

T 6 44

CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS
ESTACIÓN EXPERIMENTAL DEL ZAIDÍN

UNIVERSIDAD DE GRANADA
FACULTAD DE CIENCIAS

UNIVERSIDAD DE GRANADA
Facultad de Ciencias
Fecha ...18/02/03...
ENTRADA NUM. ...462...

UNIVERSIDAD DE GRANADA
4 / FEB. 2003
COMISION DE DOCTORADO

**TOLERANCIA A *p*-HIDROXIBENZOATO DE LA
CEPA *Pseudomonas putida* DOT-T1E: IMPLICACIÓN
DEL SISTEMA DE ENTRADA DE HIERRO**

ExbBDTonB

TESIS DOCTORAL

BIBLIOTECA UNIVERSITARIA
GRANADA
N.º Documento 613584285
N.º Copia 215950177

PATRICIA GODOY ALBA
2003

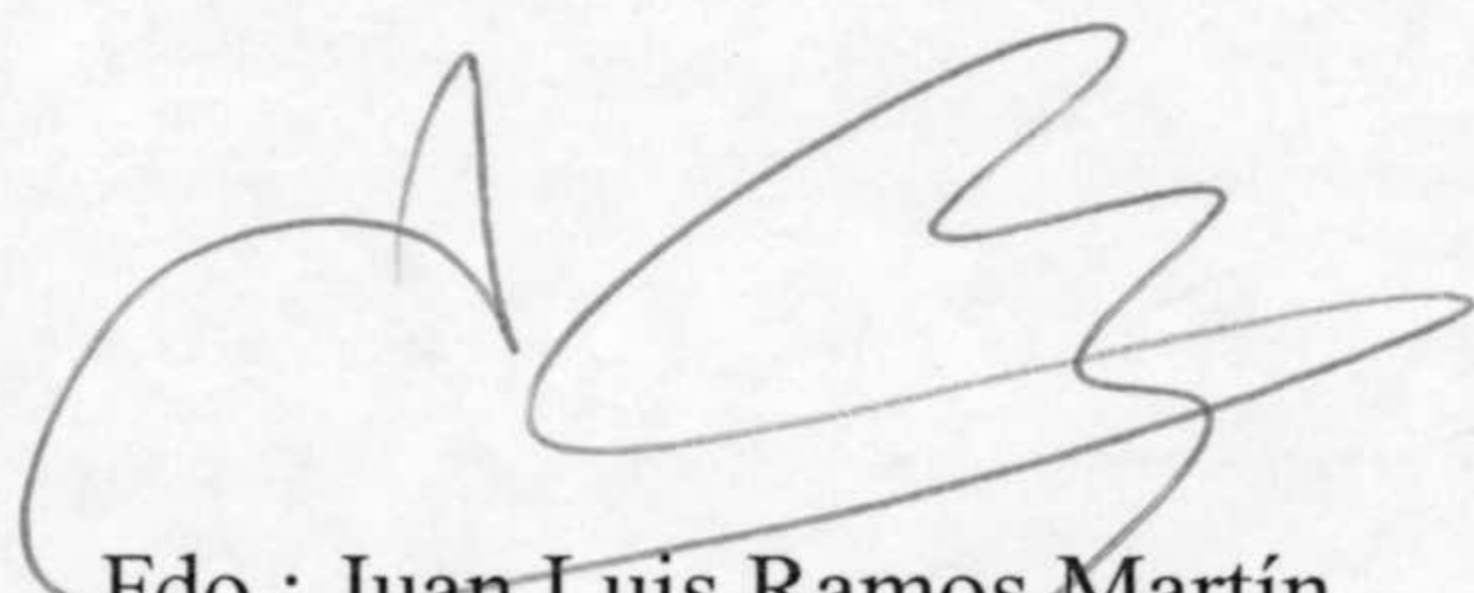
**TOLERANCIA A *p*-HIDROXIBENZOATO DE LA CEPA
Pseudomonas putida DOT-T1E: IMPLICACIÓN DEL
SISTEMA DE ENTRADA DE HIERRO ExbBDTonB**

Memoria que presenta la licenciada en
Ciencias Químicas, Patricia Godoy Alba,
para aspirar al Título de Doctora



Fdo.: Patricia Godoy Alba

Vº Bº
Los directores



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



Fdo.: Mª Isabel Ramos González
Doctora en Biología

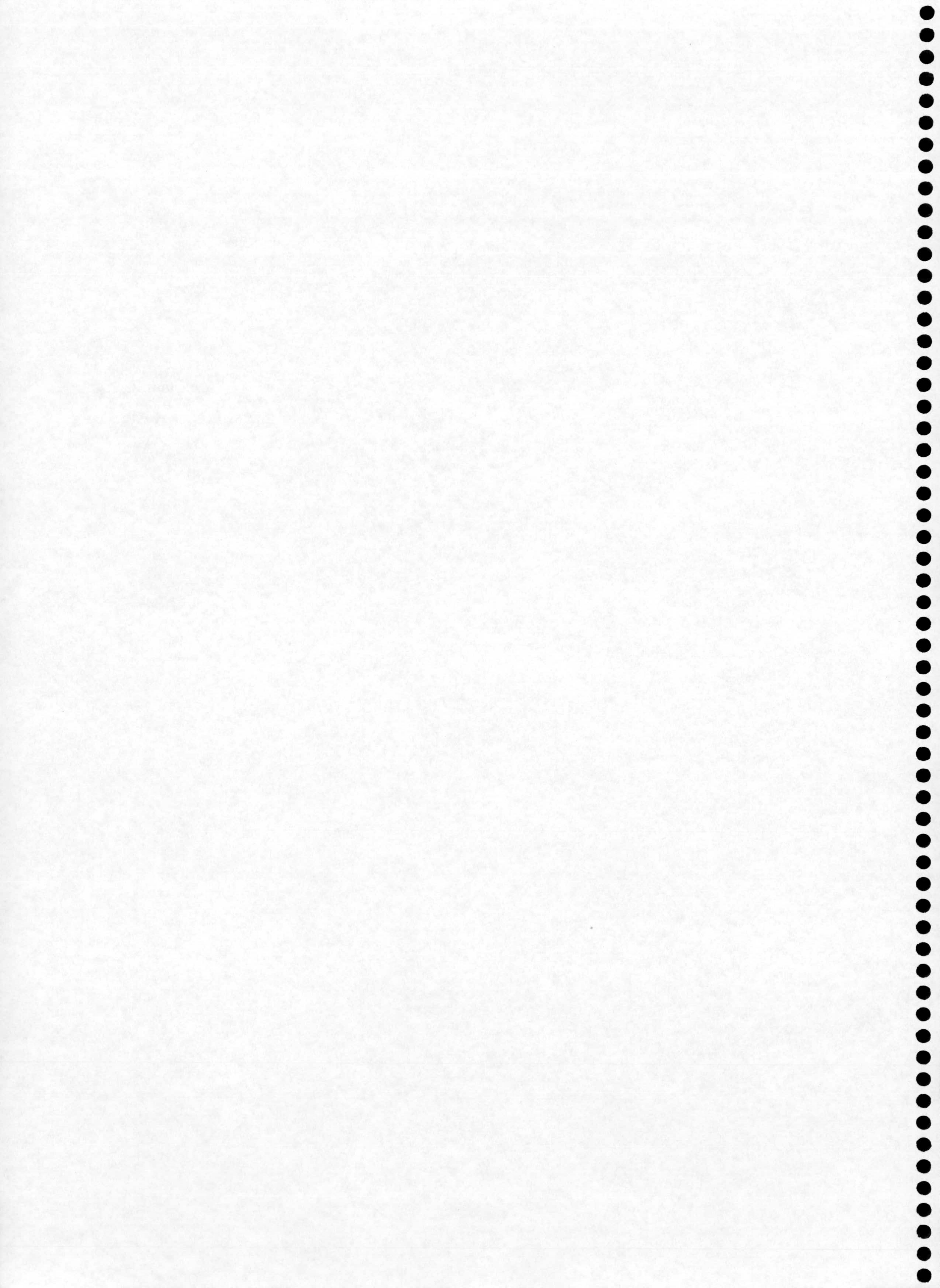
Universidad de Granada
2003

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

A mi familia

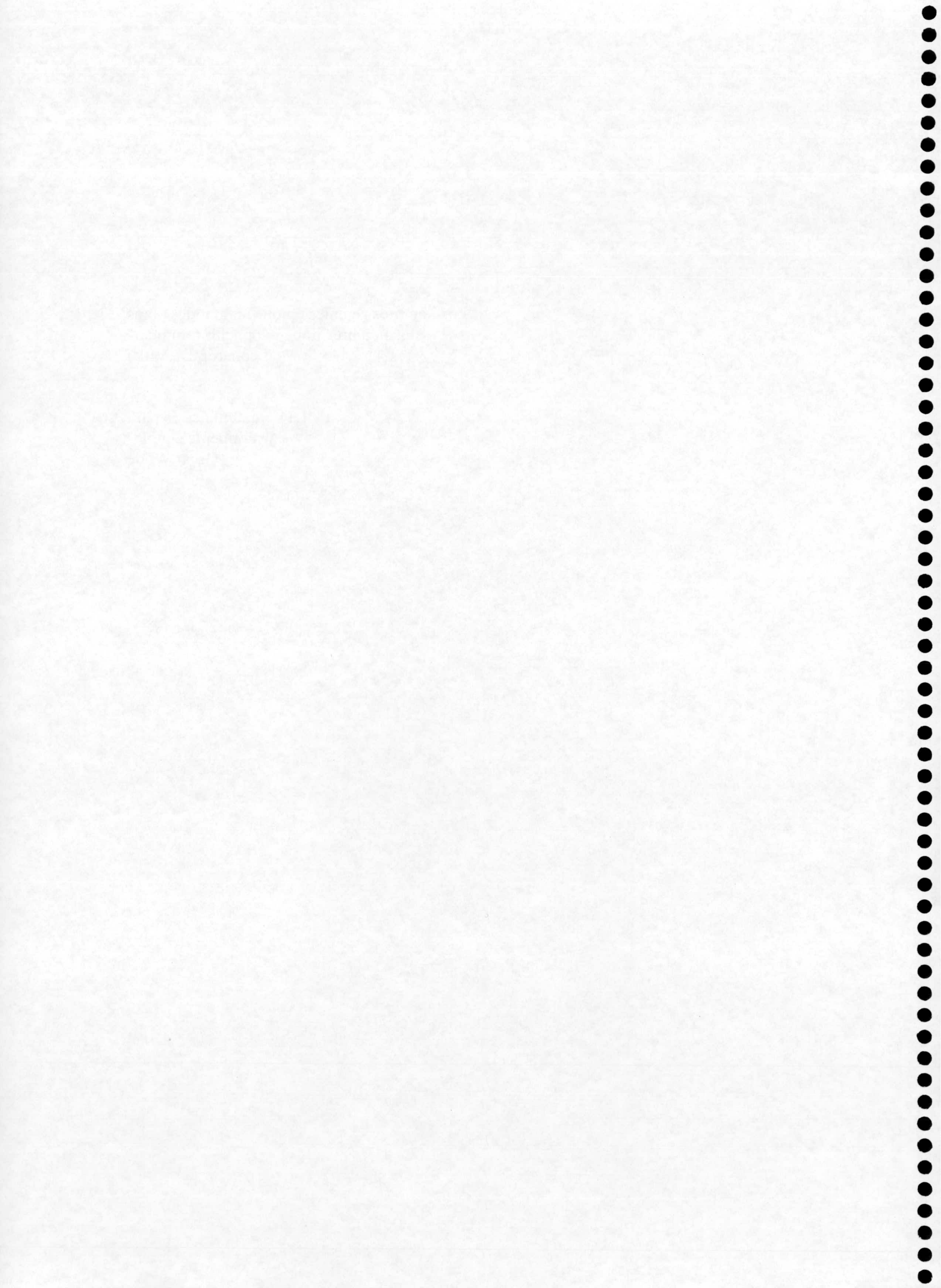
A Ale

A Ana



“Los hombres geniales empiezan grandes obras,
los hombres trabajadores las terminan”.
Leonardo Da Vinci.

"La verdad nunca es pura,
y raramente simple".
Oscar Wilde.



AGRADECIMIENTOS

No me gustaría finalizar la escritura de esta Tesis Doctoral sin antes expresar mi agradecimiento a todas aquellas personas que han contribuido de un modo u otro a su realización:

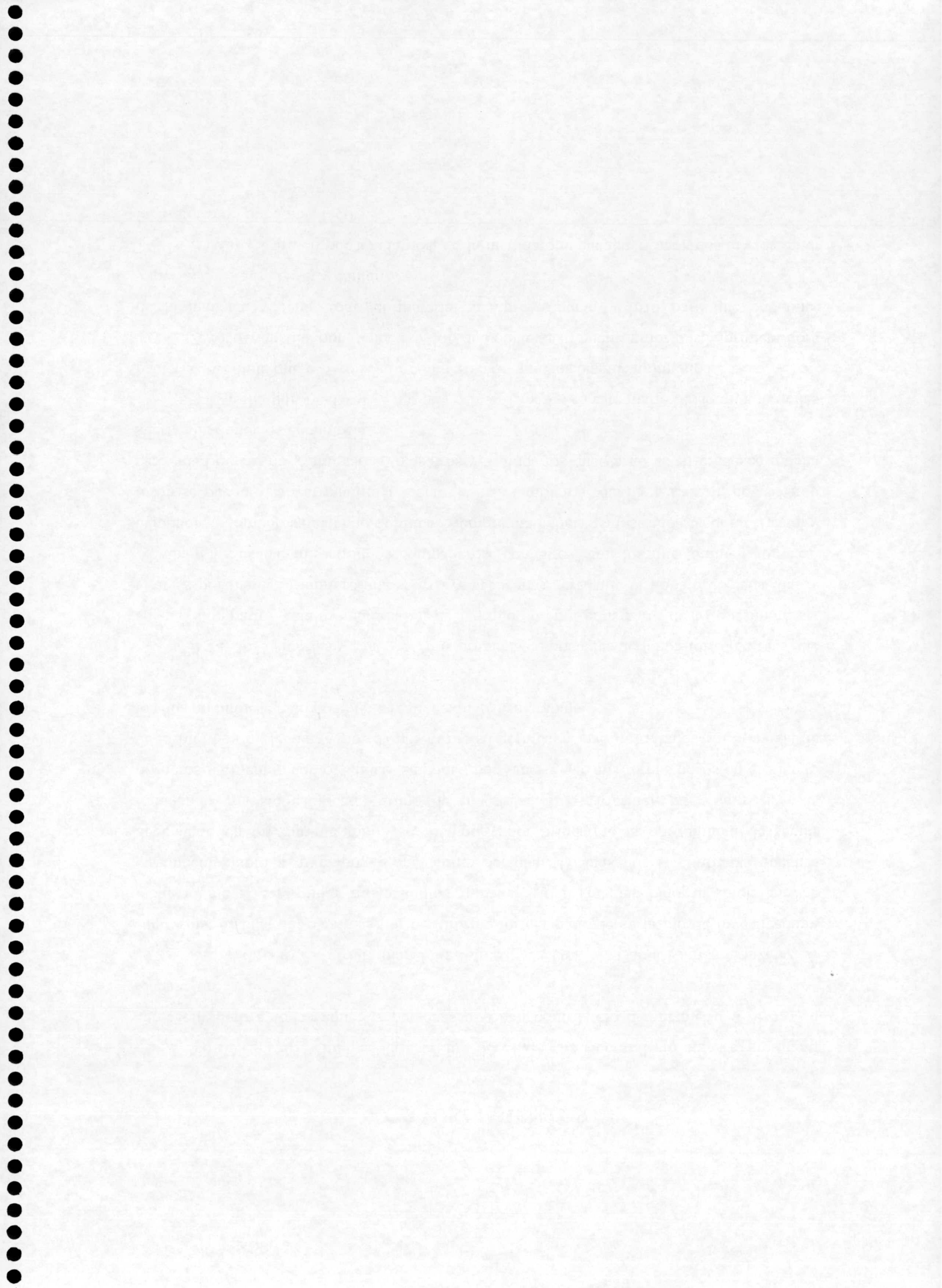
A mis directores, el Dr. Juan Luis Ramos y la Dra. M^a Isabel Ramos González. A Juan Luis, gracias una vez más por permitirme formar parte de su grupo de investigación, incluso antes de terminar mis estudios universitarios. Trabajar bajo tu tutela me ha enriquecido tanto a nivel profesional como personal. Gracias por la confianza que has depositado en mí durante todo este tiempo y por brindarme la oportunidad de seguir trabajando en este estupendo grupo de investigación. A Maribel, por compartir esos primeros momentos como "chicas Dupont", por saber guiar mis torpes pasos en el mundo de la biología molecular y por demostrarme su gran capacidad de trabajo. Sin la ayuda de los dos no hubiese sido posible la realización de este trabajo.

A M^a José Huertas y Mati Gil, mis primeras compañeras de laboratorio (con las que además comparto "estatus maternal"), de las que aprendí gran parte de lo que ahora sé. Gracias por mantener siempre una sonrisa y hacer más agradable el trabajo de cada día. A Abraham y Susana, mis antiguos compañeros "coheteros" con los que también compartí agradables momentos haciendo química. Siempre me habéis demostrado que con esfuerzo y tesón se puede alcanzar cualquier meta. Gracias también a Maxi y a Lázaro, por su gran capacidad de cariño y amistad. A vosotros y a todos los que ya no están os deseo mucha suerte allá donde os encontréis.

A Estrella por ayudarme a dar mis primeros pasos en este maravilloso mundo de las bacterias, y con la que espero seguir compartiendo muchos buenos momentos.

A M^a Angustias por tener ese don de contagiar tu buen humor desde primera hora de la mañana, y tener todo el material siempre a punto y listo para que cualquier experimento fuese coser y cantar.

A Mai y Carmen por ayudarnos, en la medida que pueden, a hacernos la vida en el laboratorio un poco más fácil.



A Mar, a Raquel R. y a las niñas del Salón Comedor (ahora exiliadas en la "casetilla") con las que seguimos compartiendo buena vecindad y agradables ratos a la hora del cafelito. A Ana Segura, por estar siempre dispuesta a ayudarme y aclarar muchas de mis dudas científicas. He aprendido mucho gracias a tí. A Ana Hurtado que, a pesar de la "mala follá granaína", siempre consigue arrancarme una sonrisa. A Antonia, mi nueva compañera "cohetera". Gracias por compartir algunos momentos de química con nuestra T1E entre curva y curva de crecimiento. A Marichu, gracias a tu buen carácter, tu cariño y amistad me has ayudado a superar muchos momentos "difíciles". A Mar y a Raquel R., las "chicas Pm y XylS". Gracias por vuestra disponibilidad incondicional e infinita para echarme una mano siempre que lo he necesitado. Constituís una especie en peligro de extinción y me siento muy afortunada por compartir vuestra amistad.

A Raquel R., Patri Marin y Marian Llamas por ayudarme a dar mis primeros pasos en el maravilloso mundo de las proteínas.

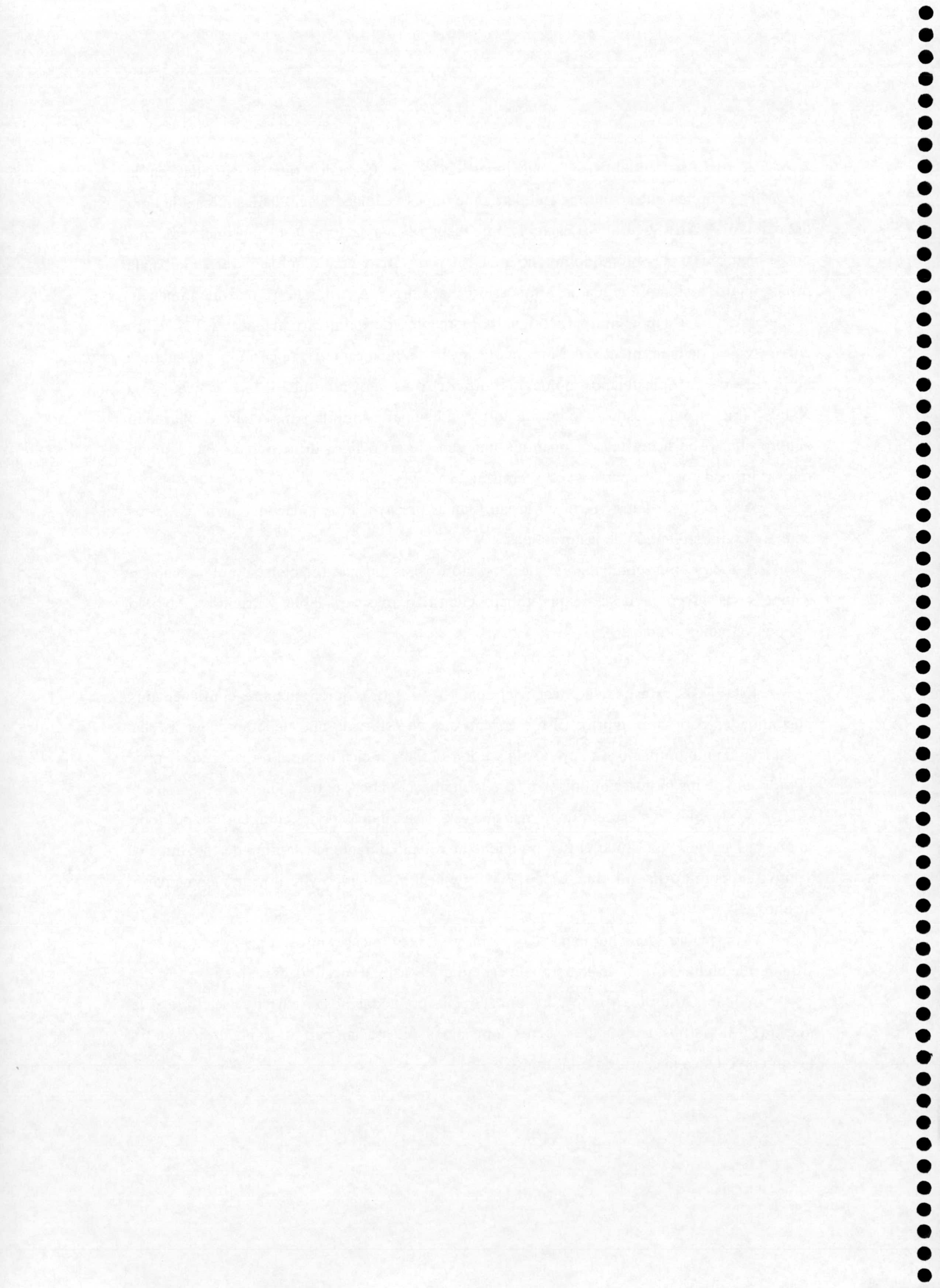
A tod@s mis compañer@s de laboratorio. Las buenas relaciones y el trabajo en equipo constituyen la base de un trabajo científico más agradable y fructífero. No lo olvidéis. Gracias a tod@s.

Esta Tesis está dedicada especialmente a mi padre, quién siempre confió en mis posibilidades para conseguirlo. Él me enseñó que en esta vida uno debe aprender a estar satisfecho con uno mismo y a aprender a valorar el trabajo bien hecho. Su recuerdo siempre ha sido uno de los motores impulsores para la finalización de este trabajo.

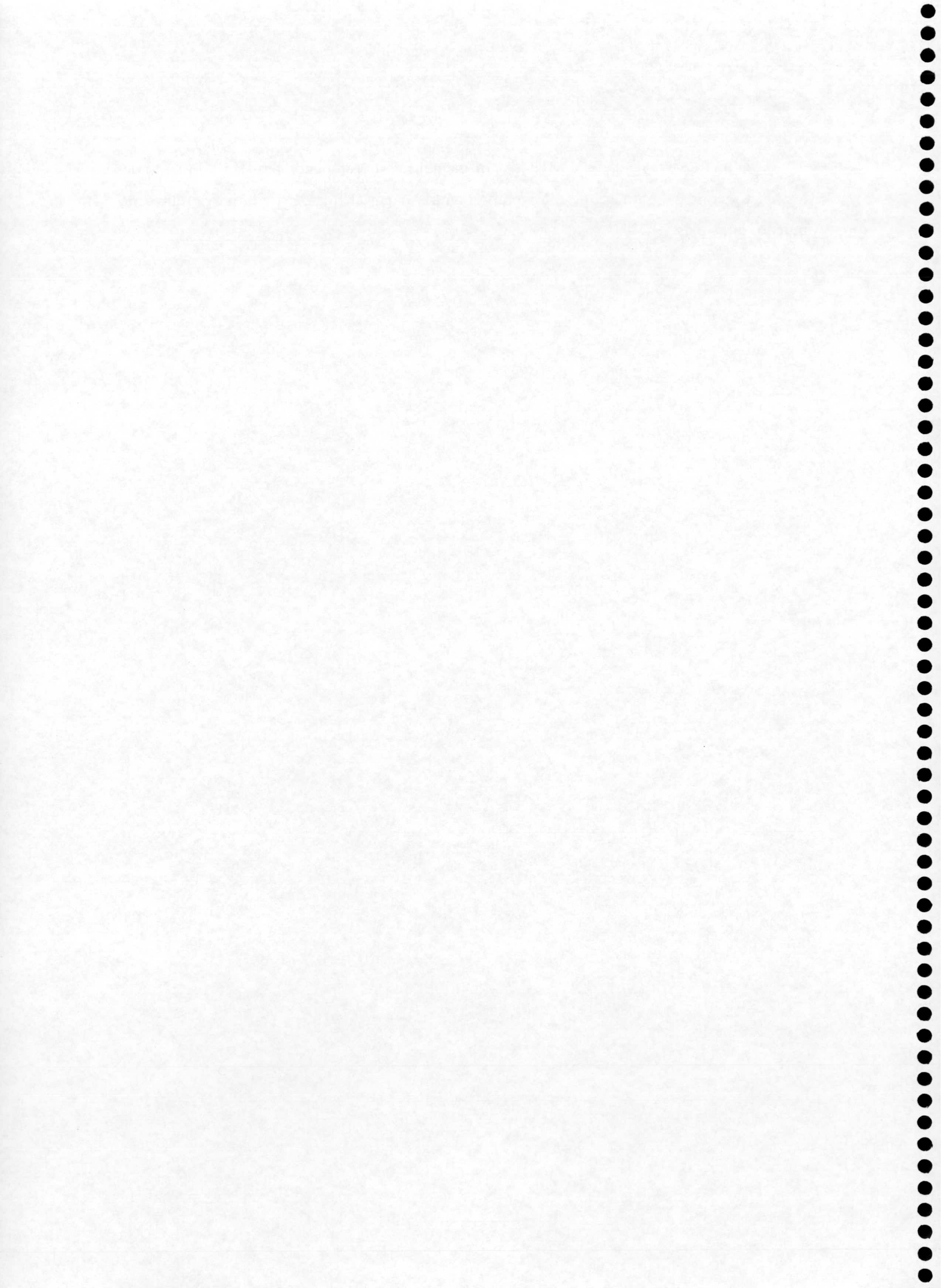
A Ale, que se merece mucho más que esta Tesis. Jamás podré compensarte por todo lo que has sufrido y por todo el tiempo que te he robado durante la escritura de este trabajo. Tanto a tí como a Ana, mi niña, espero poder dedicar más tiempo y ratitos de juego a partir de ahora.

A mi madre y mis hermanas Cris, Ana y Marta. Gracias por estar siempre a mi lado y quererme tanto. Al final de este trabajo espero que os sintáis orgullosas de mí.

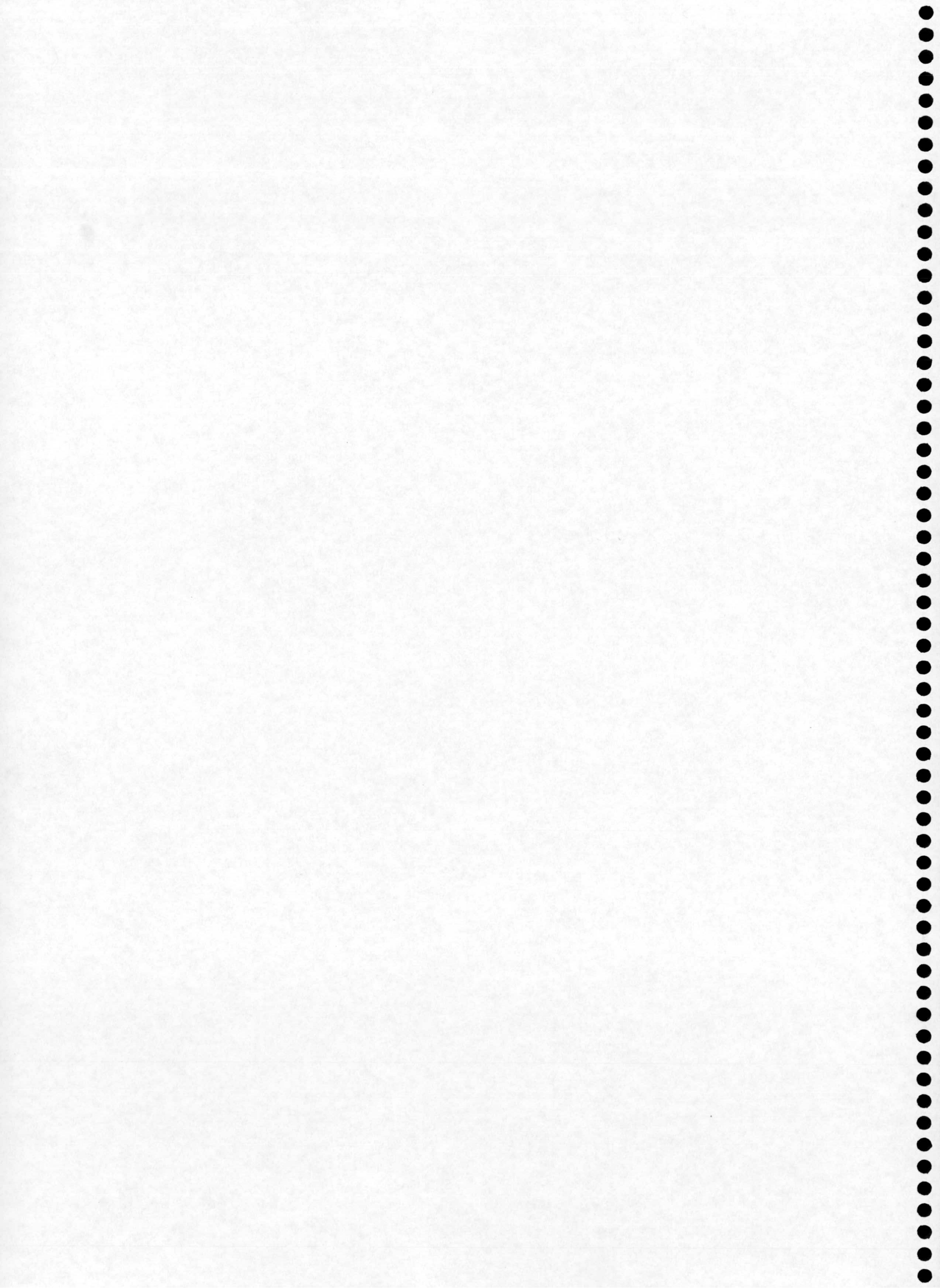
A Juani, Antonio, Migue y Juanma. Gracias por acogernos en vuestra casa (que es la nuestra) y aliviarnos de esos quehaceres domésticos que me han permitido poder dedicar un tiempo precioso a la escritura esta tesis.



A Ilu, a M^a Ángeles y a M^a José por mantener esta estupenda amistad a lo largo de los años y confiar en que tarde o temprano lograría llegar al final. Espero que perdure por muchos años más.



ÍNDICE



ÍNDICE	xiii
ABREVIATURAS	xxiii
ÍNDICE DE FIGURAS	xxv
ÍNDICE DE TABLAS	xxix
INTRODUCCIÓN	1
1. LA ENVOLTURA CELULAR DE LAS BACTERIAS GRAM-NEGATIVAS.	4
1.1. La membrana externa.	5
1.2. El espacio periplásmico.	6
1.3. La membrana citoplasmática.	7
2. EFECTOS DE LOS DISOLVENTES ORGÁNICOS SOBRE LOS MICROORGANISMOS.	9
3. MECANISMOS DE RESISTENCIA DE LOS MICROORGANISMOS FRENTE A DISOLVENTES TÓXICOS.	11
3.1. Adaptaciones a corto y a largo plazo.	12
3.2. Sistemas específicos de extrusión.	13
3.3. Degradación o modificación del disolvente.	15
4. EL METABOLISMO DEL <i>p</i> -HIDROXIBENZOATO EN BACTERIAS.	15
4.1. Biosíntesis de <i>p</i> -hidroxibenzoato en <i>Pseudomonas</i> .	17
4.2. Transporte de <i>p</i> -hidroxibenzoato al interior de la célula.	18
4.3. Ruta catabólica de <i>p</i> -hidroxibenzoato.	19
5. OTROS PRECURSORES DE PROTOCATECUATO	20
5.1. Ruta de degradación del quinato/shikimato.	20
5.2. Ruta de degradación del vainillato.	21
6. INCORPORACIÓN DE HIERRO EN LAS BACTERIAS GRAM-NEGATIVAS.	22
6.1. Sistemas de transporte de hierro (III) de alta afinidad.	23
6.1.1. Sideróforos.	24
a) tipos de sideróforos.	25
b) biosíntesis de los sideróforos.	26
6.1.2. Excreción de sideróforos al periplasma y al medio.	26
6.1.3. Transporte de ferrisideróforos al interior de la célula.	27
a) el sistema ExbBDtonB.	27

Mecanismo de transducción de energía dependiente de TonB.	31
Implicación del sistema TonB en el transporte de otras moléculas (toxinas, antibióticos).	32
Comparación de los sistemas Ton y Tol.	34
b) proteínas receptoras de membrana externa	35
6.1.4. Entrada al citoplasma.	36
6.1.5. Liberación del hierro del complejo ferrisideróforo.	37
6.2. Sistemas de transporte de hierro (III) de baja afinidad.	37
6.3. Regulación de la expresión de los sistemas de transporte de hierro.	38
6.3.1. Mecanismos de regulación negativa por hierro.	38
a) la proteína Fur.	38
b) la proteína DtxR.	40
6.3.2. Mecanismos de regulación positiva por hierro.	41
OBJETIVOS	43
MATERIALES Y MÉTODOS.	47
1. CEPAS BACTERIANAS Y SU CONSERVACIÓN.	49
2. MEDIOS Y CONDICIONES DE CULTIVO.	49
2.1. Fuentes de carbono.	50
2.2. Antibióticos.	51
2.3. Condiciones de cultivo.	51
3. SOLUCIONES.	52
4. ENSAYOS DE RESISTENCIA/SENSIBILIDAD.	54
4.1. Ensayos de resistencia/sensibilidad a antibióticos.	54
4.1.1. Aproximación del halo de inhibición.	54
4.1.2. Determinación de la concentración mínima inhibitoria (MIC).	55
4.2. Ensayos de tolerancia a compuestos tóxicos empleando placas con un gradiente de concentración.	55
4.3. Resistencia/sensibilidad a compuestos aromáticos y otros compuestos tóxicos.	56
4.3.1. Choque por exposición repentina a alta concentración.	56
4.3.2. Inhibición del crecimiento.	56

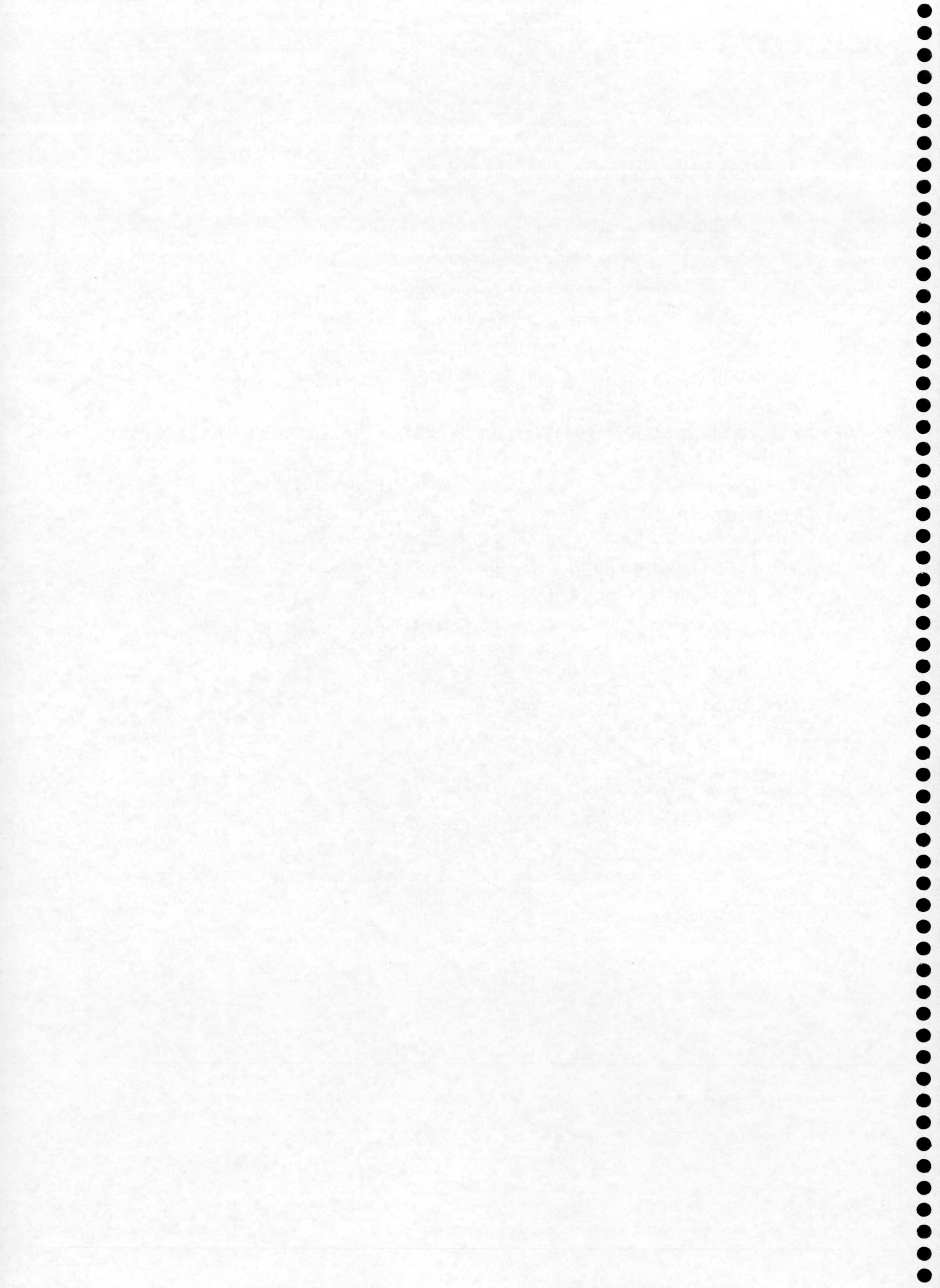
5. PREPARACIÓN DE EXTRACTOS LIBRES DE CÉLULAS.	57
6. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS EN EXTRACTOS LIBRES DE CÉLULAS.	57
7. MEDIDA DE LA ACTIVIDAD FOSFATASA ALCALINA.	57
8. ANÁLISIS DE LÍPIDOS DE MEMBRANA.	58
8.1. Extracción y purificación de lípidos.	58
8.2. Preparación de ésteres metílicos de ácidos grasos de lípidos.	59
8.3. Análisis de los ésteres metílicos por cromatografía de gases (CG).	59
9. PLÁSMIDOS.	59
10. AISLAMIENTO DE ADN PLASMÍDICO Y CROMOSÓMICO.	65
11. INTRODUCCIÓN DE PLÁSMIDOS EN CÉLULAS BACTERIANAS.	66
11.1. Transferencia por conjugación.	66
11.2. Transformación mediante choque térmico.	66
11.3. Electrotransformación.	66
12. MUTAGÉNESIS.	67
12.1. Mutagénesis por transposición.	67
12.2. Construcción de mutantes por reemplazamiento génico.	68
13. TÉCNICAS DE ADN Y ARN.	69
13.1. Determinación de la concentración de ADN y ARN.	69
13.2. Electroforesis de ADN y ARN en geles de agarosa.	69
13.2.1. Electroforesis de ADN.	69
13.2.2. Electroforesis de ARN.	70
13.3. Recuperación de fragmentos de ADN de geles de agarosa.	70
13.4. Transferencia de ADN a membrana por el método de "Southern Blotting" e hibridación.	70
13.5. Reacción de amplificación en cadena con ADN polimerasa termorresistente (PCR).	71
13.6. Reacción de amplificación en cadena con retro-transcriptasa reversa (RT-PCR).	72
13.7. Secuenciación de ADN.	73
13.8. Otras técnicas de manipulación de ADN.	73
14. DETECCIÓN DE PROTEÍNAS PERIPLÁSMICAS EN EL MEDIO	73

EXTRACELULAR.	
14.1. Preparación de lisado celular total.	73
14.2. Precipitación de proteínas del sobrenadante.	74
14.3. Separación de péptidos por electroforesis desnaturizante en gel de poliacrilamida en presencia de SDS (EGPA-SDS).	74
14.4. Transferencia a nitrocelulosa e inmunodetección de β -lactamasa.	76
15. TÉCNICAS DE MICROSCOPIA.	77
15.1. Microscopía electrónica de transmisión.	77
15.2. Microscopía electrónica de barrido.	78
16. TRATAMIENTO Y ANÁLISIS INFORMÁTICO DE SECUENCIAS.	78
RESULTADOS	81
Capítulo 1: ESTUDIO Y CARACTERIZACIÓN FISIOLÓGICA DE LA TOLERANCIA A COMPUESTOS HIDROXILADOS AROMÁTICOS EN LA CEPA <i>Pseudomonas putida</i> DOT-T1E.	83
RESUMEN	83
1. EFECTO DE COMPUESTOS AROMÁTICOS HIDROXILADOS DERIVADOS DEL METABOLISMO DE TOLUENO SOBRE EL CRECIMIENTO DE <i>P. putida</i> DOT-T1E.	84
2. EL <i>p</i> -HIDROXIBENZOATO COMO UN INHIBIDOR DEL CRECIMIENTO EN <i>P. putida</i> DOT-T1E.	91
3. EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE Mg^{2+} EN EL MEDIO DE CULTIVO SOBRE LA TOLERANCIA DE <i>P. putida</i> DOT-T1E A COMPUESTOS AROMÁTICOS HIDROXILADOS.	94
4. ADAPTACIÓN FISIOLÓGICA DE <i>P. putida</i> DOT-T1E A COMPUESTOS AROMÁTICOS HIDROXILADOS COMO UN EFECTO DE LA EXPOSICIÓN A BAJAS CONCENTRACIONES DEL COMPUESTO.	97
5. EFECTO ACUMULATIVO SOBRE LA TOLERANCIA A PHBA DE <i>P. putida</i> DOT-T1E COMO CONSECUENCIA DE UN INCREMENTO EN LOS IONES Mg^{2+} EN EL MEDIO DE CULTIVO Y DE LA ADAPTACIÓN FISIOLÓGICA DE LAS CÉLULAS BACTERIANAS AL COMPUESTO.	102
6. CRECIMIENTO DE <i>P. putida</i> DOT-T1E EN COMPUESTOS QUE RINDEN 3,4-DIHIDROXIBENZOATO: PAPEL DE LOS PRODUCTOS INTERMEDIOS METABÓLICOS DE LA RUTA DEL β -CETOADIPATO EN LA ADAPTACIÓN A PHBA.	103
7. EFECTO DE LOS COMPUESTOS AROMÁTICOS HIDROXILADOS SOBRE LA COMPOSICIÓN EN ÁCIDOS GRASOS DE LOS FOSFOLÍPIDOS DE <i>P. putida</i> DOT-T1E.	105

7.1. Análisis de células en fase estacionaria.	107
7.2. Análisis de células en fase exponencial.	110
8. LA ADAPTACIÓN FISIOLÓGICA DE <i>P. putida</i> DOT-T1E SE CORRESPONDE CON UN MENOR ACÚMULO DE PHBA EN LAS CÉLULAS.	111
Capítulo 2: GENERACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DEL MUTANTE DOT-T1E-PhoA5 SENSIBLE A PHBA.	113
RESUMEN	113
1. OBTENCIÓN DEL MUTANTE PhoA5 POR TRANSPOSICIÓN.	114
2. IDENTIFICACIÓN DEL GEN INTERRUMPIDO EN EL MUTANTE PhoA5: CLONACIÓN DE LA MUTACIÓN Y ANÁLISIS DE SECUENCIA.	114
3. CLONACIÓN DE LA REGIÓN SILVESTRE QUE CONTIENE EL GEN <i>exbD</i> Y ANALISIS DE SU SECUENCIA.	115
4. COMPARACIÓN DE ExbB, ExbD Y TonB DE <i>P. putida</i> DOT-T1E CON LAS SECUENCIAS DISPONIBLES EN LAS BASES DE DATOS.	123
4.1. Comparación de ExbB de DOT-T1E con las secuencias de las bases de datos.	123
4.2. Comparación de ExbD de DOT-T1E con las secuencias de las bases de datos.	130
4.3. Comparación de TonB de DOT-T1E con las secuencias de las bases de datos.	135
5. ORGANIZACIÓN DE LOS GENES <i>exbB</i> , <i>exbD</i> Y <i>tonB</i> EN <i>P. putida</i> DOT-T1E.	140
6. CARACTERIZACIÓN FISIOLÓGICA DEL MUTANTE PhoA5.	143
6.1. Fuentes de carbono utilizadas por PhoA5.	143
6.2. Tolerancia de PhoA5 a tóxicos.	145
6.2.1. Tolerancia del mutante PhoA5 a PHBA.	145
6.2.2. Tolerancia de PhoA5 a alquilparabenos.	147
6.2.3. Tolerancia de PhoA5 a ácidos carboxílicos aromáticos.	148
6.2.4. Tolerancia de PhoA5 a disolventes orgánicos.	149
6.2.5. Sensibilidad de PhoA5 a antibióticos.	152
6.2.6. Tolerancia de PhoA5 a aminoácidos aromáticos.	152
6.3. Integridad de la envuelta celular de PhoA5.	153
6.3.1. Análisis de la morfología y estructura celular en presencia de PHBA.	153

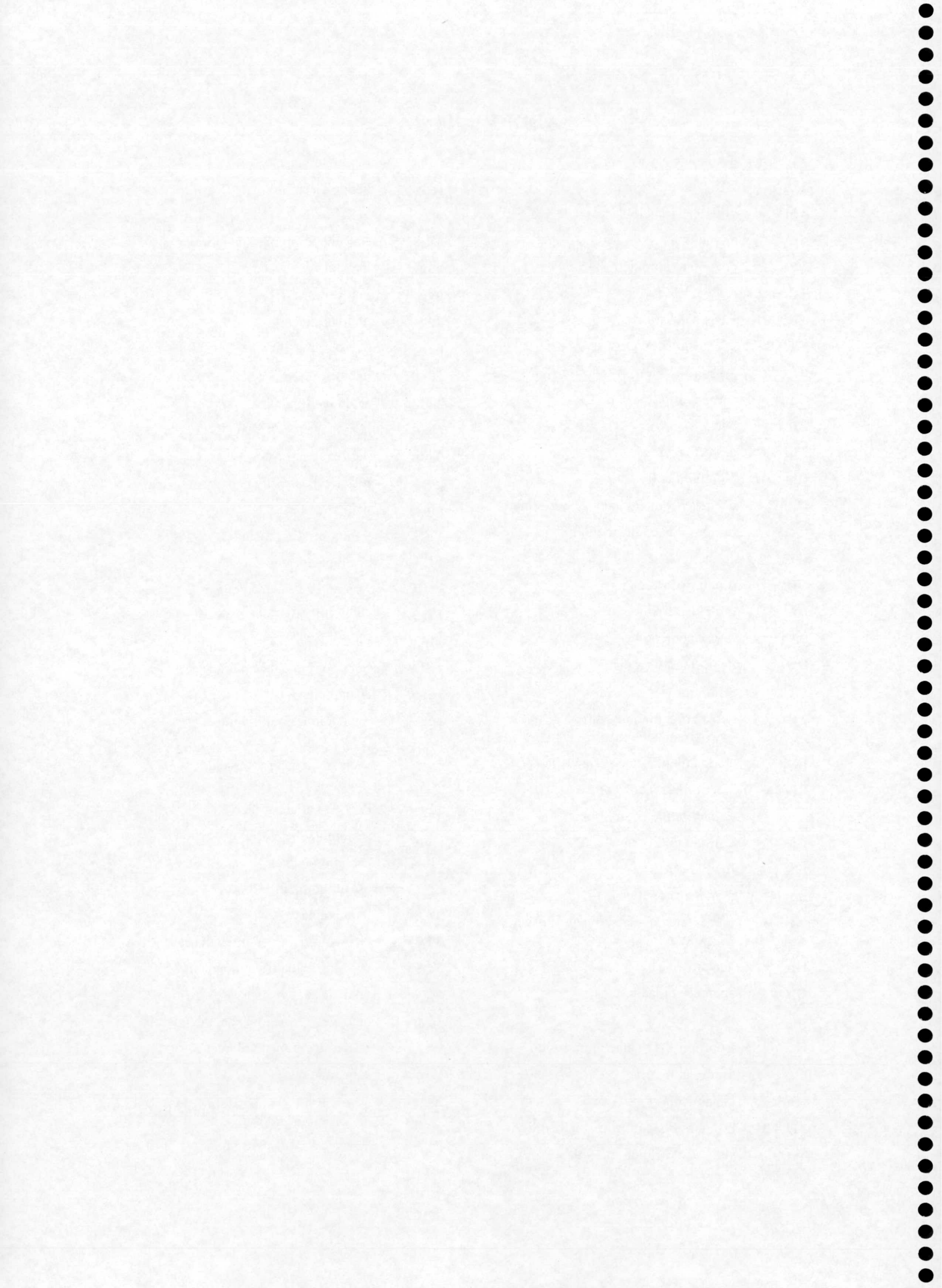
6.3.2. Liberación de enzimas periplásmicos al medio extracelular.	156
6.3.3. Funcionamiento de las bombas de eflujo. Acumulación de [¹⁴ C]-tolueno y [¹⁴ C]-PHBA.	157
7. COMPLEMENTACIÓN POR HIERRO DEL FENOTIPO PLEIOTRÓPICO DEL MUTANTE PhoA5.	160
7.1. Efecto del hierro sobre la tolerancia a PHBA y el crecimiento en dicha fuente de carbono.	161
7.2. Tolerancia a un choque de PHBA.	163
7.3. Efecto de un quelante de hierro sobre el crecimiento.	164
7.4. Expresión del operón <i>exbBDtonB</i> en el mutante PhoA5.	165
7.5. Tolerancia a tolueno.	166
8. COMPLEMENTACIÓN DE LA MUTACIÓN DE <i>P. putida</i> PhoA5 POR LA REGIÓN <i>exbBDtonB</i> SILVESTRE.	167
9. EFECTO DE UN INCREMENTO DE LA EXPRESIÓN DE LOS GENES <i>exbBDtonB</i> SOBRE LA TOLERANCIA A PHBA.	169
10. HACIA LA IDENTIFICACIÓN DE OTROS GENES IMPLICADOS EN LA TOLERANCIA A PHBA DE <i>P. putida</i> DOT-T1E.	172
Capítulo 3: CONSTRUCCIÓN Y CARACTERIZACIÓN FISIOLÓGICA DE LOS MUTANTES EXBB, EXBD Y TONB DE <i>Pseudomonas putida</i> DOT-T1E.	177
RESUMEN	177
1. CONSTRUCCIÓN DE MUTANTES NO POLARES EN LOS GENES <i>exbB</i> , <i>exbD</i> Y <i>tonB</i> DE <i>P. putida</i> DOT-T1E.	178
2. CARACTERIZACIÓN FISIOLÓGICA Y MORFOLÓGICA DE LOS MUTANTES <i>exbB</i> , <i>exbD</i> Y <i>tonB</i> DE <i>P. putida</i> DOT-T1E.	190
2.1. Crecimiento de los mutantes en medio sólido.	190
2.2. Crecimiento de los mutantes en medio líquido.	191
2.3. Susceptibilidad a antibióticos.	191
2.4. Tolerancia a PHBA.	192
2.5. Tolerancia a un choque de tolueno.	193
2.6. Liberación de enzimas periplásmicos al medio extracelular.	194
3. COMPLEMENTACIÓN DE LAS MUTACIONES DE <i>P. putida</i> DOT-T1E <i>exbB</i> , DOT-T1E <i>exbD</i> Y DOT-T1E <i>tonB</i> POR EL PLÁSMIDO QUE PORTA LOS GENES SILVESTRES.	196
DISCUSIÓN	199

1. FACTORES QUE INFLUYEN EN LA TOLERANCIA DE PHBA EN <i>P. putida</i> DOT-T1E.	202
1.1. Efecto de un suplemento de cationes Mg ²⁺ .	202
1.2. Efecto de la exposición a bajas concentraciones de PHBA.	204
1.2.1. Rol del mecanismo de isomerización <i>cis/trans</i> .	205
1.2.2. Posible sistema de exclusión activo de de PHBA.	206
1.3. Efecto del transporte de PHBA.	207
2. LA TOLERANCIA A PHBA EN <i>P. putida</i> DOT-T1E ES INDUCIDA POR EL PROPIO PHBA.	208
3. EL GEN MUTADO EN LA CEPA PhoA5 SENSIBLE A PHBA CODIFICA LA PROTEÍNA ExbD.	210
4. EL GEN <i>exbD</i> DE <i>P. putida</i> DOT-T1E FORMA PARTE DEL SISTEMA TONB.	210
5. ORGANIZACIÓN GÉNICA DEL SISTEMA TONB DE DISTINTOS MICROORGANISMOS.	216
6. POSIBLES FUNCIONES DEL SISTEMA TONB EN <i>P. putida</i> DOT-T1E.	220
7. PAPEL DEL PHBA COMO AGENTE QUELANTE DE HIERRO.	225
8. COMPARACIÓN FENOTÍPICA DEL MUTANTE POLAR EN <i>exbD</i> PhoA5 Y DE LOS MUTANTES NO POLARES EN LOS GENES <i>exbB</i> , <i>exbD</i> Y <i>tonB</i> DE <i>P. putida</i> DOT-T1E.	229
CONCLUSIONES	233
BIBLIOGRAFÍA	239



ABREVIATURAS

ADNasa	desoxinucleasa	LB	Luria-Bertani
ADNc	ADNcomplementario	LPS	lipopolisacárido
AMV	virus de la mieloblastosis de ave	mg	miligramo(s)
Ap	ampicilina	MIC	concentración mínima inhibitoria
APS	persulfato amónico	min	minuto(s)
ARNasa	ribonucleasa	ml	mililitro(s)
ARNm	ARN mensajero	mm	milimetro(s)
ATP	adenosin trifosfato	µg	microgramos(s)
BCIP	5-bromo-4-cloro-3-indolilfosfato	µl	microlitro(s)
Cb	carbenicilina	Nal	ácido nalidíxico
Ci	curio	Neo	neomicina
Cip	ciprofloxacina	Nor	norfloxacina
Cm	cloranfenicol	p/v	relación peso/volumen
CPM	cuentas/desintegraciones por minuto	pb	par(es) de bases
CTAB	bromuro de cetiltrimetilamonio	PBS	Tampón salino fosfato
CTX	cefotaxina	PCA	ácido protocatecoico
DEPC	dietilpirocarbonato	PCR	reacción en cadena de la polimerasa
DMSO	dimetilsulfóxido	PHBA	ácido p-hidroxibenzoico
dNTPs	desoxinucleótidos	Pip	piperacilina
DO₆₆₀	densidad óptica medida a $\lambda=660$ nm	PSI	libra por pulgada cuadrada
DTT	ditiotreitól	Rif	rifampicina
EDDHA	ácido etilendiamino-di(<i>o</i> -hidroxifenilacético)	rpm	revoluciones por minuto
EDTA	ácido etilendiaminotetraacético	RT-PCR	reacción en cadena de la polimerasa acoplada a una reacción de transcripción reversa
EGPA-	electroforesis en gel de	SDS	dodecil sulfato sódico
SDS	poliacrilamida con SDS	seg	segundo(s)
E	eritromicina	Sm	estreptomina
Fig.	figura	Sp	espectinomicina
f.p.m.	fuerza protón motriz	Tc	tetraciclina
% G+C	porcentaje de guanina más citosina de un ácido nucleico	TEMED	N,N,N,N-tetrametiletildiamina
Gm	gentamicina	Tris	tris(hidroximetil)aminometano
H₂Od	agua desionizada	U	unidades enzimáticas
Imp	imipenem	UFC	unidades formadoras de colonias
IPTG	isopropil- β -D-galactopiranosido	v/v	relación volumen/volumen
kb	kilobase(s)	Van	vancomicina
Km	kanamicina	X-gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido
MATAB	bromuro de alquiltrimetilamonio		
MCS	sitio de clonación múltiple		



ÍNDICE DE FIGURAS

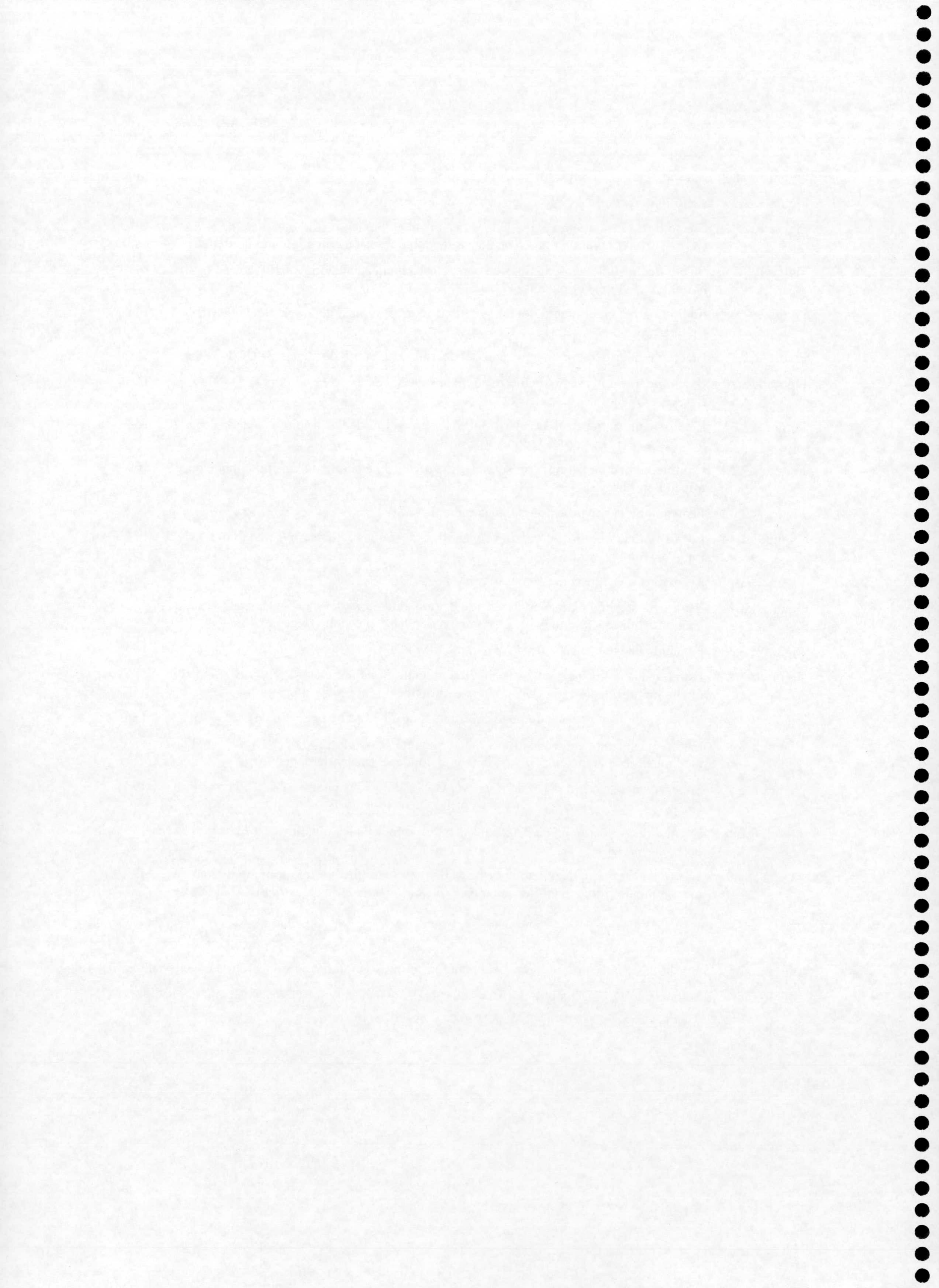
Figura I.1	Representación esquemática de la estructura de la envoltura celular de las bacterias gram-negativas.	4
Figura I.2	Transición de fase de una bicapa lipídica.	8
Figura I.3	Localización de distintos disolventes en una bicapa de fosfolípidos.	11
Figura I.4	Efecto de la isomerización <i>cis/trans</i> en la estructura de la membrana.	13
Figura I.5	Representación esquemática de la bomba TtgABC de <i>P. putida</i> DOT-T1E.	14
Figura I.6	Ruta <i>tmo</i> de degradación de tolueno por parte de la cepa <i>P. mendocina</i> KR1.	17
Figura I.7	Ruta del β -cetoadipato en <i>P. putida</i>	19
Figura I.8	Esquema de distintas rutas de degradación de compuestos aromáticos que confluyen en protocatecuato.	21
Figura I.9	Estructuras de varios sideróforos encontrados en bacterias.	25
Figura I.10	Modelo de transducción de energía dependiente de TonB.	31
Figura M.1	Mapa del transposón mini-Tn5 <i>phoA</i> .	65
Figura R.1.1	Esquema de las distintas rutas de degradación catabólica de tolueno en <i>Pseudomonas</i> .	84
Figura R.1.2	Efecto de la concentración de <i>p</i> -cresol sobre el crecimiento de <i>P. putida</i> DOT-T1E.	87
Figura R.1.3	Efecto de la concentración de <i>m</i> -cresol sobre el crecimiento de <i>P. putida</i> DOT-T1E.	88
Figura R.1.4	Efecto de la concentración de alcohol bencílico sobre el crecimiento de <i>P. putida</i> DOT-T1E.	89
Figura R.1.5	Efecto de la concentración de aldehído <i>p</i> -hidroxibencílico sobre el crecimiento de <i>P. putida</i> DOT-T1E.	90
Figura R.1.6	Efecto de la concentración de PHBA sobre el crecimiento de <i>P. putida</i> DOT-T1E.	90
Figura R.1.7	Efecto del PHBA sobre la falta de correlación entre el número de UFC/ml y la turbidez de un cultivo de <i>P. putida</i> DOT-T1E.	93
Figura R.1.8	Efecto de altas concentraciones de PHBA sobre la supervivencia de la cepa <i>P. putida</i> DOT-T1E.	94
Figura R.1.9	Alivio por cationes Mg^{2+} del efecto inhibitorio que el <i>p</i> -cresol ejerce sobre el crecimiento de <i>P. putida</i> DOT-T1E.	95
Figura R.1.10	Alivio por cationes Mg^{2+} del efecto inhibitorio que el alcohol <i>p</i> -hidroxibencílico ejerce sobre el crecimiento de <i>P. putida</i> DOT-T1E.	95
Figura R.1.11	Alivio por cationes Mg^{2+} del efecto inhibitorio que el aldehído <i>p</i> -hidroxibencílico ejerce sobre el crecimiento de <i>P. putida</i> DOT-T1E.	96
Figura R.1.12	Alivio por cationes Mg^{2+} del efecto inhibitorio que el PHBA ejerce sobre el crecimiento de <i>P. putida</i> DOT-T1E.	96
Figura R.1.13	Efecto de preincubar en PHBA sobre la tolerancia a este compuesto de la cepa <i>P. putida</i> DOT-T1E.	98
Figura R.1.14	Supervivencia de células de <i>P. putida</i> DOT-T1E, cultivadas en PHBA como única fuente de carbono, a un choque de concentraciones crecientes del mismo compuesto.	100
Figura R.1.15	Efecto del tiempo de exposición a PHBA sobre la adaptación de <i>P. putida</i> DOT-T1E a este compuesto.	101

Índice de Figuras

Figura R.1.16	Efecto conjunto de los iones Mg^{2+} y de la adaptación a PHBA sobre la tolerancia de <i>P. putida</i> DOT-T1E a un choque de PHBA.	102
Figura R.1.17	Generación de protocatecuato a partir de ácidos carboxílicos hidroxilados.	103
Figura R.1.18	Crecimiento de <i>P. putida</i> DOT-T1E en presencia de distintos precursores de PCA como única fuente de carbono y energía.	104
Figura R.1.19	Respuesta de células de <i>P. putida</i> DOT-T1E incubadas en presencia de ácidos carboxílicos aromáticos a un choque de PHBA.	105
Figura R.1.20	Composición en ácidos grasos de los fosfolípidos de <i>P. putida</i> DOT-T1E a lo largo de la curva de crecimiento en medio líquido LB.	106
Figura R.2.1	Mapa del inserto del plásmido pPAT2.	114
Figura R.2.2	Hibridación de <i>P. putida</i> DOT-T1E con la región que contiene <i>exbD</i> de pPAT2.	115
Figura R.2.3	Mapa del inserto del plásmido pPAT5.	116
Figura R.2.4	Secuencia de ADN y aminoacídica correspondiente a la región donde se insertó el transposón mini-Tn5 <i>phoAKm</i> en el mutante PhoA5.	116
Figura R.2.5	Perfil de hidropatía de ExbB.	120
Figura R.2.6	Estructura primaria del péptido señal hipotético en la región amino terminal de ExbB de <i>P. putida</i> DOT-T1E.	120
Figura R.2.7	Perfil de hidropatía de ExbD.	121
Figura R.2.8	Perfil de hidropatía de TonB.	122
Figura R.2.9	Estructura primaria del péptido señal predicho en la región amino terminal de TonB de <i>P. putida</i> DOT-T1E.	122
Figura R.2.10	Alineamiento múltiple de ExbB de <i>P. putida</i> DOT-T1E con otras proteínas ExbB.	127
Figura R.2.11	Alineamiento múltiple de proteínas ExbB con proteínas TolQ de distintas bacterias gram-negativas.	129
Figura R.2.12	Alineamiento múltiple de ExbD de <i>P. putida</i> DOT-T1E con otras proteínas ExbD.	133
Figura R.2.13	Alineamiento múltiple de proteínas ExbD con proteínas TolR de distintas bacterias gram-negativas.	135
Figura R.2.14	Alineamiento múltiple de TonB de <i>P. putida</i> DOT-T1E con otras proteínas TonB.	137
Figura R.2.15	Determinación del número de copias de los genes <i>exbB</i> , <i>exbD</i> y <i>tonB</i> de la cepa <i>P. putida</i> DOT-T1E por hibridación de ADN.	140
Figura R.2.16	Análisis mediante RT-PCR de los transcritos de los genes <i>exbB</i> , <i>exbD</i> y <i>tonB</i> de <i>P. putida</i> DOT-T1E.	142
Figura R.2.17	Crecimiento de <i>P. putida</i> DOT-T1E y PhoA5 en medio mínimo con PHBA como fuente de carbono.	145
Figura R.2.18	Tolerancia de <i>P. putida</i> DOT-T1E y el mutante PhoA5 a PHBA en placas de doble difusión en gradiente.	146
Figura R.2.19	Tolerancia de <i>P. putida</i> DOT-T1E y el mutante PhoA5 a un choque de PHBA.	147
Figura R.2.20	Respuesta a corto plazo de <i>P. putida</i> DOT-T1E y PhoA5 a un choque de tolueno.	151
Figura R.2.21	<i>P. putida</i> DOT-T1E y PhoA5 al microscopio electrónico de barrido.	154
Figura R.2.22	<i>P. putida</i> DOT-T1E y PhoA5 al microscopio electrónico de transmisión.	155
Figura R.2.23	Electroforesis de proteínas procedentes de sobrenadantes de cultivos de las cepas <i>P. putida</i> DOT-T1E y el mutante PhoA5.	157

Figura R.2.24	Acumulación de [¹⁴ C]-tolueno en <i>P. putida</i> .	159
Figura R.2.25	Acumulación de [¹⁴ C]-PHBA en células de <i>P. putida</i> .	160
Figura R.2.26	Efecto de un suplemento extra de hierro sobre el crecimiento y la tolerancia de <i>P. putida</i> DOT-T1E y el mutante PhoA5 en placas de doble difusión con gradiente de PHBA.	162
Figura R.2.27	Efecto de un suplemento de hierro sobre la tolerancia a un choque de PHBA en <i>P. putida</i> DOT-T1E y el mutante PhoA5.	163
Figura R.2.28	Inhibición del crecimiento del mutante PhoA5 en presencia del quelante de hierro EDDHA.	164
Figura R.2.29	Efecto del hierro sobre la expresión del operón <i>exbBDtonB</i> de <i>P. putida</i> DOT-T1E.	165
Figura R.2.30	Efecto de un suplemento de hierro sobre la supervivencia de <i>P. putida</i> DOT-T1E y PhoA5 a un choque de tolueno.	166
Figura R.2.31	Efecto de un suplemento de hierro sobre la susceptibilidad a antibióticos de las cepas <i>P. putida</i> DOT-T1E, PhoA5 y PhoA5(pPAT7).	168
Figura R.2.32	Complementación parcial por los genes <i>exbBDtonB</i> de la tolerancia a un choque por tolueno en PhoA5.	169
Figura R.2.33	Esquema de la construcción del plásmido pPAT11.	172
Figura R.2.34	Localización del mini-Tn5' <i>phoA5Km</i> en PhoA5 y en las cepas supresoras PhoA5-S1, PhoA5-S2 y PhoA5-S3.	174
Figura R.3.1	Esquema de la construcción del plásmido pPAT26.	179
Figura R.3.2	Estrategia seguida para la construcción del mutante <i>P. putida</i> DOT-T1E <i>exbB</i> y análisis mediante hibridación de ADN de la región donde se encuentra el gen <i>exbB</i> .	181
Figura R.3.3	Esquema de la construcción del plásmido pPAT28.	183
Figura R.3.4	Estrategia seguida en la construcción del mutante <i>P. putida</i> DOT-T1E <i>tonB</i> y análisis mediante hibridación de ADN de la región donde se encuentra el gen <i>tonB</i> .	185
Figura R.3.5	Esquema de la construcción de los plásmidos pPAT22 (A) y pPAT24 (B).	186
Figura R.3.6	Estrategia seguida en la construcción del mutante <i>P. putida</i> DOT-T1E <i>exbD</i> y análisis mediante hibridación de ADN de la región donde se encuentra el gen <i>exbD</i> .	189
Figura R.3.7	Supervivencia a corto plazo de <i>P. putida</i> DOT-T1E y los mutantes DOT-T1E <i>exbB</i> , DOT-T1E <i>exbD</i> y DOT-T1E <i>tonB</i> a un choque de tolueno.	193
Figura R.3.8	Estudio de la liberación de β-lactamasa periplásmica en los mutantes <i>exbB</i> , <i>exbD</i> y <i>tonB</i> de <i>P. putida</i> DOT-T1E.	195
Figura R.3.9	Efecto de la complementación por los genes <i>exbBDtonB</i> silvestres sobre la tolerancia a un choque por tolueno en los mutantes <i>exbB</i> , <i>exbD</i> y <i>tonB</i> de <i>P. putida</i> DOT-T1E.	197

En la nomenclatura de las Figuras se utilizó el siguiente criterio: Sección (I, Introducción; M, Materiales y Métodos; R, Resultados, o D, Discusión)- N° Capítulo (1, 2 ó 3)- N° Figura (1,2,...). Ejemplo: La Figura R.2.3, corresponde a la Figura 3 del Capítulo 2 de la sección de *Resultados*.



ÍNDICE DE TABLAS

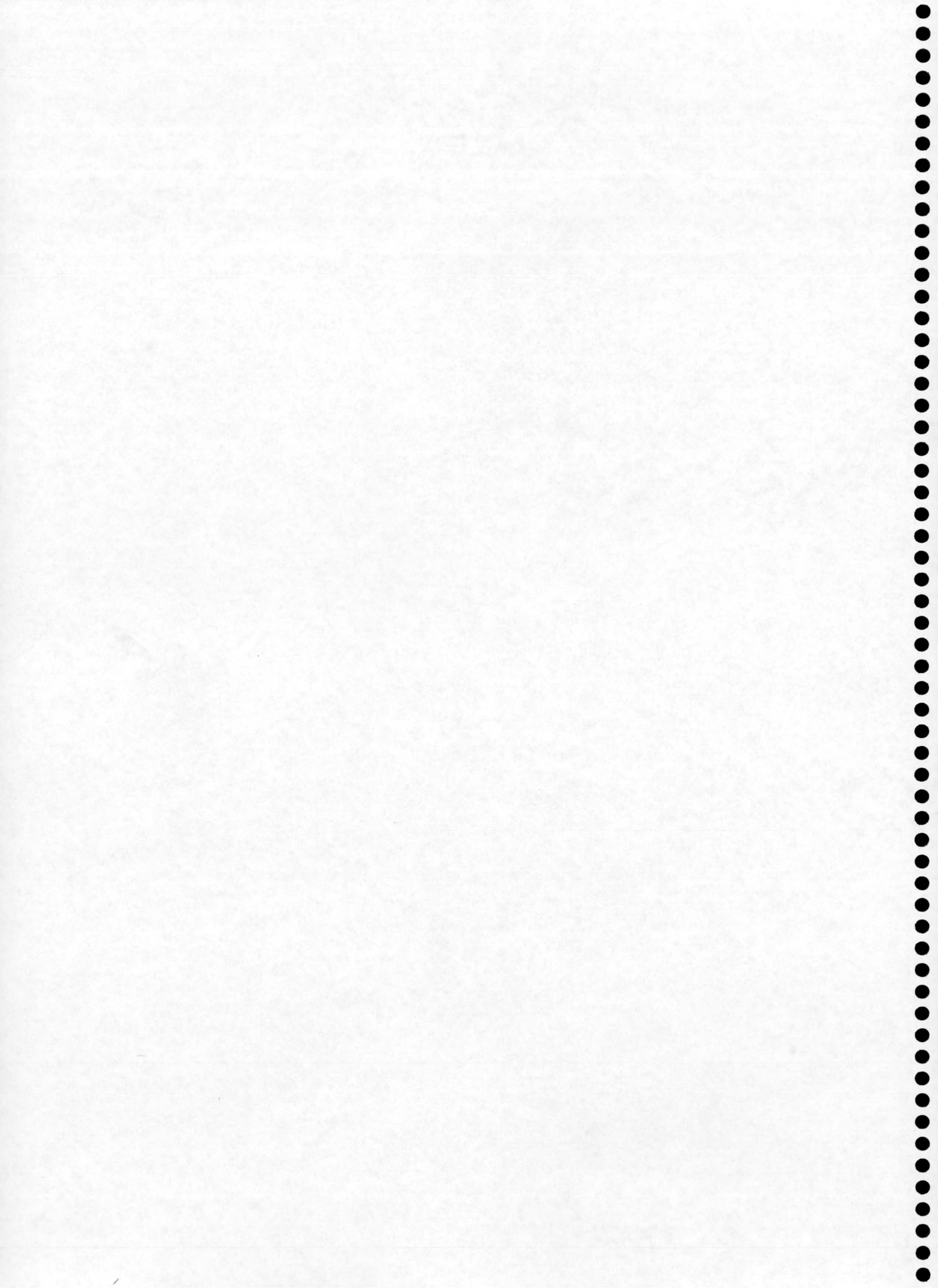
Tabla I.1	Componentes del sistema ABC de transporte de algunos ferrisideróforos.	36
Tabla M.1	Cepas bacterianas utilizadas en este trabajo.	49
Tabla M.2	Plásmidos utilizados en este trabajo.	60
Tabla M.3	Direcciones de Internet con programas de herramientas para el análisis de secuencias.	79
Tabla R.1.1	Tolerancia de <i>P. putida</i> DOT-T1E a compuestos aromáticos resultantes de la oxidación aeróbica del tolueno a través de diferentes rutas.	85
Tabla R.1.2	Tiempo de generación de células de <i>P. putida</i> DOT-T1E en medio mínimo M9-glucosa en presencia de compuestos aromáticos hidroxilados.	86
Tabla R.1.3	Supervivencia de <i>P. putida</i> DOT-T1E en concentraciones crecientes de PHBA tras una incubación de 50 horas.	91
Tabla R.1.4	Composición en ácidos grasos de los fosfolípidos de células de <i>P. putida</i> DOT-T1E cultivadas en medio mínimo M9 con glucosa y en presencia de <i>p</i> -cresol.	108
Tabla R.1.5	Composición en ácidos grasos de los fosfolípidos de células de <i>P. putida</i> DOT-T1E cultivadas en medio mínimo M9 con glucosa en presencia de alcohol <i>p</i> -hidroxibencílico.	108
Tabla R.1.6	Composición en ácidos grasos de los fosfolípidos de células de <i>P. putida</i> DOT-T1E cultivadas en medio mínimo M9 con glucosa en presencia de aldehído <i>p</i> -hidroxibencílico.	109
Tabla R.1.7	Composición en ácidos grasos de los fosfolípidos de células de <i>P. putida</i> DOT-T1E cultivadas en medio mínimo M9 con glucosa en presencia de PHBA.	110
Tabla R.1.8	Composición en ácidos grasos de los fosfolípidos de células de <i>P. putida</i> DOT-T1E en fase exponencial cultivadas en medio mínimo M9 con glucosa y el compuesto aromático hidroxilado indicado.	111
Tabla R.1.9	Acumulación de [¹⁴ C]-PHBA en <i>P. putida</i> DOT-T1E.	112
Tabla R.2.1	Proteínas homólogas a ExbB de <i>P. putida</i> DOT-T1E.	123
Tabla R.2.2	Proteínas homólogas a ExbD de <i>P. putida</i> DOT-T1E.	131
Tabla R.2.3	Proteínas homólogas a TonB de <i>P. putida</i> DOT-T1E.	136
Tabla R.2.4	Oligonucleótidos empleados en la obtención de sondas específicas para los genes <i>exbB</i> , <i>exbD</i> y <i>tonB</i> de <i>P. putida</i> DOT-T1E.	141
Tabla R.2.5	Tiempo de generación de <i>P. putida</i> DOT-T1E y PhoA5 en medio mínimo M9 con diferentes fuentes de carbono.	144
Tabla R.2.6	Tolerancia a alquilparabenos de <i>P. putida</i> DOT-T1E y PhoA5.	148
Tabla R.2.7	Tolerancia de <i>P. putida</i> DOT-T1E y PhoA5 a ácidos carboxílicos aromáticos.	148
Tabla R.2.8	Tolerancia de <i>P. putida</i> DOT-T1E y PhoA5 a distintos disolventes orgánicos.	150
Tabla R.2.9	Patrón de resistencia a antibióticos de <i>P. putida</i> DOT-T1E y PhoA5.	152
Tabla R.2.10	Tolerancia a aminoácidos aromáticos de <i>P. putida</i> DOT-T1E y PhoA5.	153
Tabla R.2.11	Efecto de un suplemento de hierro sobre el uso de PHBA como fuente de carbono.	162

Índice de Tablas

Tabla R.2.12	Efecto del número de copias del cluster <i>exbBDtonB</i> sobre la tolerancia a PHBA en <i>Pseudomonas</i> .	170
Tabla R.2.13	Caracterización fisiológica de las cepas supresoras PhoA5-S1, PhoA5-S2 y PhoA5-S3.	174
Tabla R.2.14	Oligonucleótidos empleados en la caracterización de los genes <i>tolQ</i> y <i>tolR</i> y de la región aguas abajo del minitransposón en las cepas supresoras.	175
Tabla R.3.1	Tiempo de generación de los mutantes <i>exbB</i> , <i>exbD</i> y <i>tonB</i> de <i>P. putida</i> DOT-T1E.	191
Tabla R.3.2	Inhibición del crecimiento de los mutantes <i>exbB</i> , <i>exbD</i> y <i>tonB</i> de <i>P. putida</i> DOT-T1E ejercida por antibióticos.	192
Tabla R.3.3	Tolerancia a PHBA de los mutantes <i>exbBDtonB</i> de <i>P. putida</i> DOT-T1E en placas de gradiente.	192

En la nomenclatura de las Tablas se utilizó el siguiente criterio: Sección (I, Introducción; M, Materiales y Métodos; R, Resultados, o D, Discusión)- N° Capítulo (1, 2 ó 3)- N° Tabla (1,2,...). Ejemplo: La Tabla R.2.3, corresponde a la Tabla 3 del Capítulo 2 de la sección de *Resultados*.

INTRODUCCIÓN



INTRODUCCIÓN

Existe una creciente preocupación respecto a los efectos tóxicos de ciertos compuestos químicos, sobretodo los de naturaleza aromática, que alcanzan el medio ambiente como consecuencia de una alta producción industrial. La razón estriba en que dichos compuestos se embeben en las membranas celulares, alterando su integridad y originando la pérdida de sus propiedades físico-químicas y biológicas. Las principales consecuencias de esta desorganización son la pérdida de iones, proteínas, lípidos y otros metabolitos, la pérdida del gradiente de pH con la consiguiente disipación del potencial de membrana, o la inhibición de funciones de proteínas de membrana (de Smet *et al.*, 1978; Sikkema *et al.*, 1992, 1994a, 1994b y 1995). Estos daños generalizados conducen a la lisis y, en último término, a la muerte celular.

Se ha considerado de gran interés el desarrollo de tratamientos biológicos de zonas contaminadas con altas concentraciones de compuestos aromáticos. A pesar de la toxicidad intrínseca de estos compuestos, mediante enriquecimientos bacterianos a concentraciones subletales de estos tóxicos, se ha conseguido aislar microorganismos aeróbicos capaces de tolerar altas concentraciones de tolueno, estireno y *p*-xileno, así como, en algunos casos, utilizar dichos compuestos como única fuente de carbono (Inoue y Horikoshi, 1989; Cruden *et al.*, 1992; Weber *et al.*, 1993; Ramos *et al.*, 1995; Li *et al.*, 1998). Una hipótesis que puede explicar la amplia distribución de microorganismos capaces de degradar compuestos aromáticos sería el hecho de que, durante millones de años, los microorganismos han estado expuestos a bajas concentraciones de estos compuestos, que se formaron durante procesos naturales tales como la combustión de maderas (Gibson y Subramanian, 1984; Ramos y Rojo, 1990). Como consecuencia del uso industrial masivo de disolventes orgánicos y de vertidos accidentales, se han generado zonas que contienen compuestos aromáticos monocíclicos en cantidades muy por encima de sus niveles de toxicidad para procesos vitales, lo cual impide la colonización de estos lugares por parte de microorganismos biodegradadores. Con estos antecedentes, la viabilidad y el consiguiente éxito del uso de microorganismos en la descontaminación de estas áreas dependen de un conocimiento exhaustivo previo de las bases moleculares de la tolerancia a estos compuestos aromáticos.

1. LA ENVOLTURA CELULAR DE LAS BACTERIAS GRAM-NEGATIVAS.

Las eubacterias se clasifican en dos grandes grupos de organismos: las bacterias gram-positivas y las gram-negativas, que se diferencian fundamentalmente en los componentes de la envoltura celular. La membrana citoplasmática de bacterias gram-positivas está rodeada de una gruesa pared de mureína y de una fina capa de ácido teicoico (Beveridge, 1981); mientras que las bacterias gram-negativas presentan una capa muy delgada de mureína rodeando la membrana citoplasmática, así como una membrana externa. Entre las membranas externa y citoplasmática o interna se encuentra el espacio periplásmico (ver **Figura I.1**).

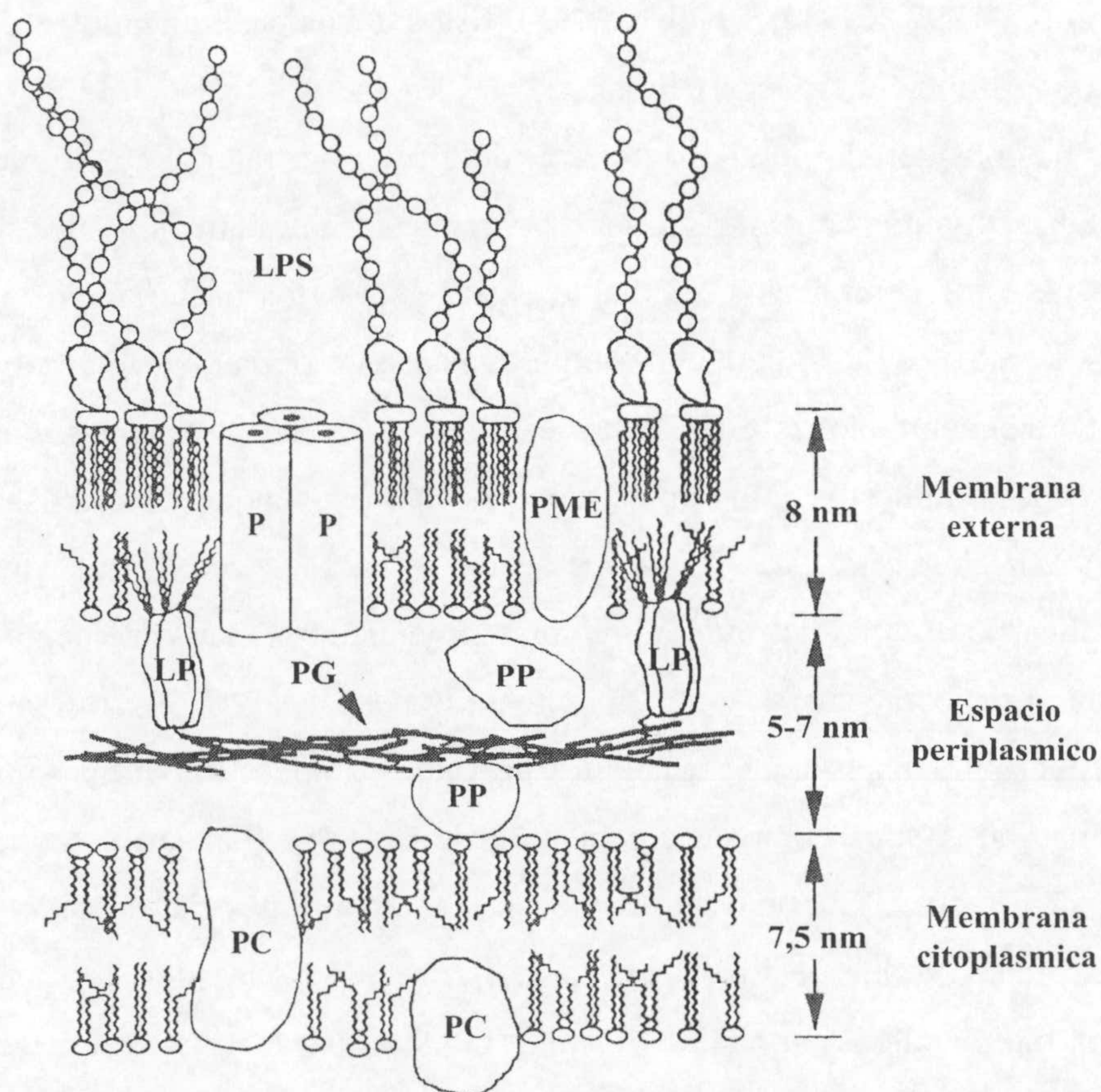


Figura I.1. Representación esquemática de la estructura de la envoltura celular de las bacterias gram-negativas. Abreviaturas: LP, lipoproteína; LPS, lipopolisacárido; P, porina; PC, proteína citoplásmica; PG, peptidoglicano; PME, proteína de membrana externa; PP, proteína periplásmica. (Figura adaptada de Cronan y Rock, 1996; Nikaido y Vaara, 1985; Oliver, 1987).

A través de estudios comparativos se ha observado que las bacterias gram-negativas son, en general, menos sensibles a disolventes orgánicos que las gram-positivas (Inoue y Horikoshi, 1991; Harrop *et al.*, 1989; Segura *et al.*, 1999a). La mayoría de los microorganismos tolerantes a disolventes orgánicos se caracterizan por ser bacterias gram-negativas, de manera que la membrana citoplasmática podría ser crítica con respecto a la toxicidad a disolventes. Previamente a describir los efectos que ejercen los disolventes sobre las membranas, se hace una breve descripción estructural de la envoltura celular, que actúa de barrera de permeabilidad, regulando el paso de solutos entre la célula y el medio que la rodea (Nikaido, 1999), considerando sus propiedades físico-químicas, así como los parámetros más susceptibles del efecto tóxico de estos compuestos.

1.1. La membrana externa.

La membrana externa de las bacterias gram-negativas se compone de una bicapa asimétrica, cuya cara externa contiene fundamentalmente lipopolisacáridos (LPS) (Mülradt y Golecki, 1975; Nikaido, 1996a), y cuya cara interna está compuesta por fosfolípidos y proteínas de la membrana externa (Lugtenberg y van Alphen, 1983; Rodríguez-Herva y Ramos, 1996).

Las interacciones laterales entre moléculas de LPS son muy fuertes, al menos en presencia de cationes divalentes (Ca^{2+} , Mg^{2+} , etc.) que neutralizan la repulsión electrostática de los LPS entre sí, formando así una red estable sobre la superficie de la membrana externa (Nikaido, 1996a; Takeuchi y Nikaido, 1981). Dicha interacción fuerte, así como las características altamente hidrofílicas de los LPS, contribuyen a la baja permeabilidad de la membrana externa, en particular a moléculas hidrofóbicas (Nikaido y Vaara, 1985; Nikaido, 1996a), que podría contribuir a la resistencia que adquieren los microorganismos gram-negativos a estos solutos (Pinkart *et al.*, 1996; Weber y de Bont, 1996). Sin embargo, un mutante LPS de la cepa tolerante a disolventes *P. putida* DOT-T1E no presenta afectada la tolerancia a disolventes (Junker *et al.*, 2001).

Entre los principales grupos de proteínas de la membrana externa se encuentran porinas de difusión general o canales no específicos, canales de difusión específicos, proteínas receptoras de alta afinidad y lipoproteínas. Estas proteínas pueden encontrarse, bien embebidas por completo en la membrana (ej. porinas) o parcialmente embebidas en la

bicapa lipídica (Nikaido y Rosenberg, 1983; Nikaido y Vaara, 1985). Las moléculas de LPS contribuyen a la estabilización, anclaje y/u orientación de las proteínas de membrana externa. Los canales que forman las porinas confieren a la membrana externa la capacidad de actuar como un tamiz molecular para ciertos solutos, generalmente de pequeño tamaño y de naturaleza hidrofílica o sin carga (ej. compuestos β -lactámicos, aminoglicósidos, cloramfenicol, etc.) (Nikaido y Vaara, 1985; Vaara, 1992), y a su vez provee a la célula de una barrera pasiva a sustancias hidrofóbicas o sustancias hidrofílicas de alto peso molecular (antibióticos hidrofóbicos, enzimas hidrolíticos, detergentes aniónicos y neutros, etc.). Sin embargo, las porinas no constituyen una barrera perfecta frente a compuestos hidrofóbicos, sobretodo si éstos poseen una fracción significativa de formas no cargadas (p.ej algunas tetraciclinas) (Nikaido y Thanassi, 1993; Nikaido, 1994a). En estos casos, los procesos de inactivación o de extrusión activa juegan un papel importante (Nikaido, 1994b).

