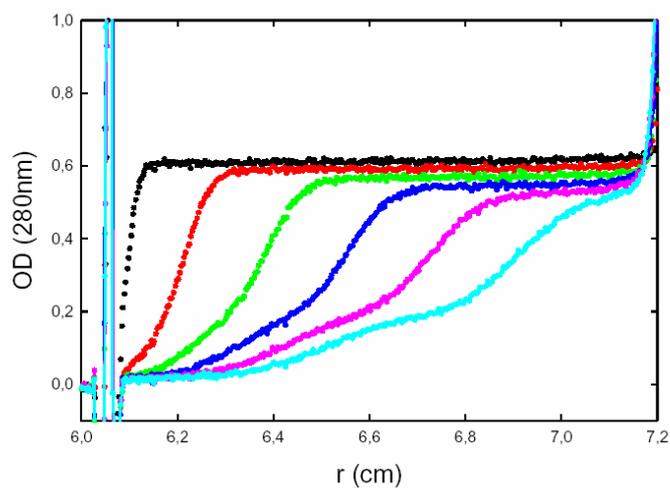
A raíz del resultado obtenido con esta técnica, quedaba descartado que las bandas adicionales observadas en algunos de los ensayos de retardo fueran significativas desde el punto de vista biológico. Dichas bandas parecen más bien obedecer a un fenómeno de multimerización, por almacenamiento prolongado de la muestra de proteína a 4°C y -20°C , un artefacto comúnmente encontrado en preparaciones de proteínas concentradas, particularmente si éstas poseen cisteínas cuya oxidación es favorecida por los cationes divalentes presentes en el tampón de almacenamiento (Volkin *et al.* 1995, Engleka *et al.*, 1992, Grkovic *et al.* 2001).

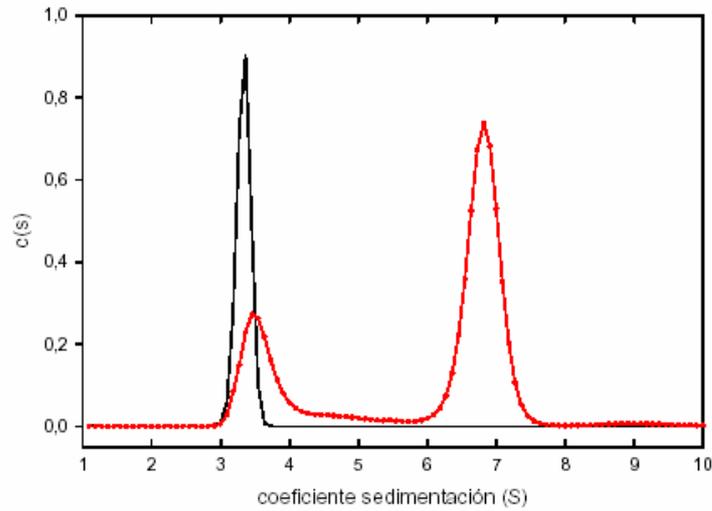
Hay que destacar que este experimento no sólo confirma de manera inequívoca la estequiometría 4:1 de unión de TtgR a su operador, sino que también demuestra que la unión de los dos dímeros de TtgR se hace de manera simultánea, al no haberse detectado formas oligoméricas intermedias para el complejo (un dímero por operador). Un resultado que coincide con los obtenidos en los ensayos de retardo en gel en los cuales no fue posible obtener la unión de un solo dímero al operador.

A



B



C**Figura 20. Ultracentrifugación analítica del complejo TtgR-operador.**

Los ensayos se realizaron como descrito en Materiales y Métodos en tampón de unión desprovisto de glicerol (Tris-HCl 10 mM, pH 7,0; acetato magnésico 10 mM; KCl 10 mM; EDTA 0,1 mM; DTT 1 mM) y a 20°C.

A. Perfiles de velocidad de sedimentación de TtgR (10 μ M), tomados a 50,000 rpm.

B. Perfiles de velocidad de sedimentación de una mezcla de TtgR (10 μ M) y ADN (1 μ M), tomados a 50,000 rpm.

C. Distribuciones de coeficientes de sedimentación [c(s)] de TtgR y ADN obtenidas según lo descrito en Materiales y Métodos.

4.5. Microcalorimetría de la unión de TtgR a su operador

Con el fin de ahondar en los aspectos termodinámicos de la interacción del represor TtgR con su operador, se analizó por calorimetría de titulación isotérmica (ITC) la unión del represor TtgR a fragmentos cortos de ADN previamente utilizados en los ensayos de retardo.

Los ensayos se hicieron con los oligonucleótidos hibridados Op28, WT-30 y WT-40 (Figura 18). Las titulaciones se llevaron a cabo en tampón de unión (Tris-HCl 10 mM, pH 7,0; acetato magnésico 10 mM; KCl 10 mM; glicerol 5 % [v/v]; EDTA 0,1 mM; DTT 1 mM) y a 30°C. Para el análisis de los datos brutos se utilizaron distintos algoritmos incluidos en el programa *Origin* (Microcal Inc.) suministrado por el equipo.

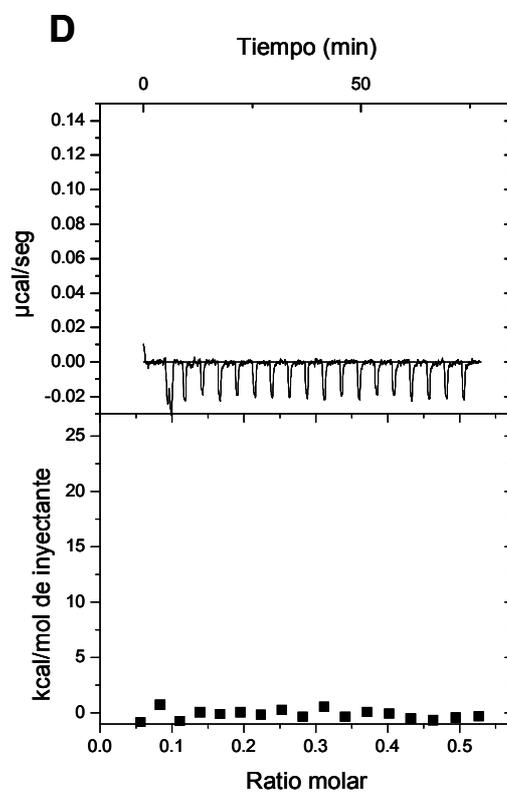
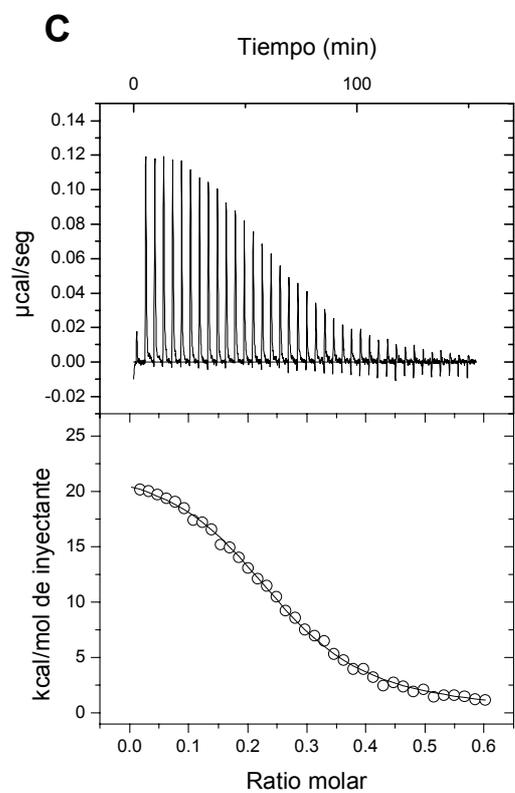
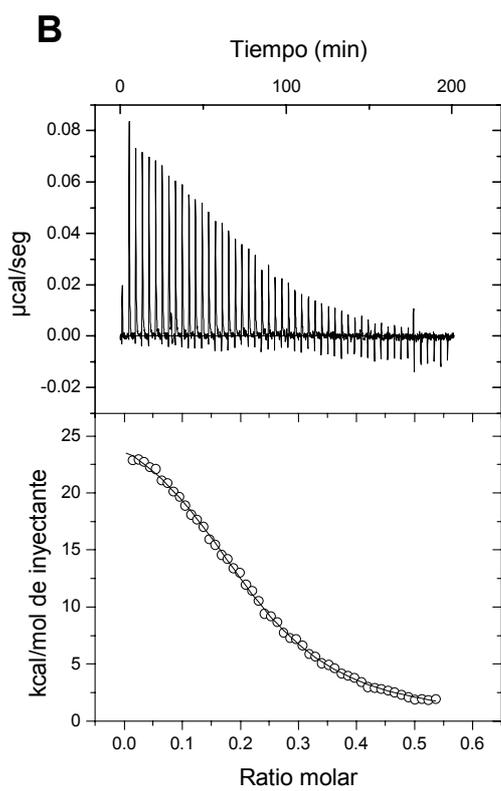
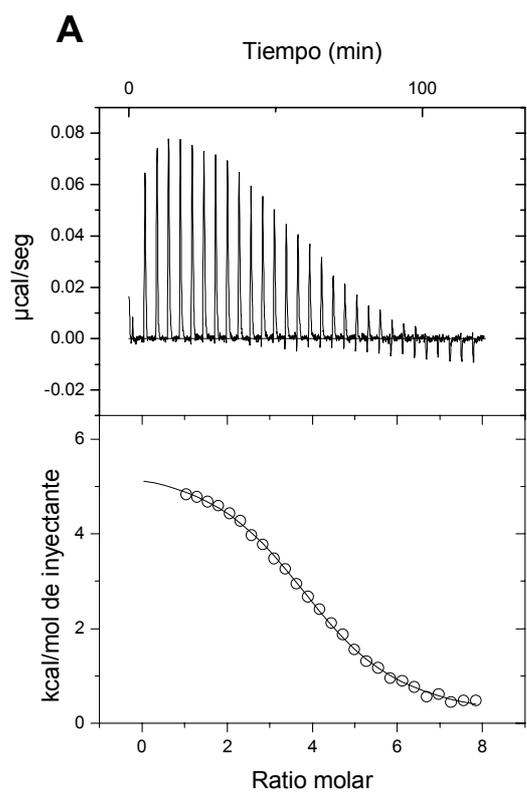
Las titulaciones con el operador WT-40, tanto en el sentido denominado directo (proteína en ADN) como reverso (ADN en proteína), generaron señales de calor endotérmicas (Figura 21 A y B). Tras corregir la línea de base y sustraer los calores no específicos de dilución, se analizaron los datos utilizando el algoritmo de regresión no lineal “one set of sites” (un solo tipo de sitios de unión) del programa *Origin*. Aunque somos conscientes de que este algoritmo es una aproximación, dada la aparente complejidad de esta interacción deducida de los ensayos de retardo en gel y de ultracentrifugación analítica (fuerte cooperatividad positiva, unión simultánea de dos dímeros por operador), se obtuvieron regresiones no lineales muy satisfactorias y fueron por tanto usadas con fines de comparación.

La unión de TtgR a su ADN operador fue totalmente dominada por el factor entrópico ($T\Delta S$ de $14,6\pm 0,06$ y $14,33\pm 0,04$ kcal/mol para las titulaciones directa y reversa respectivamente, tabla 6), como en la mayoría de las interacciones proteína-ADN. En efecto, el factor entrópico (ΔS) se puede descomponer en los términos siguientes:

$$\Delta S_{\text{total}} = \Delta S_{\text{disolvente}} + \Delta S_{\text{conformacional}} + \Delta S_{\text{otros}}$$

donde $\Delta S_{\text{disolvente}}$, es generalmente favorable (>0) ya que refleja los cambios en el grado de hidratación de las moléculas en interacción tras la unión, mientras que $\Delta S_{\text{conformacional}}$ contribuye más bien negativamente, ya que refleja la pérdida de grados de libertad de rotación, y translación, asociados a una pérdida de flexibilidad conformacional de las moléculas implicadas, y que ocurren tras la formación del complejo. ΔS_{otros} incluye, entre otros, efectos entrópicos asociados al estado de ionización de las moléculas implicadas (Murphy *et al.*, 1993 y 1994). Por tanto, un factor entrópico favorable (>0) está generalmente dominado por el término $\Delta S_{\text{disolvente}}$, y está generalmente aceptado que la naturaleza entrópica de la interacción proteína-ADN es debida al desplazamiento de las moléculas de agua ordenadas de la capa de hidratación del ADN, hacia un estado más desordenado en el disolvente (Lundbäck y Hård, 1996; Krueger *et al.*, 2003).

A su vez, el factor entálpico ΔH se descompone en dos principales términos $\Delta H_{\text{formación}}$ y $\Delta H_{\text{ruptura}}$ que reflejan respectivamente los calores de formación (<0) y ruptura (>0) de enlaces de hidrógeno, fuerzas de van der Waals y/o interacciones electroestáticas que se producen en la formación del complejo (Murphy *et al.*, 1993 y 1994). La reacción de unión de TtgR al ADN WT-40 fue muy endotérmica (ΔH de $5,54 \pm 0,05$ y $6,33 \pm 0,03$ kcal/mol para las titulaciones directa y reversa respectivamente, tabla 6), lo que es debido a una mayor contribución del término $\Delta H_{\text{ruptura}}$, y refleja probablemente el gran número de enlaces de hidrógeno que se rompen en la doble hélice de ADN durante la formación del complejo. Por último, los valores de constante de afinidad obtenidos del orden del micromolar fueron fisiológicamente significativos (Tabla 6), y comparables con lo obtenido en los ensayos de retardo en gel ($K_D = 0,613 \mu\text{M}$, figura 16).



◀Figura 21: Calorimetría de titulación isotérmica (ITC) de la unión de TtgR a diferentes fragmentos de ADN operador.

Los experimentos de ITC fueron realizados según se describe en Materiales y Métodos en tampón de unión (Tris-HCl 10 mM, pH 7,0; acetato magnésico 10 mM; KCl 10 mM; glicerol 5 % [v/v]; EDTA 0,1 mM; DTT 1 mM). En los gráficos figuran las señales de calor de titulación (ventanas superiores) y sus correspondientes curvas de integración (ventanas inferiores) analizadas con el algoritmo “one set of sites” del programa *Origin (MicroCal, Inc)*. Los parámetros termodinámicos correspondientes se recogen en la tabla 6.

- A. Titulación del ADN WT-40 (1,85 μ M) con TtgR (64 μ M), sentido directo.
- B. Titulación de TtgR (8,1 μ M) con el ADN WT-40 (18,8 μ M), sentido reverso.
- C. Titulación de TtgR (10,2 μ M) con el ADN WT-30 (26,5 μ M), sentido reverso.
- D. Titulación de TtgR (6,1 μ M) con el ADN Op28 (14 μ M), sentido reverso.

La segunda serie de ensayos de titulación se hizo en sentido reverso, con operadores más cortos (fragmentos WT-30 y Op28, de 30 y 28 pb respectivamente, véase figura 21 C y D). De manera sorprendente, las señales y curva de titulación con el fragmento WT-30 fueron muy similares a las obtenidas con el fragmento mayor WT-40, obteniéndose valores de entalpía, entropía, y afinidad prácticamente idénticos (Tabla 6). Por tanto las 10 pb sobrantes del fragmento WT-40 (5 pb en cada extremo) no parecían tener impacto sobre la termodinámica de la unión de TtgR a su operador. Esto refleja no sólo la ausencia de interacción entre TtgR y este ADN flanqueante, sino que corrobora los resultados de las secciones anteriores, en cuanto constituye *per se* la evidencia más clara de que los contactos entre los dos dímeros de TtgR y su operador están localizados en la secuencia pseudo palindrómica de 28 pb centrada en el fragmento WT30. A raíz de este resultado, se decidió entonces utilizar el fragmento Op28, que porta estrictamente la secuencia simétrica de 28 pb (Figura 18B), en un experimento similar. Sin embargo, al igual que en los ensayos de retardo en gel, no se logró detectar unión alguna, lo que indica que las dos bases que flanquean inmediatamente cada extremo del palíndromo son imprescindibles para la unión o formación del complejo TtgR-operador.

Tabla 6. Parámetros termodinámicos de la interacción de TtgR con diferentes fragmentos de ADN operador.

ADN	sentido	algoritmo	K_A (M^{-1})	K_D^3 (μM)	ΔG^4 (kcal/mol)	ΔH (kcal/mol)	$T\Delta S$ (kcal/mol)
WT-40	directo ¹	<i>one set of sites</i>	$1,59 \pm 0,07 \cdot 10^6$	$0,63 \pm 0,03$	$-8,60 \pm 0,03$	$5,54 \pm 0,05$	$14,33 \pm 0,06$
WT-40	reverso ²	<i>one set of sites</i>	$6,35 \pm 0,17 \cdot 10^5$	$1,57 \pm 0,04$	$-8,04 \pm 0,02$	$6,33 \pm 0,03$	$14,57 \pm 0,04$
WT-40	directo	<i>sequential</i> sitio 1	$4,9 \pm 1,0 \cdot 10^4$	$20,4 \pm 4,2$	$-6,50 \pm 0,12$	$35,1 \pm 7,0$	42 ± 15
		<i>binding</i> ⁵ sitio 2	$1,37 \pm 0,23 \cdot 10^6$	$0,73 \pm 0,15$	$-8,51 \pm 0,10$	$-10,8 \pm 6,5$	$-2,4 \pm 1,4$
WT-30	reverso	<i>one set of sites</i>	$8,10 \pm 0,33 \cdot 10^5$	$1,23 \pm 0,05$	$-8,19 \pm 0,03$	$5,95 \pm 0,04$	$14,15 \pm 0,06$
Op28	reverso	– No hubo unión –					

Los datos experimentales de las titulaciones (ITC) correspondientes se recogen en la figura 21.

¹ titulación del fragmento de ADN con TtgR.

² titulación de TtgR con el fragmento de ADN.

³ $K_D = 1/K_A$

⁴ $\Delta G = RT \ln K_A = \Delta H - T\Delta S$

⁵ Con este modelo de unión secuencial, se fijaron dos sitios de unión en base a la estequiometría concocida del complejo (2 dímeros de TtgR por operador).

Por otra parte, basándonos en los resultados de ultracentrifugación analítica (véase sección 4.4.), que indicaban que TtgR se unía al ADN con una estequiometría de dos dímeros por operador, y en las evidencias obtenidas de cooperatividad positiva para la unión a ADN (coeficiente de Hill de 3,23), los datos experimentales de la titulación directa con el ADN WT-40 fueron analizados con un algoritmo basado en un modelo de unión secuencial (algoritmo “*sequential binding sites*” del programa *Origin*). El ajuste de la curva de regresión obtenida fue bastante correcto, aunque con desviaciones estándar muy superiores a las obtenidas con el modelo “*one set of sites*” (Tabla 6). No obstante, se logró obtener una desconvolución de los datos brutos en dos eventos de unión de tipo cooperativo. Un primer evento con la unión de un dímero a un sitio de baja afinidad ($K_D = 20,4 \pm 4,2 \mu M$), entrópicamente muy favorable, seguido de un segundo evento de unión a un sitio de mayor afinidad ($K_D = 0,73 \pm 0,15 \mu M$), entrópicamente desfavorable, pero con una entalpía muy favorable (Tabla 6). Esta desconvolución de una interacción que debe ocurrir de manera simultánea, a juzgar por la curva monofásica de titulación, en dos eventos distintos pero en los que la unión de un primer dímero con baja

afinidad provocaría un aumento de afinidad para la unión del segundo (aumento en un factor 20), es un buen reflejo de la fuerte cooperatividad positiva que gobierna la unión de los dímeros de TtgR al operador.