Otras funciones de la membrana externa son: 1) poseer un cierto papel estructural, influyendo en la forma celular (p.ej. a través de proteínas como OmpA o Lpp); 2) albergar receptores para nutrientes (proteínas receptoras de alta afinidad implicadas en el transporte de complejos hierro-sideróforos y de vitamina B₁₂, etc.), y para la unión de pili conjugativos (OmpA o el LPS); 3) participar en otros procesos que tienen lugar por interacción directa con factores ambientales (proteger contra la acción bactericida del suero, intervenir en la unión bacteriana a superficies bióticas como abióticas, etc.); 4) servir de anclaje a otras estructuras externas (flagelos, capas S, cápsulas, etc.); y 5) secretar ciertas moléculas fuera de la célula a través de rutas específicas (metabolitos secundarios, sideróforos, enzimas, toxinas, moléculas para la construcción de cápsulas celulares, etc.).

1.2. El espacio periplásmico.

El espacio periplásmico, comprendido entre las membranas externa e interna, contiene una capa de peptidoglicano y proteínas. La capa de peptidoglicano confiere estabilidad y forma a las bacterias Gram-negativas (Lazzaroni y Portalier, 1981, 1992; Rodríguez-Herva *et al.*, 1996), y se conecta a las membranas externa e interna a través de lipoproteínas unidas covalentemente y por interacciones iónicas con proteínas propias de dichas membranas (Gotoh *et al.*, 1989; Lazzaroni *et al.*, 1989; Woodruff y Hancock, 1989;

Bouveret *et al.*, 1999). Entre las proteínas periplásmicas se encuentran enzimas detoxificantes que inactivan o modifican moléculas tóxicas (Dillis *et al.*, 1980).

1.3. La membrana citoplasmática.

La membrana citoplasmática o interna se compone de cantidades aproximadamente iguales de fosfolípidos y proteínas, y juega un papel esencial en la estructura y en el funcionamiento celular.

Los fosfolípidos presentes en las membranas externa e interna son iguales y cada molécula de fosfolípido se compone de un grupo de cabeza polar y de dos cadenas acílicas de ácidos grasos. En las bacterias gram-negativas, los tres grupos de cabeza mayoritarios son: fosfatidiletanolamina (70-80%), fosfatidilglicerol (15-20%) y difosfatidilglicerol o cardiolipina (5-10%). Normalmente, los fosfolípidos de la membrana citoplasmática están dispuestos en una bicapa, dentro la cual están embebidas las proteínas de membrana (Cronan y Rock, 1996), aunque se ha descrito la existencia de zonas transitorias y de carácter local desorganizado. La bicapa de fosfolípidos también actúa como una barrera hidrofóbica de baja permeabilidad para la mayoría de moléculas hidrofílicas (Kadner, 1996; Sikkema *et al.*, 1995). Esta función de barrera depende del estado físico de la membrana, que está relacionado con su fluidez (Cronan y Gelmann, 1975; Cronan, 1978).

Las proteínas de la membrana citoplasmática, pese a constituir solamente del 6 al 9% del total de las proteínas celulares (Kadner, 1996), participan en multitud de procesos vitales para la célula, tales como reacciones bioenergéticas (producción de ATP a través de la cadena de transporte electrónico), biosíntesis de los componentes de la membrana interna y de la pared celular (LPS y fosfolípidos), procesos de transporte activo de nutrientes orgánicos e inorgánicos hacia el interior de la célula (permeasas), etc. Existen tres tipos de proteínas, según su localización en la membrana interna: proteínas integrales de membrana, con uno o más segmentos transmembrana; proteínas que se anclan a la membrana a través de un único dominio transmembrana, que presentan dominios que se expanden hacia el periplasma de la célula; y proteínas que se asocian con la membrana interna sólo de manera transitoria. Debido a que muchas proteínas unidas a la membrana requieren de lípidos para ser funcionales, el estado físico de estos lípidos influirá en sus tareas enzimáticas (Gennis y Jonas, 1977; Freedman, 1981; Sandermann, 1983).

En condiciones fisiológicas, las membranas citoplasmáticas están normalmente en un estado de fase líquido-cristalina fluida. El mantenimiento de la correcta fluidez de la membrana es crítico para la mantener la estructura y funcionamiento óptimos de la membrana (Bloom *et al.*, 1991). Para adaptarse a cambios que ocurren en el entorno, como puede ser la temperatura, las células regulan la fluidez de sus membranas, alterando tanto la relación del contenido proteínas/lípidos de la membrana como la composición de ácidos grasos de los fosfolípidos (Rose, 1989; Shinitzky, 1982). De esta forma, la bicapa lipídica, que normalmente se encuentra en una fase fluida líquido cristalina a temperatura fisiológica, puede adquirir un estado de gel sólido cuando la temperatura disminuye. Este proceso se llama transición de fase (Engleman, 1970; Steim *et al.*, 1969) y la temperatura en el punto medio de la transición se denomina temperatura de transición (T_t). Por debajo de la T_t , las cadenas de ácidos grasos de los fosfolípidos tienden a estar en una disposición hexagonal ordenada. Cuando la temperatura aumenta y se ha completado la transición, todas las cadenas de ácidos grasos conforman un estado líquido cristalino desordenado (**Figura I.2**).

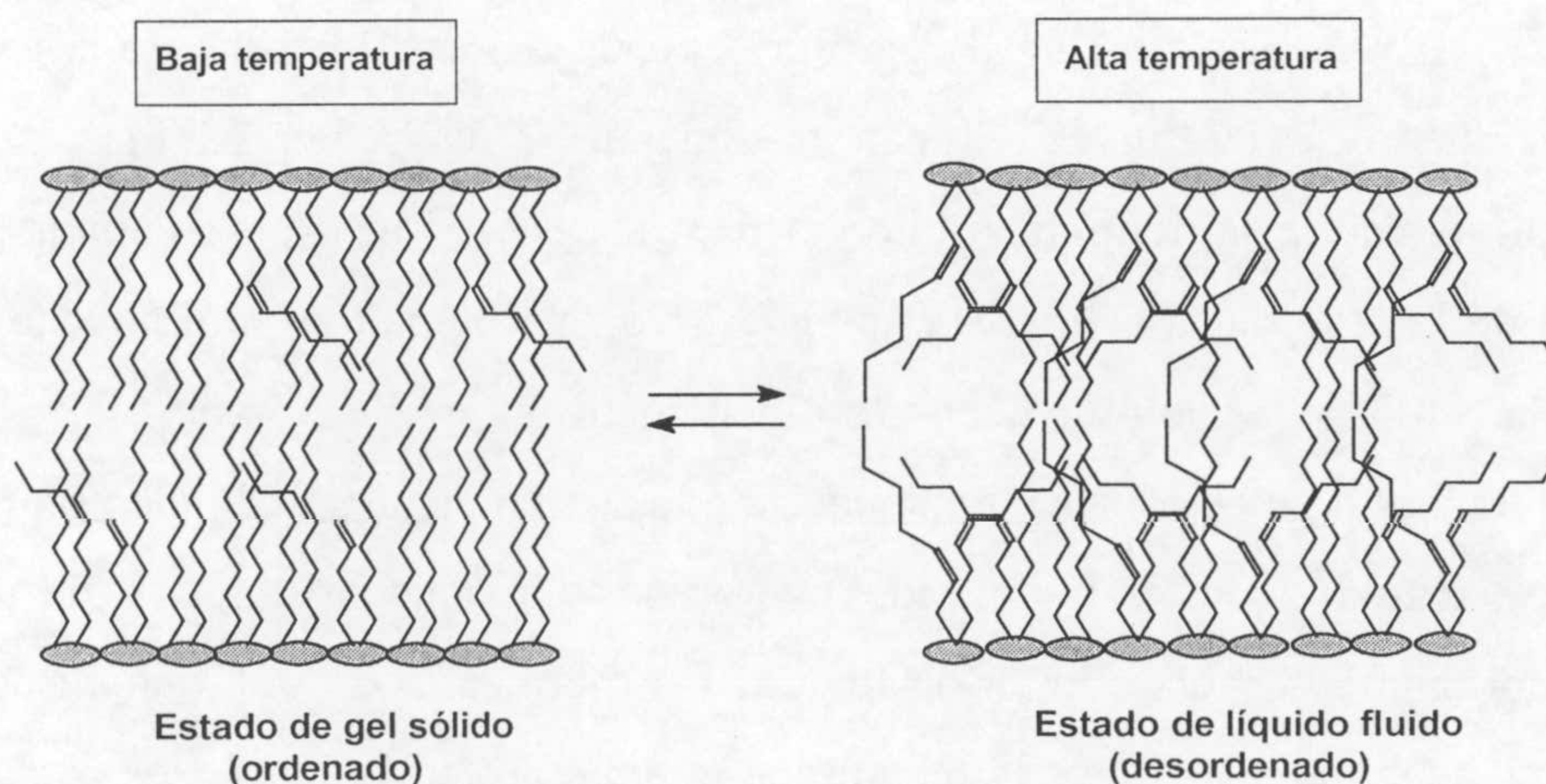


Figura I.2. Transición de fase de una bicapa lipídica. Las elipses sólidas representan los grupos de cabeza polares de los fosfolípidos, y las líneas en forma de zig-zag representan las cadenas acílicas de los ácidos grasos.

La T_t (y por tanto la fluidez lipídica a una temperatura dada) está determinada por la composición de los fosfolípidos, tanto de los ácidos grasos como de los grupos de cabeza

polares. En el caso de los ácidos grasos, la relación entre la composición de los ácidos grasos y la T_t se rige por algunas reglas básicas (de Kruijff *et al.*, 1974; Phillips *et al.*, 1970; Wu y McConnell, 1975): 1) La T_t de lípidos que contienen ácidos grasos saturados es mayor que la T_t de lípidos con ácidos grasos insaturados *cis*. Cuanto mayor es la insaturación de los ácidos grasos, menor es la T_t de los lípidos; 2) la T_t aumenta conforme aumenta la longitud de cadena del ácido graso; 3) los lípidos con ácidos grasos insaturados *trans* tienen una T_t mayor que los lípidos con ácidos grasos insaturados *cis*; 4) el efecto de los ácidos grasos ciclopropano sobre la T_t es similar al ejercido por los ácidos grasos insaturados *cis*. Los efectos de los grupos de cabeza polares de los fosfolípidos sobre la T_t son complejos y no se han encontrado reglas generales.

La mayoría de las bacterias gram-negativas como *E. coli* contienen ácidos grasos relativamente sencillos, predominando el ácido palmítico (C16:0), el ácido *cis*-9-palmitoleico (C16:1,9*cis*) y el ácido *cis*-vaccénico (C18:1,11*cis*) (Raetz, 1978). Cuando cambios en el entorno celular afectan a la fluidez lipídica, las células la restablecen alterando la longitud media de la cadena acílica de los ácidos grasos, así como el grado de insaturación de los mismos. Un ejemplo bien conocido es la adaptación termal en las bacterias (Marr e Ingraham, 1962). En respuesta a un descenso de temperatura, las células disminuyen la cantidad de ácido graso saturado C16:0 e incrementan la cantidad de ácido graso insaturado C18:1,11*cis*; de esta forma disminuyen la T_t de los lípidos y se mantiene la fluidez de la membrana a esta nueva temperatura. La longitud media de la cadena acílica y la relación de los ácidos grasos saturados frente a los insaturados son reguladas durante la síntesis de los ácidos grasos y la acilación del glicerol-3-fosfato (Cronan *et al.*, 1987a; Magnuson *et al.*, 1993; Raetz, 1978). Algunas especies bacterianas disponen de una tercera estrategia de regulación de la fluidez lipídica, denominada isomerización *cis/trans* de los ácidos grasos insaturados (Okuyama *et al.*, 1991; Chen *et al.*, 1995, Heipieper *et al.*, 1992; Weber *et al.*, 1994; Ramos *et al.*, 1997), que es independiente de la síntesis *de novo* de los ácidos grasos (Okuyama *et al.*, 1991).

2. EFECTOS NOCIVOS DE LOS DISOLVENTES ORGANICOS SOBRE LAS BACTERIAS.

La toxicidad de un disolvente está directamente relacionada con la lipofilidad del compuesto, que se expresa en términos de $\log P_{OW}$, un valor que define el coeficiente de partición de un compuesto en un sistema bifásico de octanol/agua (Rekker y de Kort, 1979). Los disolventes orgánicos con un valor de $\log P_{OW}$ superior a 4 generalmente no son tóxicos para los microorganismos (Inoue y Horikoshi, 1991; Vermüe *et al.*, 1993). Los compuestos con un valor de $\log P_{OW}$ entre 3,6 y 1,5 son los más tóxicos por acumularse en la membrana citoplasmática, causando los efectos deletereos mencionados anteriormente. En cambio, los compuestos con un valor de $\log P_{OW}$ inferior a 1,5 suelen ser bien tolerados por los microorganismos.

El efecto que pueda provocar un compuesto lipofílico sobre la integridad de la membrana dependerá de la posición donde se acumule dentro de la misma, y esto dependerá de su estructura molecular, de su carácter aromático o no, y de sus distintos sustituyentes (Weber, 1995; Weber y de Bont, 1996). Así, los alcanos, compuestos con valores de $\log P_{OW} > 3$, tienden a embeberse profundamente en la bicapa y a alinearse con las cadenas acílicas de los ácidos grasos de los fosfolípidos (Lohner, 1991; McIntosh *et al.* 1980; Pope y Dubro, 1986). Los alcoholes, que son compuestos más hidrofílicos ($\log P_{OW} < 3$), también alinean su cadena alquílica no polar con las cadenas acílicas de los ácidos grasos de los fosfolípidos, pero simultáneamente el grupo hidroxilo polar interacciona con el área del grupo de cabeza polar del fosfolípido, anclándose en la interfase lípido/agua (Pope y Dubro, 1986; Pringle y Miller, 1979) (ver **Figura I.3**). Otros disolventes orgánicos, como los hidrocarburos cíclicos, dependiendo de su estructura molecular, de su carácter o no aromático, y de diversos sustituyentes, podrán tener diferentes localizaciones dentro de la membrana (Sikkema *et al.*, 1994a). Por ejemplo, el alcohol bencílico es un compuesto anfipático, cuyo grupo hidroxilo interacciona con el grupo de cabeza polar del fosfolípido, mientras que el resto del anillo se orienta hacia las cadenas acílicas (Pope *et al.*, 1986). En el caso del tolueno, éste se localiza entre las cadenas acílicas de los ácidos grasos cerca del grupo de cabeza polar del fosfolípido (Weber, 1995; Weber *et al.*, 1993; Rekkert y De Kort, 1979).

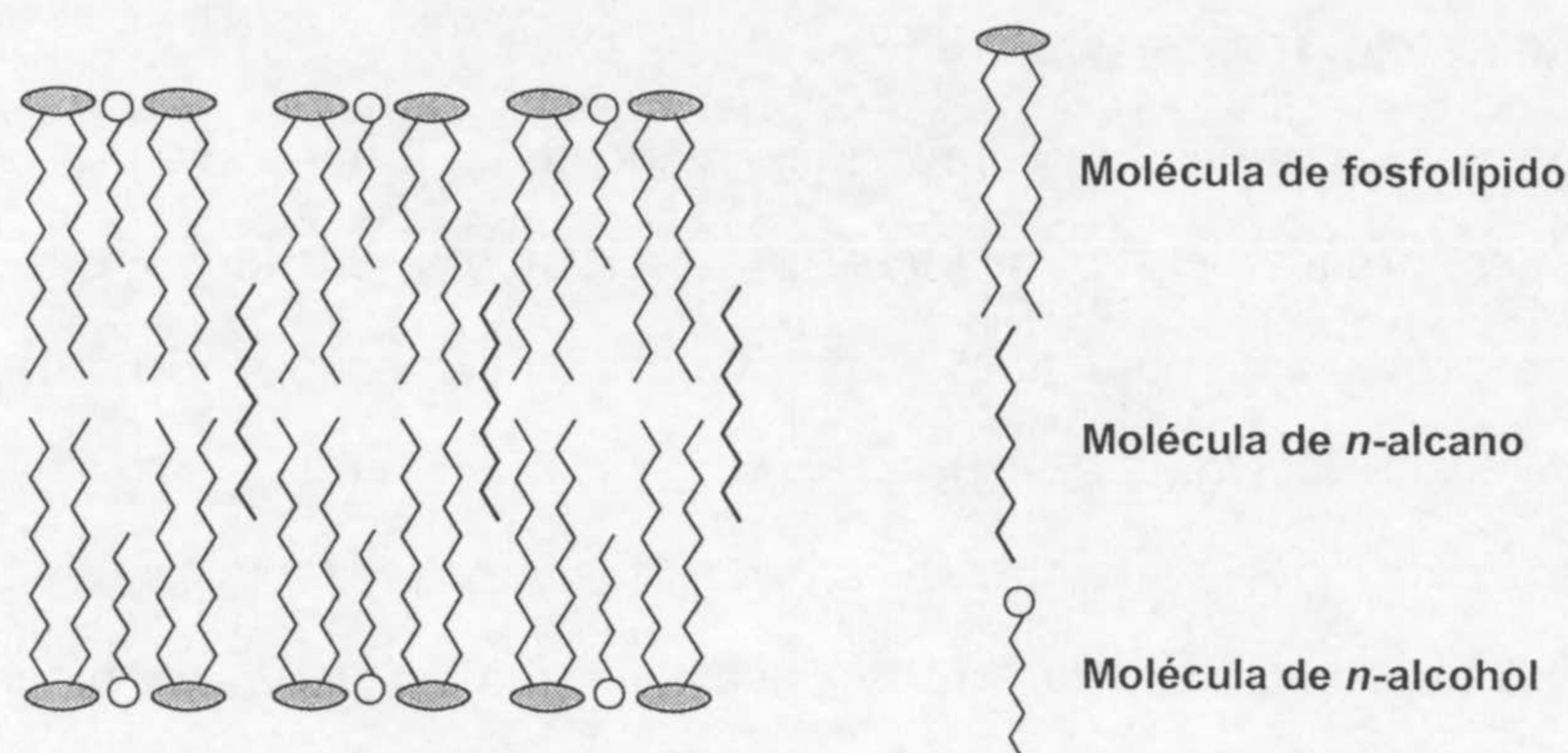


Figura I.3. Localización de distintos disolventes en una bicapa de fosfolípidos.

Independientemente de la estructura molecular y localización dentro de la membrana, las moléculas de disolvente al intercalarse en la membrana afectan a las interacciones de tipo van der Waals que se establecen entre las cadenas acílicas de los ácidos grasos de los fosfolípidos, interrumpiendo la estructura de bicapa a nivel local (Pope y Dubro, 1986; Pringle y Miller, 1979). Esto se traduce en una expansión y un desorden de la membrana (Eliasz *et al.*, 1976), lo cual provoca no sólo entrada indiscriminada de compuestos al citoplasma, sino la liberación de iones y metabolitos esenciales desde el citoplasma celular al medio externo. Este incremento en la permeabilidad de la membrana conduce a un colapso del potencial de membrana, con la consiguiente pérdida en la generación de energía de transducción, inhibiendo así aquellas funciones de la membrana dependientes de energía (Cartwright *et al.*, 1986; Sikkema *et al.*, 1994a).

3. MECANISMOS DE RESISTENCIA DE LAS BACTERIAS FRENTE A DISOLVENTES TOXICOS.

Para contrarrestar el efecto de los disolventes sobre el incremento en la fluidez de la membrana, las bacterias tolerantes a disolventes orgánicos siguen dos estrategias, por un lado, ejercen modificaciones sobre algunos de los componentes estructurales de su envoltura para conseguir una mayor rigidez de la membrana, y por otro, desarrollan mecanismos para prevenir o minimizar la acumulación de disolventes en la célula.

3.1. Adaptaciones a corto y a largo plazo.

Un incremento en el contenido de proteínas respecto a lípidos en presencia de determinados disolventes orgánicos desencadena un incremento en la rigidez de las membranas, ya que las proteínas impiden el movimiento de los lípidos (Ingram, 1977; Keweloh *et al.*, 1990; Weber y de Bont, 1996).

Para regular la fluidez de la membrana, existen dos mecanismos principales que implican un cambio en la composición de ácidos grasos: la isomerización *cis/trans* de los ácidos grasos insaturados, como una respuesta a corto plazo; y la alteración de la relación de ácidos grasos saturados/insaturados, como una respuesta a más largo plazo. También se han observado casos en que se alteraba la relación ácidos grasos de cadena larga y cadena corta (Cronan *et al.*, 1969, 1975; de Mendoza *et al.*, 1983; Garwin *et al.*, 1980b; Tsay *et al.*, 1992).

En el fenómeno de isomerización *cis/trans*, llevado a cabo por la enzima Cti (del inglés *cis/trans* isomerase) (Weber *et al.*, 1994; Ramos *et al.*, 1997; Junker y Ramos, 1999), el cambio en la configuración del doble enlace origina cambios en la temperatura de fusión de las membranas. Los ácidos grasos insaturados *trans*, así como los ácidos grasos saturados, tienen una configuración estérica similar extendida a todo lo largo de la cadena acílica; en cambio, los isómeros *cis* tienen un plegamiento de 30° en la cadena acílica, que provoca un mayor impedimento estérico y la membrana adquiere mayor fluidez (ver **Figura I.4**). El incremento observado en la relación *trans/cis*, en respuesta a la acción tóxica de los disolventes orgánicos, origina un aumento de la rigidez de la membrana, que se traduce en un aumento de la temperatura de transición de la misma.

En presencia de algunos disolventes, así como en respuesta a los cambios de temperatura, se han observado modificaciones en la síntesis de los ácidos grasos saturados. Un aumento de temperatura, que tiene un efecto fluidificante sobre la membrana, conduce a un incremento en la síntesis de ácidos grasos saturados; por el contrario, un descenso en la temperatura induce a la formación de ácidos grasos insaturados. En ambos casos, se requiere la síntesis *de novo* de ácidos grasos. De ahí que esta respuesta sea considerada un mecanismo de respuesta a más largo plazo (Ramos *et al.*, 1997; Segura *et al.*, 1999a).

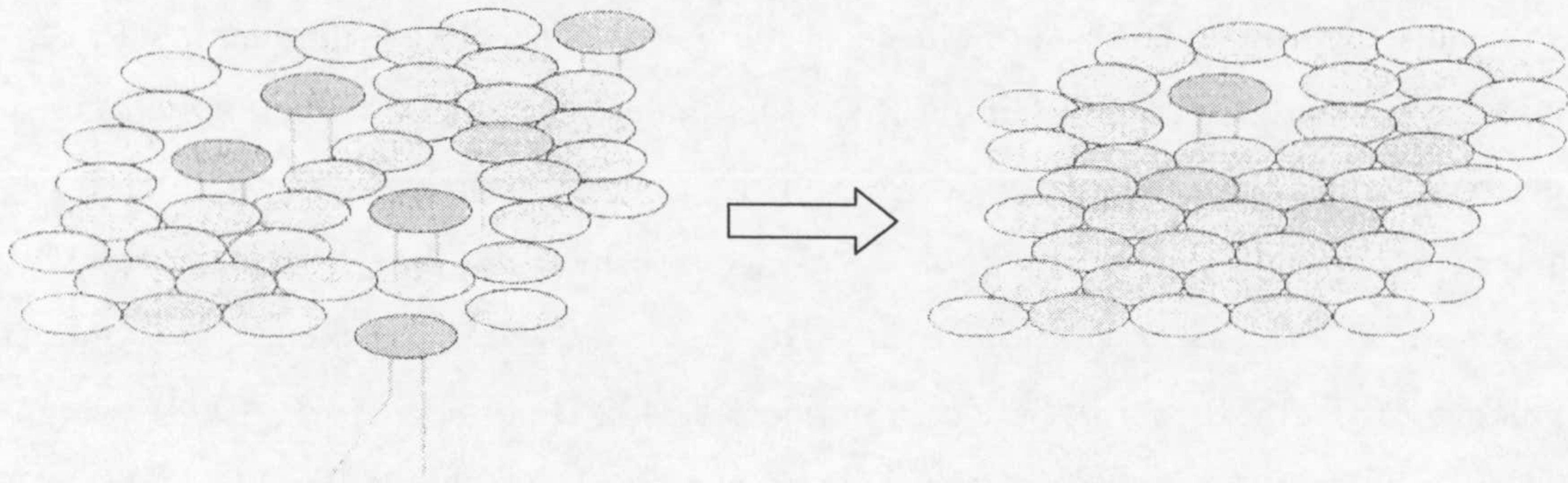


Figura I.4. Efecto de la isomerización *cis/trans* en la estructura de la membrana. En la figura se muestra una monocapa de lípidos de la membrana, y como la exposición a disolventes provoca la conversión de ácidos grasos insaturados del isómero *cis* (azul) al correspondiente isómero *trans* (rojo), permitiéndolo así un empaquetamiento más denso de las moléculas de fosfolípidos. Los ácidos grasos saturados se muestran en amarillo (obtenido de Segura *et al.*, 1999a).

Para contrarrestar los cambios en la fluidez de membrana producidos por los disolventes orgánicos, algunas cepas de *P. putida* alteran la composición de los grupos de cabeza polares de los fosfolípidos, disminuyendo la cantidad de fosfatidiletanolamina (cuya temperatura de transición es baja), mientras que las cantidades de fosfatidilglicerol y cardiolipina (de temperaturas de transición más altas) aumentan (Weber y de Bont, 1996; Ramos *et al.*, 1997), lo cual disminuye la fluidez de la membrana. En cambio, en otras cepas de *P. putida* se ha observado el efecto contrario (Pinkart y White, 1997).

3.2. Sistemas específicos de extrusión.

Otra aproximación más agresiva de las células para vencer los efectos tóxicos que producen los disolventes es prevenir o reducir la acumulación de los mismos en las membranas. Una forma encontrada en las bacterias para reducir la concentración de disolventes en las membranas es la de extruir los disolventes, mediante un sistema de exclusión activa. Este es el caso del mecanismo que utilizan las bombas de resistencia a múltiples antibióticos (MDR, del inglés multidrug resistance), que son sistemas unidireccionales que catalizan la extrusión activa de un gran número de compuestos fuera del citoplasma bacteriano, y que están energetizadas por la fuerza protón motriz. Así, las células pueden mantener una baja concentración del compuesto tóxico en la membrana, mientras esté disponible un suministro suficiente de energía. Los sistemas de extrusión de

disolventes identificados hasta ahora en bacterias gram-negativas, también suelen extruir antibióticos y pertenecen a la familia RND (del inglés *r*esistance-*n*odulation-cell *d*ivision), p.ej. los sistemas AcrAB-TolC y AcrEF-TolC de *E. coli* (Fralick, 1996; Aono *et al.*, 1998; Zgurskaya y Nikaido, 1999; Ma *et al.*, 1993; Kobayashi *et al.*, 2001), MexAB-OprM de *P. aeruginosa* PAO1 (Li *et al.*, 1998), SrpABC de *P. putida* S12 (Isken y de Bont, 1996; Kieboom *et al.*, 1998), ArpABC de *P. putida* KT2442 (Fukimori *et al.*, 1998) y TtgABC, TtgDEF y TtgGHI de *P. putida* DOT-T1E (Ramos *et al.*, 1998; Mosqueda y Ramos, 2000; Rojas *et al.*, 2001).

Los sistemas de extrusión RND constan de tres componentes: un transportador de membrana interna dependiente de energía, un canal de membrana externa y una proteína de fusión que conecta ambas estructuras a través del periplasma, posibilitando así la salida del compuesto tóxico directamente al exterior de la célula (Nikaido, 1996b) (ver **Figura I.5**).

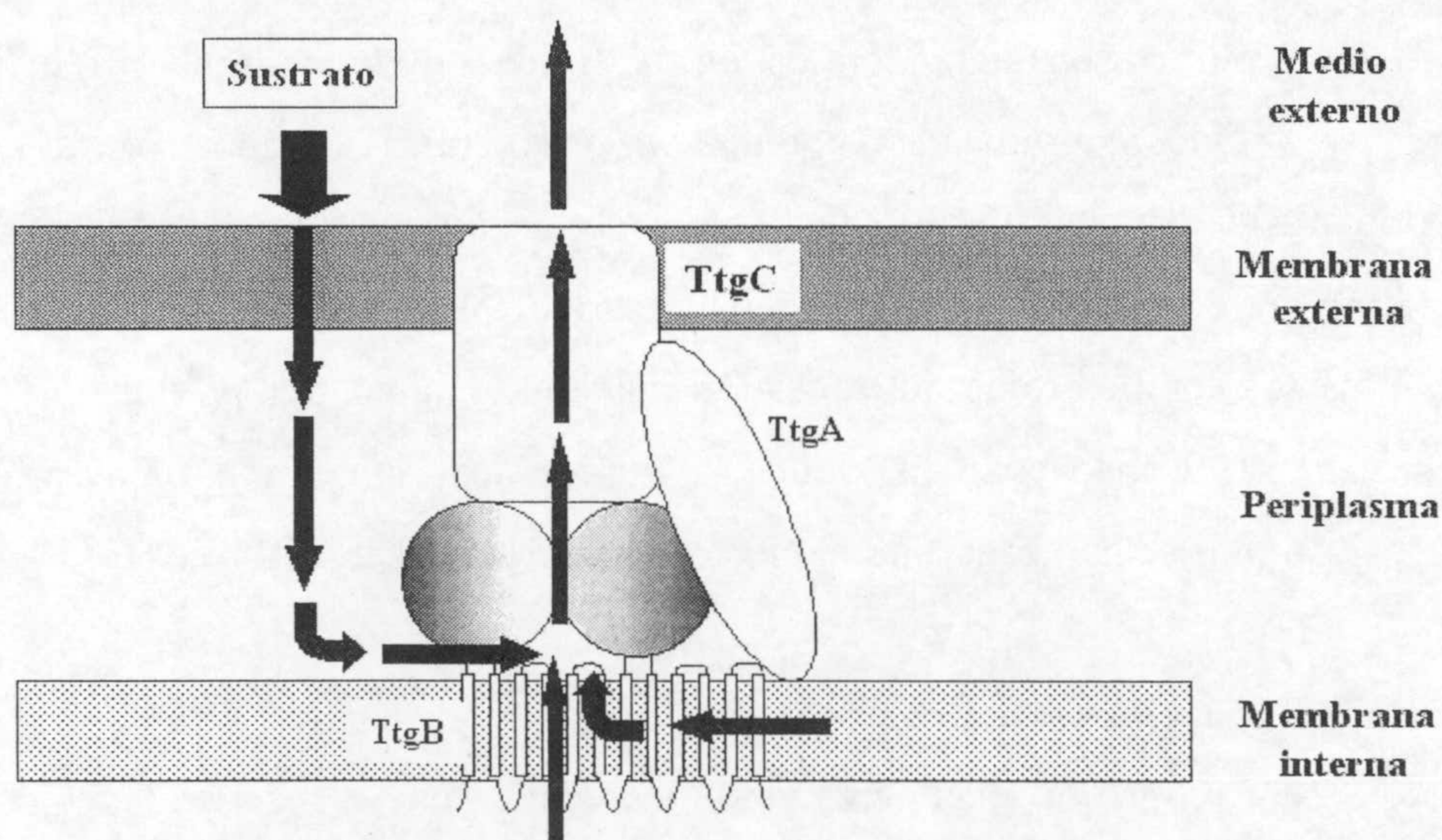


Figura I.5. Representación esquemática de la bomba TtgABC de *P. putida* DOT-T1E. En la figura se muestran los tres componentes que conforman este sistema de exclusión de tolueno: TtgA (proteína de fusión periplásmica), TtgB (transportador de membrana interna) y TtgC (proteína de membrana externa). (Modificado de Eda *et al.*, 2003). Las flechas indican posibles rutas de flujo del sustrato.

La primera relación evidente entre tolerancia a disolventes orgánicos y resistencia a antibióticos se encontró en *E. coli* (Aono *et al.*, 1995), ya que cepas hipersensibles a ciertos antibióticos también eran hipersensibles a hexano. Los sistemas de extrusión de antibióticos

de *E. coli* y *P. aeruginosa* no son capaces de bombear disolventes orgánicos (White *et al.*, 1997; Aono *et al.*, 1998; Li *et al.*, 1998).

3.3. Degradación o modificación del disolvente.

Otro mecanismo para prevenir la acumulación de disolventes en las membranas consiste en la modificación del compuesto, haciéndolo menos lipofílico o metabolizarlo a formas no tóxicas, por ejemplo, en el caso de hidrocarburos aromáticos, mediante oxidación. La mineralización completa de un compuesto puede constituir un método efectivo para vencer su toxicidad, como ocurre en el caso de microorganismos que crecen a expensas de hidrocarburos aromáticos como tolueno o estireno (Weber *et al.*, 1993; Ramos *et al.*, 1995, 1997). Aunque la biodegradación de compuestos tóxicos puede ayudar a reducir su toxicidad, existen evidencias experimentales que sugieren que este mecanismo contribuye en menor medida a la protección de la viabilidad celular. Así, existen microorganismos tolerantes a ciertos disolventes orgánicos que no son capaces de biotransformarlos en absoluto, p. ej. cepas de *E. coli* K12 tolerantes al 1% (v/v) de hexano que no pueden biotransformar este compuesto (Aono *et al.*, 1991). Además, algunas cepas de *Pseudomonas* tolerantes a concentraciones supersaturantes de tolueno son incapaces de utilizarlo como fuente de carbono y energía (Inoue y Horikoshi, 1989). *P. putida* DOT-T1E es una cepa tolerante a tolueno que degrada este aromático a través de la ruta de la tolueno dioxigenasa. Se han generado mutantes en esta ruta, incapaces de metabolizar este aromático, que son tan tolerantes a tolueno como la cepa silvestre (Mosqueda *et al.*, 1999). Estas evidencias permiten concluir que el metabolismo de un compuesto químico y el desarrollo de la tolerancia al mismo no están relacionados.

En resumen, una actuación sinérgica de todos o varios de los mecanismos anteriormente mencionados puede conferir a los microorganismos, en muchas ocasiones, unos niveles muy notables de resistencia a compuestos tóxicos (Nikaido, 1994b; Hancock, 1997; Ramos *et al.*, 1997; Nakae *et al.* 1999).

4. EL METABOLISMO DEL *p*-HIDROXIBENZOATO EN BACTERIAS.

Los compuestos aromáticos tienen una importancia significativa en diferentes áreas biotecnológicas como biotransformaciones, alimentación, farmacología y cosmética, al poder utilizarse en la ulterior síntesis de polímeros de alto valor añadido. Uno de estos compuestos de interés es el ácido *p*-hidroxibenzoico (PHBA), que constituye un monómero clave para la producción de polímeros de cristal líquido empleados en las pantallas de computadores y otros dispositivos electrónicos (Huang *et al.*, 1992; Kumar *et al.*, 2002), y para la síntesis de pesticidas y conservantes de tipo parabenos empleados en la industria alimentaria, médica y cosmética (Cavill, 1947; Engels, 1936; Zbarskii, 1939; Nobli, 1936).

La síntesis industrial actual de PHBA a partir de fenol (Lindsey y Jeskey, 1957) presenta serios inconvenientes, como son el uso de reactivos caros, requerimientos energéticos muy altos, altas temperaturas y presiones, y la generación de subproductos debido a reacciones colaterales, que hacen que su producción comercial sea poco rentable económicamente. Para la producción de PHBA se han desarrollado paralelamente métodos potencialmente útiles y protegidos bajo patente que emplean microorganismos como *Enterobacter* o *P. putida*, si bien la utilidad de estos métodos también está limitada por el alto coste, la toxicidad de los sustratos aromáticos empleados, los bajos rendimientos y una incapacidad de controlar la posterior degradación del compuesto deseado. Sin embargo, recientemente se han desarrollado dos métodos de producción biosintética de PHBA que permiten su producción a partir de tolueno o *p*-cresol (Ben-Bassat *et al.*, 2002 US Patent Application 20020151003; Miller y Peretti, 2002), con la transformación completa de estos sustratos en PHBA y un alto rendimiento de conversión. Desgraciadamente, el crecimiento celular y la producción de PHBA aún se ven afectados en presencia de altas concentraciones de PHBA.

La comprensión de los mecanismos de tolerancia a PHBA, así como a otros compuestos aromáticos, además del interés básico, presenta un interés aplicado, en cuanto que constituyen precursores de compuestos de alto valor añadido. De ahí el interés por generar microorganismos con un potencial biocatalítico incrementado que puedan tolerar grandes concentraciones de estos compuestos, y así conseguir una producción efectiva con un coste comercial razonable. Desentrañar los blancos sobre los que actúan ciertos

compuestos tóxicos puede rendir información del máximo interés para el diseño de antibióticos y agentes bactericidas y bacteriostáticos optimizados (Ben-Bassat *et al.*, octubre 2002, U.S. Patent Application 20020151003).

4.1. Biosíntesis de *p*-hidroxibenzoato en *Pseudomonas*.

Una ruta enzimática de creciente interés comercial en biotransformaciones es la de degradación de tolueno a través de la ruta *tmo* o de la tolueno 4-monooxigenasa, presente en la cepa *P. mendocina* KR1 (Whited y Gibson, 1991a y 1991b) (ver **Figura I.6**). En esta ruta, el tolueno es atacado inicialmente por el sistema enzimático que da nombre a la ruta, esto es, la tolueno 4-monooxigenasa, que cataliza la oxidación del anillo aromático en posición *para* en una reacción dependiente de NADPH, produciéndose *p*-cresol. La siguiente enzima de la ruta es la *p*-cresol metilhidrolasa que cataliza la conversión de *p*-cresol en alcohol *p*-hidroxibencílico y posteriormente en *p*-hidroxibenzaldehído. La enzima *p*-hidroxibenzaldehído deshidrogenasa oxida el *p*-hidroxibenzaldehído a *p*-hidroxibenzoato, que es hidroxilado posteriormente hasta 3,4-dihidroxibenzoato por la acción de la *p*-hidroxibenzoato hidroxilasa, una flavoproteína con actividad monooxigenasa. El 3,4-dihidroxibenzoato (protocatecuato) es sustrato de la protocatecuato 3,4-dioxigenasa que rompe el anillo aromático en *orto* y rinde β -carboxi-*cis,cis*-muconato (Wright y Olsen, 1994), que es a su vez metabolizado a través de la ruta del β -cetoadipato (Wright y Olsen, 1994; Duetz *et al.*, 1994; Leahy *et al.*, 1996).

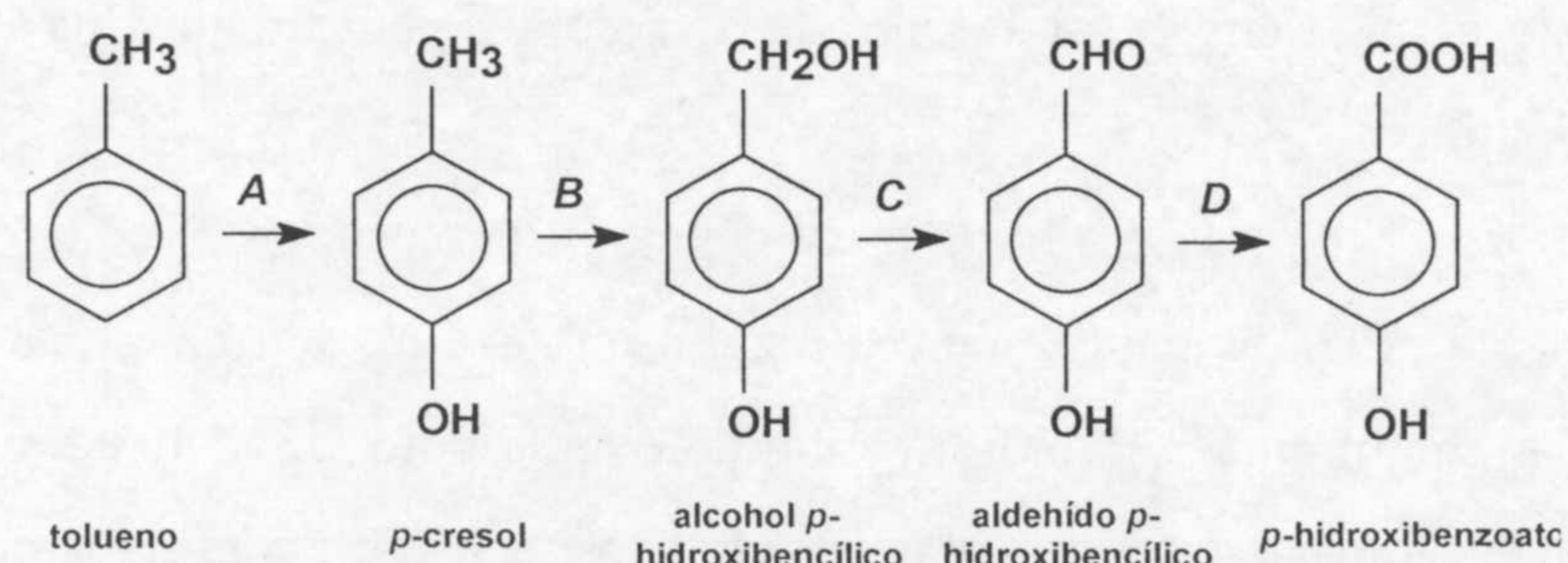


Figura I.6. Ruta *tmo* de degradación de tolueno por parte de la cepa *P. mendocina* KR1. Las enzimas implicadas en las distintas etapas de esta ruta catabólica son: (A) tolueno 4-monooxigenasa, (B y C) *p*-cresol metilhidroxilasa, (D) *p*-hidroxibenzaldehído deshidrogenasa.

Los genes que codifican las enzimas que catalizan las reacciones enzimáticas de la degradación de tolueno hasta protocatecuato están ligados genéticamente, y se pueden

movilizar simultáneamente (Wright y Olsen, 1994). Estos genes están organizados en tres unidades transcripcionales que se regulan de forma independiente: una constituida por los genes que codifican la tolueno 4-monooxigenasa (*tmoXABCDEF*) (Ramos-González *et al.*, 2002), otra que incluye los genes que codifican las enzimas *p*-cresol metilhidroxilasa y *p*-hidroxibenzaldehído deshidrogenasa (*pcuCAXB*) (Ben-Bassat *et al.*, 2001), y por último, el gen que codifican la enzima *p*-hidroxibenzoato hidroxilasa (*pobA*). Los genes *pcuCAXB* están organizados formando un operón que está regulado por el producto del gen *pcuR*, que es un activador transcripcional y se localiza aguas abajo del gen *pcuC*, transcribiéndose divergentemente al mismo (Olson y Gatenby, pendiente de publicación). Por su parte, el gen *pobA* está regulado por el gen *pobR*, localizado aguas arriba de *pobA*. Ambos genes también se transcriben de forma divergente en bacterias como *Acinetobacter* (di Marco y Ornston, 1994).

4.2. Transporte de *p*-hidroxibenzoato.

Pseudomonas putida responde quimiotácticamente a PHBA (Harwood *et al.*, 1990, 1994). La entrada de PHBA al interior celular ocurre mediante dos mecanismos. El primero de ellos consiste en la difusión pasiva de este compuesto a través de las membranas, a favor de gradiente de concentración (Kaback, 1989). Este mecanismo depende fundamentalmente del pH del medio, pues la difusión ocurre de manera casi exclusiva cuando la molécula se encuentra sin carga eléctrica, esto es, en forma apolar. Por ser el pK_a del PHBA es 4,48, a pH ligeramente ácido tiene lugar la entrada a la célula por difusión pasiva, que no tiene lugar a pHs alcalinos.

Se ha descrito que *P. putida* es capaz de crecer en medios con muy bajas concentraciones de PHBA, para lo cual utilizaría un sistema de transporte activo de PHBA a través de la membrana celular en contra de gradiente de concentración (Nichols y Harwood, 1997), consistente en un transportador específico. En el caso de las cepas de *P. putida* PSR2000 y DOT-T1E, este transportador es el producto del gen *pcaK* (Harwood *et al.*, 1994; Alaminos, 2000), que pertenece a la superfamilia de transportadores MFS (del inglés major facilitator superfamily) (Marger y Saier, 1993), y que se encuentra ampliamente distribuido entre otras bacterias del suelo, como p.ej. *Acinetobacter calcoaceticus* (Kowalchuk *et al.*, 1994). Este transportador facilita la entrada de PHBA

mediante un mecanismo dependiente del simporte de protones, permitiendo así el crecimiento de las células a expensas de PHBA a pH neutro o ligeramente básico.

4.3. Ruta catabólica de *p*-hidroxibenzoato.

La degradación de PHBA se inicia con su oxidación a protocatecuato, el cual es metabolizado a través de la ruta del β -ceto adipato (Ngai *et al.*, 1983) (ver **Figura I.7**).

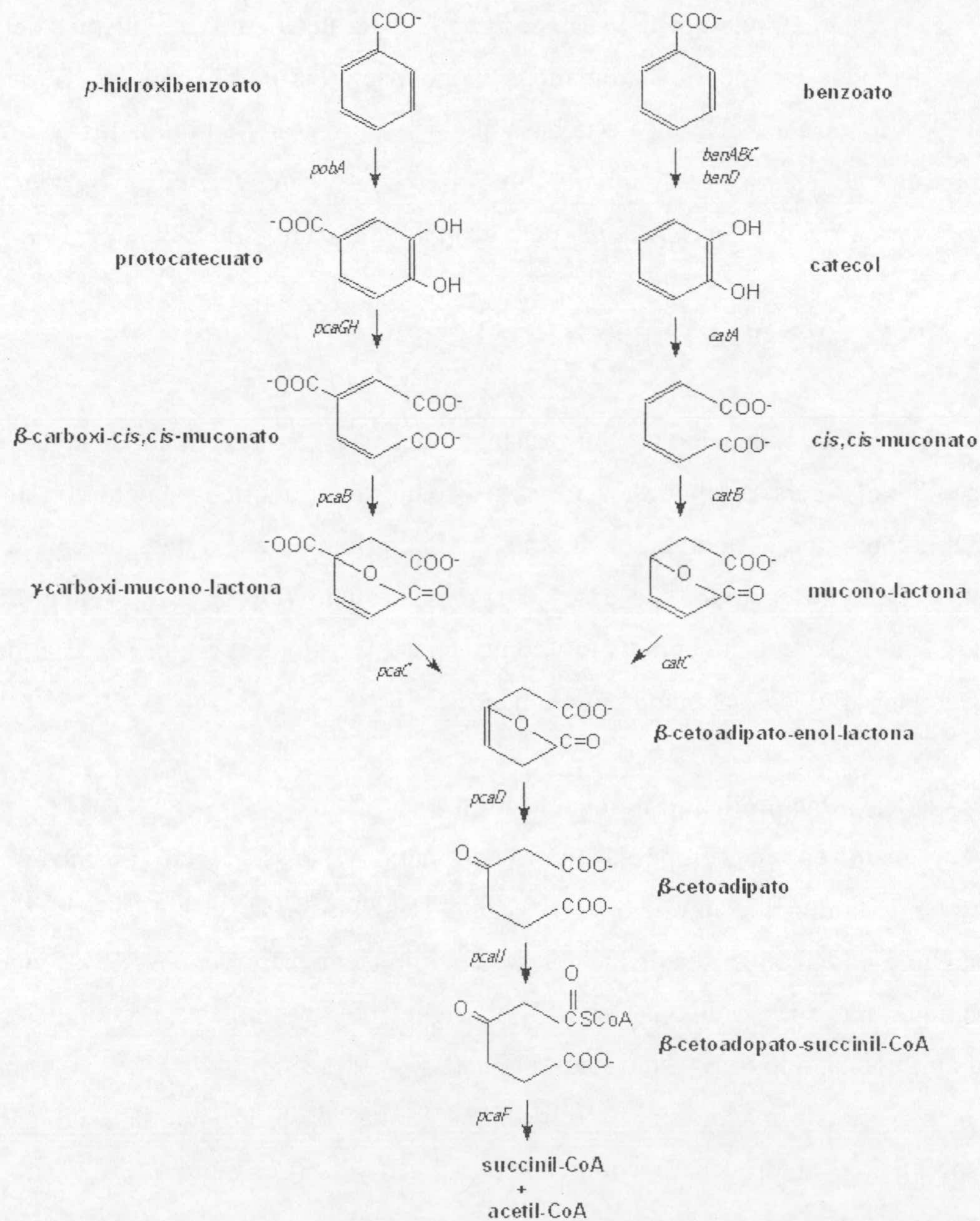


Figura I.7. Ruta del β -ceto adipato en *P. putida*. (Obtenido de Harwood *et al.*, 1994).

Esta ruta es fundamental para el catabolismo de aromáticos, dado que una gran variedad de estos compuestos son oxidados, bien a protocatecuato (PHBA, quinato, shikimato y vainillato), bien a catecol (benzoato, tolueno, salicilato, benceno, etc.) (Fewson, 1991; Stanier *et al.*, 1973). En *P. putida*, la ruta del β -cetoadipato se ramifica en dos: la rama del protocatecuato (*pca*) y la rama del catecol (*cat*), que comparten una gran homología en cuanto a las transformaciones químicas de los respectivos sustratos. En el caso de la rama *pca*, los genes que codifican las enzimas de la ruta son de codificación cromosómica, y están ampliamente distribuidos en la naturaleza entre organismos del suelo capaces de degradar compuestos aromáticos, tanto bacterias como hongos (Harwood y Parales, 1996). Esta ruta metabólica está bastante bien conservada en todos los organismos que la poseen, además de *P. putida*, como p. ej. *A. calcoaceticus*, *Agrobacterium tumefaciens* y *Rhodococcus erythropolis* (para una revisión, Harwood y Parales, 1996).

5. OTROS PRECURSORES DE PROTOCATECUATO.

En los vertidos de ciertas industrias químicas, así como en la degradación de plantas, se liberan muchos compuestos aromáticos e hidroxiaromáticos al entorno (Hawkins *et al.*, 1993), como son el quinato, el shikimato, el vainillato, etc. La degradación de estos compuestos converge en todos los casos en protocatecuato (PCA) (ver **Figura I.8**). La capacidad para utilizar estos productos como única fuente de carbono y energía está ampliamente distribuida en el mundo microbiano.

5.1. Ruta de degradación del quinato/shikimato.

El quinato es un compuesto hidroxiaromático que se libera al medio como consecuencia de la degradación de materia vegetal (Hawkins *et al.*, 1993). El shikimato es un intermedio esencial en la ruta de biosíntesis de aminoácidos aromáticos, de las vitaminas E y K, ubiquinona, plastoquinona, ácido fólico, quelantes de metales y compuestos con actividad antibiótica, antiviral y antitumoral (Bentley, 1990). En *A. calcoaceticus*, quinato y shikimato, son transformados en sus respectivas formas deshidro por la acción de una quinato/shikimato deshidrogenasa, codificada por el gen *quiA* (ver **Figura I.8**).

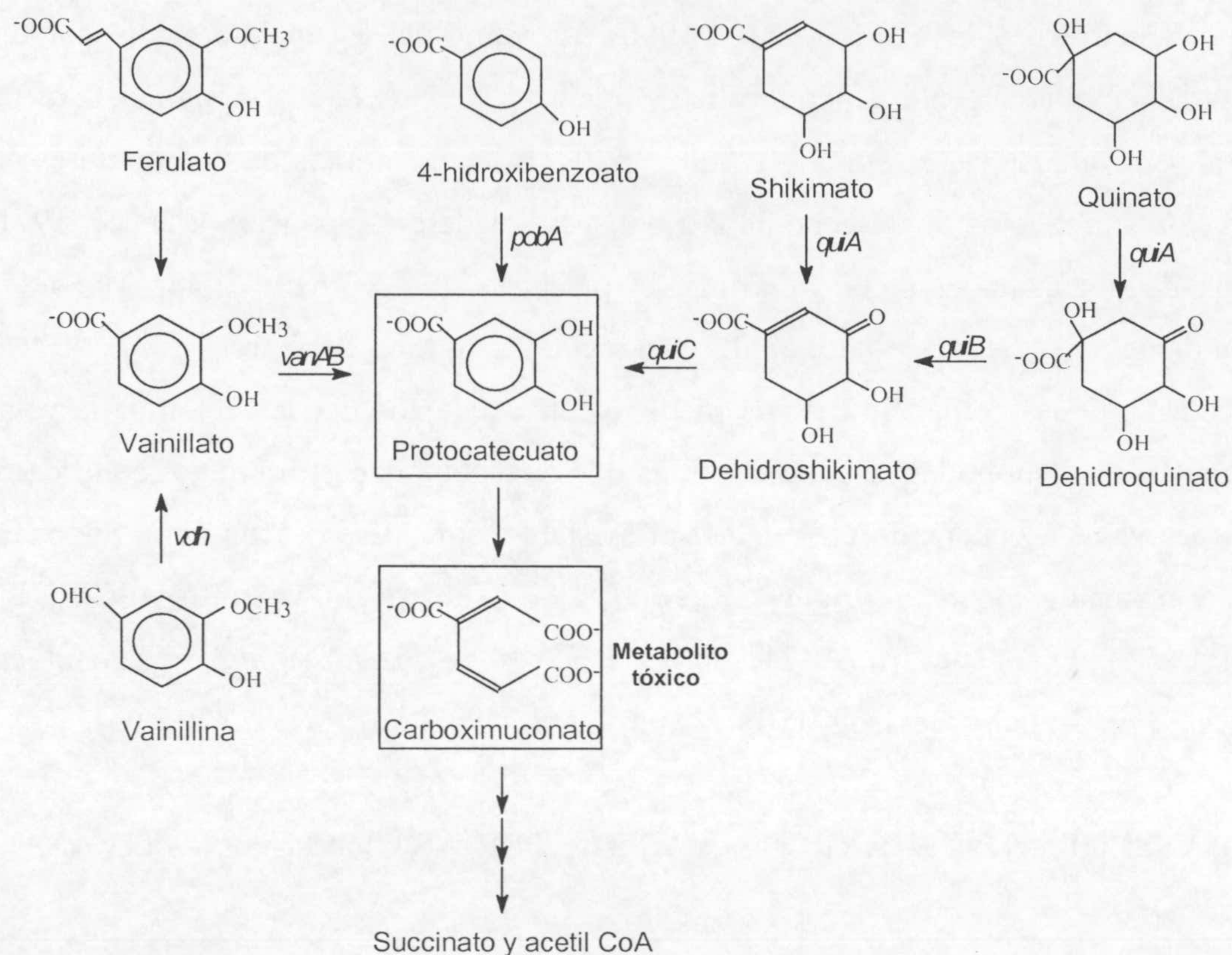


Figura I.8. Esquema de distintas rutas de degradación de compuestos aromáticos que confluyen en protocatecuato. Varios sustratos son catabolizados a través de distintas rutas que convergen en protocatecuato, que es transformado en succinato y acetyl-coA por la acción consecutiva de enzimas codificadas por los genes *pca* (adaptado de Gerischer *et al*, 1998).

La segunda etapa en la ruta de degradación del quinato es la deshidratación del deshidroquinato a deshidroshikimato, llevada a cabo por el producto del gen *quiB*. La ruta finaliza con la deshidratación del deshidroshikimato por la acción de una deshidroshikimato deshidratasa, codificada por el gen *quiC*, para obtener protocatecuato, que es oxidado subsecuentemente a través de la ruta del β -cetoadipato. En *A. calcoaceticus* los genes *pca-qui-pob* constituyen un cluster supraoperónico cuya organización es: *pcaU-pcaIJ pcaHG-quiBC-quiX-quiA-pobS-pobR-pobA* (Elsemore, 1995).

5.2. Ruta del vainillato.

La vainillina confiere a la vainilla sus propiedades características de múltiples aplicaciones en alimentación y perfumería. Actualmente, la vainillina sintética se produce a

partir del petróleo y la lignina (Clark, 1990). La vainillina es un intermedio clave en la biodegradación de eugenol, ácido ferulico y lignina (Chen *et al.*, 1982; Shiotsu *et al.*, 1989; Tadasa y Kayahara, 1983; Toms y Wood, 1970). La forma clorada del vainillato es uno de las mayores productos de desecho de las industrias maderera y papelera (Dence, 1971). En la ruta de degradación de la vainillina, el producto del gen *vdh* cataliza la oxidación dependiente de NAD^+ de la vainillina a ácido vainílico (Priefert *et al.*, 1997). La subsecuente *O* desmetilación del éter metílico está catalizada por la acción de la vainillato desmetilasa, una monooxigenasa constituida por dos subunidades diferentes codificadas por los genes *vanAB*, generando un hemiacetal inestable, el cual se descompone finalmente en PCA y formaldehído (Cartwright y Buswell, 1967; Cartwright y Smith, 1967; Ribbons, 1970, 1971). Los genes *vanAB* de varias especies de *Pseudomonas* se han clonado y secuenciado (Brunel y Davison, 1988, Venturi *et al.*, 1998, Segura *et al.*, 1999b).

6. TRANSPORTE DE HIERRO EN LAS BACTERIAS GRAM-NEGATIVAS.

El hierro es uno de los elementos esenciales para todos los organismos vivos. Este metal está implicado en muy diversos procesos metabólicos, por ser cofactor en un gran número de enzimas que contienen hierro en su estructura. Entre estos procesos podemos destacar: la cadena de transporte electrónico, la activación de oxígeno, el metabolismo de H_2O_2 y superóxido, la biosíntesis de aminoácidos, pirimidinas y ADN, y el ciclo de los ácidos tricarbónicos (Earhart, 1996). Para su crecimiento los microorganismos solamente requieren el hierro en concentraciones micromolares. Sin embargo, pese a ser el cuarto elemento más abundante de la Tierra, la disponibilidad del hierro está severamente limitada, por varios motivos:

1) En la naturaleza, la disponibilidad del hierro depende de las condiciones de pH y de aireación. En un ambiente aeróbico, el hierro se encuentra en estado de oxidación Fe^{3+} que precipita a pH neutro, por lo que es altamente insoluble y, por consiguiente, inaccesible para la mayoría de los microorganismos. En cambio, en un ambiente anaeróbico, el hierro se encuentra en forma de Fe^{2+} que es lo suficientemente soluble para que pueda ser incorporado directamente al interior de la célula (Braun y Killmann, 1999).

2) En los tejidos de animales mamíferos, la mayoría del hierro presente en las células está formando parte de hemoproteínas, como la hemoglobina, o se encuentra almacenado en forma de ferritina. Las trazas de hierro que se encuentran en el exterior de las células son rápidamente complejadas por proteínas de unión a hierro de alta afinidad, como lactoferrina y transferrina (Bullen y Griffiths, 1999).

3) El contenido de hierro de las células debe regularse, además de para conservar energía y sustratos, para evitar la toxicidad del hierro en sí, ya que, a menos que esté fuertemente complejado, puede formar especies reactivas de oxígeno muy perjudiciales para la célula, mediante las reacciones de Harber-Weiss/Fenton y Fenton (Imlay *et al.*, 1988; Nunoshiba *et al.*, 1999).

Puesto que no se conocen mecanismos de excreción de hierro en bacterias, los microorganismos parece que controlan la homeostasis de hierro, regulando su transporte a través de la membrana (Bagg y Neilands, 1987; Crosa, 1997)

Para adquirir hierro de su entorno, las bacterias gram-negativas han desarrollado sistemas especializados que les permiten secuestrar el hierro del medio donde se encuentran, a través de la síntesis de sideróforos (que se desarrollará a continuación), o utilizar directamente como fuente de hierro proteínas del organismo hospedador que contienen hierro en forma de grupo hemo, tales como hemoglobina, hemopexina, transferrina y lactoferrina (Braun *et al.*, 1998a; Gray-Owens y Schryvers, 1996; Genco y Desai, 1996). Los microorganismos patógenos que usan hemo tienen una variedad de mecanismos para acceder al hemo almacenado en el hospedador: i) la producción de proteasas extracelulares que facilitan la liberación del grupo hemo de la hemoglobina (Nishina *et al.*, 1992; Lewis *et al.*, 1999), ii) la secreción de hemóforos, que son proteínas extracelulares que unen hemo (Letoffe *et al.*, 1998; Cope *et al.*, 1998; Idei *et al.*, 1999; Braun *et al.*, 1998b), y iii) la expresión de receptores de la superficie celular que se unen directamente a los grupos hemo, a hemóforos o a hemoproteínas del hospedador (Wandersman y Stojiljkovic, 2000; Genco y Dixon, 2001).

6.1. Sistemas de transporte de hierro (III) de alta afinidad.

Los microorganismos han sobrevivido en una amplia variedad de ambientes cada vez más deficientes en hierro, debido al paso de una atmósfera reductora a oxidante con la aparición de la fotosíntesis, con lo cual han desarrollando sistemas eficaces de asimilación de Fe^{3+} . En el caso de las bacterias aeróbicas y anaeróbicas facultativas, así como microorganismos eucariotas, la síntesis de ligandos secuestradores específicos de Fe^{3+} , llamados sideróforos, constituye una vía eficaz para solucionar el problema.

6.1.1. Sideróforos.

Los sideróforos aparecen como respuesta evolutiva ante dos hechos: i) el papel fundamental que juega el hierro en el metabolismo, y ii) la alta insolubilidad de Fe(III) en ambientes aeróbicos a pH neutro. Los sideróforos tienen un papel principal en el transporte de alta afinidad de hierro dependiente de receptores específicos, aunque también pueden actuar como factores de crecimiento o germinación, como potentes antibióticos, incluso como factores de virulencia en enfermedades de animales y plantas.

Los sideróforos son pequeñas moléculas de naturaleza peptídica, generalmente de bajo peso molecular (entre 500 y 1.000 Da), que contienen en su estructura cadenas laterales y grupos funcionales que pueden proporcionar un conjunto de ligandos de alta afinidad y especificidad para la coordinación de iones férricos (Crosa, 1989; Neilands, 1995). En los sideróforos, sólo aquellos ligandos con valencia de coordinación VI, convenientemente dispuestos, son agentes quelantes efectivos para el Fe^{3+} .

En la estructura de los sideróforos pueden aparecer tres tipos principales de grupos funcionales coordinantes de hierro: 1) grupos N-hidroxiamino, donde el átomo de oxígeno es uno de los ligandos para Fe^{3+} (ej. anguibactina); 2) grupos hidroxilo adyacentes en los anillos de catecol, casi siempre derivados del 2,3-dihidroxibenzoato (DHB) (ej. enterobactina, anguibactina y acinetobactina) o derivados del 2-hidroxibenzoato; 3) átomos de N de anillos tiazol y oxazol, resultantes de la ciclación enzimática de cadenas laterales de cisteinil, seril o treonil (ej. piochelina, yersiniabactina, vibriobactina, anguibactina y acinetobactina). A menudo los tres grupos funcionales quelantes de hierro se combinan en un mismo sideróforo, como es el caso de la micobactina y la anguibactina (Crosa y Walsh, 2002). En la **Figura I.9** se muestran las formulas estructurales de algunos sideróforos identificados pertenecientes a distintas especies bacterianas.

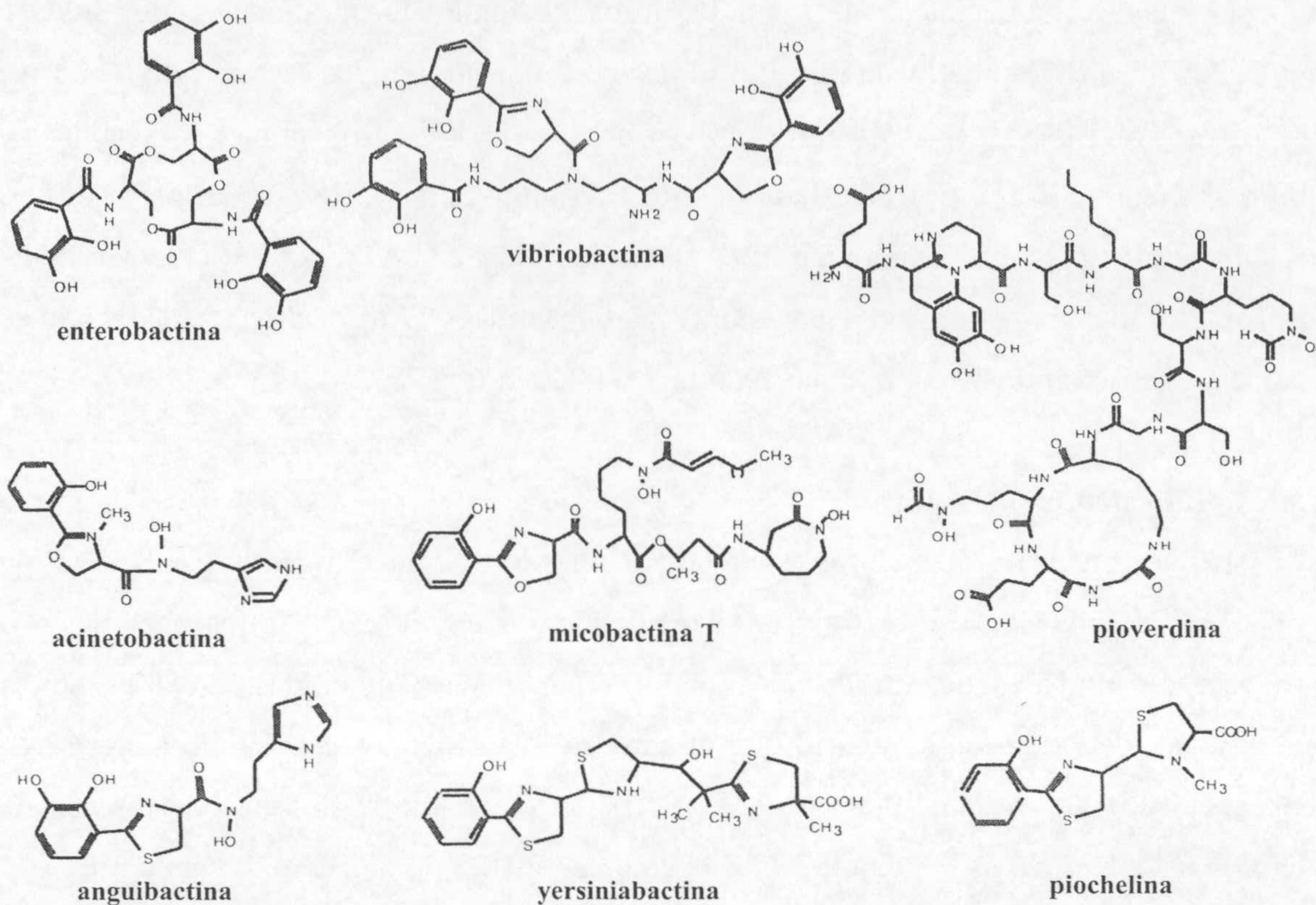


Figura I.9. Estructuras de varios sideróforos encontrados en bacterias. Acinetobactina (*Acinetobacter calcoaceticus*), anguibactina (*Vibrio anguillarum*), enterobactina (*Escherichia coli*), micobactina T (*Mycobacterium tuberculosis*), pioverdina y piochelina (*Pseudomonas aeruginosa*), vibriobactina (*Vibrio cholerae*) y yersiniabactina (*Yersinia. pestis*) (obtenido de Crosa y Walsh, 2002).

a) Tipos de sideróforos.

Para la adquisición de hierro, las bacterias pueden utilizar sideróforos endógenos (ej. enterobactina, aerobactina), y sideróforos producidos por otros microorganismos (ej. desferricromo, coprogen y ácido rodotorúlico) y que incorporan gracias a sistemas de transporte específicos. Existen además otras moléculas quelantes de hierro distintas de los sideróforos como el citrato, el salicilato, el ácido dihidroxibenzoico (DHB), y la dihidroxibenzoilserina (DBS), que poseen sus propios sistemas de transporte de alta afinidad, y que tienen en su estructura ligandos de tipo fenolato y carboxilato. La baja polarizabilidad y alta electronegatividad confieren a estas moléculas una afinidad preferente por Fe^{3+} .

La clasificación clásica de los sideróforos distingue dos grandes grupos que se diferencian en su estabilidad y en su afinidad por Fe^{3+} , por un lado los de tipo fenol-catecol, cuya estructura puede ser cíclica (enterobactina), o lineal (agrobactina, parabactina y dihidroxibenzoillisina), y por otro lado, los de tipo hidroxamato, dentro de los cuales se encuentran el ferricromo malonicromo, derivados del ácido rodolúrico, derivados hidroxamatos del ácido cítrico (schizokinen, aerobactina y artrobactina), micobactinas, fusarinas, y ferrioxaminas como la ferrioxamina E (Neilands, 1981a).

b) Biosíntesis de los sideróforos.

La biosíntesis de sideróforos está regulada por hierro y tiene lugar en condiciones de deficiencia de este elemento a través del regulador Fur en *E. coli* y otras bacterias. La existencia de unidades de aminoácidos no proteinogénicas embebidas en el esqueleto peptídico de los sideróforos, sugirió que estas moléculas fueran péptidos de síntesis no-ribosómica (Crosa y Walsh, 2002). Muchas de las proteínas implicadas en la biosíntesis de sideróforos son sintetasas de péptidos no-ribosómicos. Este tipo de enzimas se identificaron originariamente como catalizadoras de la biosíntesis de antibióticos y otras sustancias en bacterias gram-positivas (ver revisión en Crosa y Walsh, 2002).

6.1.2. Excreción de los sideróforos al periplasma y al medio.

El mecanismo por el cual los sideróforos se exportan al espacio extracelular es poco conocido. En el caso de la enterobactina y la aerobactina, se piensa que las enzimas sintetasas de estos sideróforos pueden participar tanto en la síntesis como en la excreción, posiblemente por asociación con un sistema de flujo hacia fuera de membrana citoplasmática capaz de excretar dicho sideróforo (Viswanatha *et al.*, 1987). Otra posibilidad consiste en que una vez sintetizado el sideróforo, éste se excrete directamente al medio, debido al posible daño que estas moléculas podrían causar en el citoplasma, aún cuando su afinidad por Fe^{2+} es menor que por Fe^{3+} (Armstrong *et al.*, 1989; Earhart, 1996). Una vez fuera de la célula, la molécula de sideróforo se encargará de complejar el Fe^{3+} presente en el medio.

6.1.3. Transporte de ferrisideróforos al interior de la célula.

La membrana externa presenta una superficie perforada por canales acuosos, de los que son responsables las proteínas de tipo porina. Las porinas generan pequeños poros, de 10 a 20 μm de diámetro, a través de los cuales se incorporan los nutrientes. Las moléculas hidrofóbicas de bajo peso molecular ($M_r < 700$) difunden pasivamente atravesando la membrana a través de las porinas (Nikaido y Saier, 1992). En contraste, los nutrientes voluminosos, como los complejos ferrisideróforos y la vitamina B₁₂, que se encuentran a concentraciones muy bajas en el medio extracelular, y que exceden el límite de difusión de las porinas, son incorporadas al interior celular a través de sistemas de transporte activo de alta afinidad. Estos sistemas pueden establecer gradientes de concentración a través de la membrana externa de hasta mil veces (Reynolds *et al.*, 1980; Bradbeer, 1993), lo cual implica un alto requerimiento de energía para la translocación de vitamina B₁₂ y sideróforos dentro del espacio periplásmico. Sin embargo, en la membrana externa no existe una fuente directa de energía que facilite los procesos activos, debido a que la membrana externa no puede mantener un gradiente electroquímico y el periplasma carece de reservas de ATP. El único mecanismo conocido para la transferencia de energía a la membrana externa lo constituye el sistema TonB, que transduce la fuerza protón motriz, generada por el gradiente electroquímico a través de la membrana citoplasmática, hacia los receptores de la membrana externa en forma de energía mecánica (revisión en Postle, 1993). Esta energía necesaria para el proceso de traslocación de los respectivos ligandos.

a) El sistema ExbBDTonB.

Una característica común de muchos sistemas de transporte de hierro en *Escherichia coli* y otras bacterias gram-negativas es su dependencia del sistema TonB. El complejo de transducción de energía dependiente de TonB consta de tres proteínas: TonB, ExbB y ExbD, donde la proteína TonB funciona como un verdadero transductor de energía que acopla la fuerza protón motriz de la membrana citoplasmática para producir un transporte activo en la membrana externa (Karlsson *et al.*, 1993; Braun, 1995; Letain y Postle, 1997; Kadner, 1990; Moeck y Coulton, 1998), aunque las proteínas ExbB y ExbD son esenciales para el funcionamiento de TonB.

ExbB es una proteína integral de membrana interna que presenta tres segmentos transmembrana (Kampfenkel y Braun, 1993; Karlsson *et al.*, 1993) y cuyo extremo N-terminal se encuentra inusualmente en el periplasma. ExbD es una proteína de membrana interna, que se encuentra anclada a la membrana citoplasmática a través de un segmento transmembrana en el extremo N-terminal y presenta un dominio periplásmico de 101 residuos (Kampfenkel y Braun, 1992). ExbB y ExbD están orientadas topológicamente hacia caras opuestas de la membrana citoplasmática, con la mayoría de ExbB ocupando el citoplasma, y la mayor parte de ExbD ocupando el periplasma.

Las proteínas ExbB de diferentes microorganismos comparten dominios α -hélice transmembrana altamente conservados con otras proteínas ExbB conocidas. Estos dominios incluyen el motivo de la región N-terminal VX₃LX₃SX₃WX₃ (residuos 26-38 de ExbB_{*E.coli*}, residuos 117-129 en ExbB_{*P. putida*} WCS), un dominio abarcado por los residuos 144-152 de ExbB_{*E.coli*} con tres glicinas conservadas, y una región α -hélice rica en alanina entre los residuos 177-191 de ExbB_{*E.coli*}. Se piensa a través de estos dominios ExbB interacciona con TonB y ExbD (Kampfenkel y Braun, 1992; Koebnik, 1993; Larsen *et al.*, 1994; Traub *et al.*, 1993).

Las regiones más conservadas entre las proteínas ExbD son un posible dominio transmembrana en el extremo N-terminal (aproximadamente, residuos 17-40 en *E. coli*), y un dominio periplásmico C-terminal que se cree que interacciona con TonB y ExbB. Algunas posiciones están conservadas en todas las proteínas ExbD secuenciadas hasta la fecha, p. ej. Asp25 y Lei132 en *E. coli* (Braun *et al.*, 1996).

TonB es una proteína periplásmica que se ancla a la membrana citoplasmática a través de su extremo N-terminal (Postle y Skare, 1988; Skare *et al.*, 1989; Karlsson *et al.*, 1993; Traub *et al.*, 1993; Jaskula *et al.*, 1994; Larsen *et al.*, 1994). TonB se expande al espacio periplásmico, llegando a interactuar físicamente con componentes de la membrana externa (Skare *et al.*, 1993), como se deduce de los ensayos de entrecruzamiento químico de TonB con FepA, del hecho de que FhuA puede estabilizar TonB, y de mutaciones en *tonB* supriman mutaciones en receptores de membrana externa. Recientemente se ha observado en *E. coli* que la presencia de enterobactina incrementa la interacción de TonB con el receptor de membrana externa FepA (Higgs *et al.*, 2002). De

hecho, en presencia del ligando, TonB promueve un cambio conformacional en la membrana externa, cambio no observable en ausencia del ligando (Larsen *et al.*, 1999).

La mayor parte de la cadena polipeptídica de TonB (239 residuos) está localizada en el periplasma. Del análisis de su secuencia primaria se infieren tres dominios funcionales confirmados experimentalmente. TonB presenta un dominio N-terminal hidrofóbico con características similares a una secuencia señal, aunque está desprovisto de una diana para peptidasas señal. Este dominio se requiere para la exportación y el posterior anclaje de TonB desde el citoplasma a la membrana citoplasmática (Skare *et al.*, 1989), para el entrecruzamiento con ExbB *in vivo* (Jaskula *et al.*, 1994; Larsen *et al.*, 1994), y para la respuesta conformacional de TonB a la fuerza proton motriz (Larsen *et al.*, 1999; Larsen y Postle, 2001). El dominio central hidrofílico tiene un alto contenido en prolina (el 17% del total de aminoácidos) y se extiende de las posiciones 70 a 102 en *E. coli* (Larsen *et al.*, 1993). Su conformación elongada, estructuralmente rígida, estaría de acuerdo con un posible papel en la extensión de TonB hacia la membrana externa a través del espacio periplásmico (Evans *et al.*, 1996; Brewer *et al.*, 1990; Larsen *et al.*, 1993). El alto contenido en prolina es responsable de la migración anómala de la proteína TonB en geles de SDS-poliacrilamida. Mutantes que presentan deleciones de más de 30 aminoácidos en este dominio conservan el fenotipo silvestre, y sólo manifiestan un fenotipo mutante en circunstancias de la expansión del espacio periplásmico, p. ej. debido a un aumento en la presión osmótica (Larsen *et al.*, 1993). El dominio C-terminal hidrofóbico contiene estructuras transmembranas potenciales anfipáticas (Klebba *et al.*, 1993) y recientemente se ha visto que cristaliza como un dímero, aunque no está claro si el dímero representa un estado funcional de la proteína (Chang *et al.*, 2001). En *E. coli*, la interacción de TonB con receptores de la membrana externa se produce través de los 65 residuos finales de este dominio, necesarios además para la asociación de TonB con la membrana externa (Letain y Postle, 1997). Recientemente se han identificado dos sitios adicionales de contacto de TonB_{*E. coli*} con la membrana externa, distintos a los receptores de membrana externa ya estudiados, a saber, las proteínas asociadas al peptidoglicano Lpp y OmpA (Higgs *et al.*, 2002). Esto sugiere que la asociación de TonB con la membrana externa podría estar mediada por este par de proteínas, proporcionando sitios de anclaje antes o después del proceso de transducción de energía.

ExbB y ExbD funcionan como una unidad (Ahmer *et al.*, 1995), habiéndose propuesto que ExbB y ExbD funcionen juntas como un transductor de señales (Postle, 1993), donde los dominios solubles prominentes en cada proteína (88 residuos en ExbB y 98 en ExbD, en las secuencias de *E. coli*) podrían servir como sitios de interacción con otras proteínas, posiblemente TonB en el caso de ExbD, y proteínas citoplasmáticas desconocidas en el caso de ExbB.

La asociación de TonB con la membrana citoplásmática requiere de la presencia de las dos proteínas de membrana citoplásmica, ExbB y ExbD (Letain y Postle, 1997; Held y Postle, 2002), de las cuales depende la actividad de TonB (Hantke y Zimmerman, 1981; Skare y Postle, 1991). Ambas proteínas interactúan físicamente con TonB, como evidencian ensayos de entrecruzamiento químico *in vivo* (Skare *et al.*, 1993; Larsen *et al.*, 1994; Higgs *et al.*, 1998).

Varios resultados convergentes conducen a la conclusión de que TonB, ExbB y ExbD forman un complejo en la membrana interna. En mutantes *exbB* y *exbD*, no sólo la función de TonB está alterada sino que también TonB es inestable (Ahmer *et al.*, 1995; Fischer *et al.*, 1989; Skare y Postle, 1991). La estabilidad de ExbD también decrece en ausencia de ExbB (Karlsson *et al.*, 1993). En ensayos de entrecruzamiento químico con formaldehído realizado en mutantes *exbB* (Skare *et al.*, 1993) o cuando el anclaje de TonB fue reemplazado (Jaskula *et al.*, 1994), no se detectó el complejo TonB-ExbB. También se ha observado que una mutación puntual en el segmento transmembrana de TonB puede ser parcialmente suprimida por una mutación en el primer segmento transmembrana de ExbB, sugiriendo así que el anclaje de TonB puede interactuar con el primer segmento transmembrana de ExbB (Larsen *et al.*, 1994). Estos datos genéticos y bioquímicos fueron confirmados mediante una demostración *in vitro* de la interacción entre ExbD y TonB con la proteína ExbB con cola de histidina (Braun *et al.*, 1996). Más aún, un mutante puntual ExbD (D25N), compite con el ExbD silvestre, sugiriendo así que la región C-terminal puede estar involucrada en la interacción con ExbB y/o TonB (Braun *et al.*, 1996). Para concluir, las tres proteínas ExbB, ExbD y TonB interactúan a través de sus segmentos transmembrana, aunque no han podido ser descartarse interacciones entre otros dominios de las proteínas.

Mecanismo de transducción de energía dependiente de TonB

El ciclo que experimenta TonB según Larsen *et al.* (1999) se esquematiza en la **Figura I.10** y puede resumirse como sigue: en la primera etapa del ciclo de transducción energética **(1)**, la fuerza protón motriz es utilizada para conducir la transición de TonB de la conformación “descargada” a la “cargada” (contiene energía)(Larsen *et al.*, 1994 y 1999).

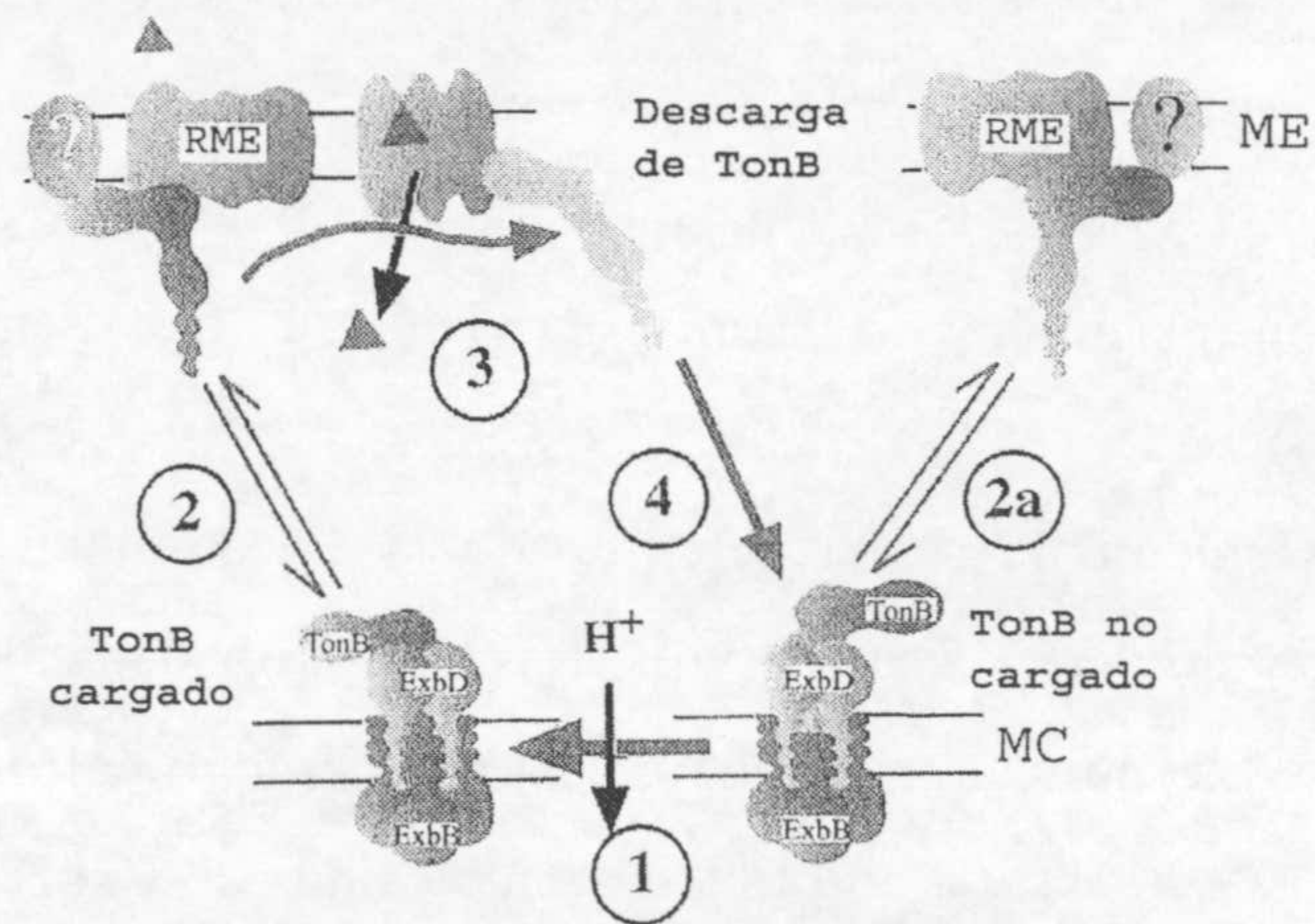


Figura I.10. Modelo de transducción de energía dependiente de TonB. El mecanismo de transducción de energía mediada por TonB se describe en el texto. Abreviaturas: RME, receptor de membrana externa; ?, proteínas de la membrana externa aún sin identificar; MC, membrana citoplasmática; ME, membrana externa. (Adaptado de Larsen *et al.*, 1999).

En una segunda etapa **(2)**, la proteína TonB “cargada” interacciona con componentes de la membrana externa. Esta interacción física fue evidenciada por primera vez *in vivo* por entrecruzamiento químico de TonB con el receptor de membrana externa FepA (Skare *et al.*, 1993). Estas interacciones requieren una región contenida en los 65 residuos C-terminal de TonB (Larsen *et al.*, 1997; Letain y Postle, 1997) y de las proteínas ExbB y ExbD (Held y Postle, 2002) **(2a)**.

En la tercera etapa del ciclo **(3)**, TonB libera su energía potencial almacenada y asume su conformación “descargada”, conduciendo a cambios conformacionales en el receptor de membrana externa que conduce a la liberación del ligando hacia dentro del espacio periplásmico. Tras la transferencia de energía al receptor **(4)**, TonB adquiere una conformación “descargada”, a partir de la cual se inicia de nuevo el ciclo, gracias a una nueva interacción con el complejo ExbB/ExbD.

Una dificultad conceptual presente en los modelos mediante los cuales se explica cómo TonB expande el periplasma e interacciona directamente con los receptores de membrana externa es el "dilema de la estequiometría" (Klebba *et al.*, 1993). La síntesis de TonB está regulada por hierro (Postle, 1990b), pero aún cuando su expresión es máxima, la cantidad de TonB debería ser al menos un orden de magnitud menor que la del número de receptores a los que asistirá. Un complejo TonB debe interaccionar presumiblemente con muchos receptores de membrana externa, pero el cómo no está claro. Los receptores no difunden lateralmente de forma rápida en la membrana externa, y es difícil visionar al dominio periplásmico de TonB moviéndose fácilmente a través de la capa de peptidoglicano.

Recientemente se ha determinado la estequiometría de las proteínas del sistema TonB de *E. coli*: TonB:ExbD:ExbB, 1:2:7 aproximadamente (Higgs *et al.*, 2002). Este dato unido a la determinación de que el extremo C-terminal de TonB cristaliza como dímero (Chang *et al.*, 2001) y a que todas las moléculas de ExbB estarían complejadas con todas las moléculas ExbD en una relación desbalanceada (Held y Postle, 2002), el complejo de membrana interna de transducción de energía estaría constituido por 2 proteínas TonB, de 4 a 5 proteínas ExbD y de 14 a 15 proteínas ExbB, y tendría una masa molecular de 520 kDa (Held y Postle, 2002).

Implicación del sistema TonB en el transporte de otras moléculas (toxinas, antibióticos).

El sistema TonB también podría funcionar como un sistema de transducción de energía para la expulsión de ciertas moléculas (Howard *et al.*, 1996; Poole *et al.*, 1996a; Zhao *et al.*, 1998). En *Aeromonas hydrophila* se ha visto que TonB juega un papel en la secreción de la exotosina aerolisina, aunque no está claro si su rol es directo o es a través de otra proteína (Howard *et al.*, 1996).

La resistencia intrínseca de *P. aeruginosa* a antibióticos se debe, en parte, al funcionamiento de dos sistemas de expulsión de múltiples antibióticos, pertenecientes a la familia RND. Dichos sistemas están codificados por los operones *mexAB-oprM* y *mexCD-oprJ* (Gotoh *et al.*, 1995; Li *et al.*, 1995; Poole *et al.*, 1993; Poole *et al.*, 1996a), donde *mexA* y *mexC* codifican una proteína de fusión periplásmica, *mexB* y *mexD* codifican el

transportador de membrana interna, y *oprM* y *oprJ* codifican una proteína de membrana externa que forma un tunel que facilita el transporte de antibióticos a través de la membrana externa (Gotoh *et al.*, 1995; Masuda *et al.*, 1995; Poole *et al.*, 1993; Koronakis *et al.*, 2000). Un mutante *tonB1* de *P. aeruginosa* deficiente en la incorporación de ferrisideróforos (Poole *et al.*, 1996; Tasake *et al.*, 2000) es susceptible a una amplia variedad de antibióticos, un fenotipo común a mutantes en el operón *mexAB-oprM*. Este comportamiento no está relacionado con la influencia que la mutación *tonB* pudiera tener sobre el estado de hierro en la célula y, de hecho, la susceptibilidad intrínseca a antibióticos y la expresión de *mexAB-oprM* no se vieron afectadas por los niveles de hierro en el medio de cultivo (Poole *et al.*, 1996; Tasake *et al.*, 2000). Así, la presencia de *tonB* en un plásmido multicopia incrementó el nivel de resistencia de la cepa MexAB-OprM⁺ a una variedad de agentes antimicrobiológicos, pero no el de una cepa MexAB-OprM⁻. Sin embargo, la expresión de *mexAB-oprM* no se vio alterada en un mutante con una delección de *tonB*, indicando que cualquier influencia de TonB sobre la resistencia a antibióticos mediada por MexAB-OprM actuaba a nivel de la funcionalidad del sistema de eflujo. Esto sugiere que los componentes de membrana externa de las bombas, OprM y OprJ, también podrían formar canales dependientes de TonB al igual que los receptores de ferrisideróforos. Alternativamente, un defecto en *tonB* podría tener un efecto indirecto sobre la actividad de la bomba MexAB-OprM, no relacionado con una influencia sobre la actividad de canal de la proteína de membrana externa (Wong y Hancock, 2000).

La susceptibilidad a antibióticos de una cepa con delección de *mexAB-oprM* fue incrementada seguidamente de una delección de *tonB*, sugiriendo que TonB puede también influir en la resistencia a antibióticos mediada por otros factores aparte de MexAB-OprM (y MexCD-OprJ). De esta forma, TonB juega un importante papel tanto en la resistencia intrínseca como en la inducida a antibióticos en *P. aeruginosa*. Así, aunque comprometida por su ausencia, parece que la resistencia a antibióticos mediada por MexAB-OprM no es absolutamente dependiente de TonB. La existencia de un segundo gen *tonB* en *P. aeruginosa* (*tonB2*, Zhao y Poole, 2000), podría explicar la falta de efecto de una delección *tonB* sobre la resistencia a antibióticos de cepas *nalB* y *nfxB* (Zhao *et al.*, 1998).

Comparación de los sistemas Ton y Tol.

El sistema Tol, al igual que el sistema TonB, está implicado en el transporte y la susceptibilidad de las células bacterianas a ciertas colicinas y fagos (Webster, 1991). Los dos sistemas de entrada de biopolímeros, compuestos por las proteínas TolA-TolQ-TolR y TonB-ExbB-ExbD, respectivamente, están funcional y evolutivamente relacionados. Las proteínas TolQ y TolR parecen transducir la fuerza protón motriz (f.p.m.) a TolA mediante un mecanismo probablemente homólogo a la transducción de la f.p.m. a TonB por parte de ExbB y ExbD (Cascales *et al.*, 2001). Al igual que las proteínas del complejo Tol de membrana interna, las proteínas del sistema TonB interaccionan entre sí formando multímeros (dímeros y trímeros) (Higgs *et al.*, 1998). También se ha descrito homología funcional de estos sistemas con el sistema Mot que forma el motor del flagelo (Braun *et al.*, 1999; van Way *et al.*, 2000).

Existe conservación en la secuencia aminoacídica y en la topología de los pares ExbB/TolQ y ExbD/TolR, con una identidad del 26,3 y 25%, respectivamente y una similitud del 79,1 y 70%, respectivamente en *E. coli* (Eick-Helmerich y Braun, 1989). Las proteínas TolQ y TolR pueden sustituir parcialmente (10% de la actividad total) a ExbB y ExbD, respectivamente y son responsables de la actividad residual del sistema TonB cuando las proteínas ExbB y ExbD están ausentes (Bradbeer, 1993; Braun, 1989; Braun y Herrmann, 1993). ExbB y ExbD pueden igualmente compensar a TolQ y TolR en la traslocación mediada por TolA. Dobles mutantes *exbB tolQ* y *exbD tolR* en *E. coli* son completamente tolerantes a colicinas, y el transporte dependiente de TonB para la vitamina B₁₂ y los sideróforos no tiene lugar (Braun, 1989; Braun y Herrmann, 1993). TolA y TonB únicamente presentan similitud de secuencia en su segmento transmembrana y, aunque sus estructuras son diferentes, ambos poseen conformaciones alargadas. Mientras que el dominio central de TolA presenta estructura de α -hélice (Deroiche *et al.*, 1999; Levensgood *et al.*, 1991), el dominio equivalente de TonB presenta una secuencia rica en prolina (Evans *et al.*, 1986; Postle y Good, 1983). Recientemente, gracias a la determinación de la estructura del dominio periplásmico de TolA en *P. aeruginosa*, se ha propuesto que las proteínas TolA y TonB están evolutivamente relacionadas (Witty *et al.*, 2002).

b) Proteínas receptoras de membrana externa.