5. Caracterización funcional de la unión de TtgR a sus efectores

5.1. Identificación de efectores

Los estudios de expresión *in vivo* de los genes *ttgABC* y *ttgR* realizados en esta tesis doctoral sugerían que el regulador TtgR estaba implicado en la inducción de estos genes en respuesta a la presencia de moléculas inductoras de tres tipos distintos: (i) antibióticos clásicos, como cloramfenicol o tetraciclina, (ii) disolventes orgánicos y aromáticos diversos, como tolueno, estireno, butil paraben, 1-naftol, o alcohol 4-hidroxibencílico, y (iii) compuestos polifenólicos de origen vegetal, de tipo flavonoide, que resultaron ser los inductores más potentes de la expresión transcripcional. Tanto los resultados obtenidos *in vivo*, como los mecanismos descritos para los demás represores miembros de la familia TetR, apuntaban hacia un mecanismo de inducción de la expresión génica consecuencia de una desrepresión mediada por efector. Con objeto de verificar esta hipótesis e identificar efectores del represor TtgR, se ensayó la capacidad de algunos compuestos que inducían la expresión *in vivo* para provocar la disociación del represor de su operador. Así, se llevaron a cabo ensayos de retardo en gel y de *footprint* con ADNasa I, en los que se incubaron los tres componentes (ADN, regulador e inductor) de manera simultánea, variando la concentración del inductor ensayado. Los resultados se recogen en la figura 22.

◀Figura 22. Identificación de efectores del represor TtgR que promueven su disociación del operador.

Los ensayos de retardo en gel (A) y de *footprint* con ADNasa I (B) en presencia de distintos compuestos, inductores o no de la expresión de los genes *ttgABC*, se llevaron a cabo según se describe en Materiales y Métodos.

A. Ensayos de retardo en gel: el fragmento de ADN marcado (189 pb, 5 nM) en ausencia (- y *) o presencia (resto de carriles) de TtgR (1,5 μ M), se incubó con concentraciones crecientes (0,2 – 1,5 mM) de distintos compuestos: cloramfenicol (Cm), tetraciclina (Tc), estireno (est), tolueno (tol), berberina (berb), genisteína (gen), luteolina (lut), apigenina (api), naringenina (nar), alcohol 3-hidroxibencílico (3OHBA), alcohol 4-hidroxibencílico (4OHBA), butil parabeno (but p ben), y 1 – naftol (1-naft). Los carriles marcados con el símbolo (+) corresponden al control positivo de unión de TtgR al ADN en ausencia de efectores, y con el símbolo (*) a los controles en ausencia de TtgR y a la máxima concentración del compuesto (1,5 mM).

B. *Footprint* de protección contra ADNasaI. El ADN fue previamente incubado en ausencia (-) o presencia (+) de 3 μ M de TtgR, y en ausencia (-) o presencia (+) de 2 mM de los antibióticos indicados: tetraciclina (Tc), ácido nalidixico (Nal), gentamicina (Gm), carbenicilina (Cb), y estreptomicina (Sm).

En el grupo de los antibióticos, el cloramfenicol y, en un menor grado, la tetraciclina promovieron la disociación del complejo TtgR-operador, a juzgar por el aumento en la intensidad de la banda correspondiente a ADN libre y la disminución de la correspondiente al complejo (Figura 22A). Esta fue la primera evidencia experimental que confirmaba el mecanismo de desrepresión de TtgR mediado por efectores, al mismo tiempo que ponía en evidencia su capacidad de reconocimiento múltiple de antibióticos (Terán *et al.*, 2003). El ensayo de *footprint* (Figura 22B) realizado en presencia de antibióticos tanto inductores (tetraciclina), como no inductores de la expresión pero sustratos del transportador TtgABC (ácido nalidixico, carbenicilina, estreptomicina), reveló que la pérdida de protección y la obtención de un patrón de corte idéntico al control sin proteína, sólo ocurría en presencia del antibiótico inductor (tetraciclina). Para los demás compuestos, se observó una protección equivalente a la obtenida en presencia de proteína TtgR sola. Estos resultados concuerdan con los obtenidos *in vivo*, ya que sólo aquellos efectores capaces de inducir la expresión transcripcional, provocaron la disociación de TtgR de su operador. Además, la obtención en presencia del efector, de un patrón de corte de ADN idéntico al control en ausencia de represor, descarta la formación de

cualquier tipo de complejo represor-ADN, intermediario (por ejemplo un solo dímero unido al operador) o de mayor orden en el ADN, que pudiera promover el efector al unirse a TtgR. Un resultado que, de lo contrario, va en el sentido de una completa y simultánea disociación de los dos dímeros de TtgR de su sitio de unión en el ADN, a raíz de la unión al efector.

En el caso de los otros tipos de compuestos ensayados, la mayoría de los que fueron capaces de inducir la expresión *in vivo*, también promovieron la disociación del represor TtgR de su operador, constituyéndose como efectores del mismo. Los compuestos más eficaces *in vitro* disociando el complejo TtgR-ADN fueron algunos flavonoides como luteolina, genisteína, apigenina y naringenina y, dentro del grupo de los aromáticos, el butil-parabeno, el alcohol 4-hidroxibencílico y el 1-naftol, compuestos que habían promovido *in vivo* las mayores inducciones de la expresión génica (véase sección 2.6. del capítulo I). De manera interesante, algunos compuestos sirvieron de controles negativos: en el caso de aromáticos de origen vegetal, la berberina, y en el caso de disolventes el alcohol 3-hidroxibencílico, y sorprendentemente, el tolueno y estireno, ya que fueron incapaces de provocar la disociación del complejo represor, incluso a máxima concentración (Figura 22A). Estos controles le dan validez a la utilización de esta técnica *in vitro* para el *screening* de efectores de TtgR, pero sobretodo en el caso del tolueno y el estireno, sugieren que a pesar de haberse observado *in vivo* un aumento de la expresión en respuesta a estos disolventes orgánicos, éstos aromáticos monocíclicos y mono-sustituídos, no parecen ser efectores de TtgR. Por otra parte, el hecho de que un cambio de posición del grupo hidroxilo de *meta* a *para* en el alcohol bencílico lo convierta en un efector, sugiere que este grupo hidroxilo en posición *para* de un anillo aromático bisustituido, sea un determinante importante de la especificidad, a pesar del amplio rango de efectores reconocidos por TtgR.

5.2. Caracterización bioquímica de la unión a efectores

Los anteriores ensayos *in vitro* demostraron el mecanismo funcional del represor TtgR, al establecer una relación de causa-efecto entre la unión del efector al represor, y su disociación del operador. Con objeto de caracterizar bioquímicamente la unión del efector al represor y de analizar el fenómeno de reconocimiento múltiple de efectores por parte de TtgR desde el punto de vista termodinámico, se llevaron a cabo experimentos de microcalorimetría de titulación isotérmica (ITC) de la proteína TtgR con algunos de sus efectores identificados anteriormente. Tres tipos de estudios por ITC surgieron para caracterizar funcionalmente la capacidad de unión de TtgR a múltiples efectores: (i) unión sencilla de efectores a la proteína TtgR, (ii) unión consecutiva de diferentes efectores y (iii) unión de efectores a la proteína TtgR unida a su operador.

5.2.1. Microcalorimetría de la unión de TtgR a diferentes efectores

Distintos efectores, estructuralmente diferentes (véase apéndice 4 para las estructuras) y pertenecientes a las tres clases de compuestos ya mencionadas (antibióticos, disolventes aromáticos, flavonoides) fueron ensayados en su unión a TtgR (Figura 23 y tabla 7). Los experimentos se realizaron en un primer tiempo en tampón Pipes (pipes 25 mM, pH 7,0; NaCl 250 mM; acetato magnésico 10 mM; KCl 10 mM; glicerol 5 % [v/v]; EDTA 0,1 mM; DTT 1 mM). Se debe hacer notar que la hidrosolubilidad muy limitada de algunos de los efectores identificados, especialmente de algunos flavonoides (luteolina, genisteína, y apigenina), dificultó la realización de estos experimentos. Por tanto se buscaron entre los inductores de la expresión de los genes *ttgABC* (véase figura 10), análogos estructurales de mayor solubilidad como la floretina y la quercetina, que resultaron ser efectores de alta afinidad para TtgR (Figura 23). En todos los casos la titulación de TtgR con éstos y otros efectores dio lugar a cambios de calor endotérmicos (Figura 23), y con cambios de entalpía muy

favorables (Tabla 7). Exceptuando al butil parabeno para el cual el término entrópico fue favorable, la interacción fue dominada por el factor entálpico y con un término entrópico desfavorable (Tabla 7). Esto indica que la contribución negativa $\Delta S_{\text{conformacional}}$ prima sobre los demás factores que influyen sobre el término ΔS_{total} (véase apartado 4.5. para el significado de los distintos factores entrópicos), en particular $\Delta S_{\text{disolvente}}$. Por tanto, la interacción de TtgR-efector, desde el punto de vista entrópico, está más marcada por una pérdida sustancial de la flexibilidad conformacional de la proteína, que por un desplazamiento importante de las moléculas de agua ordenadas de la capa de hidratación de la proteína hacia el resto del disolvente, lo cual puede sugerir que el sitio o bolsillo de unión a efectores este muy enterrado dentro del núcleo hidrofóbico de la proteína, de tal manera que la entrada del efector no se acompañe de grandes perturbaciones de la capa de hidratación. Respecto a la diferencia observada para el butil parabeno (entropía favorable), podría reflejar una diferencia importante en el modo de unión de este efector, dado su menor tamaño y su estructura monocíclica que le hacen muy diferente respecto a los demás.

Por su parte, las constantes de afinidad obtenidas se situaron en rangos biológicamente significativos (entre 1 y 150 μM , tabla 7). Las afinidades más altas se obtuvieron para los compuestos vegetales floretina y quercetina (K_D de $1,37 \pm 0,02$ y $1,47 \pm 0,07$ μM respectivamente). Además las curvas de titulación fueron de tipo sigmoideal (Figura 23), lo que permitió la determinación de la estequiometría de unión (n) con un buen intervalo de confianza. Esta estequiometría de unión fue de una molécula de efector por dímero de TtgR.

Los demás efectores ensayados, como el antibiótico cloramfenicol o los disolventes butil parabeno, mostraron afinidades de unión más débiles (K_D de $10,9 \pm 0,3$ μM para el cloramfenicol, $19,7 \pm 0,7$ μM para el butil parabeno, tabla 7), incluso hasta 100 veces más débiles en el caso del 1-naftol (K_D de 148 ± 4 μM). De manera muy interesante, la substitución en posición 3 del 1-naftol por un grupo hidroxilo (obteniéndose el 1,3-dihidroxi-naftaleno, apéndice 4) provocó un

aumento de la afinidad de unión en un factor 2, y un aumento similar en el término entálpico (Tabla 7), lo cual es coherente con un reconocimiento directo por parte de TtgR de este grupo hidroxilo, muy probablemente mediante un enlace de hidrógeno.

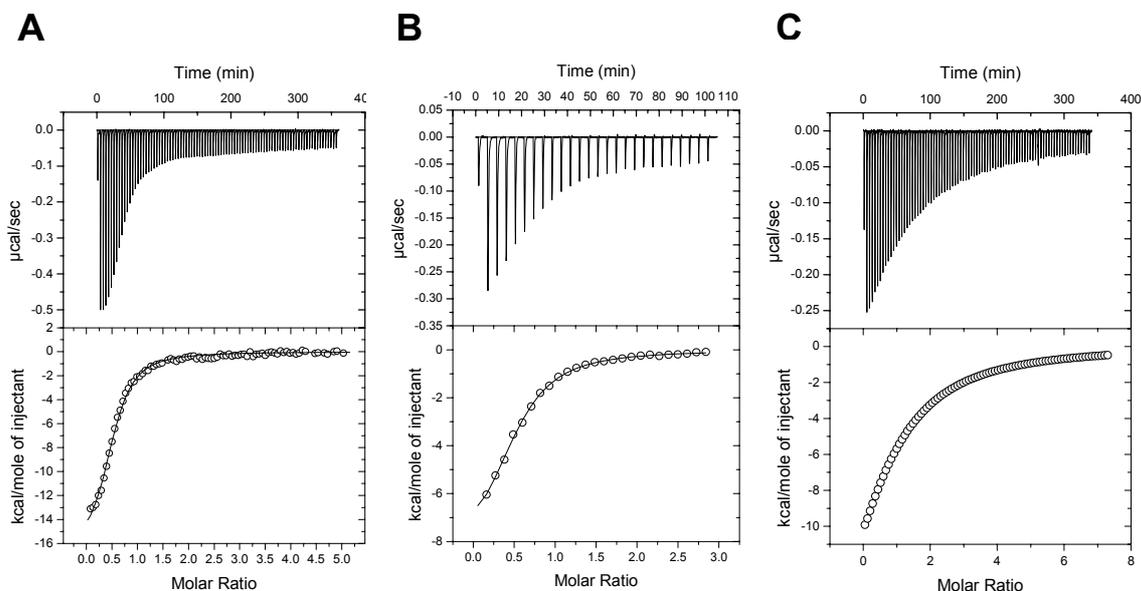


Figura 23. Calorimetría de titulación isotérmica de la proteína TtgR con distintos efectores.

Los experimentos de ITC fueron realizados a 30°C en tampón Pipes (pipes 25 mM, pH 7,0; NaCl 250 mM; acetato magnésico 10 mM; KCl 10 mM; glicerol 5 % [v/v]; EDTA 0,1 mM; DTT 1 mM). Las figuras corresponden a la titulación de TtgR (10 μM), con soluciones de floretina (A), quercetina (B), o naringenina (C), a 300 μM, 200 μM y 600 μM respectivamente. Las señales de calor de titulación (ventanas superiores) fueron integradas (ventanas inferiores) y analizadas con el algoritmo “one set of sites” del programa *Origin (MicroCal, Inc)*. Los parámetros termodinámicos correspondientes se recogen en la tabla 7.

La titulación con el disolvente orgánico estireno no generó cambios de calor compatibles con una posible unión al represor, detectándose únicamente señales correspondientes a calores de dilución, un resultado que lo descarta como efector de TtgR y que confirma lo observado previamente en los ensayos de retardo en gel. El mismo resultado se obtuvo con el antibiótico norfloxacina, sustrato de la bomba TtgABC (sección 1 del capítulo I), lo que refuerza la idea de que aunque el perfil de efectores de TtgR sea muy amplio y permisivo,

existen al mismo tiempo ciertos determinantes de especificidad, a juzgar por la ausencia de unión de estas moléculas, y por las diferencias de afinidad observadas entre efectores. No obstante, estos resultados ponen de manifiesto la capacidad de unión del represor TtgR a múltiples efectores, y con afinidades biológicamente significativas, algo que lleva implícito la gran plasticidad de su sitio de unión a efectores para conseguir acomodar compuestos distintos en tamaño y estructura.

Tabla 7. Parámetros termodinámicos de la interacción de TtgR con distintos efectores a 30°C.

Efector	K_A (M^{-1})	K_D (μM)	ΔG (kcal/mol)	ΔH (kcal/mol)	$T\Delta S$ (kcal/mol)
cloramfenicol	$9,17 \pm 1,14 \cdot 10^4$	$10,9 \pm 0,3$	$-8,27 \pm 0,01$	$-16,30 \pm 0,19$	$-9,42 \pm 0,19$
floretina	$6,75 \pm 0,35 \cdot 10^5$	$1,48 \pm 0,08$	$-8,08 \pm 0,03$	$-17,1 \pm 0,3$	$-8,97 \pm 0,31$
quercetina	$6,82 \pm 0,32 \cdot 10^5$	$1,47 \pm 0,07$	$-8,09 \pm 0,03$	$-8,93 \pm 0,22$	$-0,87 \pm 0,23$
naringenina	$1,07 \pm 0,04 \cdot 10^5$	$9,35 \pm 0,35$	$-6,97 \pm 0,02$	$-27,2 \pm 1,7$	$-20,1 \pm 1,7$
butil parabeno	$5,07 \pm 0,18 \cdot 10^4$	$19,7 \pm 0,7$	$-6,52 \pm 0,02$	$-4,49 \pm 0,07$	$1,88 \pm 0,07$
1-naftol	$6,73 \pm 0,16 \cdot 10^3$	148 ± 4	$-5,31 \pm 0,02$	$-10,9 \pm 0,2$	$-5,6 \pm 0,2$
1,3-OH naft.*	$1,65 \pm 0,11 \cdot 10^4$	61 ± 4	$-5,85 \pm 0,04$	$-19,3 \pm 5,7$	$-13,3 \pm 5,8$
estireno	– No hubo unión –				
norfloxacina	– No hubo unión –				

Los errores que figuran corresponden a la desviación estándar de los datos de ITC respecto a la regresión no-lineal obtenida tras el análisis con el algoritmo “one set of sites”. Los datos experimentales de las titulaciones (ITC) correspondientes a floretina, quercetina y naringenina se recogen en la figura 23. *: 1,3 dihidroxi-naftaleno.

Con el fin de encontrar algún determinante estructural entre los mejores efectores de TtgR como floretina y quercetina, una segunda serie de experimentos se llevó a cabo con moléculas estructuralmente relacionadas a estos. Sin embargo y como se ha mencionado anteriormente, la hidrosolubilidad de estos compuestos fue muy baja en el tampón utilizado previamente, por tanto fue necesario utilizar el mismo tampón adicionado 5% (v/v) del disolvente DMSO para evitar la precipitación de los compuestos más hidrofóbicos (apigenina, luteolina, genisteína y cumestrol). Esta utilización de entre 5 y 10% (v/v) de DMSO en el tampón de unión es una práctica común para el análisis de moléculas hidrofóbicas por ITC (Holdgate *et al.*, 2001).

Los primeros experimentos de esta segunda serie fueron destinados a evaluar el efecto del cambio de tampón en los parámetros termodinámicos de efectores ya ensayados anteriormente: floretina y naringenina (Tablas 7 y 8). En presencia de DMSO, las titulaciones revelaron para estos efectores una contribución igualmente favorable de los términos entálpico y entrópico sobre la unión, lo que indica que esta interacción no está dominada por el factor entálpico, como ocurría en ausencia de DMSO. No obstante, los efectos del DMSO sobre la afinidad y el término entálpico resultaron ser similares y proporcionales a los valores obtenidos anteriormente: los términos entálpicos disminuyeron en un factor 8, y las afinidades en un factor 7, lo que validó el uso de este nuevo tampón para la comparación de varios efectores estructuralmente relacionados.

Tabla 8. Parámetros termodinámicos de la interacción de TtgR con efectores de origen vegetal a 30°C.

Efactor	K_A ($10^4 M^{-1}$)	K_D (μM)	ΔG (kcal/mol)	ΔH (kcal/mol)	$T\Delta S$ (kcal/mol)
naringenina	1,54±0,10	64,9±4,2	-5,81±0,04	-3,45±0,50	2,36±0,51
genisteína	3,66±0,17	27,3±1,3	-6,33±0,03	-1,93±0,06	4,39±0,07
apigenina	6,45±0,53	15,5±1,3	-6,67±0,05	-1,28±0,04	5,39±0,06
luteolina	13,80±0,65	7,20±0,34	-7,13±0,03	-3,05±0,09	4,09±0,10
quercetina	7,27±0,32	13,7±0,6	-6,74±0,03	-1,49±0,02	5,24±0,03
floretina	9,14±0,35	10,9±0,4	-6,88±0,02	-1,99±0,03	4,88±0,04
cumestrol	5,49±0,69	18,2±2,3	-6,57±0,08	-1,68±0,25	4,88±0,27

Los errores corresponden a la desviación estándar de los datos de ITC respecto a la regresión no-lineal obtenida tras el análisis con el algoritmo “one set of sites”.

La figura 24 ilustra las diferencias en la estructura de las moléculas ensayadas, en donde la apigenina ocupa una posición central. Esquemáticamente las moléculas están constituidas por un núcleo cromenona (derivado del naftaleno), al que está conectado un grupo fenólico. Termodinámicamente, el modo de unión de TtgR a las 6 moléculas ensayadas fue muy similar (Tabla 8). La unión estuvo caracterizada por un modesto y favorable término entálpico (-

1,3 a 3,5 kcal/mol) acompañado de un término entrópico también favorable (TΔS situados entre 2,3 y 4,9 kcal/mol).

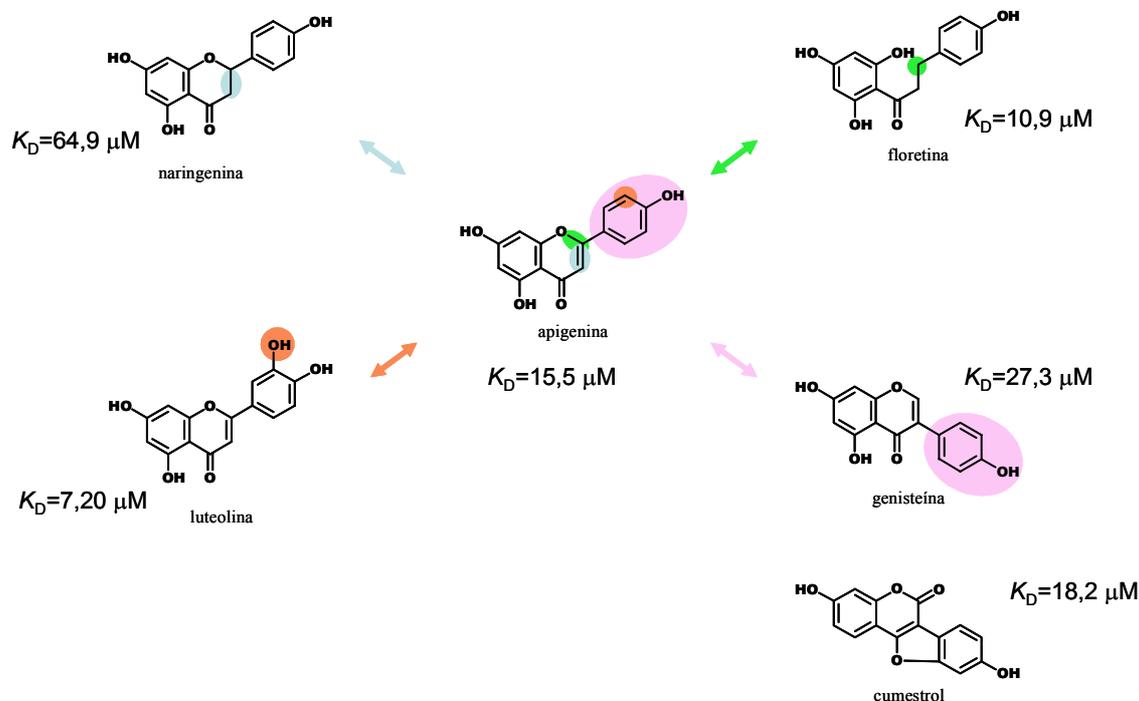


Figura 24. Análisis termodinámico de la interacción de TtgR con efectores de origen vegetal estructuralmente relacionados.

La estructura de las moléculas comparadas en su unión al represor se acompañan de sus respectivas constantes de afinidad (K_D): las transiciones o cambios estructurales entre una y otra están representados por colores y simbolizados por las flechas de igual color. Los datos experimentales de las titulaciones (ITC) correspondientes se recogen en la tabla 8.

Un análisis combinado de las estructuras y las afinidades permitió identificar elementos estructurales en los efectores, determinantes para la unión (Figura 24). En efecto, dos isómeros como la apigenina (flavona) y la genisteína (isoflavona), sólo mostraron diferencias de afinidad en un factor 1,8 (K_D de $15,5 \pm 1,3 \mu\text{M}$ para apigenina y $27,3 \pm 1,3 \mu\text{M}$ para genisteína), a pesar de un importante cambio de posición del grupo fenólico generado por esta isomerización. Un resultado a comparar con la transición apigenina-naringenina, donde el simple cambio de un enlace doble a simple, que permite

la rotación del grupo fenólico sobre el resto de la molécula con pérdida de la planalidad, provoca una pérdida de afinidad de un factor 4,2 (K_D de $64,9 \pm 4,2 \mu\text{M}$ para naringenina). Por otro lado, un resultado interesante es el aumento de afinidad de un factor 2,2 en la transición apigenina-luteolina (K_D de $7,2 \pm 0,3 \mu\text{M}$ para esta última), como consecuencia de la adición de un segundo hidroxilo al grupo fenólico, lo que sugiere la importancia de estos grupos polares en los anillos aromáticos, para el reconocimiento por parte de TtgR. Un resultado acorde con lo anteriormente observado en el caso del 1,3-dihidroxinaftaleno. Por último, un efector muy hidrofóbico como el cumestrol, que junto con la floretina y la quercetina habían demostrado tener relevancia biológica para *P. putida* DOT-T1E (véase capítulo I), también fue capaz de unirse a TtgR con una afinidad relativamente alta ($K_D=18 \mu\text{M}$).

De manera global, los resultados sugieren que la capacidad de reconocimiento múltiple de efectores por parte de TtgR, sería consecuencia de una singular plasticidad de su sitio de unión, necesaria para poder tolerar variaciones tanto de tamaño como de estructura en las moléculas que reconoce. Una plasticidad regida sin embargo por dos determinantes de especificidad en los efectores que parecen ser ambos indispensables para el reconocimiento: un núcleo hidrofóbico formado por uno o más anillos aromáticos, y al mismo tiempo varios grupos polares conectados a este núcleo, que confieran a la molécula un carácter anfipático. Las posiciones de estos grupos polares en la molécula condicionan a su vez su mayor o menor afinidad de unión por parte de TtgR.

5.2.2. Unión simultánea de dos efectores

Para explorar la posibilidad de unión simultánea de dos efectores al represor TtgR, se utilizó la misma técnica de microcalorimetría realizando dos titulaciones consecutivas sobre la misma muestra proteica con dos efectores diferentes. Tras llegar a saturación de los sitios de unión de TtgR con el butil

parabeno, se procedió a una segunda titulación de este complejo con 1-naftol. Este segundo efector era de menor afinidad (Tabla 7), con objeto de evitar un posible desplazamiento del primer efector durante la titulación. Sin embargo, no se obtuvieron señales de calor compatibles con una unión a TtgR, detectándose únicamente señales correspondientes a calores de dilución. Con lo que la unión simultánea de dos efectores de tamaños compatibles quedó descartada.

5.2.3. Unión de efectores a la proteína TtgR en complejo con su operador de ADN

Tal vez uno de los aspectos más novedosos de esta tesis doctoral, ha sido el de explorar si el represor TtgR, al estar unido a su operador, en una situación que podemos calificar de “basal”, muestra cambios en su modo de unión al efector. Quisimos en realidad situarnos en el contexto real de un efector que, habiendo conseguido entrar en la célula bacteriana, se encuentra con el complejo represor TtgR-operador, y así acceder de forma más completa al mecanismo de acción o de desrepresión de este sistema regulador.

Se realizaron titulaciones (ITC) del complejo TtgR-operador con tres efectores diferentes (floreтина, cloramfenicol y naringenina). Para ello se realizaron los experimentos en tampón de unión (Tris-HCl 10 mM, pH 7,0; acetato magnésico 10 mM; KCl 10 mM; glicerol 5 % [v/v]; EDTA 0,1 mM; DTT 1 mM), ya que el primer paso consistía en una primera titulación saturante de TtgR con su ADN operador (fragmento WT-40), en la que era importante obtener un complejo TtgR-ADN estable. Por tanto fue necesario realizar las titulaciones control de TtgR libre con efectores en este mismo tampón (Figura 25).

Los resultados de ITC de la proteína TtgR libre y unida al ADN con el efector floretina revelaron un aumento significativo de la afinidad de unión de este efector cuando la proteína estuvo en complejo con su operador, aumento

que se refleja claramente en el cambio de pendiente de las curvas de titulación en sus respectivos puntos de inflexión (Figura 25). La estequiometría de unión, por su parte, se mantuvo idéntica uniéndose 1 molécula de efector por dímero de TtgR. La afinidad de unión de la floretina resultó incrementada 2 veces en el caso del complejo TtgR-ADN: para éste se obtuvo una constante K_D de $0,49 \pm 0,03 \mu\text{M}$ (Tabla 8), mientras que para la interacción con la proteína libre se obtuvieron parámetros termodinámicos muy similares a los obtenidos anteriormente (Tablas 6 y 9), con una constante de afinidad K_D de $0,92 \pm 0,09 \mu\text{M}$. Por tanto estos resultados constituyen la primera evidencia de la existencia de cambios conformacionales en TtgR, relevantes para la unión al efector, y que ocurren tras la unión del represor al ADN.

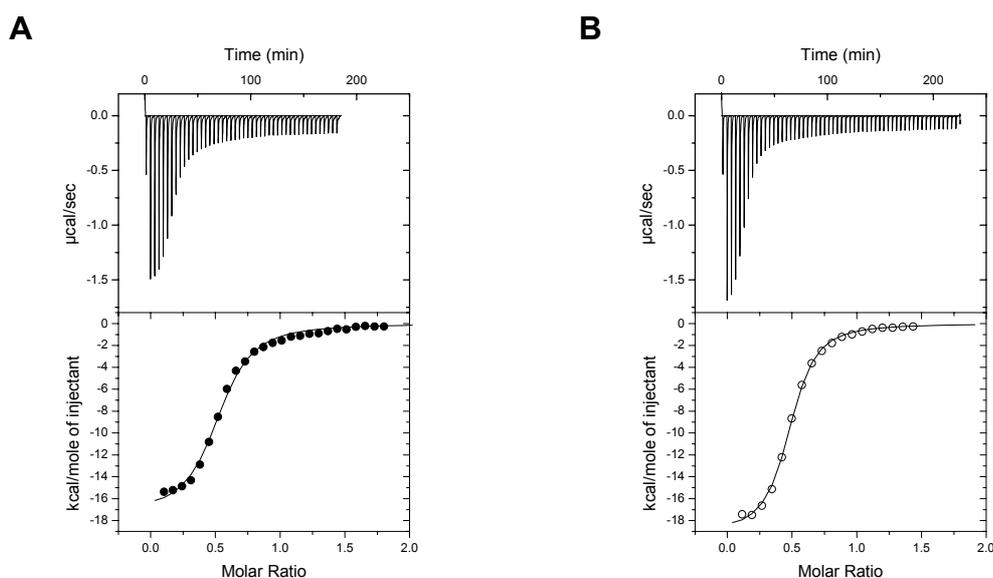


Figura 25. Calorimetría de titulación isotérmica (ITC) de la unión de efectores al represor TtgR unido a su operador.

Los experimentos de ITC fueron realizados a 30°C en tampón de unión (Tris-HCl 10 mM, pH 7,0; acetato magnésico 10 mM; KCl 10 mM; glicerol 5 % [v/v]; EDTA 0,1 mM; DTT 1 mM). Las figuras corresponden a la titulación con una solución de floretina ($700 \mu\text{M}$), del represor TtgR libre ($20 \mu\text{M}$) (A), o del complejo TtgR-ADN (WT-40) (B). Las señales de calor de titulación (ventanas superiores) fueron integradas (ventanas inferiores) y analizadas con el algoritmo “one set of sites”. Los parámetros termodinámicos correspondientes se recogen en la tabla 9.

Los resultados obtenidos con otros dos efectores de menor afinidad en su unión con el represor libre (naringenina y cloramfenicol) fueron distintos (Tabla 9). En el caso de la naringenina, si bien se observaron variaciones importantes en los términos entalpía y entropía, la afinidad de unión no varió significativamente entre la proteína TtgR libre o unida al ADN (disminución de K_D en un factor 1,08 para el complejo respecto a la proteína libre, tabla 9). Más aún, en el caso del cloramfenicol, se observó una clara disminución de la afinidad de unión en un factor 1,5 para la forma de TtgR unida al ADN respecto a la forma libre (Tabla 9). Este último resultado confirma la existencia de un cambio conformacional en la proteína TtgR tras su unión al operador, que afecta significativamente el sitio de unión al efector y tiene por tanto claras consecuencias sobre las interacciones proteína-efector.

Tabla 9. Parámetros termodinámicos de la interacción de TtgR libre y TtgR unida a su operador con distintos efectores a 30°C.

Efector	Receptor	K_A ($10^5 M^{-1}$)	K_D (μM)	ΔG (kcal/mol)	ΔH (kcal/mol)	$T\Delta S$ (kcal/mol)
floreтина	TtgR	10,9±1,1	0,92±0,09	-8,37±0,06	-17,60±0,34	-9,27±0,35
	TtgR-ADN	20,5±1,4	0,49±0,03	-8,75±0,04	-19,20±0,21	-10,42±0,22
cloramfenicol	TtgR	0,63±0,03	15,8±0,7	-6,65±0,03	-13,40±0,30	-6,69±0,31
	TtgR-ADN	0,40±0,01	24,8±0,7	-6,38±0,02	-11,30±0,16	-4,85±0,16
naringenina	TtgR	1,15±0,04	8,70±0,26	-7,02±0,02	-9,51±0,16	-2,54±0,16
	TtgR-ADN	1,06±0,03	9,43±0,23	-6,97±0,02	-14,20±0,17	-7,35±0,21

Los errores corresponden a la desviación estándar de los datos de ITC respecto a la regresión no-lineal obtenida tras el análisis con el algoritmo "one set of sites". Los datos experimentales correspondientes a la floretina están recogidos en la figura 25.

Este conjunto de resultados realizados con el complejo TtgR-ADN como unidad receptora de efectores, es totalmente novedoso para este tipo de sistemas represores. Tal vez por la mayor relevancia funcional que suscitan, se han descrito ampliamente las consecuencias, en términos conformacionales, de la unión del efector sobre la unión (o desunión en este caso) al ADN (Orth *et al.*, 1998; Schumacher *et al.*, 2001 y 2002), sin embargo las consecuencias de la unión al operador sobre el reconocimiento del efector han sido obviadas.

La relevancia de estos resultados desde el punto de vista funcional y evolutivo será discutida más adelante.

6. Competición con la ARN-polimerasa por la región promotora.

Los anteriores ensayos de retardo en gel y de *footprint* con efector en los que se determinó, por un lado, que el operador de TtgR solapaba con el sitio de unión de la ARN polimerasa, y por otro lado, que el efector promovía la disociación de TtgR de su operador, contribuyeron a aclarar el mecanismo funcional de represión-inducción del regulador TtgR. Con el fin de indagar las consecuencias del solapamiento del operador de TtgR con la zona de asentamiento de la ARN-polimerasa en la región promotora de los genes *ttgABC*, se realizaron ensayos de *footprint* de protección contra ADNasa I, en ausencia y en presencia del represor TtgR, de ARN-polimerasa (σ^{70} -holoenzima), y del efector naringenina (Figura 26). Cuando el ADN correspondiente a la región promotora de los genes *ttgABC* se incubó con ARN-polimerasa sola, se obtuvo una protección comprendida entre las posiciones +17 y -47, distinta de la protección correspondiente al represor TtgR solo (entre -7 y -39). De manera interesante, ambas proteínas demostraron ser mutuamente exclusivas en su unión a la región promotora, ya que cuando se añadió una antes que la otra a la reacción, la protección obtenida correspondió siempre a la primera, descartando la posibilidad de un desplazamiento de la ARN-polimerasa por parte de TtgR, una vez que esta se haya asentado en el promotor, al menos en las condiciones del ensayo. No obstante, cuando se incubó el ADN con el represor TtgR y, posteriormente, se añadió un efector (naringenina) y la ARN-polimerasa, la protección obtenida correspondió exactamente a la obtenida con ARN-polimerasa sola, indicando que la disociación total del represor inducida por el efector, permite la entrada correcta de la ARN-polimerasa a la región promotora para iniciar la transcripción. Este resultado confirma el mecanismo funcional sugerido por los

ensayos anteriores, con un represor TtgR que compite con la ARN-polimerasa por la región promotora, bloqueando, una vez unido a su operador, la formación del complejo transcripcional por simple impedimento estérico. Dicho bloqueo se anula en presencia del efector, al provocar éste la disociación de TtgR de su operador y dejar libre la región promotora. Un mecanismo clásico de represión transcripcional, ampliamente descrito y frecuente en bacterias (Rojo, 2001).

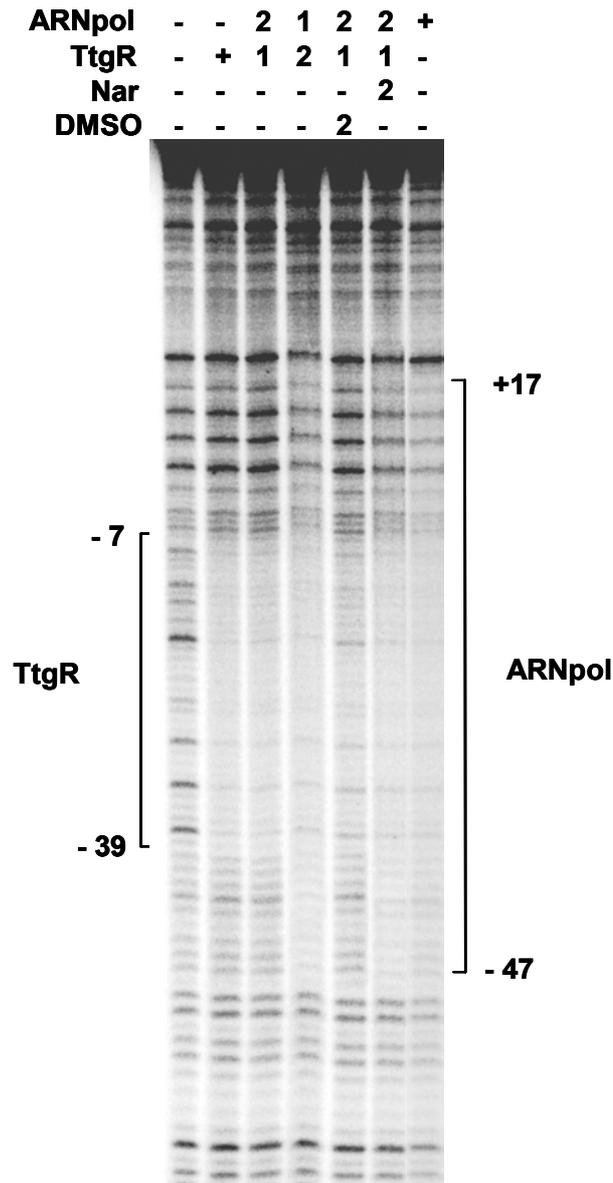


Figura 26. Competición entre el represor TtgR y la ARN-polimerasa por la región promotora del operón *ttgABC*.

Los ensayos de *footprint* con ADNasa I se llevaron a cabo como descrito en Materiales y Métodos. El ADN (50 nM), correspondiente a la cadena codificante del operón *ttgABC*, se incubó a 30°C, en ausencia (-) o presencia (+) de TtgR (1 μ M), ARN-polimerasa (σ^{70} holoenzima) (50 nM), y el efector naringenina (2 mM). Los números corresponden al orden en la incubación del ADN con las proteínas y/o efector (10 min. para cada incubación). Como control del ensayo en presencia de efector, se utilizó un volumen equivalente del disolvente DMSO, en el cual estaba preparado el efector.

DISCUSIÓN

La bomba TtgABC es responsable de la resistencia intrínseca de *P. putida* DOT-T1E a múltiples antibióticos y biocidas.