Los receptores específicos de alta afinidad para ferrisideróforos son proteínas de alto peso molecular (entre 74 y 83 kDa), cuyas constantes de disociación se sitúan en el intervalo micromolar e incluso nanomolar, y cuyo número alcanzar las 100.000 copias por célula. Algunos ejemplos de estos receptores en bacterias los constituyen, en *E. coli*, FepA para ferrienterobactina; IutA para ferriaerobactina; FhuA para ferricromo, ferricrocina y ferricrisina, todos ellos sideróforos producidos por hongos; FhuE para coprogen, ferrioxamina B y ferrirodotorulato, hidroxamatos sintetizados por hongos; FecA para citrato férrico; BtuB para vitamina B₁₂; y Fiu y Cir para quelatos férricos de catecoles monoméricos (DHB y DBS). En *P. aeruginosa*, existen los receptores FptA y FpvA para ferripiochelina y ferripioverdina (también llamada ferripseudobactina), y PfeE para ferrienterobactina. En *P. putida* WCS358, se han encontrado PupA para ferripseudobactina y PupB, para ferripseudobactinas heterólogas (ver revisiones en Earhart, 1996; van der Helm, 1998). Muchos microorganismos tienen múltiples receptores para diferentes complejos Fe³⁺-sideróforo. Alternativamente, un ferrisideróforo en concreto puede ser incorporado por diferentes microorganismos (Postle, 1993; Braun, 1995). Estas proteínas de membrana externa actúan como receptores, no sólo de ferrisideróforos sino también de colicinas del grupo B (Lazdunski *et al.*, 1998; 2000) y bacteriófagos filamentosos (Hancock y Braun, 1976; Postle, 1990a; Vostrov *et al.*, 1996).

La mayoría de los receptores de membrana externa dependientes de TonB, así como las colicinas del grupo B, poseen una secuencia consenso, altamente conservada, localizada en el extremo N-terminal, llamada caja TonB, cuya longitud varía según la fuente (entre 5, 7 u 8 aminoácidos) (Pressler *et al.*, 1988; Gudmundsdottir *et al.*, 1989; Cadieux *et al.*, 2000). Esta zona constituye el punto de contacto entre el receptor con el extremo carboxilo de la proteína TonB (Skare *et al.*, 1993; Heller *et al.*, 1988). Parece ser que el motivo PXYP de TonB (donde X es A-127; Q-168 y G-233; e Y es S-128; Y-169 y K-234, en *E. coli*) está conservado en la mayoría de las proteínas TonB e interacciona con las cajas TonB de los receptores de membrana externa, lo cual estaría de acuerdo, con la similitud encontrada entre las cajas TonB de los receptores de *E. coli* y los receptores de sideróforos de *Bordetella*. Existen evidencias directas de estas interacciones y de su papel en la

transducción de energía. Así, mutaciones en las cajas TonB de BtuB, FhuA y Cir permiten uniones normales con TonB, pero son incapaces de transportar sus respectivos ligandos. Dichas mutaciones pueden ser suprimidas parcialmente por mutaciones en el dominio periplásmico de TonB (Bell *et al.*, 1990; Heller *et al.*, 1988; Schöffner y Braun, 1989). Por otra parte, se ha observado que la adición de un pentapéptido de caja TonB sintético a células en crecimiento inhibe procesos dependientes de TonB (Tuckman y Osburne, 1992). Esto sugiere con gran probabilidad que la proteína TonB interaccione directamente con los receptores de membrana a través de su caja TonB. Sin embargo, hay excepciones a esta regla, ya que por ejemplo, ViuA, el receptor de vibriobactin en *V. cholerae*, pese a ser dependiente de TonB no tiene una caja TonB obvia (Bose *et al.*, 2002).

6.1.4. Entrada al citoplasma.

Los complejos ferrisideróforos y la vitamina B₁₂ entran en el citoplasma a través de sistemas de transporte pertenecientes a la subfamilia de transportadores tipo ABC (del inglés ATP-binding cassette). Estos sistemas constan de una proteína de unión periplásmica y un complejo de membrana interna, constituido a su vez por una proteína de unión a ATP y proteínas integrales de membrana interna (ver **Tabla I.1**). El transporte está acoplado a una fuente primaria de energía, en este caso se trata de la reacción química que produce la hidrólisis de ATP (Ames, 1986; Higgins *et al.*, 1990). Las proteínas de unión periplásmicas son monómeros estables, específicos de sustrato, que realizan cambios conformacionales grandes cuando se unen a sus ligandos (Ames, 1986; Quioco, 1990), y posteriormente los presentan al resto del complejo de membrana interna. Para un ensamblaje completo y un funcionamiento perfecto, estos transportadores sólo precisan una proteína receptora de membrana externa y una proteína TonB funcional.

Tabla I.1. Componentes del sistema ABC de transporte de algunos ferrisideróforos.

Ligando (ferrisideróforo)	Proteína de unión periplásmica	Proteína de unión a ATP	Proteínas integrales de membrana interna
Fe-enterobactina	FepB	FepC	FepD, FepG
Fe-dicitrato	FecB	FecE	FecC, FecD
Fe-hidroxiatos ^a	FhuD	FhuC	FhuB

^a Ejemplos de sideróforos de tipo hidroxamato: aerobactina, desferriferrocromo, coprogen, ácido rodotorúlico, ferrioxamina B. (Información obtenida de Earhart, 1996).

6.1.5. Liberación del hierro del complejo ferrisideróforo.

El destino intracelular de los complejos de ferrisideróforo no está muy bien caracterizado y parece depender del sideróforo en cuestión. Así, la enterobactina y el desferriferricromo sólo son funcionales una vez, tras lo cual son modificados a formas menos activas (Hartmann y Braun, 1980; Brickman y McIntosh, 1992). En cambio, la aerobactina puede ser reutilizada bajo ciertas condiciones (Braun *et al.*, 1984). Debido a que Fe^{2+} se une a los sideroforos con menor afinidad que el Fe^{3+} , y puesto que Fe^{2+} es la forma en la que el hierro existe en el citoplasma, en varias ocasiones se ha propuesto como mecanismo de liberación una reducción enzimática de hierro, por ejemplo, en el caso del ferricromo (Hartmann y Braun, 1980). De hecho, se han detectado ferrisideróforo reductasas en hongos, levaduras y en bacterias, tanto gram-positivas como gram-negativas, por ejemplo, en *E. coli*, *P. aeruginosa* y *H. pylori* (Fischer *et al.*, 1990; Halle y Meyer, 1992a, 1992b; Velayudhan *et al.*, 2000). A diferencia del ferricromo, la enterobactina es digerida enzimáticamente durante el proceso de liberación de su ion de hierro, por la acción del producto del gen *fes* (enterobactina esterasa). *Fes* es la única proteína conocida con un papel específico en la liberación de hierro de un sideroforo (Brickman y McIntosh, 1992).

6.2. Sistemas de transporte de hierro (III) de baja afinidad.

Cuando la concentración de hierro en el medio es mayor o igual a 5-10 μM , los sistemas de importación de hierro de alta afinidad están reprimidos, y funcionan en su lugar los de baja afinidad (Earhart, 1996; Neilands, 1981b). Estos sistemas de transporte aún no están completamente caracterizados, pero existen varias hipótesis acerca de posibles formas de transporte. A estas concentraciones, tanto Fe^{2+} como Fe^{3+} aparecen formando oxihidroxipolímeros bastante insolubles, de fórmula general FeOOH . Es posible que algunos de los átomos de la superficie de estos polímeros puedan estar menos firmemente unidos y así estar más accesibles para la célula. Otra alternativa consiste en la posible presencia de sitios de unión a metal en la superficie celular (Neilands, 1981b). También se ha visto que moléculas pequeñas encontradas en sobrenadantes de cultivos, como los monocatecolatos DBS y DHB, alfa-cetoácidos y alfa-hidroxiácidos como los ácidos ascórbico o salicílico, podrían funcionar como sideroforos, favoreciendo la disolución de estos polímeros férricos, y facilitando la asimilación de hierro en las células (Earhart, 1996; Visca *et al.*, 1993).

6.3. Regulación de la expresión de los sistemas de transporte de hierro.

La producción de componentes celulares que son responsables de la utilización de hierro está controlada por varios parámetros que actúan bajo diferentes condiciones fisiológicas y ambientales. Un control importante lo ejerce directamente el propio metal, de manera que altas concentraciones de hierro originan un corte en la expresión de muchos genes involucrados en la entrada de hierro. Este efecto ocurre junto a la proteína Fur, que actúa como un represor. El otro mecanismo de control actúa una vez que la bacteria encuentra condiciones de limitación de hierro, de modo que este estatus ambiental es transducido al citosol celular, poniéndose en marcha mecanismos de regulación positiva.

6.3.1. Mecanismos de regulación negativa por hierro.

Hay dos familias de proteínas que gobiernan la regulación del metabolismo del hierro en bacterias, Fur y DtxR.

a) La proteína Fur.

Cambios en la disponibilidad de hierro en el medio y la presencia de la proteína Fur regulan la transcripción de casi todos los genes implicados en la entrada de hierro a la célula mediada por sideróforos, incluido *tonB* (Postle, 1990b). La proteína Fur (del inglés *ferric uptake regulator*) es un regulador de la transcripción que utiliza como co-represor el ion ferroso, Fe^{2+} (Bagg y Neilands, 1987). Fur tiene una afinidad por Fe^{3+} significativamente baja. Fur controla la expresión de muchos genes y operones en *E. coli* (Hantke y Braun, 1998), principalmente de aquéllos implicados directamente en la entrada de hierro a la célula, como pueden ser sideróforos, receptores de membrana externa y proteínas del sistema ABC. Otras funciones en las que interviene Fur y que no están relacionadas directamente con el transporte de hierro son: rutas generales del catabolismo (Hantke, 1987b; Stojilkovic *et al.*, 1994), respiración aeróbica (Postle, 1990b), síntesis de aminoácidos y precursores de ADN (ribonucleótidos y desoxirribonucleótidos) (Prodromou *et al.*, 1992), metabolismo de azúcares (glicolisis y síntesis de alginato) (Venturi *et al.*, 1993; Roychoudhury *et al.*, 1992; Schlichtman *et al.*, 1994), protección frente a radicales de oxígeno (Compan y Touati, 1993; van Vliet *et al.*, 1999), producción de toxinas y otros factores de virulencia (Calderwood y Mekalanos, 1987; Litwin y Calderwood, 1993),

Introducción

respuesta a shock ácido (Hall y Foster, 1996), ensamblaje de flajelos y quimiotaxis (Karjalainen *et al.*, 1991), movimiento de tipo "swarming" (McCarter y Silverman, 1989) y bioluminiscencia (Makemson y Hastings, 1982). Recientemente se han descrito nuevos *loci* regulados por Fur en los genomas de *E. coli*, *S. typhimurium* y *Pseudomonas aeruginosa* de función desconocida, mediante ensayos de tipo FURTA (del inglés, Fur titration assays), de tipo SELEX (del inglés, systematic evolution of ligands by exponential enrichment) y el array de oligonucleótidos GeneChip® (Stojiljkovic *et al.*, 1994; Tsolis *et al.*, 1995; Ochsner y Vasil, 1996; Vassinova y Kozyrev, 2000; Ochsner *et al.*, 2002).

En condiciones de abundancia de hierro, la unión de Fe^{2+} a la proteína Fur induce un cambio conformacional en el dominio de unión a ADN de la proteína (Coy y Neilands, 1991) que le permite unirse a secuencias diana de ADN e inhibir así la transcripción de casi todos los genes y operones regulados por el metal (Bagg y Neilands, 1987; de Lorenzo *et al.*, 1987; Griggs y Konisky, 1989). Estas secuencias se denominan cajas Fur o cajas de hierro, y están localizadas entre las posiciones -10 y -35, y presentan una secuencia consenso de naturaleza palindrómica 5' GATAATGATAATCATTATC 3' (Calderwood y Mekalanos, 1987; de Lorenzo *et al.*, 1987). Esta secuencia fue posteriormente reinterpretada como la combinación de tres motivos de secuencia 5' NAT(A/T)AT 3' (Escolar *et al.*, 1999). Recientemente, se ha propuesto que la caja Fur de 19 pb resulta del solapamiento de dos repeticiones de heptámeros invertidos [(7-1-7)₂] (Baichoo y Helmann, 2002), donde el motivo 7-1-7 es la mínima unidad que se necesita para el reconocimiento de alta afinidad de Fur. En condiciones de escasez de hierro, Fur libera los átomos de Fe^{2+} y se desliga del ADN, con lo cual, la ARN polimerasa puede acceder a los promotores de los genes implicados en la biosíntesis y transporte de sideróforos, permitiendo su expresión (Griggs y Konisky, 1989; Klebba *et al.*, 1982).

La proteína Fur de *E. coli* es un polipéptido de 16,8 kDa que constituye un dímero en solución, ya sea en presencia o en ausencia de Fe^{2+} (Coy y Neilands, 1991; Michaud-Soret *et al.*, 1997), aunque se ha demostrado que Fur es capaz de multimerizar a través de interacciones proteína-proteína (Le Cam *et al.*, 1994). La proteína Fur presenta dos dominios: el dominio N-terminal, con un motivo hélice-giro-hélice típico de proteínas represoras, que está implicado en la unión a ADN (Stojiljkovic y Hantke, 1995), y el

dominio C-terminal, con dos sitios de unión a metal, requerido para la dimerización. En *E. coli*, uno de los sitios de unión a metal de Fur está ocupado *in vivo* por Zn^{2+} (Althaus *et al.*, 1999; Jacquamet *et al.*, 1998), que se une tetrahédricamente a dos residuos de cisteína y a dos átomos de nitrógeno u oxígeno. Estos residuos de cisteína no están presentes en las proteínas Fur de *Pseudomonas* y otras bacterias relacionadas (Saito *et al.*, 1991).

La expresión de TonB está regulada por la disponibilidad de hierro y por la proteína Fur. Se han encontrado dos sitios potenciales de unión a Fur cerca de la región promotora de *tonB*, uno localizado entre las posiciones -10 y -35 del promotor de *tonB* y otro centrado en la posición +26 (Postle y Good, 1983; Postle, 1990b). En condiciones de abundancia de hierro, Fur ejerce la represión por unión a uno solo de los sitios, entre las regiones -10 a -35, tanto en condiciones aeróbicas como anaeróbicas. La represión transcripcional de *tonB* es mayor en condiciones anaeróbicas que en aeróbicas (Young y Postle, 1994).

b) La proteína DtxR.

En bacterias gram-positivas con alto contenido en G+C en su ADN (streptomicetes, corynebacteria, staphylococos y micobacterias) la entrada de hierro y las funciones de respuesta a estrés oxidativo están reguladas por proteínas pertenecientes a una familia de reguladores relacionados con hierro distinta de Fur, cuyo prototipo es la proteína DtxR. DtxR es el regulador de los genes *tox* responsables de la producción de la toxina de la difteria, que se expresa en condiciones de escasez de hierro (Boyd *et al.*, 1990). La familia de reguladores a la que pertenece DtxR regula un conjunto de genes similar al regulado por Fur en muchas bacterias gram-negativas y en otras bacterias gram-positivas con bajo contenido en G+C, como *Bacillus subtilis*.

Estudios de la estructura terciaria revelan que DtxR se une como dímero a lados opuestos del operador *tox* (White *et al.*, 1998). Aunque no haya similitud entre las secuencias de Fur y DtxR (la secuencia consenso de unión a ADN que identifica DtxR difiere de la caja Fur), sí existe similitud a nivel estructural: ambos son represores de unión a ADN dependientes de Fe^{2+} que presentan en el extremo N-terminal un sitio de unión a ADN, un motivo hélice-giro-hélice típico, y un extremo C-terminal con un dominio responsable de la dimerización y de la unión a metales. En ambos casos existen dos sitios de unión a metales, que unen hierro *in vivo* y son importantes para la actividad represora

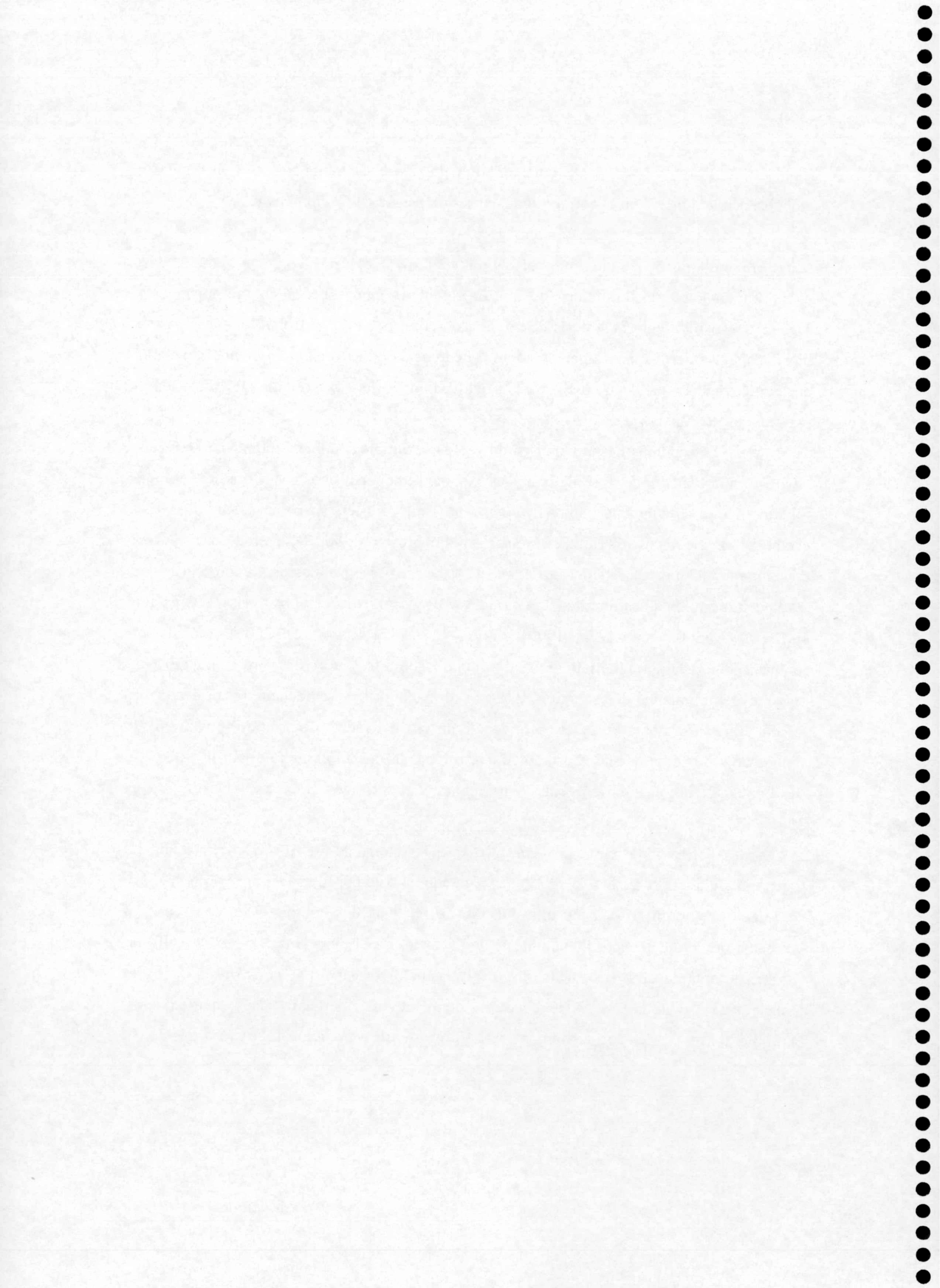
(Pohl *et al.*, 1999a y 1999b). Al igual que Fur, DtxR debe funcionar como un regulador global sensible a hierro en el control de la expresión génica en *C. diphtheriae*.

6.3.2. Mecanismos de regulación positiva por hierro.

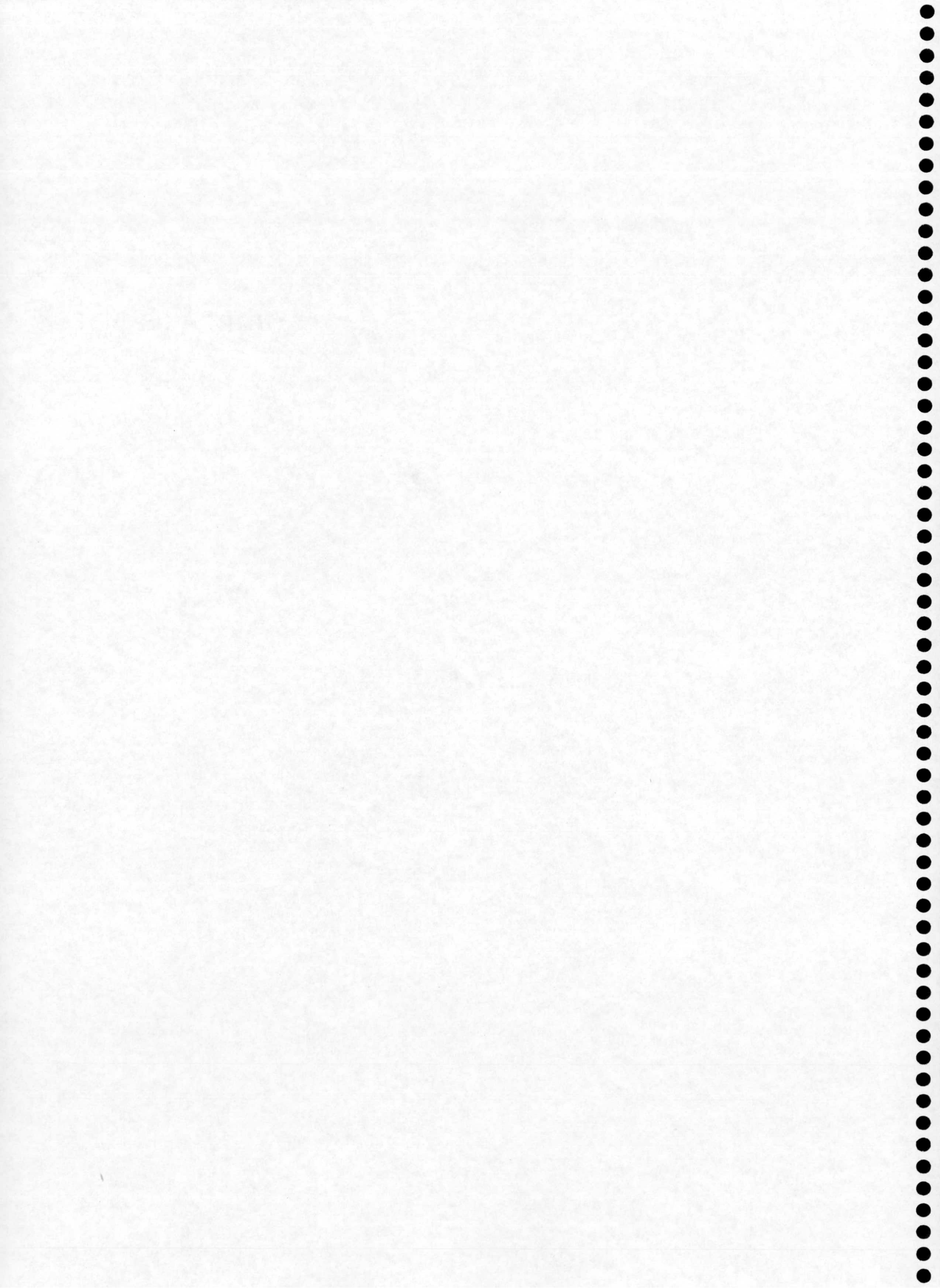
En condiciones limitantes de hierro, algunos sistemas necesitan mecanismos de regulación positiva para la síntesis de proteínas de transporte de hierro y/o enzimas para la biosíntesis de sideróforos. La percepción de la carencia de hierro en el ambiente inmediato, de alguna manera ha de traducirse en la activación de la transcripción de los sistemas particulares de transporte de hierro.

Así, Fur además de su papel como represor, también funciona como un activador positivo en la transcripción de algunos genes, como por ejemplo, los genes implicados en la tolerancia a un choque ácido en *S. typhimurium* (Hall y Foster, 1996); en la entrada y/o el catabolismo del succinato (Hantke, 1987b), en la expresión de *sodB* (superóxido dismutasa dependiente de hierro) (Niederhoffer *et al.*, 1990), en la producción de proteínas que contienen hierro en su estructura (fumarasas A y B, y aconitasa A), y las ferritinas Bfr y Ftn en *E. coli* (Abdul-Tehrani *et al.*, 1999), y Pfr en *H. pylori* (Delany *et al.* 2001). Análisis por footprint muestran la unión de Fur al promotor de Pfr y cómo la presencia de Fe^{2+} disminuye la eficiencia de esa unión. Esro constituye la primera evidencia de la interacción directa entre la proteína Fur y el promotor de un gen activado (o reprimido) por hierro, y supone un modelo en el cual el estado del hierro de la proteína Fur altera de forma diferente su afinidad de unión tanto en genes reprimidos como activados por hierro (Delany *et al.*, 2001).

Otros situaciones de regulación positiva dependiente de hierro son: i) el sistema de transporte de dicitrato de hierro en *E. coli*, regulado no sólo por hierro y por la proteína Fur, sino además por un sistema de transducción de señal de dos componentes que sensa la presencia de citrato ferrico; ii) la síntesis de un factor de virulencia en *V. cholerae*; iii) el sistema de entrada de hierro mediado por el plasmido pJM-1 de *V. anguillarum*; y iv) la inducción *in vivo* de la síntesis de receptores de membrana externa, mediada, aparte de por el propio hierro, por los correspondientes sideróforos en *Pseudomonas* (ver Crosa, 1997).



OBJETIVOS



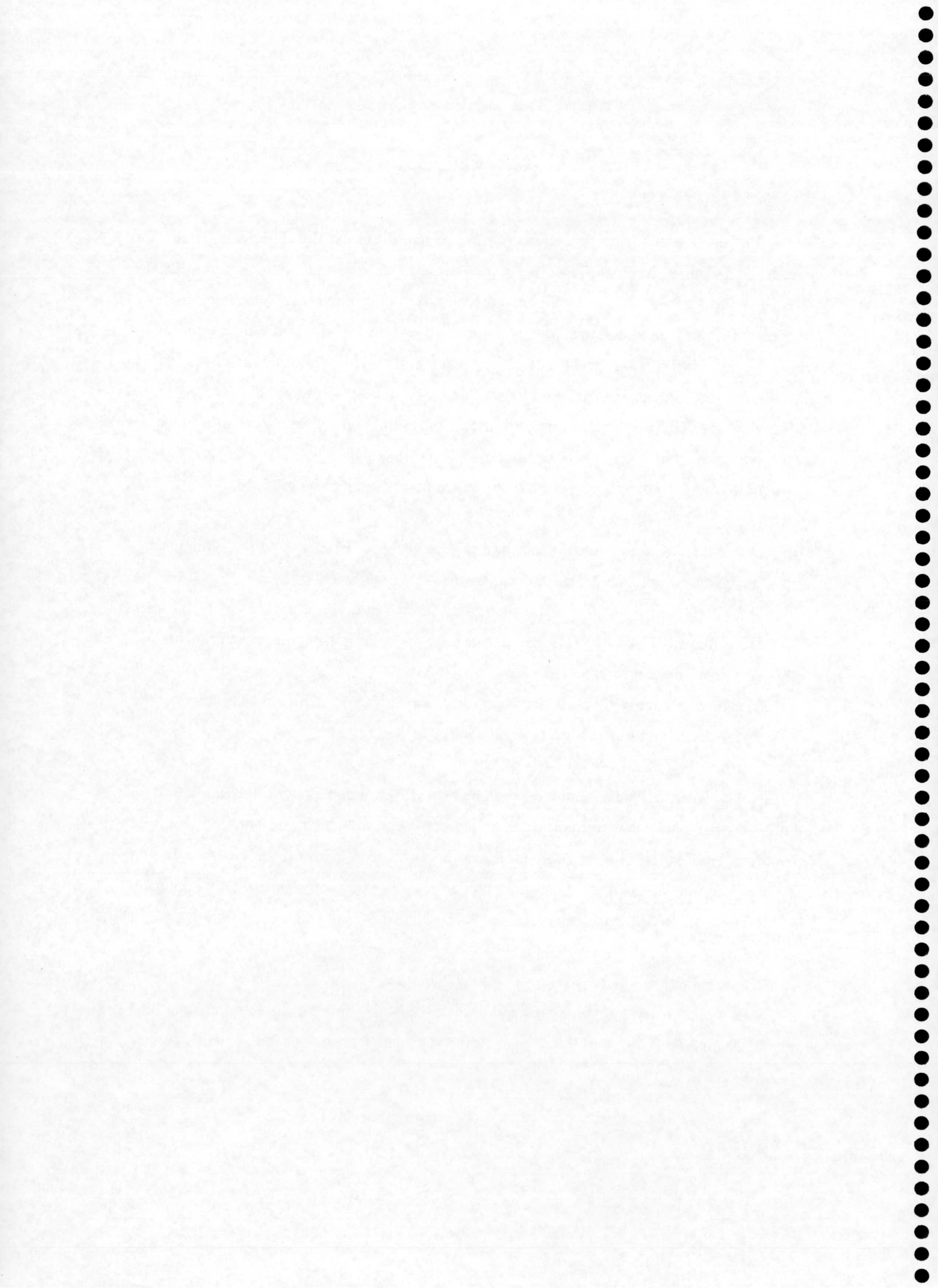
OBJETIVOS

En trabajos anteriores en nuestro grupo se abordó el estudio de la ruta catabólica para la degradación aeróbica del tolueno presente en la cepa *Pseudomonas putida* DOT-T1E, una cepa capaz de sobrevivir en presencia de concentraciones supersaturantes de tolueno, así como la caracterización fisiológica de la tolerancia a este hidrocarburo. Sin embargo, la tolerancia de DOT-T1E a los compuestos hidroxilados resultantes de la degradación de tolueno estaba inexplorada. Estos compuestos hidroxilados, p. ej. el *p*-hidroxibenzoato (PHBA), tienen un gran interés industrial como precursores de productos de alto valor añadido. Con objeto de aportar información sobre la tolerancia de DOT-T1E a estos compuestos, en el presente estudio se plantearon los siguientes objetivos:

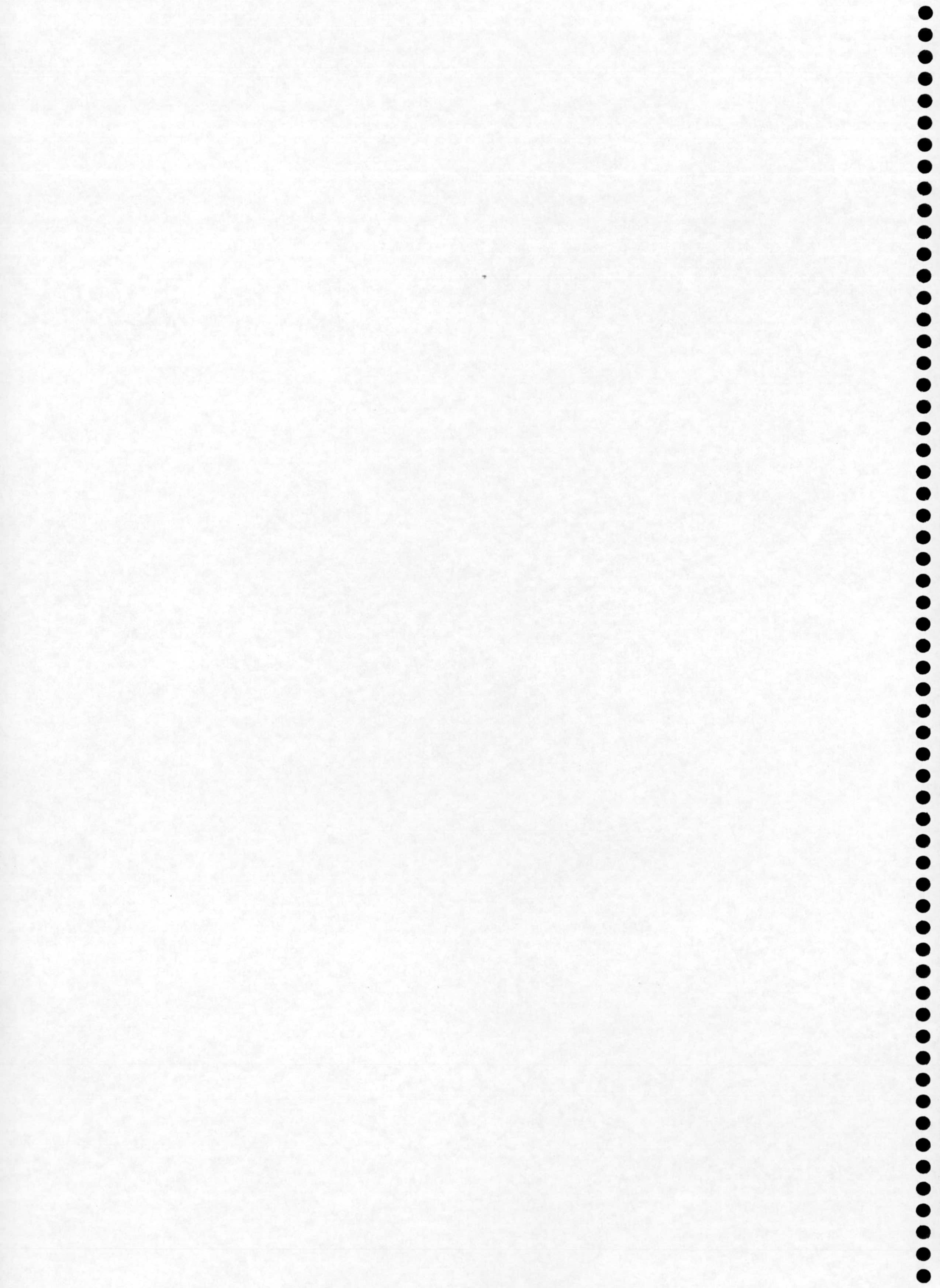
1. La caracterización fisiológica de la tolerancia a PHBA y otros compuestos aromáticos hidroxilados de la cepa *Pseudomonas putida* DOT-T1E.
2. La obtención y caracterización fisiológica de mutantes de *P. putida* DOT-T1E más sensibles a PHBA que la cepa silvestre, en los cuales un hipotético mecanismo de eflujo pudiera estar afectado.
3. La determinación de la secuencia y de la organización génica de las regiones de ADN adyacentes al(los) gen(es) mutado(s).

En el proceso de aislamiento de mutantes de *P. putida* más sensibles a PHBA, se obtuvo un mutante en la proteína ExbD, que pertenece al sistema de energización de membrana externa TonB implicado en el transporte de ferrisideróforos y vitamina B₁₂ en bacterias gram-negativas. Para determinar en qué medida el sistema TonB estaba implicado en la tolerancia a PHBA en la cepa DOT-T1E, se plantearon como siguientes objetivos:

4. La caracterización del sistema TonB en *P. putida*.
5. La construcción de mutantes individuales en cada uno de los componentes del sistema TonB y el estudio de la influencia que tienen estas mutaciones sobre la tolerancia a PHBA.



MATERIALES Y MÉTODOS



1. CEPAS BACTERIANAS Y SU CONSERVACIÓN.

Las cepas bacterianas utilizadas en este trabajo junto con sus genotipos y características más relevantes se recogen en la **Tabla M.1**. La conservación de bacterias a corto y medio plazo se hizo en placas de medios mínimos selectivos a 4°C, mientras que la conservación a largo plazo se hizo por congelación de cultivos líquidos conteniendo 30% (v/v) de glicerol a -70°C.

Tabla M.1. Cepas bacterianas utilizadas en este trabajo.

Cepa	Características relevantes ^a	Referencia
<i>Pseudomonas putida</i>		
DOT-T1E	Rif ^r , Tol ^r , PHBA ⁺	Ramos <i>et al.</i> (1995)
PhoA5	Rif ^r , Km ^r , DOT-T1E <i>exbD::mini-Tn5-'phoA</i> , PHBA ⁻ , Tol ^s	Este trabajo
KT2440	<i>hsdR1</i>	Franklin <i>et al.</i> (1981)
<i>Pseudomonas mendocina</i>		
KR1	protótrofa, PHBA ⁺	Gibson (1988)
<i>Escherichia coli</i>		
HB101	F ⁻ $\Delta(gtp-proA)62 leuB6 supE44 ara14 galK2 lacY1 \Delta(mcrC-mrr) rpsL20 (Sm^r) xyl-5 mtl1 recA13$	Boyer <i>et al.</i> (1969)
DH5 α F'	F ['] <i>endA1 hsdR17 (r_K-m_K⁺) supE44 thi1 recA1 gyrA (Nal^r) relA1 $\Delta(lacIZYA-argF)U169 deoR (\phi80dlacD(lacZ)M15)$</i>	Woodcock <i>et al.</i> (1989) Raleigh <i>et al.</i> (1988)
CC118	$\Delta(ara-leu)araD \Delta lacX74 galE galK phoA20 thi1 rpsE (Sp^r) rpoB (Rif^r) argE recA1$	Manoil y Beckwith (1985)
CC118 λ pir	CC118 lisogenizada con el fago λ pir	Herrero <i>et al.</i> (1990)

Abreviaturas: Km^r, Rif^r: resistente a kanamicina y rifampicina, respectivamente; PHBA⁺, PHBA⁻: crecimiento o ausencia de crecimiento en presencia de 6 g/l PHBA; Tol^r, Tol^s: tolerancia o sensibilidad a tolueno, respectivamente.

2. MEDIOS Y CONDICIONES DE CULTIVO.

Como medio líquido de crecimiento habitual de las cepas bacterianas, tanto *E. coli* como *P. putida*, se utilizó el medio rico Luria-Bertani (LB) (Sambrook *et al.*, 1989). Para el cultivo de células de *P. putida* en medio mínimo se empleó el medio M9 (Sambrook *et al.*, 1989), suplido con una solución de micronutrientes (Abril *et al.*, 1989), Fe-citrato (6 μ g/ml) y la fuente de carbono y energía adecuada.

2.1. Fuentes de carbono.

Azúcares y ácidos carboxílicos: glucosa (20%, p/v), glicerol (60%, p/v), succinato (1 M), citrato (1 M) se prepararon en soluciones concentradas, se esterilizaron en el autoclave, se almacenaron a 4°C y se añadieron al medio hasta alcanzar la concentración final deseada. En el caso de la glucosa, el medio mínimo se suplió con una concentración del 0,5% (p/v).

Compuestos aromáticos: El PHBA se preparó a concentración 1,5 M a pH 7,0 en KOH. El benzoato y los compuestos aromáticos derivados del catabolismo del tolueno se prepararon a concentración 0,5 M a pH 7,0, en solución acuosa, si se partía de la sal soluble, y en KOH si se partía del ácido. Todas las soluciones se esterilizaron en el autoclave y se almacenaron a 4°C y en oscuridad. El tolueno se suministró en la fase gaseosa a través de una atmósfera saturada del mismo, que se generó introduciéndolo en una varilla hueca dentro del matraz de cultivo (en cultivos líquidos), o en una varilla rellena de papel de filtro y depositada sobre la tapa de una placa de Petri invertida (en cultivos sólidos). Para minimizar la evaporación del compuesto aromático, el frasco de cultivo líquido o la placa de Petri se sellaron con tapones de goma o con papel de parafina.

Como medio deficiente en hierro, se utilizó el medio basal MB2 (Gilleland *et al.*, 1974), suplido con glucosa (0,5% p/v) como fuente de carbono. Para eliminar las trazas de hierro, el material de vidrio se lavó con una solución de mezcla crómica (15 g de dicromato potásico en 500 ml de ácido sulfúrico), se enjuagó repetidamente con agua caliente y finalmente con agua desionizada antes de ser utilizado.

Para la preparación del medio LB sólido se añadió bacto-agar (Difco, cat. no. 0140-01) hasta alcanzar una concentración final del 1,5% (p/v) y se esterilizó en el autoclave. En el caso del medio mínimo sólido se añadió al medio mínimo bacto-agar preparado al 2% (p/v) o agar noble 2,25% (p/v) en soluciones acuosas esterilizadas previamente en el autoclave.

Todos los medios y soluciones se esterilizaron por calor húmedo en el autoclave a 120°C y una atmósfera de presión o, alternativamente cuando se indique, por filtración utilizando filtros estériles de acetato de celulosa de 0,22 µm de diámetro de poro (Schleicher-Schuell, cat. no. 10462200).

2.2. Antibióticos.

Las soluciones de antibióticos se prepararon 1.000 veces concentradas en H₂O destilada, excepto el cloramfenicol que se preparó en etanol absoluto y la rifampicina y la tetraciclina que se disolvieron en metanol. Las soluciones preparadas en H₂O se esterilizaron por filtración y se almacenaron a -20°C.

Los antibióticos se añadieron a los cultivos a las concentraciones finales indicadas (en µg/ml): ampicilina, 100; carbenicilina, 300; cloramfenicol, 30; estreptomicina, 50-100; kanamicina, 25-50; piperacilina, 100; rifampicina, 10-20 y tetraciclina, 10-20. En los ensayos de resistencia/sensibilidad a antibióticos, estos últimos se suministraron en forma de discos (bioMérieux) impregnados de las siguientes cantidades (en µg/disco): ácido nalidíxico, 30; ampicilina, 10; cloramfenicol, 30; carbenicilina, 100; cefotaxima, 30; ciprofloxacina, 5; eritromicina, 15; espiramicina, 100; estreptomicina, 10; gentamicina, 10; imipenem, 10; kanamicina, 30; neomicina, 30; norfloxacina, 10; piperacilina, 100; rifampicina, 30; tetraciclina, 30 y vancomicina, 30.

2.3. Condiciones de cultivo.

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

Las medidas de turbidez de los cultivos bacterianos se realizaron a 660 nm en un espectrofotómetro UV/VIS PERKIN-ELMER modelo Lambda 3B, utilizando cubetas de 1 ml de cristal o de plástico, según que las suspensiones contuviesen o no un disolvente orgánico.

La estimación de células viables en los cultivos iniciales, expresada como unidades formadoras de colonias por mililitro de cultivo (UFC/ml), se realizó mediante

diluciones seriadas de los cultivos en tampón 1xM9. De cada dilución se sembraron alícuotas de 0,1 ml en placas de medio selectivo. Los valores presentados en la sección de *Resultados* representan la media de todas las diluciones.

3. SOLUCIONES.

A no ser que se indique otra cosa, el H₂O utilizada en la preparación de las soluciones fue destilada.

Solución de acrilamida/bisacrilamida para geles de proteínas: Se utilizó una solución comercial al 30%, con proporción acrilamida:*bis*-acrilamida (29:1) (Sigma, cat. no. A-3574), o en su defecto, se preparó una solución concentrada de acrilamida (40%, p/v): Cien ml contenían 38 g de acrilamida, 2 g de N,N'-metilenbisacrilamida y el resto de H₂O destilada. Esta solución se filtró a través de una membrana de nylon aplicando vacío. La solución filtrada se almacenó a 4°C en oscuridad.

Solución de acrilamida desnaturalizante (6%, p/v): Sesenta ml de solución contenían 9 ml de acrilamida (40%, p/v), 25,2 g de urea, 12 ml de 5xTBE, y el resto de H₂O milliQ. Inmediatamente antes de verter el gel y como catalizador en la polimerización de la acrilamida, se añadieron a la solución anterior 115 µl de APS (10%, p/v) y 115 µl de TEMED.

Solución de 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato (BCIP o X-P): Solución 100 mM de BCIP en agua destilada. Se esterilizó por filtración y se almacenó a -20°C.

Solución de 5-bromo-4-cloro-3-indolil β-D-galactopiranosido (X-gal): X-gal al 2% (p/v) disuelto en dimetilformamida. Se almacenó en alícuotas de 1 ml a -20°C.

Cloroformo-alcohol isoamílico: Solución preparada con cloroformo:alcohol isoamílico en proporción 24:1 (v:v).

Fenol-cloroformo-alcohol isoamílico: Los cristales de fenol se fundieron a 55°C y se mezclaron con cloroformo y alcohol isoamílico en proporción 25:24:1 (v:v:v). A la mezcla se añadió como antioxidante 8-hidroxiquinoleína (0,1% p/v). La solución se saturó con Tris-HCl 1 M, pH 8,0, que se descartó y añadió reiteradamente hasta que la fase acuosa adquirió pH 8,0, momento en que se sustituyó por una solución de TE.

Solución CTAB/NaCl: Cien ml de solución contenían 4,1 g de NaCl y 10 g de CTAB que se añadieron lentamente, calentando a 65°C y en agitación, tal y como se describe en Ausubel *et al.* (1999).

Solución de glucosa-Tris-EDTA (GTE): Glucosa 50 mM, Tris-HCl 25 mM, pH 8,0 y EDTA· Na₂ 10 mM. Se esterilizó en el autoclave y se conservó a 4°C.

Solución de isopropil β-D-tiogalactopiranosido (IPTG): Solución 100 mM de IPTG en H₂O destilada. Se esterilizó por filtración y se almacenó a -20°C.

Marcadores de pesos moleculares para geles de agarosa (λ_H, λ_{HE}, X): Se digirieron 80 μl de ADN del fago λ (250 ng/μl) con 1,5 unidades de los enzimas *Hind*III y/o *Eco*RI por μg de ADN en un volumen final de 100 μl del tampón indicado por el fabricante del enzima. Una vez digerido, se calentó a 80°C para separar las regiones *cos* de λ, y a la reacción se añadieron finalmente 80 μl de tampón de carga, completándose el volumen hasta 400 μl con TE, de forma que la concentración final de ADN en la solución fue de 50 ng/μl. El marcador X (0,07-12,2 kb) manufacturado por Roche (cat. no. 1 498 037) se diluyó en TE hasta alcanzar una concentración final de 50 ng/μl. Todas las soluciones de marcadores se almacenaron a 4°C. Doscientos cincuenta ng de los marcadores así preparados fueron suficientes para su visualización en geles de agarosa.

Tampón PBS: NaCl, 137 mM; KCl, 2,7 mM; Na₂HPO₄, 10 mM pH 7,4.

Solución SDS/NaOH: Solución de laurilsulfato sódico (SDS) (1%, p/v) y NaOH 0,2 N. Esta solución es de preparación extemporánea.

Solución 20xSSC: Un litro de solución contenía 175,3 g de NaCl y 88,2 g de citrato sódico. El pH se ajustó a 7,0 con una solución 10 N de NaOH. La solución se esterilizó en el autoclave.

Tampón acetato sódico: Una solución de 100 ml contenía 60 ml de acetato sódico 5 M; 11,5 ml de ácido acético glacial y el resto de agua destilada. La solución final tenía una concentración 5 M de acético y 3 M de sodio. El pH se ajustó a 4,8 con ácido acético glacial. la solución se esterilizó en el autoclave y se conservó a temperatura ambiente.

Tampón de carga de muestras proteicas para geles de poliacrilamida: Contenía Tris-HCl 0,125 mM, pH 6,8; SDS (4%, p/v); 2-mercaptoetanol (5%, v/v), sacarosa (20%, p/v) y azul de bromofenol (0,02%, p/v).

Tampón de carga de muestras de ácidos nucleicos para geles de agarosa: Contenía glicerol (33%, p/v), azul de bromofenol (0,25%, p/v) y xilencianol (0,25%, p/v).

Tampón de carga para muestras de ADNc: Contení formamida (97%, v/v), EDTA 10 mM pH 8,0, azul de bromofenol (0,25%, p/v), y xilencianol (0,25%, p/v).

Medio rico SOC: Una solución de bactotripton (2%, p/v), extracto de levadura (0,5%, p/v) se esterilizó en el autoclave y a continuación se añadieron soluciones estériles de las siguientes sustancias a las concentraciones indicadas: glucosa 20 mM, NaCl 10 mM, KCl 2,5 mM, MgCl₂ 10 mM y MgSO₄ 10 mM.

Tampón Tris-Acetato-EDTA (50xTAE): Un litro de una solución madre 50 veces concentrada (50x) contenía 242 g de Tris-base, 57,1 ml de ácido acético glacial y 37,2 g de Na₂EDTA· 2H₂O. El pH final fue de 8,5. La solución se esterilizó en el autoclave.

Tampón Tris-Borato-EDTA (10xTBE): 1 litro de una solución madre 10 veces concentrada (10x) contenía 108 g de Tris-base, 55 g de ácido bórico y 9,3 g de EDTA· Na₂· 2H₂O. El pH se ajustó a 8,2 con HCl comercial. La solución se esterilizó en el autoclave.

TE: Tris-HCl 10 mM pH 8,0, EDTA-Na₂ 1 mM. Se esterilizó en el autoclave y se almacenó a temperatura ambiente.

4. ENSAYOS DE RESISTENCIA/SENSIBILIDAD.

4.1. Ensayos de resistencia/sensibilidad a antibióticos.

La sensibilidad a antibióticos de las cepas bacterianas se determinó tanto en medio sólido, examinando el halo de inhibición del crecimiento, como en medio líquido.

4.1.1. Aproximación del halo de inhibición.

Cuatro mililitros de un cultivo de *P. putida* en LB en fase exponencial de crecimiento (DO₆₆₀ entre 0,6 y 0,8) se vertieron sobre la superficie de una placa de Petri con 25 ml de medio LB sólido. Tras distribuir la suspensión bacteriana homogéneamente por toda la superficie, con el volumen sobrante se procedió de igual modo con otras tres placas de forma sucesiva. Con el objeto de eliminar el cultivo sobrante, las placas se dejaron escurrir inclinadas hacia abajo sobre la tapa durante unos minutos, tras los cuales se aspiraron por vacío los restos líquidos y se dejaron secar las placas. Las placas se incubaron a 30°C con los discos de antibióticos (bioMérieux) a

30°C durante 20 horas, transcurridas las cuales, se observaron los halos de inhibición del crecimiento, claramente definidos en torno al disco, en un entorno de un césped bacteriano homogéneo. Los datos del diámetro del halo de inhibición incluían el diámetro del disco (6 mm).

4.1.2. Determinación de la concentración mínima inhibitoria (MIC).

Para determinar la susceptibilidad de las bacterias a los antibióticos en medio líquido, se empleó el "Microtitre Broth Dilution Method" (Amsterdam, 1991). El método se basa en la determinación del crecimiento de una suspensión bacteriana obtenida por diluciones seriadas en un volumen final de 100 µl de LB suplido con concentraciones crecientes de antibiótico, utilizando placas de microtítulo. La determinación se hizo en un cultivo en LB en fase exponencial media (turbidez a 660 nm 0,6-0,8). Se consideró la concentración mínima inhibitoria como la concentración mínima de antibiótico que redujo el crecimiento en más del 50% o del 90%, según se tratara de MIC₅₀ o MIC₉₀, respectivamente.

4.2. Ensayos de tolerancia a compuestos tóxicos empleando placas con un gradiente de concentración.

Estos ensayos se realizaron como estudio preliminar de la tolerancia de una cepa bacteriana, para acotar el intervalo de concentraciones tóxicas de un determinado compuesto, al poder analizarse de manera sencilla un gradiente amplio de concentración. En la preparación de las placas se empleó la técnica de doble difusión, para lo cual se dispuso un lateral de la placa de Petri de 85 mm de diámetro sobre un apoyo (por ejemplo, una pipeta de vidrio de 1 ml), de manera que en la placa inclinada se vertieron 15 ml de medio mínimo M9-agar suplido con glucosa. A continuación, se retiró el apoyo y sobre la base de medio con forma de plano inclinado y ya en posición horizontal, se vertieron 15 ml del mismo medio suplido con el compuesto problema a una concentración que constituía el máximo del gradiente a preparar.

Los cultivos se incubaron en agitación, en medio mínimo líquido M9 con glucosa, hasta alcanzar la fase exponencial media de crecimiento (DO₆₆₀ 0,6-0,8). A continuación, 4 ml de cultivo se vertieron sobre la superficie de la placa en gradiente y, tras distribuir la suspensión bacteriana homogéneamente por toda la superficie, con el volumen sobrante se repitió la operación sobre otras dos placas de forma sucesiva, de

manera que el dato para un cultivo se obtuvo de ensayos por triplicado. Se descartó cualquier resto de volumen de las placas dejando escurrir y posteriormente aspirando por vacío. Las placas se incubaron a 30°C durante 20-36 horas, transcurridas las cuales, se observó un césped de crecimiento homogéneo con una línea de inhibición claramente definida. La concentración inhibitoria del crecimiento se calculó empleando la siguiente fórmula:

$$\text{concentración (g/l)} = d/D \times C_{\text{MAX}}$$

donde d es la distancia (mm) alcanzada por el frente bacteriano medida sobre el diámetro de la placa; D , el diámetro (mm) de la placa, y C_{MAX} , la concentración máxima del gradiente lineal del compuesto.

4.3. Resistencia/sensibilidad a compuestos aromáticos y otros compuestos tóxicos.

La sensibilidad de las cepas bacterianas a compuestos aromáticos se estudió en dos tipos de ensayos: uno en el que se determinó la supervivencia a un choque por exposición repentina al compuesto tóxico, y el otro en el que se evaluó la toxicidad según su efecto inhibitorio sobre el crecimiento bacteriano después de 24 h.

4.3.1. Choque por exposición repentina a alta concentración.

Para determinar la respuesta a corto plazo por exposición repentina a un compuesto tóxico, se cultivó la cepa en agitación en matraces con medio LB suplido o no con el compuesto en cuestión (condiciones de inducción o no, respectivamente), hasta alcanzar la fase exponencial media de crecimiento (DO_{660} 0,6-0,8). A continuación se dividió cada uno de los cultivos en dos alícuotas, a una se le añadió el disolvente a ensayar y la otra se dejó como control. La supervivencia se estimó como el número de UFC/ml a los tiempos indicados en cada caso, generalmente minutos en el caso del tolueno y horas cuando se trató de PHBA. El tiempo 0 se consideró inmediatamente después de aplicar el choque.

4.3.2. Inhibición del crecimiento.

En los ensayos preliminares de tolerancia a estos compuestos en medio líquido, se examinó el crecimiento de las distintas cepas de *Pseudomonas* sp. en LB líquido suplido con diferentes concentraciones del compuesto en cuestión, partiendo de un

cultivo de LB el cual se diluyó 100 veces. Tras 24 horas de incubación a 30°C en matraces sellados, se determinó la turbidez a 660 nm de cada cultivo.

5. PREPARACIÓN DE EXTRACTOS LIBRES DE CÉLULAS.

En la preparación de extractos libres de células se partió de 50 ml de cultivo de las cepas bacterianas en el medio a ensayar. Una vez alcanzada la fase exponencial de crecimiento (turbidez a 660 nm 0,6-0,8), las células se recogieron por centrifugación a 12.000 x g durante 10 minutos a 4°C, se lavaron con tampón fosfato 100 mM, pH 7,2, y se resuspendieron en 5 ml del mismo tampón. La suspensión bacteriana se lisó por ultrasonidos utilizando un sonicador Braun Biotech modelo Labsonic 2000 con una sonda de tipo aguja, manteniendo la muestra a 0°C en un baño de agua y hielo. Se aplicaron pulsos de 75W durante 30 segundos, con intervalos de 1 minuto para evitar el calentamiento de la muestra, hasta que se obtuvo un extracto transparente. Los restos celulares asociados a membrana se eliminaron por centrifugación a 10.000 x g durante 30 minutos a 4°C. El sobrenadante así obtenido constituyó el extracto libre de células utilizado en los ensayos enzimáticos y en la determinación de proteínas.

6. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS EN EXTRACTOS LIBRES DE CÉLULAS.

La determinación de la concentración de proteínas en extractos libres de células se hizo por el método Bradford (Bradford, 1976), con los reactivos suministrados por la casa comercial Bio-Rad (Bio-Rad Dye reagent concentrate, cat. no. 500-0006), utilizando albúmina bovina como patrón.

7. MEDIDA DE LA ACTIVIDAD FOSFATASA ALCALINA.

Los ensayos se realizaron siguiendo el método descrito por Wagner *et al.* (1995). Se determinó la actividad a lo largo de la curva de crecimiento de una cantidad de células equivalente a 1 unidad de turbidez a 660 nm, que se recogió por centrifugación a 13.000 rpm durante 3 minutos en una centrífuga de mesa. Las células se lavaron con tampón de lavado, y se resuspendieron a continuación en 1 ml de tampón AP. Entonces, se añadieron 20 µl del sustrato (*p*-nitrofenolfosfato 0,5M), y se incubaron las células con la mezcla de reacción a 37°C durante 5 minutos. Para parar la reacción, se añadieron 500 µl de NaOH 1M y las muestras se centrifugaron a 13.000 rpm en una centrífuga de

mesa durante 10 minutos. La absorbancia del producto generado se midió a 405 nm. Para estimar la concentración del *p*-nitrofenol obtenido en la reacción, se empleó una recta de calibrado en un intervalo de 5-50 μ M. La solución stock de *p*-nitrofenol se preparó a una concentración 100 mM en tampón de lavado.

La composición de las soluciones empleadas en estas medidas de actividad enzimática fue la siguiente:

Tampón de lavado: Tris-HCl 100 mM pH 7,6; MgCl₂ 1 mM; ZnCl₂ 1 mM.

Tampón AP: Tris-HCl 100 mM pH 7,6; MgCl₂ 1 mM; ZnCl₂ 1 mM; Tritón-X (2%, p/v) para permeabilizar las células.

8. ANÁLISIS DE LÍPIDOS DE MEMBRANA.

8.1. Extracción y purificación de lípidos.

El procedimiento seguido constituye una variación del método propuesto por Bligh y Dyer (1959). La extracción se hizo a partir de 15 ml de cultivo, variando en cada caso la cepa, el medio y la fase de crecimiento. Las células se recogieron por centrifugación a 12.000 x g durante 10 minutos a 4°C, se descartó el sobrenadante y el precipitado de células se lavó con tampón 1xM9 y se conservó a -20°C. El botón de células congeladas se depositó en un tubo de vidrio Pyrex roscado y se añadió una mezcla de 1 ml de cloroformo y 2 ml de metanol absoluto, homogeneizándose por agitación con vortex durante 2 minutos. Posteriormente, se añadió 1 ml de cloroformo y se continuó la agitación durante 30 segundos, tras los cuales se añadió 1 ml de agua destilada y se aplicó agitación durante otros 30 segundos. La mezcla así homogeneizada se dejó reposar a temperatura ambiente hasta obtener una separación completa de las fases. En aquellos casos en que la separación espontánea no fue eficaz, la muestra se centrifugó a 3.000 x g durante 10 minutos a temperatura ambiente. Una vez separadas las fases, la fase clorofórmica se recogió con ayuda de una pipeta Pasteur, sin arrastrar parte de la fase acuosa. A continuación, se realizó una segunda extracción con 1 volumen de cloroformo, asegurando así la extracción total de los lípidos. Por último, el disolvente se evaporó en un rotavapor a 50°C, obteniéndose así la fracción total de lípidos de las células.

8.2. Preparación de ésteres metílicos de ácidos grasos de lípidos.

Para determinar la composición detallada en ácidos grasos de los fosfolípidos en las membranas bacterianas, se siguió el método empleado en el análisis de ácidos grasos en la industria del aceite de oliva descrito por Bannon y colaboradores (1982) para la metanolisis de lípidos, utilizando para ello metóxido potásico como catalizador. Una vez determinadas las cantidades de lípidos extraídas, por cada 5-10 mg de lípidos extraídos se añadieron 2 ml de hexano y 400 μ l de metóxido potásico (solución metanólica de KOH 2N). Se homogeneizó la mezcla por agitación con vortex y se permitió la separación espontánea de ambas fases. Finalmente se recogió la fase hexánica que contenía los ésteres metílicos de los ácidos grasos para su posterior análisis por cromatografía de gases.

8.3. Análisis de los ésteres metílicos por cromatografía de gases (CG).

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

9. PLÁSMIDOS.

En la **Tabla M.2** se relacionan los plásmidos utilizados en este trabajo junto con sus características más relevantes. Los plásmidos de nueva construcción se describirán en los apartados correspondientes de la sección *Resultados*.

Tabla M.2. Plásmidos utilizados en este trabajo.

Plásmido	Características	Referencia
pBluescript II SK +/-	Ap ^R ; <i>oriColE1</i> ; complementación α	Stratagene
pBS ϕ A3	Ap ^R , Km ^R ; <i>oriColE1</i> ; pBluescript II SK+, contiene el casete <i>aphA3</i>	Trieu-Cuot y Courvalin (1983)
pCNB5	Ap ^R , Km ^R ; <i>oriR6K</i> , <i>oriTRP4</i> , pUT/mini-Tn5 <i>lacI^q/P_{irc}</i>	de Lorenzo <i>et al.</i> (1993)
pGEM-T	Ap ^R ; clonación de productos de PCR	Promega Corporation
pGV1120	Tc ^R , Sm ^R , Sp ^R ; <i>oriColE1</i> , derivado de pSa (IncW), replicable en <i>Pseudomonas</i>	Leemans <i>et al.</i> (1982)
pJB3-Km1	Ap ^R , Km ^R ; <i>oriVRK2</i> , <i>trfA</i> , <i>oriTRK2</i> , complementación α , MCS, <i>mob⁺ tra⁻</i>	Blatny <i>et al.</i> (1997)
pJB3-Tc19	Ap ^R , Tc ^R ; <i>oriVRK2</i> , <i>oriTRK2</i> , complementación α , MCS	Blatny <i>et al.</i> (1997)
pKNG101	Sm ^R ; <i>oriR6K</i> , <i>oriTRK2</i> , <i>sacB</i>	Kaniga <i>et al.</i> (1991)
pLAFR3	Tc ^R ; <i>cos</i> , <i>oriVRK2</i> , <i>oriTRK2</i> , complementación α	Staskawicz <i>et al.</i> (1987)
pRK600	Cm ^R ; <i>oriColE1</i> , <i>oriVRK2</i> , <i>mob⁺ tra⁺</i>	Kessler <i>et al.</i> (1992)
pUC19	Ap ^R ; <i>oriColE1</i> , <i>rop</i> , MCS, complementación α	Vieira <i>et al.</i> (1982)
pUC18	Igual que pUC19 con MCS en orientación opuesta	Norrande <i>et al.</i> (1983)
pUC18Not	Ap ^R ; derivado de pUC18 con dos sitios <i>NotI</i> flanqueando el MCS	Herrero <i>et al.</i> (1990)
pUT/mini-Tn5/Km	Ap ^R , Km ^R ; <i>oriVR6K</i> , <i>oriTRP4</i>	de Lorenzo <i>et al.</i> (1990)
pUT/mini-Tn5/Sm-Sp	Ap ^R , Sm ^R , Sp ^R ; <i>oriVR6K</i> , <i>oriTRP4</i>	de Lorenzo <i>et al.</i> (1990)
pUT/mini-Tn5' <i>phoA</i>	Ap ^R , Km ^R ; <i>oriR6K</i> , <i>oriTRP4</i> , fusiones traduccionales a ' <i>phoA</i>	de Lorenzo <i>et al.</i> (1990)

Abreviaturas: Ap^R, Cm^R, Km^R, Sm^R, Sp^R, Tc^R, resistencia a ampicilina, cloramfenicol, kanamicina, estreptomicina, espectinomicina y tetraciclina, respectivamente; MCS: polilinker con múltiples sitios de clonación; *aphA3*: gen que codifica la 3'5'-aminoglicósido fosfotransferasa tipo III de *Escherichia coli* que confiere resistencia a kanamicina.

pBluescript[®] II SK (+/-): Plásmido de 2.961 pb derivado de pUC19. Contiene el origen de replicación del fago filamentoso fl, que permite la recuperación de la cadena del mismo u opuesto sentido del gen *lacZ* (según sea la notación + ó -) cuando una cepa huésped que contiene el pBluescript II es co-infectada con un fago auxiliar.

Confiere resistencia a ampicilina. Contiene el origen de replicación ColE1, un polilinker con múltiples sitios de clonación, flanqueado por los promotores T3 y T7 y el péptido α de LacZ que posibilita una fácil selección de los plásmidos recombinantes en cepas que permitan complementación α , que son aquellas portadoras de la delección *lacZ* Δ M15 (por ejemplo JM109, DH5 α , etc.). Aquellos clones que portaban un plásmido con inserto formaban colonias de color blanco, en contraposición al color azul de los clones sin inserto, en medio sólido LB suplementado con ampicilina y con 25 μ g/ml del sustrato cromogénico 5-bromo-4-cloro-indolil- β -D-galactopiranosido (X-gal). Cuando se utilizó una cepa *lacI*⁺, fue necesario además añadir 130 μ M de isopropil- β -D-tiogalactopiranosido (IPTG) como inductor. La notación SK indica que el sitio de clonación múltiple está orientado de tal forma que la transcripción de *lacZ* procede desde *SacI* hasta *KpnI*. Estos plásmidos los suministra la compañía Stratagene, Amsterdam, Holanda (cat. no. 212205 y 212206).

pBSaphA3: Plásmido de 3,91 kb derivado del plásmido pBluescript II SK+ que confiere resistencia a kanamicina, al portar el gen *aphA3* que codifica la 3'5'-aminoglicósido fosfotransferasa tipo III de *Escherichia coli*.

pCNB5: Plásmido de 5,2 kb de la serie pUT que contiene un transposón mini-Tn5*lacI*^q/*P*_{trc}. Este mini-transposón, que confiere resistencia a kanamicina, permite clonar y expresar genes heterólogos clonados en el sitio de restricción único *NotI* o *SfiI* bajo el control del promotor *P*_{trc}. La presencia del gen *lacI*^q dentro del elemento transponible permite regular la expresión a partir del promotor mediante la adición de IPTG, incluso en un fondo genético como *Pseudomonas* que está desprovisto de *lacI*.

pGEM[®]-T: El vector pGEM[®]-T se preparó cortando pGEM[®]-5Zf(+) con *EcoRV* y añadiendo una timidina (T) terminal a ambos extremos 3'. Estos extremos protuberantes sencillos 3'-T en el sitio de inserción incrementan enormemente la eficacia de la ligación de productos de PCR, debido a la adición de una adenosina (A) a los extremos 3', independiente del molde, por parte de muchas ADN polimerasas termoestables.

El vector pGEM[®]-5Zf(+) contiene el origen de replicación del fago filamentoso f1, por lo que puede usarse para producir ADN de cadena sencilla. Como promotores

presenta los de la ARN polimerasa de T7 y SP6 flanqueando una región de clonaje múltiple con la región del péptido α del enzima β -galactosidasa. La inactivación insercional del péptido α permite que los clones recombinantes puedan ser identificados directamente, mediante una diferenciación de color en las placas, como se ha descrito anteriormente para pBluescript II SK (+/-). Este plásmido de 3.003 pb está disponible en la compañía Promega Corporation, Madison, Wi, USA. (cat. no. A362A).

pGV1120: Plásmido de 11,5 kb construido mediante la sustitución del fragmento *PstI/HindIII* del vector pGV1113 por el segmento *HindIII/PstI* de pBR325 (Bolivar, 1978), que contiene el origen de replicación ColE1 y los genes estructurales *tetR* y *tetT* que codifican resistencia a tetraciclina. Debido a que la secuencia promotora de los genes de resistencia a tetraciclina se ha deleccionado (Widera *et al.*, 1978), su expresión en pGV1120 debe controlarse por un promotor externo, localizado en el fragmento derivado de pR702. Contiene los orígenes de replicación de tipo W y ColE1, por lo que este plásmido en *E. coli* presenta un número de copias elevado que es amplificable por cloramfenicol. pGV1120 contiene el sitio *bom* de ColE1 (Warren *et al.*, 1978) y es, por ello, movilizable con alta frecuencia por plásmidos de tipo I cuando la función *tra* de ColE1 se suministra en *trans* (Van Haute *et al.*, 1983).

pJB3-Km1: Plásmido de 6.052 pb de amplio espectro de huésped, derivado de RK2. Posee el MCS y las regiones *lac* de pUC19 que permiten la α -complementación. Su número de copias en *E. coli* es de aproximadamente 5-7 por cromosoma. Contiene el gen *trfA* que codifica una proteína esencial para la iniciación de la replicación a partir del *oriV* del plásmido pRK2. Se sabe que ciertas mutaciones puntuales en este gen producen un aumento del número de copias del plásmido en la células (de hasta 24 veces). Este plásmido posee el origen de transferencia de RK2, lo cual permite su transmisión cuando se aportan las funciones de transferencia en *trans*.

pJB3-Tc19: Similar a pJB3-Km1, excepto que carece del gen resistencia a kanamicina y que contiene los genes *tetA* y *tetR* que codifican resistencia a tetraciclina.

pKNG101: Plásmido suicida de 6.837 pb utilizado en experimentos de intercambio alélico que permite la selección positiva de eventos de doble recombinación

homóloga en bacterias gram-negativas. Posee el origen de replicación del plásmido R6K, que es dependiente de la proteína π codificada por el gen *pir* del fago λ y, por tanto, sólo se mantiene en bacterias que producen dicha proteína (por ejemplo, *E. coli* CC118 λ *pir*). Presenta el origen de transferencia de RK2, lo que permite movilizarlo a otras bacterias si se aportan las funciones de transferencia en *trans*. Los genes *strAB* de resistencia a estreptomicina, que sirven como marcador de selección de la integración del vector en el cromosoma de la bacteria huésped. Su característica más relevante es que porta los genes *sacBR* de *Bacillus subtilis* como marcador contraseleccionable, que permitió seleccionar positivamente la escisión del vector del cromosoma. Este gen, codifica una levanosacarasa que cataliza la hidrólisis de sacarosa así como la síntesis de levanos que, en bacterias gram-negativas, se acumulan en el periplasma y producen la muerte celular cuando la concentración de sacarosa es mayor o igual al 5% (p/v) (Gay *et al.*, 1985; Simon *et al.*, 1991).

pLAFR3: Cósmido de 22 kb derivado de pLAFR1 (Friedman *et al.*, 1982) que porta el fragmento *HaeII* de 454 pb de pUC8 (Vieira *et al.*, 1982) con el polilinker de sitios múltiples de clonación y la secuencia *lac* que permite la complementación α . Contiene los sitios *cos* del fago λ necesarios para el empaquetamiento de ADN dentro de la cápsida de dicho fago. Sólo los cósmidos recombinantes con un tamaño total entre 36 y 51 kb son susceptibles de ser empaquetados *in vitro*. En este plásmido se había construido la genoteca de *P. putida* que se utiliza en este trabajo.

pRK600: Plásmido auxiliar que porta la región *tra* del plásmido pRK2 y que permite movilizar plásmidos *mob*⁺ a un amplio espectro de huéspedes (de Lorenzo *et al.*, 1990).

pUC18/pUC19: Vector de clonación de 2.686 pb que combina fragmentos de pBR322 y de vectores de la serie M13mp. Carece del gen *rop* implicado en el control del número de copias de aquellos plásmidos que contienen el origen de replicación de ColE1 y, como consecuencia, presenta un alto número de copias por célula (más de 700). Confiere resistencia a ampicilina, y posee un sitio de clonación múltiple (MCS) dentro de la región que codifica el péptido α de LacZ, de manera que la selección de los

clones recombinantes fue posible mediante la indicación de color descrita previamente para pBluescript II SK (+/-).

pUC18Not: Plásmido derivado de pUC18 que presenta dos sitios de restricción *NotI* flanqueando ambos extremos del sitio de clonación múltiple.

pUT: Serie de plásmidos contruidos a partir del vector pGP704 (de Lorenzo *et al.*, 1990). Estos plásmidos presentan el origen de replicación del plásmido pR6K, por lo que su replicación es dependiente de la proteína π , hecho que los convierte en plásmidos suicidas en fondos genéticos carentes del gen que codifica dicha proteína, como es el caso de bacterias del género *Pseudomonas*. Los plásmidos pertenecientes a la serie pUT, portan las repeticiones invertidas de 19 pb del transposón Tn5 (IS0 e ISI), por lo que las secuencias de ADN incluidas entre dichas secuencias invertidas y las propias repeticiones constituyen un elemento transponible en presencia de la transposasa de Tn5. En estos plásmidos la transposasa se encuentra fuera del elemento transponible (mini-transposones), lo que permitió su empleo en la generación de inserciones estables. En este trabajo se utilizaron mini-Tn5Km y mini-Tn5Sm-Sp que codifican resistencia a kanamicina y estreptomicina-espectinomicina, respectivamente, en la obtención de mutantes con inserciones estables en distintas cepas de *P. putida*. También se utilizó mini-Tn5'*phoA* que se describe a continuación.

pUT/mini-Tn5'*phoA*: Plásmido de la serie pUT que lleva un transposón mini-Tn5'*phoA*. El transposón mini-Tn5'*phoA* es portador del gen '*phoA* de *E. coli* desprovisto de la secuencia codificante del péptido señal. Este mini-transposón puede generar fusiones traduccionales con actividad fosfatasa alcalina cuando se inserta en fase en genes que codifican proteínas con un péptido líder, esto es, proteínas de la envuelta celular (**Figura M.1**). Así, este plásmido es indicado para el análisis de proteínas que se exportan al espacio periplásmico o a la membrana externa de bacterias Gram-negativas. La fosfatasa alcalina de *E. coli* es un homodímero que posee dos puentes disulfuro intramoleculares en cada monómero, esenciales para que el enzima se pliegue en su conformación activa. Estos puentes disulfuro no se pueden establecer habitualmente en el citoplasma, por lo que la proteína es activa exclusivamente cuando se exporta a través de la membrana interna celular. Esta propiedad convierte a '*phoA* en

un elemento sensor de señales de exportación de proteínas. Los clones mutantes portadores de fusiones a *'phoA* activas fueron fácilmente detectables en presencia de un sustrato cromogénico de la fosfatasa alcalina como es BCIP (0,1 mM).

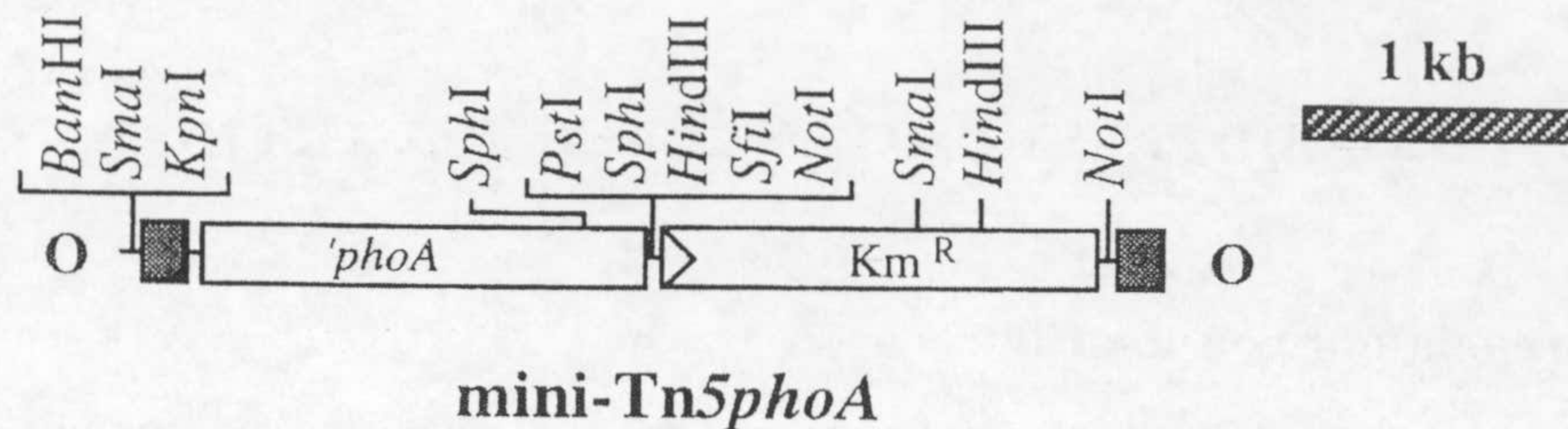


Figura M.1. Mapa del transposón mini-Tn5*phoA*. En el mapa se indican los sitios de restricción más relevantes, el gen *'phoA* desprovisto de su secuencia señal y el gen de resistencia a kanamicina procedente del transposón Tn903. Como cajas oscuras se muestran los límites de la unidad transponible, que está clonada en pUT como fragmento *XbaI-EcoRI*. Ambos sitios son externos a los extremos del minitransposón (indicados como O), y no se movilizan con éste durante el evento de transposición. Los sitios *BamHI*, *SmaI* y *KpnI*, que se encuentran delante del gen *'phoA*, también están situados fuera del elemento móvil (esquema obtenido de de Lorenzo *et al.*, 1990).

10. AISLAMIENTO DE ADN PLASMÍDICO Y CROMOSÓMICO.

Para el aislamiento de ADN plasmídico se utilizaron distintos métodos, dependiendo del grado de pureza y rendimiento requeridos, así como del tamaño del plásmido a aislar. En todos los casos, la cepa bacteriana portadora del plásmido de interés se cultivó a 30 ó 37°C (según se tratase de *Pseudomonas* sp. o *Escherichia coli*, respectivamente), con agitación durante 14-16 horas en medio LB suplementado con los antibióticos correspondientes. Para la obtención de ADN plasmídico de alta pureza, libre de ARN, que posteriormente se emplearía en la obtención de sondas génicas, en reacciones de secuenciación y/o clonación, se utilizó el sistema "Concert Rapid Plasmid Miniprep System" (Gibco BRL, cat.no. 11453-016) siguiendo las instrucciones del fabricante. Para el aislamiento de plásmidos a pequeña escala y análisis tras una clonación se utilizó el método de la lisis alcalina (Sambrook *et al.*, 1989).

El aislamiento de ADN total se realizó siguiendo el método descrito en Ausubel *et al.* (1999). Brevemente, se lisaron las bacterias procedentes de un cultivo líquido de

14-16 horas en LB con los antibióticos correspondientes, y las proteínas se eliminaron por digestión con proteinasa K. Los restos celulares, polisacáridos y proteínas se descartaron por precipitación selectiva con CTAB, y el ADN de alto peso molecular se recuperó del sobrenadante resultante por precipitación con isopropanol.

11. INTRODUCCIÓN DE PLÁSMIDOS EN CÉLULAS BACTERIANAS.

11.1 Transferencia por conjugación.

La movilización a *P. putida* de los plásmidos no autotransferibles con el origen de transferencia del plásmido pRP4 (*oriTRP4*) o del plásmido pRK2 (*oriTRK2*), se realizó mediante conjugación “triparental” (de Lorenzo y Timmis, 1994) en la que participaron la cepa de *E. coli* donadora (portadora del plásmido a movilizar), la cepa de *P. putida* receptora y la cepa auxiliar *E. coli* HB101 (pRK600). El plásmido pRK600, que determina las funciones de transferencia y, por tener el origen de replicación *oriColE1*, no se replica en *Pseudomonas*. Los transconjugantes de *P. putida* se seleccionaron en medio mínimo con benzoato 5 mM como fuente de carbono, que contraseleccionaba las cepas donadora y auxiliar, suplementado con los antibióticos adecuados para la selección del plásmido transferido. Asimismo, diluciones seriadas de la mezcla de conjugación se sembraron en el medio anterior sin antibiótico, permitiéndose así el crecimiento de las células receptoras de *P. putida* presentes en dicha mezcla. La frecuencia de transconjugantes se expresó como el número de transconjugantes en relación al número de receptores.

11.2. Transformación mediante choque térmico.

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

11.3. Electrotransformación.

La preparación de células competentes de *Pseudomonas* sp. para electroporación se realizó mediante el método de Enderle y Farwell (1998). A la suspensión de células enfriadas en hielo se añadieron entre 50 y 150 ng de ADN libre de sales. Tras 1 minuto

de incubación en hielo, la mezcla de células y ADN plasmídico se transfirió a una cubeta de electroporación de 2 mm de anchura donde recibieron un pulso eléctrico de 3 kV en un electroporador modelo MicroPulser™ (Bio-Rad, cat. no. 165-2100). Tras el pulso, se añadió a las células 1 ml de medio rico SOC, a temperatura ambiente, y la suspensión se incubó de 1 a 3 horas a 30°C con agitación, dependiendo del tiempo requerido para la expresión de la resistencia a antibiótico que portase el plásmido. A continuación, la suspensión o sus diluciones seriadas se sembraron en placas de medio selectivo para la selección de células portadoras de plásmido.

En la preparación de células electrocompetentes de *E. coli*, se siguió el protocolo que adjunta Bio-Rad con el electroporador modelo MicroPulser™ (Bio-Rad, cat. no. 165-2100). La suspensión de células así preparada se distribuyó en alícuotas de 40 µl en tubos Eppendorf preenfriados y se almacenaron a -80°C. Las condiciones del electrochoque fueron las mismas que las descritas anteriormente para *Pseudomonas* sp.

12. MUTAGÉNESIS.

12.1. Mutagénesis por transposición.

Los transposones usados en la obtención de mutantes de *P. putida* durante este trabajo de Tesis Doctoral (mini-Tn5), así como la base del proceso de mutagénesis, se describen extensamente en el apartado de *Materiales y Métodos* correspondiente a los plásmidos. Los plásmidos portadores de los mini-Tn5 se introdujeron en *P. putida* por conjugación tripartita como se indica en el **apartado 11.1** de esta sección, usando la cepa *E. coli* CC118λpir como donadora. Los transconjugantes se seleccionaron, además de por propiedades metabólicas del receptor, por su resistencia a kanamicina, el marcador que portan los elementos mini-Tn5 utilizados. Se descartaron aquellos transconjugantes que además de resistentes a kanamicina fueron resistentes a piperacilina, el marcador de resistencia de los plásmidos pUT, que aparecieron a baja frecuencia (<5%) como consecuencia de la integración del plásmido en el cromosoma de la célula huésped y que, consecuentemente, no eran el resultado de un verdadero hecho de transposición.

12.2. Construcción de mutantes por reemplazamiento alélico.

Para la construcción de mutantes de *P. putida* por reemplazamiento alélico se utilizó el plásmido pKNG101 (ver apartado de plásmidos), en el cual se clonó el gen a mutar, silvestre o portando una delección, interrumpido por un gen chivato, el casete *aphA3* (Trieu-Cuot y Courvalin, 1983) de manera que, flanqueando el gen chivato por cada lado en la construcción se extendió una secuencia de ADN de *P. putida* de, al menos, 1 kb. El plásmido se transfirió desde *E. coli* CC118 λ pir a *P. putida* en conjugación tripartita por mediación de una cepa auxiliar, como se explica en el **apartado 11.1** de *Materiales y Métodos*. En un primer paso, se seleccionaron los exconjugantes resistentes a estreptomicina, surgidos como consecuencia de la integración del plásmido en el cromosoma del huésped, por recombinación homóloga a través de las secuencias que flanqueaban el marcador *aphA3*. Tras comprobar que estas colonias (denominadas merodiploides o cointegrados) manifestaban el fenotipo conferido por el marcador introducido (Km^R), se descartaron posibles mutantes espontáneos resistentes a estreptomicina. Los merodiploides que aparecieron pertenecían a dos categorías: aquellos en los que el hecho de recombinación se había producido aguas arriba del marcador, y aquellos en los que se había producido aguas abajo del mismo. Las cepas merodiploides, por contener los genes *sacBR* presentes en el plásmido pKNG101, no deberían crecer en presencia de sacarosa, debido a la producción de levanos que son tóxicos para las células (Kaniga *et al.*, 1991); sin embargo, en ocasiones, las condiciones del medio tuvieron que optimizarse para alcanzar las condiciones de letalidad. Los parámetros que se barajaron fueron: aumentar la concentración de sacarosa hasta 10-15% (p/v), bajar la concentración de NaCl hasta 0,1% (p/v), o bajar la temperatura de crecimiento a 20°C o incluso a 4°C. Confirmar la legitimidad de los cointegrados en Southern blot fue crítico para garantizar la eficacia de las selecciones posteriores. La resolución de los cointegrados por recombinación homóloga se llevó a cabo en ausencia de presión selectiva siguiendo dos estrategias. En unos casos, los merodiploides se cultivaron en LB durante 12-16 h y estos cultivos se utilizaron como inóculo de medio fresco, así hasta completar 50 generaciones. A continuación, diluciones seriadas se sembraron en LB suplido con sacarosa, en las condiciones optimizadas de concentración del disacárido, de NaCl y temperatura. Alternativamente, los merodiploides se incubaron en placa a 4°C durante una semana y transcurrido ese tiempo, se aislaron colonias en LB suplido con sacarosa. La ocurrencia

de un segundo hecho de recombinación tuvo como consecuencia la pérdida del vector y, con ello la adquisición de la resistencia a sacarosa y la pérdida de una de las dos copias del gen, bien fuese el alelo silvestre o el mutante. La legitimidad de los clones resueltos a favor de la copia mutada (Sac^r , Km^r) se confirmó mediante PCR y Southern blot con oligos y sondas apropiadas.

13. TÉCNICAS DE ADN y ARN.

13.1. Determinación de la concentración de ADN y ARN.

Para estimar la concentración de ADN de una solución se utilizó el método espectrofotométrico descrito por Sambrook *et al.* (1989).

La absorbancia de la solución de ADN o ARN se determinó a 260 nm y 280 nm, frente a un blanco de H₂O milliQ o TE dependiendo del disolvente utilizado en la muestra. La concentración de ADN o ARN de la muestra se calculó respecto al valor estándar de $A_{260}=1$ para soluciones con 50 µg/ml de ADN de cadena doble o 40 µg/ml de ARN. La relación A_{260}/A_{280} se utilizó para estimar el grado de pureza de la preparación, de forma que los valores de esta relación por debajo de 1,8 se consideraron indicadores de contaminación por proteínas y/o fenol.

13.2. Electroforesis de ADN y ARN en geles de agarosa.

13.2.1. Electroforesis de ADN.

La separación tanto de plásmidos completos como de fragmentos de ADN originados por la digestión con enzimas de restricción se realizó mediante electroforesis en geles de agarosa (0,7-1,5%, p/v) preparados en tampón TAE. Su visualización se hizo tras teñido con bromuro de etidio y exposición del gel a luz ultravioleta (254 nm) (Sambrook *et al.*, 1989). Como marcadores de peso molecular se usaron los fragmentos de ADN del fago λ cortado con los enzimas *HindIII*, *HindIII/EcoRI* o, alternativamente, con los marcadores comerciales VIII y X (Roche Molecular Biochemicals, ref. 1336045 y 1498037, respectivamente). Las imágenes se recogieron con una video-cámara acoplada a una impresora térmica, empleando el equipo "gelprinter" de la casa comercial TDI (Madrid).

13.2.2. Electroforesis de ARN.

Las muestras de ARN se separaron y visualizaron, en aquellos casos en que fue necesario, de la misma forma que la descrita anteriormente para el ADN con las siguientes modificaciones para eliminar posibles contaminaciones de ARNasas: todo el material de electroforesis se enjuagó previamente en SDS al 1% (p/v) y se aclaró con una solución de DEPC (1:1000, v:v) en H₂O. El tampón TAE se preparó por dilución del 50 veces concentrado en la solución de DEPC anterior. La concentración de la agarosa en el gel fue de 1,5% (p/v), a la que se adicionó SDS (0,1%, p/v). Todo el material de vidrio empleado se trató previamente con cloroformo para eliminar posibles contaminaciones de ARNasas.

13.3. Recuperación de fragmentos de ADN de geles de agarosa.

Los fragmentos de ADN se recuperaron de los geles de agarosa con ayuda de un bisturí y se extrajeron utilizando el sistema comercial QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen cat. no. 28704), siguiendo las instrucciones del fabricante.

13.4. Transferencia de ADN a membrana por el método de "Southern Blotting" e hibridación.

Las muestras de ADN tanto cromosómico como plasmídico, digeridas con enzimas de restricción o sin digerir, se separaron en geles de agarosa y se transfirieron a membranas de nylon de 0,45 μ m de diámetro de poro cargadas positivamente (Boehringer Mannheim, cat. no. 1417240), bien por capilaridad, siguiendo el protocolo de transferencia descrito por Sambrook *et al.* (1989), o bien por vacío utilizando el aparato "VacuGene XL Vacuum Blotting System" (Pharmacia, cat. no. 56-1130-80) según las instrucciones recomendadas por el fabricante. Finalizada la transferencia, la membrana se lavó en 2xSSC durante 10 minutos, para eliminar posibles restos de agarosa. La fijación del ADN a la membrana seca se realizó mediante exposición a luz UV (254 nm) durante 3 minutos por cada lado. La hibridación y la posterior detección se realizaron siguiendo las instrucciones indicadas por el sistema comercial "DIG DNA Labelling and Detection Kit (Roche Molecular Biochemicals, cat. no. 1093657). Las membranas se hibridaron y se lavaron en condiciones estrictas. El marcaje de la sonda de ADN se hizo con digoxigenina-dUTP mediante extensión con el fragmento Klenow de la ADN-polimerasa de *E. coli*, y utilizando como cebadores una mezcla aleatoria de

hexanucleótidos, según se indica en el kit comercial de Boehringer Mannheim (cat. no. 1093657). Alternativamente, también se realizó el marcaje de la sonda por PCR usando DIG-11-dUTP (Boehringer Mannheim, cat. no. 10933088) (ver **apartado 13.5** de la presente sección de *Materiales y Métodos*).

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

La reacción de amplificación exponencial en cadena con una ADN polimerasa termorresistente se llevó a cabo para la obtención de fragmentos de ADN para su posterior clonaje o secuenciación, para la obtención de sondas marcadas con digoxigenina, y en la identificación de secuencias de ADN específicas.

La reacción de amplificación contenía: ADN molde (0,2 ng de ADN cromosómico ó 10 pg de ADN plasmídico); cebadores, 50-100 pmoles; tampón de Taq ADN-polimerasa (KCl, 50 mM; MgCl₂, 1,5 mM; Tris-HCl, 10 mM pH 9); dNTPs, cada uno 0,1 mM; Taq ADN polimerasa, 0,5 unidades; H₂O milliQ, hasta 100 µl.

En el caso de que el producto de la PCR fuera una sonda marcada, la reacción contenía: ADN molde, 250 µg; cebadores, 50 pmoles; tampón de Taq ADN-polimerasa (KCl, 50 mM; MgCl₂, 1,5 mM; Tris-HCl, 10 mM pH 9); dNTPs-DIG, cada uno 0,1 mM (la proporción dTTP:DIG-11-dUTP utilizada fue de 9:1); Taq ADN polimerasa, 0,5 unidades; H₂O milliQ, hasta 50 µl.

La reacción de amplificación lineal se realizó en la obtención de moléculas de ADN monocatenario marcadas con cromóforos fluorescentes. La secuenciación de ADN se desarrolla en el **apartado 13.7** de la presente sección de *Materiales y Métodos*.

Las condiciones estándar de la reacción de amplificación fueron las siguientes: tras una desnaturalización inicial a 94°C durante 3 minutos, tuvieron lugar 25 ciclos de 1 minuto a 94°C, 1 minuto de apareamiento a la temperatura adecuada para cada pareja de cebadores (de 48 a 60°C) y 1 minuto de extensión por cada kb de ADN molde; a estos 25 ciclos le siguieron 7-10 minutos a 72°C para finalizar una posible extensión incompleta de los productos de PCR. Cuando la reacción estándar no resultó

satisfactoria, se combinaron distintas modificaciones en la concentración de $MgCl_2$ (incrementada a 3 ó 4,5 mM) y/o la presencia de ciertos compuestos en la mezcla de reacción, como por ejemplo glicerol al 10% (v/v) o DMSO al 5% (v/v). Los productos obtenidos tras la amplificación se purificaron utilizando el sistema comercial QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN, cat. no. 28104) para eliminar la mezcla de reacción.

Cuando la reacción de PCR se utilizó como técnica para la identificación de un plásmido recombinante de entre un conjunto de candidatos potenciales, se llevó a cabo PCR de colonia utilizando el método anteriormente descrito, sustituyendo en la mezcla de reacción el ADN cromosómico o plásmídico se sustituyó por biomasa procedente de una colonia.

Otros usos concretos de la PCR, como la amplificación de ADNc se desarrollan en los apartados en los que se recoge la información del experimento completo.

13.6. Reacción de amplificación en cadena con retro-transcriptasa reversa (RT-PCR).

Mediante RT-PCR se puede determinar la presencia o ausencia de moldes de ARN en una muestra. Se trata de una técnica semicuantitativa que puede llegar a dar una idea de la expresión de un gen. En nuestro caso se empleo para dilucidar si un conjunto de genes formaban o no parte de una única unidad transcripcional, esto es, si constituían un operón. Para ello, un cultivo de 12-16 h de la cepa en el medio de cultivo en cuestión se diluyó hasta DO_{660} 0,4 y se cultivó hasta alcanzar DO_{660} 1,0; entonces se recogieron 3 ml por centrifugación a $3.000 \times g$ a $4^\circ C$. Cuando fue necesario, las células se almacenaron a -20 ó $-70^\circ C$ hasta la posterior extracción de ARN total utilizando el kit RNAeasy (QIAGEN cat. no. 74104). Posteriormente, las muestras se trataron con ADNasa libre de ARNasa a $37^\circ C$ durante 1-2 horas, y a continuación se inactivó a $65^\circ C$ durante 15 minutos. La síntesis de ADNc en la reacción de retro-transcripción se llevó a cabo empleando el kit TitanTM One Tube RT-PCR System (Boehringer Mannheim cat. no. 1888382), que utiliza la transcriptasa reversa del virus de la mieloblastosis de ave (AMV) según las instrucciones del fabricante.

13.7. Secuenciación de ADN.

La secuenciación de ADN se llevó a cabo en nuestro grupo de investigación, utilizando aparatos de la casa comercial Applied Biosystems (modelos 310 y 3100). El método de secuenciación fue el comercializado por Perkin Elmer, ABI PRISM™ Dye Terminator, que utiliza en la reacción de extensión el enzima comercial denominado “AmpliTaq ADN Polymerase” (cat. no. 402122), y emplea dideoxinucleótidos marcados diferencialmente con cromóforos fluorescentes. Se secuenciaron siempre ambas cadenas para eliminar las ambigüedades que surgían.

13.8. Otras técnicas de manipulación de ADN.

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

14. DETECCIÓN DE PROTEÍNAS PERIPLÁSMICAS EN EL MEDIO EXTRACELULAR

En la ejecución de este protocolo se emplearon tubos de material transparente durante las centrifugaciones, de manera que se pudiera percibir claramente la transparencia o la turbidez de las muestras. Cepas de *P. putida* (portando el plásmido pJB3-Km1 ó pJB3-Tc19, que tienen el gen *bla*, que codifica la enzima β -lactamasa, y confiere resistencia a ampicilina y piperacilina, entre otros anticuerpos β -lactámicos) se cultivaron en 25 ml de medio líquido LB con los antibióticos adecuados, hasta alcanzar una DO_{660} de 0,5. Las células bacterianas se recogieron por centrifugación a 15.000 x g durante 7 minutos a 4°C (no se utilizó el freno de la centrífuga al parar). A continuación, se procedió a la lisis del sedimento celular y a la precipitación de las proteínas presentes en el sobrenadante.

14.1. Preparación de lisado celular total.

El sedimento celular se resuspendió en tampón de muestra (Laemmli, 1970) a razón de 50 μ l por cada equivalente de DO_{660} -ml (el número de equivalentes de DO_{660} -

ml se calculó multiplicando el volumen, en ml, de cultivo centrifugado por su DO_{660}). Para eliminar la viscosidad de la muestra debida a los ácidos nucleicos, se añadieron 2,5 U de la endonucleasa comercial "Benzonasa" (Merck, cat. no. 1.01653), por cada equivalente de DO_{660} -ml. Tras 10 minutos de incubación a temperatura ambiente, las muestras se solubilizaron calentándolas durante 5 minutos a 95°C y, a continuación, se enfriaron en hielo. Las células sin romper y los restos celulares de mayor tamaño se descartaron por centrifugación a $17.000 \times g$ a 4°C durante 3 minutos.

14.2. Precipitación de proteínas del sobrenadante.

Quince ml del sobrenadante libre de células, se filtraron utilizando filtros estériles de acetato de celulosa de $0,22 \mu\text{m}$ de diámetro de poro (Schleicher-Schuell, cat. no. 10462200). Las proteínas del sobrenadante resultante se precipitaron con etanol puro añadido al sobrenadante en proporción 1:5 (v:v) durante 30 minutos a -20°C y se centrifugaron a $15.000 \times g$ durante 15 minutos a 4°C . El sedimento así obtenido correspondiente al sobrenadante se dejó secar a temperatura ambiente y se resuspendió en tampón de muestra de Laemmli, y se solubilizó del mismo modo que se hizo con el sedimento de células. El tampón de muestra se añadió en la misma proporción que la indicada en el **apartado 14.1** de esta sección (teniendo en cuenta que este sedimento provenía de 15 ml de cultivo original).

14.3. Separación de péptidos por electroforesis desnaturizante en gel de poliacrilamida en presencia de SDS (EGPA-SDS).

Para la separación electroforética de proteínas se utilizó el equipo de electroforesis vertical "Mini-PROTEAN II" (Bio-Rad Laboratories, cat. no. 165-2940) siguiendo las instrucciones recomendadas por el fabricante. Las electroforesis se realizaron utilizando geles discontinuos de poliacrilamida de $0,75 \text{ mm}$ de espesor, de acuerdo con el método descrito por Laemmli (1970). Los geles se prepararon a una concentración de acrilamida del 10% (p/v) en el segmento separador y del 4% (p/v) en el segmento concentrador, manteniéndose una relación entre acrilamida:bisacrilamida de 29:1. Tanto los geles como el tampón de electroforesis llevaban SDS (0,1%, p/v).

Para el análisis electroforético del lisado celular, obtenido como se detalla en el **apartado 14.1**, se utilizaron $15 \mu\text{l}$ (0,3 equivalentes de DO_{660} -ml) y para el análisis de

las proteínas del sobrenadante (ver apartado 14.2) se utilizaron 25 μ l (0,5 equivalentes de DO_{660} -ml). Como patrón de peso molecular se utilizó el marcador comercial "Molecular Weight Standards, SDS-PAGE" (Sigma, cat. no. MW-SDS-70). El patrón se diluyó en tampón de muestra según las recomendaciones del fabricante y se solubilizó de manera idéntica a las muestras problema.

Las proteínas se visualizaron directamente en el gel mediante una tinción con una solución de Azul de Coomassie (Azul de Coomasie, 0,25% [p/v] en una mezcla de metanol:ácido acético:agua en proporción 45:10:45 [v:v:v]). En lugar de las 2-4 horas requeridas por el método tradicional, el proceso se aceleró por calentamiento del gel sumergido en la solución anterior, en un horno microondas, hasta justo alcanzar el punto de ebullición, en que se expuso a temperatura ambiente en esta solución durante 5 minutos. La decoloración del gel transcurrió a temperatura ambiente en una solución idéntica a la de tinción pero sin colorante, que se cambió frecuentemente por solución fresca, hasta que las bandas de proteínas se visualizaron con nitidez. El calentamiento por horno microondas también aceleró el proceso de decoloración.

Alternativamente, las proteínas también se visualizaron directamente en el gel mediante tinción de plata específica para proteínas (Switzer *et al.*, 1979). Debido a la alta sensibilidad de esta tinción, es fundamental utilizar durante todo el proceso H_2O_d de alta calidad (18 $M\Omega$ x cm de resistividad), material de vidrio muy limpio, y manejar todo el material con guantes enjuagados previamente con H_2O_d . Todas las incubaciones se realizaron con agitación suave y a temperatura ambiente. Tras la electroforesis, el gel de acrilamida se sumergió en una solución fijadora (etanol:ácido acético:agua, en proporción 40:10:50 [v:v:v], almacenada a 4°C) durante 30 minutos. A continuación el gel se incubó durante al menos 30 minutos en una solución de incubación (etanol, 30% [v/v]; acetato sódico, 0,39 M; $Na_2S_2O_3$, 8 mM), tras lo cual el gel se lavó 3 veces con H_2O_d durante 5 minutos cada vez. Entonces el gel se sumergió durante 40 minutos en la solución de tinción ($AgNO_3$, 0,1% [p/v]; formaldehído, 0,02% [v/v]). Esta solución se preparó justo antes de utilizarse y se protegió de la luz). Tras la tinción el gel se lavó una vez con H_2O_d durante 5 minutos, y se transfirió a un recipiente de cristal limpio. Se añadió la solución reveladora (Na_2CO_3 , 0,24 M, almacenada a 4°C, a la que se añadió formaldehído, 0,02% [v/v] justo antes de utilizarse) y se incubó durante

aproximadamente 20 minutos. El revelado se paró sumergiendo el gel durante 20 minutos en una solución de EDTA 39 mM, pH 8,0.

Los geles se plastificaron previamente a su almacenamiento a largo plazo, para lo cual se incubaron en una solución de glicerol:metanol:agua (3:30:67, v:v:v) en agitación durante dos horas. A continuación se prensaron entre dos hojas de papel celofán transparente, humedecidas previamente en H₂O destilada, y se dejaron secar durante una noche a temperatura ambiente.

14.4. Transferencia a nitrocelulosa e inmunodetección de β -lactamasa.

En la transferencia de las proteínas separadas electroforéticamente, se utilizó una membrana de difluoruro de polivinilideno (PVDF) (Roche, cat. no. 3010031) de 0,45 μ m de diámetro de poro. Tras la electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS, el gel separador y la membrana se equilibraron brevemente en tampón de transferencia (Tris, 20 mM; glicina, 150 mM; etanol 20% [v/v]) y la transferencia se realizó utilizando el equipo "Mini Trans-Blot" (Bio-Rad Laboratories, cat. no. 170-3930) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. A continuación, la membrana se sumergió en rojo Ponceau (Ponceau S, 0,2% p/v; ácido tricloroacético (TCA), 3% p/v) y se agitó suavemente durante 5 minutos a temperatura ambiente. Después se lavó 3 ó 4 veces con H₂O destilada hasta que las bandas de proteína se visualizaron claramente y, finalmente, se secó entre dos hojas de papel Whatman 3MM. Así, además de contar con la posición correspondiente a los patrones, se comprobó la eficiencia de la transferencia. En este punto, la membrana se almacenó para su uso posterior o se utilizó inmediatamente para la detección inmunológica.

En el revelado inmunológico, la membrana se incubó en agitación durante 5 minutos en tampón PBS (Na₂HPO₄, 10 mM pH 7,4; NaCl, 137 mM; KCl, 2,7 mM) suplido con leche desnatada al 5 ó 10% (p/v), según se emplease en el revelado un sustrato cromogénico o quimioluminiscente, respectivamente. Esta solución de PBS-leche se utilizó como bloqueante en prevención de uniones inespecíficas de los anticuerpos a las membranas en todas las incubaciones y lavados siguientes, salvo que se indique lo contrario. Como anticuerpo primario se utilizó un anticuerpo policlonal de conejo (diluído 1:1000) dirigido contra la enzima β -lactamasa de *E. coli* (5 Prime-3

Prime, Inc., cat. no. 5307-661211, cedido por el Dr. LLoubès, CNRS, Marsella, Francia). La membrana se incubó con el primer anticuerpo (diluído en PBS-leche) en agitación, durante 1 hora y a temperatura ambiente o, alternativamente, durante toda la noche a 4°C. Después se realizaron 3 lavados con PBS-leche de 5 minutos cada uno y se añadió el segundo anticuerpo. Como anticuerpo secundario se utilizó el anticuerpo policlonal de cabra (diluído 1:1000) dirigido contra inmunoglobulinas de conejo (CALTAG, cat. no. L42007), conjugado a peroxidasa de rábano. Tras la incubación con el anticuerpo secundario en PBS-leche en agitación durante 1 hora a temperatura ambiente, se realizaron 3 lavados de 5 minutos con PBS y se procedió al revelado (4 lavados de 10 minutos, en el revelado quimioluminiscente).

En el caso del revelado con un sustrato cromogénico, la membrana se incubó en oscuridad en una solución extemporánea de PBS, con 0,6 mg/ml de 3,3'-diaminobencidina y 0,03% (v/v) de H₂O₂. Cuando las bandas de producto precipitado se visualizaron nítidamente, la reacción se paró lavando varias veces con H₂O destilada.

Para el revelado quimioluminiscente se utilizó el sistema comercial "ECL Western blotting detection reagents" (Amersham, cat. no. RPN 2109) siguiendo las instrucciones del fabricante. Las bandas de reacción se visualizaron por exposición de una película "Hyperfilm-MP" (Amersham, cat. no. RPN 8). El revelado quimioluminiscente de las membranas fue compatible con un revelado clásico posterior, con el único requisito de un lavado en PBS durante 5 minutos al concluir el revelado quimioluminiscente.

15. TÉCNICAS DE MICROSCOPIA.

15.1. Microscopía electrónica de transmisión.

Células bacterianas procedentes de cultivos en el medio que se indique en cada caso y en la fase de crecimiento deseada se recogieron por centrifugación y se fijaron con una mezcla de formaldehído al 1% (v/v) y glutaraldehído al 2% (v/v) en tampón cacodilato 0,1 M pH 7,4 durante 2 horas a 4°C. Posteriormente, se lavaron con este mismo tampón y se fijaron con tetróxido de osmio al 2% (v/v) y ferrocianuro potásico al 1,5% (v/v) durante 1 hora. Las muestras se lavaron nuevamente con el tampón

cacodilato anterior y se contrastaron en bloque con acetato de uranilo al 1% (v/v) durante 1 hora, transcurrida la cual se deshidrataron en un gradiente de etanol y se sometieron a un tratamiento con óxido de propileno. A continuación, las muestras se infiltraron durante 1 hora en óxido de propileno:resina (1:1) y se mantuvieron en resina pura durante 12 horas, tras lo cual polimerizaron en una estufa a 60°C durante 12 horas. Finalmente los bloques se cortaron en secciones ultrafinas de aproximadamente 500 Å, que se contrastaron con acetato de uranilo y citrato de plomo. Las muestras se observaron con un microscopio electrónico de transmisión Zeiss modelo EM902, a un voltaje de aceleración de 80 kV. Tanto el procesamiento de las muestras como la observación de las preparaciones se realizaron en el Servicio de Microscopía Electrónica del Centro de Instrumentación Científica de la Universidad de Granada.

15.2. Microscopía electrónica de barrido.

Las cepas bacterianas se cultivaron en el medio líquido y en la fase de crecimiento que se indique en cada caso. Se colocó una gota de cultivo sobre un cubre-objetos impregnado con poli-L-lisina y se expuso durante 24 horas a vapores de glutaraldehído al 25% (v/v) en una cámara húmeda a 4°C. Las muestras se lavaron con H₂O destilada y después se deshidrataron en un gradiente de etanol. Posteriormente, se transfirieron a acetato de amilo y se desecaron por el método del punto crítico (Anderson, 1951) en un desecador marca Polaron. Finalmente, las muestras se montaron en carbón conductor LEIT C sobre un portamuestras de aluminio, se metalizaron con oro en un aparato "SEM Coating Unit E5000" marca Polaron, y se observaron con un microscopio óptico de barrido Zeiss modelo DSM950. Tanto el procesamiento de las muestras como la observación de las preparaciones se realizaron en el servicio de Microscopía Electrónica del Centro de instrumentación Científica de la Universidad de Granada.

16. TRATAMIENTO Y ANÁLISIS INFORMÁTICO DE SECUENCIAS

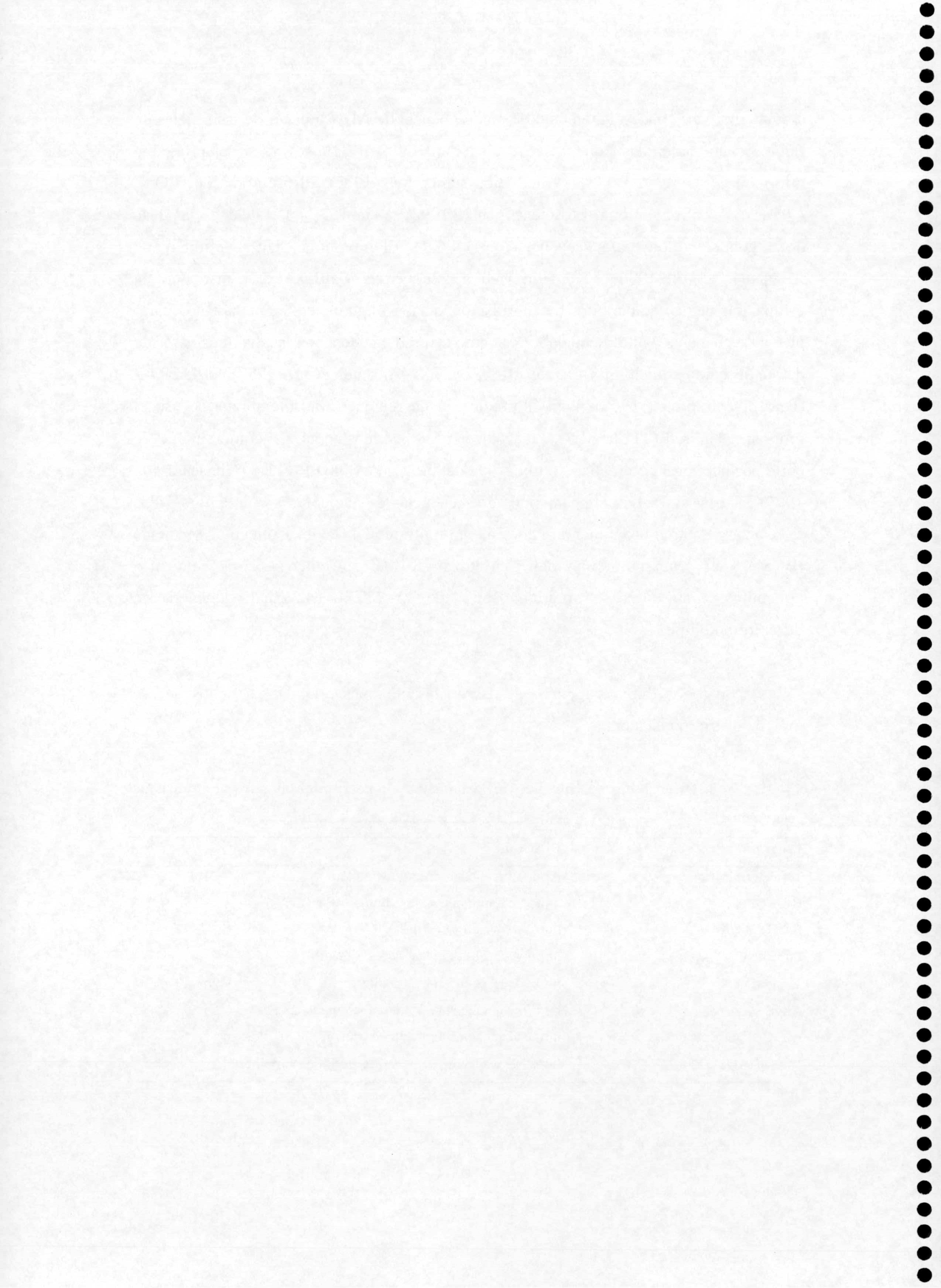
Para el análisis de secuencias de nucleótidos y aminoácidos (determinación de fases de lectura abierta, de los sitios de restricción, uso de codones, composición de aminoácidos, etc) se utilizaron los programas informáticos DNA Strider v. 1.1 (Marck, 1988) y OMIGATM v.2.0 (Oxford Molecular Ltd.). Para la generación de un

cromatograma y consecuentemente de una secuencia de ADN a partir de las señales de fluorescencia obtenidas con el secuenciador ABI Prism 310 se utilizó el programa informático SeqEd v. 1.0.3 (Applied Biosystems, Inc., 1992). El programa OLIGO v. 4.05 (W. Rychlik, National Biosciences, Inc., 1992) se empleó para el diseño y análisis de oligonucleótidos (para secuenciación y PCR). El programa "Tm determination" (Breslauer *et al.*, 1986) cuyo sitio web aparece en la **Tabla M.3** se usó para la estimación de la temperatura de hibridación de los oligonucleótidos. Para comparar nuevas secuencias, tanto de nucleótidos como de aminoácidos, con las distintas bases de datos, se emplearon los programas BLAST 2.2.3 (Altschul *et al.*, 1997), y FASTA3 (Pearson y Lipman, 1988). Para la predicción de regiones transmembrana se usó el programa Tmpred (**Tabla M.3**). La predicción de péptidos señal, así como su sitio de corte por peptidasas se realizó con la ayuda del programa SignalP v. 1.1 (Nielsen *et al.*, 1997) (**Tabla M.3**). Los alineamientos de secuencias de nucleótidos y de aminoácidos se realizaron con el programa de alineamiento múltiple del Baylor College of Medicine (BCM) y el programa Align del Genestream Resource Center. Los alineamientos obtenidos se trataron con el programa BoxShade 3.21 (**Tabla M.3**), para la generación de su formato lineal.

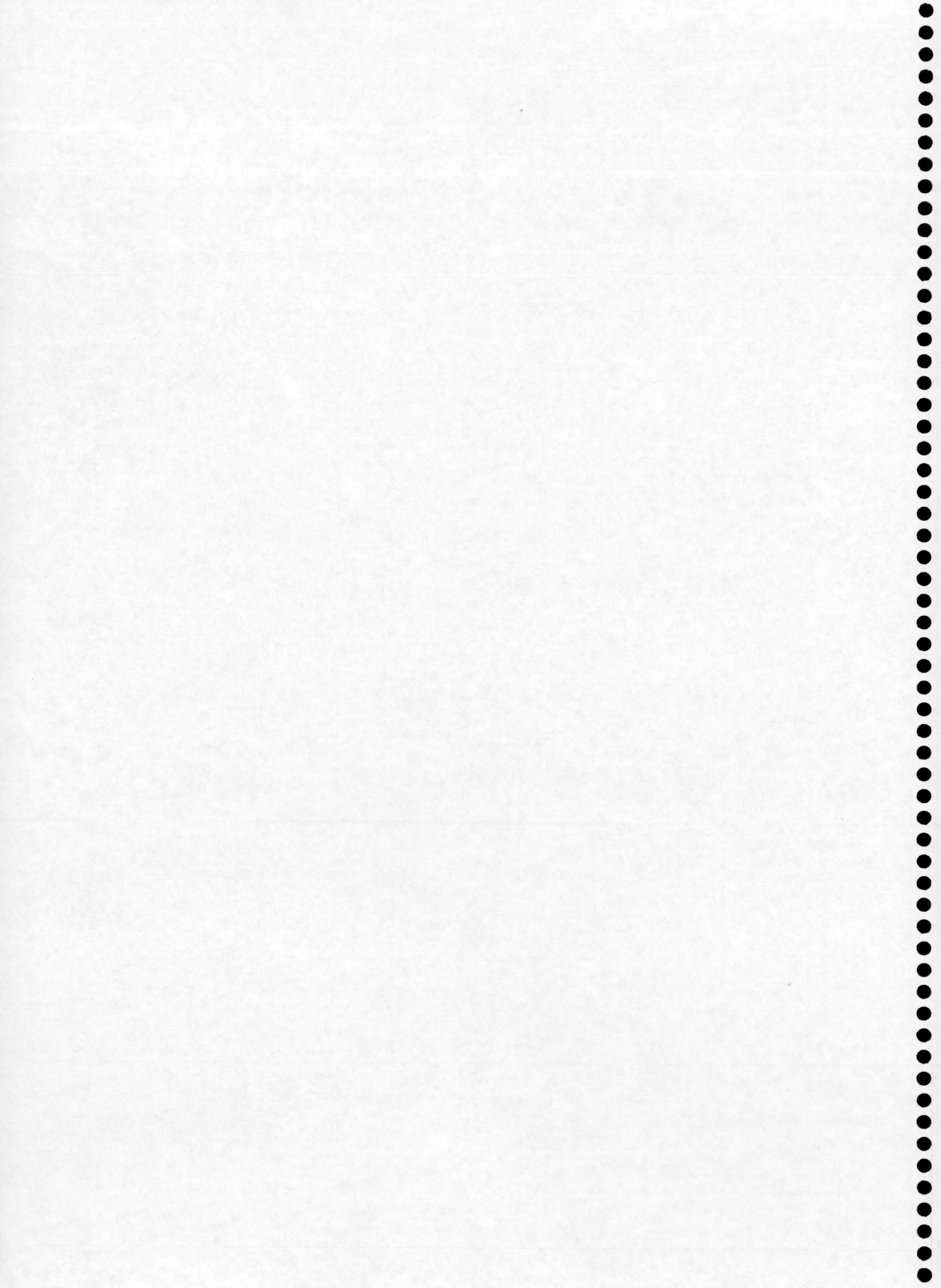
Con todos estos programas se usaron las opciones estándar, a menos que se indique otra circunstancia.

TABLA M.3. Direcciones de Internet con programas de herramientas para el análisis de secuencias.

Programa	Dirección
Tm determination	http://alces.med.umn.edu/rawtm.html
BLAST	http://ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/BLAST/
FASTA3	http://www2.ebi.ac.uk/fasta3/
SignalP V 1.1.	http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/
Tmpred	http://www.isrec.isb-sib.ch/software/TMPRED_form.html
Align	http://xylian.igh.cnrs.fr/bin/nph-align_query.pl
BCM Alignments	http://searchlauncher.bcm.tmc.edu/cgi-bin/multi-align/
BOXSHADE 3.21	http://www.ch.embnet.org/software/BOX_form.html



RESULTADOS



Capítulo 1

ESTUDIO Y CARACTERIZACIÓN FISIOLÓGICA DE LA TOLERANCIA A COMPUESTOS HIDROXILADOS AROMÁTICOS EN LA CEPA *Pseudomonas putida* DOT-T1E

RESUMEN

Pseudomonas putida DOT-T1E, una cepa altamente tolerante a tolueno, se aisló de la planta de tratamiento de aguas residuales de la ciudad de Granada. Esta cepa puede crecer en presencia de tolueno (90% v/v) como única fuente de carbono y energía y es resistente a disolventes orgánicos cuyo valor de $\log P_{ow}$ sea superior a 2,5 (Ramos *et al.*, 1995). La ruta catabólica que utiliza la cepa para degradar tolueno es la ruta de la tolueno dioxigenasa, en la que el tolueno se oxida hasta 3-metilcatecol, el cual es subsecuentemente transformado hasta productos intermedios del ciclo de Krebs (Mosqueda *et al.*, 1999). La tolerancia a disolventes orgánicos de esta cepa la hacía atractiva para llevar a cabo biotransformaciones en sistemas de doble fase y, en particular, para producir *p*-hidroxibenzoato (PHBA), un compuesto de alto valor añadido en la industria, por la ruta de la tolueno-4-monooxigenasa (T4MO). Puesto que la tolerancia de DOT-T1E a compuestos hidroxilados estaba inexplorada, se determinó la tolerancia a PHBA, así como a los productos hidroxilados intermedios que pudieran acumularse transitoriamente a partir de tolueno a través de la ruta de la T4MO. *Pseudomonas putida* DOT-T1E toleró altas concentraciones de tolueno y del ácido carboxílico aromático PHBA (18 g/l), sustrato y producto de la ruta de la T4MO, respectivamente. La presencia de cationes Mg^{2+} en el medio y la pre-exposición de las células a bajas concentraciones de PHBA (6 g/l), condujeron a aumentar la tolerancia a concentraciones más altas de PHBA en medio líquido (hasta 30 g/l) mediante adaptación fisiológica de las células. Asimismo, se demostró que la tolerancia de DOT-T1E a PHBA era inducible por el sustrato en sí mismo y no por un metabolito derivado de su metabolismo. Los compuestos hidroxilados produjeron alteraciones en la composición de ácidos grasos de los fosfolípidos, que en la fase estacionaria de crecimiento consistieron en una disminución de los ácidos grasos ciclopropano, así como una disminución de las relaciones de ácidos grasos saturados/insaturados y *cis/trans*.

1. EFECTO DE COMPUESTOS AROMÁTICOS HIDROXILADOS DERIVADOS DEL METABOLISMO DE TOLUENO SOBRE EL CRECIMIENTO DE *P. putida* DOT-T1E.

Los compuestos aromáticos: *p*-hidroxibenzoato (PHBA), aldehído *p*-hidroxibencílico, alcohol *p*-hidroxibencílico, *p*-cresol, *m*-cresol, alcohol bencílico y benzoato son metabolitos derivados del metabolismo del tolueno a través de las cinco rutas catabólicas para la degradación de tolueno descritas en organismos aeróbicos (Figura R.1.1).

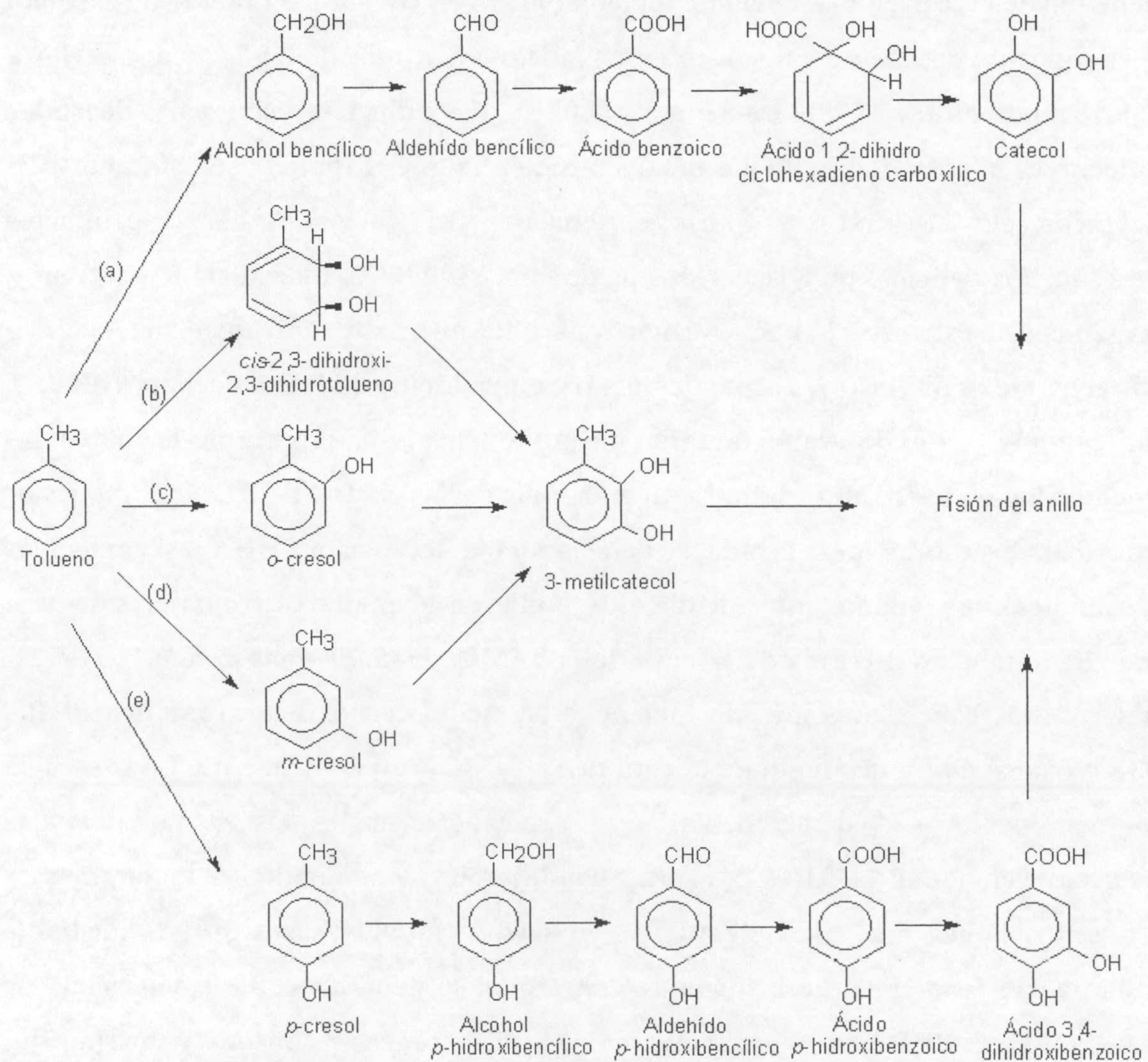


Figura R.1.1. Esquema de las distintas rutas de degradación catabólica de tolueno en *Pseudomonas*. (a) ruta codificada en el plásmido TOL pWW0 (tolueno monooxigenasa); (b) ruta codificada por el operón *tod* (tolueno 2,3-dioxigenasa); (c) ruta de la tolueno-2-monooxigenasa; (d) ruta de la tolueno-3-monooxigenasa; y (e) ruta de la tolueno-4-monooxigenasa (esquema obtenido de Weber *et al.*, 1995).

Con el objeto de analizar el nivel de tolerancia a estos compuestos aromáticos, se realizaron los ensayos de tolerancia que se describen a continuación. Para la evaluación de la tolerancia en medio sólido, *P. putida* DOT-T1E se cultivó durante 14-16 h en medio mínimo M9 con glucosa como fuente de carbono y a continuación se distribuyeron uniformemente alícuotas del cultivo, tal como se describe en el **apartado 4.2** de la sección de *Materiales y Métodos*, en placas de doble difusión de medio mínimo M9-agar con glucosa como única fuente de carbono, que contenían un gradiente lineal de concentración del compuesto objeto de estudio, cuyas cotas se indican en la **Tabla R.1.1**. Las placas se incubaron a 30 °C y se analizaron a las 44 h. El límite de inhibición se estableció en aquella concentración a partir de la cual el crecimiento no dio lugar a un césped bacteriano. Los resultados se muestran en la **Tabla R.1.1**. Entre los compuestos ensayados, los más tóxicos fueron el aldehído *p*-hidroxibencílico y los *m*- y *p*-cresoles, para los que una concentración de aproximadamente 1 g/l, ya inhibió el crecimiento. *P. putida* DOT-T1E presentó mayor tolerancia a los alcoholes y ácidos carboxílicos aromáticos y exhibió la tolerancia más alta a PHBA, resistiendo concentraciones de hasta 18 g/l.

Tabla R.1.1. Tolerancia de *P. putida* DOT-T1E a compuestos aromáticos resultantes de la oxidación aeróbica del tolueno a través de diferentes rutas.

Compuesto aromático	Gradiente (g/l) ^a	Medio sólido (g/l)
<i>p</i> -cresol ^b	0 - 1,5	0,9
<i>m</i> -cresol	0 - 1,5	1
alcohol bencílico	0 - 4,0	2,3
alcohol <i>p</i> -hidroxibencílico	0 - 8,8	4,5
aldehído <i>p</i> -hidroxibencílico	0 - 1,8	1
benzoato	0 - 10	7
PHBA	0 - 30	18

^a Cotas del gradiente.

^b Para cada compuesto, la concentración (mM) equivalente a 1 g/l es: *p*-cresol (9,26), *m*-cresol (9,26), alcohol bencílico (9,26), alcohol *p*-hidroxibencílico (8,06), aldehído *p*-hidroxibencílico (8,19), benzoato (8,19) y PHBA (7,24).

Alternativamente, para la determinación de la tolerancia en medio líquido, los cultivos se diluyeron hasta alcanzar una turbidez de 0,05 a 660 nm en el mismo medio mínimo M9 suplido con glucosa y con cantidades crecientes del compuesto. Las

concentraciones indicadas en la **Tabla R.1.2** constituyeron las máximas concentraciones a las que no se observó erradicación completa del crecimiento, monitorizado por medidas de turbidez y cuantificación del número de UFC/ml.

En el transcurso de los ensayos de tolerancia en medio líquido, se determinó el efecto de los compuestos tóxicos sobre la velocidad de crecimiento de la bacteria. En general, la adición al medio de cultivo de cualquiera de los compuestos hidroxilados aromáticos arriba mencionados aumentó el tiempo de generación de las células bacterianas (**Tabla R.1.2**), observándose una correlación positiva entre concentración del compuesto aromático y el aumento del tiempo de generación.

Tabla R.1.2. Tiempo de generación de células de *P. putida* DOT-T1E en medio mínimo M9-glucosa en presencia de compuestos aromáticos hidroxilados.

Compuesto hidroxilado	Concentración (g/l)	Tiempo de generación (min) ^a
ninguno	-	60
<i>p</i> -cresol	0,2	135
"	0,4	700
"	0,8	Sin crecimiento
<i>m</i> -cresol	0,4	81
"	0,8	Sin crecimiento
"	1,2	Sin crecimiento
alcohol bencílico	1	136
"	2	Sin crecimiento
"	4	Sin crecimiento
aldehído <i>p</i> -hidroxibencílico	0,5	80
benzoato	3	66
"	6	117
"	9	151
PHBA	6	101
"	12	244

^a El tiempo de generación se determinó en la fase exponencial de crecimiento.

El crecimiento celular resultó inhibido significativamente por *p*-cresol en concentraciones iguales o mayores a 0,4 g/l (Tabla R.1.2 y Figura R.1.2). Aunque no se detectó crecimiento a una concentración de 0,8 g/l, esto no significó un descenso en el número de UFC/ml del cultivo, aunque concentraciones mayores de este compuesto condujeron a un descenso de entre una y dos unidades logarítmicas en el número de UFC/ml.

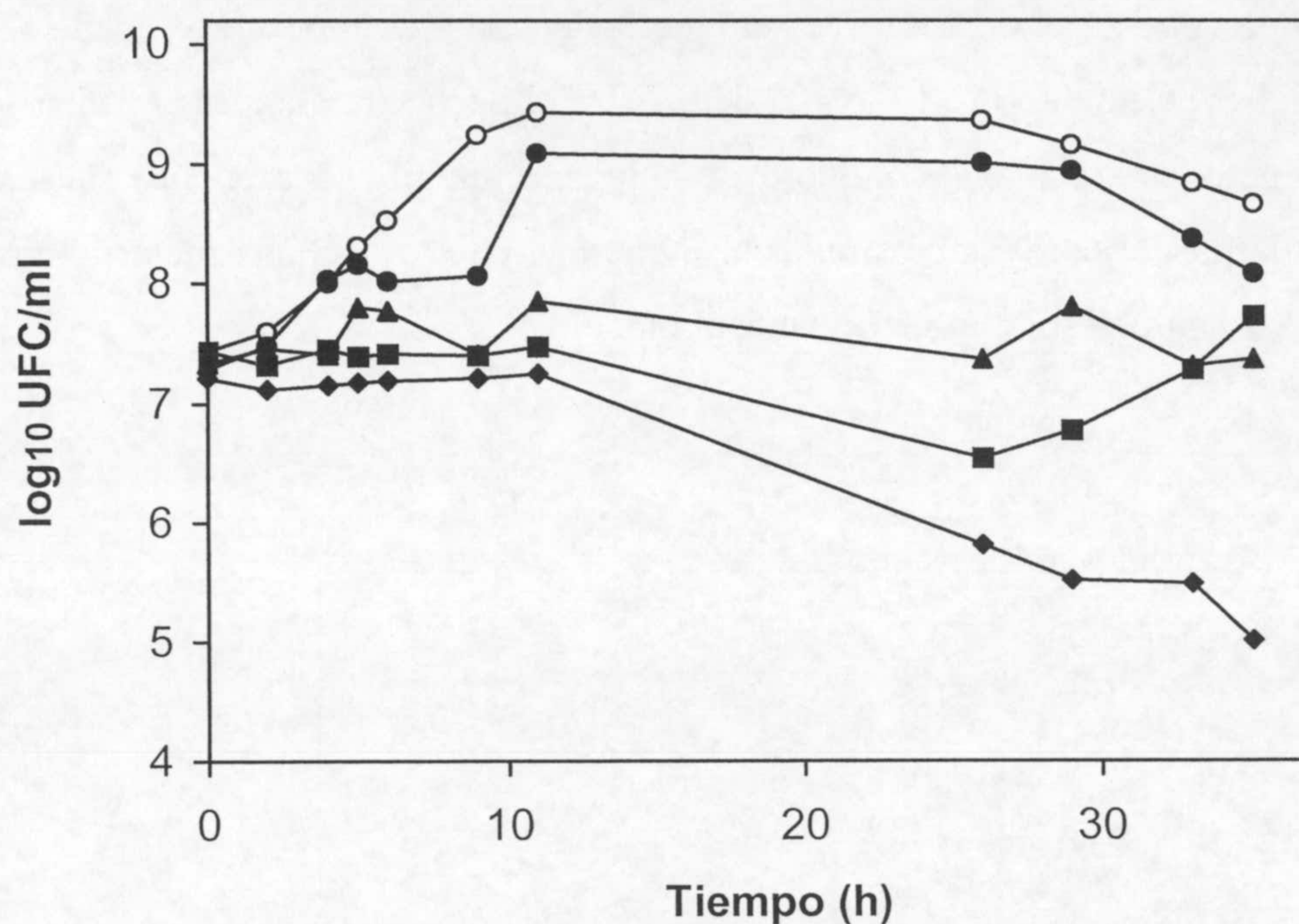


Figura R.1.2. Efecto de la concentración de *p*-cresol sobre el crecimiento de *P. putida* DOT-T1E. Treinta ml de medio mínimo M9 suplido con glucosa conteniendo 0 (○), 0,2 (●), 0,4 (▲), 0,8 (■) y 1,2 (◆) g/l de *p*-cresol, respectivamente se inocularon con 0,3 ml de un cultivo de 12-16 h de *P. putida* DOT-T1E en medio mínimo M9 con glucosa. El crecimiento bacteriano se siguió por conteo de UFC/ml en placas de LB.

A continuación se presentan los resultados obtenidos cuando se añadieron alternativamente *m*-cresol y alcohol bencílico al medio mínimo con glucosa como fuente de carbono. Las concentraciones ensayadas de *m*-cresol estuvieron en el intervalo de 0 a 1,2 g/l y las de alcohol bencílico entre 0 y 4 g/l. Los resultados obtenidos se muestran en las Figuras R.1.3 y R.1.4.

La adición de 0,4 g/l y 1 g/l de *m*-cresol y alcohol bencílico, respectivamente, afectó a la velocidad de crecimiento de *P. putida* DOT-T1E. El tiempo de generación se incrementó desde aproximadamente 60 minutos, en ausencia de los compuestos aromáticos, hasta alrededor de 81 y 136 minutos en presencia de *m*-cresol y alcohol bencílico, respectivamente (ver **Tabla R.1.2**). Concentraciones más altas de *m*-cresol (0,8 y 1,2 g/l) (**Figura R.1.3**) o de alcohol bencílico (2 y 4 g/l) (**Figura R.1.4**) inhibieron completamente el crecimiento, aunque las células permanecieron viables en el transcurso del experimento (10 h), como demuestra el hecho de que, tras evaluar los UFC/ml en diluciones seriadas, el número de células contabilizadas en las muestras recogidas a lo largo del ensayo fue similar al número inicial de células presente en el cultivo inmediatamente después de efectuarse el inóculo.

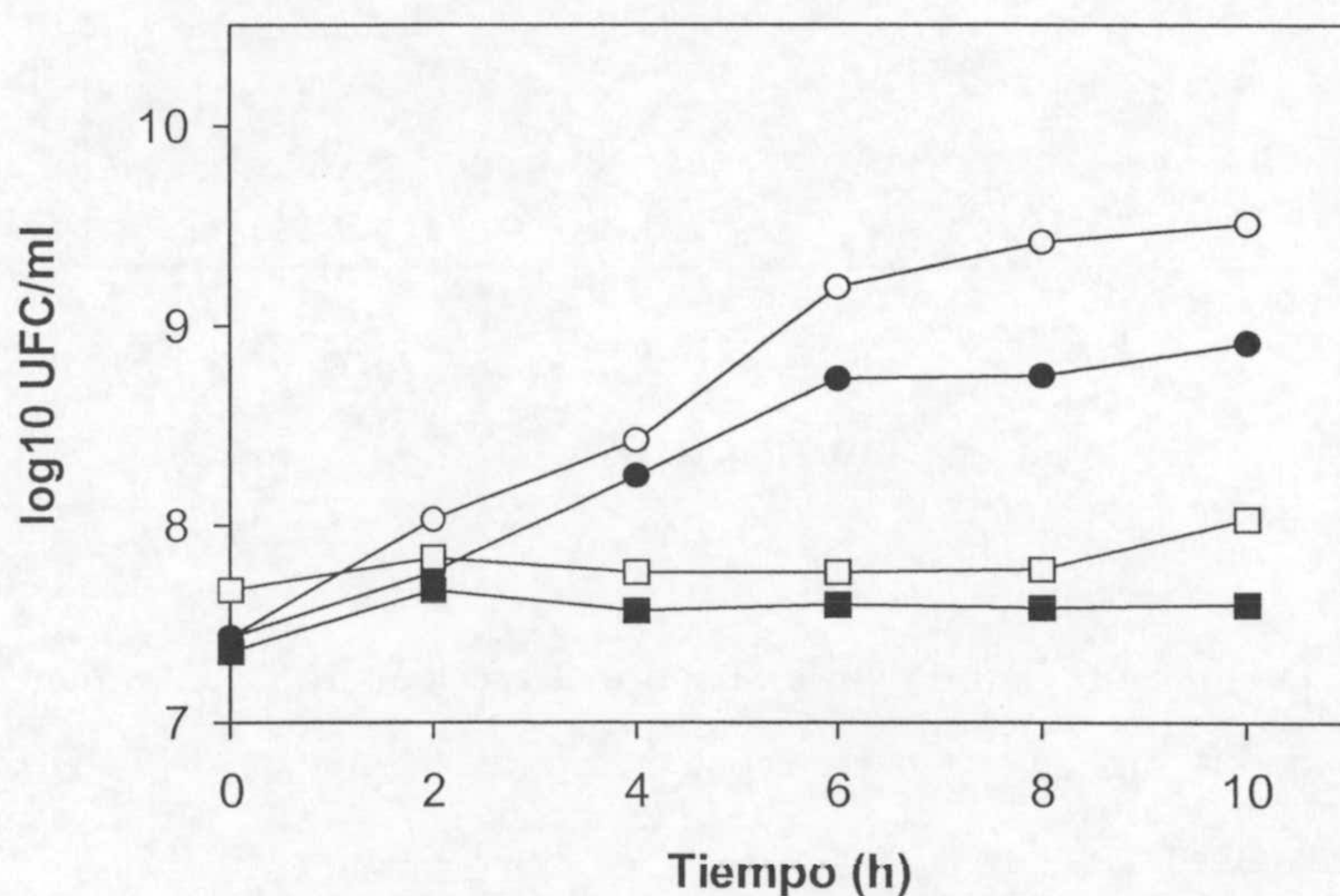


Figura R.1.3. Efecto de la concentración de *m*-cresol sobre el crecimiento de *P. putida* DOT-T1E. Las condiciones de cultivo fueron las mismas que las descritas en la leyenda de la **Figura R.1.2**, excepto que se adicionó *m*-cresol hasta alcanzar una concentración de 0 (○), 0,4(●), 0,8 (□), y 1,2 (■) g/l. La supervivencia se determinó mediante conteos de UFC/ml en placas de medio sólido LB.

No se pudo seguir el efecto del alcohol *p*-hidroxibencílico sobre el crecimiento a las concentraciones de inhibición en medio líquido, debido a la insolubilidad del compuesto en el medio de cultivo (<1,6 g/l).

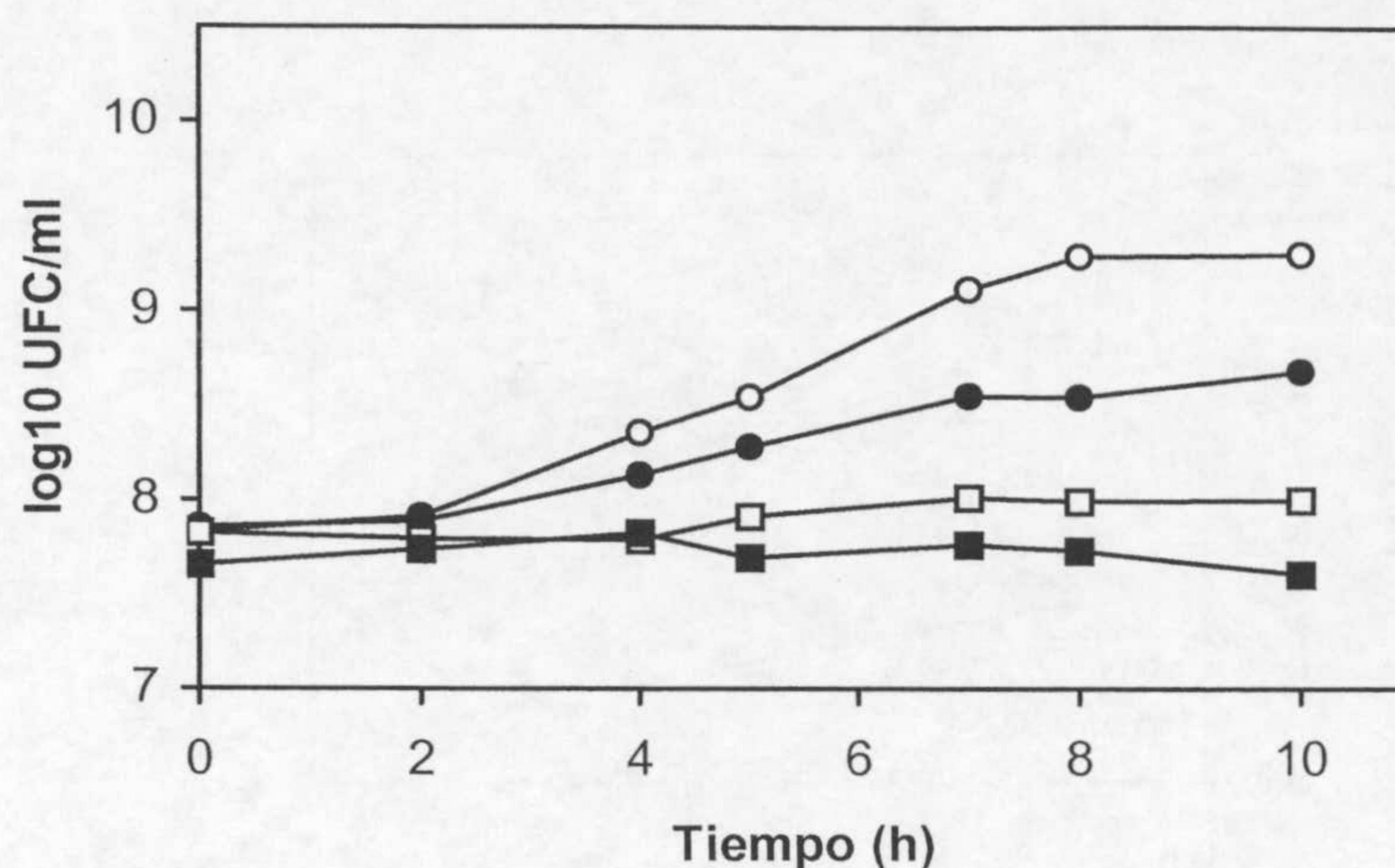


Figura R.1.4. Efecto de la concentración de alcohol bencílico sobre el crecimiento de *P. putida* DOT-T1E. Las condiciones de cultivo fueron las mismas que las descritas en la leyenda de la **Figura R.1.2**, excepto por la adición de 0 (○), 1 (●), 2 (□), y 4 (■) g/l de alcohol bencílico, respectivamente. La supervivencia se determinó mediante conteos de UFC/ml en placas de medio sólido LB.

Respecto al aldehído *p*-hidroxibencílico, una concentración de 0,5 g/l aumentó el tiempo de generación en un tercio (**Tabla R.1.2**), y 1 g/l detuvo totalmente el crecimiento durante las primeras 10 h (**Figura R.1.5**), aunque tras una incubación prolongada de hasta 50 h, se observó un aumento en el número de UFC/ml (no se muestra). Concentraciones mayores de este aldehído aromático, a saber 1,5-2 g/l, rindieron una supervivencia de alrededor del 0,01% del número de células inicial, tras un periodo de incubación de 24 h (no se muestra).

Posteriormente se evaluó la supervivencia de *P. putida* DOT-T1E cuando se añadió benzoato al medio de cultivo líquido. Se procedió como en los ensayos anteriores, excepto que el medio de cultivo se suplió con 0, 3, 6 ó 9 g/l de ácido benzoico. Cuanto mayor fue la concentración de ácido benzoico, menor fue la velocidad de crecimiento (**Tabla R.1.2**). Así, la adición de 6 g/l casi duplicó el tiempo de división.

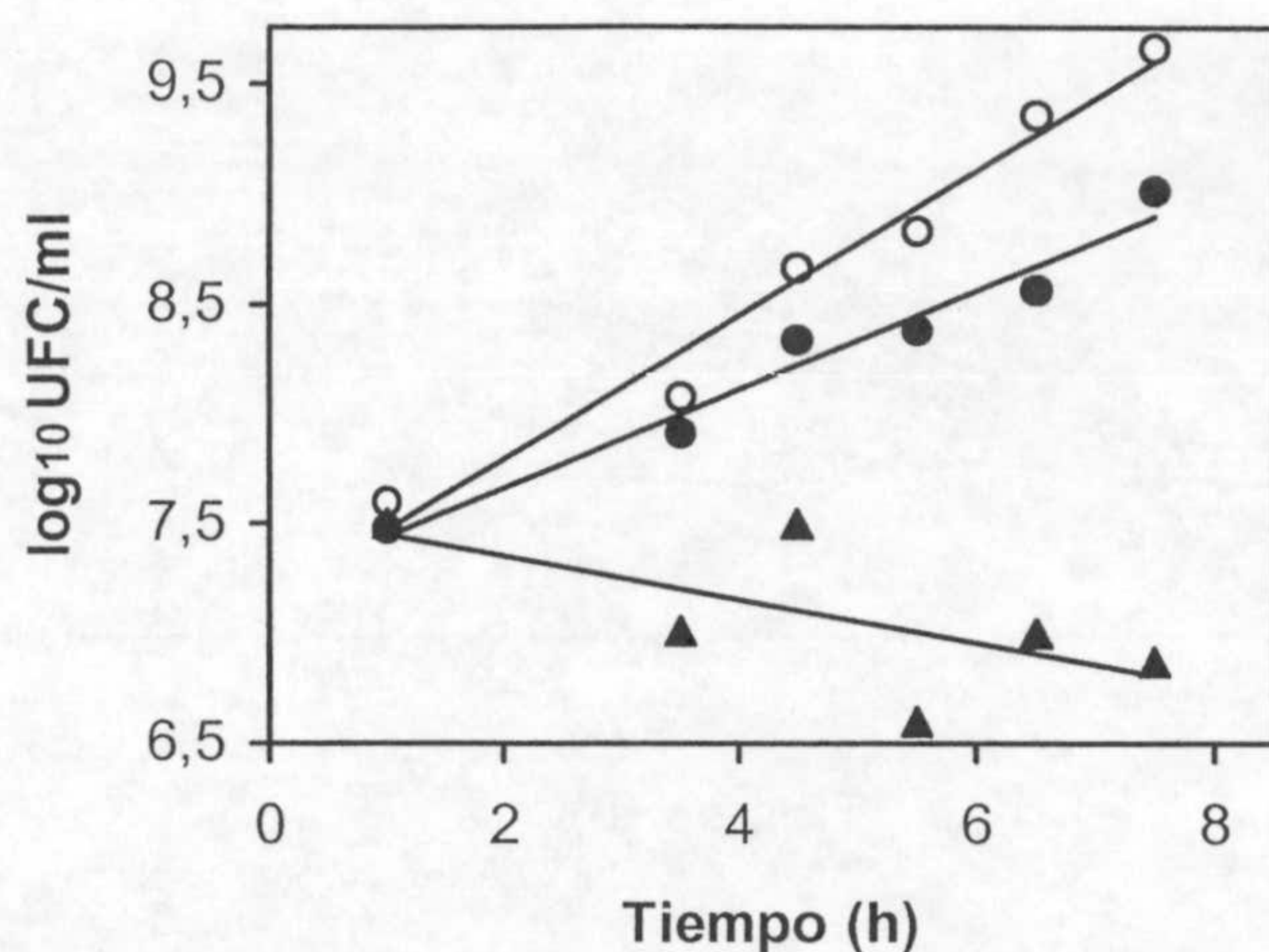


Figura R.1.5. Efecto de la concentración de aldehído *p*-hidroxibencílico sobre el crecimiento de *P. putida* DOT-T1E. Se procedió como se ha descrito en la **Figura R.1.2**, excepto por la adición de 0 (○), 0,5 (●) y 1 (▲) g/l de aldehído *p*-hidroxibencílico, respectivamente. La supervivencia se determinó mediante conteos de UFC/ml en placas de medio sólido LB.

La tolerancia a PHBA en medio líquido se estudió en un intervalo de 0 a 36 g/l mediante la evaluación del crecimiento a lo largo de 10 horas (**Figura R.1.6**).

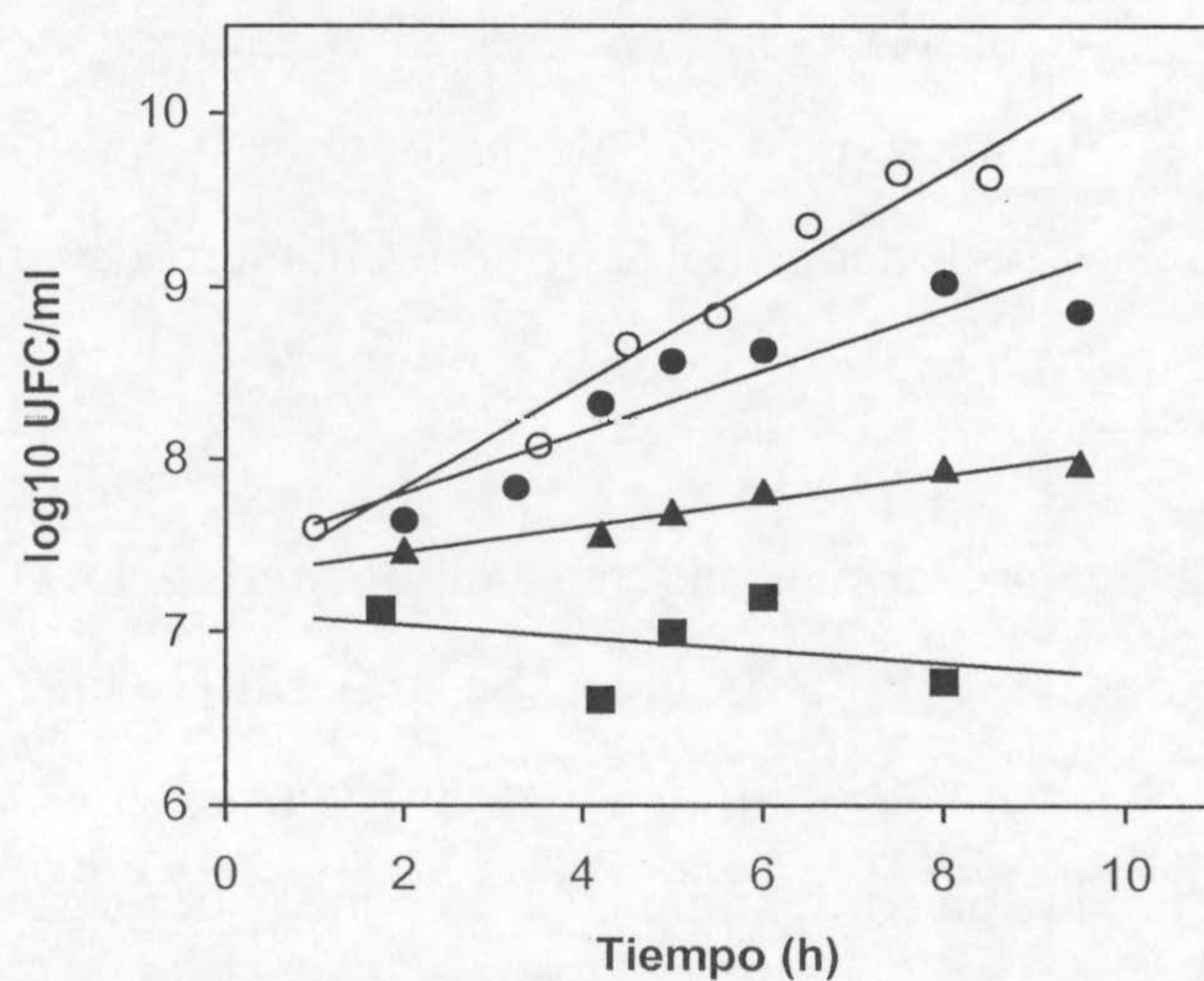


Figura R.1.6. Efecto de la concentración de PHBA sobre el crecimiento de *P. putida* DOT-T1E. Las condiciones de cultivo fueron las mismas que las descritas en la **Figura R.1.2**, excepto que la supervivencia se determinó en 30 ml de medio mínimo M9 suplido con glucosa conteniendo 0 (○), 6 (●), 12 (▲), y 18 (■) g/l de PHBA, respectivamente. La supervivencia se determinó mediante conteos de UFC/ml en placas de medio sólido LB.

En la **Tabla R.1.2** se muestra que concentraciones de 6 y 12 g/l de PHBA ejercieron un efecto inhibitorio sobre el crecimiento; desde un tiempo de generación de 60 min en ausencia del ácido carboxílico aromático se pasó a tiempos entre dos y cuatro veces superiores, respectivamente (**Tabla R.1.2**). A concentraciones más altas de PHBA se observó una inhibición total del crecimiento bacteriano.

También se estudió la tolerancia a PHBA de *P. putida* DOT-T1E durante incubaciones prolongadas. Los resultados se muestran en la **Tabla R.1.3**. Mientras que en ausencia del compuesto aromático o en cultivos con una concentración de 6-12 g/l de PHBA, el número de UFC/ml aumentó, éste no fue el caso de los cultivos con una concentración de 24 a 36 g/l. Sorprendentemente, en un cultivo con 18 g/l, el número de células viables cayó por debajo de 16 UFC/ml en 50 horas.

Tabla R.1.3. Supervivencia de *P. putida* DOT-T1E en concentraciones crecientes de PHBA tras una incubación de 50 horas.^a

PHBA (g/l)	UFC/ml
0	4,1 x 10 ⁹
6	4,0 x 10 ⁹
12	7,5 x 10 ⁸
18	< 16
24	2,2 x 10 ⁶
30	2,8 x 10 ³
36	3,7 x 10 ⁵

^a Treinta ml de medio mínimo M9 con glucosa y suplido con 0, 6, 12, 18, 24, 30 ó 36 g/l de PHBA se inocularon con 10⁷ UFC/ml de *P. putida* DOT-T1E, y se determinó el número de UFC/ml después de 50 horas.

2. EL *p*-HIDROXIBENZOATO COMO UN INHIBIDOR DEL CRECIMIENTO EN *P. putida* DOT-T1E.

Dada la elevada tolerancia natural de *P. putida* DOT-T1E a PHBA, así como su alta tolerancia a tolueno (hasta 90% [v/v], Ramos *et al.*, 1995), se consideró que esta cepa tenía interés biotecnológico para la biotransformación de tolueno en PHBA, un compuesto de alto valor añadido por ser el sustrato empleado en la obtención de polímeros de cristal líquido y conservantes de tipo parabenos. Al comienzo de este

trabajo, este proceso se había llevado a cabo en Dupont de Nemours con *P. mendocina* KR1, una cepa que es más sensible, tanto al sustrato tolueno (0,1 %, v/v) (Huertas, 1999) como al producto PHBA (8,5 g/l). Por esta razón, se profundizó en la caracterización fisiológica de la tolerancia a PHBA de *P. putida* DOT-T1E .

En el apartado anterior se describió que, tras una incubación prolongada (50 horas) en presencia de PHBA, el número de UFC de *P. putida* DOT-T1E en la muestra fue mayor a ciertas concentraciones altas del ácido carboxílico aromático que a ciertas concentraciones más bajas (ver **Tabla R.1.3**). Así, el número de bacterias en las muestras de cultivos con 24 g/l de PHBA fue del orden de 5 órdenes de magnitud mayor que en cultivos incubados con 18 g/l, a pesar de que estos cultivos mostraron una turbidez similar a 660 nm (alrededor de 0,4).

Con glucosa como única fuente de carbono y sin la adición de ningún aromático, la curva de crecimiento de *P. putida* DOT-T1E fue exponencial y se observó correlación entre la turbidez y el número de UFC/ml (**Fig. R.1.7A**); sin embargo, en presencia de 12 g/l de PHBA no se encontró correlación entre ambos parámetros (**Fig. R.1.7B**). Esta situación impuso la necesidad de hacer conteos de UFC/ml en el seguimiento del crecimiento en todos los casos en que se suplió el medio con PHBA.

No se pudo evaluar el consumo de PHBA en estos cultivos debido a la alta concentración del compuesto presente en el medio. En presencia del ácido aromático, aunque la turbidez del cultivo aumentó durante las primeras 12 horas, el número de células viables disminuyó hasta aproximadamente 10^3 UFC/ml (**Fig. R.1.7B**). En el transcurso de la incubación el crecimiento se reanudó y tras 140 horas, la población bacteriana aumentó hasta alrededor de 10^9 UFC/ml, habiéndose producido el valle en el descenso 24 h después de iniciarse el estudio.

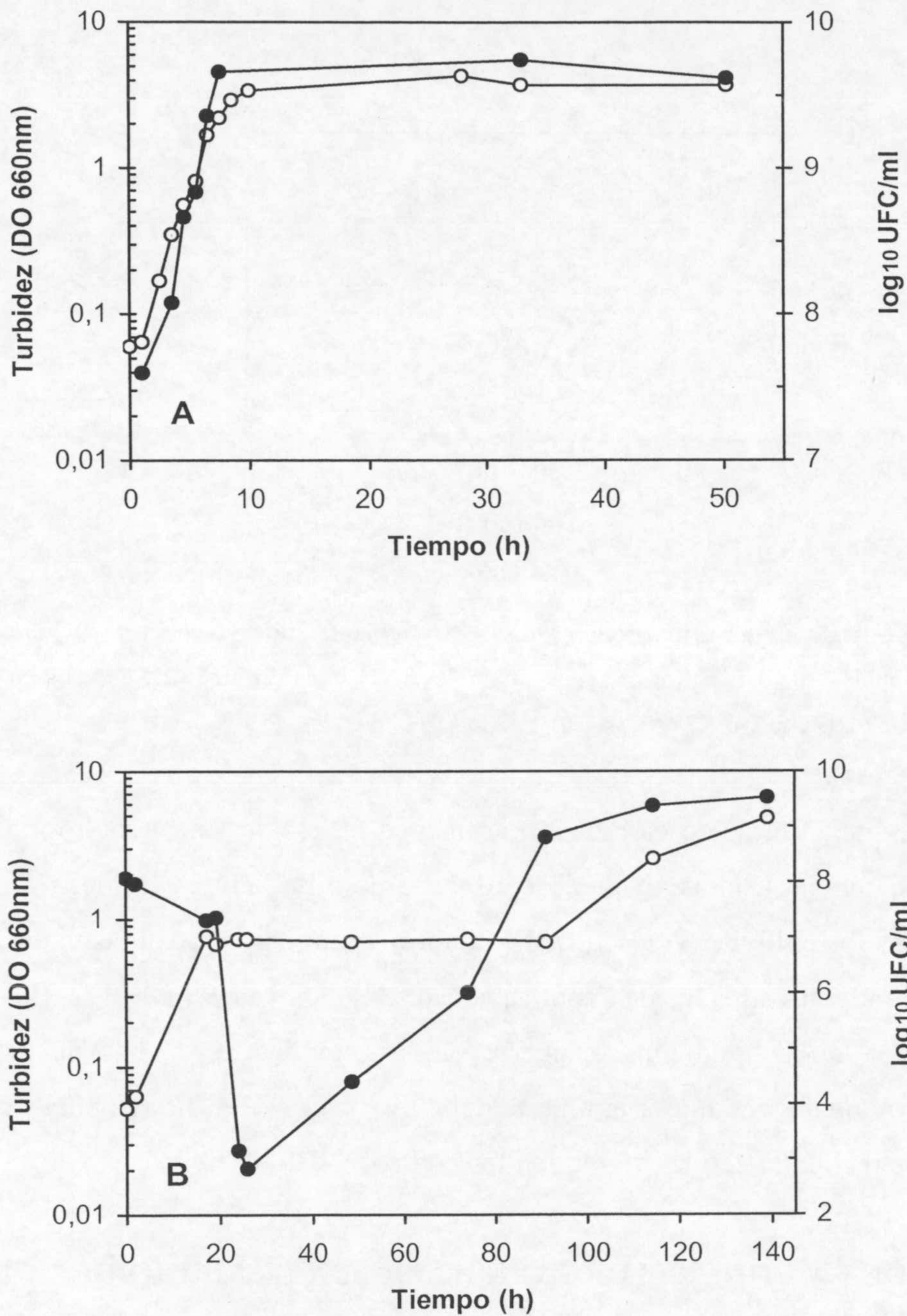


Figura R.1.7. Efecto del PHBA sobre la falta de correlación entre el número de UFC/ml y la turbidez de un cultivo de *P. putida* DOT-T1E. Cultivos de 14-16 horas en medio mínimo con glucosa como fuente de carbono se diluyeron en el mismo medio (A) o en este medio suplido con 12 g/l de PHBA (B). Se determinó la turbidez de los cultivos a 660 nm (○) o el número de UFC/ml (●) a los tiempos indicados.

El efecto de añadir concentraciones crecientes de PHBA, a saber, 18, 27 ó 33 g/l sobre la supervivencia de *P. putida* DOT-T1E se muestra en la **Figura R.1.8**.

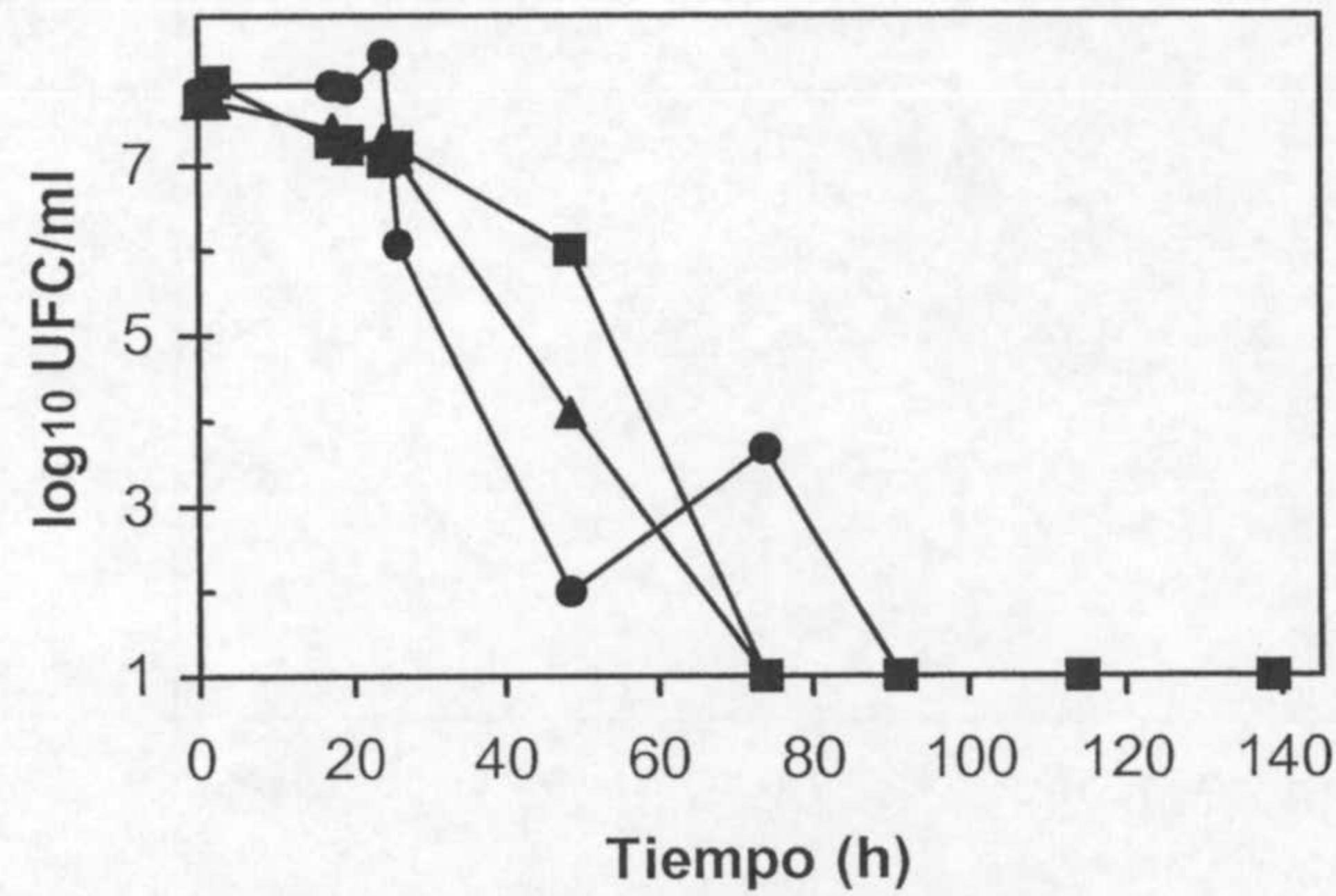


Figura R.1.8. Efecto de altas concentraciones de PHBA sobre la supervivencia de *P. putida* DOT-T1E. Las condiciones fueron las mismas que en la leyenda de la **Figura R.1.7**, excepto que las concentraciones de PHBA fueron 18 (●), 27 (▲) ó 33 (■) g/l.

En presencia del ácido carboxílico aromático, el crecimiento resultó inhibido y durante las primeras 24 horas de incubación el número de células viables por ml fue similar en todos los cultivos. Transcurridas 48 horas, el número de células viables había disminuido significativamente, de modo que entre el 90 y el 99,99% de las células viables iniciales no se pudieron recuperar en los conteos en placas de LB. Una incubación prolongada condujo a la muerte del cultivo (**Fig. R.1.8**), evidenciado por la incapacidad de recuperar células viables en los conteos.

3. EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE Mg^{2+} EN EL MEDIO DE CULTIVO SOBRE LA TOLERANCIA DE *P. putida* DOT-T1E A COMPUESTOS AROMÁTICOS HIDROXILADOS.

El objetivo de este estudio consistió en verificar si una sugerencia existente en la literatura, y que otorga a los lipopolisacáridos (LPS) un rol en la tolerancia a disolventes orgánicos (Pinkart y White, 1997), pudiera ser aplicable a la tolerancia de DOT-T1E a compuestos hidroxilados. El razonamiento detrás de esta hipótesis se basa en que un incremento de los iones Mg^{2+} en el medio de cultivo neutralizaría las cargas negativas

de los LPS presentes en la superficie celular de las bacterias, originando una barrera celular externa más organizada y, a la vez, más impermeable.

En las **Figuras R.1.9 a R.1.12**, se muestran los efectos provocados por un incremento en la concentración estándar de $MgSO_4$ (desde 1 mM hasta 10 mM) sobre la tolerancia a diversos compuestos hidroxilados en concentraciones inhibitorias para el crecimiento.

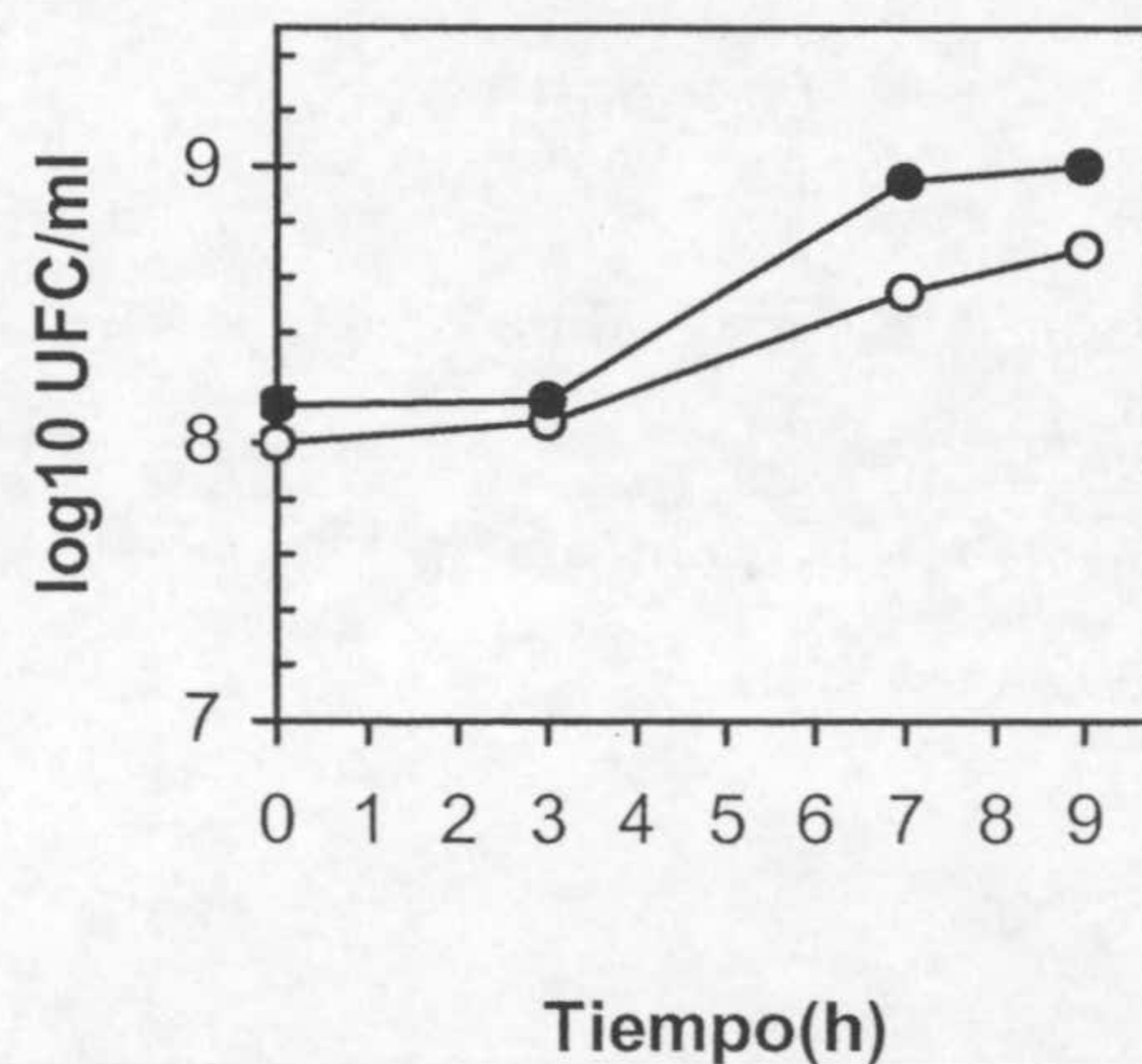


Figura R.1.9. Alivio por cationes Mg^{2+} del efecto inhibitorio que el *p*-cresol ejerce sobre el crecimiento de *P. putida* DOT-T1E. Cultivos de 14-16 horas en medio mínimo con glucosa se diluyeron cincuenta veces en el mismo medio suplido con *p*-cresol (0,4 g/l) conteniendo 1 mM (○) ó 10 mM (●) de $MgSO_4$. Los conteos de UFC/ml se hicieron en placas de LB suplido con antibiótico.

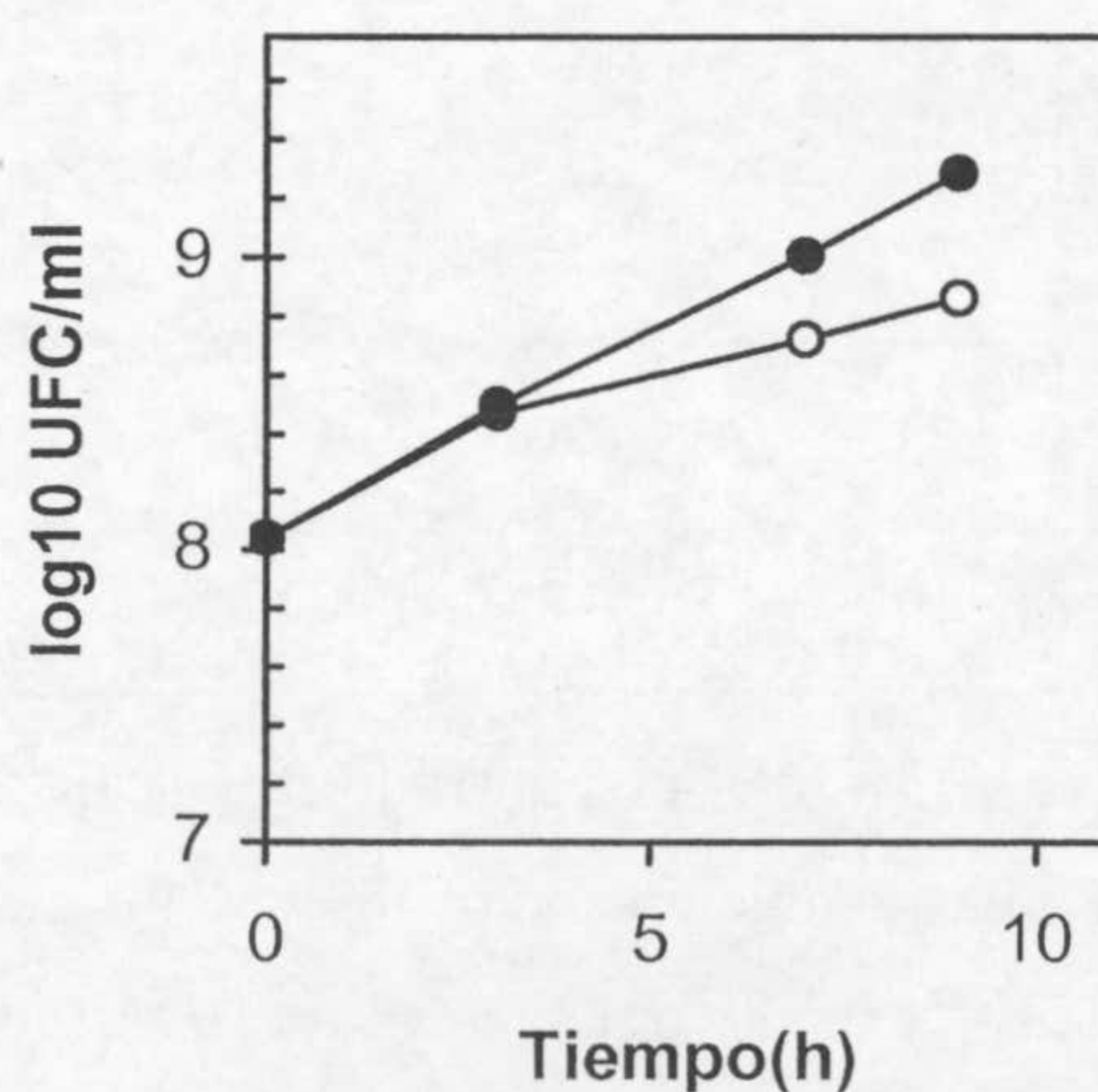


Figura R.1.10. Alivio por cationes Mg^{2+} del efecto inhibitorio que el alcohol *p*-hidroxibencílico ejerce sobre el crecimiento de *P. putida* DOT-T1E. Las condiciones de cultivo y los símbolos son equivalentes a los descritos en la leyenda de la **Figura R.1.9**, excepto que se añadió alcohol *p*-hidroxibencílico (1 g/l) en lugar de *p*-cresol.

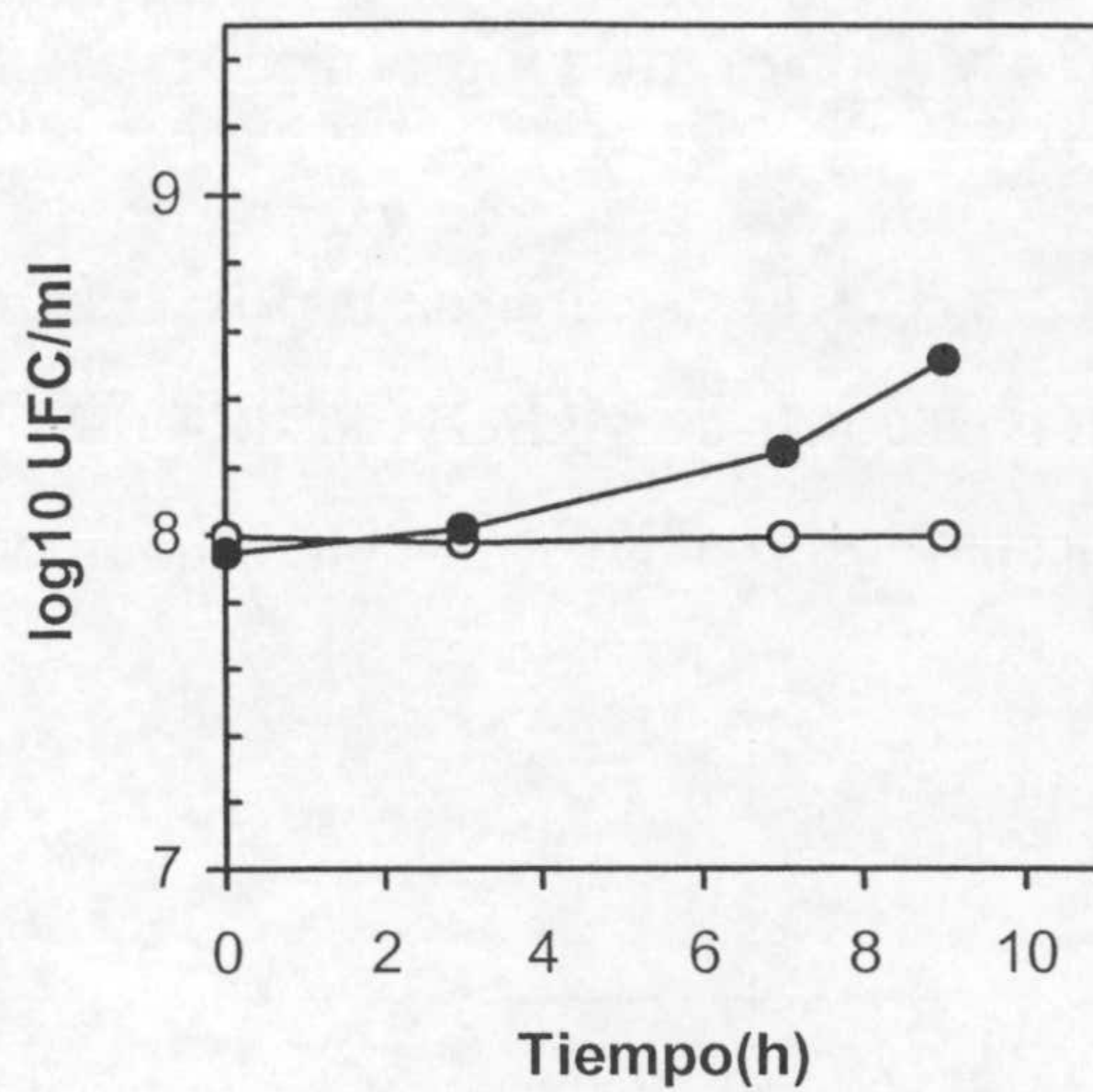


Figura R.1.11. Alivio por cationes Mg^{2+} del efecto inhibitorio que el aldehído *p*-hidroxibencílico ejerce sobre el crecimiento de *P. putida* DOT-T1E. Las condiciones de cultivo y los símbolos son equivalentes a los descritos en la leyenda de la Figura R.1.9, excepto que se añadió aldehído *p*-hidroxibencílico (1 g/l) en lugar de *p*-cresol.

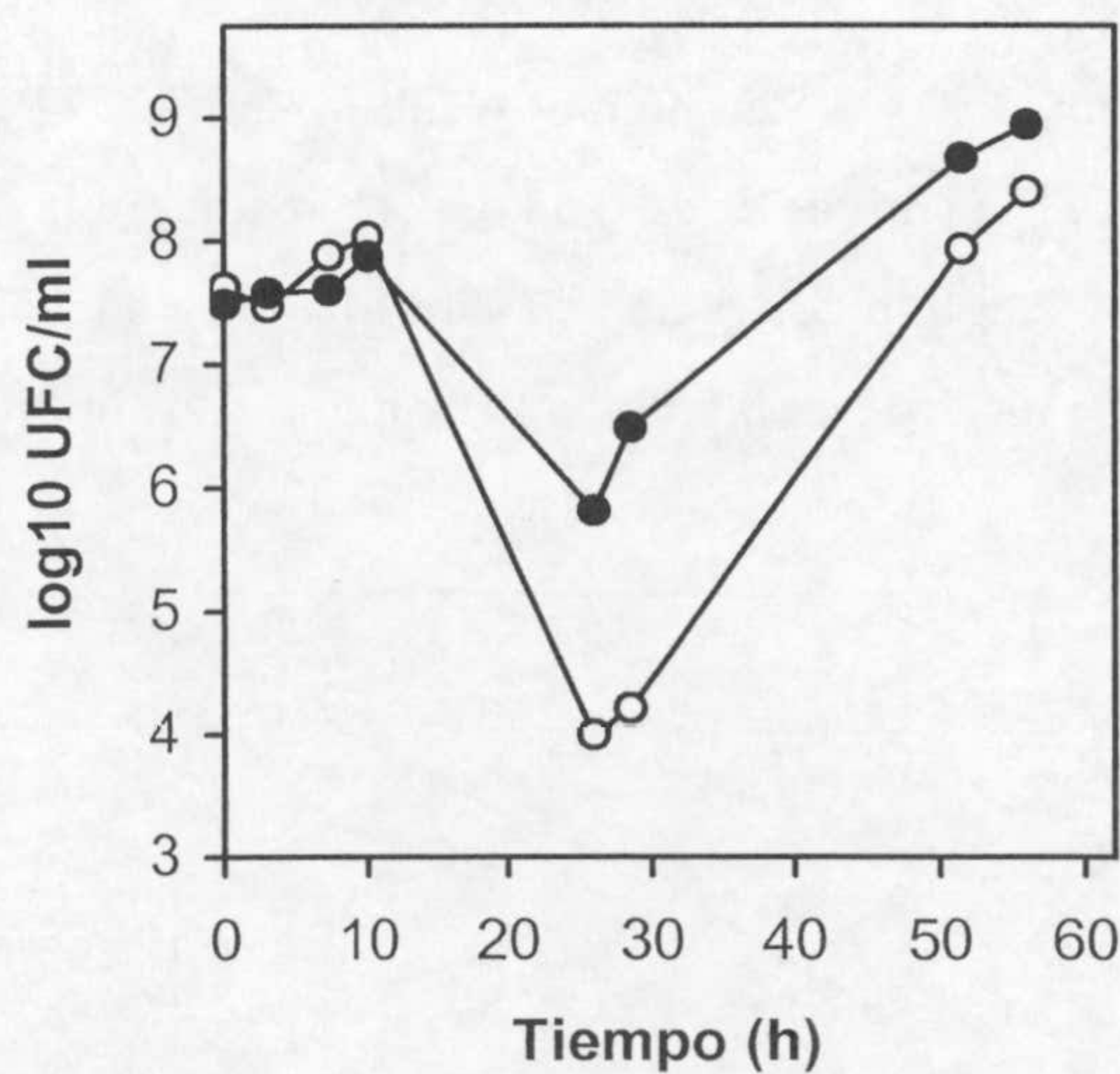


Figura R.1.12. Alivio por cationes Mg^{2+} del efecto inhibitorio que el PHBA ejerce sobre el crecimiento de *P. putida* DOT-T1E. Las condiciones de cultivo y los símbolos son equivalentes a los descritos en la leyenda de la Figura R.1.9, excepto que se añadió PHBA (18 g/l) en lugar de *p*-cresol.