Al inicio de esta Tesis Doctoral se habían identificado tres sistemas de transporte de la familia RND (TtgABC, TtgDEF y TtgGHI), responsables de los altos niveles de tolerancia a disolventes orgánicos de la cepa *P. putida* DOT-T1E (Rojas *et al.*, 2001). Estos transportadores son capaces de expulsar disolventes orgánicos como tolueno, estireno, triclorobenceno, xilenos, etil y propilbenceno según el caso (Ramos *et al.*, 1998; Rojas *et al.*, 2001). La bomba TtgABC parecía, además, conferir resistencia a varios antibióticos como ampicilina, tetraciclina o cloramfenicol (Ramos *et al.*, 1998), perfilándose como un transportador MDR de muy amplio espectro de sustratos. Los estudios de susceptibilidad a diferentes clases de agentes antimicrobianos realizados en el presente trabajo (Tabla 4), permitieron ampliar el rango de sustratos de este transportador no sólo a distintos antibióticos de importancia clínica, sino a otros agentes biocidas o antimicrobianos como el triclosan, o el bromuro de etidio, y demostraron, además, que TtgABC era el único, entre los tres transportadores de disolventes Ttg, responsable de la resistencia intrínseca de *P. putida* DOT-T1E a esta otra clase de compuestos. La similitud de secuencia de TtgABC con sus pares MexAB-OprM en *P. aeruginosa*, y AcrAB-TolC en *E. coli* (apéndice 3), coincide con el rango de sustratos de estos transportadores MDR, capaces de expulsar tanto antibióticos como disolventes orgánicos, detergentes, biocidas o incluso sales biliares en el caso de *E. coli* (Ma *et al.*, 1995; Thanassi *et al.*, 1997; Poole, 2004). Este amplio rango de sustratos unido al hecho que se hayan encontrado homólogos de esta bomba en bacterias dispares desde el punto de vista de la relación con su entorno natural o huésped, como *P. fluorescens*, *S. maltophilia*, *Burkholderia spp*, *Neisseria spp*, *Salmonella spp*, *Erwinia spp*, o *A. tumefaciens*, sugiere que no han sido ni el uso clínico de antibióticos, ni el derrame de hidrocarburos aromáticos tóxicos, los causantes de la adquisición y evolución

de estos sistemas. Grkovic y colaboradores (2002) señalan al respecto que el uso indiscriminado de antibióticos y biocidas, a lo que añadiríamos nosotros los frecuentes vertidos y derrames de hidrocarburos aromáticos en suelos y aguas, habrían en realidad permitido la selección y emergencia de bacterias que ya tenían estos genes de transportadores MDR presentes en su genoma. La selección se hubiera hecho sobre una mayor expresión de estos transportadores, ya sea intrínseca o adquirida. Una hipótesis cada vez más aceptada, debido a la aparición de genes de transportadores MDR en todo tipo de bacterias, tanto patógenas como inocuas (Paulsen *et al.*, 2001). Más aún si estudios de genómica funcional realizados tanto en *E. coli* como en *B. subtilis*, señalan que la mayoría de los transportadores MDR, caracterizados o no, se expresan a unos niveles basales detectables (Tao *et al.* 1999; Saier *et al.*, 2002). Estos elementos explicarían la relativa resistencia basal intrínseca de algunas bacterias a muchos agentes antimicrobianos, como es el caso de nuestra cepa *P. putida* DOT-T1E, y su selección por resistencia a tóxicos orgánicos.

La bomba TtgABC participa en la expulsión de moléculas señal de plantas presentes en su hábitat natural y que poseen actividad antimicrobiana.

No obstante, la pregunta que más sobresale respecto a estos transportadores MDR es el papel fisiológico que pueden cumplir en bacterias. Una pregunta que, si bien no ha constituido un objetivo *per se* del presente trabajo, ha estado omnipresente a lo largo de esta Tesis Doctoral, condicionando por tanto el diseño de algunos experimentos, y permitiendo obtener claros elementos de respuesta. Así, se logró demostrar que TtgABC confería resistencia a metabolitos secundarios de origen vegetal presentes en el suelo y con actividad antimicrobiana, particularmente abundantes en el entorno rizosférico de las plantas (Bailey y Mansfield, ed. 1982). Estos incluyeron flavonoides como quercetina o naringenina y otros compuestos polifenólicos

como floretina o cumestrol, cuya actividad antibacteriana sobre *P. putida* DOT-T1E aumentó en ausencia de la bomba TtgABC (Tabla 5). Algunos de estos compuestos se sintetizan de forma constitutiva en algunas plantas y en otras se consideran fitoalexinas, es decir que son sintetizados en respuesta a una señal o elicitador producido por un microorganismo potencialmente patógeno (van Etten, 1994, Dixon, 2001). La actividad antimicrobiana de los flavonoides, y moléculas relacionadas, ha sido ampliamente reportada (El Gammal *et al.*, 1986; Rauha *et al.*, 2000; Dastidar *et al.*, 2001; Martini *et al.*, 2004) y parece estar fundamentada en la capacidad de estos compuestos para inhibir ciertas proteínas con actividad tirosina-quinasa (Markovits *et al.*, 1989; Fischer y Lane, 2000), en particular la actividad de sobre enrollamiento de las girasas bacterianas (Plaper *et al.*, 2003). Para algunos de éstos, como el cumestrol, la floretina, o la naringenina, la acción antibacteriana sobre *P. putida* DOT-T1E y su expulsión por parte de la bomba TtgABC, sólo han logrado ser evidenciados utilizando el inhibidor de bombas MC₂₀₇₁₁₀ (Tabla 5). El efecto sinérgico obtenido por la utilización combinada de inhibidores y agentes antimicrobianos está lejos de ser una situación artificial de laboratorio, ya que es un recurso natural descubierto en plantas de la especie *Berberis*, capaces de sintetizar tanto el componente antibacteriano (berberina), como inhibidores de transportadores MFS que potencian su actividad (5'-metoxihidnocarpina y feoforbida A) (Stermitz *et al.*, 2000, a y b). La utilización de inhibidores de bombas de expulsión se convierte, por tanto, en una herramienta útil para estudiar en el laboratorio el efecto antibacteriano de toda una nueva clase de compuestos derivados de plantas con gran potencial para el tratamiento de infecciones bacterianas (Hsieh *et al.*, 1998; Renau *et al.*, 1999; Lomovskaya *et al.*, 1999; Lewis, 2001; Tegos *et al.*, 2002). La presencia en *P. putida* DOT-T1E, de otros transportadores, además de TtgABC, capaces de expulsar estos compuestos de origen vegetal, como lo sugiere la potenciación de su actividad por el inhibidor MC₂₀₇₁₁₀ en la cepa mutante DOT-T1E18, es probablemente responsable del alto nivel de resistencia obtenido en los ensayos

realizados en ausencia del inhibidor, tanto en la cepa silvestre como en la cepa DOT-T1E18 (Tabla 5). Una hipótesis que es coherente con la reciente secuenciación del genoma de *P. putida* KT2440 (Nelson *et al.*, 2002) que revela la existencia de otros 9 transportadores de tipo RND, entre los cuales dos ortólogos no caracterizados de los sistemas MexCD-OprJ (PP2817-19) y MexEF-OprN (PP3425-27), los demás sin función conocida (PP0906, PP1517, PP2065, PP3302, PP3456, PP3584, PP5173), alguno de ellos pudiendo participar en la expulsión de esta clase de compuestos vegetales. Este solapamiento en el perfil de sustratos de los transportadores MDR de un mismo organismo, y su funcionamiento de manera complementaria, se ha descrito para otros sistemas MDR bacterianos, como las bombas Mex de *P. aeruginosa*, o Acr de *E. coli* (Morita *et al.*, 2001; Poole, 2003), siendo un fenómeno que dificulta el estudio de la actividad individual de un transportador MDR en su cepa parental.

Por otro lado, podría pensarse que los altos valores de CIM (centenas de µg/ml) obtenidos para estos compuestos vegetales en ausencia del inhibidor (Tabla 5), fueran poco significativos desde el punto de vista ecológico o fisiológico, ya que provienen de bioensayos realizados en el laboratorio en condiciones que poco tienen que ver con las concentraciones naturales de estos agentes antimicrobianos en medioambiente. No obstante, encontramos un ejemplo de estudio de la actividad de estos compuestos *in situ* (Pierce *et al.*, 1996), en el que los autores logran determinar las concentraciones reales de una fitoalexina con poder antibacteriano en células foliares de varias cepas de algodónero. Los valores obtenidos en dicho trabajo, fueron incluso superiores a las CIM obtenidas en los respectivos bioensayos de laboratorio con el microbio patógeno (*Xanthomonas campestris*). Con lo cual se logró establecer una perfecta correlación entre protección *in situ* contra este patógeno, concentración foliar en fitoalexina y ensayos de determinación de CIM en laboratorio. Además, otros ensayos *in situ* con bacterias asociadas a plantas (patógenas o no) como *A. tumefaciens*, *R. etli*, o *E. amylovora*, demostraron la participación de un

transportador MDR, implicado en la resistencia a flavonoides y otras moléculas señal de plantas, en la colonización competitiva de raíces o tejidos vegetales (Palumbo *et al.*, 1998; Gonzalez-Pasayo *et al.*, 2000; Burse *et al.*, 2004) v. Todo esto da crédito a los bioensayos de resistencia/susceptibilidad obtenidos y presentados en esta memoria, lo que permite otorgar un papel fisiológico a la bomba de disolventes orgánicos y antibióticos TtgABC, en la expulsión de moléculas con actividad antibacteriana, derivadas de plantas y por tanto presentes en el hábitat natural de *P. putida* DOT-T1E.

Los genes de la bomba TtgABC forman un operón y se inducen en respuesta a compuestos aromáticos, incluyendo disolventes orgánicos, antibióticos y metabolitos secundarios de plantas.

La expresión de los genes *ttgABC* y *ttgR* había sido previamente analizada en *P. putida* DOT-T1E y el mutante DOT-T1E13 (*ttgR*), pero únicamente en respuesta a tolueno suministrado en fase de vapor durante el crecimiento de las cepas (Duque *et al.*, 2001). En esta Tesis Doctoral (Capítulo I, sección 2), tras demostrar que los genes estructurales *ttgABC* forman un operón (Figura 3), se confirma la regulación negativa ejercida por TtgR sobre la transcripción de *ttgABC* y sobre su propia transcripción (Figura 5). Sin embargo, se debe destacar que contrariamente a lo sugerido por los anteriores ensayos, la expresión del operón *ttgABC* no es constitutiva, aunque exista un cierto nivel basal responsable de la resistencia intrínseca a varios antibióticos no inductores de la expresión (p. ej. estreptomicina, norfloxacin, cefotaxima, carbenicilina o ampicilina, figura 4 y tabla 5). En efecto, la expresión aumentó significativamente en presencia de numerosos compuestos aromáticos, que incluyeron a disolventes como estireno, 1-naftol, butil parabeno o alcohol 4-hidroxibencílico, antibióticos como cloramfenicol o tetraciclina, y varias moléculas señal de plantas (Figuras 4 y 10), muchos de ellos sustratos de la bomba TtgABC. Se comprobó además que la inducción génica obtenida en

respuesta a la mayoría de estos compuestos aromáticos, era dependiente del regulador TtgR, tanto por los ensayos *in vivo* en un fondo *ttgR*⁻, en los cuales no se obtuvo inducción (figuras 5 y 10), como por los ensayos *in vitro* que demostraron que la mayoría de estos inductores de la expresión eran efectores de TtgR (Figura 27). El perfil de expresión en presencia de estos inductores fue idéntico para los genes estructurales *ttgABC* y el gen regulador *ttgR*, probablemente debido al solapamiento de los promotores divergentes involucrados, y a la localización del operador de TtgR (Figura 17) que cubre las regiones promotoras involucradas (las regiones -10 de cada promotor y la región -35 de P_{ttgABC} quedan completamente cubiertas).

Inducción de la expresión de la bomba TtgABC y estrés: evidencias de una regulación independiente de TtgR.

El caso particular de los disolventes orgánicos tolueno y estireno merece ser discutido, ya que, aunque se obtuvo una inducción de los genes *ttgABC* y *ttgR* en su presencia (Figura 4), los ensayos *in vitro* de retardo en gel (Figura 27) y de ITC (Tabla 5) indicaron que estos dos disolventes aromáticos no eran efectores de TtgR. Por tanto, la inducción obtenida en respuesta a estos compuestos parece seguir una ruta reguladora independiente de TtgR, lo que coincide con el aumento de la expresión de los genes *ttgABC* y *ttgR* observada en respuesta a estireno en la cepa DOT-T1E13, deficiente en el regulador TtgR (Figura 5). La implicación de un regulador distinto a TtgR, y probablemente global había sido propuesta previamente para los genes *ttgABC* y *ttgR* (Duque *et al.*, 2001). En el caso de la bomba AcrAB-TolC de *E. coli*, la expresión está controlada tanto a nivel local por el represor AcrR (homólogo a TtgR), como por varios reguladores globales de respuesta a estrés general (Mar, Rob, Sox) o a densidad celular y señales de *quorum sensing* (SdiA) (Ma *et al.*, 1995 y 1996; Rahmati *et al.*, 2002). Sin embargo la búsqueda de homólogos de estos reguladores globales en el genoma de *P. putida* KT2440, no arrojó ningún

resultado satisfactorio, señalando una regulación global en respuesta a estrés diferente en *P. putida*. Además, la respuesta a estrés, en *P. putida* DOT-T1E, sólo reveló un aumento de la expresión del operón *ttgABC* a un choque de etanol, y no a otros tipos de estrés (Figura 9), como ocurre para los genes *acrAB* en *E. coli*. Aunque el choque etanólico provoca alteraciones importantes en los lípidos de membrana que modifican su fluidez (Heipieper *et al.*, 1994), se acompaña generalmente de un choque oxidativo, activando en *E. coli* la respuesta SoxRS (Storz y Imlay, 1999) y por tanto induciendo, entre otros muchos genes, los genes *acrAB* (Lu *et al.*, 2005). En *P. putida* DOT-T1E, la expresión del operón *ttgABC* se mantuvo inalterada por un choque oxidativo (H₂O₂), lo que sugiere que la inducción de *ttgABC* obtenida tras el choque etanólico, no pasa por el efecto oxidativo paralelo que genera, siguiendo por tanto una ruta reguladora distinta. Las similitudes en algunas de las alteraciones de membrana causadas por el etanol y los disolventes orgánicos (Heipieper *et al.*, 1994; Jones, 1994; Ramos *et al.*, 2002), asociadas a la respuesta pleiotrópica que provocan como estrés, permiten proponer que el aumento de expresión del transportador TtgABC observado en respuesta a tolueno, estireno o etanol, se inscribe más en una respuesta global a un estrés relacionado con los lípidos de membrana, que en una respuesta específica a estos compuestos. En este sentido TtgABC se diferenciaría de las otras dos bombas de expulsión de tolueno en *P. putida* DOT-T1E (TtgGHI y TtgDEF), cuya inducción y regulación cruzada en respuesta a numerosos disolventes orgánicos forman parte de respuesta más específica mediada por los reguladores locales de estos sistemas (TtgV y TtgT respectivamente), cuyos efectores incluyen a toluenos y alcoholes alifáticos (Guazzaroni *et al.*, 2004 y 2005; Terán *et al.*, 2005).

Factores sigma implicados en la transcripción desde los promotores *P_{ttgABC}* y *P_{ttgR}*.

Como se ha mencionado, la expresión basal del operón *ttgABC* es responsable de la resistencia intrínseca de *P. putida* DOT-T1E a varios compuestos antimicrobianos. El gen regulador *ttgR* también se transcribe a un nivel basal detectable en ausencia de efectores (Figura 4), lo que indica que la represión ejercida por TtgR es débil, y por tanto coherente con la baja afinidad de unión al operador obtenida en los ensayos *in vitro* ($K_D \sim 1 \mu\text{M}$, figura 15), muy por debajo de la del represor TetR ($K_D \sim 0,01 \text{ nM}$, Orth *et al.*, 2000), o de otros represores de la familia como CamR ($K_D \sim 0,1 \mu\text{M}$, Aramaki *et al.*, 1995), EthR ($K_D \sim 0,146 \mu\text{M}$, Engohan-Ndong *et al.*, 2004). La transcripción basal observada en ambos promotores, depende del factor σ^{70} (Figura 7), el factor sigma principal implicado en la transcripción de más de mil genes (Ishihama, 1999), mayoritariamente con función vegetativa y de mantenimiento (*house keeping genes*). Además la transcripción fue dependiente de σ^{70} tanto en fase exponencial como en fase estacionaria temprana (Figura 7), momento en que se alcanza una actividad basal máxima de los promotores *P_{ttgABC}* y *P_{ttgR}* (Figura 6). Lo cual hizo pensar que el factor sigma alternativo RpoS, responsable de la inducción de un centenar de genes en fase estacionaria y también considerado un regulador central de respuesta a estrés (Ishihama, 1999), podía estar involucrado en la expresión de *ttgABC* y *ttgR*. Sin embargo, se demostró que esta dependencia de la expresión transcripcional en función de la fase de crecimiento era independiente de σ^S (Figura 8). Un resultado similar ha sido obtenido en *E. coli*, cuyos genes *acrAB* se inducen también en entrada de fase estacionaria (Ma *et al.*, 1995 y 1996), pero por un proceso independiente del factor σ^S (Rand *et al.*, 2002).

Caracterización bioquímica y funcional del regulador TtgR.

La purificación hasta homogeneidad de la proteína TtgR desarrollada en esta Tesis Doctoral abrió paso a numerosos estudios bioquímicos y moleculares *in vitro* (Capítulo II), que permitieron caracterizar funcionalmente este regulador local de la bomba MDR TtgABC. Dos de sus aspectos funcionales constituyeron los dos ejes conductores de la caracterización de su modo de acción: su capacidad de unión al ADN operador, responsable de la represión transcripcional, y su particular capacidad de unión a múltiples efectores estructuralmente distintos, causantes de la desrepresión transcripcional de los genes *ttgABC* y *ttgR*, mediada por un amplio rango de efectores.

Dos características funcionales que los miembros de la familia TetR consiguen articular a través de sus dos dominios funcionales. Es interesante anotar que aunque la familia de reguladores TetR se define a través de un perfil limitado al dominio N-terminal, dominio que contiene el conservado motivo HTH de unión al ADN (Aramaki *et al.*, 1995; Ramos *et al.*, 2005), importantes características comunes de sus miembros están portadas por el resto de la proteína (dominio C-terminal).

La primera es la composición en estructura secundaria: todos los miembros caracterizados estructuralmente (TetR, QacR, CprB y EthR), están compuestos por entre 9 y 10 α -hélices (Hinrichs *et al.*, 1994; Kisker *et al.*, 1995; Orth *et al.*, 2000; Schumacher *et al.*, 2001 y 2002; Natsume *et al.*, 2004; Dover *et al.*, 2004), la predicción para TtgR es de 9 α -hélices (Figura 12).

La segunda es que todos los miembros parecen ser homodiméricos, como también ha sido demostrado para TtgR (Figuras 15 y 20). Una propiedad que según los datos estructurales involucra, en cada monómero, dos hélices α antiparalelas del dominio C-terminal (α -hélices 8 y 9 o 8 y 10 según el caso) que forman un motivo de interfase estructuralmente conservado, en asociación con las equivalentes en el otro monómero. No obstante, los residuos implicados en ésta interacción proteína-proteína no están conservados entre los distintos

miembros de la familia, en términos de secuencia primaria, pero sí en el tipo de interacción utilizando diferentes combinaciones de contactos hidrofóbicos y electroestáticos (Schumacher *et al.*, 2001; Natsume *et al.*, 2004; Dover *et al.*, 2004). Aunque la evolución de estos reguladores ha sido aparentemente más permisiva en el dominio C-terminal, como lo sugiere el poco grado de conservación en su secuencia primaria (Ramos *et al.*, 2005), la conservación estructural del motivo de dimerización, asociada a la ausencia de formas monómericas o de mayor orden, sugiere que la dimerización es una característica relevante e imprescindible para el funcionamiento de estos reguladores transcripcionales. Además, la reciente aparición en la base de datos de estructuras proteicas PDB, de otras 5 estructuras cristalinas de reguladores miembros de la familia TetR (1RKT, 1VIO de *Bacillus subtilis*, 1T33 de *Salmonella typhimurium*, 1PCB de *E. coli*, y 1ZOX de *Enterococcus faecalis*), cuya función es desconocida² pero con las mismas características mencionadas, respalda este análisis. Es importante, por tanto, añadir a esta familia, estas nuevas características estructurales y funcionales que se escapan del análisis de su secuencia primaria, a saber su composición exclusivamente helicoidal, con un tamaño limitado a 9-10 hélices α , y su capacidad para formar homodímeros estables, a través de un motivo de hélices antiparalelas estructuralmente conservado en su dominio C-terminal.

Caracterización funcional de la unión de TtgR a su operador de ADN

TtgR constituye, después de QacR (Schumacher *et al.*, 2002), el segundo ejemplo descrito para un miembro de la familia TetR en exhibir un modo de unión al ADN altamente cooperativo y con una estequiometría de dos dímeros por operador (Capítulo II, sección 4). Las similitudes entre estos dos reguladores de la familia TetR han sido patentes en varios aspectos de su unión al operador: la cooperatividad positiva, el tamaño del operador de 28-30 pb que

² Estructuras tridimensionales derivadas de ensayos de cristalización a escala genómica.

contiene un palíndromo imperfecto de 28 pb con una secuencia espaciadora, la estequiometría de unión, y la imposibilidad de obtener la unión de un solo dímero al operador. Similitudes que, por otro lado, se han encontrado también en otros aspectos como el hecho que puedan tener el mismo número de hélices α (9 predichas para TtgR, figura 12), la capacidad de reconocimiento de múltiples efectores con estructuras distintas, o la estequiometría de unión de un efector por dímero (Capítulo II, sección 5), todo ello a pesar de que la similitud en secuencia primaria entre esta dos proteínas sea baja (13% de identidad). Un tercer regulador de la familia TetR en *Mycobacterium tuberculosis*, EthR se une también de manera cooperativa al ADN, pero con una estequiometría de 4 dímeros por operador (Engohang-Ndong *et al.*, 2004).