El efecto de suplir el medio mínimo con $MgSO_4$ 10 mM sobre la tolerancia de *P. putida* DOT-T1E a compuestos hidroxilados se evaluó contabilizando la supervivencia con el número de UFC/ml. Así, la supervivencia a concentraciones inhibitorias del

crecimiento de *p*-cresol (**Fig. R.1.9**), alcohol *p*-hidroxibencílico (**Fig. R.1.10**) y aldehído *p*-hidroxibencílico (**Fig. R.1.11**), se vio incrementada en aproximadamente 0,5 unidades logarítmicas de UFC/ml, una diferencia que aunque ligera, resultó repetitiva. En el caso del PHBA, se observó una protección más relevante frente al efecto tóxico del ácido carboxílico, sobre todo en cuanto al choque inicial observado, de manera que la supervivencia en este periodo se incrementó en aproximadamente 2 unidades logarítmicas de UFC/ml, para finalmente alcanzarse densidades celulares que difirieron en 0,5 unidades logarítmicas de UFC/ml a favor de los cultivos con MgSO₄ 10 mM (**Fig. R.1.12**).

4. ADAPTACIÓN FISIOLÓGICA DE *P. putida* DOT-T1E A COMPUESTOS AROMÁTICOS HIDROXILADOS COMO UN EFECTO DE LA EXPOSICIÓN A BAJAS CONCENTRACIONES DEL COMPUESTO.

Los ensayos que se relatan a continuación se llevaron a cabo para determinar si la incubación de *P. putida* DOT-T1E a bajas concentraciones de PHBA tenía algún efecto sobre la tolerancia a concentraciones más altas del mismo compuesto, de manera que pudiera contemplarse la existencia de preadaptación. De la **Figura R.1.8** se dedujo que células que habían sido cultivadas en glucosa tenían comprometida su supervivencia ante un choque a concentraciones altas de PHBA (>18 g/l). La **Figura R.1.13** muestra el efecto que la pre-exposición a concentraciones relativamente bajas de PHBA (5 g/l) tuvo sobre la tolerancia de *P. putida* DOT-T1E a concentraciones crecientes del compuesto hidroxilado (hasta 36 g/l). En estas condiciones, concentraciones de hasta 24 g/l no condujeron a una pérdida sustancial de la viabilidad celular, aunque cuanto más alta fue la concentración de PHBA ensayada, mayor fue la fase de latencia previa a la reanudación del crecimiento. A la mayor concentración de PHBA ensayada (33 g/l), se observó un descenso en unas 3 unidades logarítmicas en la viabilidad celular, lo que constituye una cinética similar a la observada para células que sin exposición previa habían sido sometidas a un choque de PHBA, a una concentración de casi la mitad, a saber, 18 g/l (ver **Fig. R.1.8**).

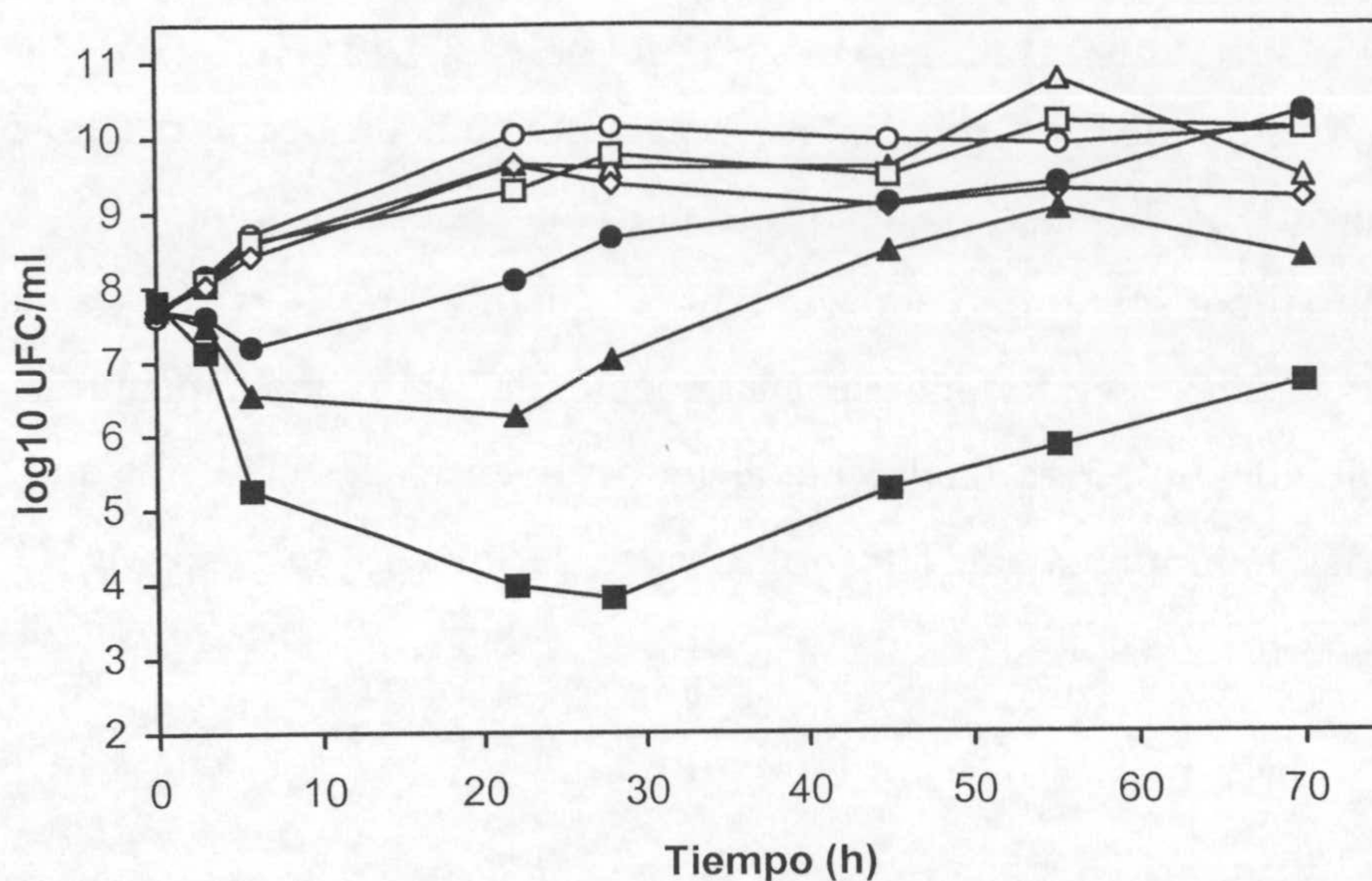


Figura R.1.13. Efecto de preincubar en PHBA sobre la tolerancia a este compuesto de *P. putida* DOT-T1E. Un cultivo de 14-16 horas de *P. putida* DOT-T1E en medio mínimo M9 con glucosa y 5 g/l de PHBA se diluyó 50 veces en el mismo medio con 0 (○), 6 (△), 12 (□), 18 (◇), 24 (●), 30 (▲) ó 33 (■) g/l de PHBA. La supervivencia se contabilizó determinando el número de UFC/ml.

La exposición de *P. putida* DOT-T1E a concentraciones comparativamente bajas de PHBA (5 g/l) tuvo un efecto beneficioso sobre la tolerancia a concentraciones más altas de este compuesto. En el **apartado 2** de este capítulo se mostró que un cultivo de células de *P. putida* DOT-T1E expuestas a concentraciones mayores o iguales a 12 g/l de PHBA, experimentaban un descenso inicial en la viabilidad celular seguida de un incremento en el número de células viables (ver **Figura R.1.7**). Esta observación desencadenó el siguiente interrogante: ¿a qué se debió la recuperación del crecimiento?, ¿pudo ser consecuencia de la división de mutantes espontáneos que hubieran surgido con una tolerancia incrementada a PHBA o, por el contrario, se debió a mecanismos de adaptación fisiológica? Para responder esta pregunta se realizó la siguiente consideración. Si en un cultivo hubieran surgido mutantes espontáneos, se esperaría que, tras incubar en un medio no selectivo (LB), la re-exposición a PHBA no provocara una inhibición del crecimiento o, en su caso, muerte celular. Así, colonias que habían sido aisladas como tolerantes a PHBA (18 g/l) se cultivaron en medio LB no selectivo, y a estos cultivos se les sometió a un choque con PHBA (18 g/l) como se describe en el **apartado 2**. El resultado fue una latencia significativa previa a la reanudación del

crecimiento, similar al comportamiento de aquellas células que no habían sido pre-expuestas a PHBA. Estos resultados apoyarían la hipótesis de una adaptación fisiológica por parte de *P. putida* DOT-T1E a altas concentraciones de PHBA, más que la aparición de mutantes altamente tolerantes.

En esta misma línea se estudió la tolerancia a un choque por PHBA (18 g/l) de células procedentes de cultivos en los que se había producido la recuperación a un choque previo. En estos casos no se observó latencia o muerte celular. Sin embargo, este comportamiento se perdió cuando se interrumpió la incubación en PHBA con una incubación en LB para después retornar de nuevo al medio mínimo selectivo, reafirmando así la hipótesis de la adaptación fisiológica.

Se estudió si el efecto pre-adaptativo tenía lugar cuando *P. putida* DOT-T1E crecía en presencia de PHBA como única fuente de carbono. Las células se sometieron a choques de concentraciones crecientes de PHBA. Se observaron dos comportamientos (**Figura R.1.14**): 1) cuando la concentración de PHBA fue menor o igual que 18 g/l, el número de UFC/ml no disminuyó durante las primeras 8 horas, aunque a mayor concentración de PHBA, más larga fue la fase de latencia, tras la cual se recuperó el crecimiento; y 2) cuando la concentración de PHBA fue de 24-30 g/l, primero se observó un descenso en la viabilidad celular durante las 6 primeras horas de incubación, que fue de 2 órdenes de magnitud para la concentración de PHBA más alta analizada (30 g/l). A continuación se reanudó el crecimiento y los cultivos alcanzaron densidades celulares altas, entre 10^7 y 10^9 UFC/ml (**Figura R.1.14**). En un experimento similar pero realizado con células cultivadas en glucosa, el choque por PHBA a concentraciones superiores a 18 g/l, causó la muerte celular (ver **Figura R.1.8**).

Así pues, el estudio cuyos resultados se muestra en la **Figura R.1.14**, confirma nuestras observaciones anteriores en cuanto a que la pre-incubación de células de *P. putida* DOT-T1E en presencia de bajas concentraciones de PHBA alivia el efecto inhibitor ejercido por altas concentraciones de este compuesto aromático hidroxilado.

UNIVERSIDAD DE GRANADA

47 FEB 2003

COMISION DE DOCTORADO

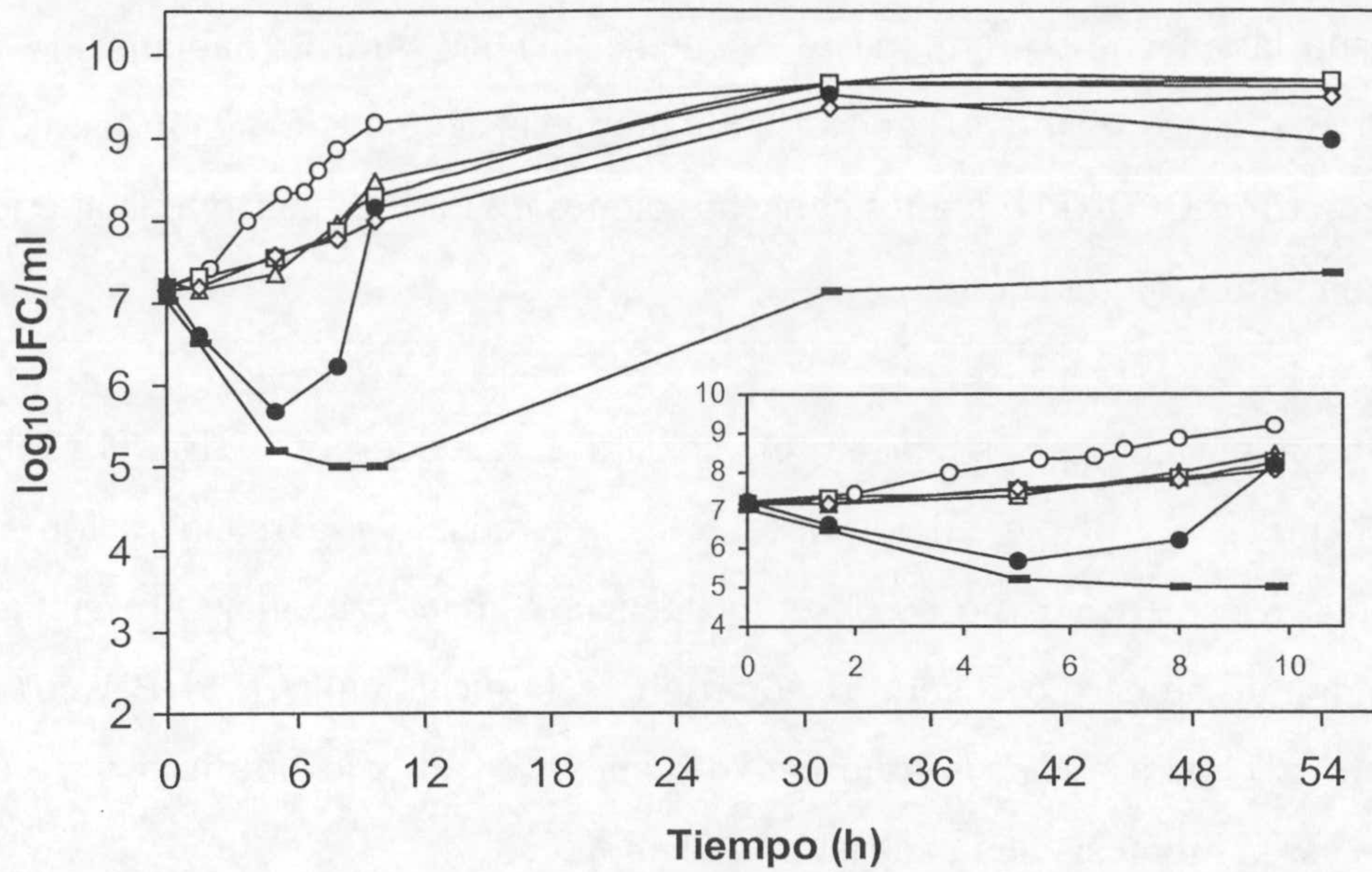


Figura R.1.14. Supervivencia de células de *P. putida* DOT-T1E, cultivadas en PHBA como única fuente de carbono, a un choque de concentraciones crecientes del mismo compuesto. Un cultivo de 14-16 horas de *P. putida* DOT-T1E en medio mínimo M9 suplido con 5 g/l de PHBA como única fuente de carbono se diluyó 50 veces en el mismo medio con 3 (○), 6 (△), 12 (□), 18 (◇), 24 (●) y 30 (-) g/l de PHBA. La supervivencia se contabilizó determinando el número de UFC/ml en placas de LB.

Ante la observación de que la tolerancia de *P. putida* DOT-T1E a PHBA se incrementaba en respuesta a la adaptación previa al compuesto, se abordó el estudio del tiempo requerido para el establecimiento de dicha adaptación fisiológica. Los resultados se muestran en la **Figura R.1.15**.

La supervivencia disminuyó tras un choque de PHBA (24 g/l) tanto en células que no habían sido expuestas como en las preexpuestas (**Figura R.1.15**). En general, las células pre-adaptadas a PHBA toleraron mejor el choque de PHBA (24 g/l) que las células no pre-expuestas. Cuanto mayor fue el tiempo de adaptación, mayor fue la supervivencia al choque, de manera que tras una exposición a PHBA (6 g/l) durante 3 horas, la supervivencia se incrementó hasta en 3 órdenes de magnitud con respecto a células no expuestas (**Fig. R.1.15C**). No obstante, pese a que el incremento en la tolerancia a un choque de PHBA como consecuencia de la pre-exposición a este compuesto fue considerable después de 3 horas de preincubación (**Figura R.1.15C**), no fue una adaptación total, tal como se observa en el caso de células preincubadas durante toda la noche (ver **Figura R.1.13**).

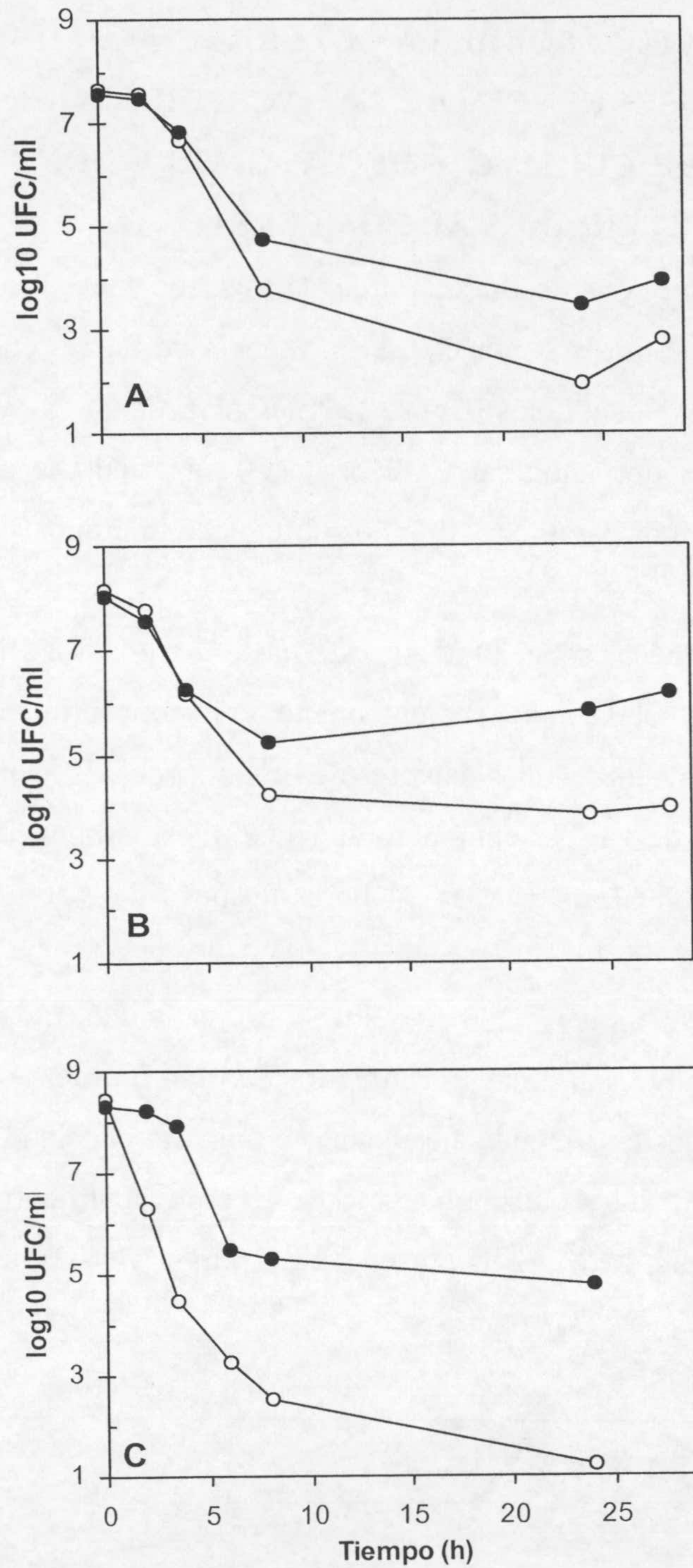


Figura R.1.15. Efecto del tiempo de exposición a PHBA sobre la adaptación de *P. putida* DOT-T1E a este compuesto. Células de *P. putida* DOT-T1E se cultivaron durante 14-16 horas en medio mínimo M9 suplido con glucosa como única fuente de carbono. Entonces, las células se diluyeron 50 veces en el mismo medio con y sin PHBA (6 g/l), y se incubaron a 30°C con agitación. Tras 1 hora (A), 2 horas (B), ó 3 horas (C) de incubación, las muestras se centrifugaron a 6.000 x g durante 5 minutos, se lavaron con tampón M9, y las células se resuspendieron en el mismo medio con glucosa como fuente de carbono. A las suspensiones celulares se añadió 24 g/l de PHBA. Células no preexpuestas (○), células preexpuestas (●).

5. EFECTO ACUMULATIVO SOBRE LA TOLERANCIA A PHBA DE *P. putida* DOT-T1E COMO CONSECUENCIA DE UN INCREMENTO EN LOS IONES Mg^{2+} EN EL MEDIO DE CULTIVO Y DE LA ADAPTACIÓN FISIOLÓGICA DE LAS CÉLULAS BACTERIANAS AL COMPUESTO.

En los apartados 3 y 4 de este capítulo se puso de manifiesto que, tanto la presencia de iones Mg^{2+} como la incubación en presencia de bajas concentraciones de PHBA, tuvieron un efecto beneficioso sobre la tolerancia de *P. putida* DOT-T1E a concentraciones más altas del ácido carboxílico. En este apartado se estudia el efecto que la combinación de ambos parámetros ejerció sobre dicha tolerancia.

Con células adaptadas, concentraciones de hasta 24 g/l de PHBA no tuvieron efecto sobre la viabilidad celular independientemente de la concentración de $MgSO_4$ en el medio de cultivo. A concentraciones mayores de PHBA (p. ej. 30 y 36 g/l), y con una concentración de $MgSO_4$ de 1 mM, el número de UFC/ml estuvo por debajo de nuestro límite de detección (16 UFC/ml) pasadas 24 horas después del choque a PHBA. Sin embargo, tras un choque de 30 g/l en presencia de 10 mM $MgSO_4$, se detectó una supervivencia que no se había detectado en células no preadaptadas; aunque el número de células viables disminuyó significativamente alrededor de 6 órdenes de magnitud, el crecimiento se reanudó posteriormente, alcanzándose una alta densidad celular (**Figura R.1.16**), de lo que se deduce que ambos efectos fueron acumulativos. Cuando la concentración de PHBA fue de 36 g/l, la presencia de 10 mM $MgSO_4$ no evitó la muerte celular.

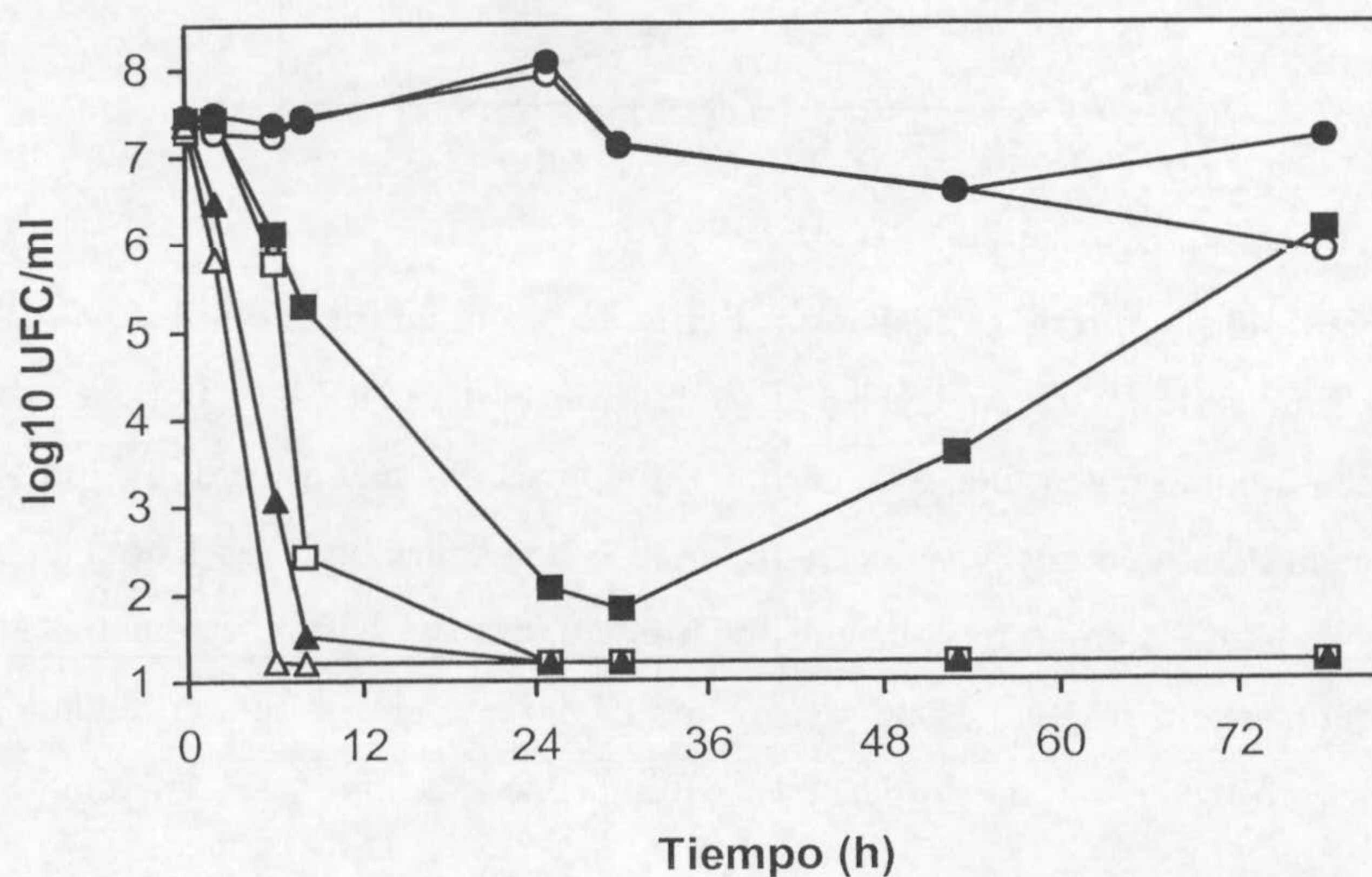


Figura R.1.16. Efecto conjunto de los iones Mg^{2+} y de la adaptación a PHBA sobre la tolerancia de *P. putida* DOT-T1E a un choque de PHBA. Un cultivo de 14-16 h en medio mínimo suplido con glucosa y PHBA (6 g/l) se diluyó 50 veces en el mismo medio conteniendo la concentración estándar de $MgSO_4$, 1 mM (símbolos abiertos) o 10 mM (símbolos cerrados). Las concentraciones de PHBA fueron (g/l): 24 (○, ●), 30 (□, ■), ó 36 (△, ▲).

6. CRECIMIENTO DE *P. putida* DOT-T1E EN COMPUESTOS QUE RINDEN 3,4-DIHIIDROXIBENZOATO: PAPEL DE LOS PRODUCTOS INTERMEDIOS METABÓLICOS DE LA RUTA DEL β -CETOADIPATO EN LA ADAPTACIÓN A PHBA.

El metabolismo del PHBA transcurre a través de la ruta del β -cetoadipato, que es de codificación cromosómica y está ampliamente distribuida en bacterias del suelo (Harwood y Parales, 1996). Inicialmente, previa a la rotura del anillo aromático, el PHBA sufre una hidroxilación hasta ácido 3,4,-dihidroxi benzoico o protocatecoico (PCA), por acción de la enzima *p*-hidroxibenzoato hidroxilasa. El PCA es uno de los productos mayoritarios de la degradación aeróbica de compuestos aromáticos. Otros ácidos carboxílicos hidroxilados como el ferúlico, vainílico, quínico y shikímico también son transformados en PCA en el transcurso de su metabolismo, para ser mineralizados a través de la ruta del β -cetoadipato a semejanza del PHBA (Figura R.1.17).

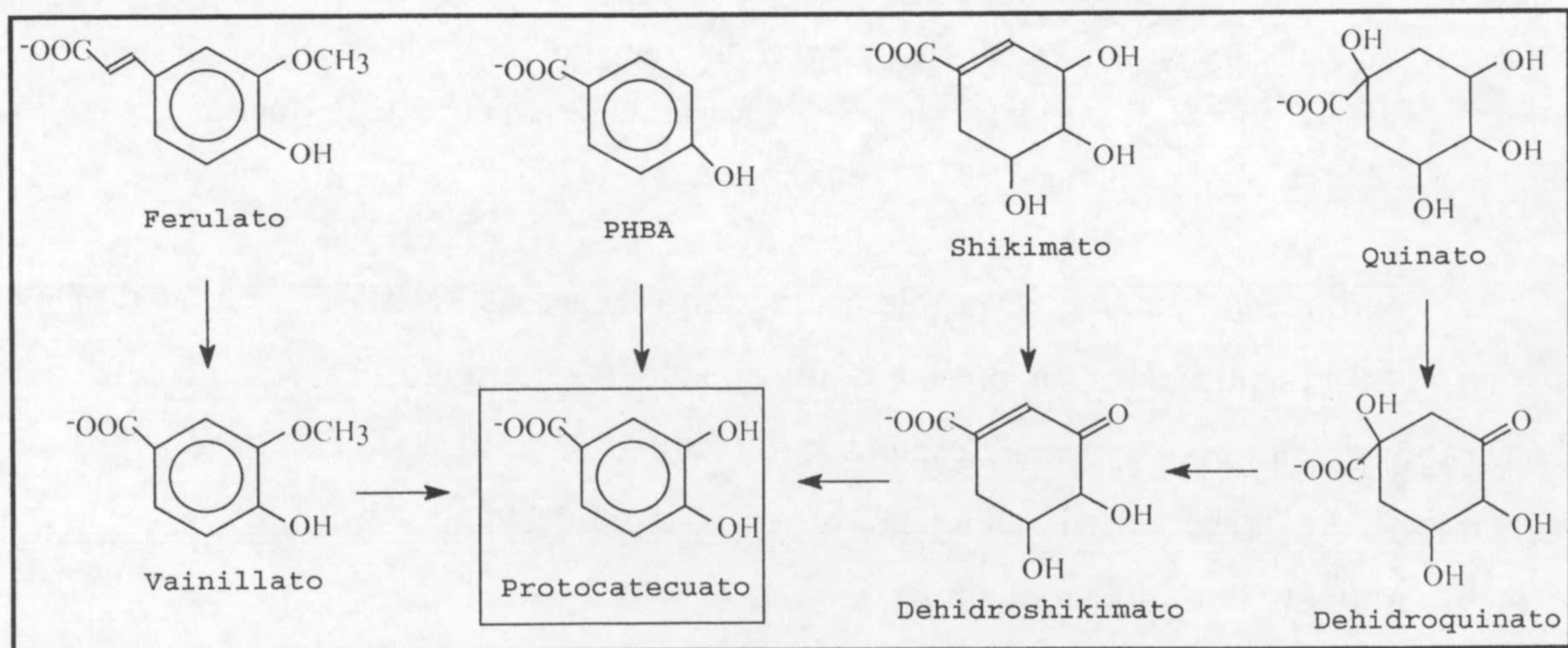


Figura R.1.17. Generación de protocatecuato a partir de ácidos carboxílicos hidroxilados.

Con el objeto de responder a la pregunta de si la tolerancia de *P. putida* DOT-T1E a PHBA adquirida en presencia de este compuesto pudiera deberse a algún producto intermedio en el metabolismo del PCA, primero se estudió la capacidad de esta cepa bacteriana para utilizar los ácidos mencionados anteriormente como fuente de carbono. Los resultados se muestran en la **Figura R.1.18**. De entre todos los ácidos ensayados, *P. putida* no utilizó los ácidos ferúlico ni vanílico como fuentes de carbono.

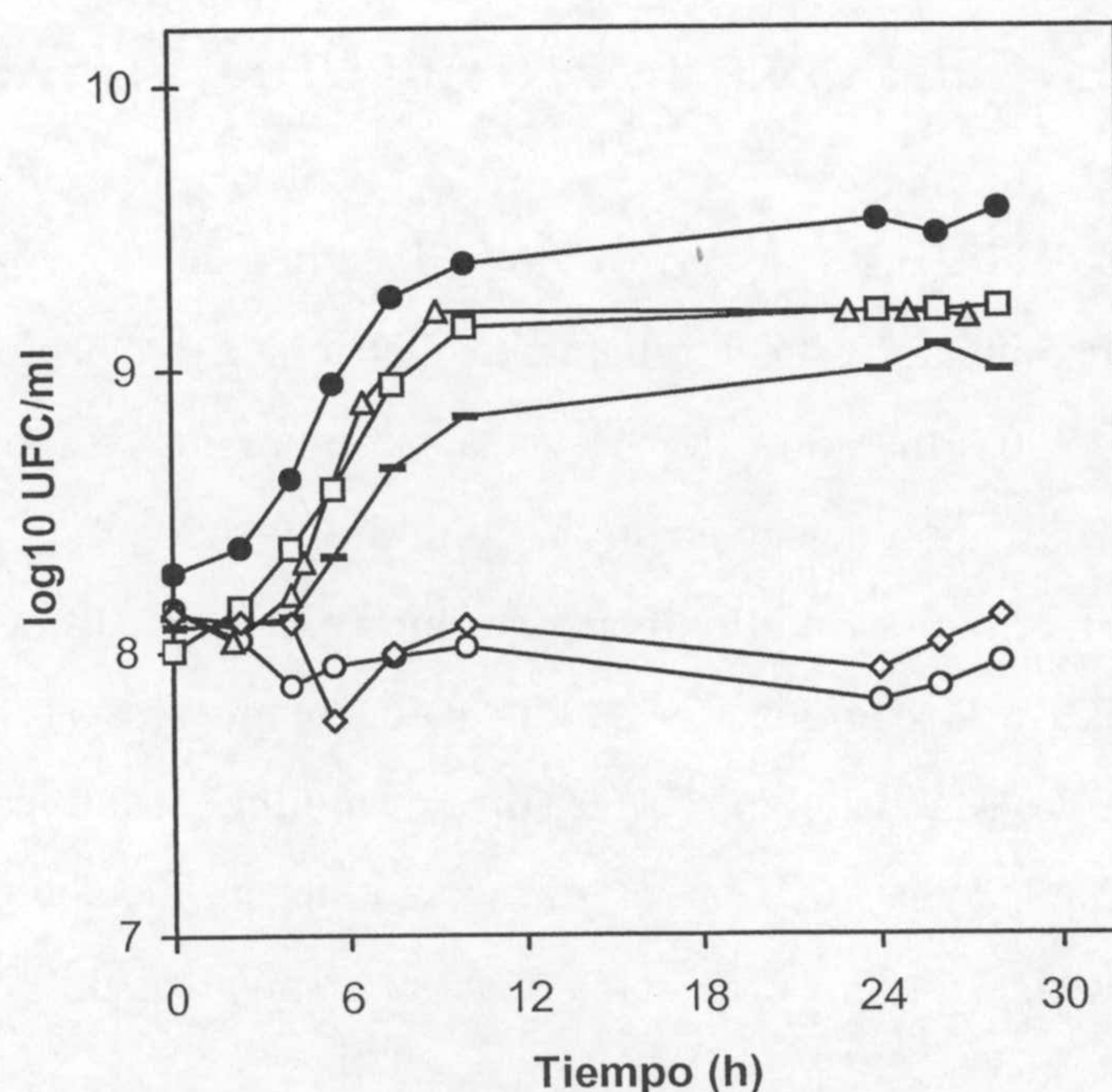


Figura R.1.18. Crecimiento de *P. putida* DOT-T1E en presencia de distintos precursores de PCA como única fuente de carbono y energía. Un cultivo de 14-16 h de *P. putida* DOT-T1E en medio mínimo M9 con glucosa se diluyó 50 veces en el mismo medio suplido con glucosa (●) o, alternativamente, con 10 mM de PHBA (-), quinato (□), shikimato (△), ferulato (○) o vainillato (◇). El crecimiento se determinó contabilizando las UFC/ml a los tiempos indicados.

A continuación se analizó la tolerancia a un choque de PHBA de células de *P. putida* DOT-T1E cultivadas en presencia de quinato o shikimato, observándose que dichas células resultaron ser sensibles al mismo (**Figura R.1.19**). Este resultado sugiere que la tolerancia a PHBA fue inducida por el propio compuesto en sí mismo y no por un producto resultante de su metabolismo.

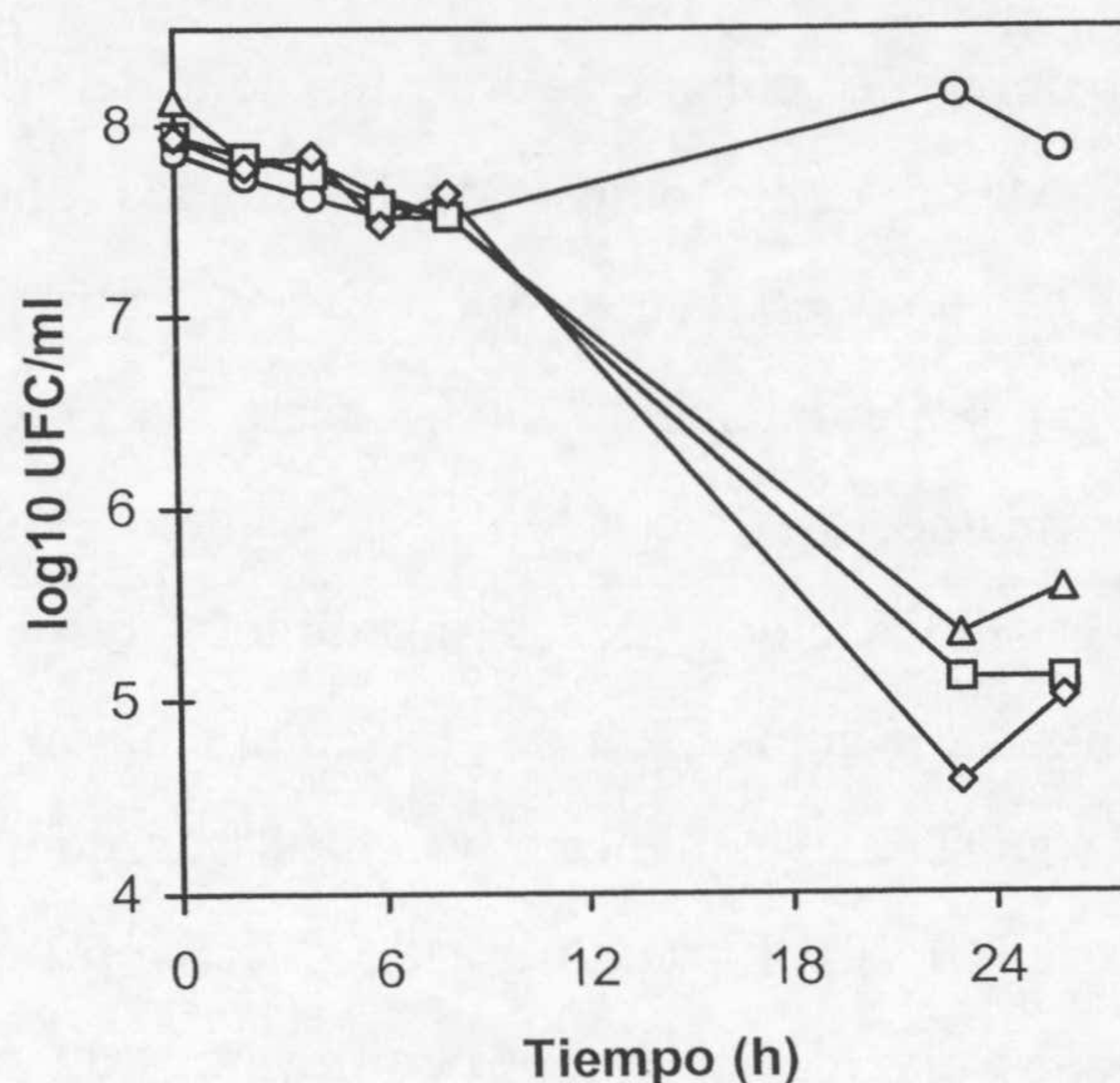


Figura R.1.19. Respuesta de células de *P. putida* DOT-T1E incubadas en presencia de ácidos carboxílicos aromáticos a un choque de PHBA. Cultivos de *P. putida* DOT-T1E de 14-16 h en medio mínimo M9 suplido con PHBA (10 mM) (○), o alternativamente con 10 mM de glucosa (△), quinato (□) o shikimato (◇), se diluyeron 50 veces en los mismos medios, respectivamente. Después de 2 h de incubación a 30°C y en agitación, se sometieron a un choque de PHBA (15 g/l). La supervivencia se determinó contabilizando las UFC a los tiempos indicados.

7. EFECTO DE LOS COMPUESTOS AROMÁTICOS HIDROXILADOS SOBRE LA COMPOSICIÓN EN ÁCIDOS GRASOS DE LOS FOSFOLÍPIDOS DE *P. putida* DOT-T1E.

La composición en ácidos grasos de los fosfolípidos de células de *P. putida* DOT-T1E se analizó en ausencia y en presencia de los diferentes metabolitos intermedios resultantes en la biotransformación de tolueno a PHBA a través de la ruta metabólica *tmo* presente en *P. mendocina* KR1 (Wright y Olsen, 1994), a saber, *p*-cresol, alcohol *p*-hidroxibencílico, aldehído *p*-hidroxibencílico y PHBA. Los análisis se realizaron tanto con células en fase exponencial de crecimiento (DO_{660} 0,4-0,6), como con células en fase estacionaria (DO_{660} 4-5 en ausencia de compuestos tóxicos o 1,0-1,5 en presencia de dichos compuestos), debido a la variación en la composición de ácidos grasos observada en el transcurso del crecimiento bacteriano (Cronan, 1968; Law *et al.*, 1963). En bibliografía se describe cómo la fracción que sufre más cambio es la de los ácidos grasos insaturados, que están implicados en mecanismos generales de respuesta a

situaciones de estrés (ver *Introducción*). Los ácidos grasos ciclopropano (CFAs) presentes en bacterias se forman mediante la transferencia del grupo metilo de la S-adenosil-L-metionina (SAM) al doble enlace de los ácidos grasos insaturados con configuración *cis* (Law, 1971; Law *et al.*, 1963). En *E. coli* y otras especies bacterianas, esta conversión tiene lugar preferentemente en las fases de crecimiento exponencial tardía y estacionaria. Asimismo, la síntesis de ácidos grasos insaturados *trans* tiene como precursores estos mismos ácidos grasos insaturados *cis* (Weber *et al.*, 1994; Ramos *et al.*, 1997; Junker y Ramos, 1999). La composición en ácidos grasos de fosfolípidos de *P. putida* DOT-T1E se determinó en el transcurso del crecimiento en medio líquido LB (**Figura R.1.20**). El ácido graso C17:ciclopropano se detectó en la fase exponencial tardía y los niveles aumentaron conforme avanzó la fase estacionaria. Se observaron altos niveles de los ácidos grasos C16:1,9 *cis* y *trans* al inicio de la fase exponencial. El nivel del isómero C16:1,9 *cis* aumentó en el transcurso de la fase exponencial hasta alcanzar un máximo (alrededor del 30% del total) y después descendió a la vez que el nivel de C17:ciclopropano aumentó desde niveles inapreciables hasta constituir el 28% del total. El nivel del isómero C16:1,9 *trans* disminuyó a lo largo de la curva de crecimiento desde alrededor del 11% del total hasta hacerse casi indetectable. Los niveles de los restantes ácidos grasos permanecieron prácticamente invariables.

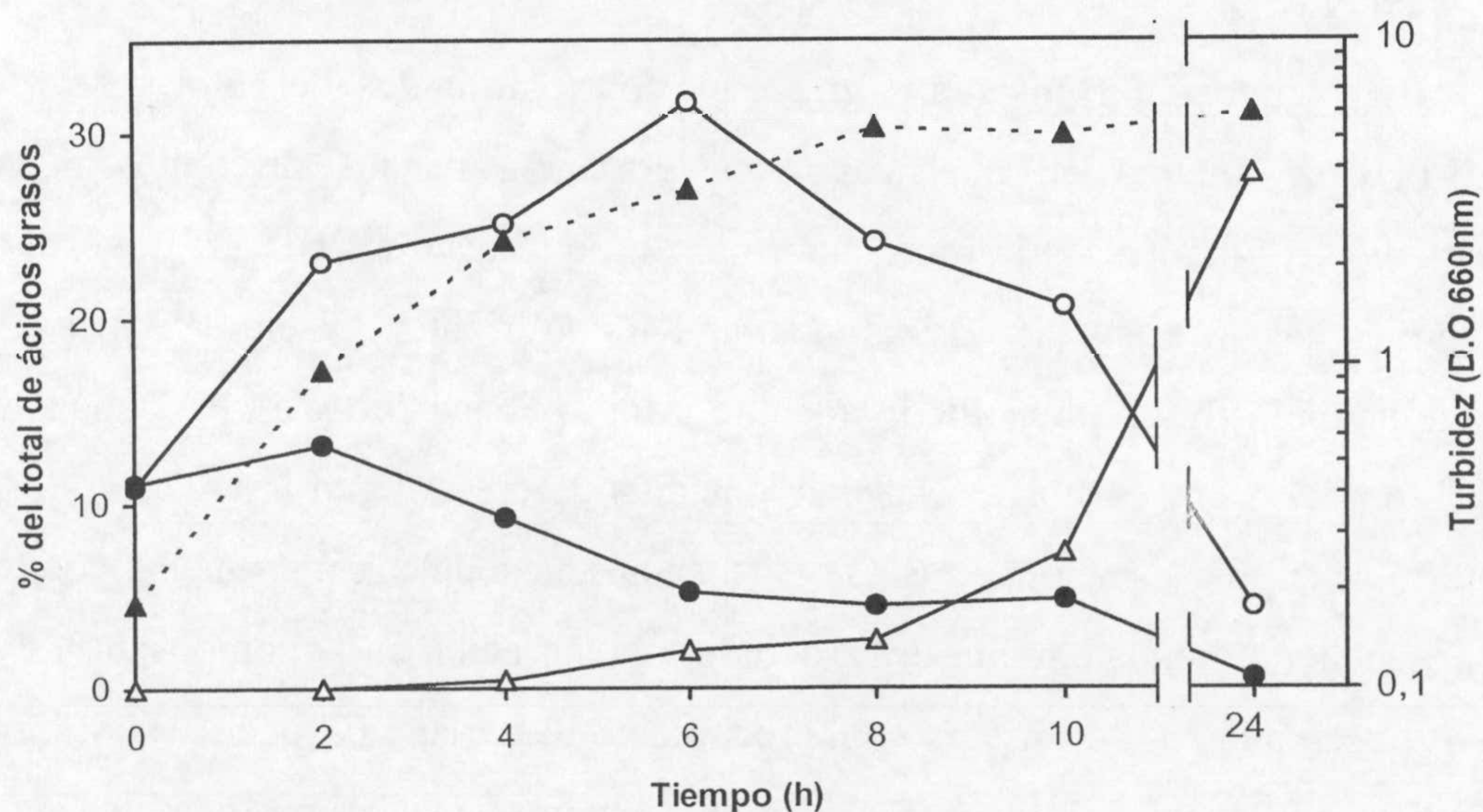


Figura R.1.20. Composición en ácidos grasos de los fosfolípidos de *P. putida* DOT-T1E a lo largo de la curva de crecimiento en medio líquido LB. Quince mililitros de un cultivo de 14-16 h en medio LB se inocularon en 1,5 l del mismo medio, que se incubó a 30 °C y en agitación. El crecimiento fue seguido por medidas de turbidez a 660 nm (▲). Se recogieron 200 ml de cultivo por centrifugación a los tiempos indicados (5.000 x g, 10 min, 4 °C) y las células se lavaron una vez con tampón M9. Los protocolos para el tratamiento de células y el posterior análisis de los lípidos se describen en los apartados 8.1-8.3 de la sección de *Materiales y Métodos*. En la Figura se muestran los porcentajes respecto al total de ácidos grasos de fosfolípidos de los ácidos grasos C16:1,9 cis (○), C16:1,9 trans (●) y C17:ciclopropano (△).

7.1. Análisis de células en fase estacionaria.

Los resultados de la composición en ácidos grasos de los fosfolípidos en presencia de los diferentes compuestos aromáticos hidroxilados se recogen en las **Tablas R.1.4 a R.1.7**. Cuando se añadió *p*-cresol al medio de cultivo, la composición en ácidos grasos de las membranas se modificó en la medida que la concentración del compuesto aumentó en el medio (ver **Tabla R.1.4**). Los cambios más relevantes en la composición de ácidos grasos en presencia de *p*-cresol (0,4 g/l) fueron los siguientes: 1) la relación *cis/trans* de ácidos grasos insaturados disminuyó desde aproximadamente 15 en ausencia del compuesto hasta menos de 4 en presencia del aromático, como consecuencia principalmente de un incremento de más de cinco veces en la cantidad del ácido graso C16:1,9 *trans*, así como del descenso en el nivel de C18:1,11 *cis* vaccénico; 2) la relación de ácidos grasos saturados/insaturados también disminuyó desde 2,27 en ausencia de *p*-cresol hasta 1,74 en presencia de 0,4 g/l del aromático, y esto a pesar de que el nivel del ácido graso saturado C18:0 aumentó desde cantidades inapreciables hasta constituir alrededor del 18% del total; 3) el nivel de C17:ciclopropano disminuyó desde 16,78 hasta alrededor del 5% del total.

Los resultados obtenidos para el alcohol aromático *p*-hidroxibencílico fueron similares a los descritos anteriormente con *p*-cresol (**Tabla R.1.5**). Los cambios más relevantes fueron: 1) un aumento significativo en los niveles de los ácidos grasos insaturados *trans* C16:1,9 y C18:1,11 vaccénico, responsable del descenso en la relación de ácidos grasos insaturados *cis/trans* desde 15,23 en ausencia del alcohol hasta alrededor del 0,2 en presencia del mismo; 2) un descenso de aproximadamente 5 veces en el nivel del ácido graso C17:ciclopropano; y 3) un incremento de casi 8 veces en el nivel del ácido graso C18:0, aunque la relación final de ácidos grasos saturados/insaturados disminuyó.

Tabla R.1.4. Composición en ácidos grasos de los fosfolípidos de células de *P. putida* DOT-T1E cultivadas en medio mínimo M9 con glucosa y en presencia de *p*-cresol.^a

Ácido graso	<i>p</i> -cresol (g/l)			
	0	0,1	0,2	0,4
C14:0	1,57 ^b	1,77	< 1,0	< 1,0
C16:1,9 <i>cis</i>	6,84	6,25	4,11	7,68
C16:1,9 <i>trans</i>	1,06	1,99	2,63	5,88
C16:0	55,22	53,87	53,93	48,32
C17:ciclopropano	16,78	17,47	14,69	5,25
C18:1,11 <i>cis</i> vaccénico	16,92	16,05	15,7	14,58
C18:1,11 <i>trans</i> vaccénico	<1,0	<1,0	< 1,0	< 1,0
C18:0	<1,0	2,58	8,92	18,17
Sat/insat	2,27	2,3	2,7	1,74
<i>cis/trans</i>	15,23	8,06	7,52	3,78

^a Un mililitro de un cultivo de 14-16 h en medio mínimo M9 con glucosa se utilizó para inocular 100 ml del mismo medio suplido con la concentración indicada de *p*-cresol. Después de 24 h de incubación a 30°C y en agitación, se recogieron 30 ml de cultivo por centrifugación (5.000xg, 10 min, 4 °C), y las células se lavaron una vez con tampón M9. Los protocolos para el tratamiento de las células y el posterior análisis de los lípidos se describen en los apartados 8.1-8.3 de la sección de *Materiales y Métodos*.

^b Los valores representan porcentajes del contenido total de ácidos grasos, excepto en las relaciones de ácidos grasos saturados/insaturados y *cis/trans*.

Tabla R.1.5. Composición en ácidos grasos de los fosfolípidos de células de *P. putida* DOT-T1E cultivadas en medio mínimo M9 con glucosa en presencia de alcohol *p*-hidroxibencílico.^a

Ácido graso	alcohol <i>p</i> -hidroxibencílico (g/l)			
	0	0,2	0,4	1
C14:0	1,57 ^b	< 1,0	0	0
C16:1,9 <i>cis</i>	6,84	3,12	2,0	2,69
C16:1,9 <i>trans</i>	1,06	20,87	21,02	21,95
C16:0	55,22	45,15	51,78	44,0
C17:ciclopropano	16,78	4,71	5,0	3,02
C18:1,11 <i>cis</i> vaccénico	16,92	7,72	4,98	4,42
C18:1,11 <i>trans</i> vaccénico	<1,0	15,25	15,2	15,85
C18:0	<1,0	3,16	< 1,0	6,4
Sat/insat	2,27	1,03	1,19	1,12
<i>cis/trans</i>	15,23	0,30	0,19	0,18

^a Se procedió como se describe en el pie de la **Tabla R.1.4** excepto que se utilizó alcohol *p*-hidroxibencílico, en lugar de *p*-cresol, a las concentraciones indicadas.

^b Los valores representan porcentajes del contenido total de ácidos grasos, excepto en las relaciones de ácidos grasos saturados/insaturados y *cis/trans*.

Los cambios experimentados en la composición de los ácidos grasos de los fosfolípidos con el aldehído *p*-hidroxibencílico fueron similares a los obtenidos previamente con *p*-cresol y alcohol *p*-hidroxibencílico (**Tabla R.1.6**). El nivel de ciclopropano generalmente disminuyó a medida que se incrementó la concentración del aldehído, y el nivel de C16:1,9 *trans* aumentó. Algunas de estas respuestas fueron más significativas a las concentraciones más altas del aldehído ensayadas. Sin embargo, en general, las relaciones de ácidos grasos *cis/trans* y ácidos grasos saturados/insaturados disminuyeron al aumentar la concentración del aldehído en los ensayos.

Tabla R.1.6. Composición en ácidos grasos de los fosfolípidos de células de *P. putida* DOT-T1E cultivadas en medio mínimo M9 con glucosa en presencia de aldehído *p*-hidroxibencílico.^a

Ácido graso	aldehído <i>p</i> -hidroxibencílico (g/l)					
	0	0,1	0,2	0,4	0,8	1,0
C14:0	1,57 ^b	1,85	1,72	1,77	< 1,0	< 1,0
C16:1,9 <i>cis</i>	6,84	8,85	9,77	9,52	15,56	17,77
C16:1,9 <i>trans</i>	1,06	2,6	2,97	3,29	6,27	9,63
C16:0	55,22	56,57	55,2	56,95	55,01	38,65
C17:ciclopropano	16,78	15,71	16,41	14,57	10,45	1,17
C18:1,11 <i>cis</i> vaccénico	16,92	14,41	13,93	12,69	12,69	23,15
C18:1,11 <i>trans</i> vaccénico	<1,0	< 1,0	< 1,0	< 1,0	< 1,0	2,15
C18:0	<1,0	< 1,0	< 1,0	< 1,0	< 1,0	5,14
Sat/insat	2,27	2,25	2,13	1,6	1,59	0,83
<i>cis/trans</i>	15,23	8,94	7,97	6,75	4,50	3,5

^a Se procedió como se describe en el pie de la **Tabla R.1.4** excepto que se utilizó aldehído *p*-hidroxibencílico, en lugar de *p*-cresol, a las concentraciones indicadas.

^b Los valores representan porcentajes del contenido total de ácidos grasos, excepto en las relaciones de ácidos grasos saturados/insaturados y *cis/trans*.

Con respecto al PHBA, a medida que la concentración en el medio de cultivo aumentó, la composición en ácidos grasos de *P. putida* DOT-T1E se alteró

gradualmente (**Tabla R.1.7**). Así, el nivel del ácido graso C17:ciclopropano disminuyó considerablemente al aumentar la concentración del ácido, y los niveles de los isómeros *trans* de los ácidos C16:1, 9 y C18:1,11 (vaccénico), así como el del ácido graso saturado C18:0 aumentaron con la concentración del aromático. Como consecuencia de estos cambios, las relaciones de ácidos grasos saturados/insaturados y *cis/trans* disminuyeron en la manera que se había observado previamente para los alcoholes y aldehído hidroxilados.

Tabla R.1.7. Composición en ácidos grasos de los fosfolípidos de células de *P. putida* DOT-T1E cultivadas en medio mínimo M9 con glucosa en presencia de PHBA.^a

Ácido graso	PHBA (g/l)			
	0	6	12	15
C14:0	0,95 ^b	1,15	0,47	0,36
C16:1,9 <i>cis</i>	9,8	15,2	12,2	14,8
C16:1,9 <i>trans</i>	1,4	8,7	25,1	23,5
C16:0	42,8	42,7	40,9	39,9
C17:ciclopropano	26,7	16,1	4,5	1,6
C18:1,11 <i>cis</i> vaccénico	17,0	14,0	13,1	14,6
C18:1,11 <i>trans</i> vaccénico	0,11	0,80	4,9	4,0
C18:0	0,92	1,1	1,1	2,2
Sat/insat	1,6	1,2	0,7	0,73
<i>cis/trans</i>	17,8	3,1	0,84	1,1

^a Se procedió como se describe en el pie de la **Tabla R.1.4** excepto que se utilizó PHBA en lugar de *p*-cresol, a las concentraciones indicadas.

^b Los valores representan porcentajes del contenido total de ácidos grasos, excepto en las relaciones de ácidos grasos saturados/insaturados y *cis/trans*.

7.2. Análisis de células en fase exponencial.

Se analizó el efecto de la presencia de compuestos aromáticos hidroxilados en células creciendo en fase exponencial, expuestas durante un tiempo corto a *p*-cresol, alcohol *p*-hidroxibencílico, aldehído *p*-hidroxibencílico y PHBA a concentraciones con efecto sobre el crecimiento pero sin llegar a inhibirlo completamente. Los resultados se muestran en la **Tabla R.1.8**. No se observaron cambios significativos en el perfil de fosfolípidos como consecuencia de los tratamientos.

Tabla R.1.8. Composición en ácidos grasos de los fosfolípidos de células de *P. putida* DOT-T1E en fase exponencial cultivadas en medio mínimo M9 con glucosa y el compuesto aromático hidroxilado indicado.^a

Ácido graso	Compuesto hidroxilado				
	Ninguno	<i>p</i> -cresol	alcohol <i>p</i> - hidroxibencílico	aldehído <i>p</i> - hidroxibencílico	PHBA
C14:0	0,2 ^b	0,3	0,7	0,8	1,3
C16:1,9 <i>cis</i>	23,7	30,9	25,8	30,0	26,1
C16:1,9 <i>trans</i>	8,5	4,2	6,3	4,3	8,4
C16:0	38,46	37,86	37,0	36,0	39,7
C17:ciclopropano	0	0,2	0,5	0,3	0,6
C17:0	0,1	0,1	0,2	0,3	0,3
C18:1,11 <i>cis</i> vaccénico	23,2	24,3	25,2	26,2	20,8
C18:1,1 <i>trans</i> vaccénico	2,6	0,2	0,8	1,0	0,2
C18:0	3,2	2,0	3,8	2,0	3,4
Sat/insat	0,72	0,67	0,72	0,63	0,81
<i>cis/trans</i>	2,1	12,5	7,2	10,6	5,4

^a Un cultivo de 14-16 h en medio mínimo M9 con glucosa, se diluyó 100 veces en el mismo medio y después de 3 h de incubación a 30°C y en agitación ($DO_{660}=0,8$) se dividió en cinco alícuotas. Una de ellas se mantuvo como control y a las otras 4 se le añadió alternativamente *p*-cresol (0,2 g/l), alcohol *p*-hidroxibencílico (0,5 g/l), aldehído *p*-hidroxibencílico (0,5 g/l) o PHBA (6 g/l). Los cultivos se incubaron durante 4 horas más y las células se recogieron por centrifugación a 5.000 x g durante 10 min a 4°C, y se lavaron en tampón M9. Los protocolos para el tratamiento de las células y el posterior análisis de los lípidos se describen en los apartados 8.1-8.3 de la sección de *Materiales y Métodos*.

^b Los valores representan porcentajes del contenido total de ácidos grasos.

8. LA ADAPTACIÓN FISIOLÓGICA DE *P. putida* DOT-T1E SE CORRESPONDE CON UN MENOR ACÚMULO DE PHBA EN LAS CÉLULAS.

Para desvelar si la adaptación fisiológica de *P. putida* DOT-T1E a PHBA fue consecuencia de un sistema de exclusión inducible se llevaron a cabo estudios de acumulación de [¹⁴C]-PHBA en células inducidas y sin inducir. En la inducción se utilizó *p*-clorobenzoato, un análogo estructural de PHBA, no metabolizable por la bacteria. Los resultados obtenidos se muestran en la **Tabla R.1.9**. Las células preinducidas acumularon cantidades hasta 4 veces menores del sustrato ¹⁴C-marcado después de 30 minutos, lo que sugiere la posibilidad de un sistema operativo de eflujo inducible para PHBA en *P. putida* DOT-T1E.

Tabla R.1.9. Acumulación de [¹⁴C]-PHBA en *P. putida* DOT-T1E.^a

Células	Tiempo (min)	¹⁴ C acumulado (CPM)
Sin inducir	0	46.000
"	10	25.000
"	30	102.000
Inducidas	0	6.000
"	10	11.000
"	30	27.000

^a Dos cultivos de 14-16 h en medio mínimo M9 con glucosa como única fuente de carbono y energía, uno en ausencia y otro en presencia de *p*-clorobenzoato (1 mM), se diluyeron 100 veces en el mismo medio y se incubaron a 30 °C en agitación hasta alcanzar la fase logarítmica media (DO_{660 nm} de 0,6). Entonces se filtraron 1,5 ml del cultivo empleando un filtro de nitrocelulosa de 0.45 µm de diámetro de poro (Millipore Corp., cat.nº. HAWP02500), se lavaron con 1 volumen de tampón M9 y se resuspendieron en el mismo volumen de medio M9 con glucosa al 0,1% (p/v). Tras incubar 10 minutos a 30°C y en agitación, se añadieron 1,5 µCi de [¹⁴C]-PHBA (actividad específica 11,3 mCi/mmol). A los tiempos 0 (inmediatamente tras la adición), 10 y 30 minutos se recogieron alícuotas de 250 µl del cultivo que se filtraron a través de filtros Millipore (Ha 0,45 µm de diámetro de poro). Las membranas se lavaron con tampón M9 suplido con PHBA (5 mM). El ¹⁴C retenido en las membranas se determinó en un contador de centelleo Packard Radiometer. Los datos constituyen la media de dos determinaciones independientes.

P. putida DOT-T1E puede utilizar PHBA como fuente de carbono y energía, por lo que el ¹⁴C cuantificado en estos ensayos probablemente se deba a una fracción retenida en las membranas y otra que se haya incorporado como esqueletos carbonados. En el Capítulo 2 de la presente sección de *Resultados* se analiza la acumulación de PHBA en las membranas mediante el empleo de un mutante afectado en la tolerancia a PHBA, que es incapaz de metabolizar PHBA.

Capítulo 2

GENERACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DEL MUTANTE DOT-T1E-PhoA5 SENSIBLE A PHBA

RESUMEN

Mediante mutagénesis de la cepa *Pseudomonas putida* DOT-T1E por transposición con un mini-Tn5'*phoAKm* se obtuvo un mutante, denominado PhoA5, deficiente en una proteína de membrana celular de 15,4 kDa de masa molecular aparente. La caracterización fisiológica de la cepa mutante PhoA5 reveló su incapacidad para formar colonias definidas en medio LB sin suplemento adicional de hierro, así como su incapacidad para utilizar *p*-hidroxibenzoato (PHBA) como única fuente de carbono, y una mayor sensibilidad a dicho compuesto aromático, así como a distintos antibióticos que la cepa silvestre. Observaciones al microscopio, tanto óptico como electrónico, revelaron que esta cepa crecía formando flóculos, aunque la morfología celular no estaba alterada. La región de ADN adyacente al mini-transposón se clonó y se utilizó como sonda para rescatar el gen silvestre. Tras la comparación de la zona mutada con las secuencias disponibles en las bases de datos, se encontró que la inserción del transposón se había producido en un gen homólogo a *exbD*, que codifica una proteína de membrana implicada en el transporte de ferrisideróforos en bacterias gram-negativas. Corriente abajo del gen mutado se encontró otro gen que presentó similitud con los genes *tonB* de otras bacterias gram-negativas. Corriente arriba se encontró otra fase abierta de lectura, que presentaba homología con el gen *exbB*.

Figura R.2.1. Mapa del inserto del plásmido pPAT2. El esquema muestra el gen de resistencia a kanamicina del mini-Tn5'*phoAKm* que precede a un fragmento de 4,3 kb de ADN de *P. putida*. Para construir el plásmido pPAT2 se ligaron 10 µg de ADN total del mutante PhoA5 digerido con *SphI* con 1,5 µg de pUC18 digerido con *SphI*, y con la ligación se transformó la cepa DH5αF' por choque térmico a 42°C como se describió en el **apartado 11.2** de la sección de *Materiales y Métodos*. En el mapa se indican los sitios de restricción relevantes para el desarrollo de este trabajo.

El inserto del plásmido pPAT2 se secuenció usando como cebador un oligo localizado en el extremo O del mini-Tn5. Con la secuencia obtenida se rastrearon las bases de datos y se encontró que la secuencia con la que compartía la máxima identidad fue el gen *exbD* de *P. putida* WCS358, que en este microorganismo constituye el segundo gen del cluster *exbBDtonB* (Bitter *et al.*, 1993).

3. CLONACIÓN DE LA REGIÓN SILVESTRE QUE CONTIENE EL GEN *exbD* Y ANÁLISIS DE SU SECUENCIA.

Para recuperar la región silvestre que contenía el gen *exbD* de *P. putida* DOT-T1E, que había resultado ser el blanco del mini-Tn5 en el mutante PhoA5, se construyó una minigenoteca de esta cepa en el plásmido pUC18. Utilizando el fragmento *NotI/SphI* de 4,3 kb de pPAT2 como sonda, se identificaron bandas de hibridación de ADN total de *P. putida* DOT-T1E digerido con distintas enzimas de restricción. El resultado del Southern blot se muestra en la **Figura R.2.2**.

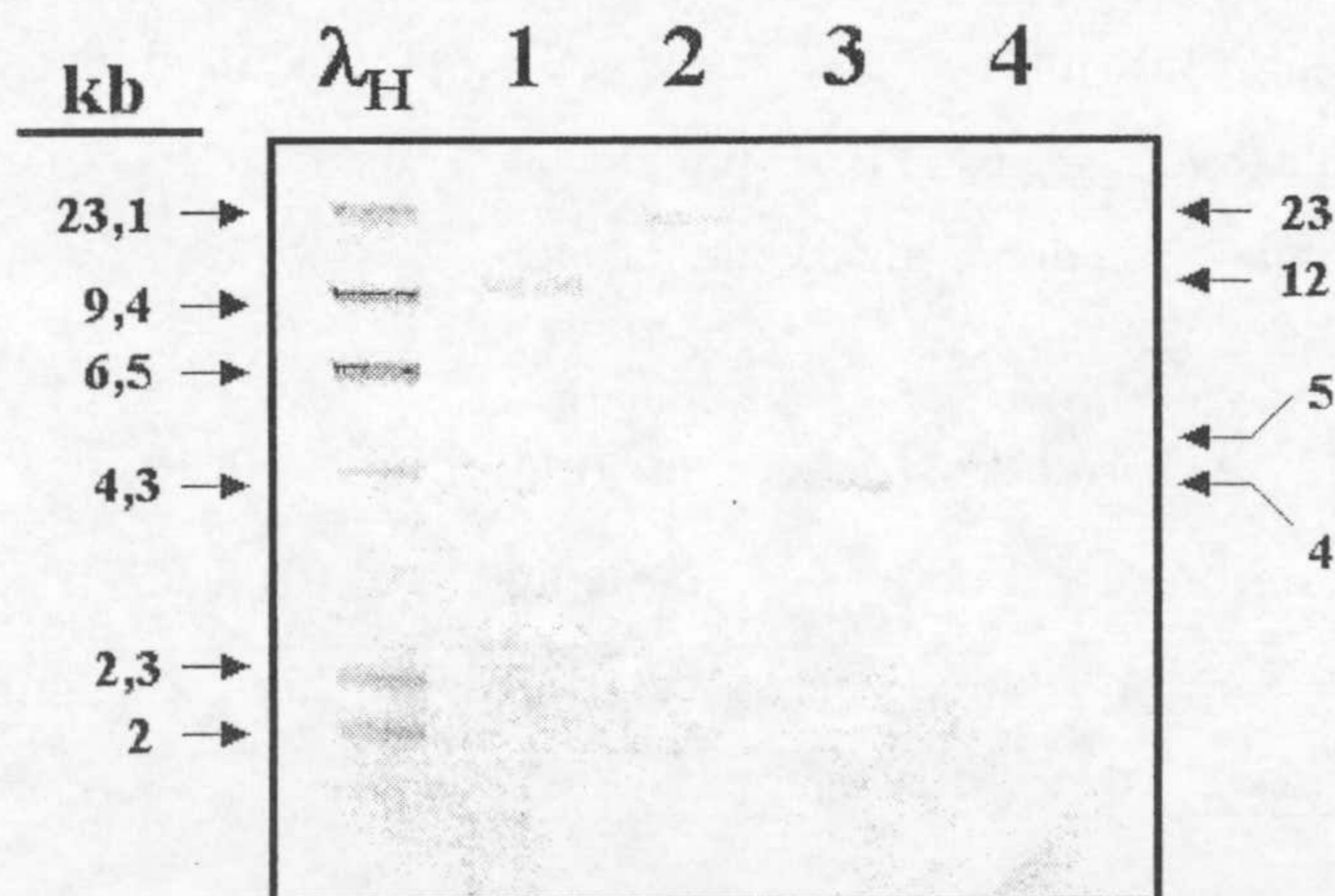


Figura R.2.2. Hibridación de *P. putida* DOT-T1E con la región que contiene *exbD* de pPAT2. Diez microgramos de ADN total de DOT-T1E se digirieron alternativamente con *Bam*HI (calle 1), *Hind*III (calle 2), *Pst*I (calle 3), o *Sal*I (calle 4), se separaron electroforéticamente en gel de agarosa (0,8%, p/v) y se transfirieron a una membrana de nailon, tal y como se describe en el **apartado 13.9** de la sección *Materiales y Métodos*. En la hibridación se utilizó como sonda el fragmento de 4,3 kb *NotI/SphI* de

pPAT2 marcado con dUTP-digoxigenina. Los números a la izquierda se indican los tamaños de las bandas del marcador de peso molecular λ /HindIII (λ_H). Los números a la derecha indican el tamaño de las bandas resultantes de las digestiones enzimáticas del ADN de DOT-T1E que hibridan con la sonda utilizada.

La digestión con *Pst*I rindió una banda de hibridación de aproximadamente 4 kb (**Fig. R.2.2, calle 3**). Se repitió el proceso de la digestión de ADN total con *Pst*I y de separación electroforética para, a continuación, aislar los fragmentos en torno a 4 kb como se describe en el **apartado 13.3** de la sección de *Materiales y Métodos*. Estos fragmentos se ligaron al vector pUC18 linearizado con *Pst*I, y entre más de 100 clones analizados mediante hibridación en colonia con la sonda correspondiente al fragmento *Not*I/*Sph*I de 4,3 kb de pPAT2, se identificaron dos clones positivos. El plásmido portado por uno de estos clones se denominó pPAT5 (**Figura R.2.3**).

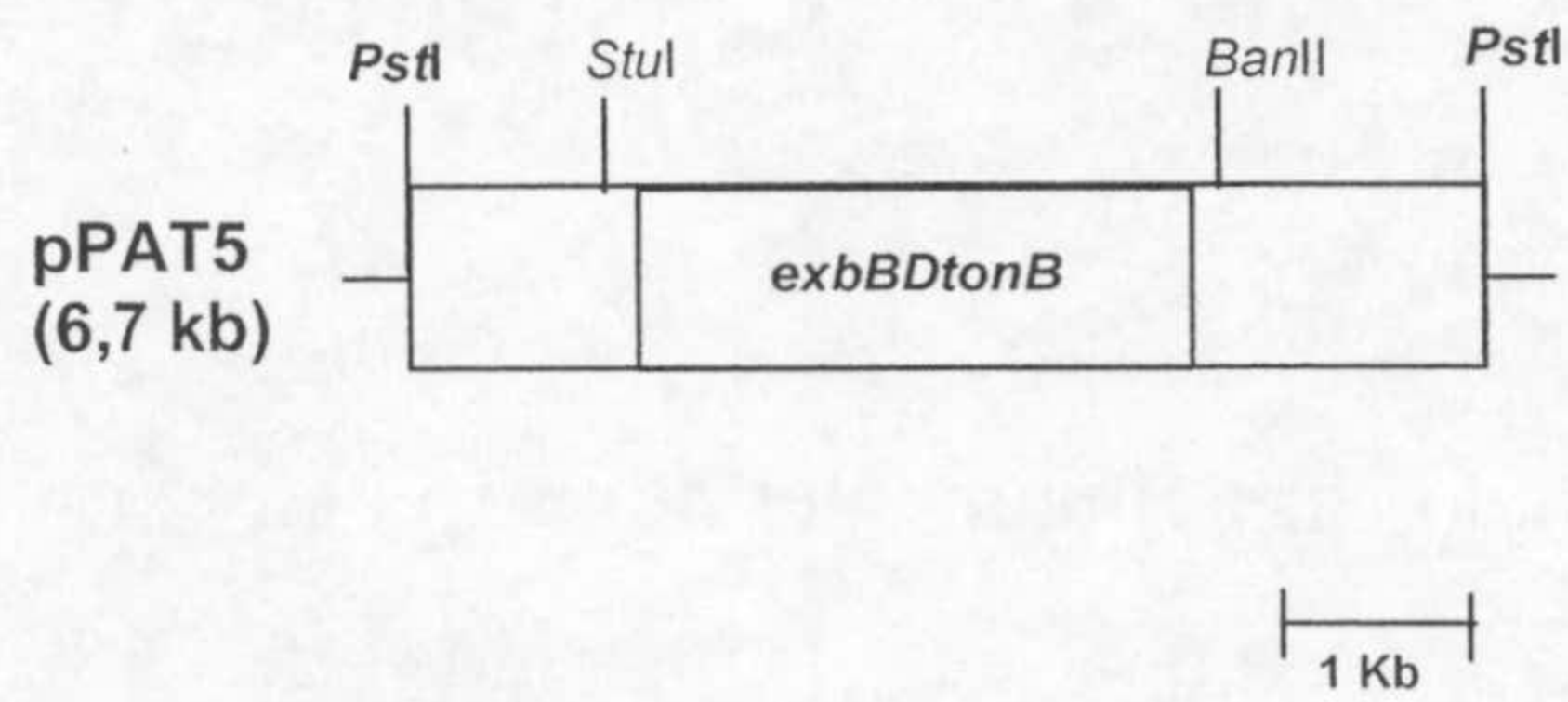


Figura R.2.3. Mapa del inserto del plásmido pPAT5. El esquema corresponde a la región de ADN que contiene la región *exbBDtonB* de *P. putida* DOT-T1E. Para rescatar la zona de ADN de *P. putida* DOT-T1E que contenía *exbD*, se digirieron parcialmente 20 μ g de ADN total de DOT-T1E con *Pst*I, se separaron electroforéticamente en un gel de agarosa (0,8%), se aislaron los fragmentos de ADN en el intervalo de 3,7-4,3 kb aproximadamente, se ligaron con 3 μ g de pUC18 digerido con *Pst*I, y con esta mezcla de ligación se transformó la cepa Dh5 α F' por choque térmico a 42°C. En el mapa se indican los sitios de restricción relevantes en el desarrollo de este trabajo.

La región de ADN silvestre correspondiente a la zona de inserción del minitransposón en el mutante PhoA5 se secuenció a partir del plásmido pPAT5. El inserto se secuenció en ambas cadenas con cebadores internos. La secuencia obtenida se presenta en la **Figura R.2.4**.

```

1  atcgacataggctgcttggttaaccgcctcatcgtgctggctggccgccacgcagtacac
61  caggtagtcagcggggcctgtggcctggcctgcggtatcgacggttcggccaaactctgc
121 ggcaaccggctgaaccctgcgggcagctgaccaacagaacggcgcaggccgctcacctg
181 ccagcctttagccaacatctgcttggccagacgcccaccacatcaccacaaccaccac

```


241 catcacggaaaggtctgacatctctaaactccctagaccaattgatcagcctggccacgc
301 tacacgatgggcggttagaccataggcgaaaaaagctacaatattacttttgtaacaag
361 aattacttgcaataatggccgccaattggttctcggcctacatcgaggccttggagaacg
421 ttcactttttcttcatcggtccggccagcatgacacgtactcaaccttccgcttcgcca
M T R T Q P S A S P
481 acccgtcgcgcgcctggcgcgccatcgccgcgctgacactcagcctggtgctggccccg
T P S R A W R A I A A L T L S L V L A P
541 gtggccatggccgatgagccaaccaccaacgcccgcacacctgcggtgctactgccccg
V A M A /D E P T T N A A T P A A A T A P
601 gccgcaccgctgctgccccggtcgatgcgcccggcctggtgccactgccaccaaccg
A A P A A A P V D A P A P G A T A T N P
661 gcagatgcagaccaagcgttcaagccctggtcgaagacacctcgctgggcatggccat
A D A D P S V Q A L V E D T S L G M A H
721 gacctgtccccatggggcatgtacaagaacgccgacatcgtggtgaagatcgtcatgatc
D L S P W G M Y K N A D I V V K I V M I
781 ggtctggccatcgctccatcatcacctggaccatctggattgcaaaggcttcgagctg
G L A I A S I I T W T I W I A K G F E L
841 atgggcgccaagcgtcgcctgcggggtgaaatcgcccagttgaagaagtccaccaccctg
M G A K R R L R G E I A Q L K K S T T L
901 aaggaagccagcgaagtctccaacaaggaaggcaccctggcccacaccctggtccacgat
K E A S E V S N K E G T L A H T L V H D
961 gccctcgaagagatgcgtctttcggctaacgctcgcgaaaaagaaggcatcaaggagcgc
A L E E M R L S A N A R E K E G I K E R
1021 gtcagcttccgtctggagcgcctggtgcatgccagcggccgcaccatgagcagcggcacc
V S F R L E R L V H A S G R T M S S G T
1081 ggcgtcctcgcaaccatcggtccaccgcaccgttcggttgccctggttcggtaccgtatgg
G V L A T I G S T A P F V G L F G T V W
1141 ggcacatgaacagcttcatcggcatcgccaagaccagaccaccaacctggccgctcgtt
G I M N S F I G I A K T Q T T N L A V V
1201 gccccaggtatcgccgaagcgtgctggccactgctctgggcctggtcgcggcaatcccg
A P G I A E A L L A T A L G L V A A I P
1261 gccgtggtcatctacaacgtcttcgcccgtccattgccggttacaaggcacaggtgtcc
A V V I Y N V F A R S I A G Y K A Q V S
1321 gatgcctccgctcaggtactgctgctggtcagccgtgatctggaccaccagggtagcgag
D A S A Q V L L L V S R D L D H Q G S E
1381 cgcgccgccccgcacatggtgaaagtggggtaagccatgggcctgcatctcaacgaaggt
R A A P H M V K V G *** M G L H L N E G
1441 ggcgacgacctcgccgaaaaccacgaaatcaacgttacgccggttcatcgacgtgatgctg
G D D L A E N H E I N V T P F I D V M L

(cada aminoácido aparece debajo de la base central del codon que lo codifica). Las bases escritas en negro y enmarcadas en gris señalan las dos posiciones en torno al minitransposón en el mutante PhoA5. Las bases escritas en blanco y enmarcadas en gris señalan una posible caja *fur* de acuerdo con la secuencia consenso (de Lorenzo *et al.*, 1987). Las bases en verde indican una posible secuencia Shine-Dalgarno (Shine y Dalgarno, 1974). Las secuencias de aminoácidos subrayadas corresponden a segmentos transmembrana según las predicciones del programa TmPred (ver **apartado 17** de *Materiales y Métodos*). Las barras inclinadas, "/", entre los aminoácidos A y D de Orf1, y A e I de Orf3, indican los sitios de corte propuestos para el procesamiento de los correspondientes péptidos señal, según la regla de von Heijne (1986). El símbolo *** indica un codon de terminación. El número de acceso para esta secuencia en la base de datos GenBank es AF315582.

El análisis de la secuencia reveló que el sitio de inserción del transposón estaba localizado entre las posiciones 1.829 y 1.830 de la secuencia de la **Figura R.2.4**. El fragmento secuenciado contenía un 62,2 % de G+C, porcentaje similar al determinado para el ADN de *P. putida* (61,6% G+C) (Nelson *et al.*, 2002). El análisis de la secuencia rindió tres marcos de lectura abierta diferentes: el primero de la posición 451 a 1413, *orf1*; el segundo de la posición 1417 a 1845, *orf2*; y el tercero de la posición 1842 a 2573, *orf3* (**Fig. R.2.4**). Las tres ORFs comenzaron con un codon ATG canónico para la primera metionina de los polipéptidos y estaban precedidas por secuencias potenciales Shine-Dalgarno de unión a ribosoma (Shine y Dalgarno, 1974) (**Fig. R.2.4**).

La región *orf1* codifica un péptido de 320 aminoácidos con una masa molecular estimada de 38.948 Da. Debido a que la identidad más alta mostrada por este péptido con otras secuencias del banco de datos correspondió a ExbB de *P. putida* WCS358, *orf1* se denominó ExbB. El péptido propuesto contenía alanina como aminoácido más abundante (18,1 % del total) y era relativamente rico en aminoácidos cargados (D, E, K, R), que representan el 18,7 % del total. El programa TmPred predijo la existencia de 4 segmentos transmembrana (posiciones 15-33, 104-125, 222-239 y 258-275) con orientaciones dentro-fuera, fuera-dentro, dentro-fuera y fuera-dentro, respectivamente (ver **Figura R.2.5**). El perfil de hidrofobicidad de dicho péptido predecía la presencia de 4 segmentos hidrofóbicos, que coincidían con las posiciones de los segmentos transmembrana predichos con el programa TmPred, el primero de ellos localizado en el extremo amino terminal (**Fig. R.2.5**).

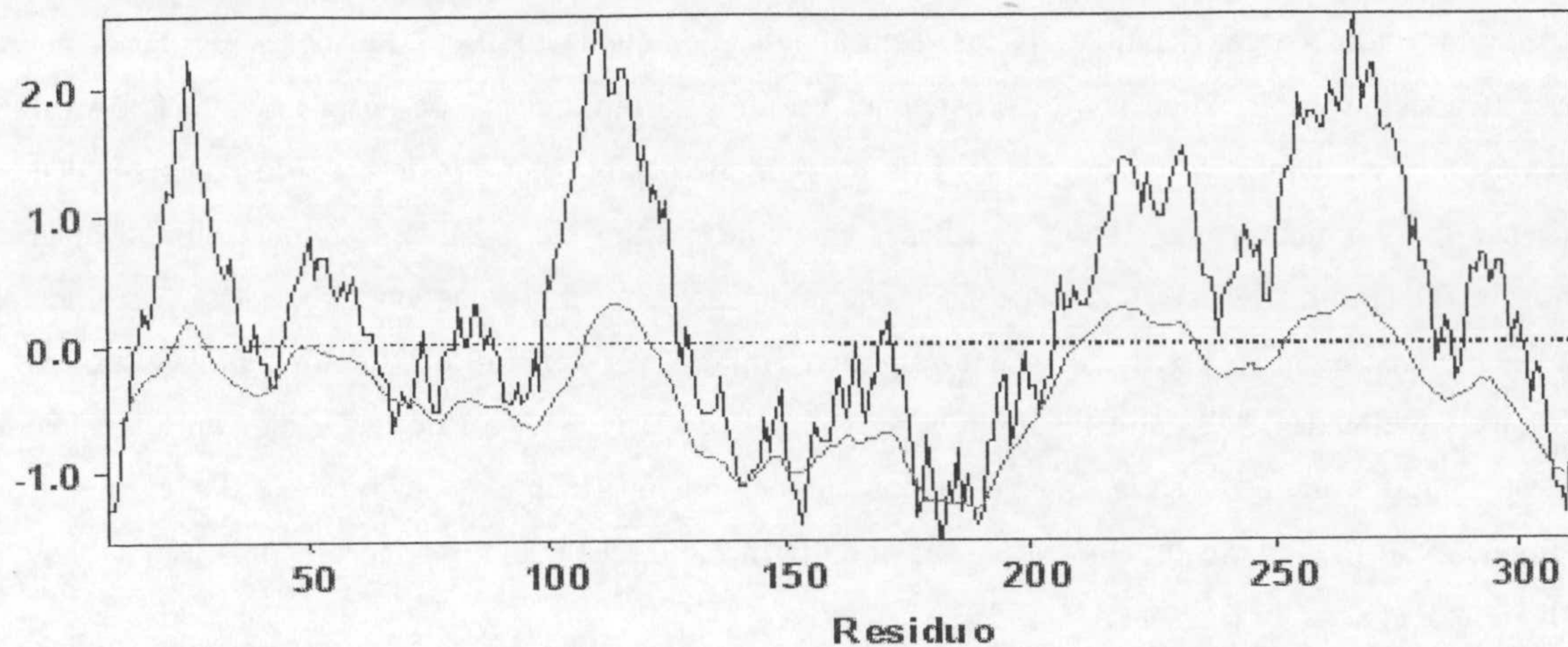
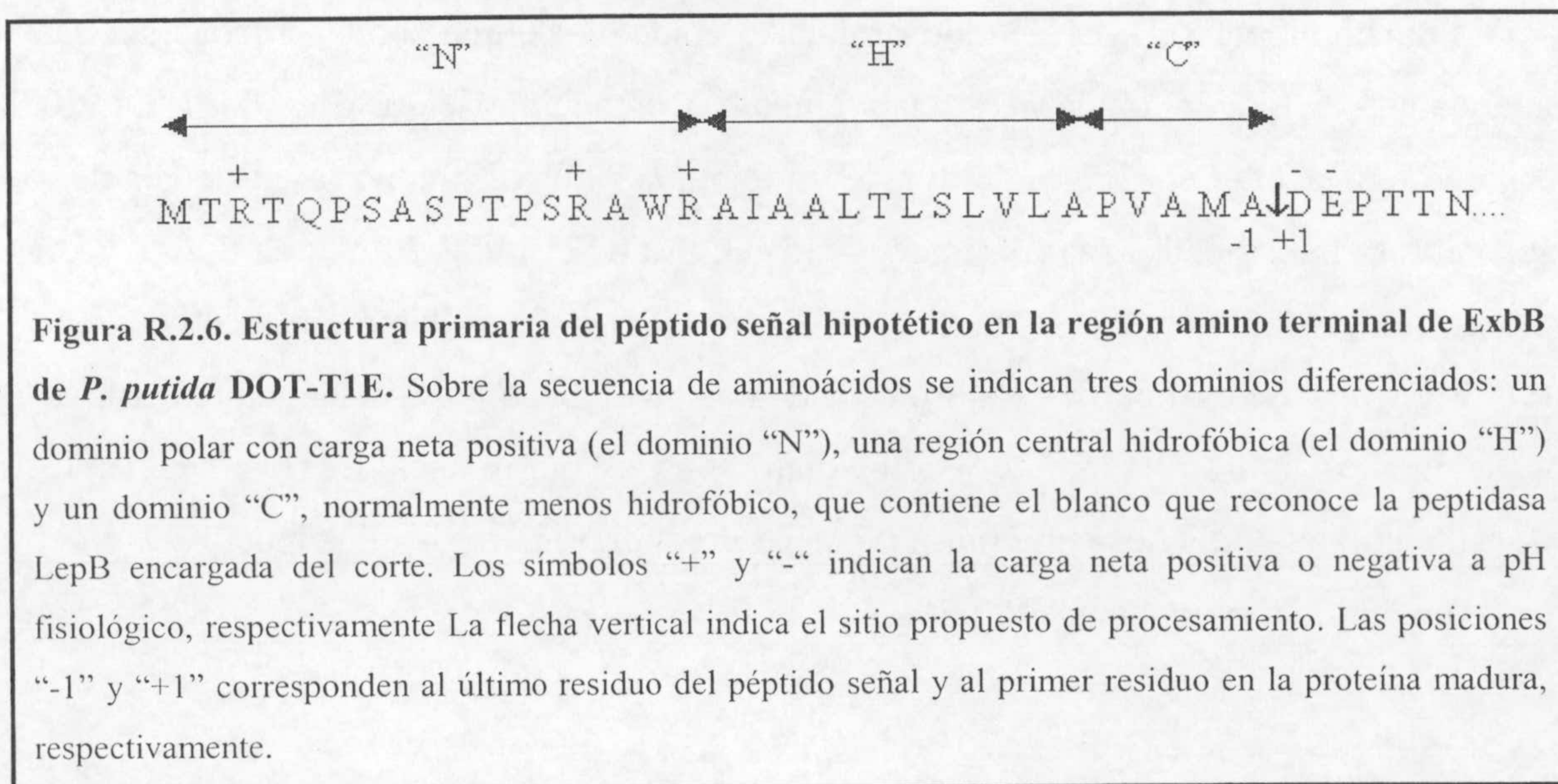


Figura R.2.5. Perfil de hidropatía de ExbB. El perfil de hidrofobicidad de ExbB se generó utilizando el programa Omega 2.0 siguiendo el método de Kyte y Doolittle (1982). En el eje horizontal se indica la posición de los residuos de aminoácidos, mientras que en el eje vertical se indica su hidrofobicidad relativa. Los valores positivos y negativos indican hidrofobicidad e hidrofiliidad, respectivamente. En negro se representa el perfil de hidrofobicidad de la proteína y en rojo la predicción de segmentos transmembrana siguiendo el método de von Heine (1986). La localización y extensión de dichos segmentos viene representada en la gráfica por la porción de línea roja que queda por encima del eje 0.0.

El programa SignalP (ver **apartado 16** de la sección *Materiales y Métodos*) predijo en dicho extremo amino terminal la presencia de un péptido señal de 34 aminoácidos con características muy similares a las de los péptidos señal estándar (Braun y Wu, 1994; Pugsley, 1993). El punto de procesamiento propuesto para la peptidasa LepB o peptidasa señal de tipo I se localizaba entre Ala34 y Asp35 (**Figura R.2.6**). Tras dicho procesamiento, la proteína presentaría un tamaño de 286 aminoácidos y una masa molecular de 34.821 Da.



El producto deducido de la traducción de *orf2* es un péptido de 142 aminoácidos con una masa molecular estimada de 17.789 Da. La identidad más alta con otras proteínas del banco de datos correspondió a ExbD de *P. putida* WCS358, por lo que a *orf2* se le denominó ExbD. Los aminoácidos más abundantes de ExbD fueron: alanina (11,3 %), leucina y valina (10,6 % cada uno), además de un 26 % de aminoácidos cargados (D, E, K, R). El programa TmPred predijo un segmento transmembrana (posiciones 23-43) con orientación dentro-fuera, en consonancia con el perfil de hidropatía de Orf2 que predijo una proteína de carácter hidrofílico con un segmento amino terminal hidrofóbico (**Figura R.2.7**). El programa SignalP no predijo la existencia de un péptido señal en este segmento.

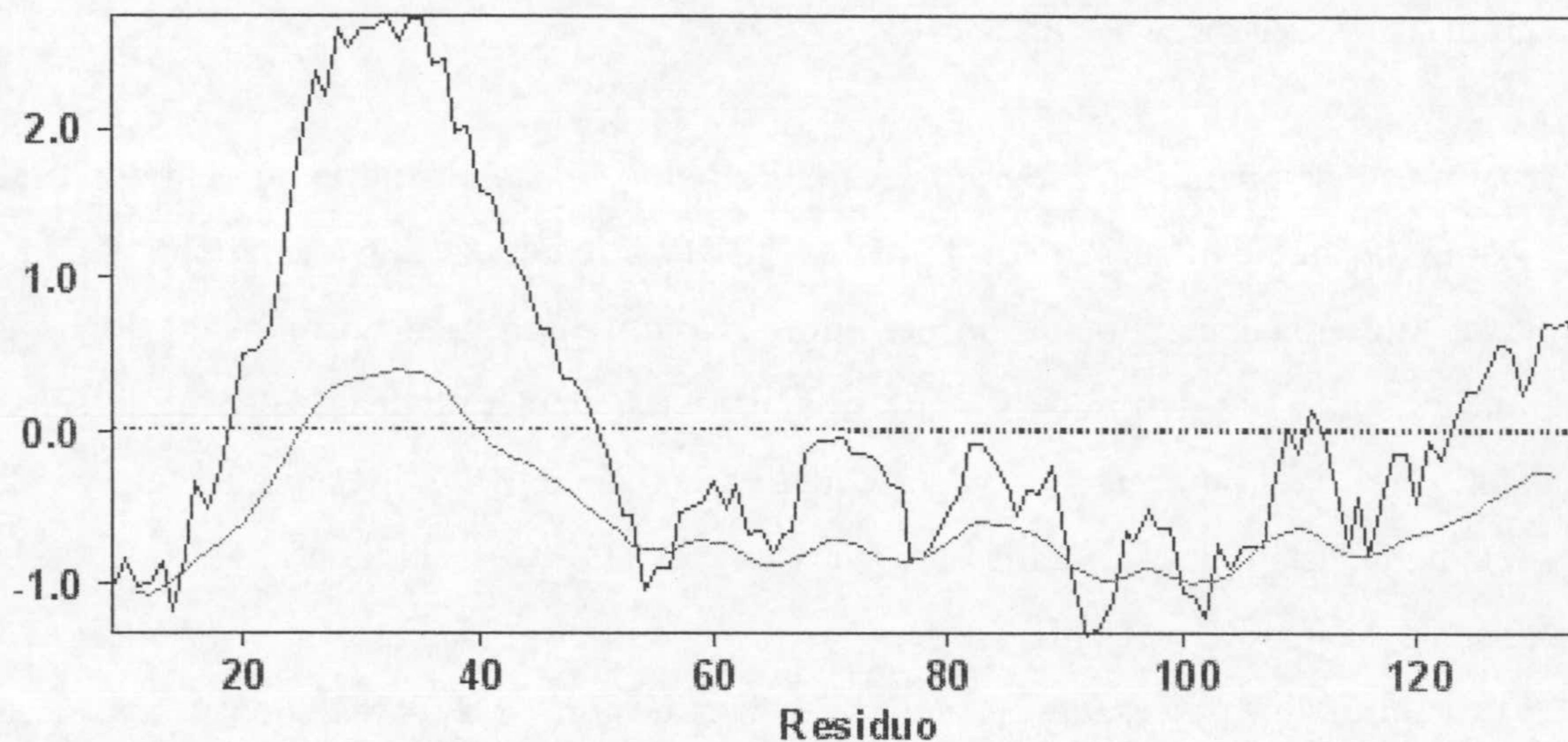


Figura R.2.7. Perfil de hidropatía de ExbD. El perfil de hidrofobicidad de ExbD se generó como se describe en la leyenda de la **Figura R.2.5**.

Por último, la región *orf3* codifica un péptido de 243 aminoácidos con una masa molecular estimada de 30.362 Da. La identidad más alta con otras proteínas del banco de datos correspondió a TonB de *P. putida* WCS358 por lo que a *orf3* se le denominó TonB. TonB contiene como aminoácidos más abundantes un 18,9 % de prolina y un 12,7 % de alanina, además de un 22,6 % de aminoácidos cargados (D, E, K, R). El programa TmPred predijo la existencia de un segmento transmembrana (posiciones 15-32) con orientación fuera-dentro. El perfil de hidropatía predijo una proteína de marcado carácter hidrofílico con un segmento amino terminal hidrofóbico (**Figura R.2.8**).

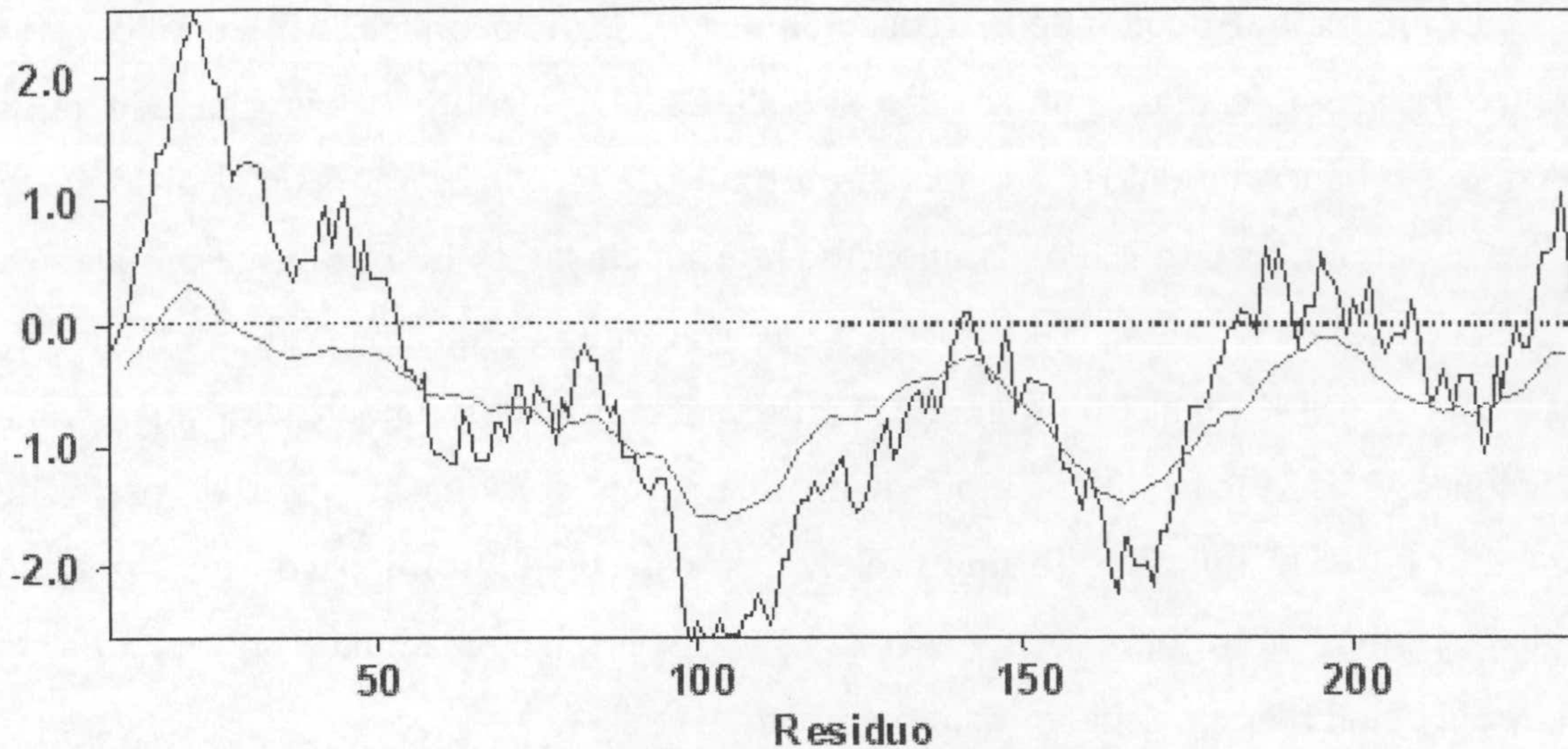
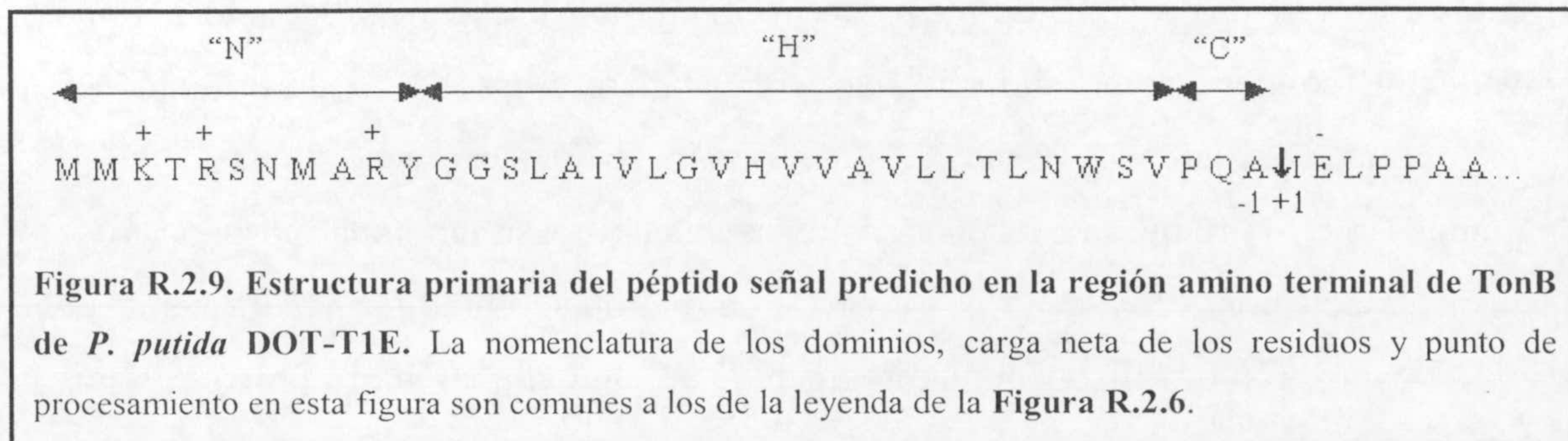


Figura R.2.8. Perfil de hidropatía de TonB. El perfil de hidrofobicidad de TonB se generó como se describe en la leyenda de la **Figura R.2.5**.

En este segmento, el programa SignalP predijo la existencia de un péptido señal de 37 aminoácidos de acuerdo con la regla -3, -1 (von Heijne, 1986). En dicho péptido se puede diferenciar claramente un dominio "N" con carga neta positiva, un dominio "H" hidrofóbico y un dominio "C" que se ajusta a las características del péptido señal estándar, con residuos neutros de pequeño tamaño en las posiciones -1 y -3, concretamente alanina y leucina, respectivamente. El procesamiento del que sería responsable la peptidasa LepB estaría localizado entre la Ala37 e Ile38 (ver **Figura R.2.9**). La proteína procesada presentaría una extensión de 206 residuos y una masa molecular de 25.734 Da. Sin embargo, se ha descrito que este dominio N-terminal de TonB, pese a tener propiedades similares a una secuencia señal, parece estar desprovista de un sitio de rotura típico para peptidasas señal (Skare *et al.*, 1989). Se observó que estos tres péptidos, ExbB, ExbD y TonB carecen de residuos de cisteína en su secuencia aminoácida.



4. COMPARACIÓN DE ExbB, ExbD Y TonB DE *P. putida* DOT-T1E CON LAS SECUENCIAS DISPONIBLES EN LAS BASES DE DATOS.

Las secuencias de aminoácidos derivadas de la región *exbBDtonB* de *P. putida* DOT-T1E se compararon con las bases de datos de proteínas Swiss-Prot y con secuencias de ADN traducidas de la base de datos del EMBL. La cuantificación de la identidad y similitud con las secuencias de las bases de datos no redundantes se realizó mediante el programa BLAST (Altschul *et al.*, 1997).

4.1. Comparación de ExbB de DOT-T1E con las secuencias de las bases de datos.

Cuando se comparó ExbB con las bases de datos (mayo 2002), resultó que las secuencias que mostraron la mayor identidad, del 90 al 98%, fueron las proteínas ExbB de dos cepas de *P. putida* denominadas WCS358 (Bitter *et al.*, 1993) y KT2440 [The Institute for Genomic Research (TIGR), comunicación personal]. Hasta esa fecha se encontraron al menos 48 proteínas ExbB secuenciadas en su totalidad o parcialmente. ExbB de DOT-T1E mostró una alta similitud, del 23 a 65%, con las proteínas ExbB de otras bacterias gram-negativas presentes en las bases de datos tales como: *Escherichia coli*, *Xanthomonas campestris*, *Salmonella typhimurium*, etc. Las proteínas ExbB de las tres cepas de *P. putida* presentaron un fragmento extra de 80-90 residuos en el extremo amino terminal con respecto a las proteínas ExbB homólogas de otras bacterias gram-negativas. Las proteínas ExbB, además de entre ellas, presentaron homología con las proteínas TolQ de distintas especies bacterianas. En la **Tabla R.2.1** aparecen listadas dichas proteínas, junto al porcentaje de identidad a ExbB de DOT-T1E que presentaron.

Tabla R.2.1. Proteínas homólogas a ExbB de *P. putida* DOT-T1E.

Proteína y especie bacteriana	Longitud (aa) ^a	Extensión del solapamiento ^b	% identidad ^c	Nº acceso
ExbB <i>Pseudomonas putida</i> KT2440	320	320	98,1	TIGR (comun.personal)
ExbB <i>Pseudomonas putida</i> WCS358	329	329	90	Q05605
ExbB <i>Mesorhizobium loti</i>	249	223	65	Q98EN4
ExbB <i>Yersinia pestis</i>	237	236	62,3	Q8ZI34
ExbB <i>Escherichia coli</i> K-12	244	229	62,0	P18783

(Continúa en la página siguiente)

Tabla R.2.1.(continuación)

Proteína y especie bacteriana	Longitud (aa) ^a	Extensión del solapamiento ^b	% identidad ^c	N° acceso
ExbB <i>Salmonella typhimurium</i>	244	229	61,6	P18950
ExbB <i>Brucella melitensis</i>	319	267	57,7	Q9AMF1
ExbB <i>Brucella melitensis</i> 16M	290	267	57,7	Q8YIS8
ExbB <i>Bradyrhizobium japonicum</i>	258	227	55,5	Q93SH1
ExbB <i>Agrobacterium tumefaciens</i> C58	340	285	54	Q8UIY0
ExbB <i>Sinorhizobium meliloti</i>	328	300	51,0	Q92Q41
ExbB2 <i>Helicobacter pylori</i> 26695 ^d	150	69	46,4	O25986
ExbB2 <i>Helicobacter pylori</i> J99 ^d	150	69	46,4	Q9ZJH1
ExbB <i>Xanthomonas axonopodis</i>	253	92	45,7	AAM34901
ExbB <i>Xanthomonas campestris</i>	253	92	45,7	O34260
ExbB <i>Aquifex aeolicus</i>	148	71	45,1	O67637
ExbB <i>Xylella fastidiosa</i>	254	254	44,9	Q9PHD4
ExbB1 <i>Vibrio cholerae</i>	228	67	41,8	O52043
ExbB3 <i>Campylobacter jejuni</i> ^d	184	92	41,3	Q9PJ17
ExbB2 <i>Synechocystis</i> PCC6803 ^d	227	75	41,3	P72941
ExbB1 <i>Campylobacter jejuni</i>	253	212	40,6	Q9PIV0
ExbB <i>Photobacterium damsela</i>	223	68	39,7	CAD27898
ExbB <i>Haemophilus influenzae</i>	150	85	38,8	P43008
ExbB2 <i>Campylobacter jejuni</i> ^d	141	78	38,5	Q9PM47
ExbB <i>Methanobacterium thermoautotrophicum</i> ^d	279	82	37,8	O27101
ExbB <i>Pasteurella haemolytica</i>	152	78	37,2	P72202
ExbB1 <i>Helicobacter pylori</i> 26695 ^d	189	103	36,9	O25755
ExbB1 <i>Helicobacter pylori</i> J99 ^d	189	103	36,9	Q9ZK83
ExbB <i>Plesiomonas shigelloides</i>	269	77	36,4	Q93SS5
ExbB <i>Haemophilus ducreyi</i>	150	78	35,9	O51808

(Continúa en la página siguiente)

Tabla R.2.1.(continuación)

Proteína y especie bacteriana	Longitud (aa) ^a	Extensión del solapamiento ^b	% identidad ^c	Nº acceso
ExbB <i>Helicobacter pylori</i> 26695	145	91	35,2	O25897
ExbB <i>Helicobacter pylori</i> J99	145	91	35,2	Q9ZJP6
ExbB <i>Pasteurella multocida</i> Pm 70	152	94	35,1	Q9CLN3
ExbB <i>Pasteurella multocida</i> Pm 25	152	94	35,1	Q9L6A8
ExbB <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	239	239	34,8	Q9RMT2
ExbB2 <i>Ralstonia solanacearum</i> ^d	206	149	34,2	Q8XWE6
ExbB <i>Xanthomonas axonopodis</i>	220	133	33,1	AAM36942
ExbB <i>Anabaena</i> sp. PCC7120	217	121	33,1	Q8YM89
ExbB <i>Bordetella bronchiseptica</i>	314	257	32,3	Q9ZG17
ExbB1 <i>Ralstonia solanacearum</i> ^d	243	199	31,7	Q8XXZ9
ExbB <i>Neisseria meningitidis</i> (serogrupo C)	220	218	31,2	P95375
ExbB <i>Neisseria meningitidis</i> (serogrupo A y B)	220	218	30,7	P57027
ExbB <i>Bordetella pertussis</i>	325	268	30,6	Q9S3M5
ExbB <i>Neisseria gonorrhoeae</i>	220	218	30,3	O06433
ExbB <i>Chlamydia pneumoniae</i>	232	189	29,1	Q9Z7C1
ExbB <i>Chlamydia trachomatis</i>	232	188	28,7	O84601
ExbB2 <i>Vibrio cholerae</i>	179	97	22,7	Q9ZHW0
TolQ <i>Brucella melitensis</i>	236	227	39,2	Q93TG7
TolQ <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	231	195	39,0	P50598
TolQ <i>Agrobacterium tumefaciens</i> C58	285	238	38,7	Q8U9L1
TolQ <i>Rickettsia prowazekii</i>	241	225	38,2	Q9ZDL8
TolQ <i>Mesorhizobium loti</i>	236	225	37,8	Q98F81
TolQ <i>Sinorhizobium meliloti</i> ^d	239	238	37,8	Q92M96
TolQ <i>Rickettsia conorii</i>	241	221	37,6	Q92IJ8

(continúa en la página siguiente)

Tabla R.2.1.(continuación)

Proteína y especie bacteriana	Longitud (aa) ^a	Extensión del solapamiento ^b	% identidad ^c	N° acceso
TolQ <i>Rickettsia montanensis</i>	241	221	37,6	Q9AKM2
TolQ <i>Rickettsia typhi</i>	241	225	37,3	Q9AKC1
TolQ <i>Rickettsia rickettsii</i>	241	221	37,1	Q9AKG6
TolQ <i>Pseudomonas putida</i> KT2440	231	192	37,0	Q9WWX3
TolQ <i>Pseudomonas putida</i> DOT-T1E	231	192	37,0	Este trabajo
TolQ <i>Pasteurella multocida</i>	229	194	35,1	Q9CM68
TolQ <i>Ralstonia solanacearum</i> ^d	230	199	34,7	Q8Y1F8
TolQ <i>Haemophilus influenzae</i>	228	194	34,5	P43768
TolQ <i>Escherichia coli</i> K-12	230	197	33,5	P05828
TolQ <i>Salmonella typhimurium</i>	230	197	33,5	Q8XFE1
TolQ <i>Xanthomonas campestris</i>	259	188	33,0	AAM42292
TolQ <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	222	189	32,3	Q9ZAG4
TolQ <i>Erwinia chrysanthemi</i>	228	217	31,3	Q937K6
TolQ <i>Pectobacterium chrysanthemi</i>	228	217	31,1	Q937K6
TolQ <i>Yersinia pestis</i>	228	217	30,9	Q8ZGZ4
TolQ <i>Xanthomonas axonopodis</i>	259	210	30,5	AAM37989
TolQ <i>Vibrio cholerae</i>	227	222	29,7	Q9KR08
TolQ <i>Aquifex aeolicus</i> ^d	204	173	27,2	O67795
TolQ <i>Methanopyrus kandleri</i>	202	198	23,2	AAM01283

^a Extensión en aminoácidos de la proteína.

^b En el cómputo global del número de aminoácidos comprendidos en la región de solapamiento se incluyen los “huecos” que introduce el programa de similitudes ALIGN (Genestream Resource Center, ver *Materiales y Métodos*) para optimizar el alineamiento.

^c Porcentaje de residuos idénticos encontrados en la región de solapamiento.

^d Proteínas putativas deducidas por traducción de sus secuencias de ADN correspondientes.

Mientras que en *P. putida* se encontró una sola copia de *exbB*, en *Vibrio cholerae* se encontraron dos copias (Occhino *et al.*, 1998; Heidelberg *et al.*, 2000) y en *Ralstonia solanacearum* (Salanoubat *et al.*, 2002), *Helicobacter pylori* (Tomb *et al.*, 1997; Alm *et al.*, 1999) y *Campylobacter jejuni* (Parkhill *et al.*, 2000) se encontraron hasta tres copias del alelo *exbB*.

PPDOT-T1E	223	VGLFGTVWGI	MNSF	IGIAK	Q	-TTNLAV	VAPG	IAEAL	LATA	GLVAAI	PAVV	IYNVFARS																							
PPWCS358	232	VGLFGTVWGI	MNSF	IGIAK	Q	-TTNLAV	VAPG	IAEAL	LATA	GLVAAI	PAVV	IYNVFARS																							
BB	212	VGLFGTVWGI	YHAL	VGIGL	SDG	-VTINRI	AGPV	GEAL	MTGL	GLAVAI	PAV	AYNAFVRN																							
CP	147	I	GLLGT	VWGI	VAFT	THSSGS	--SGNSA	IMEGL	LATAL	GTII	GLFVAI	PSLA	NYLKAH																						
XC	169	VGLLGT	VWGI	YGAL	IKIGA	NG	-SASIDA	VAGP	VEAL	MTA	GLFVAI	PAVFA	NFFSKV																						
HP26695-2	95	VGLLGT	VLGI	MVIF	YDMG	VSG	-GMDAK	TIMV	GISL	ALKATA	GLAVAI	PTL	AYNSLLRK																						
VC-1	126	I	GLLGT	VLGI	MEFKG	VAA	TGSL	TPNV	LADGL	GVAM	YTTA	AGLL	TA	PAVAGA	LLNLW																				
ECK-12	143	VGLFGTVWGI	MNSF	IGIAK	Q	-TTNLAV	VAPG	IAEAL	LATA	GLVAAI	PAVV	IYNVFARQ																							
VC-2	105	I	GLLGT	VTGM	ISVED	VMATQ	G	SSDP	KMAS	GTSL	ATPT	MAGM	VAAI	AGL	FVHARLSKT																				
HP26695-1	112	I	GLFGT	VEI	LEAEN	NGTL	G	QASFG	VIAP	ISKAL	ATAAG	ILAAI	PAYS	FYLIL	KRK																				
NG	137	I	GLFGT	VWGI	IYHAL	INIG	QSG	-QMSIA	VAGP	ICEAL	ATAAG	LFAI	PAV	AYN	FLNRG																				
HI	73	VGLLGT	VIGI	ILTF	YQI	HGGG	DDP	SEIM	LHSL	ALKATA	GLI	VAI	PSM	FYNG	LGRK																				
AA	70	VGLLGT	VLGI	ILTF	YI	IGEK	G	IVNT	KEIM	VGLA	LALKA	TAL	GLI	VAI	PST	ILYN	FLVRK																		
HP26695-3	66	I	GLLGT	VMGI	MLTF	MDIG	SAS	-GIDT	KAIM	TNAL	LALKA	TAL	GMGL	I	VAI	PAI	VIYN	LLVRK																	
consensus	241	vGLLGT	Vwgim	fi	ig	tg	v		ia	gia	Alla	Tal	Glvv	Aipav	yn	l	r																		
PPDOT-T1E	282	IAGYKAQVSD	ASAQ	VL	IVSR	DD	DH	QGS	ERA	AAP	H	MV	KVG	-----																					
PPWCS358	291	IAGYKAQVSD	ASAQ	VL	IVSR	DD	DH	QGS	ERA	AAP	H	MV	KVG	-----																					
BB	271	NR	-----	V	F	SRL	DA	FAH	DL	FA	FL	T	TG	Q	V	A	V	S	D	G	K	V	R	A	L	R	R	Q	H	G	R	G	S	E	
CP	205	SS	-----	E	L	I	S	E	E	Q	T	A	Y	L	L	N	S	I	E	V	K	Y	R	N	T	N	L	-----							
XC	228	NS	-----	S	T	A	K	F	D	T	F	A	H	D	L	H	D	F	F	A	T	G	S	R	V	R	-----								
HP26695-2	154	SD	-----	V	L	S	E	K	F	R	I	M	K	K	-----																				
VC-1	186	ADRTMAKLE	H	T	L	N	Y	V	N	W	L	E	G	M	T	L	H	A	D	A	S	L	T	V	V	T	P	Q	E	A	T	T	E	N	L
ECK-12	202	IGGFKAML	G	D	V	A	A	Q	V	L	I	Q	S	R	D	L	E	A	S	A	A	A	H	P	V	A	V	A	Q	K	L	R	A	G	
VC-2	164	CR	-----	G	L	E	M	K	L	E	Q	A	L	R	S	Q	S	-----																	
HP26695-1	171	VY	-----	D	L	S	Y	Y	Q	M	Q	V	D	I	L	S	S	K	K	-----															
NG	196	TK	-----	I	L	T	Q	D	L	A	M	A	H	D	L	H	V	R	L	L	N	Q	K	D	S	-----									
HI	133	VE	-----	V	N	R	K	W	K	V	N	E	Q	K	D	K	E	-----																	
AA	129	VR	-----	E	K	L	D	W	E	A	T	H	G	E	C	S	S	S	H	E	-----														
HP26695-3	125	SE	-----	I	L	T	K	W	D	I	F	H	P	V	D	T	Q	S	H	E	I	Y	S	K	A	-----									
consensus	301			v	l	l	l					l	h																						

Figura R.2.10. Alineamiento múltiple de ExbB de *P. putida* DOT-T1E con otras proteínas ExbB. El alineamiento de ExbB de *P. putida* DOT-T1E con 13 proteínas ExbB se realizó mediante el programa de alineamiento múltiple de secuencias del Baylor College of Medicine (ver sección *Materiales y Métodos*). Las secuencias de aminoácidos subrayadas corresponden a segmentos transmembrana según las predicciones del programa TmPred (ver apartado 16 de *Materiales y Métodos*). Para cada secuencia se indican con letra blanca y enmarcados en negro aquellos aminoácidos conservados al menos en 7 de las secuencias alineadas (la mitad más una), y con letra blanca y enmarcados en gris aquellos aminoácidos conservados con cambios permisivos dentro del mismo grupo que aparecen en 7 ó más secuencias (la mitad más una). La secuencia consenso y el código de color se generaron con ayuda del programa BoxShade 3.21(ver sección *Materiales y Métodos*). En la secuencia consenso, en letra mayúscula aparecen los aminoácidos conservados en todas las secuencias y en letra minúscula aparece el aminoácido más frecuente en aquellas posiciones conservadas en las que existe cierta permisividad. Para cada secuencia, el número de acceso a la base de datos se indica en la **Tabla R.2.1**. Abreviaturas: AA, *Aquifex aeolicus*; BB, *Bortedella bronchiseptica*; CP, *Chlamydia pneumoniae*; ECK-12, *E. coli* K12; HI, *Haemophilus influenzae*; HP26695, *Helicobacter pylori* 26695; NG, *Neisseria gonorrhoeae*; PPDOT-T1E, *P. putida* DOT-T1E; PPWCS358, *P. putida* WCS358; VC, *Vibrio cholerae*; XC, *Xanthomonas campestris*.

Curiosamente, las proteínas ExbB de las cepas de *P. putida* DOT-T1E, KT2440 y WCS358 presentaron una extensión extra en su extremo amino terminal de 82, 82 y 91 aminoácidos, respectivamente. En esta extensión en el extremo extra N-terminal se predijo la presencia de un segmento transmembrana. El significado funcional de este

segmento extra se desconoce, y hasta la fecha no se ha identificado homología alguna entre esta secuencia con proteínas de las bases de datos. En la mitad carboxilo terminal de la proteína se observó el mayor grado de similitud entre secuencias. También se observó una alta identidad de secuencia en las tres regiones transmembrana de ExbB de *P. putida* comunes a las proteínas ExbB de otras bacterias gram-negativas. Se piensa que es a través de estos dominios con los que ExbB interacciona con TonB y ExbD (Kampfenkel y Braun, 1992; Koebnik, 1993; Larsen *et al.*, 1994; Traub *et al.*, 1993). Estos dominios incluyen el motivo VX₃VX₃LX₃SX₃WX₃ de la región N-terminal (residuos 22-41 de ExbB_{*E.coli*}, residuos 113-132 en ExbB_{*P.putida*} WCS358); una región entre las posiciones 144-152 de ExbB_{*E.coli*} con tres residuos de glicina conservados, y una región α-hélice rica en alanina entre los residuos 177-191 de ExbB_{*E.coli*} que contiene los aminoácidos leucina, treonina, glicina, leucina (isoleucina), valina (alanina) y prolina conservados en las posiciones 178, 181, 184, 185 y 190 en ExbB_{*E.coli*}.

Como se mostró en la **Tabla R.2.1**, ExbB también presentó similitud con la proteína de membrana TolQ. La zona de mayor similitud se restringió a la mitad C-terminal (**Figura R.2.11**), si bien en el alineamiento de las proteínas ExbB de DOT-T1E y de otras bacterias gram-negativas con sus correspondientes proteínas TolQ se observó una alta identidad de secuencia en las tres regiones transmembrana de la proteína madura ExbB, a semejanza de la observación en el alineamiento con proteínas ExbB.

ExbB-PPDOT-T1E	1	MTRTQPSASPTPSRAWRAIAALTLSLVLAPVAMADEPTTNAATPAAATAPAAPAAAPVDA
ExbB-ECK-12	1	-----
ExbB-PA	1	-----
ExbB-HI	1	-----
TolQ-PPDOT-T1E	1	-----
TolQ-PA	1	-----
TolQ-ECK-12	1	-----
TolQ-HI	1	-----
consensus	1	-----
ExbB-PPDOT-T1E	61	PAPGATATNPADADPSVQALVEDTSLGMAHDLSPWGMVKNADIVVKIVMIGLAIASITW
ExbB-ECK-12	1	-----MGNNLMQTDLSWGMVQHADIVVKCVMIGLILASVVTW
ExbB-PA	1	-----MSLLITPLESVEGAVTWLIVGFSVVTW
ExbB-HI	1	-----MQLFDLQYSDYFTIGLILMSIIML
TolQ-PPDOT-T1E	1	-----MEANVVDHTSNWSLVSNASVIVVQLVMITLVAASVTSW
TolQ-PA	1	-----MEPNVVDHTSNWSLISNASIVVQLVMITLVAASVTSW
TolQ-ECK-12	1	-----MTDMNLDLFLKASLIVKLMITLIGFSTASW
TolQ-HI	1	-----MTAEINFLDLFLKASIVVQLVIVLISFSTISW
consensus	61	m dlsvw ly asivv lvmilligaSiisw
ExbB-PPDOT-T1E	121	TIWIA GFELMCAKRRLRCEIAQLKKSTTLKEASEVSNKEG---LAHTVHDALEEMRL
ExbB-ECK-12	39	AIFFSKVEFFNLKRRLRREQLLAEARSLNQANQIAADFGSK-SLSLHLNEAQNELEL
ExbB-PA	28	GAIVGVQFARQKRODRQFKQFWSATSLDSAGQQAQDKQGAGARVAQAGFAIQVQDN
ExbB-HI	29	AMIER---YLFLR-----
TolQ-PPDOT-T1E	38	IMIFQRSTMLRAGRALDAFEERFWSGIDLSKLYRQAGSNPDPD SGVEQVFRAGFKEFSR
TolQ-PA	38	IMIFQRGNAMRAAKALDAFEERFWSGIDLSKLYRQAGSNPDPD SGVEQVFRAGFKEFSR
TolQ-ECK-12	33	AIIIQRIRILNAAAREAEAFEDKFWSGIDLSKLYQESQGKRDNLGSEQV FYSGFKEFVR
TolQ-HI	34	AIIIQRIRILTNALEAATFEDRFWSGEIDNLYEGLSNRRDGLGSEQVFCVGFKEFSR
consensus	121	aiiigrs l gahr lrgfe fwsq l e a t ql g e

ExbB-PPDOT-T1E	178	S--ANAREKEGKERVSRERLHASGRTSSGTGVLATIGSTAPFVGLFGTVWGMNS
ExbB-ECK-12	98	S--EGSDNEGKERTSFRERRAAVGRQGRGNGVLATIGAI SPFVGLFGTVWGMNS
ExbB-PA	88	G-QPDLAQSINHQRLEERARQQTQRERRSLESGLAVLASIGSTSPFVGLFGTVWGMNEA
ExbB-HI	40	-----KVSVAHYSTIHALDIDLNRNMTVISTIGANAPYVGLLGTVIGILLI
TolQ-PPDOT-T1E	98	LKQQPGVDPDAVMGEGVGRAMRVAISREEEKLQSPFLATVGSTSPYVGLFGTVWGMNS
TolQ-PA	98	LKQQPGVDPDAVMGEGVARAMRVAISREEEKLQSPFLATVGSTSPYVGLFGTVWGMNS
TolQ-ECK-12	93	LFRANSHAPEAVVEGASRAMRVAISNRELENLETHPFLGTVGSISPYVGLFGTVWGMHHA
TolQ-HI	94	LKQVNPDAPEALIKGTMRAMNVAISNREIESLENRVPFLATVAVSVPYVGLFGTVWGMHHA
consensus	181	q e eai e vsramr i re le l flatigstsPyvGLfGTVwGImns
ExbB-PPDOT-T1E	236	FIGLAK-TQTTNLAVVAPGIAEALATAIGLVAAIPAVVIYNVFARSIAGYKQVSDASA
ExbB-ECK-12	156	FIGLAQ-TQTTNLAVVAPGIAEALATAIGLVAAIPAVVIYNVFAQQGGFKMLGDVAA
ExbB-PA	147	LKGLSA-AGSASLETVAGPICSALIATCVGIAVAVPAVLVYNYFLRRKTAADLDDFAH
ExbB-HI	86	FYQICHGCGDIDPSVIMLHESLALKATALGILVAIPSMVFYNGLCRQVEVNRLLKWKVLSE
TolQ-PPDOT-T1E	158	FRGLAS-AQQATLATVAPGIAEALATAIGLFAAIPAVLAYNRFAARSEMIICRYYTFAD
TolQ-PA	158	FRGLAT-VQQATLATVAPGIAEALATAIGLFAAIPAVLAYNRFSARSEMIIICRYYTFAD
TolQ-ECK-12	153	FIALGA-VKQATLQMVAPGIAEALATAIGLFAAIPAVMAYNRLNQRVNLKVELNYDNFME
TolQ-HI	154	FMALEG-AKQATLQMVAPGIAEALATAIGLFAAIPAVMAYNRLSLRVNAIEQDYGNFID
consensus	241	figia aq atlavvapgiaeALiATaiGl aAiPavv YN farri l a y fae
ExbB-PPDOT-T1E	295	CVLLVSRDIDHQSERAAPHMVKVG-----
ExbB-ECK-12	215	CVLLVSRDIDLEASAAAHPVAVAQKLRAG----
ExbB-PA	206	EFYSLAQKSAFRVIVHPSAARQAGNPSRNVKEAS
ExbB-HI	146	QKDK-----
TolQ-PPDOT-T1E	217	EFQAILHRKVHTSEE-----
TolQ-PA	217	EFQAILHRKVHTSDD-----
TolQ-ECK-12	212	EFTAILHRQAFTVSESNG-----
TolQ-HI	213	EFTTILHRQAFGKAPH-----
consensus	301	ef il r l

Figura R.2.11. Alineamiento múltiple de proteínas ExbB con proteínas TolQ de distintas bacterias gram-negativas. La nomenclatura y el método seguido para generar el alineamiento, así como la secuencia consenso son los mismos que se indicaron en la **Figura R.2.10**, excepto que no se han considerado aquellos aminoácidos que aparecían conservados exclusivamente en uno de los dos grupos en que se han dividido las proteínas (ExbB o TolQ). El porcentaje de identidad entre ExbB de *P. putida* DOT-T1E y las distintas proteínas TolQ alineadas se indica en la **Tabla R.2.1**. Abreviaturas: ECK-12, *E. coli* K12; HI, *Haemophilus influenzae*; PA, *P. aeruginosa*; PPDOT-T1E, *P. putida* DOT-T1E.

4.2. Comparación de ExbD de *P. putida* DOT-T1E con las secuencias de las bases de datos.

ExbD de *P. putida* DOT-T1E se comparó con las secuencias de las bases de datos y se encontró un 100% de identidad con la proteína ExbD de *P. putida* KT2440. ExbD de DOT-T1E mostró una alta similitud (de 69,5 a 14,3 %) con las proteínas ExbD de otras bacterias gram-negativas presentes en las bases de datos tales como *P. putida* WCS358, *Escherichia coli*, *Xanthomonas campestris*, *Salmonella typhimurium*, etc. La proteína ExbD de DOT-T1E además presentó homología con la proteína TolR de distintas especies bacterianas. En las bases de datos (mayo 2002) aparecieron 48 proteínas ExbD secuenciadas total o parcialmente. En la **Tabla R.2.2** se muestran dichas proteínas, junto al porcentaje de identidad a ExbD_{DOT-T1E} que presentaron.

PPDOT-T1E	113	YGDLM	EV	NNMRAAGYLKVGLV	GLETA	AKK-----
PPWCS358	113	YGDLM	EV	NNMRAAGYLKVGLV	GLETA	AKK-----
PA	109	YGQ	AKA	MA	SI	ERAGITRLAVITAR-----
BB	113	YET	IAQV	MA	SARRSGMTRIGFIT	SPAPQGAPGEAGASAAPAAP-----
NG	117	YDY	VNKA	EAARQAGITKIGFV	TETKAQ-----	
XC-1	112	MRT	INE	TKIAQGGMLDVG	FVATKEKGQ-----	
XC-2	114	YEV	MAKV	AAAKNSQMKKIG	FMQ-----	
ECK-12	112	YET	LMKVM	DTLHQAGYLKIGLV	GEETAKAK-----	
CP	111	FRTYQ	NVKN	IEAAGFHEH	HVALQN-----	
VC-1	111	VQQ	L	VKLS	SFLQENGIQATQ	LLTEPSHS-----
VC-2	109	NGT	V	VKVM	DAAKGAGVKS	IAAAEKP-----
HP26695-1	109	YDK	V	YLL	KTKEAGFLK	VSLLTSP-----
HP26695-2	104	FET	F	S	IMDILKEHNHENFS	ISTQAQ-----
HP26695-3	103	LEN	F	KV	VDLQTN	NKQYLLVEDKKNQKN-----
HI	100	FQDF	V	T	TDMLSKNE	IKNVAIVSMKDKGKSAGKNSQESTPSQSVPTTP
AA	107	LEN	F	KV	FDL	NQYCFKNVNLIVKKE-----
consensus	121	ye	lmkvm	mr	agi	kvglv

Figura R.2.12. Alineamiento múltiple de ExbD de *P. putida* DOT-T1E con otras proteínas ExbD. El alineamiento y la secuencia consenso se generaron como se indicó en la **Figura R.2.10**. El porcentaje de identidad entre ExbD de DOT-T1E y las distintas proteínas alineadas, así como el número de acceso a la base de datos para cada secuencia se indican en la **Tabla R.2.2**. Abreviaturas: AA, *Aquifex aeolicus*; BB, *Bordetella pertussis*; CP, *Chlamydia pneumoniae*; ECK-12, *E. coli* K12; HI, *Haemophilus influenzae*; HP26695, *Helicobacter pylori* 26695; NG, *Neisseria gonorrhoeae*; PA, *P. aeruginosa*; PPDOT-T1E, *P. putida* DOT-T1E; PPWCS358, *P. putida* WCS358; VC, *Vibrio cholerae*; XC, *Xanthomonas campestris*.

Las secuencias mostraron un alto grado de conservación a nivel de aminoácidos. Las regiones más conservadas entre proteínas ExbD son la posible región transmembrana N-terminal (aproximadamente, residuos 17-40 de ExbD_{DOT-T1E}), y la región periplásmica C-terminal que se piensa que interacciona con TonB y ExbB. El Asp25 de ExbD de *E. coli*, que parece ser importante en el funcionamiento de la proteína (Braun *et al.*, 1996), está conservado entre todas las secuencias ExbD conocidas. La Leu132 de ExbD de *E. coli*, que también parece ser funcionalmente importante (Braun *et al.*, 1996), está sustituida conservativamente por valina, fenilalanina o isoleucina. En el caso de ExbB, la extensión del solapamiento es más variable, pero en el caso de ExbD la extensión del solapamiento es más homogénea y comprende unos 120 aminoácidos.

Como se muestra en la **Tabla R.2.2**, ExbD también presentó homología con la proteína de membrana TolR. En la **Figura R.2.13** se muestra un alineamiento entre proteínas ExbD de *P. putida* y otras bacterias gram-negativas con sus correspondientes proteínas TolR. Las zonas de similitud entre secuencias se restringieron fundamentalmente a la región donde el programa TmPred predijo la existencia de un segmento transmembrana en ExbD_{DOT-T1E} (posiciones 23 a 43) y, en menor grado, a la región C-terminal (**Fig. R.2.13**).

^b En el cómputo global del número de aminoácidos comprendidos en la región de solapamiento se incluyen los “huecos” que introduce el programa de similitudes ALIGN (Genestream Resource Center, ver *Materiales y Métodos*) para optimizar el alineamiento.

^c Porcentaje de residuos idénticos encontrados en la región de solapamiento.

^d Proteínas putativas deducidas por traducción de sus secuencias de ADN correspondientes.

La proteína ExbD de DOT-T1E es similar en tamaño a otras proteínas ExbD de otros microorganismos. Mientras que en *P. putida* se encontró una sola copia de *exbD*, en *Vibrio cholerae* (Occhino *et al.*, 1998; Heidelberg *et al.*, 2000), *Xylella fastidiosa* (Simpson *et al.*, 2000), *Ralstonia solanacearum* (Salanoubat *et al.*, 2001) y *Xanthomonas campestris* (Wiggerich *et al.*, 1997) se encontraron dos copias, y en *Campylobacter jejuni* (Parkhill *et al.*, 2000) y *Helicobacter pylori* (Tomb *et al.*, 1997; Alm *et al.*, 1999) se encontraron hasta tres copias del alelo *exbD*.

En la **Figura R.2.12** se muestra un alineamiento múltiple de ExbD con algunas de las proteínas listadas en la tabla anterior, seleccionadas según el mismo criterio que en el caso de ExbB.

```

PPDOT-T1E 1 -MGLHLNEGDDLAENHEINVTPLIDVMLVLLIIFMVAAPLAV-DIKVDLPASTAKP--
PPWCS358 1 -MGLHLNEGDDLAENHEINVTPLIDVMLVLLIIFMVAAPLAV-DIKVDLPASTAKP--
PA 1 ----MAFSTQDSDEVISEINVTPLIDVMLVLLIIFMVAAPLAV-DIKVDLPASTAKP--
BB 1 MAFGSFDNKGSGSHTMSEINVTPLIDVMLVLLIIFMVAAPLAV-DIKVDLPASTAKP--
NG 1 --MAFGSMNSDDSPMSDINVTPLIDVMLVLLIIFMVAAPLAV-DIKVDLPASTAKP--
XC-1 1 ----MAFSSGNSGGPMADINVTPLIDVMLVLLIIFMVAAPLAV-DIKVDLPASTAKP--
XC-2 1 ----MAFSTGGNRGPMADINVTPLIDVMLVLLIIFMVAAPLAV-DIKVDLPASTAKP--
ECK-12 1 -MAMHLNENLDDNGEMHDINVTPLIDVMLVLLIIFMVAAPLAV-DIKVDLPASTAKP--
CP 1 ----MKYRFTEEIEEPLVNIITPLIDVMLVLLIIFMVAAPLAV-DIKVDLPASTAKP--
VC-1 1 ----MIKSSAKHNDGFLTPDITPLIDVMLVLLIIFMVAAPLAV-DIKVDLPASTAKP--
VC-2 1 ----MRLGRRTSKQEEAQIDLTSMIDVIFMVAAPLAV-DIKVDLPASTAKP--
HP26695-1 1 -----MNYDNYWDEDKPELNIITPLIDVMLVLLIIFMVAAPLAV-DIKVDLPASTAKP--
HP26695-2 1 -----MKSIRRGDGLNVVPEIDVMLVLLIIFMVAAPLAV-DIKVDLPASTAKP--
HP26695-3 1 -----MKKVESMNVVPEIDVMLVLLIIFMVAAPLAV-DIKVDLPASTAKP--
HI 1 -----MKKFDEINTIPEIDVMLVLLIIFMVAAPLAV-DIKVDLPASTAKP--
AA 1 ----MIIVRSMEEEKETSSMNVIPIDVMLVLLIIFMVAAPLAV-DIKVDLPASTAKP--
consensus 1 1 einvtpliDvmlvlliiifmvtapl1t i v lp
    
```

```

PPDOT-T1E 57 --APRPEKPVFVSVKADQKLYVGDQ--VAAPDQLGPMIDAKTKGDKETTIFQADKGVD
PPWCS358 57 --APRPEKPVFVSVKADQKLYVGDQ--VPAPAQLGAMIDAKTKGDKETTIFQADKGVD
PA 54 --PPEQKDPVVSIDFAGKLFVNKD---EQPELLESNLAATAKADAEVVRVQIQADEGVN
BB 58 --IEEEPKTVDIADANGALFWDEK---PVSIDDLPNRFKAIAGDKPQAEIRIRADQATR
NG 58 -QDKQPKDPIRITIDANGGYYVGGDSASKVEIGEVESRLKAAKEQENVIIVATAADKAVE
XC-1 56 -DAEKRAAPITAVKEIGSYWNE---PISKEALESRLSTAAQQTPOPPINIRGDRITTK
XC-2 56 -QTTEPPPPPEIRIDASNQVFNNSP-TPVAQLQKMEVVQADPTNQPELRIDANEDAE
ECK-12 57 --QPRPEKPVYLSVKAANSMEIGND---PVTDETMITALNALTEGKETTIFFRADKTVD
CP 57 ---SENDSIAVIRKVFACHSITLNEH---PITLQELTVRITLLHKAYPEKTPLILQDGETS
VC-1 56 ---EVNKESTVNIILATEPYWAIIDGK--PYLDWHNFSLALLESVQVDRPVVIAADQGAE
VC-2 56 ----QKQAGFVAITAANDIYIDKR---QVDVBRVQATLEHLLLDQPIASVVIQADEHAF
HP26695-1 54 ---ATQDKMEIRMDKAKTYTDSQT--YEYNSFPDTFNLLSKKYDKTRASTRADKRLT
HP26695-2 52 --QPNDQKVVSVDYDEHDNIEVDK-----PMNLEALSAVVKQTDPKTLIDIKSDKSSR
HP26695-3 49 SKDVLDDKKQVTAISNKGsfyfdk---EISFENLKHKYSTLA---KQTPVVIQGDKSN
HI 49 K---SDELAKLIVTADKQLYFNDR---PITQALEAEIAQWN---KQKQVTKIDAEAS
AA 55 --AVQPQESVVIITKEGKLYIKSR---EVSYPELKEFLKTLN---RQTPVEINADKNAK
consensus 61 v vsi ad lyv d i d l l e i l adk
    
```


Tabla R.2.2.(continuación)

Proteína y especie bacteriana	Longitud (aa) ^a	Extensión del solapamiento ^b	% identidad ^c	Nº acceso
ExbD <i>Haemophilus influenzae</i>	147	128	27,3	P43009
ExbD <i>Haemophilus ducreyi</i>	129	128	26,6	O51809
ExbD2 <i>Helicobacter pylori</i> ^d	133	109	25,7	O25987
ExbD2 <i>Helicobacter pylori</i> J99 ^d	133	109	25,7	O25987
ExbD <i>Chlamydia pneumoniae</i>	135	121	25,6	Q9Z7C2
ExbD <i>Synechocystis</i> PCC6803 ^d	269	121	25,6	P72942
ExbD <i>Chlamydia trachomatis</i>	135	121	20,7	O84602
ExbD <i>Plesiomonas shigelloides</i>	143	111	19,8	Q93SS4
ExbD1 <i>Vibrio cholerae</i>	138	111	17,1	O52044
ExbD <i>Photobacterium damsela</i>	141	104	15,4	CAD27899
ExbD <i>Pasteurella multocida</i> Pm25	(109)	112	14,3	Q9ZH80
TolR <i>Brucella melitensis</i>	150	121	47,9	Q93TG6
TolR <i>Xylella fastidiosa</i>	144	122	42,6	Q9PC82
TolR <i>Pseudomonas putida</i> KT2440	150	134	42,5	CAB50779
TolR <i>Pseudomonas putida</i> DOT-T1E	150	134	42,5	Este trabajo
TolR <i>Sinorhizobium meliloti</i> ^d	150	125	42,4	Q92M97
TolR <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	146	130	41,5	P50599
TolR <i>Agrobacterium tumefaciens</i> C58	152	118	41,5	Q8U9L2
TolR <i>Xanthomonas campestris</i>	149	122	41,0	AAM42291
TolR <i>Xanthomonas axonopodis</i>	149	122	41,0	AAM37988
TolR <i>Rickettsia montanensis</i>	143	118	37,3	Q9AKM1
TolR <i>Rickettsia rickettsii</i>	143	118	36,4	Q9AKG5
TolR <i>Rickettsia typhi</i>	143	118	36,4	Q9AKC0
TolR <i>Rickettsia conorii</i>	143	118	36,4	Q92IJ7
TolR <i>Yersinia pestis</i>	142	124	33,9	Q8ZGZ3
TolR <i>Rickettsia prowazekii</i>	143	118	33,9	Q9ZDL7
TolR <i>Escherichia coli</i> K-12	142	124	33,1	P05829
TolR <i>Vibrio cholerae</i>	146	129	32,6	Q9KR09
TolR <i>Ralstonia solanacearum</i> ^d	144	126	32,5	Q8Y1F7
TolR <i>Erwinia chrysanthemi</i>	141	124	32,3	Q937K5
TolR <i>Vibrio cholerae</i>	457	39	30,8	Q9ZHW1

^a Extensión en aminoácidos de la proteína. Los números entre paréntesis indican que la secuencia disponible en la base de datos está incompleta.

Tabla R.2.2. Proteínas homólogas a ExbD de *P. putida* DOT-T1E.

Proteína y especie bacteriana	Longitud (aa) ^a	Extensión del solapamiento ^b	% identidad ^c	Nº acceso
ExbD <i>Pseudomonas putida</i> KT2440	142	142	100	TIGR (com.personal)
ExbD <i>Pseudomonas putida</i> WCS358	142	142	97,9	Q05606
ExbD <i>Brucella melitensis</i>	174	131	69,5	Q9AMF0
ExbD <i>Bradyrhizobium japonicum</i>	148	127	68,5	Q93SH0
ExbD <i>Agrobacterium tumefaciens</i> C58	167	132	68,2	Q8UIX9
ExbD <i>Yersinia pestis</i>	143	140	67,1	Q8ZI33
ExbD <i>Mesorhizobium loti</i>	155	130	66,9	Q98EN4
ExbD <i>Escherichia coli</i> K-12	141	142	64,8	P18784
ExbD <i>Salmonella typhimurium</i>	141	142	64,8	Q8XGU8
ExbD <i>Sinorhizobium meliloti</i>	141	142	57,7	Q92Q40
ExbD <i>Brucella melitensis</i> 16M	150	121	47,9	Q8YIV3
ExbD1 <i>Campylobacter jejuni</i>	136	120	44,2	Q9PIU9
ExbD <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	133	118	39,0	Q9RMT1
ExbD <i>Bordetella bronchiseptica</i>	155	119	34,5	Q9ZG16
ExbD <i>Helicobacter pylori</i> 26695	129	110	33,6	O25898
ExbD <i>Helicobacter pylori</i> J99	129	110	33,6	Q9ZJP5
ExbD <i>Neisseria meningitidis</i> (serogrupos A, B y C)	144	146	33,6	P95376
ExbD <i>Neisseria gonorrhoeae</i>	144	136	33,1	O06434
ExbD2 <i>Ralstonia solanacearum</i> ^d	143	121	33,1	Q8XWE6
ExbD1 <i>Xanthomonas campestris</i>	140	118	33,0	Z95386
ExbD1 <i>Ralstonia solanacearum</i> ^d	137	118	32,2	Q8XXZ8
ExbD1 <i>Helicobacter pylori</i> 26695 ^d	133	119	31,9	O25754
ExbD1 <i>Helicobacter pylori</i> J99 ^d	133	119	31,9	Q9ZK84
ExbD1 <i>Xanthomonas campestris</i>	140	129	31,8	O34259
ExbD3 <i>Campylobacter jejuni</i> ^d	129	121	31,4	Q9PJ16
ExbD1 <i>Xanthomonas axonopodis</i>	140	136	30,1	AAM34902
ExbD2 <i>Xanthomonas axonopodis</i>	137	123	30,1	AAM34903
ExbD1 <i>Xylella fastidiosa</i>	140	129	29,5	Q9PHD3
ExbD2 <i>Xanthomonas campestris</i>	136	131	29,0	O34258
ExbD <i>Aquifex aeolicus</i>	132	122	28,7	O67694
ExbD <i>Pasteurella haemolytica</i>	145	120	28,3	P72203
ExbD2 <i>Campylobacter jejuni</i> ^d	129	116	27,6	Q9PM46

(Continúa en la página siguiente)

ExbD-PPDOT-T1E	1	MGLH	NEGGDDLAENHE	INVT	PFIDVMLVLL	I	FMVAAP	ATVD	-	IKVDLPAS	TAKPAPR							
ExbD-ECK-12	1	MAMH	NENLDDNGEMH	INVT	PFIDVMLVLL	I	FMVAAP	ATVD	-	VKVNLPAS	ISTPQPR							
ExbD-PA	1	---	MAFSTQDSDEV	SEINVT	PLVDVMLVLL	V	FIVTAP	ITNS	-	IPINLPK	ESVAPPE							
ExbD-HI	1	-----	MKKFDEIN	PFID	IMLVLL	T	VLLITASF	ISQGKI	QVNV	PKAST	AVAFK							
TolR-PPDOT-T1E	1	---	MARVRHRRKRP	VAEMNV	VPYIDV	MLVLL	I	FMVTAP	MINQ	G	VKVDLPKVSSEALPQ							
TolR-PA	1	---	MARVRHRRKRP	VAEMNV	VPYIDV	MLVLL	I	FMVTAP	MINQ	G	VKVDLPKVSSEALPQ							
TolR-ECK-12	1	--	MARARGRRDLK	SEINVT	PLVDV	MLVLL	I	FMATAP	ITQS	-	VEVDLPDAESQAVS							
TolR-HI	1	---	MARRQRKA	IKSEIN	VPFLD	VLLVLL	I	FMATAP	ITQS	-	VQVELEDSVQSQEV							
consensus	1	1		m	eiNvvPfiDvmLVLliifmvtAplltq						vkvdLPksts p							
ExbD-PPDOT-T1E	60	PEK	--	PVFLSVKADQ	KLYG	GD	Q	-----	VAAP	Q	LGPM	DAKTK	D	----	KETT			
ExbD-ECK-12	60	PEK	--	PVYLSVKAD	NSM	IGN	-----	PV	DET	V	ITAN	ALTE	CK	----	KDIT			
ExbD-PA	57	QK	--	PLVVS	LD	AGKL	VN	-----	E	QPEL	ESN	AAAK	KD	----	AVRV			
ExbD-HI	50	SDE	-	LAKL	IVTAD	KQLY	F	NDR	-----	PITQ	E	EA	IAQWN	KDQK	VTLKIDAEASFQD			
TolR-PPDOT-T1E	56	DNNVQI	T	S	KADKTY	YWN	G	SEVD	TDKQ	MDK	AM	LPA	TDA	TKII	A	GRDQGKQ		
TolR-PA	56	DNNKQV	T	S	KADKGS	YYWN	G	SEVD	TEKQ	TDS	AV	SLE	Q	TDA	TKIMS	R		
TolR-ECK-12	58	SN	NPPV	VEV	S	IGQY	T	V	-----	KDR	LER	PPE	Q	VAE	SSRF	KAN		
TolR-HI	55	NE	KVPV	LEV	A	IGKYA	S	G	-----	GERQ	E	HE	M	TQ	LSRQ	EFDKD		
consensus	61	ed		pvv	lsvk	adg	yvn	d			avt	e	l	l	g	et	i	
ExbD-PPDOT-T1E	104	FFQADK	CV	DYGD	IMEV	MNNM	F	AAGYL	KVGL	V	G	L	E	T	A	A	K	
ExbD-ECK-12	103	FFRADK	T	V	YET	L	M	K	V	M	D	T	L	H	Q	A	G	Y
ExbD-PA	100	QIQADE	C	V	NYG	Q	V	A	K	A	M	A	S	T	E	R	A	G
ExbD-HI	103	FVTITD	M	S	K	N	E	I	K	N	V	A	I	V	S	M	K	D
TolR-PPDOT-T1E	116	FIRGDK	A	V	D	Y	G	A	V	G	A	M	G	G	L	O	K	A
TolR-PA	112	FIRGDK	A	V	N	Y	G	A	V	G	A	M	G	A	L	Q	A	G
TolR-ECK-12	108	LGGAKD	V	P	Y	D	E	T	I	K	A	N	L	L	S	A	G	K
TolR-HI	105	LGGAKE	V	P	Y	E	E	V	I	K	A	N	L	L	L	A	G	I
consensus	121	fl		g	d	k	g	v	y	g	d	v	m	k	a	m	l	r

Figura R.2.13. Alineamiento múltiple de proteínas ExbD con proteínas TolR de distintas bacterias gram-negativas. La nomenclatura y el método seguido para generar el alineamiento, así como la secuencia consenso son los mismos que se indicaron en la **Figura R.2.10**, excepto que no se han considerado aquellos aminoácidos que aparecían conservados en uno sólo de los dos grupos en que se han dividido las proteínas (ExbD o TolR). El porcentaje de identidad entre ExbD de DOT-T1E y las distintas proteínas TolR alineadas se indica en la **Tabla R.2.2**. Abreviaturas: ECK-12, *E. coli* K12; HI, *Haemophilus influenzae*; PA, *P. aeruginosa*; PPDOT-T1E, *P. putida* DOT-T1E.

4.3. Comparación de TonB de *P. putida* DOT-T1E con las secuencias de las bases de datos.

Al comparar TonB de *P. putida* DOT-T1E con las secuencias de las bases de datos (mayo 2002), aquellas secuencias que mostraron la identidad más extensa (entre el 93,8 % y el 100%) fueron las proteínas TonB de las cepas de *P. putida* KT2440 (The Institute for Genomic Research, comunicación personal) y WCS358 (Bitter *et al.*, 1993), respectivamente. TonB de DOT-T1E mostró similitud, aunque a niveles mucho más bajos (de 41,2 a 22,2 %), con las proteínas TonB de otras bacterias gram-negativas tales como: *Escherichia coli*, *Xanthomonas campestris*, *Pseudomonas aeruginosa*, etc. (ver **Tabla R.2.3**).

Tabla R.2.3. Proteínas homólogas a TonB de *P. putida* DOT-T1E.

Proteína y especie bacteriana	Longitud (aa) ^a	Extensión del solapamiento ^b	% identidad ^c	Nº acceso
TonB <i>Pseudomonas putida</i> KT2440	243	243	100	TIGR (comun.personal)
TonB <i>Pseudomonas putida</i> WCS358	243	243	93,8	Q05613
TonB <i>Neisseria meningitidis</i> (serogrupo A)	280	97	41,2	P57003
TonB <i>Neisseria meningitidis</i> (serogrupo B)	280	97	41,2	P57004
TonB <i>Mesorhizobium loti</i>	256	219	39,3	Q98EN6
TonB <i>Neisseria gonorrhoeae</i>	283	89	39,3	O06432
TonB2 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	270	224	36,6	Q9RMT3
TonB <i>Erwinia chrysanthemi</i>	252	190	34,7	Q9REB0
TonB <i>Brucella melitensis</i>	271	194	33,5	Q9AME9
TonB <i>Serratia marcescens</i>	247	219	32,9	P26185
TonB <i>Xanthomonas campestris</i>	223	154	32,5	O34261
TonB1 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	342	236	32,2	Q51368
TonB <i>Pasteurella haemolytica</i>	246	56	32,1	P72204
TonB <i>Salmonella typhi</i>	(237)	212	32,1	Q9AIL5
TonB <i>Brucella melitensis</i> 16M	115	98	31,6	Q8YIS9
TonB <i>Ralstonia solanacearum</i> ^d	221	203	31,5	Q8XY00
TonB <i>Xylella fastidiosa</i>	221	233	31,3	Q9PHD5
TonB <i>Enterobacter aerogenes</i>	243	212	31,1	P46383
TonB <i>Vibrio cholerae</i>	244	187	31,0	O52042
TonB <i>Klebsiella pneumoniae</i>	243	211	30,8	P45610
TonB <i>Yersinia enterocolitica</i>	255	219	30,6	Q05740
TonB <i>Bordetella bronchiseptica</i>	268	236	30,5	Q9ZG18
TonB <i>Haemophilus influenzae</i>	270	203	30,5	P42872
TonB <i>Salmonella typhimurium</i>	242	212	30,2	P25945
TonB <i>Bradyrhizobium japonicum</i>	276	263	30,0	Q93SG9
TonB <i>Agrobacterium tumefaciens</i> C58	307	200	30,0	Q8UIX8
TonB1 <i>Helicobacter pylori</i> J99 ^d	317	127	29,9	Q9ZLP9
TonB <i>Escherichia coli</i> K-12	239	206	29,6	P02929
TonB <i>Pasteurella multocida</i>	256	202	29,2	Q9ZH79
TonB <i>Bordetella pertussis</i>	266	234	29,1	Q9S3M6
TonB <i>Helicobacter pylori</i> 26695	285	193	29	O25899

(Continúa en la página siguiente)

Tabla R.2.3.(continuación)

Proteína y especie bacteriana	Longitud (aa) ^a	Extensión del solapamiento ^b	% identidad ^c	Nº acceso
TonB <i>Campylobacter coli</i>	232	189	28,3	O07650
TonB <i>Yersinia pestis</i>	252	218	27,5	Q8ZEH7
TonB <i>Rhizobium leguminosarum</i>	454	203	27,1	Q9AE36
TonB <i>Helicobacter pylori</i> J99	280	193	26,9	Q9ZJP4
TonB1 <i>Campylobacter jejuni</i> ^d	248	164	26,8	Q9PIU8
TonB1 <i>Vibrio parahaemolyticus</i> ^d	247	173	26,0	Q9XCY6
TonB <i>Plesiomonas shigelloides</i>	288	215	25,1	Q93SS6
TonB <i>Haemophilus ducreyi</i>	279	194	24,7	O51810
TonB <i>Neisseria meningitidis</i> (serogrupo C)	278	100	24,0	P95374
TonB <i>Photobacterium damsela</i>	252	217	23,5	CAD27897
TonB2 <i>Vibrio cholerae</i>	206	117	23,1	Q9ZHV8
TonB2 <i>Campylobacter jejuni</i> ^d	227	180	22,2	Q9PM45

^a Extensión en aminoácidos de la proteína. Los números entre paréntesis indican que la secuencia disponible en la base de datos está incompleta.

^b En el cómputo global del número de aminoácidos comprendidos en la región de solapamiento se incluyen los “huecos” que introduce el programa de similitudes ALIGN (Genestream Resource Center, ver *Materiales y Métodos*) para optimizar el alineamiento.

^c Porcentaje de residuos idénticos encontrados en la región de solapamiento.

^d Proteínas putativas deducidas por traducción de sus secuencias de ADN correspondientes.

La **Figura R.2.14** muestra un alineamiento múltiple de TonB con algunas de las proteínas listadas en la **Tabla R.2.3**. A nivel de estructura primaria, las secuencias no mostraron un alto grado de conservación, a diferencia de los observado con las proteínas ExbB y ExbD.

PPDOT-T1E	1	-----
PPWCS358	1	-----
PA-2	1	-----
PA-1	1	MSPQPSRSPDRFSLAALAEDHPTAPAQGDSESLPCVNAQRGEPNLRVVD CSGARRDEEV
SM	1	-----
HPJ99-2	1	-----
HPJ99-1	1	-----
KP	1	-----
ECK-12	1	-----
YE	1	-----
HI	1	-----
BB	1	-----
NG	1	-----
CC	1	-----
XC	1	-----
consensus	1	-----


```

PPDOT-T1E      1  -----MMKTRSNMARYGGSLA V L C V H V V A L L T L N W S P Q A I E P P A -
PPWCS358      1  -----MTKTRHNLARYSGSLA V L C V H A V A L L T L N W S P Q A I E P P A -
PA-2          1  -MATPQPVDARTQPWRETPGGDLVALGRPVRQALHLVPHNPAQGRVLSRRETILLVLFAL
PA-1          61  AVEEVLIPIYAHGSDPEDVPGPEPKSFWLLSSGAAVAMHVAITCALVVMPTPAELNLGHG
SM            1  -----MPLKKMFLNR I S V P F V L S V C I H S A L V A G I L Y A S K E V V E P K P E
HPJ99-2       1  -----MKISPSPRKLSKVSTSVSFL S F A Y A I G F C Y F L L R E D A P E P L A Q A G -
HPJ99-1       1  -----MPENSKLQPAKLGKNFDPVD S N R N F F F S I S V L H W L T Y L F E H R E D F F P S K P
KP            1  -----MTLDLPRFPWPTL S V C I H G A V V A G I L Y T S V H Q V I E Q P S P -
ECK-12        1  -----MIMTSMTLDLPRFPWPTL S V C I H G A V V A G I L Y T S V H Q V I E P A P -
YE            1  -----MQLNKFFLGRWLTWPLAFS V C I H G S V T A A I L V S V E Q M R I Q P E I E
HI            1  -----MQQTK S L L G L L S L I A H G I V I C F L L W N W N E P S D S A N S A Q
BB            1  -----MPSPQSGRSFSSHTSLALRAGAGFTV A H A A V I C A V F L S K T E R P E L E P E A
NG            1  -----MDKERILTPAVVFSVALLHLA I V A L W Q A H K L P V I E S G N V I E F D L G -
CC            1  -----MKT F I S N H K N Q S S F I T L F V F T P F F V F L Y S K D L H Q P N E T K E N -
XC            1  ----MTEQLVIHRHDYDAGNQGLSWARIIGIAFV A H I L T A M M I L I P A V A P K A P A E K E -
consensus    61  r i l g v h i v g l l w v l
    
```

```

PPDOT-T1E      44  ----A M V E L A P L P E P A P P P ----- P P K A A P Q P P A P V E E P P L P -----
PPWCS358      44  ----A M V E L A P L P E P A P P P ----- P P K A A P Q P P A P V E E L P L P -----
PA-2          60  -TLHGAVIHWLSQORTPALPEVPPQVPPMTIEFTAPAPPVVEPPPPPEP-----LP
PA-1          121 -ELPKT M Q N F V Q L E K K A E P T P Q ----- P P A A A P E P T P P K I E E P K P E P ----- P K P K
SM            46  -DA--P L S V M M V N T A A M A E P P ----- P P A P A E P E P P Q V E P E P E P E ----- P E
HPJ99-2       48  ---TTK V T M S L A S I N T N S N T K T N ----- A E S A K P K E E P K E K P K K E E P K K E E P - K K E T K
HPJ99-1       56  KLVKLNPNENLVLKRGHSQDPSKNNPGAPKPTLAGPQKPPTPPTPPTPP-----TPPK
KP            42  -TQ--P E I T M V A P A D L E P P ----- P A Q P V V E P V V E P E P E P E P E ----- V V P E
ECK-12        47  -AQ--P L S V T M V T P A D L E P P Q ----- A V Q P P P E P V V E P E P E P E P ----- I P E
YE            46  -DA--P L A V T M V N I D T F A A P Q ----- P A A A E P Q A E P E P E P E P E P I D E --- A P P E
HI            41  GDISTS S M E L L Q G M V L E E P A P E P E D V Q K E P E P E P E P G N V Q K E P E P E K Q E I V E D P T I K P E
BB            53  -VMVSI E A P L P Q L A Q A E P T P E P P T P V E E T P P E P E P E P V I E P E P E P E P V V E P - E P E P E
NG            48  -DFGGGGGAPGAGAPAAPEPQ-----P A P D P P K P V E P P K P V L K P A V T K K A D A D I Q Q
CC            46  ----K F N A I K H F V Q N S S D ----- M K P T Q P T Q T I Q E P S N V P ----- K E
XC            56  ----R T T M V T L V D A P P P P ----- P P P P P P P P E D K P -----
consensus    121  m v l v p p p p e p e p e p p
    
```

```

PPDOT-T1E      78  K A E A P K P K I A I P K ----- P P K P K A K P Q P P K P E K K P E P P K E A P P T E Q T V D A P P S N T
PPWCS358      78  K V E A P K P K I A I A K ----- P P K P K A K P Q P P K P E K K P E P P K E A P P T E E V D A P P S N T
PA-2          109 P V E E P P P P V D E N ----- A V K P P P P K P V P K P K P K P Q P R P P A P K A V E P A P P A P P Q P
PA-1          167 P V E K P K P K P K P K P V E N A I P K A K P K P E P K P K P E P E P S T E A S S Q P S P S S A A P P P A P T V G Q
SM            85  P V E P P P K A I V K P E ----- P V K P K P K P K P K V E K Q V K P E - - P K K V E P R E P S P F N N
HPJ99-2       97  P K P K P K P K P K P ----- K P K P K P E P K P K P E P K V E E P K E E P K E E P K K E E A K E E A
HPJ99-1       109 P V E K P K P E P K P K P K ----- P E P K P N H K H K A L K K V E K V E E K K V V E E K K E E K K V V E Q
KP            82  P P K E A V V I H K P E P ----- K P K P K P K P K P K P E K K V E Q P K R E V K P A A E P R P A S P F E N
ECK-12        86  P P K E A P V V I E ----- K P K P K P K P K P V K K V Q E Q P R D V K P V E S R P A S P F E N
YE            91  P E V L P E P V P V P I P E ----- P V K P K P K P V K K E V K K P E V K K P D V K K T V A P P D D K P F K S
HI            101 P K I K E P E K E K P K P ----- K G K P K G K P K N K P K K E V K P Q K P I N K E L P K G D E N I D S S
BB            111 P V E K P P E P A P K P ----- K P K P K P K P K P Q P K P E A P P E P - K K I E T P P T G A P Q G A
NG            99  P K E K P K P E E K P K P ----- E P E P E A K P A P K P A E K P A E K P S E K P A E H S G N A S A K A G S
CC            81  P Q E I K K I K P R K E K ----- L I A K P K K I I P P A N A K A I S Q P K D T N M Q Q P I M Q Q O T P Q A
XC            83  --P P P V K N L S ----- P P K P S P V P P P P E A P V V D V P E P R P S D I V T P P S P P A P P A
consensus    181  p l e p p k p p k p k p k p k p k k k p
    
```

```

PPDOT-T1E      129 P-----P Q K S - A A P A P S I A S -----
PPWCS358      129 P-----P Q K S - A A P A P S I A S -----
PA-2          163 -----A A P P A P P A P A A A P A P -----
PA-1          227 S-----T P G A Q T A P S G S Q G P -----
SM            134 D S -----P A K P I D K A P V K Q A P A -----
HPJ99-2       147 K E K S V P K Q V T T K D I V K E K D Q E S N K T S E A T S E A Q A -----
HPJ99-1       160 K V E Q K K I E E K K P V K K E F D P N Q L S F L P K E V A P P R Q E N N K G L D N Q T R R D I D E L Y G E E F G D L G
KP            132 N N -----T A P A R T A P S T S T A A -----
ECK-12        133 -----T A P A R L T S S T A T A A -----
YE            142 D E -----P A L V S T N A P V K S A P K -----
HI            151 A N V N -----D K A S T T S A A N S N A Q V A G S G -----
BB            160 Q Q -----V T Q A P R Q A P P P D E P I -----
NG            149 E Q G N G E G K G T G T K G D G T G R G E G S G K G S G G A K G E H G E G ----- A G G S G
CC            133 S-----S Y Q S -----
XC            128 P-----P S D I G A S -----
consensus    241  a p
    
```


PPDOT-T1E	143	-NSNALP	WQS-DLLRHLAKYKRYPEDARRRG	LCGMNR	RFVVDAEGKVVSYSMAGGSGS				
PPWCS358	143	-NSNALP	WQS-DPVRHLAKYKRYPEDARRRG	LCGINR	RFVVDAEGKVVSYAMAGGSGS				
PA-2	178	-LTPPSANAG	-----YLHNPAPEYPALAMRRGWEGTVL	RVHVLASGSPSE	QVQKSSGR				
PA-1	242	-AGLPSG	SLNDSDIKPLRMDPPVYPRMAQARRTEGRV	KVLF	TTSQGR	DDIQVLESVPS			
SM	151	-APVQGN	SREV-GPRPISRANPLYPPRAQA	QTEGNV	RVQFD	DSQGRVSNVRI	LSAEPR		
HPJ99-2	184	-YNPGVSN	EFMKIQTAISSKNRYPKMAQIRG	IEGEV	IVSFT	INAGSV	TDIKVVKSN	TT	
HPJ99-1	220	TAEKDFIR	NNLRDIGRITQKYLEYPQVAAY	GQDGT	NAVEFY	HPNGD	TDIK	ITIGSEY	
KP	148	-AKPTVTAPS	--GPRAISRVQPSYPARAQA	RIEGTV	RVKFDV	SPQGR	DNQ	LSAQPA	
ECK-12	147	-TSKPVT	SVAS-GPRALSRNQPOYPARAQA	RIEGQV	KVKFDV	TPQGR	VDNQ	LSAKPA	
YE	159	-ASVPGV	STST-GPKALSKAKETYPARALA	GV	EGQVKVQ	DI	DENGR	VTRILEATPR	
HI	174	-TDTSEIA	AAYRSAIRREIESHKRYPTRAKI	MRKQ	GKVS	SFNVGA	GS	SGAKVTKSSGD	
BB	177	-MVSSVEYQ	-----ARPMFVYPMASKR	REEGR	VVLVE	STQGL	VDRAS	DTSSGF	
NG	191	GGTGVS	SKGNPLRANGSI	PRPAYPAL	SMENDE	GMVV	SVLV	SPGGVES	KVKSSGF
CC	138	-VALTSN	SEFLKEIKSAIDEALYPRQARK	MRMS	SGEVL	VEFTW	TKEK	ENK	KPKSKY
XC	136	-VDISSKNMN	-----PPKYPPAAFRAGV	QGEVI	IVDV	DANG	NVTN	SVEKSSRN	
consensus	301	t		p YP	a l leG	v v f v	egkv	i ml	s
PPDOT-T1E	201	AALDRAT	EMTRRAGTVP-KPPPELLNNGT	TEVVAP	FVYSLDRR				
PPWCS358	201	AALDRAT	EMTRRAGTVP-KPPPELLNNGT	TEVVAP	FVYSLDRR				
PA-2	232	EALDQAA	KAVKRWSEVP-AKRGDKAEDGW	SPID	FKLN----				
PA-1	301	RMFDR	EVROAMAKWREPRVSGGKIVARQAT	KMFF	FKIEKRR--				
SM	209	NMFR	EVKQAMRKWREYA-KEAKDRTVT	RFK	INGTTELN----				
HPJ99-2	243	DILN	HAAEATKSAAHLPKPDET	VHLK	PTAYSLKED-----				
HPJ99-1	280	KMLD	DNTKTIQIAYKDYPRPKTKTLIR	RV	FYYLGGN-----				
KP	205	NMFR	EVKSAMRRWRVQGRPGT	VTMT	KFR	INGVEIN-----			
ECK-12	205	NMFR	EVKNAMRRWRVPGKPGSGIVVN	LFK	INGTTEIQ----				
YE	217	NMFR	EVKQVMRKWREYA-VAADYVTT	VFK	IGGTTEMD----				
HI	233	ESLD	KAA	DATNVSE	SVG-TRPAGFPSS	SVQ	SFTLQ-----		
BB	229	SRLDE	SA	AAARKARE	KP-LTRNGVAYPAKAK	PFDF	VMRN---		
NG	251	SRLD	NAARKAAQNGHEQA-NAWTE	FKVP	KFEIN-----				
CC	197	DFLN	RSATETIRIASKKFPQYEKTFHIK	PI	VYKLS-----				
XC	185	RDLDR	AAMDAAARKWENA-STVNGQKAAGR	VR	VPVNFALN----				
consensus	361	ldr	l airr	rf		i	ikv		

Figura R.2.14. Alineamiento múltiple de TonB de *P. putida* DOT-T1E con otras proteínas TonB. El alineamiento y la secuencia consenso se generaron como se indicó en la **Figura R.2.10**. El porcentaje de identidad entre TonB de DOT-T1E y las distintas proteínas alineadas, así como el número de acceso a la base de datos para cada secuencia se indican en la **Tabla R.2.3**. Abreviaturas: BB, *Bordetella pertussis*; CC, *Campylobacter coli*; ECK-12, *E. coli* K12; HI, *Haemophilus influenzae*; HPJ99, *Helicobacter pylori* J99; KP, *Klebsiella pneumoniae*; NG, *Neisseria gonorrhoeae*; PA, *P. aeruginosa*; PPDOT-T1E, *P. putida* DOT-T1E; PPWCS358, *P. putida* WCS358; SM, *Serratia marcescens*; VC, *Vibrio cholerae*; XC, *Xanthomonas campestris*; YE, *Yersinia enterocolitica*.

La proteína TonB tiene una región central que es rica en prolina (el 17% de los residuos de TonB son prolinas) localizada entre las posiciones 70 y 102 en la secuencia de *E. coli* (Larsen *et al.*, 1993) que, aunque aparece conservada en casi todas las secuencias del alineamiento, se ha demostrado que no es esencial, siendo su función la de extender TonB a través del espacio periplásmico hacia la membrana externa (Larsen *et al.*, 1993). Parece ser que el motivo PXYP (donde X es A-127; Q-168 y G-233; e Y es S-128; Y-169 y K-234, en TonB_{*Escherichia coli*}) interacciona con las cajas TonB de los receptores dependientes de TonB presentes en la membrana externa y está conservado en la mayoría de las proteínas TonB (Heller *et al.*, 1988; Bell *et al.*, 1990; Schöffner y Braun, 1989; Tuckman y Osborne, 1992).

5. ORGANIZACIÓN DE LOS GENES *exbB*, *exbD* Y *tonB* EN *P. putida* DOT-T1E.

El resultado de hibridar el ADN genómico de *P. putida* DOT-T1E con sondas específicas para cada uno de los genes *exbB*, *exbD* y *tonB* confirmó la existencia de una sola copia del cluster de genes en esta cepa (ver **Figura R.2.15**).

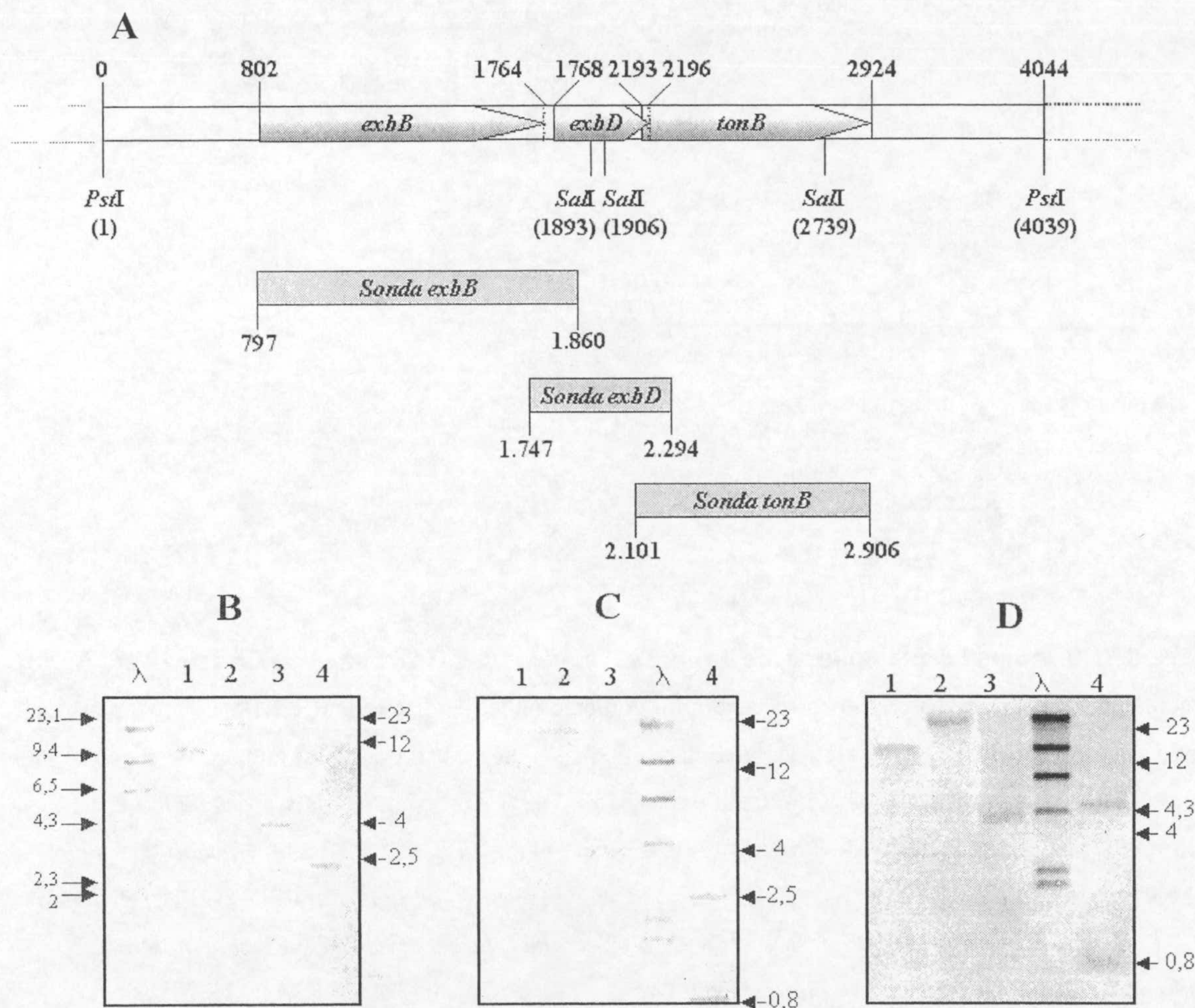


Figura R.2.15. Determinación del número de copias de los genes *exbB*, *exbD* y *tonB* de *P. putida* DOT-T1E por hibridación de ADN. (A) Esquema de la región de ADN de DOT-T1E que contiene los genes *exbB*, *exbD* y *tonB*, que incluye los sitios de restricción más relevantes en las hibridaciones. También se muestra la localización de los fragmentos correspondientes a las respectivas sondas empleadas (simbolizadas como rectángulos). (Paneles B, C y D) Patrones de bandas de *P. putida* DOT-T1E homologas a la región de ADN que contiene *exbB* (B), *exbD* (C) ó *tonB* (D). Diez microgramos de ADN de *P. putida* DOT-T1E se digirieron alternativamente y por triplicado con *Bam*HI (calle 1), *Hin*dIII (calle 2), *Pst*I (calle 3), o *Sa*I (calle 4), se separaron electroforéticamente en gel de agarosa (0,8%, p/v) y se transfirieron a una membrana de nailon, tal y como se describe en el apartado 13.4 de la sección *Materiales y Métodos*. Las sondas empleadas para las respectivas hibridaciones aparecen descritas en el texto y se marcaron con dUTP-digoxigenina. En el margen izquierdo del panel B se indican los tamaños correspondientes al marcador de peso molecular λ /*Hin*dIII (λ_H). Los números a la derecha de los paneles indican los tamaños de los fragmentos de ADN que hibridaron con cada una de las sondas empleadas.

La región silvestre de DOT-T1E con el clúster de genes *exbBDtonB* está contenido en un fragmento *Pst*I de aproximadamente 4 kb. En la **Figura R.2.15A** se muestra un esquema de esta región. Para la identificación de los genes *exbB*, *exbD* y *tonB* se utilizaron sondas obtenidas con los oligos que aparecen en la **Tabla R.2.4**. En dicha tabla se recoge la información sobre el tamaño y la localización de las sondas.

Tabla R.2.4. Oligonucleótidos empleados en la obtención de sondas específicas para los genes *exbB*, *exbD* y *tonB* de *P. putida* DOT-T1E.

Oligo	Secuencia (5'→ 3')	Localización ^a
ExbB1	CCAGCATGACACGTACAC	446 a 463
ExbB2	CAGCAGCACCAGCATCAC	1492 a 1509
ExbD1	ATGGTGAAAGTGGGGTAA	1396 a 1413
ExbD2	TACCGACCAGTTGAGCGT	1926 a 1943
TonB1	GATTACGGCAGCCTGATG	1750 a 1767
TonB2	GTAGACGAACGGTGCC	2540 a 2555

^a Los números indican las posiciones que ocupan el primer y el último nucleótido de cada oligo en la secuencia de la **Figura R.2.4**. La secuencia de la **Figura R.2.4** abarca la región de pPAT5 comprendida entre las posiciones 352 y 2.924, con lo que hay un desplazamiento de 351 pb en la localización de los oligos descritos en la presente tabla.

Las digestiones con las enzimas *Bam*HI, *Hind*III y *Pst*I, que no cortan en el interior del segmento de 4 kb que incluye el clúster *exbBDtonB*, rindieron bandas de aproximadamente 23, 12 y 4 kb, respectivamente, independientemente de la sonda utilizada en la hibridación. La digestión con *Sal*I, con tres sitios de corte en el interior del clúster, rindió un patrón de bandas diferente según la sonda empleada (**Figuras R.2.15B, C y D**), que está de acuerdo con lo que se deriva del mapa de restricción con *Sal*I (**Fig. R.2.15A**).

Existían razones que sugerían la organización de *exbB*, *exbD* y *tonB* en un operón en *P. putida* DOT-T1E. Por un lado, el análisis de la secuencia reveló la proximidad entre los genes *exbB* y *exbD*, separados tan sólo por 3 pb, así como el solapamiento existente entre los genes *exbD* y *tonB* (ver **Figura R.2.16A**). Por otro lado, como se desarrollará en la sección de *Discusión*, la organización de estos genes está conservada en distintos microorganismos.

Con objeto de confirmar si los genes *exbB*, *exbD* y *tonB* se transcribían formando parte de una misma unidad transcripcional, se hicieron estudios de RT-PCR mediante amplificación de ADNc obtenidos por retrotranscripción de ARN con cebadores adecuados (ver apartado 13.6 de la sección de *Materiales y Métodos*).

El producto de la transcripción de *exbB* y *exbD* se analizó a partir del ADNc correspondiente de 203 pb de extensión con los oligos I y II que se unen a las posiciones 1306 a 1323 de *exbB* y a las posiciones 1492 a 1509 de *exbD*, respectivamente (según la secuencia de la **Figura R.2.4**). El producto de la transcripción de *exbD* y *tonB* de 193 pb de extensión se analizó de igual manera con los oligos III y IV que se unen a las posiciones 1750 a 1767 de *exbD* y 1926 a 1943 de *tonB*, respectivamente (**Fig. R.2.4**). Los resultados de la reacción de retrotranscripción se muestran en la **Figura R.2.16B** donde se analiza tanto la cepa silvestre como el mutante PhoA5.

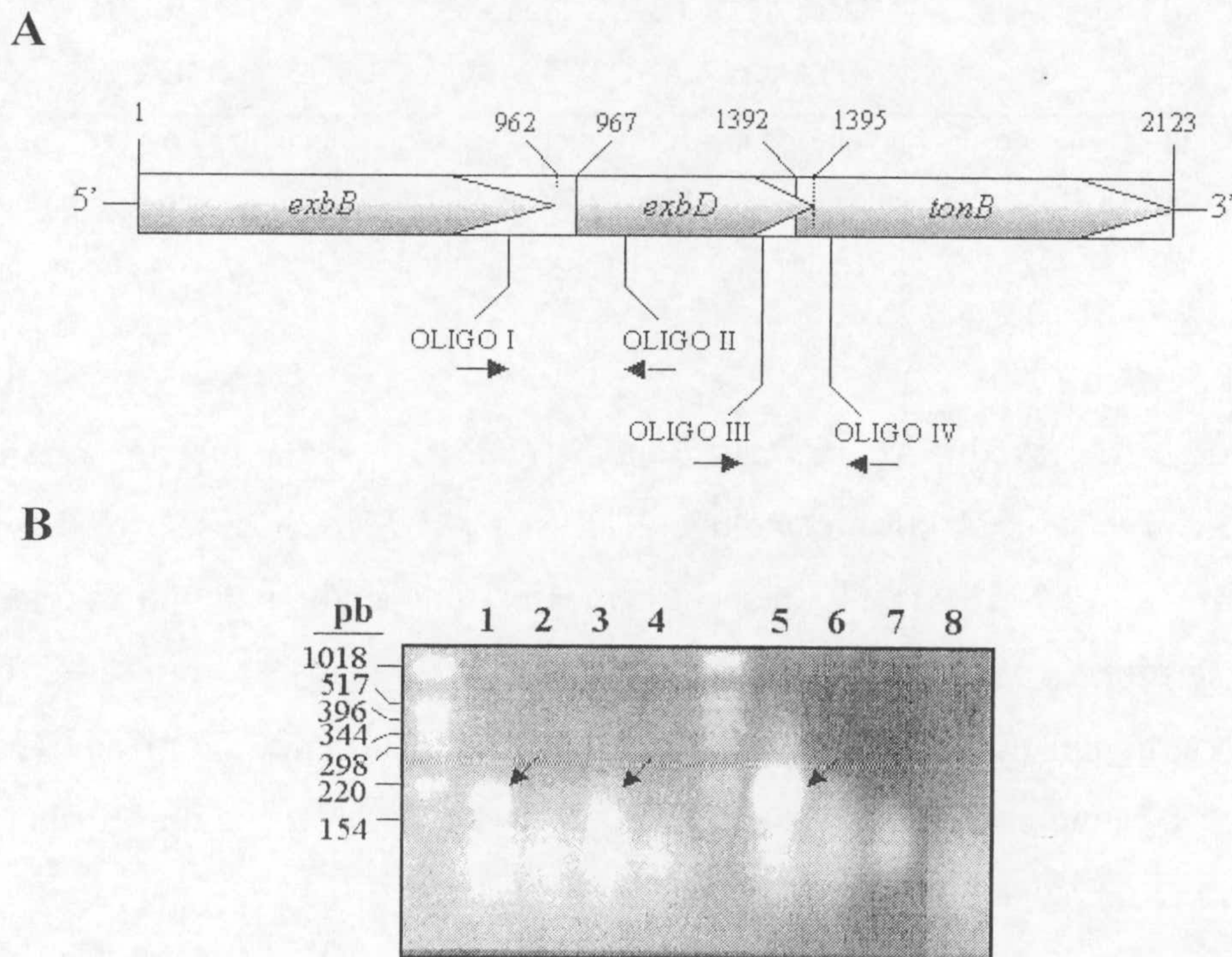


Figura R.2.16. Análisis mediante RT-PCR de los transcritos de los genes *exbB*, *exbD* y *tonB* de *P. putida* DOT-T1E. (A) Organización de los genes y posiciones de los oligonucleótidos utilizados para amplificar ARNm en los ensayos de RT-PCR. Los números indican la posición que ocupa la A del codon de iniciación ATG de cada gen (posiciones 1, 967 y 1395) y la posición que ocupa la tercera base en los correspondientes codones de terminación (posiciones 962, 1392 y 2123). (B) Electroforesis del ADNc amplificado con los oligonucleótidos I y II en DOT-T1E (calle 1) y en el mutante PhoA5 (calle 3). Las calles 2 y 4 son controles negativos de las muestras de las calles 1 y 3, respectivamente, a los que no se añadió retrotranscriptasa (AMW). Las calles 5 (DOT-T1E) y 7 (PhoA5) corresponden a los ADNc amplificados con los oligonucleótidos III y IV, con sus controles negativos en las calles 6 y 8,

respectivamente. En el margen izquierdo de la figura se indican los tamaños correspondientes al marcador de peso molecular. Las flechas señalan los productos de ADNc obtenidos por retrotranscripción con cada pareja de oligos a partir del ARNm correspondiente. Las secuencias de las parejas de oligonucleótidos utilizados fueron: I (5'-AAGGCACAGGTGTCCGAT-3') y II (5'-CAGCAGCACCAGCATCAC-3'), y III (5'-GATTACGGCGACCTGATG-3') y IV (5'-TACCGACCAGTTGAGCGT-3').