Este modo de unión cooperativa al ADN ha sido descrito para varios reguladores transcripcionales pertenecientes a otras familias, como los reguladores MetJ (Somers *et al.*, 1992), y TrpR (Lawson y Carrey, 1993) de *E. coli*, la proteína Arc del fago P22 (Raumann *et al.*, 1994); y el represor DtxR (White *et al.*, 1998; Chen *et al.*, 2000). No obstante, en el caso de MetJ y Arc, la unión de dos dímeros al operador es diferente a la de QacR y TtgR, ya que cada dímero se une a un semi-sitio, sin solapar con el otro, y la cooperatividad proviene de la capacidad de estos para formar tetrámeros que implican por tanto contactos entre dímeros, independientemente de la presencia o no de ADN. El caso más parecido al de TtgR y QacR sería el de DtxR, cuya unión cooperativa al operador se hace sin contactos entre los dos dímeros) y con una unión al operador en la que los sitios para cada dímero solapan entre sí (White *et al.*, 1998; Chen *et al.*, 2000). Tanto en el caso de DtxR como de QacR (Schumacher *et al.*, 2002), la cooperatividad de unión entre los dos dímeros ocurre por una deformación del sitio de unión (ADN) inducida por la misma proteína, lo que es coherente con los resultados de *footprint* (hiperreactividad y cambio del patrón de corte en todo el fragmento de ADN intergénico obtenidos en algunos ensayos de *footprint*, figura 17), y de ITC (reacción ampliamente dominada por

el término entrópico, Tabla 6). Por tanto, el modo de unión al ADN, por parte de TtgR merece seguir siendo explorado, particularmente desde el punto de vista estructural, para poder así obtener más información sobre este tipo de cooperatividad.

Si bien en la familia TetR, ya se han descrito hasta tres modos distintos de unión al operador, que se diferencian por la estequiometría de unión (1, 2 o 4 dímeros), ni la secuencia primaria, ni la estructura secundaria, ni siquiera la estructura terciaria del conservado motivo HTH, permiten predecir completamente el modo de unión de los miembros de esta familia, ya que esto lo confiere sin duda alguna la naturaleza del operador (Meier *et al.*, 1988; Orth *et al.*, 2000; Grkovic *et al.*, 2001; Engohan-Ndong *et al.*, 2004). La superposición de la estructura de los motivos HTH pertenecientes a los cuatro reguladores caracterizados estructuralmente (TetR, QacR, CprB y EthR) va en este sentido, ya que revela una desviación cuadrática promedia de tan sólo 1,5 Å, (Dover *et al.*, 2004), una conservación tridimensional que parece extenderse a los otros cinco cristales de la familia TetR mencionados, presentes en la base de datos PDB.

Predicción de contactos con el operador a partir de un modelo tridimensional del dominio de unión a ADN de la proteína TtgR.

Gracias al alto grado de conservación en estructura y secuencia del HTH se pudo realizar una modelización de la estructura tridimensional del dominio de unión al ADN de TtgR (residuos 1 a 59) con el programa SWISS-MODEL (www.expasy.ch/swissmod/swiss-model.html) y utilizando como molde la proteína CprB de *Streptomyces coelicolor* (46% de identidad y 66% de similitud para este fragmento de 59 residuos, figura 27). El modelo tridimensional (Figura 28) revela las características comunes de todas las estructuras de los miembros de la familia TetR, cuyo dominio de unión al ADN está formado por las α -hélices, H1, H2 H3 y parte de la α -hélice H4.



Figura 27. Alineamiento del dominio N-terminal de TtgR con el de sus homólogos TetR y QacR.

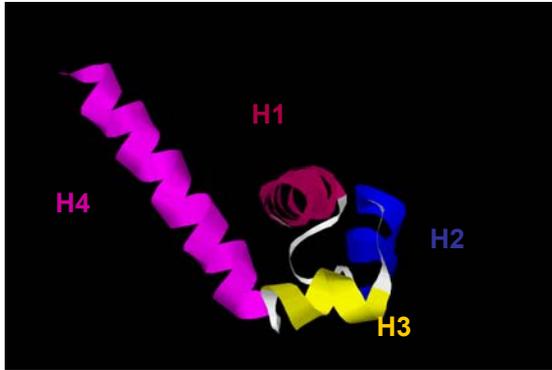
El alineamiento de los residuos que conforman el dominio N-terminal de las proteínas TtgR, CprB, TetR y QacR se hizo con el programa CLUSTALW (EMBL). Los asteriscos indican los residuos idénticos y los puntos los residuos cuyas propiedades bioquímicas quedan conservadas. Las α -hélices que conforman este dominio están indicadas por cajas. En gris están resaltados los residuos implicados en contactos directos con las bases del operador según los datos cristalográficos de las proteínas TtgR (Orth et al., 2000) y QacR (Schumacher et al., 2002).

El HTH lo constituyen las dos cortas hélices H2 y H3, separadas por el giro 2 de 3 residuos (GVT), obteniéndose un ángulo prácticamente recto entre los ejes de cada hélice. H1 está situada perpendicularmente al plano formado por H2 y H3 (Figura 28A) y a una distancia que le permite contactar con ambas por interacciones mayoritariamente hidrofóbicas, estabilizando de esta manera la estructura del motivo HTH. A su vez, H1 forma un ángulo recto con H4, quedando encastrada entre H2 y el extremo N-terminal de H4 (figura 25A), consiguiéndose al mismo tiempo la estabilización de un elemento móvil, como puede ser el extremo N-terminal de la proteína. Por tanto la hélice H1 y parte de H4 parecen tener un papel fundamental en la estabilización de la arquitectura del motivo HTH, arquitectura hecha también posible gracias a los giros 1 (GVARTT) y 2 (FNN) cuyo primer residuo (G y F respectivamente) están ultraconservados en la familia (Ramos *et al.* 2005). Esta organización permite la obtención de una unidad funcional pequeña y compacta, estabilizada principalmente por interacciones hidrofóbicas entre hélices (Figura 28 B y C).

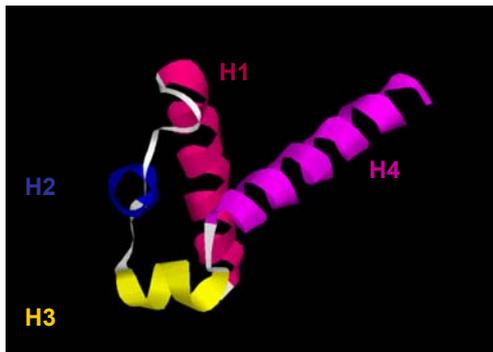
Por otro lado, los contactos proteína-ADN descritos para los dos únicos miembros co-cristalizados con su ADN operador (TetR, Orth *et al.*, 2000; y QacR, Schumacher *et al.*, 2002) están localizados principalmente en la hélice H3

que alberga la mayoría de los contactos base-específicos. H2, el giro 2 y el extremo amino terminal de H4, participan con contactos de tipo electrostático con los fosfatos de la molécula de ADN.

A



B



C

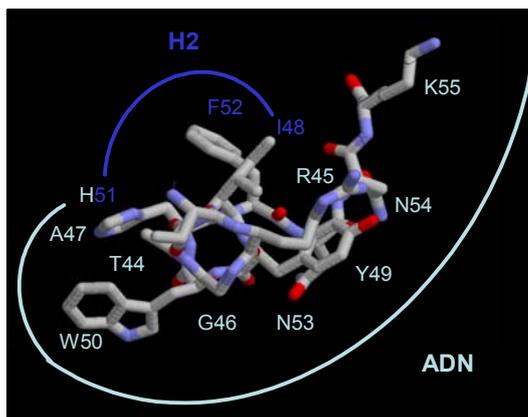
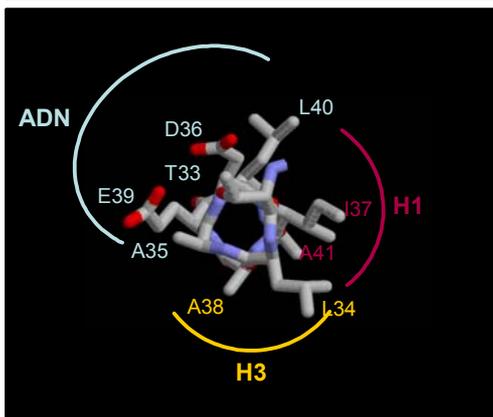
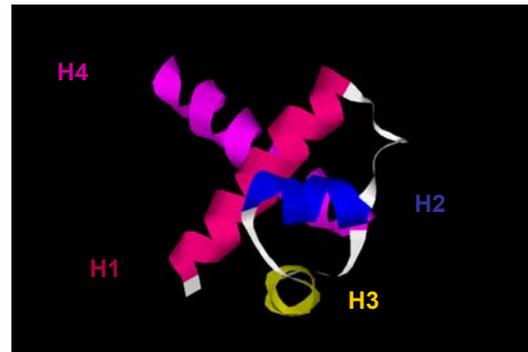


Figura 28. Modelización del dominio de unión a ADN del represor TtgR.

La modelización se realizó utilizando como molde la estructura de la proteína CprB (PDB 1UI6) y el programa SWISS MODEL. Las α -hélices representadas por cintas y están numeradas H1 a H4. A, vista desde el extremo N-terminal de H1. B, vista desde el extremo N-terminal de H2 (ventana superior), y la correspondiente proyección planar de las cadenas laterales de sus residuos (ventana inferior). C, vista desde el extremo N-terminal de H3 (ventana superior), y su correspondiente proyección planar (ventana inferior).

El alineamiento de los dominios de unión a ADN de TtgR, QcR, TetR y CprB (Figura 27) reveló que algunos de los residuos involucrados en contactos con ADN en TetR y QacR estaban también conservados en CprB y en TtgR (Orth *et al.* 2000; Schumacher *et al.* 2002), lo que permitió, junto con el modelo de TtgR obtenido, realizar una predicción de algunos contactos potenciales para este regulador (Figura 28 B y C). Tanto por su posición y conservación en el alineamiento, como por la orientación de las cadenas laterales en el modelo estructural (Figura 28B), el residuo K55, ultraconservado en la familia (Ramos *et al.*, 2005), y los residuos T33, T44, Y49 y H51 establecerían contactos de tipo electroestáticos con el esqueleto de fosfatos del ADN. R45, G46, A47, Y49, W50 y H51 serían los residuos más proclives a establecer contactos base específicos. No obstante las orientaciones respectivas de las cadenas laterales de los residuos que conforman en particular H2 y el giro 3 (entre H3 y H4) reflejadas en el modelo estructural (Figura 25B), permiten también proponer contactos potenciales con el ADN para algunos residuos adicionales no descritos en las estructuras disponibles: D36, E39, L40 y N53, claramente orientados hacia el ADN. Algunas de estas predicciones parecen estar corroboradas por estudios preliminares pertenecientes a otra tesis doctoral iniciada en nuestro grupo en las que se han construido los siguientes mutantes de TtgR: R45A, G46A, A47T con una marcada pérdida de actividad represora *in vivo*, y el aislamiento de dos mutantes N53K y L40K que, de lo contrario, presentaron una mayor actividad represora *in vivo* (Purswani J, comunicación personal). De igual manera, la hélice H1 de largo tamaño en TtgR y CprB, podría involucrar algunos de sus residuos del extremo N-terminal (R3, R4 o K5) en un probable contacto de tipo electroestático con fosfatos del ADN, como ocurre para QacR (Schumacher *et al.* 2002). Por último hay que anotar la importancia de los residuos hidrofóbicos de H2 y H3 (L34, I37, I48, F52 y H51), que mantienen la arquitectura del sitio de unión al ADN, destacando en particular el residuo F52, cuyo anillo benceno

parece “cerrar” y compactar el núcleo hidrofóbico existente entre las 4 hélices de este dominio.

Caracterización funcional de la unión de TtgR a sus efectores.

La otra propiedad relevante del represor TtgR puesta en evidencia en esta Tesis Doctoral, es su amplio rango de efectores estructuralmente distintos, lo que lo convierte en el segundo miembro de la familia TetR y el cuarto regulador local de bombas MDR, descrito por su singular capacidad de reconocimiento de múltiples efectores (Terán *et al.* 2003), después de BmrR (Markham *et al.* 1996), QacR (Grkovic *et al.* 2001, y EmrR (Lomovskaya *et al.* 1995). Además, la peculiaridad de los estudios llevados a cabo en esta Tesis Doctoral fue la utilización de la técnica de ITC para analizar bioquímicamente este fenómeno de reconocimiento múltiple por una misma proteína.

Así, se demostró que TtgR era capaz de unirse, con afinidades (K_D) que van de 1 a 100 μM , a efectores tan diferentes en estructura como hidrocarburos aromáticos de uno o dos ciclos aromáticos (alcohol 4-hidroxibencilílico, butil parabeno, 1-naftol, 1,3 dihidroxinaftaleno), antibióticos como tetraciclina o chloramfenicol, y moléculas señal de plantas con actividad antibacteriana (flavonoides, alcaloides o chalconas) y encontradas en el hábitat natural de *P. putida* DOT-T1E. Resultados que respaldan y quedan respaldados, a su vez, por los similares ensayos *in vivo* de expresión y transporte. De los estudios calorimétricos y las propiedades comunes de los efectores ensayados, dos características emergen como determinantes potenciales de la capacidad de reconocimiento de tan amplio rango de efectores: (i) un bolsillo predominantemente hidrofóbico que no genera grandes movimientos de moléculas de agua al recibir al efector, y por tanto enterrado en el *core* de la proteína, como ocurre para QacR (Schumacher *et al.*, 2001) y TetR (Hinrichs *et al.*, 1994). En este bolsillo, la presencia de residuos apolares y aromáticos sería entonces la responsable de recibir al correspondiente núcleo hidrofóbico de los

efectores, formado a su vez por uno o varios anillos aromáticos. (ii) La presencia en este mismo bolsillo de varios residuos polares aceptores o donantes de puentes de hidrógeno que permitan estabilizar el efector dentro del bolsillo por interacciones con los grupos polares (hidroxilos mayoritariamente) presentes en los anillos aromáticos de los efectores. Varios análisis estructurales que describen este fenómeno de reconocimiento de múltiples moléculas anfipáticas por parte de una proteína, ya sea reguladora (QacR, BmrR) o transportadora (AcrB), destacan la importancia de los residuos aromáticos del bolsillo por su capacidad para inmovilizar los anillos de los efectores y formar al mismo tiempo interacciones electroestáticas (Zheleznova *et al.*, 1999, Schumacher y Brennan, 2003; Yu *et al.*, 2003 a y b; Murray *et al.*, 2004). Estos grupos que confieren a la molécula efector un carácter anfipático, así como sus posiciones en los anillos, han mostrado ser determinantes de la mayor o menor afinidad de unión por parte de TtgR.

También es importante señalar la posibilidad que el bolsillo de unión pueda estar formado por dos sub-sitios: uno que acepte un núcleo hidrofóbico pequeño (un solo anillo bencénico), y otro que reciba un núcleo hidrofóbico mayor (naftaleno), cada uno con sus determinantes polares. Bajo esta hipótesis, se podría explicar la capacidad de TtgR para reconocer efectores que poseen uno, dos o tres anillos aromáticos con afinidades compatibles con su funcionalidad *in vivo*.

Por otro lado y como se ha mencionado previamente, la estequiometría de unión de un efector por dímero de TtgR es un elemento de similitud funcional adicional entre TtgR y QacR (Schumacher *et al.*, 2001) diferenciándolos de TetR, cuya estequiometría de unión es de un efector por monómero (Kisker *et al.*, 1995). La diferencia fundamental entre TetR y la pareja QacR –TtgR, es que TetR no es un regulador con capacidad de unión a múltiples fármacos o efectores, sino que es específico de un solo antibiótico, la tetraciclina. Además se diferencia por su altísima afinidad de unión a este

antibiótico, que, siendo del orden del nanomolar, está muy por encima de la afinidad de los represores QacR y TtgR por sus múltiples efectores (0,2 a 100 μM), por lo que tal vez estos últimos han logrado compensar esta pérdida de sensibilidad de reconocimiento, debida a la ampliación de su rango de efectores, por un mecanismo de desrepresión que exige la mitad de la cantidad de efectores, es decir que basta que un solo efector entre al bolsillo de uno de los monómeros unidos al operador para que se produzca la desrepresión, como ocurre efectivamente para QacR (Schumacher *et al.*, 2001).

Pero sin duda, el aspecto más novedoso de esta Tesis Doctoral respecto a la caracterización funcional del represor TtgR, es el haberse puesto en el contexto de la proteína unida al ADN, para estudiar la interacción con efectores, pues se trata realmente de la situación modelo más próxima a lo que ocurre durante la desrepresión. La sorpresa fue haber encontrado diferencias significativas para dos efectores, pero sobretodo ver que la afinidad de la floretina, uno de los compuestos con relevancia biológica, por su presencia en el hábitat natural de *P. putida* DOT-T1E y su demostrada actividad antibacteriana (Capítulo I, sección 1), aumentaba en un factor 2. No fue casual que haya sido también el efector que presentó la mayor afinidad, el que tenga optimizada su unión al complejo TtgR-operador, ya que indica que ambos han evolucionado juntos para optimizar una función de desrepresión de la expresión génica, favoreciendo la unión del efector al represor en su conformación unida al ADN, más que en su conformación en estado libre, algo fundamentado biológicamente si se tiene en cuenta que la interacción con la forma unida, tiene más consecuencias biológicas (inducción de genes de resistencia de forma inmediata) que con la forma libre, al menos en las primeras etapas de la desrepresión. No obstante, los cambios en el sitio de unión al efector, como consecuencia de la unión del represor a su diana en el ADN, no “favorecieron”, en términos de afinidad, a todos los efectores por igual: si para la floretina se observó un aumento de afinidad de 2 veces, para el cloramfenicol fue lo

inverso, mientras que para un tercer efector (naringenina) no se produjeron cambios significativos. Esto sugiere que la evolución de este sistema regulador de genes de resistencia haya ido seleccionando un sistema optimizado para aquellos efectores que más participaron en su evolución por su relevancia biológica y su persistencia en el hábitat natural de *P. putida* DOT-T1E, pero al mismo tiempo, y dada la gran variedad de moléculas señal secretadas por las plantas, un sistema que mantuviera un perfil de reconocimiento amplio para toda molécula potencialmente peligrosa, presente en el hábitat natural o no. Una doble prioridad evolutiva que habría condicionado conjuntamente regulador y transportador, y probablemente contribuido a la capacidad de reconocimiento múltiple de moléculas por parte de estos sistemas MDR, algunos sustratos o efectores fisiológicamente relevantes reconocidos de manera óptima (floretilina), mientras que otros estarían reconocidos de manera fortuita y por tanto de manera mucho menos óptima (cloramfenicol). Con este resultado se puede proponer, por tanto, que la expulsión de disolventes orgánicos, biocidas y antibióticos sintéticos mediada por la bomba TtgABC ocurre de manera fortuita, habiéndose puesto en evidencia, tanto a través de estudios *in vivo* como *in vitro*, al menos una de sus funciones fisiológicas relacionada con la adaptación al entorno natural de *P. putida* DOT-T1E.

Esta Tesis Doctoral, subraya la importancia de la regulación de los genes de bombas MDR, no sólo desde el punto de vista conceptual o funcional de la regulación génica en procariotas, sino porque queda demostrado que puede aportar elementos clave de respuesta acerca del papel fisiológico de estos transportadores MDR, al mismo tiempo que abre nuevas perspectivas de investigación en el campo de las interacciones proteína-fármaco, con todo el interés clínico y terapéutico que conlleva.

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos y expuestos en esta memoria permitieron establecer las siguientes conclusiones:

1. La bomba de disolventes orgánicos TtgABC está implicada en la resistencia intrínseca de *P. putida* DOT-T1E a múltiples antibióticos de importancia clínica, como cloramfenicol, ácido nalidíxico, norfloxacin, tetraciclina, cefotaxima, estreptomycin, ampicilina y carbenicilina, a biocidas y agentes mutagénicos como triclosan y bromuro de etidio, y a agentes antibacterianos naturales como flavonoides, chalconas y alcaloides todos de origen vegetal.
2. Los genes estructurales *ttgABC* están organizados en una única unidad transcripcional.
3. TtgR es el represor local del operón *ttgABC* y de su propio gen *ttgR*
4. La expresión basal de los genes *ttgABC* y *ttgR* aumenta en presencia de disolventes orgánicos, antibióticos y compuestos polifenólicos naturales sintetizados por plantas. Este aumento en la expresión transcripcional se traduce en un aumento paralelo de la expulsión de los sustratos de la bomba por parte del transportador TtgABC
5. La proteína TtgR es un homodímero estable de 50 kDa en solución.
6. El operador de TtgR se encuentra localizado en la región intergénica *ttgABC-ttgR*, y solapa con las regiones -35 y -10 de *P_{ttgABC}* y -10 de *P_{ttgR}*. La secuencia del operador, con un tamaño de 36 pb, se sitúa entre las posiciones -7 y -39 de *P_{ttgABC}*.

7. El operador mínimo necesario para la unión de TtgR tiene un tamaño de 30 pb y está formado por una secuencia palíndromica imperfecta de 28 pb flanqueada por 1 pb en cada extremo, imprescindibles para la unión.
8. La unión de TtgR a su operador es cooperativa, con una afinidad global de 0,7 μ M y una estequiometría de dos dímeros de TtgR por operador.
9. TtgR es capaz de reconocer, con afinidades del orden del micromolar, varios efectores con estructuras distintas que incluyen a los antibióticos cloramfenicol y tetraciclina, los hidrocarburos aromáticos 1-naftol, y butil-paraben, y las moléculas señales de plantas naringenina, apigenina, luteolina, genisteína, quercetina, floretina y cumestrol. El efector con mayor afinidad es la floretina.
10. La estequiometría de unión de TtgR a efectores es de una molécula de efector por dímero de proteína.
11. El mecanismo de represión de TtgR es por competición con la ARN-polimerasa, impidiendo el acceso de ésta a las regiones promotoras solapantes de los genes *ttgABC* y *ttgR*.
12. La inducción de la expresión de los promotores P_{ttgABC} y P_{ttgR} es consecuencia de la desrepresión de los mismos mediada por la unión de TtgR a la molécula efectora, lo que provoca la disociación de TtgR de su operador.
13. La unión de TtgR a su operador produce cambios en su dominio de unión a efectores que aumentan la afinidad por el efector floretina.

BIBLIOGRAFÍA

Akama, H., T. Matsuura, S. Kashiwagi, H. Yoneyama, S. Narita, T. Tsukihara, A. Nakagawa, and T. Nakae. 2004. Crystal structure of the membrane fusion protein, MexA, of the multidrug transporter in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Biol Chem* 279:25939-42.

Alonso, A. and J. L. Martinez. 2001. Expression of multidrug efflux pump SmeDEF by clinical isolates of *Stenotrophomonas maltophilia*. *Antimicrob Agents Chemother* 45:1879-81.

Amsterdam, D. 1991. V. Lorian (ed.). Williams and Wilkins, Baltimore, Md.

Aono, R. 1998. Improvement of organic solvent tolerance level of *Escherichia coli* by overexpression of stress-responsive genes. *Extremophiles* 2:239-48.

Aramaki, H., N. Yagi, and M. Suzuki. 1995. Residues important for the function of a multihelical DNA binding domain in the new transcription factor family of Cam and Tet repressors. *Protein Eng* 8:1259-66.

Baranova, N. and H. Nikaido. 2002. The baeSR two-component regulatory system activates transcription of the yegMNOB (mdtABCD) transporter gene cluster in *Escherichia coli* and increases its resistance to novobiocin and deoxycholate. *J Bacteriol* 184:4168-76.

Beinlich, K. L., R. Chuanchuen, and H. P. Schweizer. 2001. Contribution of multidrug efflux pumps to multiple antibiotic resistance in veterinary clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol Lett* 198:129-34.

Berens, C. and W. Hillen. 2003. Gene regulation by tetracyclines. Constraints of resistance regulation in bacteria shape TetR for application in eukaryotes. *Eur J Biochem* 270:3109-21.

Brown, M. H., I. T. Paulsen, and R. A. Skurray. 1999. The multidrug efflux protein NorM is a prototype of a new family of transporters. *Mol Microbiol* 31:394-5.

Chan, Y. Y., T. M. Tan, Y. M. Ong, and K. L. Chua. 2004. BpeAB-OprB, a multidrug efflux pump in *Burkholderia pseudomallei*. *Antimicrob Agents Chemother* 48:1128-35.

Cruden, D. L., J. H. Wolfram, R. D. Rogers, and D. T. Gibson. 1992. Physiological properties of a *Pseudomonas* strain which grows with p- xylene in a two-phase (organic-aqueous) medium. *Appl Environ Microbiol* 58:2723-9.

Dastidar, S. G., S. K. Mahapatra, K. Ganguly, A. N. Chakrabarty, Y. Shirataki, and N. Motohashi. 2001. Antimicrobial activity of prenylflavanones. *In Vivo*

15:519-23.

Dixon, R. A. 2001. Natural products and plant disease resistance. *Nature* 411:843-7.

Dover, L. G., P. E. Corsino, I. R. Daniels, S. L. Cocklin, V. Tatituri, G. S. Besra, and K. Futterer. 2004. Crystal structure of the TetR/CamR family repressor Mycobacterium tuberculosis EthR implicated in ethionamide resistance. *J Mol Biol* 340:1095-105.

Duque, E., A. Segura, G. Mosqueda, and J. L. Ramos. 2001. Global and cognate regulators control the expression of the organic solvent efflux pumps TtgABC and TtgDEF of *Pseudomonas putida*. *Mol Microbiol* 39:1100-6.

Elkins, C. A. and H. Nikaido. 2003. 3D structure of AcrB: the archetypal multidrug efflux transporter of *Escherichia coli* likely captures substrates from periplasm. *Drug Resist Updat* 6:9-13.

Engohang-Ndong, J., D. Baillat, M. Aumercier, F. Bellefontaine, G. S. Besra, C. Locht, and A. R. Baulard. 2004. EthR, a repressor of the TetR/CamR family implicated in ethionamide resistance in mycobacteria, octamerizes cooperatively on its operator. *Mol Microbiol* 51:175-88.

Espinosa-Urgel, M., A. Salido, and J. L. Ramos. 2000. Genetic analysis of functions involved in adhesion of *Pseudomonas putida* to seeds. *J Bacteriol* 182:2363-9.

Eswaran, J., E. Koronakis, M. K. Higgins, C. Hughes, and V. Koronakis. 2004. Three's company: component structures bring a closer view of tripartite drug efflux pumps. *Curr Opin Struct Biol* 14:741-7.

Evans, K., L. Adewoye, and K. Poole. 2001. MexR repressor of the mexAB-oprM multidrug efflux operon of *Pseudomonas aeruginosa*: identification of MexR binding sites in the mexA-mexR intergenic region. *J Bacteriol* 183:807-12.

Evans, K., L. Passador, R. Srikumar, E. Tsang, J. Nezezon, and K. Poole. 1998. Influence of the MexAB-OprM multidrug efflux system on quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 180:5443-7.

Evans, K. and K. Poole. 1999. The MexA-MexB-OprM multidrug efflux system of *Pseudomonas aeruginosa* is growth-phase regulated. *FEMS Microbiol Lett* 173:35-9.

Federici, L., D. Du, F. Walas, H. Matsumura, J. Fernandez-Recio, K. S. McKeegan, M. I. Borges-Walmsley, B. F. Luisi, and A. R. Walmsley. 2005. The crystal structure of the outer membrane protein VCEC from the bacterial

pathogen vibrio cholerae at 1.8 Å resolution. *J Biol Chem*.

Foster, T. J. 1975. Tetracycline-sensitive mutants of the F-like R factors R100 and R100-1. *Mol Gen Genet* 137:85-88.

Fournier, B., R. Aras, and D. C. Hooper. 2000. Expression of the multidrug resistance transporter NorA from *Staphylococcus aureus* is modified by a two-component regulatory system. *J Bacteriol* 182:664-71.

Gonzalez-Pasayo, R. and E. Martinez-Romero. 2000. Multiresistance genes of *Rhizobium etli* CFN42. *Mol Plant Microbe Interact* 13:572-7.

Griffiths, D. E., R. L. Houghton, W. E. Lancashire, and P. A. Meadows. 1975. Studies on energy-linked reactions: isolation and properties of mitochondrial venturicidin-resistant mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur J Biochem* 51:393-402.

Grkovic, S., M. H. Brown, N. J. Roberts, I. T. Paulsen, and R. A. Skurray. 1998. QacR is a repressor protein that regulates expression of the *Staphylococcus aureus* multidrug efflux pump QacA. *J Biol Chem* 273:18665-73.

Grkovic, S., M. H. Brown, and R. A. Skurray. 2002. Regulation of bacterial drug export systems. *Microbiol Mol Biol Rev* 66:671-701, table of contents.

Guazzaroni, M. E., T. Krell, A. Felipe, R. Ruiz, C. Meng, X. Zhang, M. T. Gallegos, and J. L. Ramos. 2005. The multidrug efflux regulator TtgV recognizes a wide range of structurally different effectors in solution and complexed with target DNA. Evidence from isothermal titration calorimetry. *J Biol Chem*.

Guazzaroni, M. E., W. Teran, X. Zhang, M. T. Gallegos, and J. L. Ramos. 2004. TtgV bound to a complex operator site represses transcription of the promoter for the multidrug and solvent extrusion TtgGHI pump. *J Bacteriol* 186:2921-7.

Heipieper, H. J. and J. A. de Bont. 1994. Adaptation of *Pseudomonas putida* S12 to ethanol and toluene at the level of fatty acid composition of membranes. *Appl Environ Microbiol* 60:4440-4.

Heldwein, E. E. and R. G. Brennan. 2001. Crystal structure of the transcription activator BmrR bound to DNA and a drug. *Nature* 409:378-82.

Higgins, P. G., H. Wisplinghoff, D. Stefanik, and H. Seifert. 2004. Selection of topoisomerase mutations and overexpression of *adeB* mRNA transcripts during an outbreak of *Acinetobacter baumannii*. *J Antimicrob Chemother* 54:821-3.

Hillen, W. and C. Berens. 1994. Mechanisms underlying expression of Tn10

encoded tetracycline resistance. *Annu Rev Microbiol* 48:345-69.

Hsieh, P. C., S. A. Siegel, B. Rogers, D. Davis, and K. Lewis. 1998. Bacteria lacking a multidrug pump: a sensitive tool for drug discovery. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:6602-6.

Isken, S. and J. A. de Bont. 1996. Active efflux of toluene in a solvent-resistant bacterium. *J Bacteriol* 178:6056-8.

Jellen-Ritter, A. S. and W. V. Kern. 2001. Enhanced expression of the multidrug efflux pumps AcrAB and AcrEF associated with insertion element transposition in *Escherichia coli* mutants Selected with a fluoroquinolone. *Antimicrob Agents Chemother* 45:1467-72.

Junker, F. and J. L. Ramos. 1999. Involvement of the cis/trans isomerase Cti in solvent resistance of *Pseudomonas putida* DOT-T1E. *J Bacteriol* 181:5693-700.

Kieboom, J. and J. de Bont. 2001. Identification and molecular characterization of an efflux system involved in *Pseudomonas putida* S12 multidrug resistance. *Microbiology* 147:43-51.

Kieboom, J., J. J. Dennis, G. J. Zylstra, and J. A. de Bont. 1998. Active efflux of organic solvents by *Pseudomonas putida* S12 is induced by solvents. *J Bacteriol* 180:6769-72.

Kim, K., S. Lee, K. Lee, and D. Lim. 1998. Isolation and characterization of toluene-sensitive mutants from the toluene-resistant bacterium *Pseudomonas putida* GM73. *J Bacteriol* 180:3692-6.

Kisker, C., W. Hinrichs, K. Tovar, W. Hillen, and W. Saenger. 1995. The complex formed between Tet repressor and tetracycline-Mg²⁺ reveals mechanism of antibiotic resistance. *J Mol Biol* 247:260-80.

Kohler, T., M. Michea-Hamzehpour, S. F. Epp, and J. C. Pechere. 1999. Carbapenem activities against *Pseudomonas aeruginosa*: respective contributions of OprD and efflux systems. *Antimicrob Agents Chemother* 43:424-7.

Koronakis, V., A. Sharff, E. Koronakis, B. Luisi, and C. Hughes. 2000. Crystal structure of the bacterial membrane protein TolC central to multidrug efflux and protein export. *Nature* 405:914-9.

Krueger, C., C. Berens, A. Schmidt, D. Schnappinger, and W. Hillen. 2003. Single-chain Tet transregulators. *Nucleic Acids Res* 31:3050-6.

Lee, E. H., C. Rouquette-Loughlin, J. P. Folster, and W. M. Shafer. 2003. FarR

regulates the farAB-encoded efflux pump of *Neisseria gonorrhoeae* via an MtrR regulatory mechanism. *J Bacteriol* 185:7145-52.

Levy, S. B. 2002. Active efflux, a common mechanism for biocide and antibiotic resistance. *J Appl Microbiol* 92 Suppl 1:65S-71S.

Lewis, K. 1994. Multidrug resistance pumps in bacteria: variations on a theme. *Trends Biochem Sci* 19:119-23.

Li, X. Z., H. Nikaido, and K. Poole. 1995. Role of mexA-mexB-oprM in antibiotic efflux in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 39:1948-53.

Li, X. Z. and K. Poole. 1999. Organic solvent-tolerant mutants of *Pseudomonas aeruginosa* display multiple antibiotic resistance. *Can J Microbiol* 45:18-22.

Li, X. Z., L. Zhang, and K. Poole. 1998. Role of the multidrug efflux systems of *Pseudomonas aeruginosa* in organic solvent tolerance. *J Bacteriol* 180:2987-91.

Li, X. Z., L. Zhang, and K. Poole. 2002. SmeC, an outer membrane multidrug efflux protein of *Stenotrophomonas maltophilia*. *Antimicrob Agents Chemother* 46:333-43.

Lomovskaya, O., K. Lewis, and A. Matin. 1995. EmrR is a negative regulator of the *Escherichia coli* multidrug resistance pump EmrAB. *J Bacteriol* 177:2328-34.

Lu, C., C. R. Albano, W. E. Bentley, and G. Rao. 2005. Quantitative and kinetic study of oxidative stress regulons using green fluorescent protein. *Biotechnol Bioeng* 89:574-87.

Lucas, C. E., J. T. Balthazar, K. E. Hagman, and W. M. Shafer. 1997. The MtrR repressor binds the DNA sequence between the mtrR and mtrC genes of *Neisseria gonorrhoeae*. *J Bacteriol* 179:4123-8.

Ma, D., M. Alberti, C. Lynch, H. Nikaido, and J. E. Hearst. 1996. The local repressor AcrR plays a modulating role in the regulation of acrAB genes of *Escherichia coli* by global stress signals. *Mol Microbiol* 19:101-12.

Ma, D., D. N. Cook, M. Alberti, N. G. Pon, H. Nikaido, and J. E. Hearst. 1995. Genes acrA and acrB encode a stress-induced efflux system of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 16:45-55.

Mao, W., M. S. Warren, A. Lee, A. Mistry, and O. Lomovskaya. 2001. MexXY-OprM efflux pump is required for antagonism of aminoglycosides by divalent cations in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 45:2001-7.

- Markham, P. N., M. Ahmed, and A. A. Neyfakh. 1996.** The drug-binding activity of the multidrug-responding transcriptional regulator BmrR resides in its C-terminal domain. *J Bacteriol* 178:1473-5.
- Marques, S., J. L. Ramos, and K. N. Timmis. 1993.** Analysis of the mRNA structure of the *Pseudomonas putida* TOL meta fission pathway operon around the transcription initiation point, the xylTE and the xylFJ regions. *Biochim Biophys Acta* 1216:227-36.
- Martinez-Bueno, M., A. J. Molina-Henares, E. Pareja, J. L. Ramos, and R. Tobes. 2004.** BacTregulators: a database of transcriptional regulators in bacteria and archaea. *Bioinformatics* 20:2787-91.
- Martini, N. D., D. R. Katerere, and J. N. Eloff. 2004.** Biological activity of five antibacterial flavonoids from *Combretum erythrophyllum* (Combretaceae). *J Ethnopharmacol* 93:207-12.
- Maseda, H., K. Saito, A. Nakajima, and T. Nakae. 2000.** Variation of the mexT gene, a regulator of the MexEF-oprN efflux pump expression in wild-type strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol Lett* 192:107-12.
- Masuda, N. and G. M. Church. 2002.** *Escherichia coli* gene expression responsive to levels of the response regulator EvgA. *J Bacteriol* 184:6225-34.
- Matsuo, Y., S. Eda, N. Gotoh, E. Yoshihara, and T. Nakae. 2004.** MexZ-mediated regulation of mexXY multidrug efflux pump expression in *Pseudomonas aeruginosa* by binding on the mexZ-mexX intergenic DNA. *FEMS Microbiol Lett* 238:23-8.
- Miller J. H. 1972.** pp. 352-355 *Experiments in molecular genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
- Miller, P. F. and M. C. Sulavik. 1996.** Overlaps and parallels in the regulation of intrinsic multiple-antibiotic resistance in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 21:441-8.
- Mine, T., Y. Morita, A. Kataoka, T. Mizushima, and T. Tsuchiya. 1999.** Expression in *Escherichia coli* of a new multidrug efflux pump, MexXY, from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 43:415-7.
- Morita, Y., A. Kataoka, S. Shiota, T. Mizushima, and T. Tsuchiya. 2000.** NorM of *Vibrio parahaemolyticus* is a Na⁽⁺⁾-driven multidrug efflux pump. *J Bacteriol* 182:6694-7.
- Mortlock, A., W. Low, and A. Crisanti. 2003.** Suppression of gene expression by a cell-permeable Tet repressor. *Nucleic Acids Res* 31:e152.

- Mosqueda, G. and J. L. Ramos. 2000.** A set of genes encoding a second toluene efflux system in *Pseudomonas putida* DOT-T1E is linked to the *tod* genes for toluene metabolism. *J Bacteriol* 182:937-43.
- Natsume, R., Y. Ohnishi, T. Senda, and S. Horinouchi. 2004.** Crystal structure of a gamma-butyrolactone autoregulator receptor protein in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *J Mol Biol* 336:409-19.
- Neyfakh, A. A. 1992.** The multidrug efflux transporter of *Bacillus subtilis* is a structural and functional homolog of the *Staphylococcus* NorA protein. *Antimicrob Agents Chemother* 36:484-5.
- Neyfakh, A. A. 2002.** Mystery of multidrug transporters: the answer can be simple. *Mol Microbiol* 44:1123-30.
- Neyfakh, A. A. 2001.** The ostensible paradox of multidrug recognition. *J Mol Microbiol Biotechnol* 3:151-4.
- Nikaido, H. 1996.** Multidrug efflux pumps of gram-negative bacteria. *J Bacteriol* 178:5853-9.
- Nikaido, H. 1994.** Prevention of drug access to bacterial targets: permeability barriers and active efflux. *Science* 264:382-8.
- Nishino, K. and A. Yamaguchi. 2001.** Analysis of a complete library of putative drug transporter genes in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 183:5803-12.
- Nishino, K. and A. Yamaguchi. 2001.** Overexpression of the response regulator *evgA* of the two-component signal transduction system modulates multidrug resistance conferred by multidrug resistance transporters. *J Bacteriol* 183:1455-8.
- Ocaktan, A., H. Yoneyama, and T. Nakae. 1997.** Use of fluorescence probes to monitor function of the subunit proteins of the MexA-MexB-oprM drug extrusion machinery in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Biol Chem* 272:21964-9.
- Olliver, A., M. Valle, E. Chaslus-Dancla, and A. Cloeckaert. 2005.** Overexpression of the multidrug efflux operon *acrEF* by insertional activation with IS1 or IS10 elements in *Salmonella enterica* serovar typhimurium DT204 *acrB* mutants selected with fluoroquinolones. *Antimicrob Agents Chemother* 49:289-301.
- Olliver, A., M. Valle, E. Chaslus-Dancla, and A. Cloeckaert. 2004.** Role of an *acrR* mutation in multidrug resistance of in vitro-selected fluoroquinolone-resistant mutants of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *FEMS Microbiol Lett* 238:267-72.