Con los oligos I y II se obtuvo una banda de ADNc del tamaño esperado tanto en la cepa silvestre como en el mutante PhoA5, mientras que con los oligos III y IV, la banda obtenida con la cepa silvestre no se observó en el mutante. Así, los resultados obtenidos revelaron que los productos de la transcripción de *exbB* y *exbD* formaban parte del mismo mensajero, así como los de la transcripción de *exbD* y *tonB*. El resultado obtenido con el mutante PhoA5 fue el esperado como consecuencia de la inserción del mini-Tn5 *phoAKm* en el extremo 3' del gen *exbD*.

6. CARACTERIZACIÓN FISIOLÓGICA DEL MUTANTE PhoA5.

En la caracterización del mutante PhoA5 se abordaron dos aspectos: el crecimiento en diferentes fuentes de carbono y la tolerancia a diversos compuestos tales como aromáticos, disolventes, antibióticos, etc., que afectan a los microorganismos con defectos en la envuelta celular (Fung *et al.*, 1978; Sukupolvi *et al.*, 1986; Woodruff y Hancock, 1989; Rodríguez-Herva, 1999). Para completar este estudio, se evaluó la integridad de la envuelta celular, desde un punto de vista morfológico-estructural y funcional.

Se verificó que el mutante PhoA5 conservaba los caracteres distintivos de la cepa parental tales como: 1) amplificación mediante PCR de los genes *todC1C2* con cebadores específicos; 2) perfil idéntico en el test de crecimiento API 20 NE (bioMérieux, cat. no. 20050); y 3) crecimiento en tolueno como única fuente de carbono y de energía.

6.1. Fuentes de carbono utilizadas por PhoA5.

En el contexto de la caracterización del mutante PhoA5, se estudió el crecimiento tanto en medio rico LB como en medio mínimo M9 suplido con diferentes fuentes de carbono, en medio sólido y en medio líquido. En cuanto al crecimiento en LB, tanto la cepa silvestre como la mutante crecieron con un tiempo de generación

similar, 45 y 50 minutos, respectivamente, si bien esta última no formó colonias en dicho medio rico. En medio mínimo M9-agar con glucosa (0,5% p/v), succinato (10 mM) o glicerol (1% p/v) como única fuente de carbono, no hubo diferencias en el crecimiento de ambas cepas, obteniéndose colonias visibles tras 24-36 horas de incubación a 30 °C. El crecimiento en medio mínimo suplido con las fuentes de carbono mencionadas anteriormente tuvo lugar con tiempos de generación similares en la cepa silvestre y en la mutante (**Tabla R.2.5**). Cuando se empleó citrato (10 mM) como fuente de carbono, se duplicó el tiempo de generación del mutante PhoA5 respecto al de la cepa silvestre.

Tabla R.2.5. Tiempo de generación de *P. putida* DOT-T1E y PhoA5 en medio mínimo M9 con diferentes fuentes de carbono.^a

Fuente de carbono	Cepa	
	wt	PhoA5
Glucosa	85	91
Citrato	92	180
Succinato	125	125
Glicerol	459	464
PHBA ^b	101	No crecimiento

^a Los tiempos de generación se determinaron en la fase exponencial de crecimiento. Los valores corresponden a la media obtenida de tres cultivos diferentes y se expresan en minutos.

^b La concentración de PHBA utilizada fue de 6 g/l.

La cepa PhoA5, además de ser sensible a PHBA, fenotipo por el que se aisló, fue incapaz de utilizar PHBA como fuente de carbono (**Fig. R.2.17A**), a diferencia de la cepa silvestre que presentó crecimiento en el intervalo de 3 a 5 g/l (**Fig. 17B**).

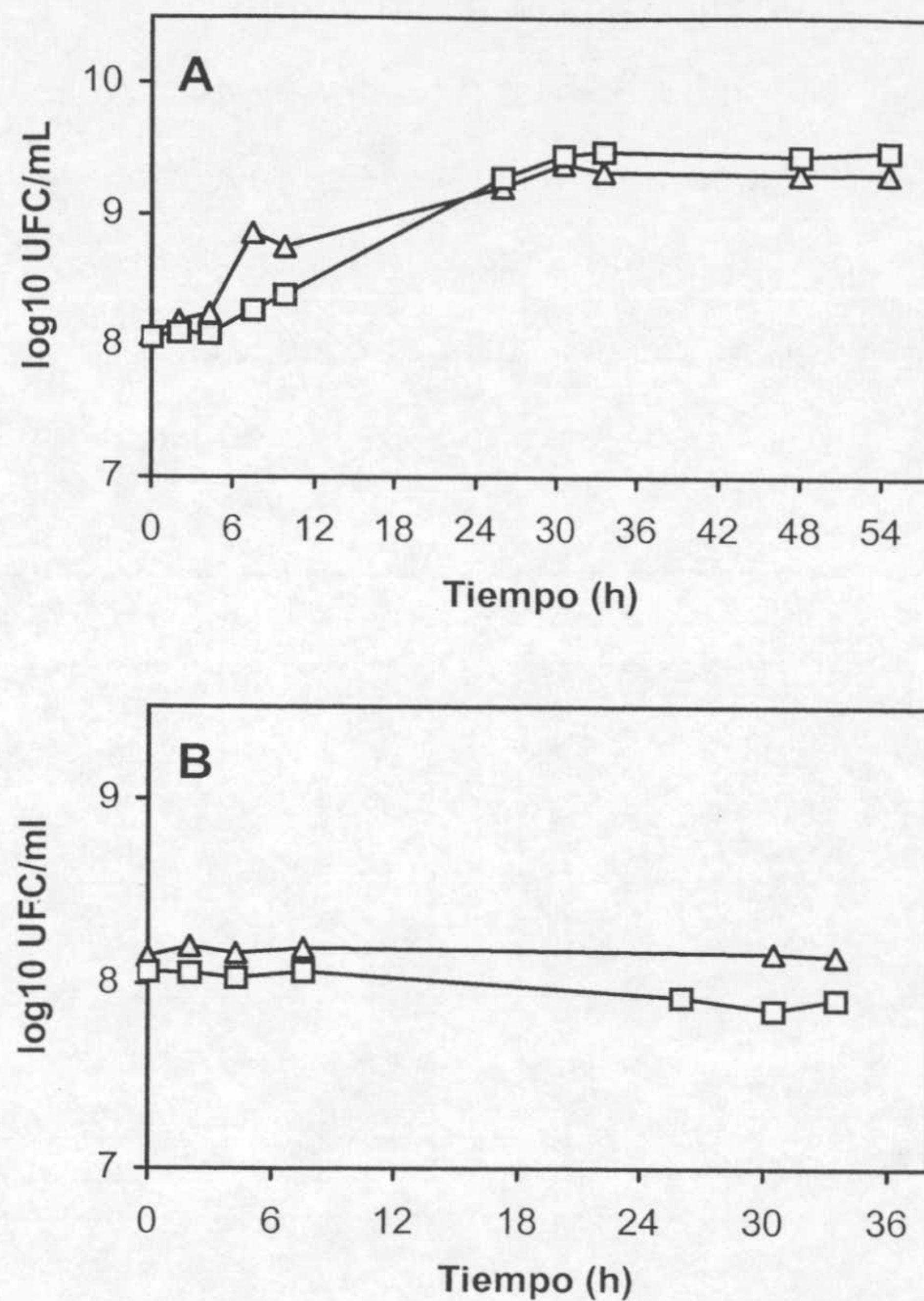


Figura R.2.17. Crecimiento de *P. putida* DOT-T1E y PhoA5 en medio mínimo con PHBA como fuente de carbono. Cultivos de 14-16 h en medio mínimo M9-glucosa de la cepa silvestre (A) o del mutante (B) en medio mínimo M9 con glucosa (0,5% (p/v)), se diluyeron 50 veces en medio mínimo M9 con 3 g/l (Δ) ó 5 g/l (□) de PHBA. El crecimiento se determinó contabilizando UFC/ml a los tiempos indicados.

6.2. Tolerancia de PhoA5 a tóxicos.

Continuando con la caracterización fisiológica de PhoA5, se llevaron a cabo estudios de tolerancia a compuestos tóxicos para las células bacterianas, tales como el propio PHBA y derivados de tipo parabeno, otros ácidos carboxílicos aromáticos, disolventes orgánicos, antibióticos y aminoácidos aromáticos.

6.2.1. Tolerancia del mutante PhoA5 a PHBA.

El mutante PhoA5, que se aisló por su sensibilidad a PHBA, no utilizó este compuesto como fuente de carbono y energía. Con el objetivo de determinar si la incapacidad de esta cepa para crecer en PHBA como única fuente de carbono fue debido a un efecto de inhibición del crecimiento por toxicidad, se determinó la tolerancia de

dicha cepa al compuesto utilizando placas de doble difusión de medio mínimo M9 con glucosa y un gradiente lineal de PHBA, tal y como se describe en el **apartado 4.3** de la sección de *Materiales y Métodos*. Los resultados se muestran en la **Figura R.2.18**. En estos ensayos, la inhibición del crecimiento de PhoA5 se observó a 6 g/l, en contraste con la cepa silvestre que formó césped hasta alrededor de 18 g/l, de lo que se deduce que la falta de crecimiento en PHBA (3 g/l) no fue consecuencia de la toxicidad del compuesto.

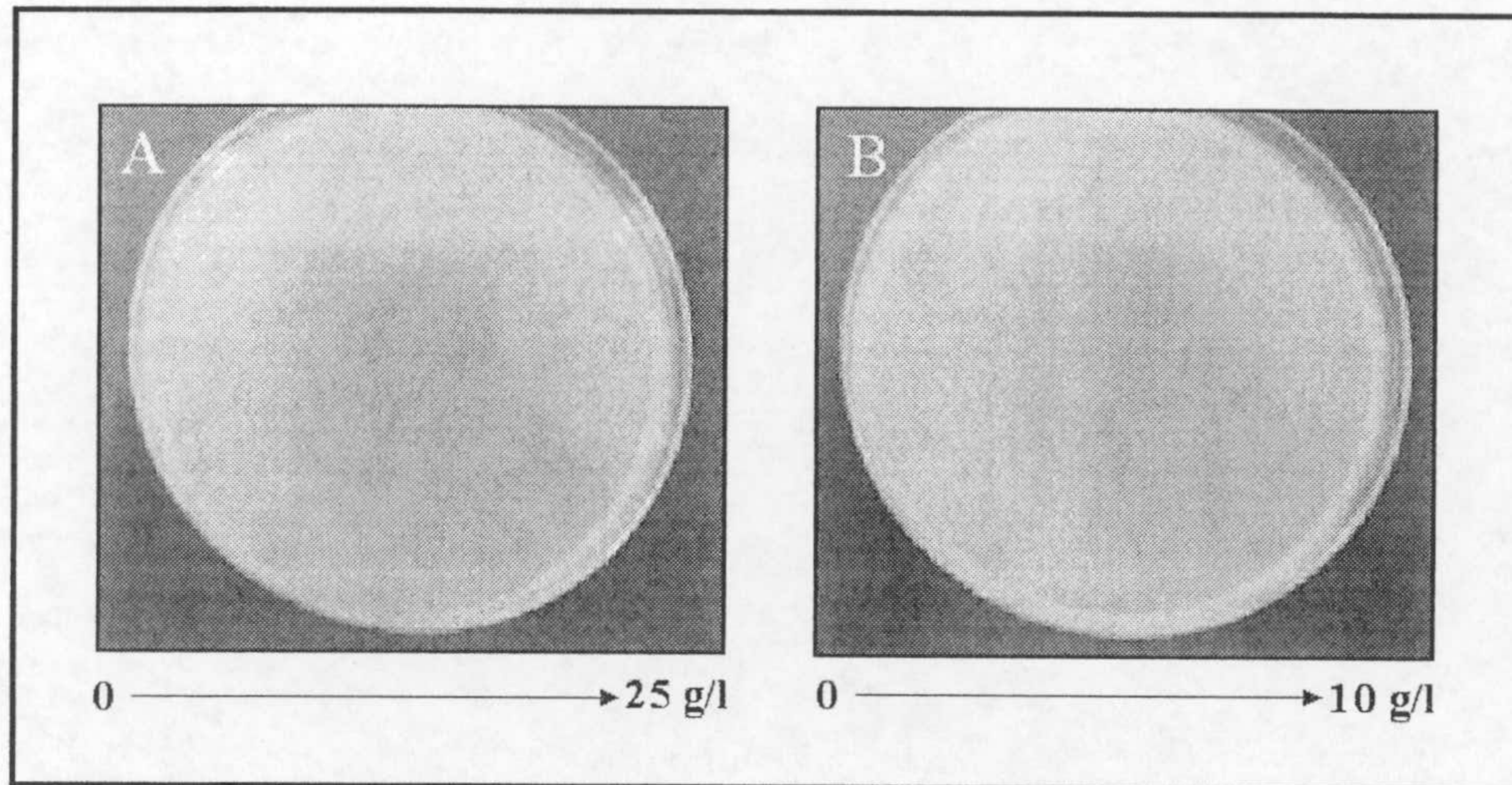


Figura R.2.18. Tolerancia de *P. putida* DOT-T1E y el mutante PhoA5 a PHBA en placas de doble difusión en gradiente. Cultivos de 14-16 h de *P. putida* DOT-T1E (A) y PhoA5 (B) en medio mínimo M9 con glucosa se diluyeron 50 veces en el mismo medio y se incubaron a 30 °C en agitación hasta alcanzar una DO_{660} de aproximadamente 1. Entonces se sembraron alícuotas como se describe en el **apartado 4.3** de los *Materiales y Métodos* en las placas de M9 con glucosa y un gradiente lineal de PHBA (el intervalo de concentración del gradiente se indica debajo de cada fotografía), las placas se incubaron a 30°C durante 20-36 h horas y a continuación se examinó el crecimiento del césped bacteriano. La figura muestra placas representativas de tres experimentos independientes.

La respuesta de PhoA5 a un choque por PHBA se muestra en la **Figura R.2.19**. Concentraciones de PHBA en un intervalo de 6-15 g/l inhibieron el crecimiento y a partir de 12 g/l se observó muerte celular después de 20 h de incubación (**Fig. R.2.19A**). Ninguna de las concentraciones ensayadas provocaron muerte celular considerable en la cepa silvestre (**Fig. R.2.19B**), como quedó patente en el **Capítulo 1** de *Resultados*.

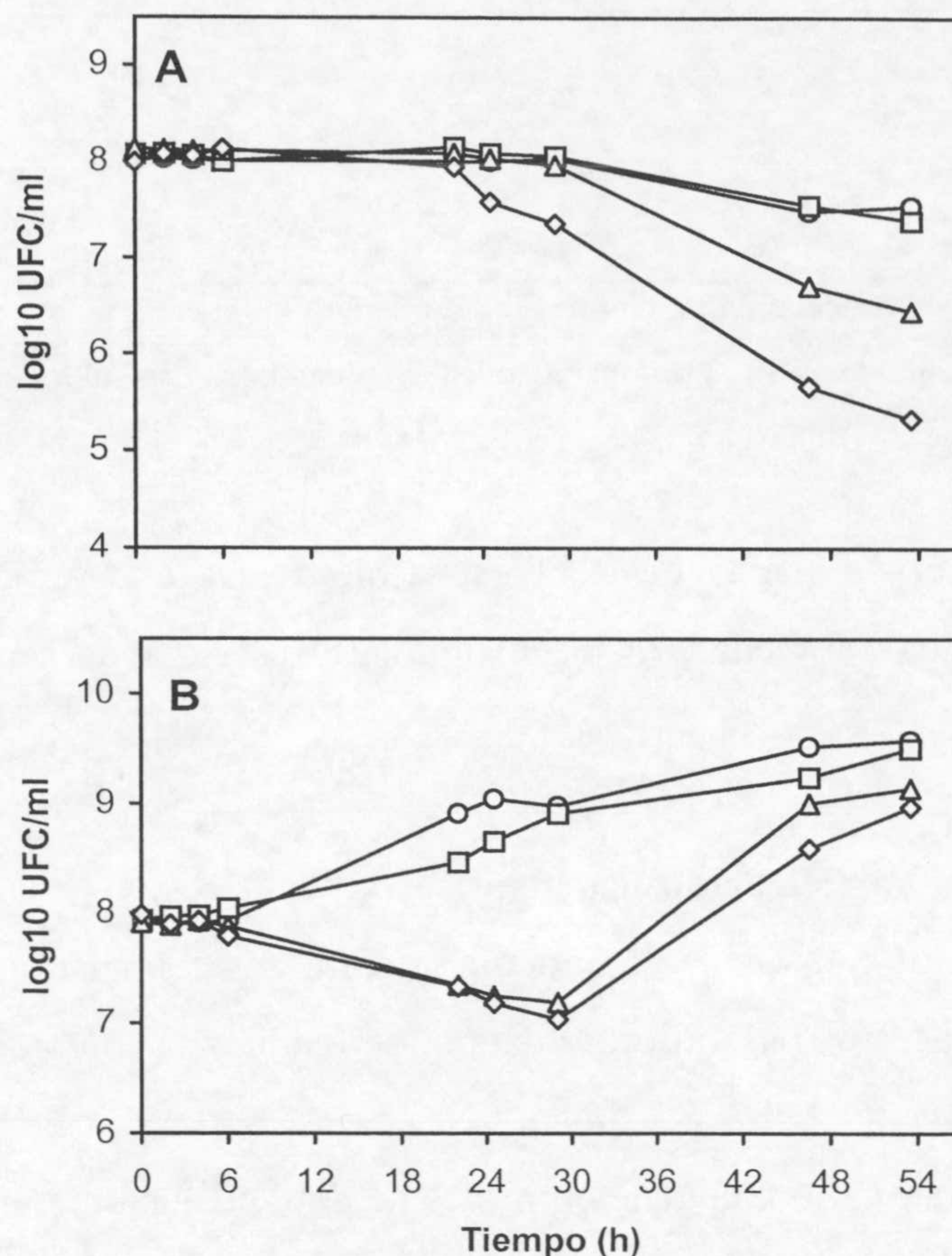


Figura R.2.19. Tolerancia de *P. putida* DOT-T1E y el mutante PhoA5 a un choque de PHBA. Cultivos de 14-16 h de las cepas PhoA5 (A) y silvestre (B) en medio mínimo M9-glucosa, se diluyeron 50 veces en el mismo medio. Tras 3 horas de incubación a 30 °C y en agitación, los cultivos se dividieron en 4 alícuotas cada uno, a las cuales se añadió alternativamente 6 (○), 9 (□), 12 (△) y 15 (◇) g/l de PHBA. La supervivencia de los cultivos se determinó cuantificando UFC/ml a los tiempos indicados.

6.2.2. Tolerancia de PhoA5 a alquilparabenos.

Los parabenos son ésteres derivados del PHBA. Sus derivados alquílicos, moléculas muy poco solubles en agua, tienen un alto valor añadido como agentes conservantes en alimentación, bebidas y medicamentos, así como agentes fungicidas (Cavill, 1947; Engels, 1936; Zbarskii, 1939; Nobli, 1936). Se estudió la tolerancia de *P. putida* DOT-T1E y PhoA5 a estos compuestos empleando placas de doble difusión con un gradiente de concentración del compuesto. La cota máxima del gradiente, así como la concentración de la disolución stock estuvieron fijadas por la solubilidad del compuesto en agua. Los resultados se muestran en la **Tabla R.2.6**.

Tabla R.2.6. Tolerancia a alquilparabenos de *P. putida* DOT-T1E y PhoA5.^a

Compuesto	DOT-T1E	PhoA5
MP	>2	1
EP	>1,54	1,4
PP	>0,8	>0,8
BP	>0,3	>0,3

^a Los resultados muestran la concentración mínima inhibitoria (MIC) del crecimiento en g/l. Abreviaturas: MP, metilparaben; EP, etilparaben; PP, propilparaben; BP butilparaben. Las soluciones se prepararon en agua destilada y se esterilizaron en el autoclave.

Se puede observar que la cepa silvestre toleró las concentraciones más altas ensayadas de todos los parabenos, y que el mutante resultó más sensible a metil- y etilparaben.

6.2.3. Tolerancia de PhoA5 a ácidos carboxílicos aromáticos.

Para estudiar un posible efecto de la naturaleza del sustituyente y/o de la posición del mismo dentro del anillo aromático, se analizó la tolerancia de *P. putida* DOT-T1E y el mutante PhoA5 a distintos ácidos carboxílicos aromáticos con sustituyentes metoxi, amino o halógeno en placas de doble difusión con un gradiente de 0 a 20 g/l del ácido correspondiente. Los datos se muestran en la **Tabla R.2.7**. La cepa mutante resultó significativamente más sensible que la cepa silvestre a todos los ácidos aromáticos ensayados, siendo su nivel de tolerancia del 35 al 65% del nivel de tolerancia de la cepa silvestre, con dependencia del compuesto.

Tabla R.2.7. Tolerancia de *P. putida* DOT-T1E y PhoA5 a ácidos carboxílicos aromáticos.^a

Compuesto	Cepa	
	wt	PhoA5
<i>o</i> -metoxibenzoato	17 ^b	8,5
<i>m</i> -metoxibenzoato	12	7,2
<i>p</i> -metoxibenzoato	19	9,1
<i>p</i> -metilbenzoato	14,5	7,4
<i>o</i> -aminobenzoato	8,7	5
<i>m</i> -aminobenzoato	14,8	7,5
<i>p</i> -aminobenzoato	13	7,8
<i>o</i> -clorobenzoato	14,5	6
<i>m</i> -clorobenzoato	4,5	3
<i>p</i> -clorobenzoato	11,7	4

^a Cultivos de 14-16 h en medio mínimo M9 con glucosa se diluyeron 50 veces en el mismo medio y se incubaron a 30 °C en agitación hasta alcanzar una DO_{660} de aproximadamente 1. Entonces se sembraron alícuotas en las placas de gradiente como se describe en el **apartado 4.3** de los *Materiales y Métodos*, las placas se incubaron a 30°C durante 20-36 h horas y a continuación se examinó el crecimiento.

^b Los valores indican la máxima concentración (g/l) que permitió la formación de un césped bacteriano y representan el valor de la media de tres experimentos independientes.

6.2.4. Tolerancia de PhoA5 a disolventes orgánicos.

Los disolventes orgánicos son muy tóxicos para los microorganismos, porque alteran la integridad de la membrana citoplasmática, modificando así sus propiedades físico-químicas y vitales, a saber: pérdida de iones y, por consiguiente, desaparición del gradiente de pH y del potencial de membrana; pérdida de metabolitos y proteínas de membrana, que conducen, en último término, a la lisis y muerte celular (De Smet *et al.*, 1978; Cruden *et al.*, 1992; Sikkema *et al.*, 1995). La toxicidad de los disolventes está ligada al valor del logaritmo de su coeficiente de partición en una mezcla *n*-octanol/agua ($\log P_{OW}$) (Inoue y Horikoshi, 1991; Rekker y de Kort, 1979). Aquellos compuestos que tienen un $\log P_{OW}$ comprendido entre 2,5 y 4, como por ejemplo el benceno (2,0), el estireno (3,6), los xilenos (3,2) o el tolueno (2,5) son los más tóxicos, por acumularse en la membrana citoplasmática causando los efectos mencionados. Se determinó la tolerancia del mutante PhoA5 a distintos disolventes orgánicos, cuyo valor de $\log P_{OW}$ se indica entre paréntesis en la **Tabla R.2.8**.

Tanto la cepa silvestre como la mutante fueron sensibles a 1-hexanol, *o*-cresol, *m*-cresol, *p*-cresol, y benceno, no detectándose crecimiento ($D.O_{660} < 0,5$). Ambas cepas toleraron el choque al resto de disolventes, alcanzándose una turbidez mayor de 1,5 unidades en todos los casos tras 24 horas de incubación a 30°C. En el caso del tolueno, PhoA5 fue más sensible que la cepa silvestre (ver **Tabla R.2.8**).

Estudios previos realizados en nuestro laboratorio (Ramos *et al.*, 1998) demostraron que la pre-adaptación a tolueno suplementado en la fase gaseosa juega un papel clave en la tolerancia a tolueno. En este estudio se comparó la respuesta a corto plazo a un choque de tolueno de la cepa mutante PhoA5 con la respuesta de la cepa parental. Los resultados se muestran en la **Figura R.2.20**.

Tabla R.2.8. Tolerancia de *P. putida* DOT-T1E y PhoA5 a distintos disolventes orgánicos.^a

Compuesto	log P _{OW}	Cepa	
		DOT-T1E	PhoA5
<i>Hidrocarburos</i>			
heptano	4,5	+++	+++
ciclopentano		+++	+++
ciclohexano	3,2	+++	+++
1-hexeno		+++	+++
1-octeno		+++	+++
1-dodeceno		+++	+++
<i>Alcoholes</i>			
metanol		+++	+++
etanol		+++	+++
1-propanol	0,34	+++	+++
isopropanol	0,61	+++	+++
1-hexanol	1,8	-	-
1-heptanol	2,4	+	+
1-octanol	2,9	+++	+++
<i>Aromáticos</i>			
benceno	2,13	-	-
etilbenceno	3,1	+++	+++
propilbenceno	3,6	+++	+++
tolueno	2,5	++	+
<i>o</i> -xileno	2,77	+++	+++
<i>m</i> -xileno	3,2	+++	+++
<i>p</i> -xileno	3,15	+++	+++
<i>o</i> cresol	1,95	-	-
<i>m</i> -cresol	1,94	-	-
<i>p</i> -cresol	1,96	-	-
<i>Éteres</i>			
dietil éter		+++	+++
<i>terc</i> -butilmetil éter		+++	+++
<i>Ésteres</i>			
acetato de etilo		+++	+++

^a Cultivos de 14-16 h en medio líquido LB se diluyeron 100 veces en el mismo medio y se incubaron a 30°C durante 2 horas en agitación. A continuación se añadió el disolvente indicado a una concentración del 0,3% (v/v). La supervivencia al choque por el disolvente se contabilizó determinando la turbidez a las 24 y 48 horas. Símbolos: +++, DO₆₆₀≥1,5; ++, 1≤DO₆₆₀<1,5; +, 0,5<DO₆₆₀<1; -, DO₆₆₀≤0,5.

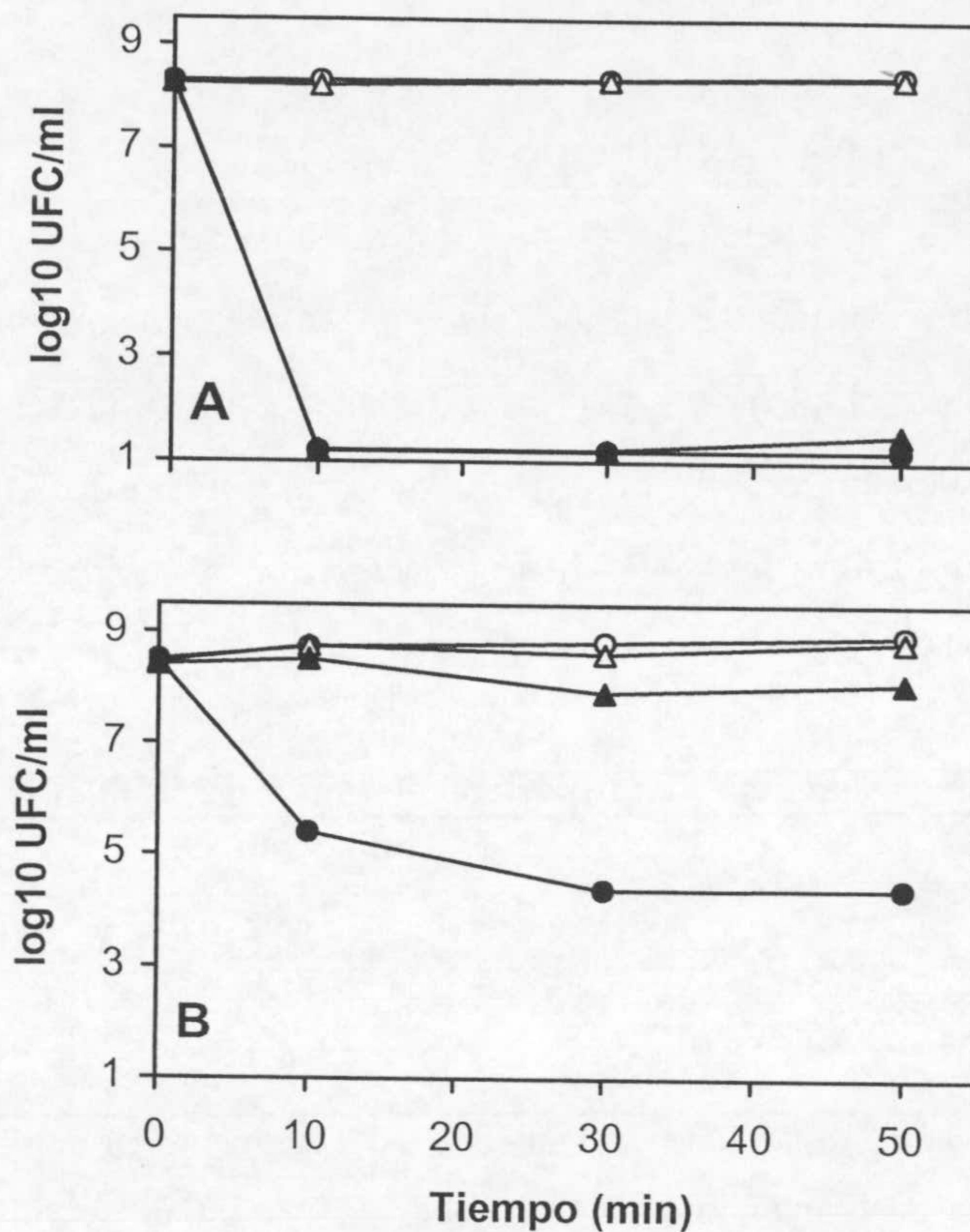


Figura R.2.20. Respuesta a corto plazo de *P. putida* DOT-T1E y PhoA5 a un choque de tolueno. Cultivos de 14-16 h de PhoA5 (A) y DOT-T1E (B) en medio líquido LB en ausencia (○,●) y en presencia (△,▲) de tolueno suplementado en la fase gaseosa, se diluyeron en el mismo medio y, cuando alcanzaron una turbidez a 660 nm igual a 0,8, los cultivos se dividieron en dos alícuotas, a una de las cuales se añadió tolueno al 0,3% (v/v) (símbolos rellenos), y la otra se mantuvo como control (símbolos huecos). La supervivencia se determinó como UFC/ml a los tiempos indicados (tiempo 0, inmediatamente antes de añadir el tolueno).

Para la cepa silvestre (Fig. R.2.20B), los resultados fueron similares a los descritos previamente por Ramos *et al.* (1998), de manera que un choque repentino de tolueno a células no expuestas originó una pérdida en la viabilidad de unos 4 órdenes de magnitud, mientras que aproximadamente el 90% de las células expuestas toleraron el choque. En el caso del mutante PhoA5 (Fig. R.2.20A), tanto las células expuestas como las no expuestas fueron más sensibles que la cepa silvestre al choque de tolueno. Así, la supervivencia se limitó a unas 10 UFC/ml en las células expuestas, lo que representa un descenso en la viabilidad celular de 7 órdenes de magnitud, mientras que no hubo

recuperación alguna tras el choque del crecimiento en las células no expuestas, cuya supervivencia se representa en la figura con el valor del límite de detección.

6.2.5. Sensibilidad de PhoA5 a antibióticos.

Es conocido que modificaciones producidas en la envuelta celular a menudo se traducen en alteraciones en la resistencia de las bacterias a antibióticos (Fung *et al.*, 1978; Sukupolvi *et al.*, 1986). Es por ello que se estudió la resistencia de la cepa silvestre DOT-T1E y en la cepa mutante PhoA5 a una batería de antibióticos, mediante el test descrito en el apartado 4.1.1 de los *Materiales y Métodos*. Los resultados se muestran en la **Tabla R.2.9**.

Tabla R.2.9. Patrón de resistencia a antibióticos de *P. putida* DOT-T1E y PhoA5.

Cepa	Antibiótico								
	CTX	IPM	NOR	CIP	NA	TE	SM	GM	PIP
DOT-T1E	14 ^a	26	20	21	15	17	16	17	18
PhoA5	30	45	30	40	15	28	14	16	19

^a Los valores indican el diámetro del halo de inhibición del crecimiento en mm, incluyendo 6 mm de la membrana impregnada en el antibiótico. Abreviaturas: CTX, cefotaxima; IPM, imipenem; NOR, norfloxacin; CIP, ciprofloxacina; NA, ácido nalidíxico; TE, tetraciclina; SM, estreptomicina; GM, gentamicina; y PIP, piperacilina.

Tanto la cepa silvestre como la mutante fueron igualmente resistentes a ampicilina, vancomicina, eritromicina, cloranfenicol y rifampicina, antibióticos que no tuvieron ningún efecto sobre el crecimiento (no se muestra). Ambas cepas fueron igualmente sensibles a ácido nalidíxico, estreptomicina, gentamicina y piperacilina, y aunque las dos cepas fueron sensibles a tetraciclina, cefotaxima, imipenem, norfloxacin y ciprofloxacina, los halos de inhibición producidos en el mutante fueron mayores que los observados en la cepa silvestre (**Tabla R.2.9**).

6.2.6. Tolerancia de PhoA5 a aminoácidos aromáticos.

Para completar la caracterización de la cepa PhoA5 respecto a la tolerancia a compuestos aromáticos, se estudió su resistencia a los aminoácidos aromáticos tirosina, histidina y triptófano. Los resultados se muestran en la **Tabla R.2.10**. Todos los aminoácidos aromáticos inhibieron el crecimiento de la cepa mutante a concentraciones

más bajas, aproximadamente al 60-70% de la concentración requerida para ejercer la misma inhibición en la cepa silvestre.

Tabla R.2.10. Tolerancia a aminoácidos aromáticos de *P. putida* DOT-T1E y PhoA5.^a

Cepa	Aminoácido		
	Tyr	Trp	His
DOT-T1E	39,4 ^b	35,3	31,2
PhoA5	25,3	23,5	22,3

^a Cultivos de 14-16 h en medio mínimo M9 con glucosa se diluyeron 50 veces en el mismo medio y una vez alcanzada la fase exponencial media de crecimiento, se sembraron alícuotas de 100 µl en placas de doble difusión con un gradiente lineal (0 a 50 mM) del correspondiente aminoácido. Las placas se incubaron a 30°C durante 24-48 horas.

^b Los valores indican la concentración máxima (mM) a la que se observó formación de césped debido al crecimiento bacteriano.

6.3. Integridad de la envuelta celular de PhoA5

En un trabajo previo a esta tesis, llevado a cabo en nuestro laboratorio, se generó un mutante OprL de *P. putida* que resultó ser más sensible a tolueno y a antibióticos que la cepa parental (Rodríguez-Herva *et al.*, 1996). Este mutante liberaba proteínas periplásmicas al medio extracelular debido a alteraciones en la membrana externa. Se realizaron estudios orientados a desvelar la integridad de la envoltura celular en el mutante PhoA5 para determinar si las características fenotípicas del mutante PhoA5, que se han descrito en los apartados anteriores, eran debidas a un daño general en la membrana externa.

6.3.1. Análisis de la morfología y estructura celular en presencia de PHBA

Las posibles alteraciones en la envuelta celular del mutante PhoA5 se estudiaron mediante microscopía electrónica de transmisión y barrido. Células en fase exponencial de las cepas silvestre y mutante cultivadas en medio mínimo M9-glucosa suplido o no con PHBA (10 g/l), se examinaron al microscopio electrónico de barrido. En la **Figura R.2.21** se observa la alta densidad celular en las preparaciones de la cepa silvestre (**Fig. R.2.21B**) en comparación con la densidad más baja de la población de PhoA5 (**Fig. R.2.21D**).

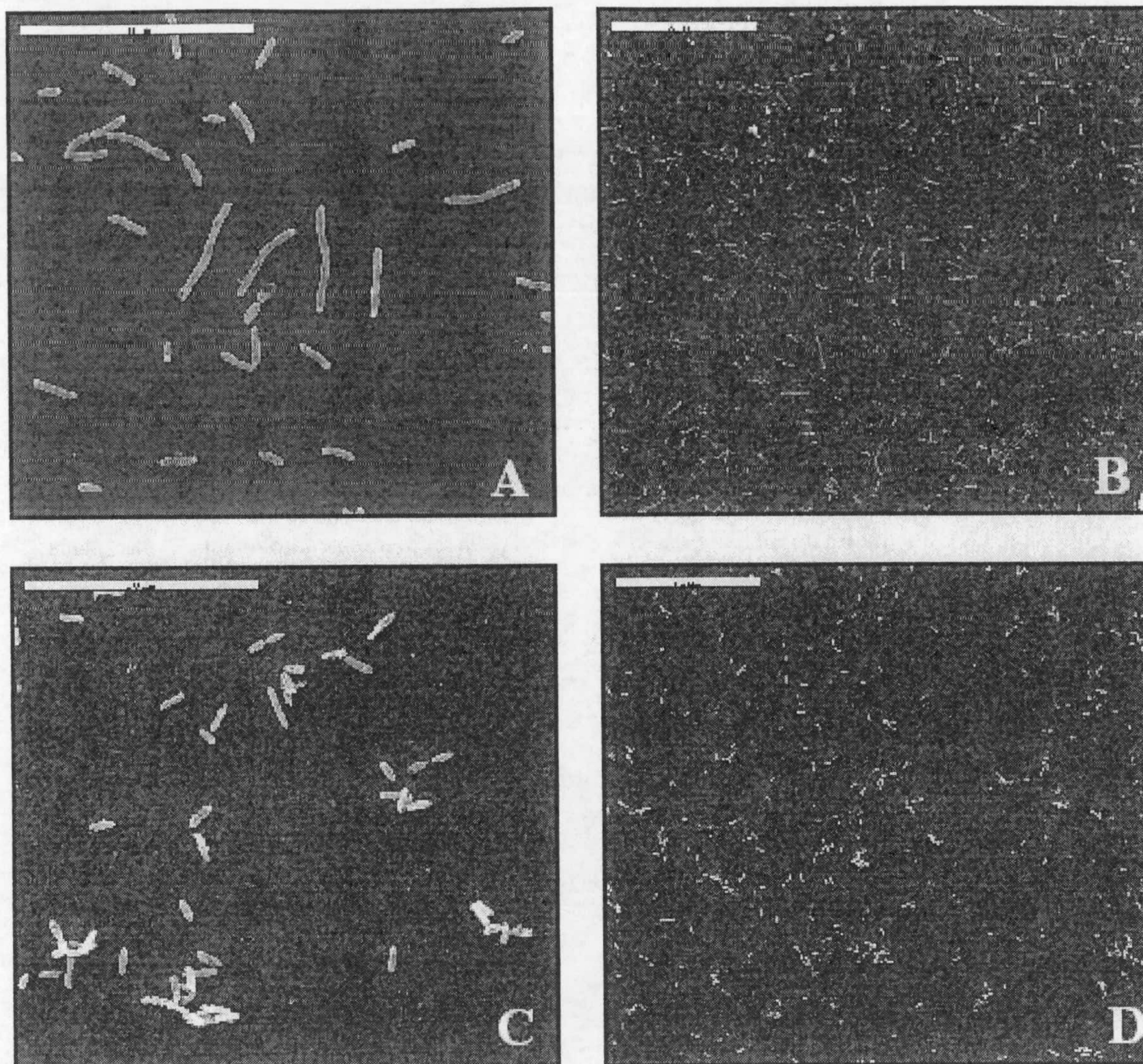


Figura R.2.21. *P. putida* DOT-T1E y PhoA5 al microscopio electrónico de barrido. Células de *P. putida* DOT-T1E (A, B) o PhoA5 (C, D) cultivadas en medio mínimo M9 con glucosa y un suplemento de PHBA (10 g/l), se recogieron en la fase exponencial de crecimiento (turbidez a 660 nm ~ 0,8). Para la preparación de las muestras se procedió como se indica en el **apartado 15.2** de la sección *Materiales y Métodos*. Aumentos: (A, C) x 2000, (B, D) x 500.

Las células del mutante PhoA5 mostraron una longitud disminuida respecto a las de la cepa silvestre y aparecían formando grupos, mientras que las células de la cepa silvestre fueron alargadas, con presencia individualizada y bien definidas, mostrándose en diversos estadios del proceso de división celular. Estas observaciones no se vieron alteradas por la presencia de PHBA en el medio de cultivo. Mediante microscopía electrónica de transmisión, se analizó la ultraestructura de estas bacterias, en presencia y en ausencia de PHBA (**Figura R.2.22**).

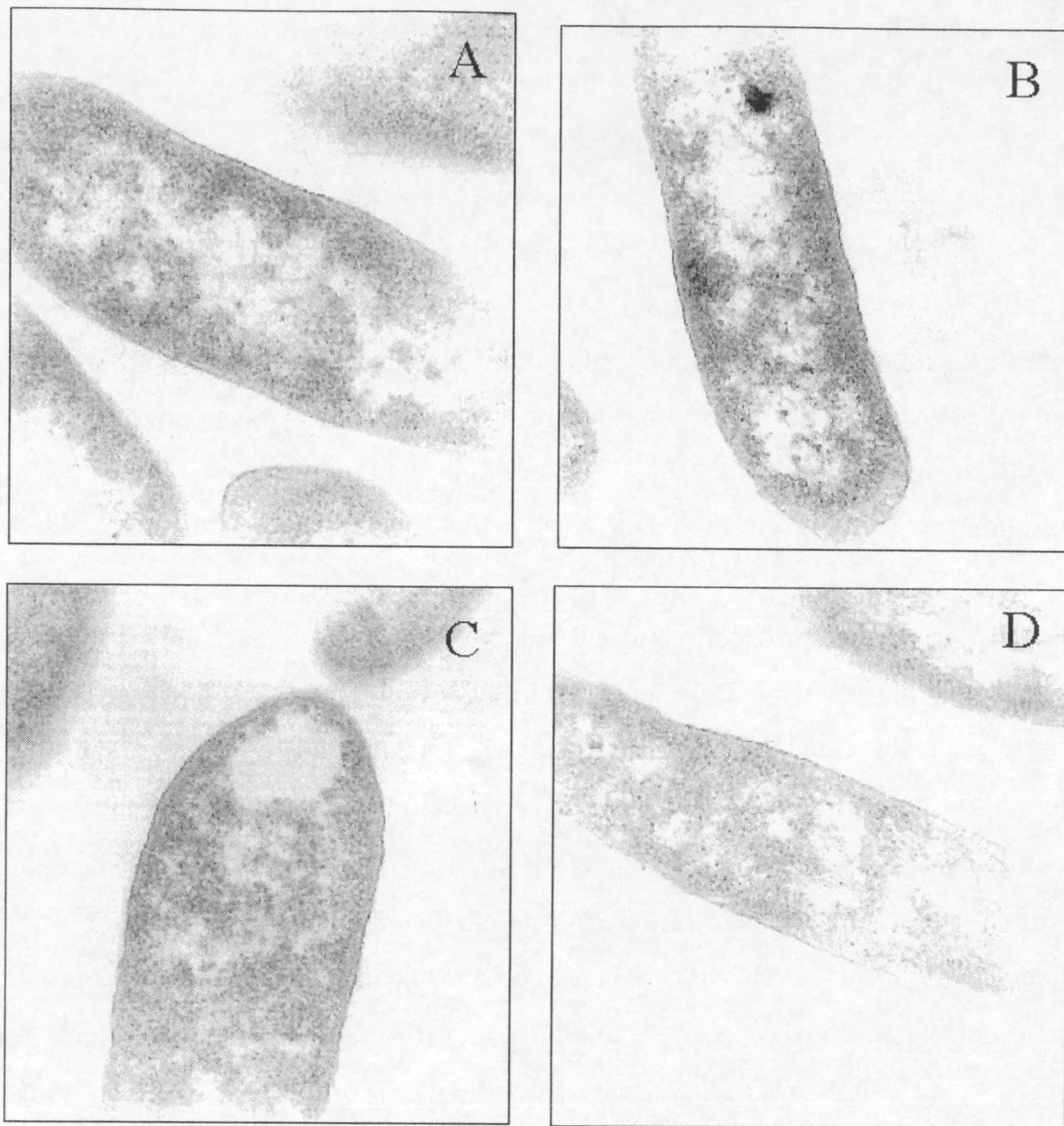


Figura R.2.22. *P. putida* DOT-T1E y PhoA5 al microscopio electrónico de transmisión. Células de *P. putida* DOT-T1E (A, B) o *P. putida* DOT-T1E-PhoA5 (C, D) cultivadas en medio mínimo M9 con glucosa (A, C) o, alternativamente, con glucosa y un suplemento de PHBA (10 g/l) (B, D) se recogieron en la fase exponencial de crecimiento (turbidez a 660 nm ~ 0,8). Para la preparación de las muestras se procedió como se indica en el **apartado 15.1.** de la sección *Materiales y Métodos*. Aumentos: x 50.000.

Tanto en la cepa silvestre como en la mutante, las células presentaron una superficie lisa, independientemente de la presencia de PHBA. Estos resultados sugerían que la sensibilidad incrementada del mutante PhoA5 a PHBA no fue consecuencia de daños generalizados en la membrana externa, como resultado de la mutación en el clúster *exbBDtonB*.

6.3.2. Liberación de enzimas periplásmicos al medio extracelular.

En los mutantes en proteínas de membrana, a veces es difícil dilucidar si un fenotipo determinado es consecuencia directa de una mutación o si, por el contrario, se trata de un efecto pleiotrópico debido, precisamente, a la pérdida de proteínas del espacio periplásmico como consecuencia de los daños producidos en la membrana externa. Uno de los primeros fenotipos que se describieron para los mutantes en el sistema de proteínas de la envuelta celular *tol-pal* de *E. coli* (Bernadac *et al.*, 1998; Fognini-Lefebvre *et al.*, 1987; Lazzaroni y Portalier, 1992), así como de *P. putida* KT2440 (Llamas *et al.*, 2000) fue la liberación de proteínas periplásmicas al medio extracelular.

Por presentar PhoA5 una mutación en una proteína de membrana como es ExbD, se consideró la posibilidad de que este mutante liberase proteínas periplásmicas, fenotipo conocido en inglés como "leaky". La proteína que se decidió seguir inmunológicamente fue la β -lactamasa en la fracción sobrenadante de cultivos de las cepas silvestre y mutante que portaban el plásmido pJB3-Tc19, el cual codifica dicha β -lactamasa que es de localización periplásmica. Como control positivo se utilizó el mutante de *P. putida* KT2440 QX, afectado en una proteína de membrana externa, portando el plásmido pJB3-Km1, que codifica la misma β -lactamasa, y como control negativo se utilizó la cepa *P. putida* KT2440, para comprobar la especificidad del anticuerpo.

Los cultivos de las distintas cepas se recogieron en fase de crecimiento exponencial (turbidez a 660 nm 0,5-0,6) para evitar en lo posible las interferencias debidas a la lisis celular que ocurre en las fases posteriores del crecimiento. En primer lugar, se analizaron las proteínas de la fracción sobrenadante de los cultivos celulares mediante electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS y posterior tinción con plata. Los resultados se muestran en la **Figura R.2.23**.

No se pudieron observar diferencias en el perfil de bandas de proteínas entre las dos cepas (**Fig. R.2.23A**). Además, ni en la cepa silvestre ni en la mutante se observó la liberación de la enzima β -lactamasa al medio extracelular (**Fig. R.2.23B y C**).

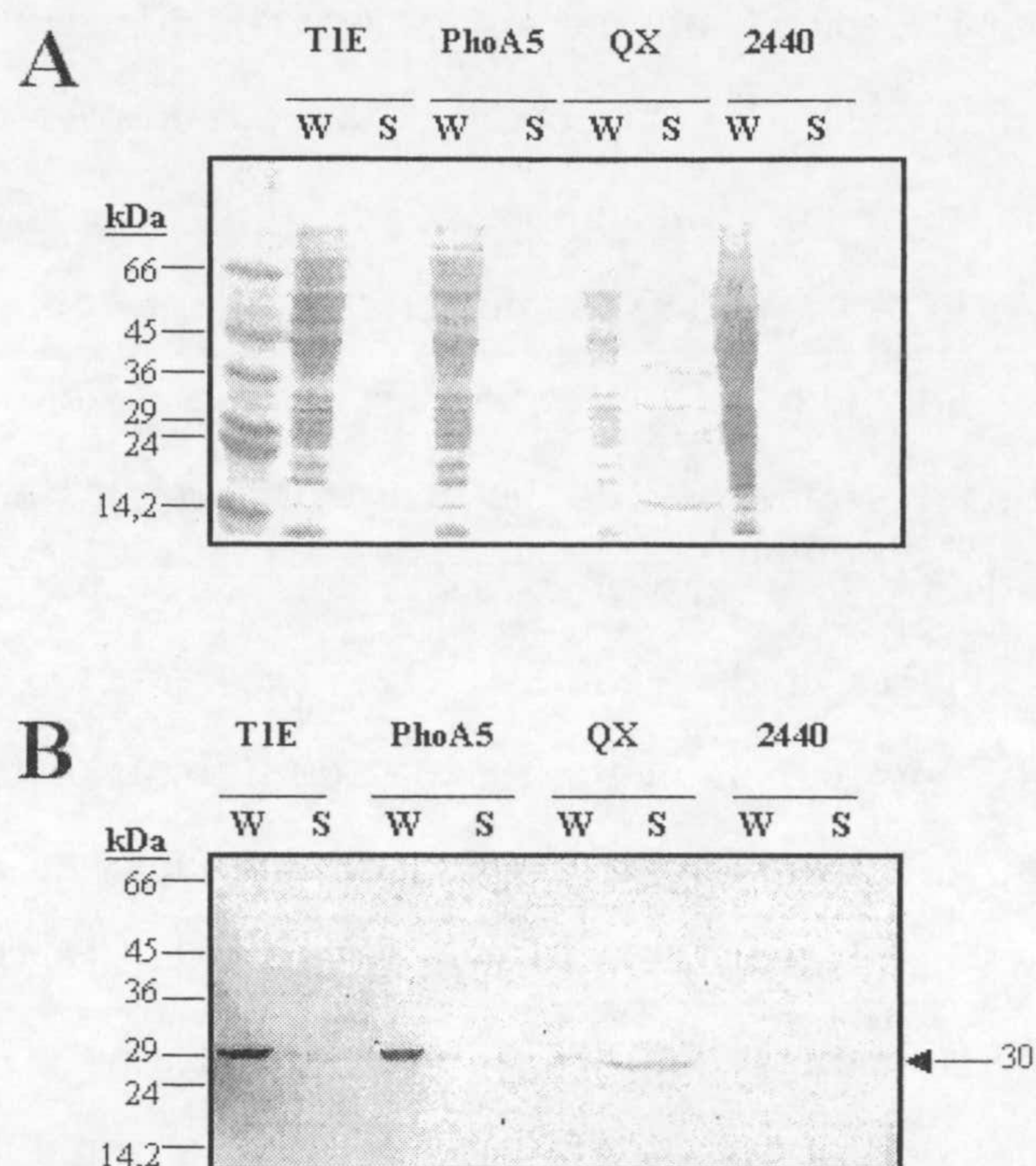


Figura R.2.23. Electroforesis de proteínas procedentes de sobrenadantes de cultivos de *P. putida* DOT-T1E y el mutante PhoA5. Células de *P. putida* DOT-T1E (pJB3-Tc19), PhoA5 (pJB3-Tc19), QX (pJB3-Km-1) y KT2440, se cultivaron en medio LB líquido con los antibióticos correspondientes y se recogieron por centrifugación en fase de crecimiento exponencial (turbidez a 660 nm 0,5-0,6). Se prepararon lisados de células totales (W) y extractos del sobrenadante (S) de dichos cultivos celulares como se indicó en los apartados 14.1 y 14.2 de la sección *Materiales y Métodos*. Las distintas muestras se separaron por electroforesis en gel de poliacrilamida al 10% (p/v) con SDS y se tiñeron con nitrato de plata (A). Las proteínas separadas electroforéticamente se transfirieron a una membrana de PVDF y se realizó una detección inmonológica usando un anticuerpo policlonal contra la enzima periplásmica β -lactamasa (B). Los revelados se realizaron tanto por métodos colorimétricos (B) como por métodos quimioluminiscentes (no se muestra). Para el análisis de las muestras de sobrenadante de cultivos se utilizaron 0,5 equivalentes de DO_{660} -ml/calle y para el de los lisados de células totales 0,3 equivalentes/calle. En el margen izquierdo de cada panel se indican los tamaños correspondientes a los marcadores de peso molecular. La flecha situada a la derecha del panel (B) indica el tamaño de la proteína β -lactamasa.

6.3.3. Funcionamiento de las bombas de eflujo. Acumulación de [14 C]-tolueno y [14 C]-PHBA.

Con objeto de desvelar si el funcionamiento de las bombas que extruyen tolueno, o algún sistema de eflujo de PHBA en *P. putida* DOT-T1E, pudiera haber resultado afectado en la cepa mutante PhoA5, se llevaron a cabo ensayos de acumulación de [14 C]-tolueno y [14 C]-PHBA en la cepa PhoA5 en colaboración con la Dra. Ramos

González y la técnico M^a Jesús Campos. En el **apartado 6.1** de este capítulo de *Resultados* se puso de manifiesto la incapacidad de la cepa PhoA5 para utilizar PHBA como única fuente de carbono. Sin embargo, el primer producto derivado del metabolismo del PHBA, PCA, sí pudo sostener el crecimiento del mutante PhoA5, de manera que una acumulación de [¹⁴C]-PHBA no sería consecuencia de la incorporación en forma de esqueletos carbonados. Por esta razón, en las determinaciones de acumulación de [¹⁴C]-PHBA se utilizó como cepa control el mutante DOT-T1E*pobA* (Ramos-González *et al.*, 2001), un derivado de DOT-T1E afectado en el primer paso del metabolismo de PHBA y, por consiguiente, incapaz de utilizar dicho compuesto como fuente de carbono. Con la misma lógica, en las determinaciones de acumulación de [¹⁴C]-tolueno se utilizó como cepa control el mutante DOT-T1E Δ *todC* de DOT-T1E, incapaz de metabolizar tolueno (Godoy *et al.*, 1991; Ramos-González *et al.*, en preparación). Las células de la cepa silvestre DOT-T1E, del mutante PhoA5 y la cepa control correspondiente se cultivaron, según el ensayo, en ausencia de los compuestos aromáticos o en presencia de concentraciones subletales de PHBA (5 mM) o tolueno (suplementado vía la fase gaseosa). Los resultados se muestran en las **Figuras R.2.24 y R.2.25**.

Independientemente de las condiciones de crecimiento, el mutante PhoA5 acumuló tolueno a mayor velocidad que la cepa control DOT-T1E Δ *todC* (**Fig R.2.24**). Esta acumulación fue más evidente con células no expuestas a tolueno en el caso de la cepa control Δ *todC*: Mientras que el nivel de tolueno acumulado en las células de la cepa control permaneció relativamente estable, el tolueno acumulado en las células de PhoA5 se incrementó uniformemente a lo largo del tiempo que duró el ensayo, independientemente de la pre-exposición al compuesto aromático.

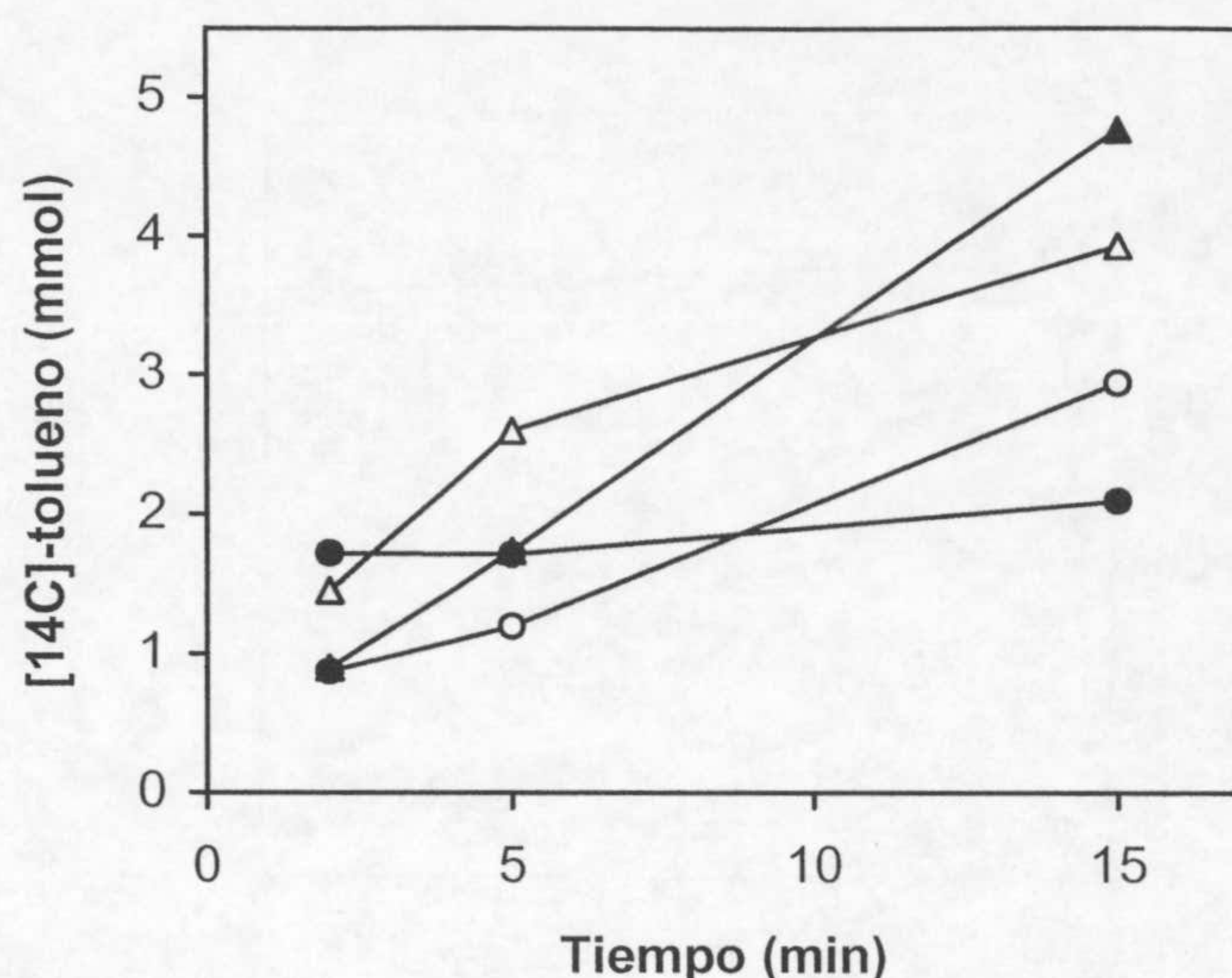


Figura R.2.24. Acumulación de $[^{14}\text{C}]$ -tolueno en *P. putida*. Células de *P. putida* DOT-T1E Δ todC (○,●) y PhoA5 (△,▲) se cultivaron en agitación en medio LB en ausencia (símbolos huecos) y en presencia (símbolos rellenos) de tolueno suministrado en la fase gaseosa hasta alcanzar una DO_{660} de 0,7-1. Se recogieron las células por centrifugación, se lavaron con medio LB, y se concentraron en 4 ml del mismo medio para alcanzar una turbidez a 660 nm de 3. Las células se mantuvieron a 30 °C y en agitación. Seguidamente se añadieron a los cultivos 4 μCi $[^{14}\text{C}]$ -tolueno (Sigma, cat. no. T7027-14C) (actividad específica 120 $\mu\text{Ci}/\mu\text{mol}$) para alcanzar una concentración subletal de tolueno del 0,075% (v/v). Se tomaron muestras de 400 μl a los tiempos indicados y se filtraron a través de filtros de nitrocelulosa (Millipore Corp, cat. no HAWP02500) de 0,45 μm de diámetro de poro aplicando vacío, utilizando para ello un colector 1225 de filtración múltiple (Millipore, cat. no. XX2702550). Los filtros con las células se lavaron con 1 ml de LB por filtración y una vez secos, se depositaron en viales de centelleo a los que se añadieron 4 ml de líquido de centelleo. El número de cuentas por minuto (CPM) se determinó utilizando un contador de centelleo PACKARD RADIOMETER modelo 1.500-TRI-CARB. Se muestran los resultados de un ensayo representativo escogido de entre tres ensayos independientes.

En cuanto al $[^{14}\text{C}]$ -PHBA, el mutante PhoA5 también acumuló cantidades de PHBA mayores que la cepa control DOT-T1E Δ pobA (**Figura R.2.25**). Las células de PhoA5 acumularon por encima de 75.000 cpm por unidad de densidad celular durante los primeros 45 minutos (200 nmol por unidad de turbidez celular por minuto), alcanzando posteriormente un grado de saturación del compuesto en torno a 100.000 cpm. En cambio, en el mutante DOT-T1E Δ pobA la acumulación de $[^{14}\text{C}]$ -PHBA fue despreciable a corto plazo, alcanzando un máximo del 10% del nivel encontrado en la cepa PhoA5 tras 19 horas (15 nmol por unidad de turbidez celular por minuto) (**Figura R.2.25**).

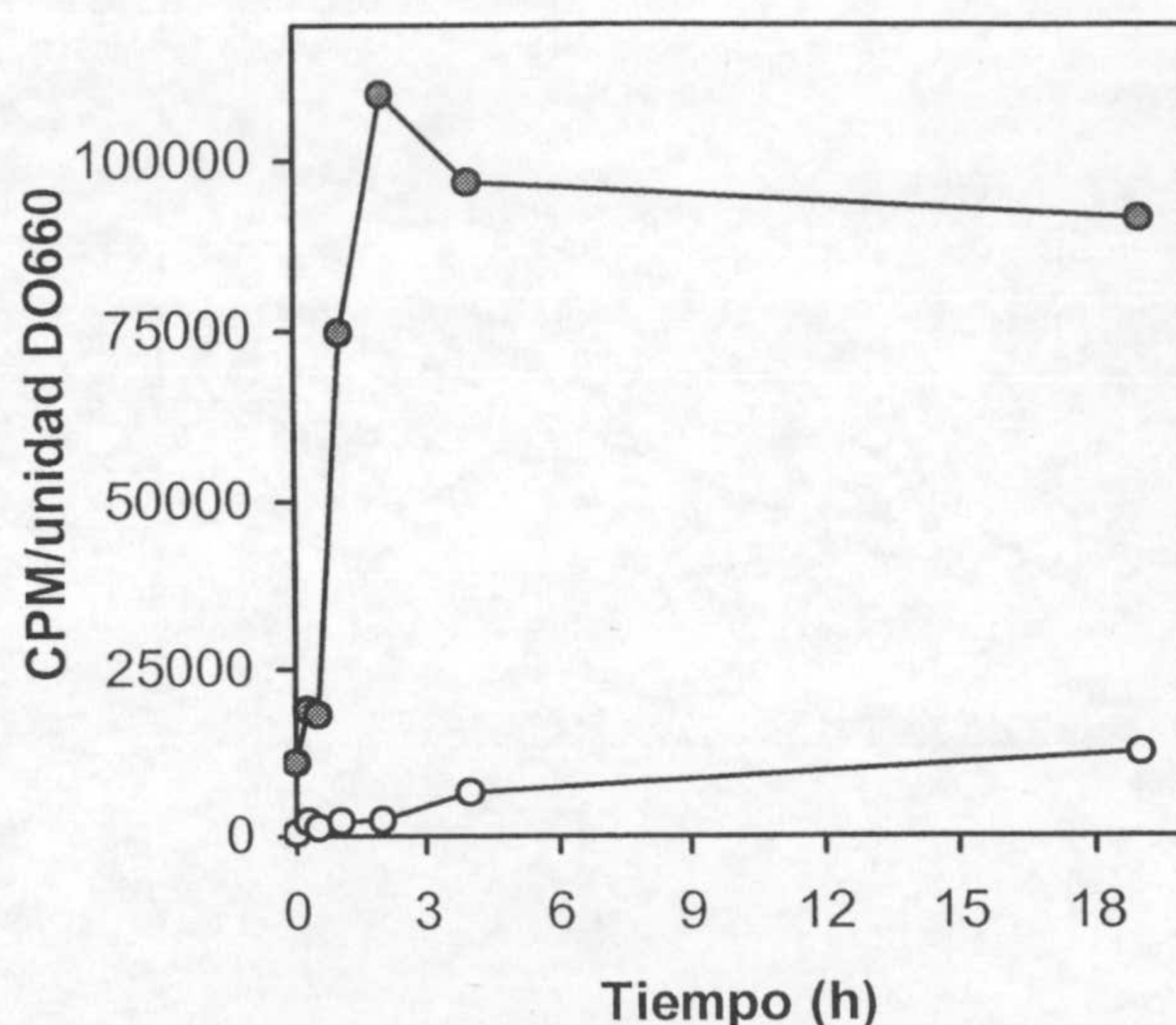


Figura R.2.25. Acumulación de [¹⁴C]-PHBA en células de *P. putida*. Células de *P. putida* DOT-T1EpoB (○) y PhoA5 (●) se cultivaron en medio mínimo M9-glucosa y 5 mM de PHBA con agitación hasta alcanzar la fase logarítmica tardía de crecimiento (DO₆₆₀ 0,7-1,0). Las células se lavaron en tampón 1xM9, se concentraron en 2 ml de medio mínimo M9 suplido con 0,3% (p/v) de glucosa hasta una DO₆₆₀ final de 2,5 y las células se incubaron a 30°C en agitación durante 10 minutos. A continuación, se añadieron 1,5 μCi de [¹⁴C]-PHBA (Sigma, cat. no. H9763-14C; actividad específica 11,5 mCi/mmol) en 2 ml del mismo medio mínimo M9 sin fuente de carbono, de manera que la concentración de glucosa en el ensayo fue 0,15% (p/v), una concentración suficiente para mantener el requerimiento energético necesario para mantener el metabolismo. Se tomaron alícuotas de 400 μl a los tiempos indicados que se filtraron a través de una membrana de nitrocelulosa de 0.45 μm de diámetro de poro, (Millipore Corp., cat. no. HAWP02500) en un colector 1225 para filtración múltiple (Millipore Corp., cat. no. XX2702550). Las membranas con las células se lavaron por filtración con 3 ml de tampón 1xM9 suplido con PHBA (5 mM) para evitar la salida de PHBA de las células por difusión pasiva. Las CPM se midieron en un contador de centelleo PACKARD RADIOMETER, como se describe en la leyenda de la **Figura R.2.24**. Cada experimento se realizó al menos por duplicado. En la figura se muestran los resultados de un ensayo representativo.

7. COMPLEMENTACIÓN POR HIERRO DEL FENOTIPO PLEIOTRÓPICO DEL MUTANTE PhoA5.

TonB es una proteína de membrana interna que atraviesa el espacio periplásmico y transduce la energía del potencial de la membrana citoplasmática a receptores de la membrana externa implicados en la entrada de hierro Fe³⁺ y vitamina B₁₂ (ver revisión

de Earhart, 1996). ExbB y ExbD asisten a TonB en su función. El hallazgo de que el mutante PhoA5 presentara la inserción del mini-Tn5 en *exbD* y, por tanto, se viera afectado el sistema TonB, condujo a estudiar si en dicho mutante pudiera estar comprometida la entrada de hierro a la célula. Debido a que mutaciones en *exbD* producen en otros organismos una deficiencia en el transporte de Fe^{3+} (Postle, 1990a), se ensayó el efecto de la adición de 6 ó 60 mg/ml de $FeCl_3$ a medio LB sólido sobre el fenotipo mutante de esta cepa, en cuanto a la formación de colonias en dicho medio. La adición de $FeCl_3$ restauró la capacidad del mutante PhoA5 para formar colonias bien definidas en medio LB tras incubación a 30°C durante 24 horas, a semejanza de la cepa silvestre.

7.1. Efecto del hierro sobre la tolerancia a PHBA y el crecimiento en dicha fuente de carbono.

En la caracterización fisiológica del mutante PhoA5, se hacía patente su incapacidad para utilizar PHBA como fuente de carbono, así como su mayor sensibilidad a dicho ácido hidroxilado aromático. Se estudió el efecto de la adición de un suplemento de $FeCl_3$ (60 μ g/ml) sobre este fenotipo en placas de medio mínimo M9 con un gradiente de PHBA (0-10 g/l) suplidas o no con glucosa como fuente de carbono. Mientras que la cepa silvestre formó un césped denso e incoloro sobre la placa en todas las condiciones, por el contrario, en ausencia de glucosa, la cepa mutante no creció sin suplemento adicional de hierro, y sólo se observó un ligero crecimiento en aquellas placas con suplemento extra de hierro. En las placas correspondientes al mutante PhoA5 se observó un color violeta-púrpura (**Figura R.2.26**). Estos resultados sugieren que aunque el hierro no fue esencial para la tolerancia a PHBA en el mutante PhoA5, la presencia de este elemento hierro en el medio se tradujo en una mayor definición del frente de crecimiento en la cepa PhoA5, como consecuencia de alcanzar una mayor densidad de crecimiento.

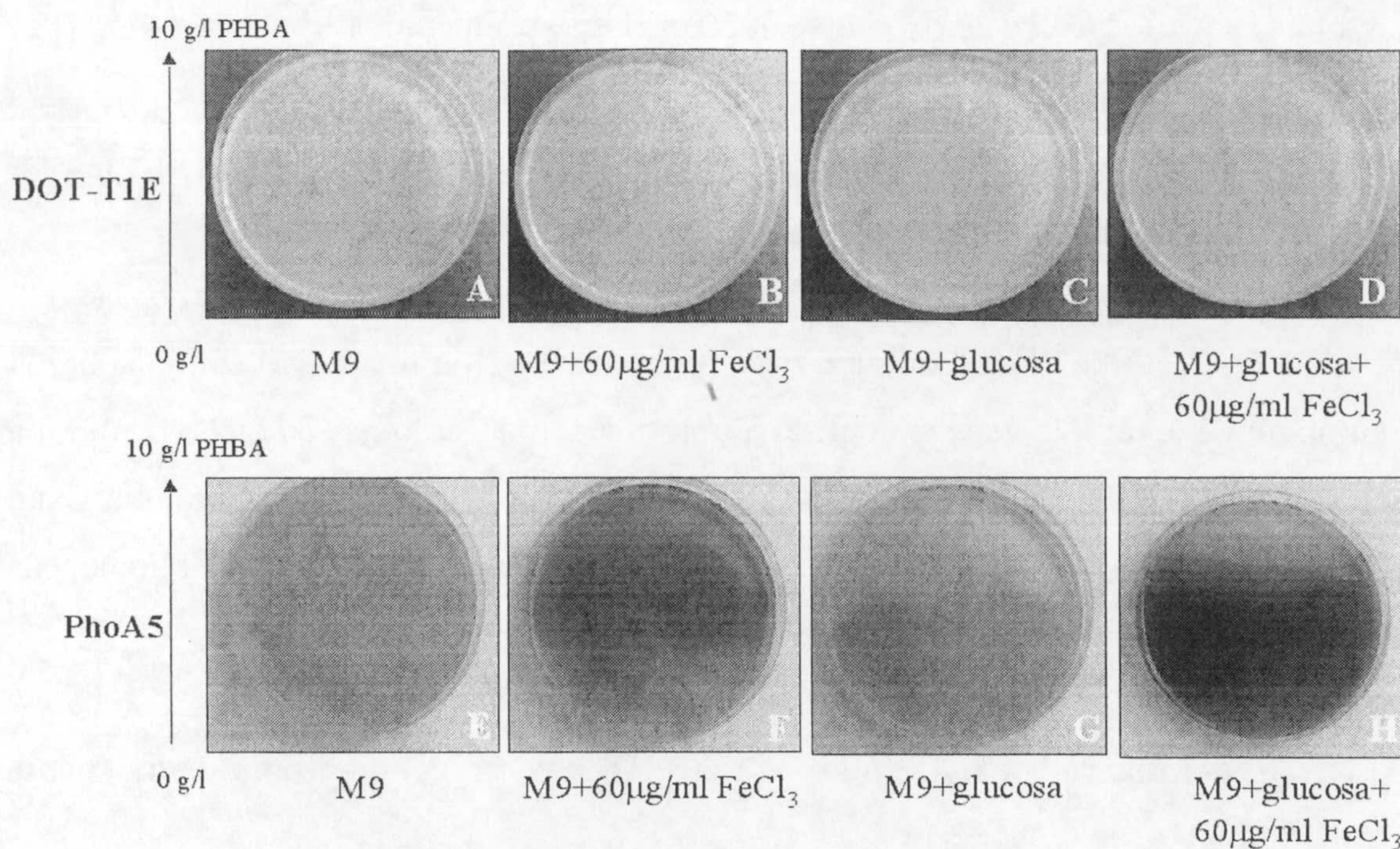


Figura R.2.26. Efecto de un suplemento extra de hierro sobre el crecimiento y la tolerancia de *P. putida* DOT-T1E y el mutante PhoA5 en placas de doble difusión con gradiente de PHBA. Cultivos de 14-16 h de *P. putida* DOT-T1E y PhoA5 en medio mínimo M9-glucosa se diluyeron 50 veces en el mismo medio y cuando alcanzaron una turbidez a 660 nm de 0,8, se sembraron alícuotas como se describe en el apartado 4.3 de *Materiales y Métodos* en placas de medio mínimo M9 con un gradiente de 0-10 g/l de PHBA, en ausencia y en presencia de glucosa (0,5%, p/v), con y sin un suplemento extra de 60 µg/ml de FeCl₃.

También se comprobó si un suplemento de hierro restauraba el crecimiento del mutante PhoA5 en PHBA en medio líquido. Los resultados obtenidos se muestran en la **Tabla R.2.11**. En dicho mutante PhoA5, el número de UFC/ml sólo se incrementó con respecto al número inicial cuando se adicionó al medio el suplemento extra de hierro, si bien no se alcanzaron los niveles de la cepa silvestre.

Tabla R.2.11. Efecto de un suplemento de hierro sobre el uso de PHBA como fuente de carbono.^a

	DOT-T1E		PhoA5	
	Inicial	Final	Inicial	Final
-FeCl ₃	3,5 x 10 ⁷	9,5 x 10 ⁸	3,5 x 10 ⁷	5 x 10 ⁷
+FeCl ₃	4 x 10 ⁷	1 x 10 ⁹	3,3 x 10 ⁷	4 x 10 ⁸

^a Cultivos de 14-16 horas de las cepas silvestre y mutante, DOT-T1E y PhoA5, en medio mínimo M9-glucosa, se centrifugaron y, tras descartar el sobrenadante, se resuspendieron a una turbidez a 660 nm de

0,1 en medio mínimo M9 con PHBA (3 g/l) en ausencia total o en presencia de un suplemento de FeCl_3 (60 $\mu\text{g/ml}$). Los números indican las medidas de UFC/ml al inicio y transcurridas 24 horas.

7.2. Tolerancia a un choque de PHBA.

En cuanto al efecto del hierro sobre la supervivencia a un choque por PHBA, los resultados se muestran en la **Figura R.2.27**. Aunque el suplemento extra de hierro no constituyó una ventaja para la cepa silvestre, sí tuvo un efecto significativo sobre la supervivencia del mutante PhoA5, de manera que la supervivencia de células de esta cepa a un choque por PHBA (12 g/l) alcanzó el 100%, frente al 0,001‰ sin adición extra de hierro; a una concentración mayor (18 g/l), aunque la supervivencia no fue total, sin embargo el 0,01‰ de las células sobrevivió al choque.

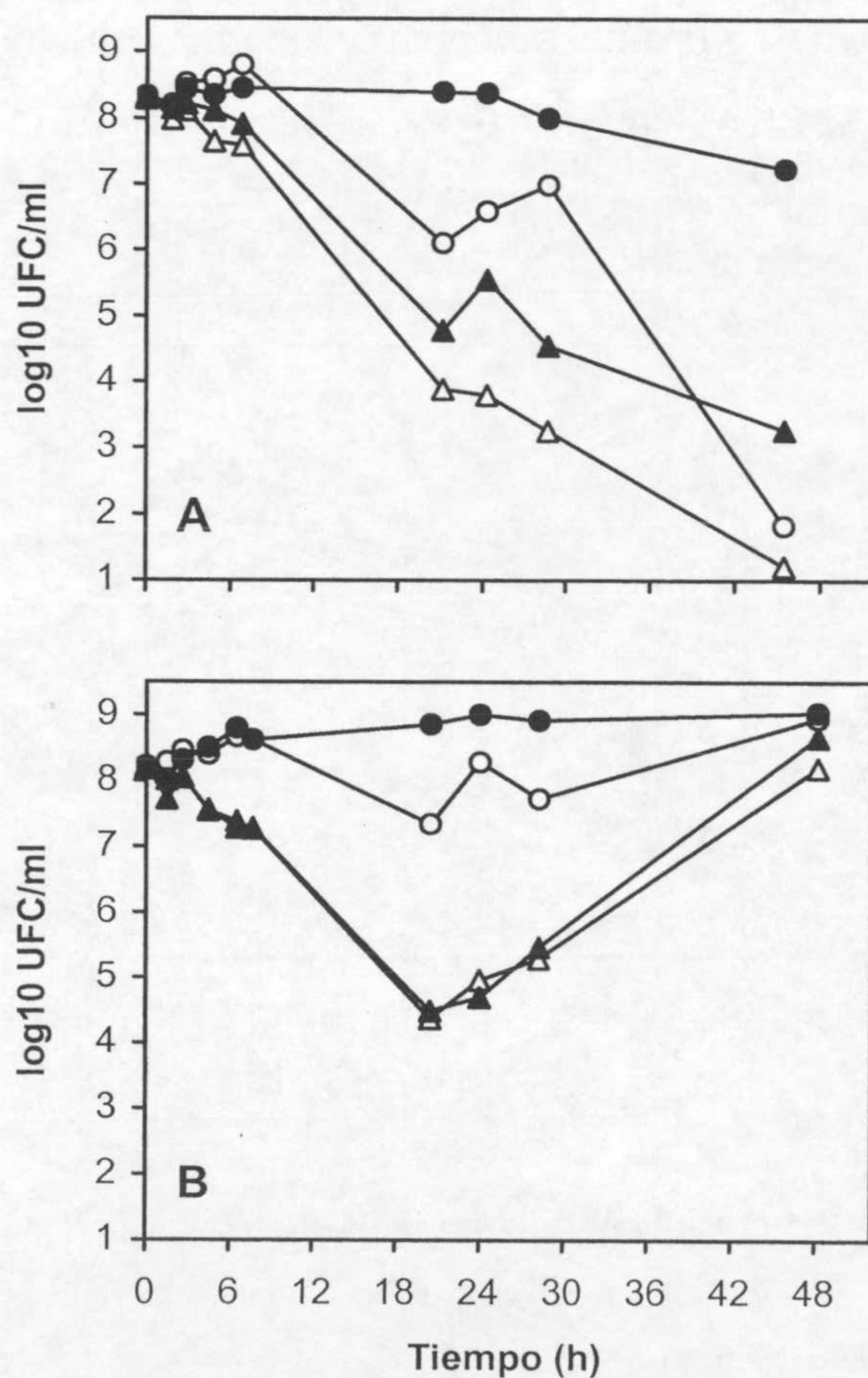


Figura R.2.27. Efecto de un suplemento de hierro sobre la tolerancia a un choque de PHBA en *P. putida* DOT-T1E y el mutante PhoA5. Cultivos de la cepa mutante PhoA5 (A) y de la cepa silvestre (B) en medio mínimo M9-glucosa con una turbidez a 660 nm de 1 se dividieron en dos alícuotas, una se

mantuvo como control (símbolos huecos) y a la otra se añadió 60 $\mu\text{g/ml}$ FeCl_3 (símbolos rellenos). A su vez, cada una de estas alícuotas se subdividió, y se las sometió a un choque por PHBA a 12 (\circ, \bullet) y 18 ($\triangle, \blacktriangle$) g/l. Se siguió la supervivencia mediante la determinación en el tiempo del número de UFC/ml.

7.3. Efecto de un quelante de hierro sobre el crecimiento.

Ante la observación de que un suplemento de hierro podía complementar el fenotipo mutante de PhoA5, al menos en algunas de sus manifestaciones, se hicieron estudios en condiciones de limitación extrema de hierro, en un medio deficiente en hierro como es el MB2 (Gilleland *et al.*, 1974) y en presencia del quelante de hierro EDDHA (Bitter *et al.*, 1993; Watanabe *et al.*, 1987). El crecimiento de las cepas silvestre y mutante en dicho medio MB2 suplido con glucosa y EDDHA se muestra en la **Figura R.2.28**. Mientras que el quelante de hierro no tuvo ningún efecto sobre el crecimiento de la cepa silvestre, el crecimiento del mutante PhoA5 resultó severamente inhibido en presencia del quelante. Dicho crecimiento quedó restaurado cuando se añadió a los cultivos FeCl_3 (6 $\mu\text{g/ml}$). Estos resultados confirmaron la deficiencia en hierro en la cepa mutante PhoA5.

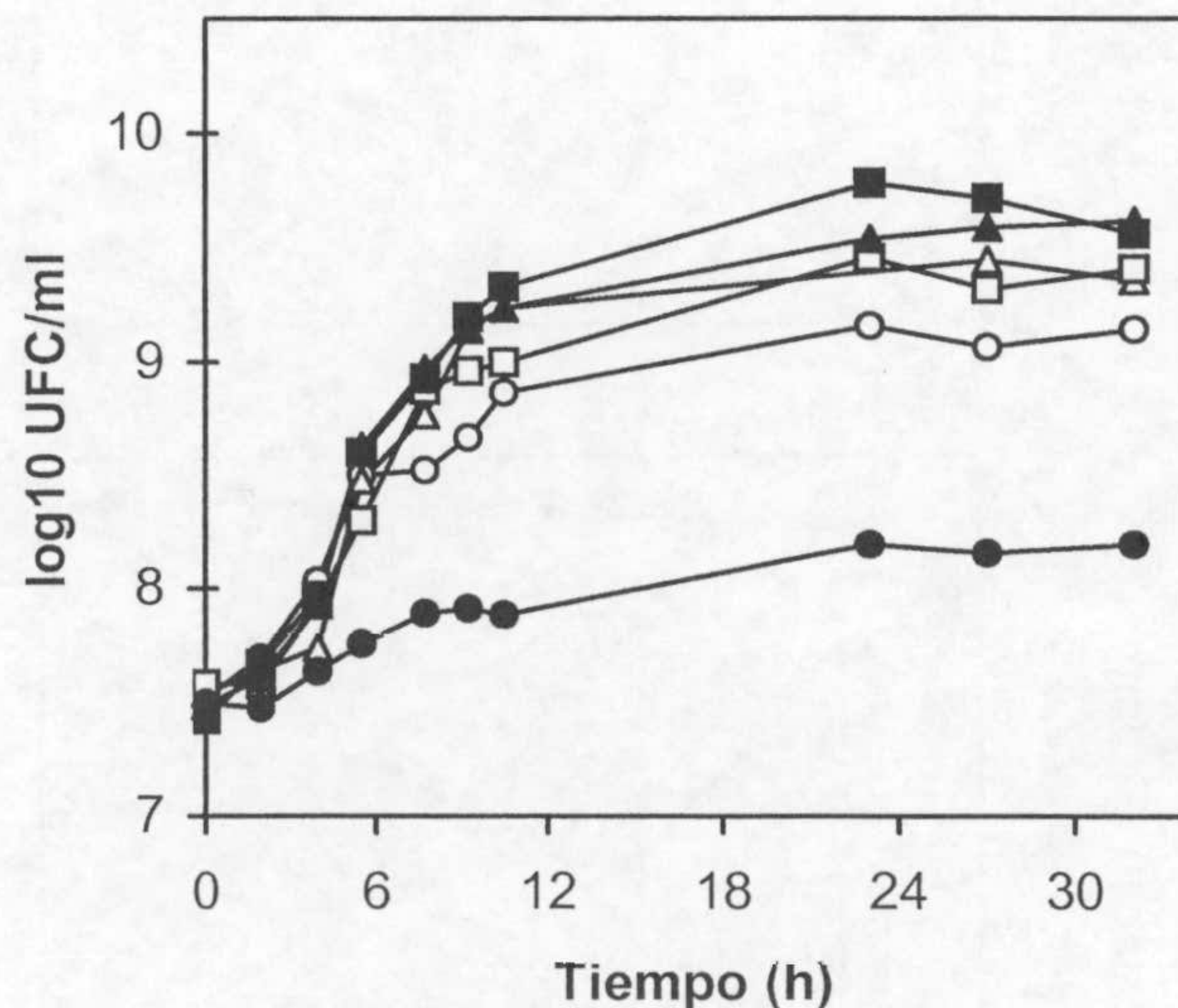


Figura R.2.28. Inhibición del crecimiento del mutante PhoA5 en presencia del quelante de hierro EDDHA. Cultivos de 14-16 h de la cepa silvestre DOT-T1E (símbolos huecos) y del mutante PhoA5 (símbolos rellenos) en medio mínimo MB2 suplido con glucosa se diluyeron 100 veces en el mismo medio en presencia de EDDHA (3 $\mu\text{g/ml}$). Estos cultivos se dividieron en tres alícuotas y, mientras que una de ellas se mantuvo como control, a las otras dos se añadió FeCl_3 alternativamente (6 ó 60 $\mu\text{g/ml}$). \circ, \bullet : 3 $\mu\text{g/ml}$ de EDDHA; $\triangle, \blacktriangle$: 3 $\mu\text{g/ml}$ de EDDHA y 6 $\mu\text{g/ml}$ de FeCl_3 ; \square, \blacksquare : 3 $\mu\text{g/ml}$ de EDDHA y 60 $\mu\text{g/ml}$ de FeCl_3 .

7.4. Expresión del operón *exbBDtonB* en el mutante PhoA5.

En el análisis de la secuencia del inserto de pPAT5, en la región reguladora del cluster de genes *exbBDtonB*, se detectó una posible secuencia de caja *fur*, donde se une el regulador Fur, que modula la expresión, entre otros, de genes con funciones relacionadas con la entrada de hierro (ver *Introducción*). La fusión traduccional de *exbD* a '*phoA* generada en el mutante PhoA5 permitía realizar estudios de expresión del promotor P_{exbB} en diferentes condiciones, mediante medidas de actividad fosfatasa alcalina. Los resultados del efecto del hierro sobre la expresión a partir de dicho promotor, en diversos medios de cultivo, se muestran en la **Figura R.2.29**.

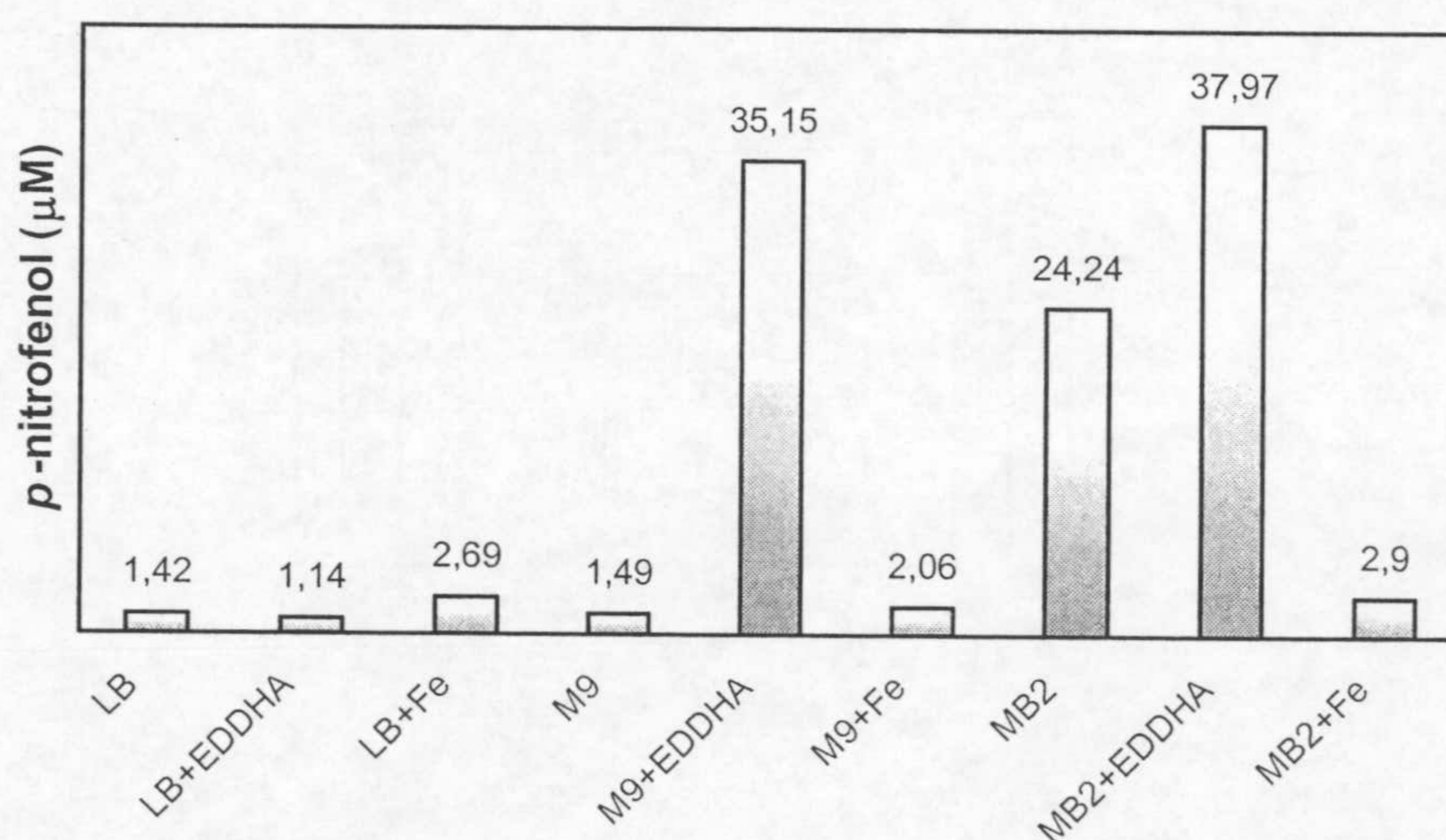


Figura R.2.29. Efecto del hierro sobre la expresión del operón *exbBDtonB* de *P. putida* DOT-T1E. La actividad fosfatasa alcalina se midió en la fase estacionaria de crecimiento en diferentes medios de cultivo: LB, M9 y MB2 suplido o no con EDDHA (3 mg/ml) y alternativamente con FeCl₃ (60 µg/ml). La turbidez a 660 nm se normalizó a 1 en las muestras. En la determinación de la actividad fosfatasa alcalina se evaluó como la concentración del *p*-nitrofenol formado en la reacción.