- Orth, P., C. Alings, D. Schnappinger, W. Saenger, and W. Hinrichs. 1998.** Crystallization and preliminary X-ray analysis of the Tet-repressor/operator complex. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 54 (Pt 1):99-100.
- Palumbo, J. D., C. I. Kado, and D. A. Phillips. 1998.** An isoflavonoid-inducible efflux pump in *Agrobacterium tumefaciens* is involved in competitive colonization of roots. *J Bacteriol* 180:3107-13.
- Pan, W. and B. G. Spratt. 1994.** Regulation of the permeability of the gonococcal cell envelope by the mtr system. *Mol Microbiol* 11:769-75.
- Pao, S. S., I. T. Paulsen, and M. H. Saier Jr. 1998.** Major facilitator superfamily. *Microbiol Mol Biol Rev* 62:1-34.
- Paulsen, I. T., M. H. Brown, and R. A. Skurray. 1996.** Proton-dependent multidrug efflux systems. *Microbiol Rev* 60:575-608.
- Paulsen, I. T. and K. Lewis. 2001.** Microbial multidrug efflux: introduction. *J Mol Microbiol Biotechnol* 3:143-4.
- Paulsen, I. T. and M. H. Saier Jr. 1997.** A novel family of ubiquitous heavy metal ion transport proteins. *J Membr Biol* 156:99-103.
- Poole, K., N. Gotoh, H. Tsujimoto, Q. Zhao, A. Wada, T. Yamasaki, S. Neshat, J. Yamagishi, X. Z. Li, and T. Nishino. 1996.** Overexpression of the mexC-mexD-oprJ efflux operon in nfxB-type multidrug-resistant strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol* 21:713-24.
- Poole, K., D. E. Heinrichs, and S. Neshat. 1993.** Cloning and sequence analysis of an EnvCD homologue in *Pseudomonas aeruginosa*: regulation by iron and possible involvement in the secretion of the siderophore pyoverdine. *Mol Microbiol* 10:529-44.
- Poole, K., K. Krebs, C. McNally, and S. Neshat. 1993.** Multiple antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: evidence for involvement of an efflux operon. *J Bacteriol* 175:7363-72.
- Pos, K. M. and K. Diederichs. 2002.** Purification, crystallization and preliminary diffraction studies of AcrB, an inner-membrane multi-drug efflux protein. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 58:1865-7.
- Rahmati, S., S. Yang, A. L. Davidson, and E. L. Zechiedrich. 2002.** Control of the AcrAB multidrug efflux pump by quorum-sensing regulator SdiA. *Mol Microbiol* 43:677-85.
- Ramos, J. L., E. Duque, M. T. Gallegos, P. Godoy, M. I. Ramos-Gonzalez, A.**

- Rojas, W. Teran, and A. Segura. 2002.** Mechanisms of solvent tolerance in gram-negative bacteria. *Annu Rev Microbiol* 56:743-68.
- Ramos, J. L., E. Duque, P. Godoy, and A. Segura. 1998.** Efflux pumps involved in toluene tolerance in *Pseudomonas putida* DOT- T1E. *J Bacteriol* 180:3323-9.
- Rauha, J. P., S. Remes, M. Heinonen, A. Hopia, M. Kahkonen, T. Kujala, K. Pihlaja, H. Vuorela, and P. Vuorela. 2000.** Antimicrobial effects of Finnish plant extracts containing flavonoids and other phenolic compounds. *Int J Food Microbiol* 56:3-12.
- Rojas, A., E. Duque, G. Mosqueda, G. Golden, A. Hurtado, J. L. Ramos, and A. Segura. 2001.** Three efflux pumps are required to provide efficient tolerance to toluene in *Pseudomonas putida* DOT-T1E. *J Bacteriol* 183:3967-73.
- Rojas, A., A. Segura, M. E. Guazzaroni, W. Teran, A. Hurtado, M. T. Gallegos, and J. L. Ramos. 2003.** In vivo and in vitro evidence that TtgV is the specific regulator of the TtgGHI multidrug and solvent efflux pump of *Pseudomonas putida*. *J Bacteriol* 185:4755-63.
- Rojo F. 2001.** Mechanisms of transcriptional repression. *Curr Opin Microbiol.* 4(2):145-51.
- Saier, M. H. Jr, J. T. Beatty, A. Goffeau, K. T. Harley, W. H. Heijne, S. C. Huang, D. L. Jack, P. S. Jahn, K. Lew, J. Liu, S. S. Pao, I. T. Paulsen, T. T. Tseng, and P. S. Virk. 1999.** The major facilitator superfamily. *J Mol Microbiol Biotechnol* 1:257-79.
- Saier, M. H. Jr, R. Tam, A. Reizer, and J. Reizer. 1994.** Two novel families of bacterial membrane proteins concerned with nodulation, cell division and transport. *Mol Microbiol* 11:841-7.
- Sanchez, P., A. Alonso, and J. L. Martinez. 2002.** Cloning and characterization of SmeT, a repressor of the *Stenotrophomonas maltophilia* multidrug efflux pump SmeDEF. *Antimicrob Agents Chemother* 46:3386-93.
- Sanchez, P., E. Moreno, and J. L. Martinez. 2005.** The biocide triclosan selects *Stenotrophomonas maltophilia* mutants that overproduce the SmeDEF multidrug efflux pump. *Antimicrob Agents Chemother* 49:781-2.
- Sanchez, P., F. Rojo, and J. L. Martinez. 2002.** Transcriptional regulation of mexR, the repressor of *Pseudomonas aeruginosa* mexAB-oprM multidrug efflux pump. *FEMS Microbiol Lett* 207:63-8.

- Schneiders, T., S. G. Amyes, and S. B. Levy. 2003.** Role of AcrR and ramA in fluoroquinolone resistance in clinical *Klebsiella pneumoniae* isolates from Singapore. *Antimicrob Agents Chemother* 47:2831-7.
- Schumacher, M. A., M. C. Miller, S. Grkovic, M. H. Brown, R. A. Skurray, and R. G. Brennan. 2001.** Structural mechanisms of QacR induction and multidrug recognition. *Science* 294:2158-63.
- Segura, A., A. Rojas, A. Hurtado, M. J. Huertas, and J. L. Ramos. 2003.** Comparative genomic analysis of solvent extrusion pumps in *Pseudomonas* strains exhibiting different degrees of solvent tolerance. *Extremophiles* 7:371-6.
- Shafer, W. M., W. L. Veal, E. H. Lee, L. Zarantonelli, J. T. Balthazar, and C. Rouquette. 2001.** Genetic organization and regulation of antimicrobial efflux systems possessed by *Neisseria gonorrhoeae* and *Neisseria meningitidis*. *J Mol Microbiol Biotechnol* 3:219-24.
- Stermitz, F. R., T. D. Beeson, P. J. Mueller, J. Hsiang, and K. Lewis. 2001.** *Staphylococcus aureus* MDR efflux pump inhibitors from a *Berberis* and a *Mahonia* (*sensu strictu*) species. *Biochem Syst Ecol* 29:793-798.
- Stermitz, F. R., P. Lorenz, J. N. Tawara, L. A. Zenewicz, and K. Lewis. 2000.** Synergy in a medicinal plant: antimicrobial action of berberine potentiated by 5'-methoxyhydnocarpin, a multidrug pump inhibitor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:1433-7.
- Stermitz, F. R., J. Tawara-Matsuda, P. Lorenz, P. Mueller, L. Zenewicz, and K. Lewis. 2000.** 5'-Methoxyhydnocarpin-D and pheophorbide A: *Berberis* species components that potentiate berberine growth inhibition of resistant *Staphylococcus aureus*. *J Nat Prod* 63:1146-9.
- Tanaka, T., T. Horii, K. Shibayama, K. Sato, S. Ohsuka, Y. Arakawa, K. Yamaki, K. Takagi, and M. Ohta. 1997.** RobA-induced multiple antibiotic resistance largely depends on the activation of the AcrAB efflux. *Microbiol Immunol* 41:697-702.
- Tegos, G., F. R. Stermitz, O. Lomovskaya, and K. Lewis. 2002.** Multidrug pump inhibitors uncover remarkable activity of plant antimicrobials. *Antimicrob Agents Chemother* 46:3133-41.
- Teran, W., A. Felipe, A. Segura, A. Rojas, J. L. Ramos, and M. T. Gallegos. 2003.** Antibiotic-dependent induction of *Pseudomonas putida* DOT-T1E TtgABC efflux pump is mediated by the drug binding repressor TtgR.

Antimicrob Agents Chemother 47:3067-72.

Thanassi, D. G., L. W. Cheng, and H. Nikaido. 1997. Active efflux of bile salts by *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 179:2512-8.

Tseng, T. T., K. S. Gratwick, J. Kollman, D. Park, D. H. Nies, A. Goffeau, and M. H. Saier Jr. 1999. The RND permease superfamily: an ancient, ubiquitous and diverse family that includes human disease and development proteins. *J Mol Microbiol Biotechnol* 1:107-25.

Tullius, T. D. and B. A. Dombroski. 1986. Hydroxyl radical "footprinting": high-resolution information about DNA-protein contacts and application to lambda repressor and Cro protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83:5469-73.

Wang, H., J. L. Dzink-Fox, M. Chen, and S. B. Levy. 2001. Genetic characterization of highly fluoroquinolone-resistant clinical *Escherichia coli* strains from China: role of *acrR* mutations. *Antimicrob Agents Chemother* 45:1515-21.

Weber, F. J., L. P. Ooijkaas, R. M. Schemen, S. Hartmans, and J. A. de Bont. 1993. Adaptation of *Pseudomonas putida* S12 to high concentrations of styrene and other organic solvents. *Appl Environ Microbiol* 59:3502-4.

Wery, J., D. I. Mendes da Silva, and J. A. de Bont. 2000. A genetically modified solvent-tolerant bacterium for optimized production of a toxic fine chemical. *Appl Microbiol Biotechnol* 54:180-5.

White, D. G., J. D. Goldman, B. Demple, and S. B. Levy. 1997. Role of the *acrAB* locus in organic solvent tolerance mediated by expression of *marA*, *soxS*, or *robA* in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 179:6122-6.

Xiong, A., A. Gottman, C. Park, M. Baetens, S. Pandza, and A. Matin. 2000. The *EmrR* protein represses the *Escherichia coli* *emrRAB* multidrug resistance operon by directly binding to its promoter region. *Antimicrob Agents Chemother* 44:2905-7.

Yu, E. W., J. R. Aires, and H. Nikaido. 2003. *AcrB* multidrug efflux pump of *Escherichia coli*: composite substrate-binding cavity of exceptional flexibility generates its extremely wide substrate specificity. *J Bacteriol* 185:5657-64.

Zheleznova, E. E., P. N. Markham, A. A. Neyfakh, and R. G. Brennan. 1997. Preliminary structural studies on the multi-ligand-binding domain of the transcription activator, *BmrR*, from *Bacillus subtilis*. *Protein Sci* 6:2465-8.

Zheleznova, E. E., P. N. Markham, A. A. Neyfakh, and R. G. Brennan. 1999. Structural basis of multidrug recognition by *BmrR*, a transcription activator of a

multidrug transporter. *Cell* 96:353-62.

Ziha-Zarifi, I., C. Llanes, T. Kohler, J. C. Pechere, and P. Plesiat. 1999. In vivo emergence of multidrug-resistant mutants of *Pseudomonas aeruginosa* overexpressing the active efflux system MexA-MexB-OprM. *Antimicrob Agents Chemother* 43:287-91.

Apéndices

Apéndice 1: Proteínas homólogas al transportador TtgB (BLAST)

Sequences producing significant alignments:
(bits) Value

<input checked="" type="checkbox"/>	NPSA_sptr O52248	(O52248_PSEPU)	TtgB
1944	0.0		
<input checked="" type="checkbox"/>	NPSA_sptr Q9KJC2	(Q9KJC2_PSEPU)	Inner membrane transporter protein
1942	0.0		
<input checked="" type="checkbox"/>	NPSA_sptr Q88N31	(Q88N31_PSEPK)	Multidrug/solvent RND transporter TtgB
1940	0.0		
<input checked="" type="checkbox"/>	NPSA_sptr Q6V6X8	(Q6V6X8_PSEFL)	Inner membrane pump protein
1692	0.0		
<input checked="" type="checkbox"/>	NPSA_sptr Q87X84	(Q87X84_PSESM)	AcrB/AcrD/AcrF family protein
1617	0.0		
<input checked="" type="checkbox"/>	NPSA_sw P52002	(MEXB_PSEAE)	Multidrug resistance protein mexB
1565	0.0		
<input checked="" type="checkbox"/>	NPSA_sptr Q7WJG6	(Q7WJG6_BORBR)	Acriflavine resistance protein B
1365	0.0		
<input checked="" type="checkbox"/>	NPSA_sptr Q7VZD3	(Q7VZD3_BORPE)	Acriflavine resistance protein B
1364	0.0		
<input checked="" type="checkbox"/>	NPSA_sptr Q7WAC5	(Q7WAC5_BORPA)	Acriflavine resistance protein B
1357	0.0		
<input checked="" type="checkbox"/>	NPSA_sptr Q93K40	(Q93K40_KLEPN)	AcrB protein
1316	0.0		
<input checked="" type="checkbox"/>	NPSA_sptr Q8ZRA7	(Q8ZRA7_SALTY)	RND family, acridine efflux pump
1313	0.0		
<input checked="" type="checkbox"/>	NPSA_sptr Q8Z8T8	(Q8Z8T8_SALTI)	Acriflavin resistance protein B
1313	0.0		
<input checked="" type="checkbox"/>	NPSA_sptr Q57S88	(Q57S88_SALET)	RND family, acridine efflux pump
1312	0.0		
<input checked="" type="checkbox"/>	NPSA_sptr Q5PFL1	(Q5PFL1_SALPA)	Acriflavin resistance protein B
1312	0.0		
<input checked="" type="checkbox"/>	NPSA_sptr Q9AEG1	(Q9AEG1_ENTAE)	AcrB protein
1309	0.0		
<input checked="" type="checkbox"/>	NPSA_sptr Q8FK92	(Q8FK92_ECOL6)	Acriflavine resistance protein B
1298	0.0		
<input checked="" type="checkbox"/>	NPSA_sw P31224	(ACRB_ECOLI)	Acriflavine resistance protein B
1298	0.0		
<input checked="" type="checkbox"/>	NPSA_sptr Q8XD55	(Q8XD55_ECO57)	Acridine efflux pump
1298	0.0		
<input checked="" type="checkbox"/>	NPSA_sptr Q7WTQ9	(Q7WTQ9_ERWAM)	Multidrug efflux transporter
1294	0.0		

[NPSA sptr|Q7UDI0](#) (Q7UDI0_SHIFL) Acriflavine resistance protein
 1294 [0.0](#)

[NPSA sptr|Q83SF0](#) (Q83SF0_SHIFL) Acridine efflux pump
 1289 [0.0](#)

[NPSA sptr|Q66DR0](#) (Q66DR0_YERPS) RND family, acridine/multidrug
 efflu... 1284 [0.0](#)

[NPSA sptr|Q8ZC87](#) (Q8ZC87_YERPE) Multidrug efflux protein
 (Acridine e... 1280 [0.0](#)

[NPSA sptr|Q5PJW8](#) (Q5PJW8_SALPA) RND family, multidrug transport
 prot... 1273 [0.0](#)

[NPSA sptr|Q8ZLN4](#) (Q8ZLN4_SALTY) RND family multidrug transport
 protein 1273 [0.0](#)

[NPSA sptr|Q6D806](#) (Q6D806_ERWCT) Acriflavin resistance protein B
 1270 [0.0](#)

[NPSA sptr|Q57J78](#) (Q57J78_SALET) RND family, multidrug transport
 prot... 1269 [0.0](#)

[NPSA sptr|Q7N0N0](#) (Q7N0N0_PHOLL) Acriflavin resistance protein B
 1264 [0.0](#)

[NPSA sptr|Q71UZ6](#) (Q71UZ6_PSEST) Resistance nodulation cell
 division ... 1261 [0.0](#)

[NPSA sptr|Q8FD25](#) (Q8FD25_ECOL6) Acriflavine resistance protein F
 1258 [0.0](#)

[NPSA sw|P24181](#) (ACRF_ECOLI) Acriflavine resistance protein F
 (Protei... 1255 [0.0](#)

[NPSA sptr|Q7WSD5](#) (Q7WSD5_SERMA) Multidrug efflux pump SdeY
 1251 [0.0](#)

[NPSA sptr|O31100](#) (O31100_PSEPU) Inner membrane transporter
 protein 1249 [0.0](#)

[NPSA sptr|Q93PU4](#) (Q93PU4_PSEPU) Inner membrane efflux pump
 component... 1246 [0.0](#)

[NPSA sptr|Q727N9](#) (Q727N9_DESVH) Multidrug resistance protein
 1244 [0.0](#)

[NPSA sptr|Q5P649](#) (Q5P649_AZOSE) Acriflavine resistance protein B
 1239 [0.0](#)

[NPSA sptr|Q8PIQ2](#) (Q8PIQ2_XANAC) Multidrug efflux transporter
 1237 [0.0](#)

[NPSA sptr|Q849R0](#) (Q849R0_PSEPU) Periplasmic efflux protein SepB
 1237 [0.0](#)

[NPSA sptr|Q8P7C9](#) (Q8P7C9_XANCP) Multidrug-efflux transporter
 1236 [0.0](#)

[NPSA sptr|Q8XRL3](#) (Q8XRL3_RALSO) PROBABLE DRUG EFFLUX
 TRANSMEMBRANE P... 1232 [0.0](#)

✓	NPSA	sptr	 Q9AA04	(Q9AA04_CAUCR)	AcrB/AcrD/AcrF family protein
1231		0.0			
✓	NPSA	sptr	 Q8E8H2	(Q8E8H2_SHEON)	AcrB/AcrD/AcrF family protein
1226		0.0			
✓	NPSA	sptr	 Q9KVV4	(Q9KVV4_PSEPU)	Inner membrane transporter
1226		0.0			
✓	NPSA	sptr	 Q5IS02	(Q5IS02_MORMO)	AcrB
1225		0.0			
✓	NPSA	sptr	 Q8VPA8	(Q8VPA8_PROMI)	Inner membrane RND family protein
AcrB	1215	0.0			
✓	NPSA	sptr	 Q63WS7	(Q63WS7_BURPS)	Putative RND family acriflavine
resi...	1202	0.0			
✓	NPSA	sptr	 Q6VV68	(Q6VV68_BURPS)	Inner membrane protein
1199		0.0			
✓	NPSA	sptr	 Q62MD0	(Q62MD0_BURMA)	Hydrophobe/amphiphile efflux
family ...	1197	0.0			
✓	NPSA	sptr	 Q749P6	(Q749P6_GEOSL)	AcrB/AcrD/AcrF family protein
1174		0.0			
✓	NPSA	sptr	 Q668H5	(Q668H5_YERPS)	HAE1 family (RND superfamily)
multid...	1173	0.0			
✓	NPSA	sptr	 Q8ZCE8	(Q8ZCE8_YERPE)	Multidrug efflux protein
(Putative e...	1173	0.0			
✓	NPSA	sptr	 Q74SE6	(Q74SE6_YERPE)	Multidrug efflux protein
1173		0.0			
✓	NPSA	sptr	 Q6KAZ6	(Q6KAZ6_XANMA)	RND protein
1172		0.0			
✓	NPSA	sptr	 Q6KAZ0	(Q6KAZ0_XANMA)	RND protein
1170		0.0			
✓	NPSA	sptr	 Q6KAY1	(Q6KAY1_XANMA)	RND protein
1170		0.0			
✓	NPSA	sptr	 Q9F240	(Q9F240_XANMA)	Putative RND protein
1169		0.0			
✓	NPSA	sptr	 Q6AMJ9	(Q6AMJ9_DESPS)	Probable acriflavine resistance
prot...	1159	0.0			
✓	NPSA	sptr	 Q87QQ7	(Q87QQ7_VIBPA)	Acridine efflux pump
1157		0.0			
✓	NPSA	sptr	 Q5R0E7	(Q5R0E7_IDILO)	Probable acriflavine resistance
prot...	1156	0.0			
✓	NPSA	sw	 Q8X3J5	(MDTF_ECO57)	Multidrug resistance protein mdtF
1155		0.0			
✓	NPSA	sw	 P37637	(MDTF_ECOLI)	Multidrug resistance protein mdtF
1153		0.0			

[NPSA sw|Q8FCI8](#) (MDTF_ECOL6) Multidrug resistance protein mdtF
 1152 [0.0](#)

[NPSA sptr|Q5FT29](#) (Q5FT29_GLUOX) Acriflavin resistance protein B
 (Mul... 1147 [0.0](#)

[NPSA sw|P24177](#) (ACRD_ECOLI) Probable aminoglycoside efflux pump
 (Acr... 1144 [0.0](#)

[NPSA sptr|Q8XE2](#) (Q8XE2_ECO57) Sensitivity to acriflavine,
 integral... 1142 [0.0](#)

[NPSA sptr|Q7ABQ1](#) (Q7ABQ1_ECO57) Aminoglycoside efflux pump
 1142 [0.0](#)

[NPSA sptr|Q8FF84](#) (Q8FF84_ECOL6) Probable aminoglycoside efflux
 pump 1141 [0.0](#)

[NPSA sptr|Q83QM5](#) (Q83QM5_SHIFL) Sensitivity to acriflavine,
 integral... 1139 [0.0](#)

[NPSA sptr|Q8ZN77](#) (Q8ZN77_SALTY) RND family
 aminoglycoside/multidrug ... 1138 [0.0](#)

[NPSA sptr|Q5NQU7](#) (Q5NQU7_ZYMMO) RND multidrug efflux transporter
 1138 [0.0](#)

[NPSA sptr|Q5PCQ3](#) (Q5PCQ3_SALPA) Putative efflux pump
 1138 [0.0](#)

[NPSA sptr|Q8Z4S4](#) (Q8Z4S4_SALTI) Putative efflux pump
 1135 [0.0](#)

[NPSA sptr|Q6CZM0](#) (Q6CZM0_ERWCT) Probable aminoglycoside efflux
 pump 1132 [0.0](#)

[NPSA sptr|Q57LN0](#) (Q57LN0_SALET) RND family,
 aminoglycoside/multidrug... 1129 [0.0](#)

[NPSA sptr|Q6F8F6](#) (Q6F8F6_ACIAD) Acridine efflux pump (RND family)
 1121 [0.0](#)

[NPSA sptr|Q6N787](#) (Q6N787_RHOPA) RND multidrug efflux transporter
 Mex... 1117 [0.0](#)

[NPSA sptr|Q8PQJ5](#) (Q8PQJ5_XANAC) Multidrug efflux transporter
 1089 [0.0](#)

[NPSA sptr|Q66F48](#) (Q66F48_YERPS) Multidrug efflux protein, RND
 family... 1046 [0.0](#)

[NPSA sptr|Q8ZBD4](#) (Q8ZBD4_YERPE) Multidrug efflux protein
 (Acridine e... 1045 [0.0](#)

[NPSA sptr|Q5G7J3](#) (Q5G7J3_RHIET) RmeB
 1042 [0.0](#)

[NPSA sptr|Q8GC83](#) (Q8GC83_ENTAE) EefB inner membrane protein
 1041 [0.0](#)

[NPSA sptr|Q8UCE5](#) (Q8UCE5_AGRT5) Acriflavin resistance protein B
 (AGR... 1035 [0.0](#)

[NPSA_sptr|Q9F8V7](#) (Q9F8V7_9RHIZ) Multidrug efflux transporter RND fam... 1031 [0.0](#)

[NPSA_sptr|Q88HA4](#) (Q88HA4_PSEPK) Multidrug efflux RND transporter 1027 [0.0](#)

[NPSA_sptr|Q8Y3H0](#) (Q8Y3H0_RALSO) PUTATIVE ACRIFLAVIN RESISTANCE TRANS... 1026 [0.0](#)

[NPSA_sptr|Q9RBY8](#) (Q9RBY8_XANMA) SmeB 1021 [0.0](#)

[NPSA_sptr|Q92T03](#) (Q92T03_RHIME) PUTATIVE MULTIDRUG-EFFLUX SYSTEM TRA... 1010 [0.0](#)

[NPSA_sptr|Q8GKU1](#) (Q8GKU1_ACIG3) AdeE 1008 [0.0](#)

[NPSA_sptr|Q8UB15](#) (Q8UB15_AGRT5) RND multidrug efflux transporter (AG... 1002 [0.0](#)

[NPSA_sptr|Q7NVV1](#) (Q7NVV1_CHRVO) Acriflavin resistance protein B 992 [0.0](#)

[NPSA_sptr|O68441](#) (O68441_9RHIZ) Transmembrane efflux pump protein 989 [0.0](#)

[NPSA_sptr|Q8FHT0](#) (Q8FHT0_ECOL6) Acriflavine resistance protein B 988 [0.0](#)

[NPSA_sptr|Q7WH61](#) (Q7WH61_BORBR) Putative efflux system transmembrane... 964 [0.0](#)

[NPSA_sptr|Q7VWW1](#) (Q7VWW1_BORPE) Putative efflux system transmembrane... 963 [0.0](#)

[NPSA_sptr|Q6D1J9](#) (Q6D1J9_ERWCT) Multidrug resistance protein 947 [0.0](#)

[NPSA_sptr|Q6N9P2](#) (Q6N9P2_RHOPA) RND multidrug efflux transporter MexD 946 [0.0](#)

[NPSA_sptr|Q8X7E2](#) (Q8X7E2_ECO57) Putative efflux pump (Putative multi... 945 [0.0](#)

[NPSA_sptr|Q6N2Z4](#) (Q6N2Z4_RHOPA) RND multidrug efflux transporter Mex... 942 [0.0](#)

[NPSA_sptr|Q89UA1](#) (Q89UA1_BRAJA) RND multidrug efflux transporter 940 [0.0](#)

[NPSA_sptr|Q9HVI9](#) (Q9HVI9_PSEAE) RND multidrug efflux transporter MexD 931 [0.0](#)

[NPSA_sptr|O87936](#) (O87936_BURPS) Putative transporter AmrB 928 [0.0](#)

[NPSA_sptr|Q63U14](#) (Q63U14_BURPS) Multidrug efflux system transporter ... 926 [0.0](#)

[NPSA_sptr|Q82VH6](#) (Q82VH6_NITEU) RND multidrug efflux transporter 923 [0.0](#)

✓	NPSA	sptr Q9RG59	(Q9RG59_PSEAE)	Putative RND transporter (RND multidrug efflux transporter)
		922	0.0	
✓	NPSA	sptr Q88J31	(Q88J31_PSEPK)	Multidrug efflux RND transporter
MexD		920	0.0	
✓	NPSA	sptr Q882N4	(Q882N4_PSESM)	AcrB/AcrD/AcrF family protein
920		0.0		
✓	NPSA	sptr Q8RSM1	(Q8RSM1_9BACT)	MexD protein (Mexd protein)
protein)		920	0.0	
✓	NPSA	sptr Q87DA3	(Q87DA3_XYLFT)	Multidrug-efflux transporter
917		0.0		
✓	NPSA	sptr Q9PBP6	(Q9PBP6_XYLFA)	Multidrug-efflux transporter
915		0.0		
✓	NPSA	sptr Q6N682	(Q6N682_RHOPA)	RND multidrug efflux transporter
Mex...		913	0.0	
✓	NPSA	sptr Q8XT05	(Q8XT05_RALSO)	PROBABLE MULTIDRUG EFFLUX SYSTEM
TRA...		913	0.0	
✓	NPSA	sptr Q8P875	(Q8P875_XANCP)	Multidrug-efflux transporter acrB
913		0.0		
✓	NPSA	sptr Q8PJN1	(Q8PJN1_XANAC)	Multidrug efflux transporter
912		0.0		
✓	NPSA	sptr Q9JT51	(Q9JT51_NEIMA)	Probable drug efflux protein
910		0.0		
✓	NPSA	sptr Q9JY67	(Q9JY67_NEIMB)	Multiple transferable resistance
sys...		909	0.0	
✓	NPSA	sptr Q5GZ12	(Q5GZ12_XANOR)	Multidrug efflux transporter
909		0.0		
✓	NPSA	sptr Q9ZH24	(Q9ZH24_PSEAE)	Transmembrane efflux pump protein
906		0.0		
✓	NPSA	sptr Q5F725	(Q5F725_NEIG1)	Antibiotic resistance efflux pump
co...		904	0.0	
✓	NPSA	sptr Q51073	(Q51073_NEIGO)	RND protein
896		0.0		
✓	NPSA	sptr Q6F8P8	(Q6F8P8_ACIAD)	Putative multidrug efflux protein
880		0.0		
✓	NPSA	sptr Q93E19	(Q93E19_ACIBA)	AdeB RND protein
872		0.0		
✓	NPSA	sptr Q51396	(Q51396_PSEAE)	RND family exporter MexD
872		0.0		
✓	NPSA	sptr Q7M9I0	(Q7M9I0_WOLSU)	MULTIDRUG EFFLUX TRANSPORTER
840		0.0		
✓	NPSA	sptr Q9ZNG8	(Q9ZNG8_PSEAE)	MexY
828		0.0		

Apéndice 2. Proteínas homólogas a TtgR (BLAST).

BacTregulators



Entries with sequence similar to sequence 743:

E BLAST	Id	AN	Long name	Organism
1e-119	841	Q9AIU0	Regulatory protein TtgR	<i>Pseudomonas putida</i>
1e-117	906	Q9KJC4	ArpR	<i>Pseudomonas putida</i>
1e-117	3553	Q88N29	Transcriptional regulator TtgR	<i>Pseudomonas putida</i> KT2440
1e-117	5970	26988121	transcriptional regulator TtgR	<i>Pseudomonas putida</i> KT2440
2e-86	582	Q6V6Y0	TetR-like putative regulatory protein	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
2e-83	3444	Q87X86	Transcriptional regulator, TetR family	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. tomato
2e-83	7932	28871439	transcriptional regulator, TetR family	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. tomato str. DC3000
5e-46	756	Q7WTR1	Putative repressor for the <i>acrAB</i> genes	<i>Erwinia amylovora</i>
5e-45	1105	Q62MD2	Transcriptional regulator, TetR family	<i>Burkholderia mallei</i> ATCC 23344
5e-45	8960	53725068	transcriptional regulator, TetR family	<i>Burkholderia mallei</i> ATCC 23344 chromosome 1
1e-44	587	Q6VV70	Repressor protein	<i>Burkholderia pseudomallei</i>
1e-44	1233	Q63WS9	TetR family regulatory protein	<i>Burkholderia pseudomallei</i> K96243
1e-44	9032	53718451	TetR family regulatory protein	<i>Burkholderia pseudomallei</i> K96243 chromosome 1
4e-43	4597	Q6D804	Potential <i>acrAB</i> operon repressor	<i>Pectobacterium atrosepticum</i>
4e-43	7805	50120110	potential <i>acrAB</i> operon repressor	<i>Erwinia carotovora</i> subsp. <i>atroseptica</i> SCRI1043
2e-42	1722	Q8Y3G8	PUTATIVE ACRAB OPERON REPRESSOR TRANSCRIPTION REGULATOR PROTEIN	<i>Ralstonia solanacearum</i>
2e-42	6677	17544731	PUTATIVE ACRAB OPERON REPRESSOR TRANSCRIPTION REGULATOR PROTEIN	<i>Ralstonia solanacearum</i> GMI1000
5e-40	2742	Q7N0N2	<i>AcrAB</i> operon repressor	<i>Photobacterium luminescens</i> subsp. <i>laumondii</i>
5e-40	8351	37527710	<i>acrAB</i> operon repressor	<i>Photobacterium luminescens</i> subsp. <i>laumondii</i> TTO1

6e-40	4738	Q8X5D3	AcrAB operon repressor	Escherichia coli O157:H7	
6e-40	5178	15800193	acrAB operon repressor	Escherichia coli O157:H7 EDL933	
6e-40	5358	15829771	acrAB operon repressor	Escherichia coli O157:H7	
8e-40	2	P34000	HTH-type transcriptional regulator acrR (Potential acrAB operon repressor)	Escherichia coli O6	
8e-40	3	P34000	HTH-type transcriptional regulator acrR (Potential acrAB operon repressor)	Shigella flexneri	
8e-40	4810	16128448	acrAB operon repressor	Escherichia coli K12	
8e-40	7439	24111847	acrAB operon repressor	Shigella flexneri 2a str. 301	
8e-40	7569	26246477	Potential acrAB operon repressor	Escherichia coli CFT073	
8e-40	8189	30061964	acrAB operon repressor	Shigella flexneri 2a str. 2457T	
2e-39	433	Q66DQ8	Putative transcriptional repressor for multidrug efflux pump (TetR/AcrR family)	Yersinia pseudotuberculosis IP 32953	
2e-39	1842	Q8ZC89	Putative tetR-family transcriptional regulatory protein (AcrAB operon repressor)	Yersinia pestis	
2e-39	6343	16123293	putative tetR-family transcriptional regulatory protein	Yersinia pestis strain CO92	
2e-39	7345	22124958	acrAB operon repressor	Yersinia pestis KIM	
2e-39	8505	45440649	putative tetR-family transcriptional regulatory protein	Yersinia pestis biovar Medievalis str. 91001	
2e-39	8738	51595335	putative transcriptional repressor for multidrug efflux pump (TetR/AcrR family)	Yersinia pseudotuberculosis IP 32953	
7e-39	583	Q6VG95	AcrR	Salmonella enteritidis	
7e-39	584	Q6VG96	AcrR	Salmonella enterica subsp. enterica serovar Dublin	
7e-39	1650	Q8XEW7	Potential acrAB operon repressor	Salmonella typhi	
7e-39	2665	Q7CR15	AcrAB operon repressor (TetR/AcrR family)	Salmonella typhimurium	
7e-39	6506	16763857	acrAB operon repressor	Salmonella typhimurium LT2	
7e-39	6555	16759457	potential acrAB operon repressor	Salmonella enterica subsp. enterica serovar Typhi str. CT18	
7e-39	8015	29142771	potential acrAB operon repressor	Salmonella enterica subsp. enterica serovar Typhi Ty2	
2e-38	837	Q9AEG3	Putative AcrR protein	Enterobacter aerogenes	
3e-37	325	Q8VPB0	Regulatory protein AcrR	Proteus mirabilis	
5e-35	363	Q93K42	AcrR protein	Klebsiella pneumoniae	
1e-27	82	P39897	HTH-type transcriptional regulator mtrR	Neisseria gonorrhoeae	

1e-27	413	Q59608	MtrR protein	Neisseria gonorrhoeae	
8e-27	561	Q6RV06	MtrR	Neisseria meningitidis	
8e-27	1939	Q92T04	PUTATIVE TRANSCRIPTION REGULATORY PROTEIN	Sinorhizobium meliloti	
8e-27	6179	15963944	PUTATIVE TRANSCRIPTION REGULATORY PROTEIN	Sinorhizobium meliloti 1021	
8e-27	4311	Q9JT49	Transcriptional regulator	Neisseria meningitidis serogroup A	
8e-27	6321	15794854	transcriptional regulator	Neisseria meningitidis serogroup A strain Z2491	
8e-27	4317	Q9JY65	Transcriptional regulator MtrR	Neisseria meningitidis serogroup B	
8e-27	6314	15677564	transcriptional regulator MtrR	Neisseria meningitidis MC58	
1e-26	2825	Q7P0X9	Acrab operon repressor	Chromobacterium violaceum	
1e-26	8256	34495891	acrab operon repressor	Chromobacterium violaceum ATCC 12472	
2e-26	4233	Q9HY46	Probable transcriptional regulator	Pseudomonas aeruginosa	
2e-26	5092	15598770	probable transcriptional regulator	Pseudomonas aeruginosa PA01	
3e-26	1762	Q8YF91	TRANSCRIPTIONAL REGULATOR, TETR FAMILY	Brucella melitensis	
3e-26	6818	17987914	TRANSCRIPTIONAL REGULATOR, TETR FAMILY	Brucella melitensis 16M chromosome I	
3e-26	4081	Q8G2M8	Transcriptional regulator, TetR family	Brucella melitensis biovar Suis	
3e-26	7412	23501197	transcriptional regulator, TetR family	Brucella suis 1330 chromosome I	
2e-25	480	Q6KAY3	Transcriptional repressor	Stenotrophomonas maltophilia	
3e-25	1223	Q63U12	TetR family regulatory protein	Burkholderia pseudomallei K96243	
3e-25	9042	53719418	TetR family regulatory protein	Burkholderia pseudomallei K96243 chromosome 1	
4e-25	482	Q6KAZ8	Transcriptional repressor	Stenotrophomonas maltophilia	
4e-25	1871	Q8ZLN6	Transcriptional repressor for envCD (AcrEF)	Salmonella typhimurium	
4e-25	6535	16766684	transcriptional repressor	Salmonella typhimurium LT2	
7e-25	481	Q6KAZ2	Transcriptional repressor	Stenotrophomonas maltophilia	
2e-24	4451	Q9RG61	Probable transcriptional regulator	Pseudomonas aeruginosa	
2e-24	5056	15597216	probable transcriptional regulator	Pseudomonas aeruginosa PA01	
3e-24	291	Q8KLP4	Repressor	Stenotrophomonas maltophilia	
2e-23	41	P31676	Potential acrEF/envCD operon	Escherichia coli O157:H7	

			repressor		
2e-23	4834	16131152	putative transcriptional regulator	Escherichia coli K12	
2e-23	5204	15803798	putative transcriptional regulator	Escherichia coli O157:H7 EDL933	
2e-23	5383	15833390	putative transcriptional regulator	Escherichia coli O157:H7	
2e-23	4018	Q8FD26	Potential acrEF/envCD operon repressor	Escherichia coli O6	
2e-23	7593	26249856	Potential acrEF/envCD operon repressor	Escherichia coli CFT073	
3e-23	2294	Q6N2F3	Transcriptional regulator, TetR family	Rhodopseudomonas palustris	
3e-23	8468	39937157	transcriptional regulator, TetR family	Rhodopseudomonas palustris CGA009	
2e-20	276	O87934	Regulator AmrR	Burkholderia pseudomallei	
2e-20	2809	Q7NV88	Probable transcriptional regulator, TetR family	Chromobacterium violaceum	
2e-20	8272	34497911	probable transcriptional regulator, TetR family	Chromobacterium violaceum ATCC 12472	
2e-19	691	Q7CRV7	AGR_L_3219p	Agrobacterium tumefaciens str. C58	
2e-19	6258	15891729	AGR_L_3219p	Agrobacterium tumefaciens str. C58 chromosome linear	
2e-19	1617	Q8UB16	Transcriptional regulator, TetR family	Agrobacterium tumefaciens str. C58	
2e-19	6763	17936912	transcriptional regulator, TetR family	Agrobacterium tumefaciens str. C58 chromosome linear	
1e-17	890	Q9F939	Putative AcrR protein (Fragment)	Salmonella typhimurium	
2e-17	263	O68442	Regulatory protein	Agrobacterium tumefaciens	
2e-17	963	Q9R9T9	Efflux pump regulator SrpR	Pseudomonas putida	
2e-16	3352	Q82VH4	Bacterial regulatory proteins, TetR family	Nitrosomonas europaea	
2e-16	8223	30249103	Bacterial regulatory proteins, TetR family	Nitrosomonas europaea ATCC 19718	
1e-15	373	Q93PU7	Putative regulatory protein TtgW	Pseudomonas putida	
9e-15	910	Q9KWD3	Riorf51 protein	Agrobacterium rhizogenes Plasmid pRi1724	
3e-14	4013	Q8FC12	Hypothetical protein c4550	Escherichia coli O6	
3e-14	7601	26250370	Hypothetical protein	Escherichia coli CFT073	