En LB se detectaron bajos niveles de actividad fosfatasa alcalina, produciéndose menos de 3 µM de producto (*p*-nitrofenol) en todas las situaciones ensayadas, tanto en presencia del quelante como con un suplemento extra de hierro. La limitación de hierro impuesta por la adición del quelante al medio mínimo, ya fuera M9 o MB2, condujo a una producción de *p*-nitrofenol aproximadamente 30 veces mayor que en LB. Con células cultivadas en medio MB2 se produjo más de 15 veces más *p*-nitrofenol incluso en ausencia del quelante, como se esperaba de un medio con menor concentración en

hierro que el M9. El efecto de añadir un suplemento extra de hierro al medio mínimo redujo la producción de *p*-nitrofenol a prácticamente los niveles detectados en LB.

7.5. Tolerancia a tolueno.

Un mecanismo fundamental de la tolerancia a tolueno lo constituyen las bombas de eflujo (Ramos *et al.*, 1998; Rojas *et al.*, 2001). Dado que la tolerancia a tolueno se encuentra comprometida en el mutante PhoA5 y que este mutante es deficiente en hierro, se estudió el efecto del hierro sobre la tolerancia a un choque por tolueno. Los resultados se muestran en la **Figura R.2.30**.

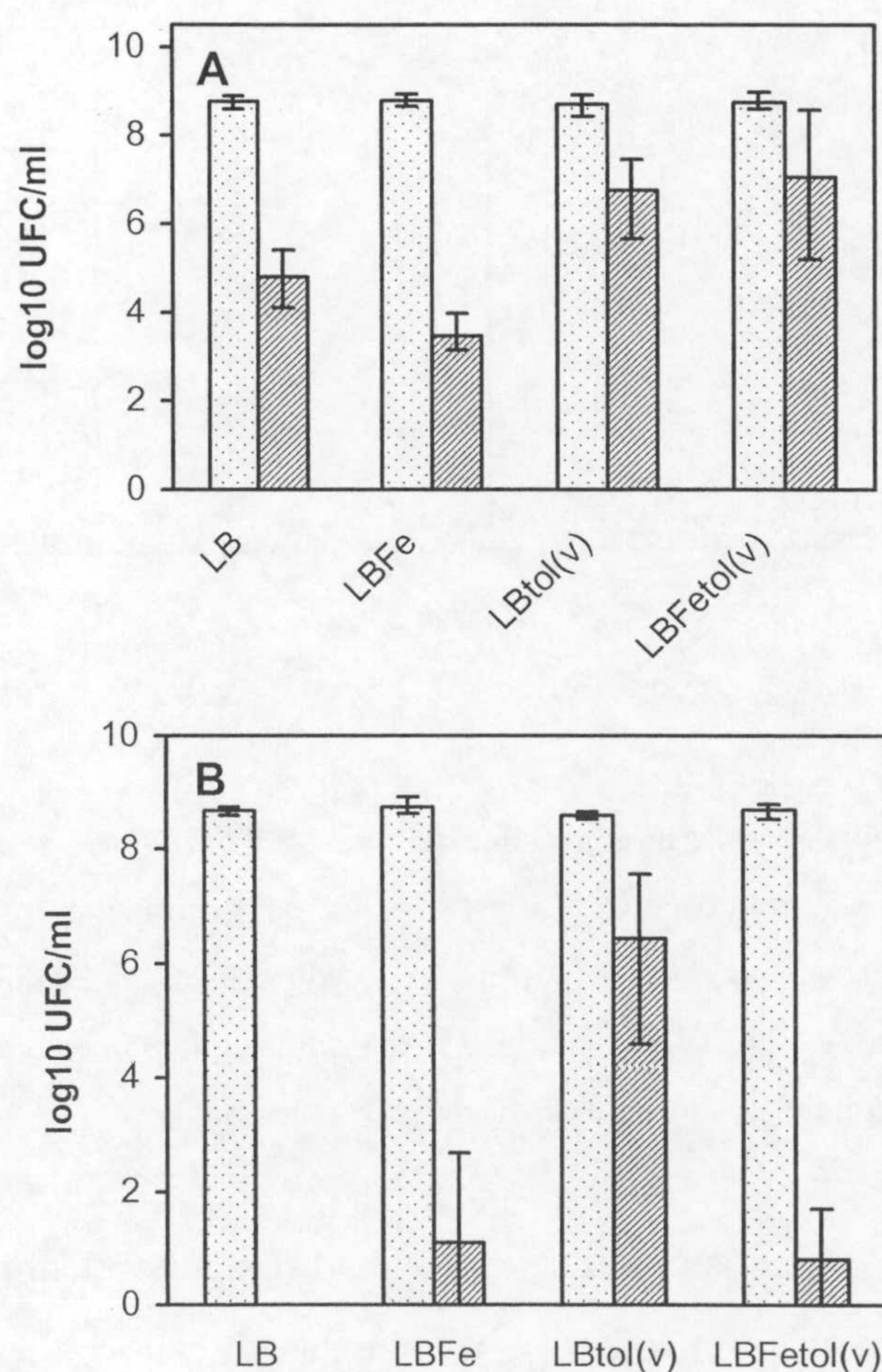


Figura R.2.30. Efecto de un suplemento de hierro sobre la supervivencia de *P. putida* DOT-T1E y PhoA5 a un choque de tolueno. Cultivos de 14-16 h de *P. putida* DOT-T1E (A) y de PhoA5 (B) en LB en presencia o en ausencia de tolueno en la fase gaseosa y suplementado o no con 60 μ g/ml de FeCl₃, se diluyeron 100 veces en los mismos medios y cuando alcanzaron una turbidez a 660 nm de 0,8, fueron sometidos a un choque de tolueno (0,3%, v/v). La supervivencia se determinó cuantificando las UFC/ml a tiempo 0 (antes de añadir el tolueno) (columnas punteadas) y 10 minutos después de añadir el disolvente (columnas rayadas). Las barras de error representan la desviación estándar de tres ensayos diferentes.

Como se describió en el **apartado 6.2.4** del presente capítulo de *Resultados*, la preincubación en tolueno confería una mayor tolerancia al disolvente que se traducía en un aumento en la supervivencia ante un choque por tolueno. Para la cepa silvestre, un suplemento extra de hierro al medio condujo a una ligera pérdida de viabilidad en células que no estaban preinducidas, no observándose diferencias dependientes del hierro en las células preinducidas. En el caso del mutante PhoA5, el suplemento extra de hierro fue responsable de la pérdida de inducción de la tolerancia, no observándose diferencias en la supervivencia de células inducidas y no inducidas.

8. COMPLEMENTACIÓN DE LA MUTACIÓN DE *P. putida* PhoA5 POR LA REGIÓN *exbBDtonB* SILVESTRE.

El inserto *Pst*I de 4 kb de pPAT5, que contiene el clúster de genes *exbBDtonB* de la cepa silvestre DOT-T1E (ver **Figura R.2.3**), se subclonó en el sitio *Pst*I del plásmido de amplio espectro de huésped pJB3-Tc19 (Blatny *et al.*, 1997), obteniéndose así el plásmido pPAT7.

El plásmido pJB3-Tc19 y su derivado recombinante pPAT7 se transfirieron mediante conjugación “tripartita” a la cepa silvestre *P. putida* DOT-T1E y al mutante PhoA5. Los transconjugantes se seleccionaron en medio sólido LB suplementado con rifampicina y tetraciclina, o kanamicina y tetraciclina, respectivamente. Los ensayos, cuyos resultados se exponen a continuación, se realizaron para estudiar la complementación del mutante PhoA5 por el operón *exbBDtonB* silvestre. El plásmido pPAT7 confería a PhoA5 la capacidad para formar colonias robustas en medio LB después de 24 h en placas de medio LB sin necesidad de un suplemento adicional de hierro. Otras deficiencias en el crecimiento que se subsanaron en PhoA5 con la adquisición de pPAT7 fueron la reducción del tiempo de generación en el medio mínimo deficiente en hierro MB2, así como la capacidad para utilizar PHBA como única fuente de carbono y formar colonias en placas de medio mínimo M9 suplido con PHBA (6 g/l). Asimismo, el mutante PhoA5 con el plásmido pPAT7 toleró concentraciones de antibióticos como tetraciclina, ciprofloxacina, cefotaxina, imipenem similares a los niveles tolerados por la cepa silvestre (**Figuras R.2.31A y E**).

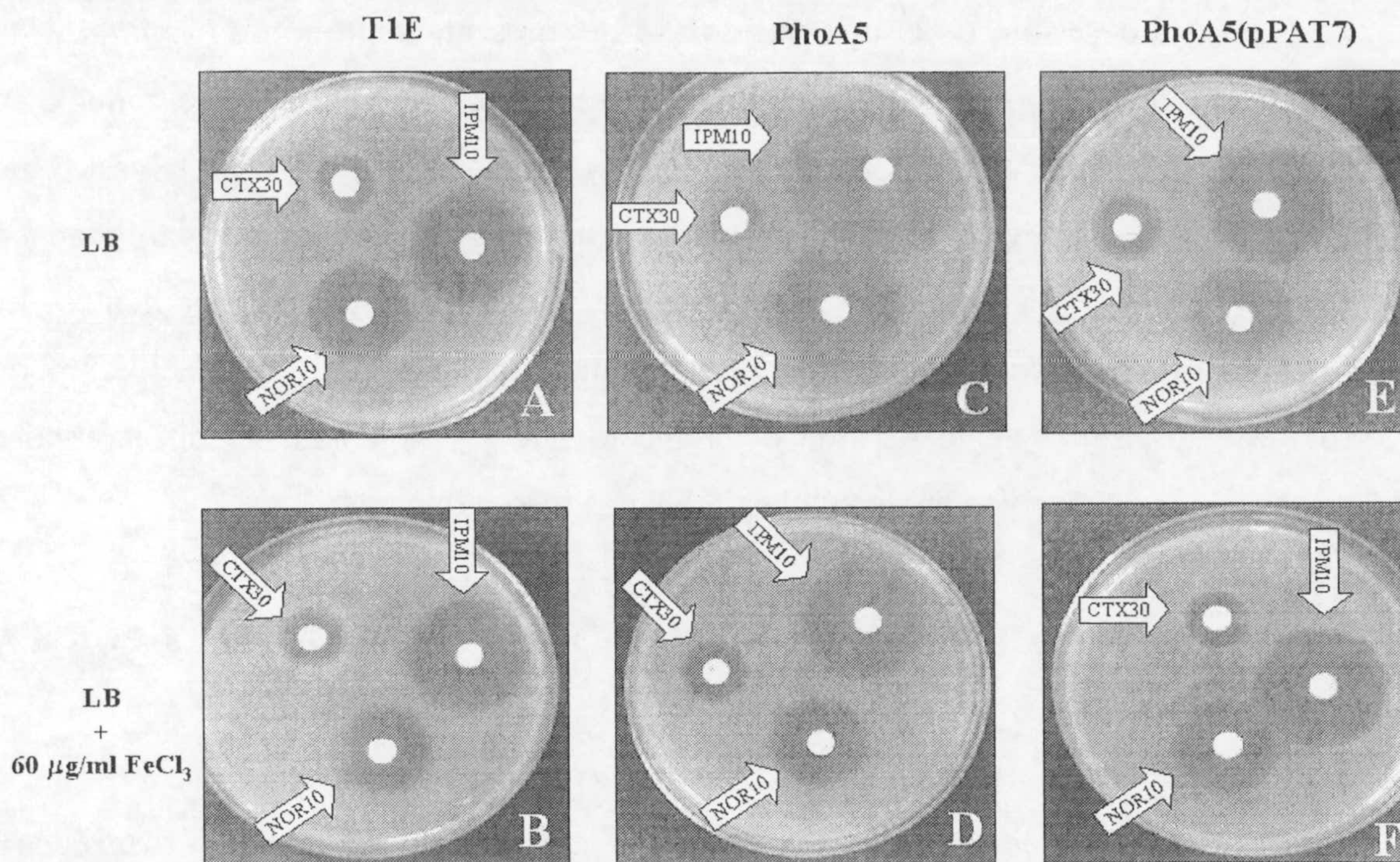


Figura R.2.31. Efecto de un suplemento de hierro sobre la susceptibilidad a antibióticos de la cepas *P. putida* DOT-T1E, PhoA5 y PhoA5 (pPAT7). Cultivos de 14-16 h en LB se diluyeron 100 veces en el mismo medio y se incubaron a 30°C en agitación hasta alcanzar una DO_{600} de 0,8. Para determinar la inhibición del crecimiento por los antibióticos, se procedió como se indicó en el apartado 4.1.1 de la sección *Materiales y Métodos*, utilizando placas de LB con y sin un suplemento de 60 µg/ml de $FeCl_3$. En la foto se muestra un ejemplo con tres de los antibióticos probados: CTX (cefotaxin), 30 µg; IMP (imipenem), 10 µg y NOR (norfloxacin), 10 µg.

De igual modo, se ejerció la complementación sobre la tolerancia a aromáticos, PHBA y parabenos, de manera que la tolerancia al ácido aromático hidroxilado alcanzó niveles similares a los de la cepa silvestre (del orden de 15-17 g/l PHBA). Si bien no se observó un efecto positivo sobre la tolerancia a PHBA y antibióticos como consecuencia de un suplemento de hierro en presencia del clúster *exbBDtonB* silvestre (**Figuras R.2.31E y F**), la presencia de hierro se tradujo en una mejor definición de los halos de inhibición por antibióticos en la cepa PhoA5, como consecuencia de la mayor densidad de crecimiento alcanzada (**Figuras R.2.31C y D**).

La tolerancia a un choque por tolueno de las células preinducidas por tolueno quedó parcialmente restablecida en el mutante PhoA5 portando el plásmido pPAT7 (**Figura R.2.32**). Estas células fueron más tolerantes que en el caso de PhoA5, mostrando una supervivencia del 0,01%, casi tres órdenes de magnitud superior que en

el mutante, y a su vez un valor inferior en tres órdenes de magnitud al silvestre. En el caso de células no preinducidas, la supervivencia fue similar para PhoA5(pPAT7) y la cepa silvestre.

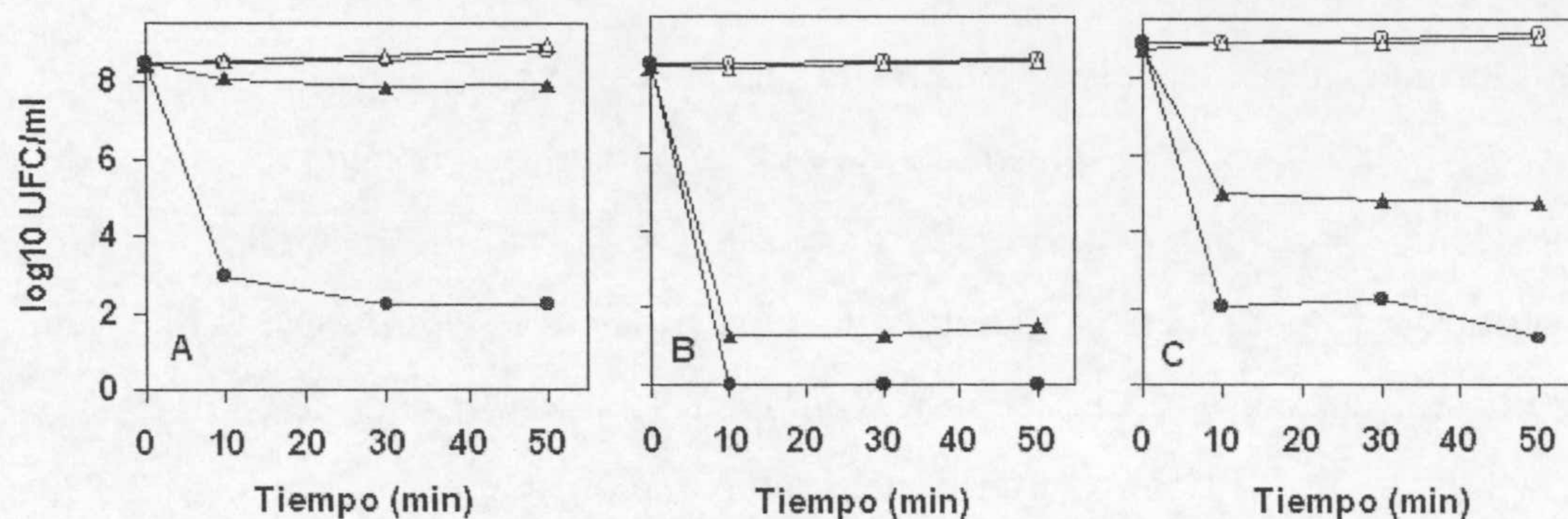


Figura R.2.32. Complementación parcial por los genes *exbBDtonB* de la tolerancia a un choque por tolueno en PhoA5. Cultivos de 14-16 h de *P. putida* DOT-T1E (A), PhoA5 (B) o PhoA5(pPAT7) (C) en medio LB se diluyeron 50 veces en el mismo medio de cultivo en ausencia (○,●) y en presencia (△,▲) de tolueno en la fase gaseosa. Cuando los cultivos alcanzaron una turbidez a 660 nm de alrededor de 1 se dividieron en dos alícuotas, manteniendo una como control (símbolos huecos) y a la otra se le añadió tolueno al 0,3% (v/v) (símbolos rellenos). Se determinó el número de UFC/ml a los tiempos indicados. La cinética se repitió con tres cultivos independientes y en la figura se muestra un resultado que, aunque obtenido con uno de los cultivos, representa la tendencia en todos los experimentos.

La presencia de pPAT7 no confirió un aumento significativo en la tolerancia natural de la cepa silvestre a PHBA, tolueno, aminoácidos aromáticos o antibióticos.

El aislamiento de un cósmido portador de los genes *exbBDtonB* de *P. putida* KT2440 se realizó por complementación del mutante PhoA5 al adquirir la capacidad de crecimiento en PHBA como única fuente de carbono y energía. Este cósmido, denominado pMIR54, complementó el fenotipo pleiotrópico del mutante PhoA5 en la misma medida que lo hizo pPAT7.

9. EFECTO DE UN INCREMENTO DE LA EXPRESIÓN DE LOS GENES *exbBDtonB* SOBRE LA TOLERANCIA A PHBA.

En el **apartado 8** de este capítulo de *Resultados* se mostró que la presencia de los genes *exbBDtonB* en el mutante PhoA5 condujo al restablecimiento de la tolerancia a PHBA a los niveles de la cepa silvestre. Basándonos en este resultado, se consideró la posibilidad de incrementar la dosis de ExbB, ExbD y TonB para así analizar el efecto de

este incremento sobre la tolerancia a PHBA. Para ello se siguieron dos aproximaciones que consistieron en aumentar el número de copias y aumentar la expresión de los genes *exbBDtonB*, respectivamente.

En primer lugar, se clonó el cluster de genes *exbBDtonB*, contenido en un fragmento *Pst*I de 4,0 kb, en el plásmido pGV1120, para el que existen alrededor de 20 copias por célula (Leemans *et al.*, 1982), dando lugar al plásmido pPAT8. El plásmido pPAT8 se introdujo por electroporación en la cepa silvestre *P. putida* DOT-T1E y en el mutante PhoA5, así como en las cepas *P. putida* KT2440 y *P. mendocina* KR1, para evaluar la tolerancia a PHBA conferida, en comparación con el plásmido pPAT7, un derivado de pJB3-Tc, para el que existen unas tres copias por célula (Blatny *et al.*, 1997), y así poder evaluar el efecto de la dosis de ExbB, ExbD y TonB sobre la tolerancia a PHBA. La tolerancia se determinó en placas de doble difusión de medio mínimo M9 suplido con glucosa y un gradiente lineal de PHBA entre 0 y 25 g/l, como se describe en la sección de *Materiales y Métodos*. Los resultados se muestran en la **Tabla R.2.12**.

Tabla R.2.12. Efecto del número de copias del cluster *exbBDtonB* sobre la tolerancia a PHBA en *Pseudomonas*.^a

Cepa	pJB3-Tc ó pGV1120	Plásmido pPAT7	pPAT8
<i>P. putida</i> DOT-T1E	17	17	17
<i>P. putida</i> PhoA5	5	16	17
<i>P. putida</i> KT2440	17	17	18,5
<i>P. mendocina</i> KR1	8,5	10	10,2

^a Todas las cepas se cultivaron en medio mínimo M9 suplido con glucosa hasta alcanzar la fase exponencial media de crecimiento ($DO_{660}=0,8$). Entonces se sembraron alícuotas en placas de doble difusión de medio mínimo M9-glucosa y un gradiente de PHBA entre 0 y 25 g/l como se describe en el **apartado 4.3** de la sección de *Materiales y Métodos*. Las placas se incubaron a 30°C durante 24-48 horas. Los números constituyen los valores medios de tres ensayos diferentes y representan la concentración máxima que no presentó efecto sobre el crecimiento.

Los plásmidos pJB3-Tc y pGV1120 no ejercieron como tales ningún efecto sobre la tolerancia a PHBA (**Tabla R.2.12**). La introducción de los genes silvestres *exbBDtonB* en el mutante PhoA5 restauró la tolerancia a niveles similares a los de la

cepa silvestre de 5 a 16 g/l, independientemente del número de copias. *P. putida* DOT-T1E toleró hasta 17 g/l y la presencia de los plásmidos pPAT7 ó pPAT8 no supuso un incremento en la tolerancia. Un resultado similar se obtuvo con la cepa *P. putida* KT2440 (**Tabla R.2.12**). Por el contrario, la incorporación de pPAT7 a una bacteria más sensible a PHBA como fue *P. mendocina* KR1 sí supuso un incremento en la tolerancia a PHBA (desde 8,5 hasta 10 g/l). Sin embargo, el plásmido pPAT8 en ningún caso confirió un incremento en la tolerancia que alcanzara el 10% con respecto a pPAT7.

La segunda aproximación que se siguió con el objetivo de aumentar la dosis en el sistema ExbBDTonB fue sobreexpresar los genes *exbBDtonB* de DOT-T1E desde un promotor fuerte como es P_{trc} en el plásmido pCNB5 (de Lorenzo *et al.*, 1993). Para evitar interferencias con el promotor del propio operón *exbBDtonB*, se consideró un fragmento *StuI/PstI* de 3,28 kb procedente de pPAT5, que contenía el cluster de genes desprovisto del promotor para así generar el plásmido pPAT9. La construcción del plásmido pPAT11, en el cual se sobreexpresarían los genes *exbBDtonB* desde el promotor P_{trc} , se esquematiza en la **Figura R.2.33**.

El plásmido pPAT11 se transfirió a las cepas de la **Tabla R.2.12** de manera que la fusión transcripcional $P_{trc}::exbBDtonB$ contenida en el minitransposón, que está presente en el plásmido pPAT11, se insertó en el cromosoma. Como resultado de la sobreexpresión del cluster de genes, se incrementó la tolerancia a PHBA del mutante PhoA5 hasta los niveles de la cepa silvestre. En cambio, no se observó ningún efecto sobre la tolerancia a PHBA como consecuencia de la incorporación de dicha fusión en el cromosoma de las cepas silvestres *P. putida* DOT-T1E y *P. mendocina* KR1, hecho similar al que se observó con pPAT8.

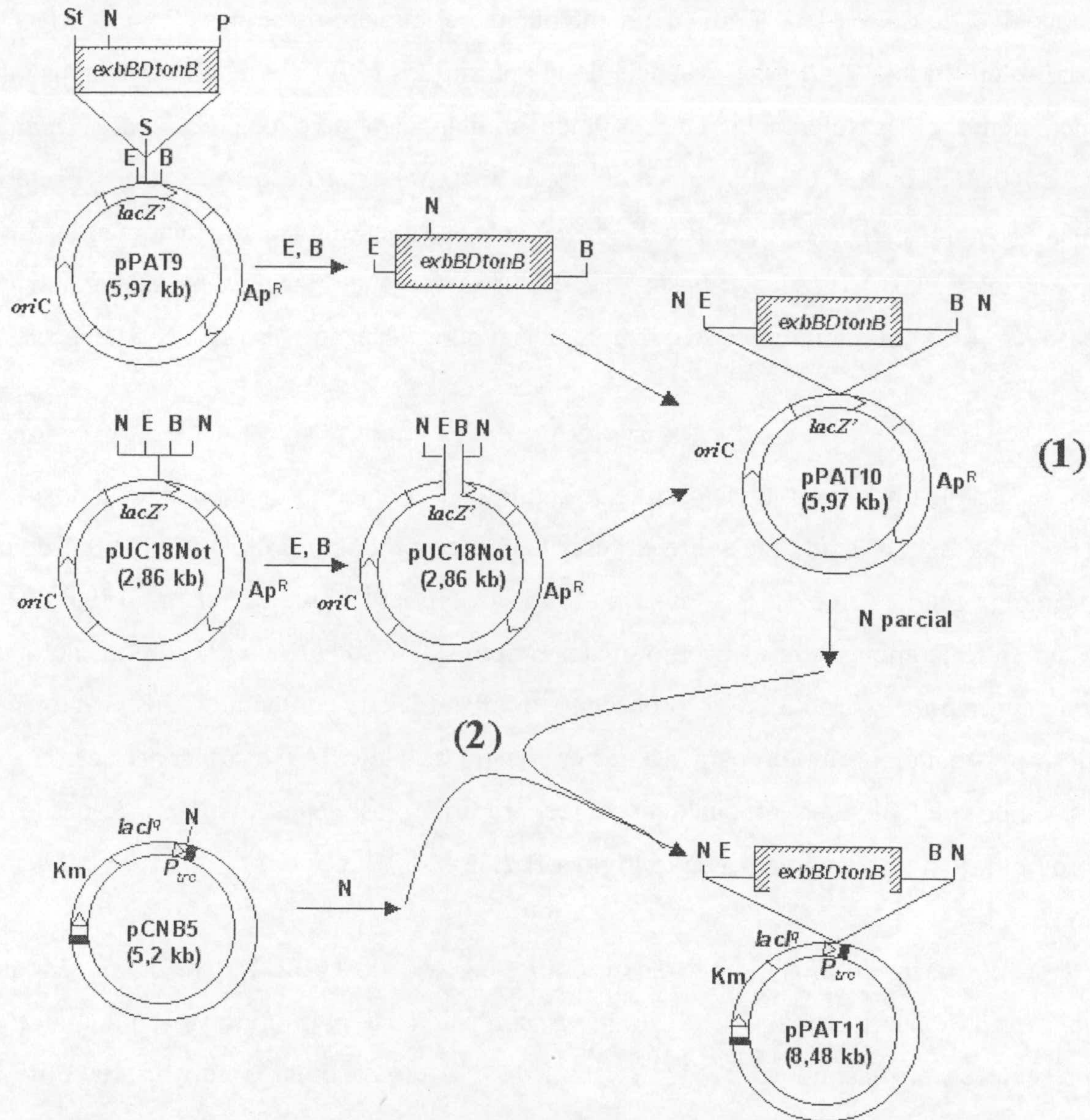


Figura R.2.33. Esquema de la construcción del plásmido pPAT11. El fragmento *StuI/PstI* de 3,28 kb de pPAT5 que contenía los genes *exbBDtonB* desprovisto de promotor se clonó en el sitio *SmaI* del plásmido pUC18. El plásmido así generado, pPAT9, se digirió con *BamHI* y *EcoRI* y el inserto de 3,28 kb se clonó en el plásmido pUC18Not para generar el plásmido pPAT10 (1). Éste se digirió parcialmente con *NotI* y el inserto de 3,28 kb se clonó en el sitio *NotI* único de pCNB5 que está localizado dentro del elemento transponible, dando lugar a pPAT11 (2). Se indican los sitios de restricción relevantes para la construcción de los plásmidos. Abreviaturas: B, *BamHI*; E, *EcoRI*; N, *NotI*; P, *PstI*; S, *SmaI*; St, *StuI*.

10. HACIA LA IDENTIFICACIÓN DE OTROS GENES IMPLICADOS EN LA TOLERANCIA A PHBA DE *P. putida* DOT-T1E.

En el apartado anterior de este capítulo de *Resultados* se puso de manifiesto que ni un aumento en el número de copias, ni la sobreexpresión de los genes *exbBDtonB*

tuvo consecuencias destacables en la tolerancia a PHBA de *P. putida*. Con objeto de identificar nuevas funciones responsables de la tolerancia en la cepa silvestre, se procedió a la búsqueda de mutantes supresores de PhoA5 en los que, manteniéndose la mutación en *exbD*, se hubieran restaurado los niveles de tolerancia a PHBA de la cepa silvestre.

Una mutación supresora es una mutación en un *locus* que restaura total o parcialmente el fenotipo silvestre en una cepa mutante. Un mutante supresor es, por tanto, una cepa que porta dos mutaciones con respecto a la cepa silvestre de la que se deriva, cuya combinación da lugar a un fenotipo similar al silvestre o incluso superior para un carácter determinado. Cuando la recuperación del fenotipo silvestre se debe a la pérdida de la mutación se trata de un fenómeno de reversión.

Para el aislamiento de supresores de la mutación *exbD*, de la que es portadora la cepa PhoA5, se mantuvo esta cepa en medio mínimo M9 suplido con glucosa y Km durante 50 generaciones. A continuación se aislaron tres clones en placas con el mismo medio, al que se había adicionado PHBA a una concentración que inhibió el crecimiento del mutante PhoA5 (15 g/l). Estos clones, PhoA5-S1, PhoA5-S2 y PhoA5-S3 exhibieron resistencia a kanamicina, lo que constituía un indicio potente de que mantenían el minitransposón y de que se trataba de cepas supresoras. En la **Figura R.2.34** se muestra el resultado de hibridar el genoma de estas cepas bacterianas, digerido con *SphI*, con una sonda contra el mini-Tn5'*phoAKm*. Tanto con la cepa parental PhoA5 como con las tres cepas supresoras PhoA5-S1, PhoA5-S2 y PhoA5-S3 se obtuvo una única banda de 6 kb, de las cuales 1,7 kb correspondían al casete de kanamicina y las 4,3 kb restantes a ADN de *Pseudomonas* (coincidente con el inserto del plásmido pPAT2, ver **Figura R.2.2** del presente capítulo de *Resultados*). Así pues, las tres cepas supresoras mantuvieron el mini-transposón Tn5'*phoAKm* en la misma posición que la cepa parental PhoA5 y, por tanto se pudo concluir que estas cepas eran supresoras de la mutación *exbD*.

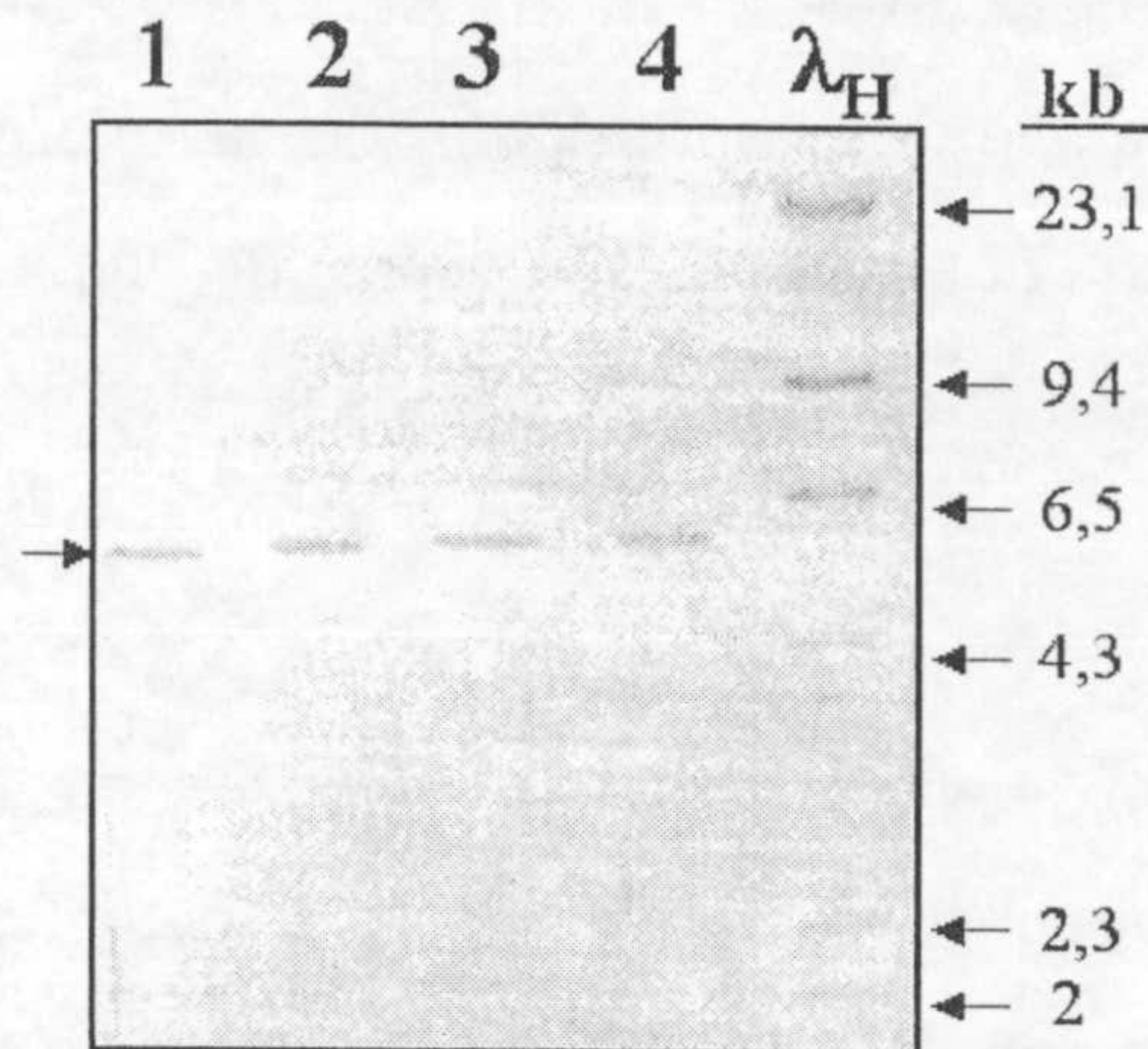


Figura R.2.34. Localización del mini-Tn5'*phoA5Km* en PhoA5 y en los supresores PhoA5-S1, PhoA5-S2 y PhoA5-S3. Diez microgramos de ADN de PhoA5 (calle 1), PhoA5-S1 (calle 2), PhoA5-S2 (calle 3) o PhoA5-S3 (calle 4) se digirieron con *SphI*, se separaron electroforéticamente en gel de agarosa (0,8%, p/v) y se transfirieron a una membrana de nailon, tal y como se describe en el apartado 13.4 de la sección de *Materiales y Métodos*. Se utilizó como sonda el fragmento *EcoRI* de 2 kb del mini-Tn5'*phoAKm* (ver **Figura M.1** de *Materiales y Métodos*) marcado con dUTP-digoxigenina. A la derecha se indican los tamaños correspondientes al marcador de peso molecular λ /*HindIII* (λ_H) marcado también con dUTP-digoxigenina.

Se comparó el fenotipo de los supresores con el de la cepa silvestre DOT-T1E y el mutante PhoA5 en cuanto a los siguientes aspectos: capacidad para formar colonias en medio LB, tolerancia a tolueno, crecimiento en PHBA como única fuente de carbono, crecimiento en medio mínimo líquido con PHBA (15 g/l) y tolerancia a PHBA en placas de doble difusión. Los resultados obtenidos se muestran en la **Tabla R.2.13**.

Tabla R.2.13. Caracterización fisiológica de las cepas supresoras PhoA5-S1, PhoA5-S2 y PhoA5-S3.

Condición	T1E	PhoA5	PhoA5-S1	PhoA5-S2	PhoA5-S3
LB-agar	++	+/-	++	++	++
LB-agar + 60 μ g/l FeCl ₃	++	++	++	++	++
M9-agar + tolueno (fase gaseosa)	++	+	++	++	+
M9-agar + glucosa + PHBA (15 g/l)	++	-	++	++	++
M9-líquido + PHBA (15 g/l)	+	-	+	++	++
Tolerancia a PHBA en placa	17 ^a	5	17	18	20

^a Los números indican g/l. Símbolos: ++, turbidez a 660 nm >1 y colonias después de 24 h; +, turbidez a 660 nm entre 0,5-1 y colonias después de 48 h; +/-, crecimiento residual que no alcanza a formar colonias; -, sin crecimiento.

Las tres cepas supresoras se comportaron esencialmente como la cepa silvestre (**Tabla R.2.13**) en cuanto a la formación de colonias bien definidas en medio LB con o sin suplemento de hierro y a la utilización de PHBA como única fuente de carbono. En los tres casos se recuperó la tolerancia a PHBA en placas de doble difusión, de manera que, mientras la cepa mutante PhoA5 toleró alrededor de 5g/l, las cepas silvestre DOT-T1E y el supresor PhoA5-S1 toleraron hasta 17 g/l; y los supresores PhoA5-S2 y PhoA5-S3 toleraron concentraciones relativamente más altas, alcanzando hasta 20 g/l en el caso de PhoA5-S3.

Algunas mutaciones supresoras de mutantes en los genes *exbB* y *exbD* de *E. coli* se han localizado en los genes *tolQ* y *tolR*, respectivamente (Braun, 1989; Eick-Helmerich y Braun, 1989; Braun y Herrmann, 1993). Para identificar posibles mutaciones en los genes *tolQ* y *tolR* en las cepas supresoras PhoA5-S1, PhoA5-S2 y PhoA5-S3, estos genes se amplificaron por PCR empleando oligos diseñados según la secuencia de la cepa *P. putida* KT2440 (cedidos por la Dra. Marian Llamas) (ver **Tabla R.2.14**). El gen *tolQ* se amplificó con los oligos OR1 y TR3 que rindieron un fragmento de 1.320 pb. Para el rescate del gen *tolR* se recurrió a los oligos TQ3 y TA1 que amplificaron un fragmento de 1.477 pb. La secuenciación de los fragmentos correspondientes a los genes *tolQ* y *tolR* en las tres cepas supresoras no reveló ninguna mutación con respecto a los mismos genes en la cepa silvestre.

Tabla R.2.14. Oligonucleótidos empleados en la caracterización de los genes *tolQ* y *tolR* y de la región aguas abajo del minitransposón en las cepas supresoras.

Nombre de oligo	Secuencia (5'→ 3')
OR1	GGCTGGATGACGAATTG
TR3	CGCCATAGTCGACAGCC
TQ3	CCGTTACTACACCTTCGCCG
TA1	ACCGTCCGGCAACATGT
OF	ACTTGTGTATAAGAGTCAG
Regul-1	GCGAGTGTGACGATGTAG

La región inmediatamente aguas abajo del transposón también se secuenció en las cepas supresoras. Para ello se amplificó un fragmento de 875 pb con los oligos OF, que amplifica hacia fuera del extremo O del minitransposón, y Regul-1, localizado más

allá del codon de terminación del gen *tonB* en la cadena antiparalela. La secuencia de los oligos se especifica en la **Tabla R.2.14**. No se encontraron mutaciones en esta zona que pudieran explicar una posible expresión del gen *tonB* en las cepas supresoras, independientemente de la mutación polar acontecida sobre este gen en el mutante PhoA5. Con objeto de localizar las supresiones acaecidas en las cepas PhoA5-S1, PhoA5-S2 y PhoA5-S3, se prepararán bancos de cósmidos de las cepas supresoras para, posteriormente, proceder a la búsqueda de genes por complementación del clon mutante con dichos cósmidos.

Capítulo 3

CONSTRUCCIÓN Y CARACTERIZACIÓN FISIOLÓGICA DE LOS MUTANTES *exbB*, *exbD* y *tonB* DE *Pseudomonas putida* DOT-T1E

RESUMEN

Se generaron mutantes no polares en los genes *exbB*, *exbD* y *tonB* de *P. putida* DOT-T1E mediante intercambio alélico por recombinación homóloga. En la construcción de las mutaciones se empleó el casete *aphA3*, que codifica la 3'5''-aminoglicósido fosfotransferasa de *E. coli*, una enzima que confiere resistencia a kanamicina, y que no da lugar a efectos polares sobre genes localizados aguas abajo del casete de resistencia al antibiótico. El fenotipo de cada una de las tres cepas mutantes fue analizado y comparado tanto con la cepa silvestre como con el mutante PhoA5 (*exbD::Tn5'phoAKm*), que fue previamente caracterizado en el Capítulo 2. Todos los mutantes mostraron un fenotipo similar al mutante PhoA5, a saber, incapacidad para formar colonias en medio sólido LB sin suplemento de hierro, incapacidad de utilizar *p*-hidroxibenzoato como única fuente de carbono, y mayor sensibilidad a tolueno, *p*-hidroxibenzoato y algunos antibióticos. Estos resultados pusieron de manifiesto la importancia del sistema ExbBDTonB en la tolerancia a distintos compuestos tóxicos de la cepa *P. putida* DOT-T1E.

1. CONSTRUCCIÓN DE MUTANTES NO POLARES EN LOS GENES *exbB*, *exbD* Y *tonB* DE *P. putida* DOT-T1E

En una mutagénesis al azar de la cepa DOT-T1E con el miniTn5'*phoAKm*, se aisló un clon sensible a PHBA denominado PhoA5, que presentaba la inserción del transposón en el gen *exbD* (ver **capítulo 2**). Se planteó la reconstrucción de la mutación en el gen *exbD* para responder a la pregunta de si un efecto indirecto provocado por la fusión traduccional a '*phoA* pudiera ser responsable del fenotipo mutante de la cepa PhoA5, como se he descrito para otras cepas bacterianas portadoras de este tipo de fusiones (Manoil y Traxler, 1995). Además, debido a la naturaleza de la mutación en PhoA5, no se podía descartar que el fenotipo de este mutante fuera consecuencia de una mutación polar sobre *tonB* o de una descompensación en la dosis de los tres elementos del sistema *exbBDtonB*. Es por ello que se dedicó generar mutantes no polares en cada uno de los genes del operón *exbBDtonB* para así abordar estudios finos que permitieran adjudicar a cada uno de los componentes del sistema ExbBDTonB su papel en la configuración del fenotipo del mutante PhoA5.

Los mutantes se construyeron por reemplazamiento génico de la copia silvestre en el cromosoma por un alelo mutante que contenía la inserción del casete *aphA3* en el locus correspondiente (ver plásmido pBS*aphA3* en la sección de *Materiales y Métodos*).

Las tres construcciones mutantes en los genes *exbB*, *exbD* y *tonB* se clonaron independientemente en un plásmido suicida en *Pseudomonas* como es pKNG101 (ver sección *Materiales y Métodos*), dando lugar a los plásmidos pPAT24, pPAT26 y pPAT28, que se utilizaron para generar los mutantes *exbD*, *exbB* y *tonB*, respectivamente, por recombinación homóloga. Estos plásmidos, con los que se realizó el reemplazamiento génico, contienen parte del gen que se desea mutar interrumpido por el casete *aphA3*, además de secuencias flanqueantes de ADN cromosómico de *P. putida* DOT-T1E con una extensión suficiente como para que los eventos de recombinación homóloga transcurrieran a una frecuencia razonable. Para la construcción de los mutantes se siguió el procedimiento descrito en el **apartado 12.2** de la sección *Materiales y Métodos*.

A continuación, se describe la generación del mutante *exbB* (*exbB*' ∇ *aphA3*'*exbB*) de *P. putida* DOT-T1E. En la **Figura R.3.1** se esquematiza la construcción del plásmido

pPAT26, que contiene la inserción del casete *aphA3* en el sitio *NotI* del gen *exbB*, que dio lugar a la inactivación de dicho gen.

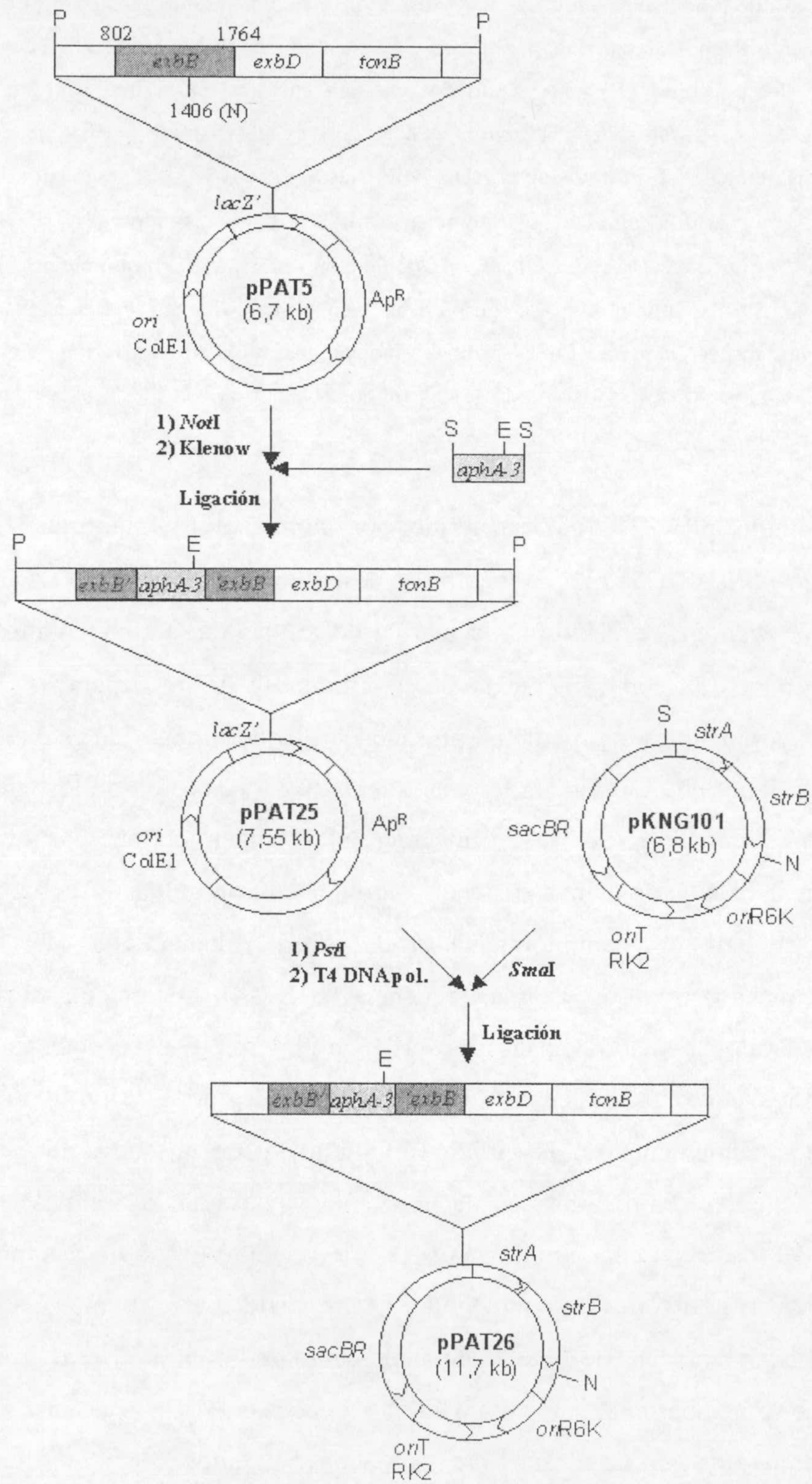
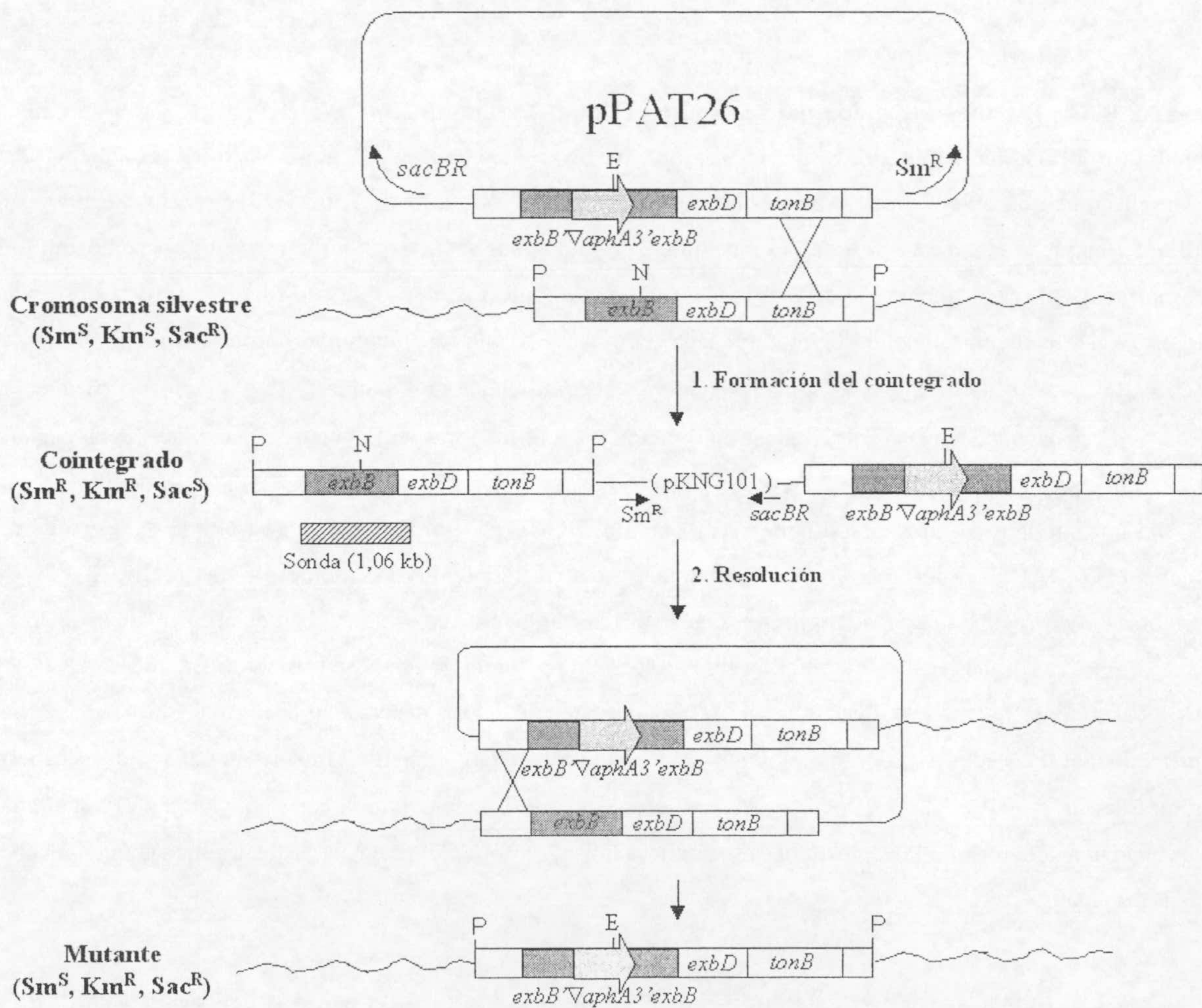


Figura R.3.1. Esquema de la construcción del plásmido pPAT26. El plásmido pPAT5 es un derivado de pUC18 portador de un inserto *Pst*I de 4,0 kb que contiene el operón *exbBDtonB* de *P. putida* DOT-T1E (ver apartado 3 del Capítulo 2 de la presente sección de *Resultados*). El plásmido pPAT5 se digirió con *Not*I y se trató con el fragmento Klenow de la ADN polimerasa I. El plásmido así linearizado se ligó con el fragmento *Sma*I de 850 pb del plásmido pBSaphA3, portador del gen chivato *aphA3* que confiere resistencia a kanamicina (ver sección de *Materiales y Métodos*), generándose así el plásmido pPAT25. Este plásmido se digirió posteriormente con *Pst*I, se trató con la ADN polimerasa del fago T4, y el fragmento de 4,85 kb que contiene la construcción *exbB'aphA3'exbB* se clonó en el sitio *Sma*I del plásmido pKNG101. Con la mezcla de ligación se transformó la cepa *E. coli* CC118 λ *pir* y de un clon resistente a estreptomicina y kanamicina se obtuvo el plásmido pPAT26, que presentaba aguas arriba y aguas abajo del gen *aphA3* 1.406 y 2.638 pb de ADN de *P. putida*, respectivamente. En la figura se indican los sitios de restricción relevantes para la construcción de los plásmidos. Las flechas en los plásmidos señalan el sentido de la transcripción de los genes. Abreviaturas: E, *Eco*RV; N, *Not*I; P, *Pst*I; S, *Sma*I.

El plásmido pPAT26 fue transferido por conjugación “tripartita” desde *E. coli* CC118 λ *pir* a *P. putida* DOT-T1E tal y como se describe en el apartado 11.1 de la sección de *Materiales y Métodos*, excepto que la mezcla de células de la conjugación se depositó sobre una placa de LB con suplemento de Fe-citrato (60 μ g/ml), para así favorecer la aparición de exconjugantes que pudieran presentar un requerimiento de este elemento para su crecimiento (fenotipo del mutante PhoA5 en *exbD*). La selección de los exconjugantes, aparecidos como consecuencia de la integración del plásmido en el cromosoma por recombinación homóloga, se hizo en medio mínimo M9 suplido con benzoato (5 mM) como fuente de carbono, estreptomicina (100 μ g/ml) y kanamicina (50 μ g/ml). Los cointegrados, que aparecieron con una frecuencia de $1,7 \times 10^{-7}$ por célula de receptor, no crecieron en LB suplementado con sacarosa (10%, p/v), como consecuencia de la letalidad conferida por los genes *sacBR* en este medio. Los cointegrados se cultivaron en medio líquido LB con suplemento de Fe-citrato (60 μ g/ml) y en ausencia de estreptomicina durante 14-16 horas, permitiéndose así la proliferación de aquellas células en las que se había perdido el plásmido como consecuencia de un segundo hecho de recombinación que condujese a la resolución del cointegrado. Transcurrido este tiempo, se sembraron diluciones seriadas en placas de LB con un suplemento de Fe-citrato (60 μ g/ml) y sacarosa (10%, p/v) que se incubaron a temperatura ambiente, pues en algunos casos, se observó que la toxicidad producida por los levanos fue más efectiva a temperaturas por debajo de 30°C

(Rodríguez-Herva, 1999). Aparecieron colonias resistentes a sacarosa con una frecuencia de 10^{-3} . Entre estas colonias se seleccionaron aquellos clones que fueron sensibles a estreptomicina y resistentes a kanamicina (2×10^{-3}), por ser candidatos a haber resuelto el cointegrado y presentar reemplazamiento alélico. En la **Figura R.3.2.A** se muestra un esquema del proceso seguido en el reemplazamiento del gen silvestre *exbB* por el alelo mutante. Entre los clones así aislados se eligió uno al azar que se denominó *P. putida* DOT-T1E*exbB*.

A



B

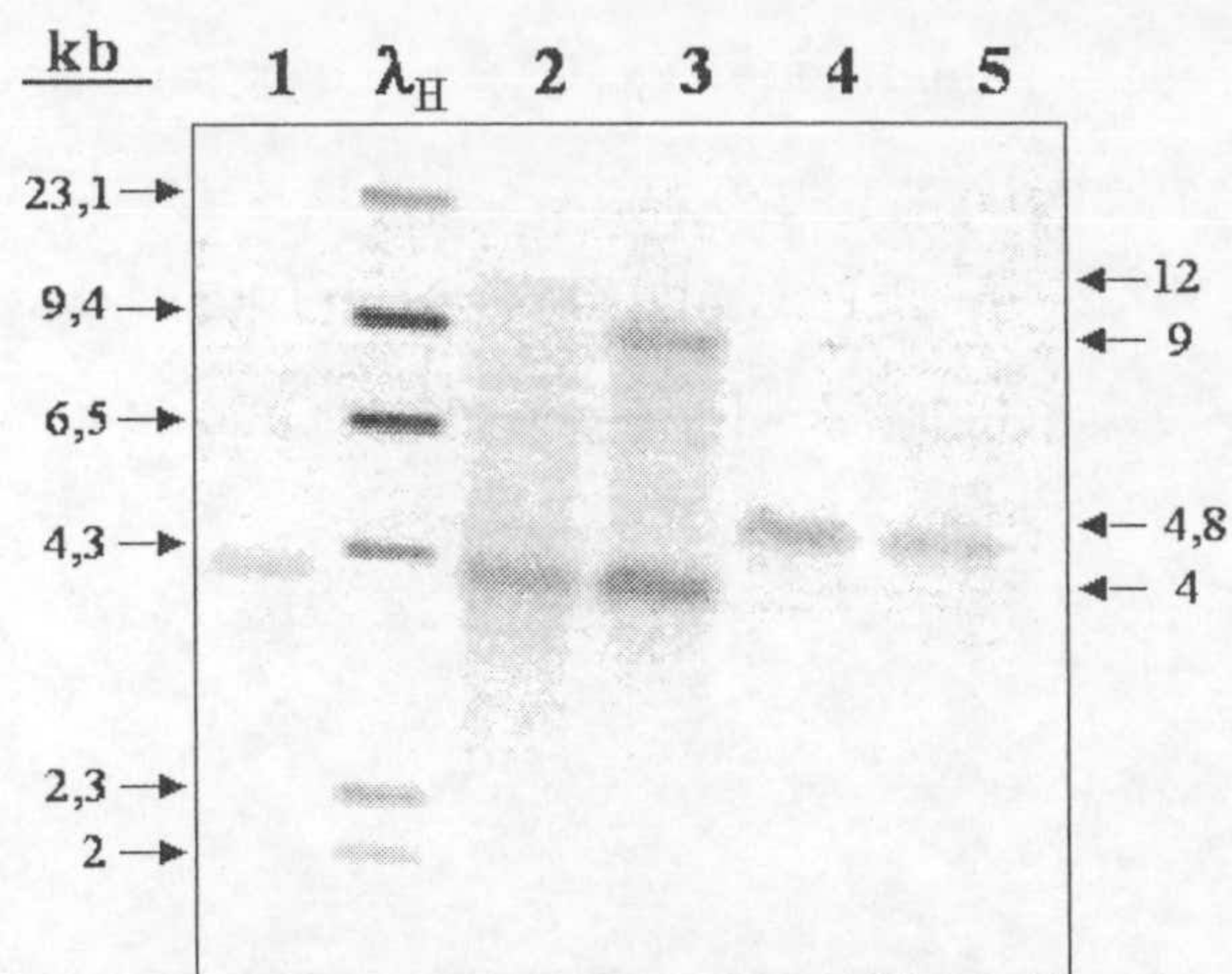


Figura R.3.2. Estrategia seguida para la construcción del mutante *P. putida* DOT-T1E *exbB* y análisis mediante hibridación de ADN de la región donde se encuentra el gen *exbB*. (A) Esquema del reemplazamiento génico. *Paso 1*: primer hecho de recombinación ocurrido entre las secuencias de 1,4 y 2,6 kb que flanquean el casete *aphA3* en el plásmido pPAT26, y sus secuencias homólogas en el cromosoma de *P. putida* DOT-T1E, generando dos tipos de cointegrados, de los cuales se representa uno de ellos en la figura. *Paso 2*: segundo hecho de recombinación que conduce a la resolución del cointegrado. Abreviaturas: E, *EcoRV*; N, *NotI*; P, *PstI*; Km^R/Km^S, resistencia o sensibilidad a kanamicina (50 µg/ml), respectivamente; Sm^R/Sm^S, resistencia o sensibilidad a estreptomicina (100 µg/ml), respectivamente; Sac^R/Sac^S, resistencia o sensibilidad a sacarosa (10%, p/v), respectivamente. Los dibujos no están a escala. (B) Patrón de hibridación contra una sonda *exbB* presentado por la cepa parental DOT-T1E, un derivado merodiploide para *exbB* y un mutante *exbB*. Diez microgramos de ADN total de DOT-T1E (calle 1), merodiploides (calles 2 y 3), y mutantes *exbB* (calles 4 y 5), se digirieron con *PstI*, los fragmentos se separaron en electroforesis de agarosa (0,8%, p/v) y se transfirieron a membranas de nailon. Como sonda de ADN se utilizó un fragmento de 1.063 pb localizado entre las posiciones 446 y 1.509 de la secuencia génica descrita en la **Figura R.2.4**, obtenido y marcado por PCR con dUTP-digoxigenina. A la izquierda se indican los tamaños del marcador de peso molecular λ /*HindIII* (λ_H). Las flechas y los números situados a la derecha marcan la posición y el tamaño de las bandas resultantes de las digestiones enzimáticas del ADN total de las cepas arriba indicadas que hibridan con la sonda utilizada.

Los ADNs totales de la cepa parental, de los candidatos a merodiploides y mutantes *exbB* digeridos con *PstI*, se analizaron en Southern blot con una sonda de 1,06 kb que contiene el gen *exbB* (**Figura R.3.2B**), confirmándose el reemplazamiento alélico y por

tanto la generación del mutante *exbB*. En los mutantes *exbB* se observó una banda de hibridación *Pst*I de aproximadamente 4,8 kb, correspondiente al fragmento *Pst*I de 4 kb presente en la cepa silvestre tras la inserción del casete *aphA3*. En los cointegrados, de uno de los cuales se derivó el mutante *exbB*, se observó una banda de hibridación extra a la de 4 kb correspondiente a un fragmento *Pst*I que incluía la construcción *exbB'*∇*aphA3'**exbB* (Fig. R.3.2B). Utilizando como sonda el plásmido pKNG101, no se observó ninguna banda de hibridación en el mutante *exbB*, confirmándose así la resolución legítima del cointegrado (no se muestra).

Para la generación del mutante en el gen *tonB* se siguió el mismo proceso que para el mutante en *exbB*, utilizando el plásmido pPAT28, construido a partir de pKNG101 como se recoge en la Figura R.3.3.

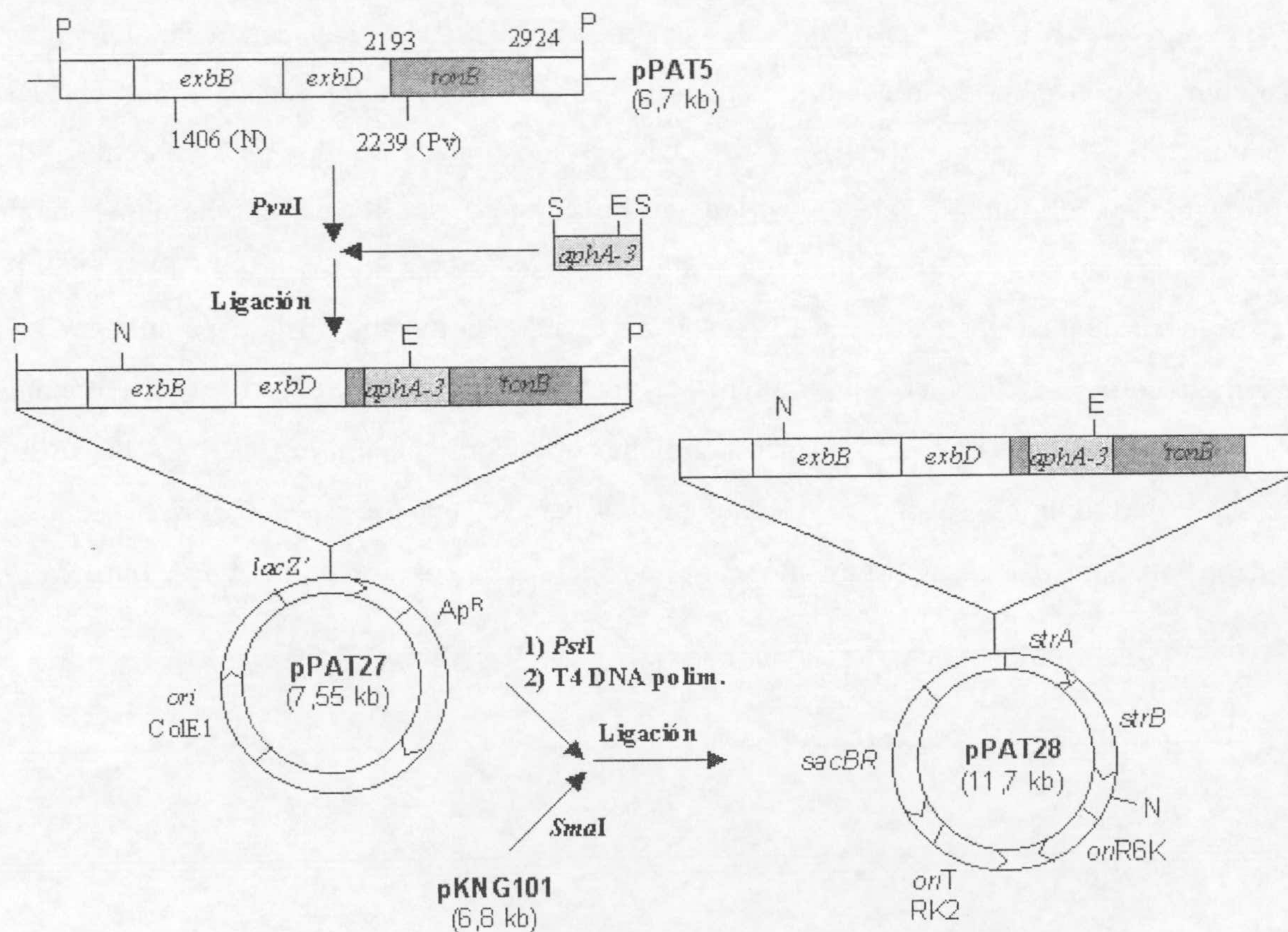
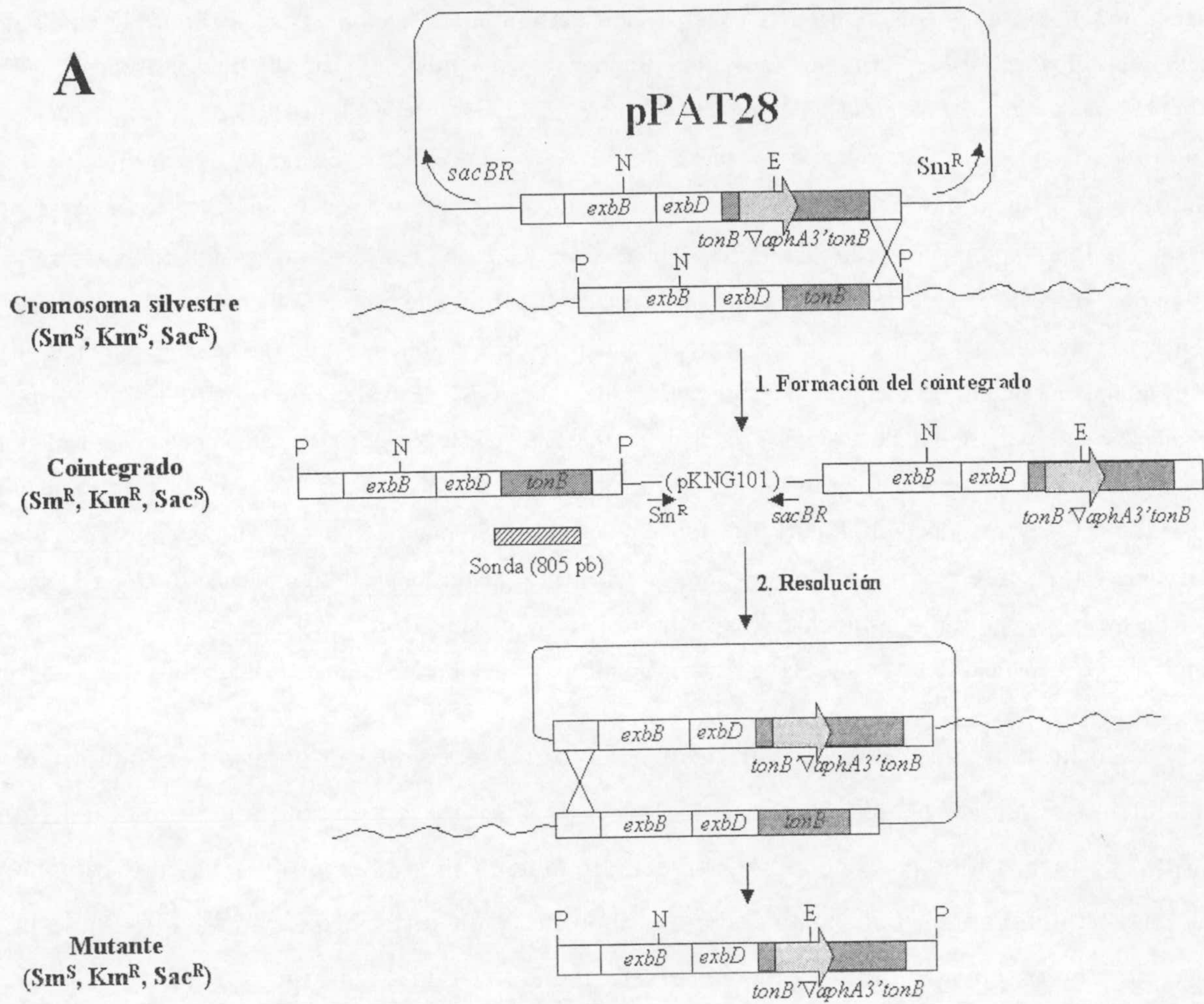


Figura R.3.3. Esquema de la construcción del plásmido pPAT28. El plásmido pPAT5 es un derivado de pUC18 portador de un inserto *Pst*I de 4,0 kb que contiene el operón *exbBDtonB* de *P. putida* DOT-T1E (ver apartado 3 del Capítulo 2 de la presente sección de Resultados). El gen *aphA3* se clonó como un fragmento *Sma*I de 850 pb en el sitio *Pvu*I de pPAT5, generándose el plásmido pPAT27. Este plásmido se digirió posteriormente con *Pst*I, se trató con la ADN polimerasa del fago T4, y el fragmento portador de la construcción *tonB'∇aphA3'tonB* se clonó en el sitio *Sma*I del plásmido pKNG101, y con la mezcla de ligación se transformó la cepa *E. coli* CC118λpir. De la selección de un clon resistente a estreptomicina y kanamicina se obtuvo el plásmido pPAT28, que presentaba 2.239 pb de ADN de *P. putida* corriente arriba del gen *aphA3* y 1.805 pb corriente abajo. En la figura se indican los sitios de restricción relevantes para la construcción de los plásmidos. Las flechas en los plásmidos señalan el sentido de la transcripción de los genes. Abreviaturas: E, *Eco*RV; N, *Not*I; P, *Pst*I; Pv, *Pvu*I; S, *Sma*I.

En la **Figura R.3.4A** se muestra un esquema del proceso seguido en el reemplazamiento génico del gen *tonB* silvestre por la copia mutada. Entre los clones candidatos a ser mutantes en *tonB* (Sm^S , Km^R , Sac^R) se eligió uno al azar que se denominó *P. putida* DOT-T1EtonB. La pérdida del gen silvestre *tonB* y de las secuencias del vector, así como la presencia de la copia mutada, se confirmaron mediante hibridaciones de ADN (Southern-blot) (**Figura R.3.4B**). El ADN cromosómico de la cepa parental, del cointegrado y del mutante seleccionado digeridos con *Pst*I, se hibridaron con una sonda de 805 pb marcada por PCR con digoxigenina localizada entre las posiciones 1.749 y 2.554 de la secuencia génica descrita en la **Figura R.2.4**. La sonda hibridó en la cepa silvestre con un fragmento *Pst*I de 4 kb que contenía al gen *tonB*, mientras que en la cepa mutante hibridó con una banda de 4,8 kb correspondientes a la construcción *tonB'∇aphA3'tonB*. En la cepa merodiploide se pudieron observar dos bandas, una de 4 kb correspondiente al operón silvestre y otra al fragmento *Pst*I que incluía la construcción *tonB'∇aphA3'tonB* (**Fig. R.3.4B**).



B

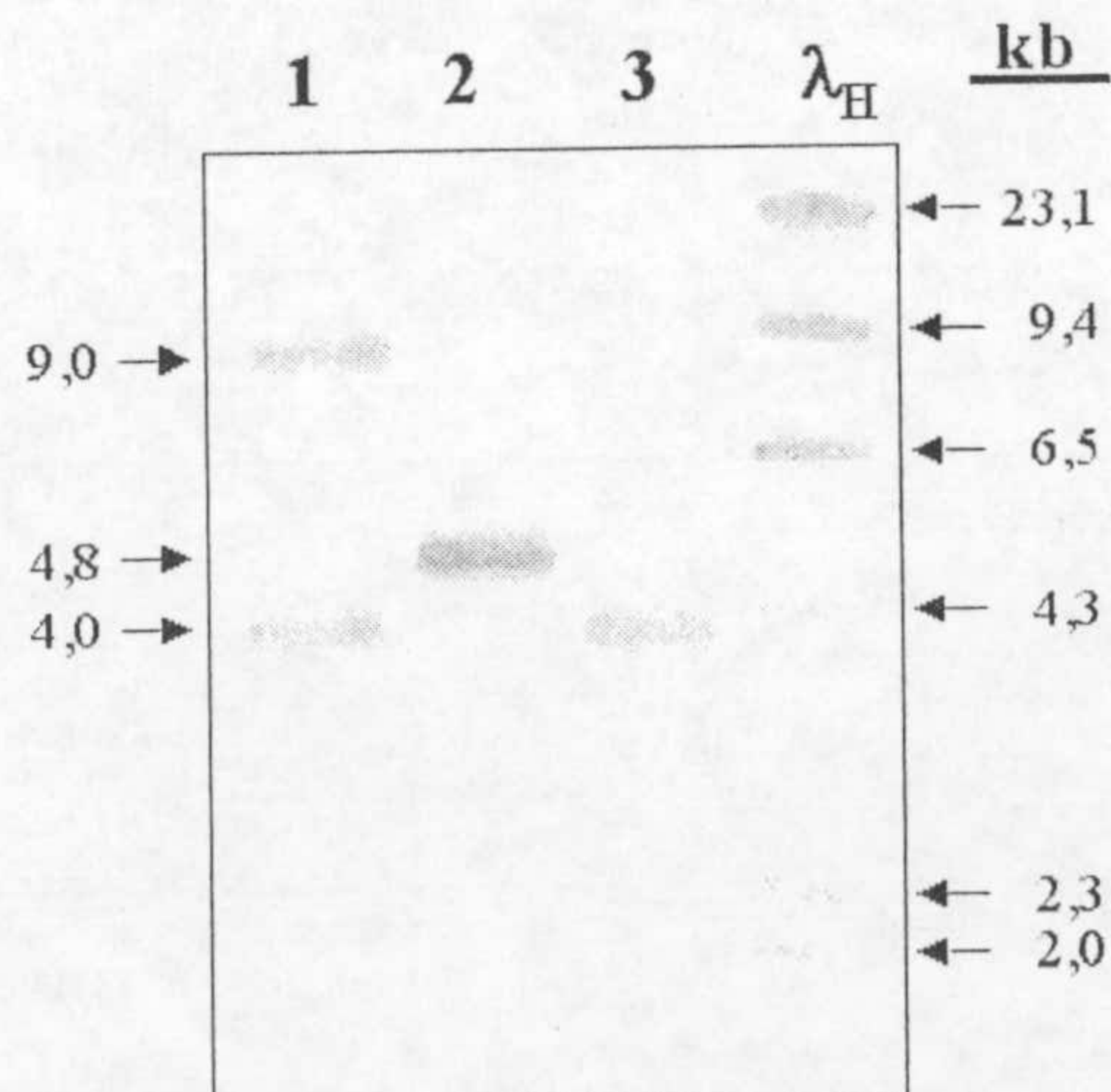
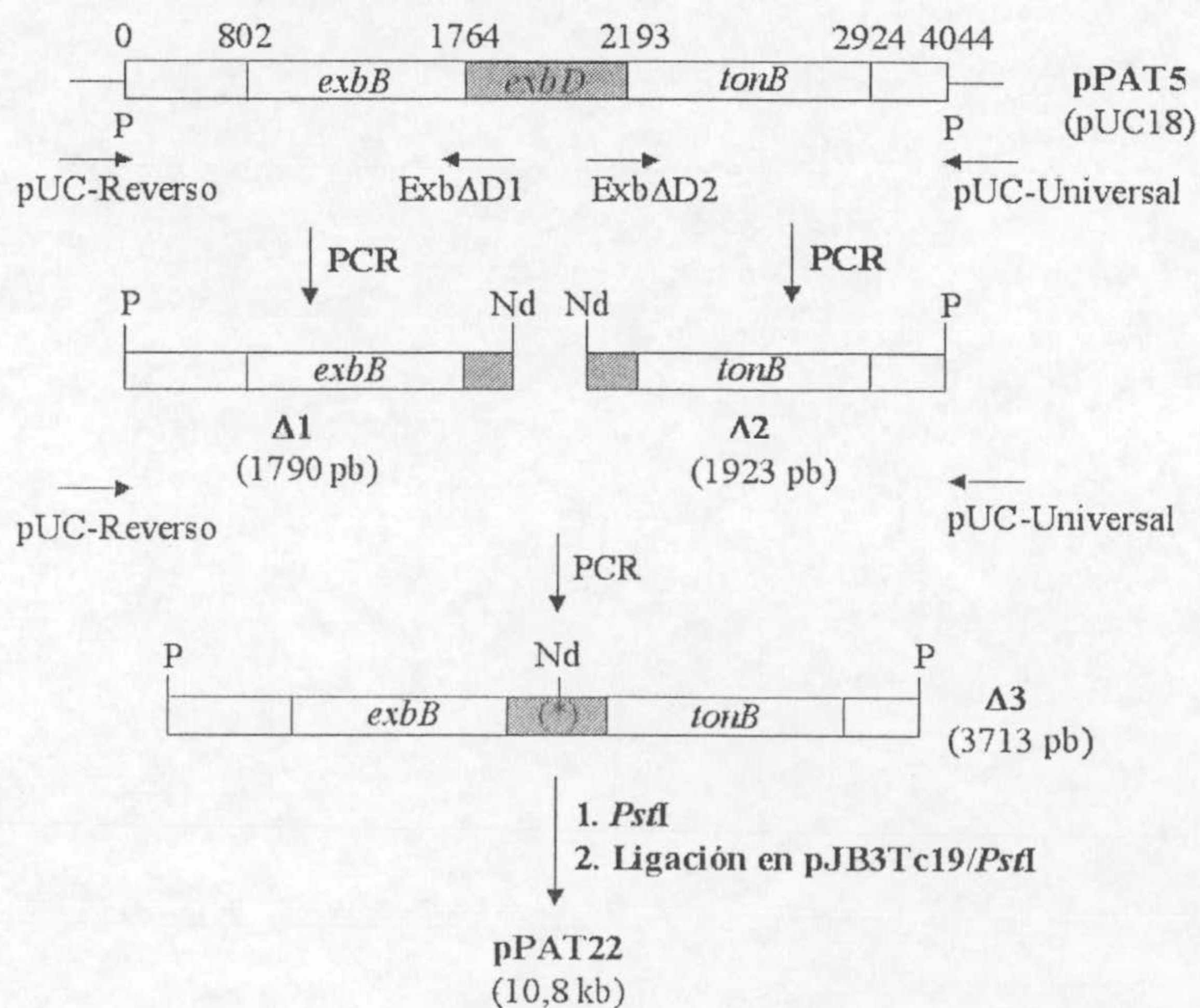


Figura R.3.4. Estrategia seguida en la construcción del mutante *P. putida* DOT-T1EtonB y análisis mediante hibridación de ADN de la región donde se encuentra el gen *tonB*. (A) Esquema del reemplazamiento génico. Se procedió como se describe en la leyenda de la **Figura R.3.2A**, excepto que se utilizó el plásmido pPAT28 en lugar del plásmido pPAT26. Abreviaturas: E, *EcoRV*; N, *NotI*; P, *PstI*; Km^R/Km^S, resistencia o sensibilidad a kanamicina (50 µg/ml), respectivamente; Sm^R/Sm^S, resistencia o sensibilidad a estreptomicina (100 µg/ml), respectivamente; Sac^R/Sac^S, resistencia o sensibilidad a sacarosa (10%, p/v), respectivamente. Los dibujos no están a escala. (B) Patrón de hibridación contra una sonda *tonB* de la cepa parental DOT-T1E, un derivado merodiploide para *tonB* y un mutante *tonB*. Diez microgramos de ADN total de merodiploide (calle 1), mutante *tonB* (calle 2), y DOT-T1E (calle 3) se digirieron con *PstI*, los fragmentos se separaron en electroforesis de agarosa (0,8%, p/v) y se transfirieron a membranas de nailon. Como sonda de ADN se utilizó un fragmento de 805 pb localizado entre las posiciones 1.749 y 2.555 de la secuencia génica mostrada en la **Figura R.2.4**, obtenido y marcado por PCR con dUTP-digoxigenina. A la derecha de la figura se indican los tamaños correspondientes al marcador de peso molecular λ /*HindIII* (λ_H). Las flechas y números a la izquierda señalan la posición y el tamaño de las bandas resultantes de las digestiones enzimáticas del ADN de las cepas arriba indicadas que hibridan con la sonda *tonB*.

En la construcción del plásmido pPAT24, que se emplearía para la generación del mutante en el gen *exbD*, debido a la inexistencia de sitios de restricción únicos en el inserto de pPAT5 localizados en el gen *exbD*, se decidió generar una deleción interna en dicho gen de 331 pb mediante PCR solapante y se incorporó un sitio *NdeI* para así facilitar la inserción del casete *aphA3*, tal como se describe en la leyenda de la **Figura R.3.5**.

A



B

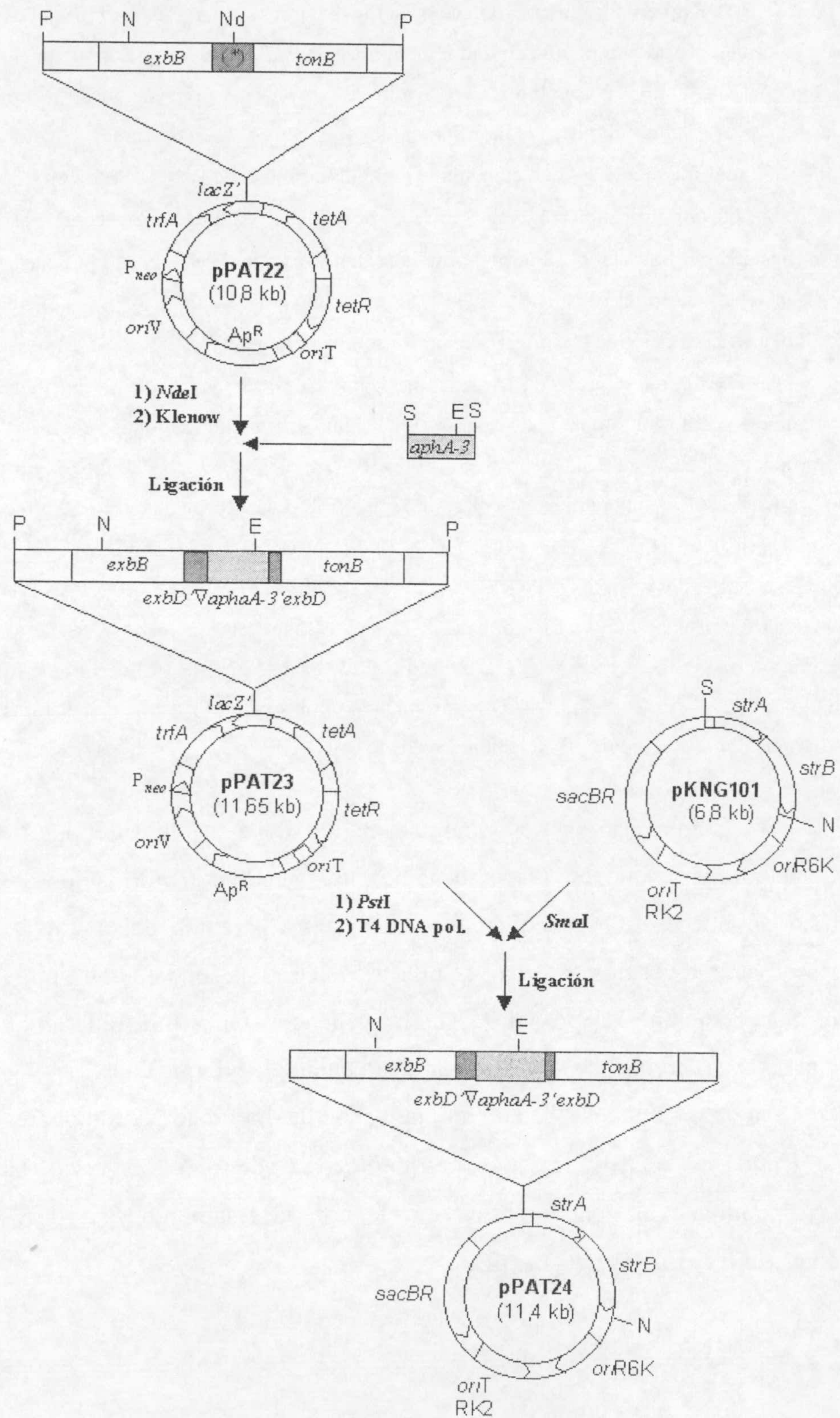
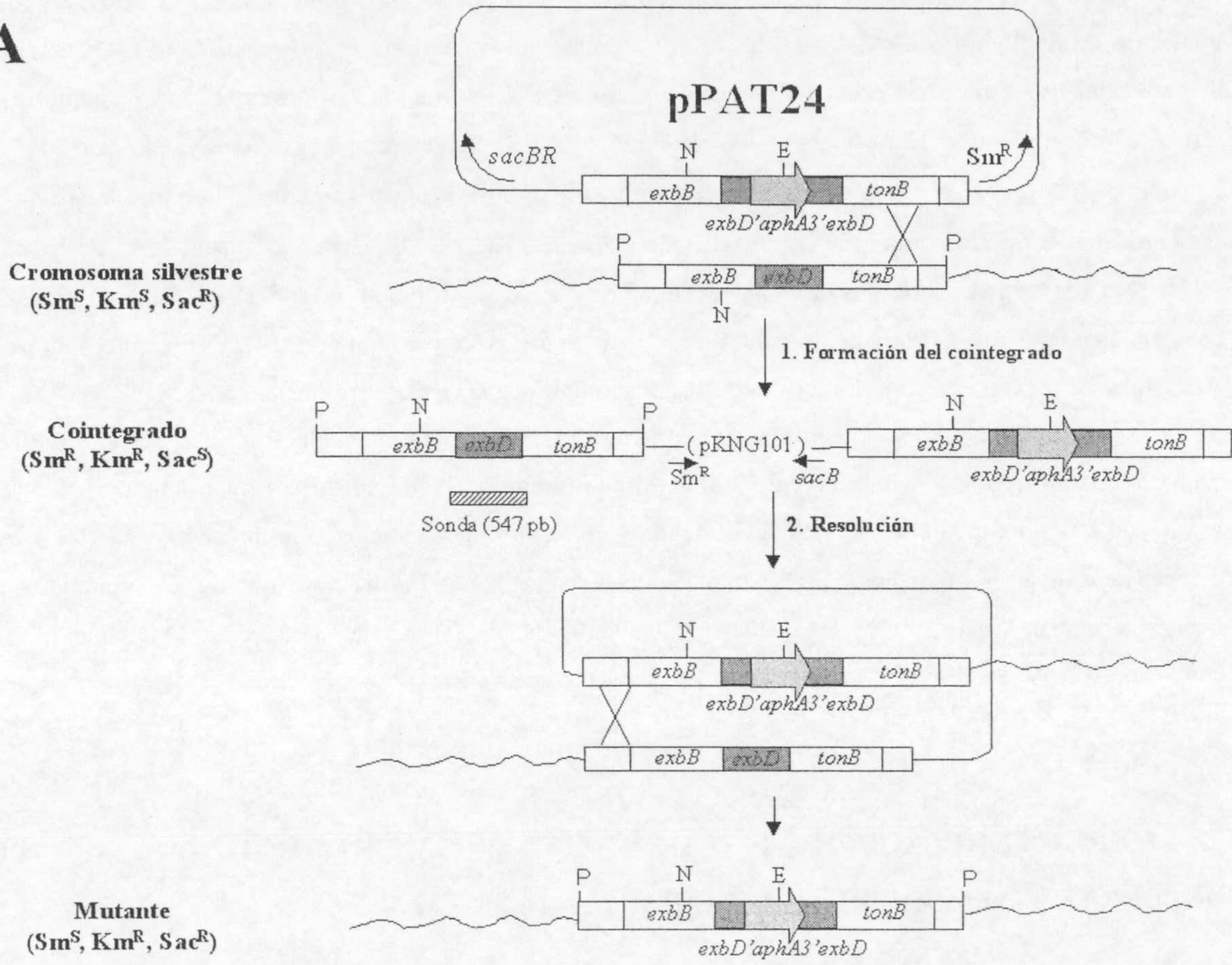


Figura R.3.5. Esquema de la construcción de los plásmidos pPAT22 (A) y pPAT24 (B). (A) El plásmido pPAT5 es un derivado de pUC18 portador de un inserto *Pst*I de 4,0 kb que contiene el operón *exbBDtonB* de *P. putida* DOT-T1E (ver apartado 3 del Capítulo 2 de la presente sección de Resultados). Empleando el plásmido pPAT5 como molde, se amplificaron dos fragmentos de ADN en dos reacciones de PCR diferentes. Para generar el fragmento $\Delta 1$ que contenía la región N-terminal de ExbD se utilizaron los oligos pUC-reverso y Exb Δ D1, que amplifican el fragmento entre las posiciones 1-1.790 en la secuencia de la Figura R.2.4. En la amplificación del fragmento $\Delta 2$ portador de la región C-terminal de ExbD se utilizaron los oligos Exb Δ D2 y pUC-universal, que amplifican el fragmento comprendido entre las posiciones 2.121-4.044 en la secuencia de la Figura R.2.4. Los oligos Exb Δ D1 y Exb Δ D2 son complementarios en su extremo 5' un total de 6 bases, en las cuales existe un sitio *Nde*I. Ambos productos de PCR $\Delta 1$ y $\Delta 2$ se purificaron y fueron usados conjuntamente con los oligos pUC-reverso y pUC-universal en una segunda reacción de PCR, obteniéndose un producto de fusión de 3.713 pb. Este producto se digirió con *Pst*I y se clonó en el sitio compatible del vector pJB3-Tc19, generándose el plásmido pPAT22. Las secuencias de los oligos empleados fueron: Exb Δ D1 (5' CCTTCGTT CATATG CAGGC 3'), Exb Δ D2 (5' GGTGATGAAC CATATG CGC 3'), pUC-Universal (5' GTAAAACGACGGCCAGT3') y pUC-Reverso (5' AGCGGATAACAATTTTCACACAGGA 3'). (B) El casete *aphA3* se escindió del plásmido pBSaphA3 con *Sma*I y se clonó en el sitio *Nde*I del plásmido pPAT22 para generar el plásmido pPAT23. El inserto *Pst*I de 3.505 pb de pPAT23 se clonó en el sitio *Sma*I del vector suicida pKNG101, originando el plásmido pPAT24. Abreviaturas: E, *Eco*RV; N, *Not*I; Nd, *Nde*I; P, *Pst*I; S, *Sma*I. (*) Delección de 331 pb en el gen *exbD*.

La comprobación del reemplazamiento del gen silvestre por la copia mutada se realizó, al igual que en los casos anteriores, mediante hibridaciones de ADN (Figura R.3.6), donde el ADN cromosómico de la cepa parental, del cointegrado y del mutante seleccionado digeridos con *Pst*I, se hibridaron con una sonda de 547 pb, que está localizada entre las posiciones 1.396 y 1.943 de la secuencia génica mostrada en la Figura R.2.4. La sonda hibridó en la cepa silvestre con una banda de 4 kb que contenía el gen *exbD*, mientras que en la cepa mutante hibridó con una banda de 4,5 kb correspondientes a la construcción *exbD'* ∇ *aphA3'**exbD*. En la cepa merodiploide se pudieron observar dos bandas, una de 4 kb correspondiente al operón silvestre y la otra al fragmento *Pst*I de 7,8 que incluía la construcción *exbD'* ∇ *aphA3'**exbD*.

A



B

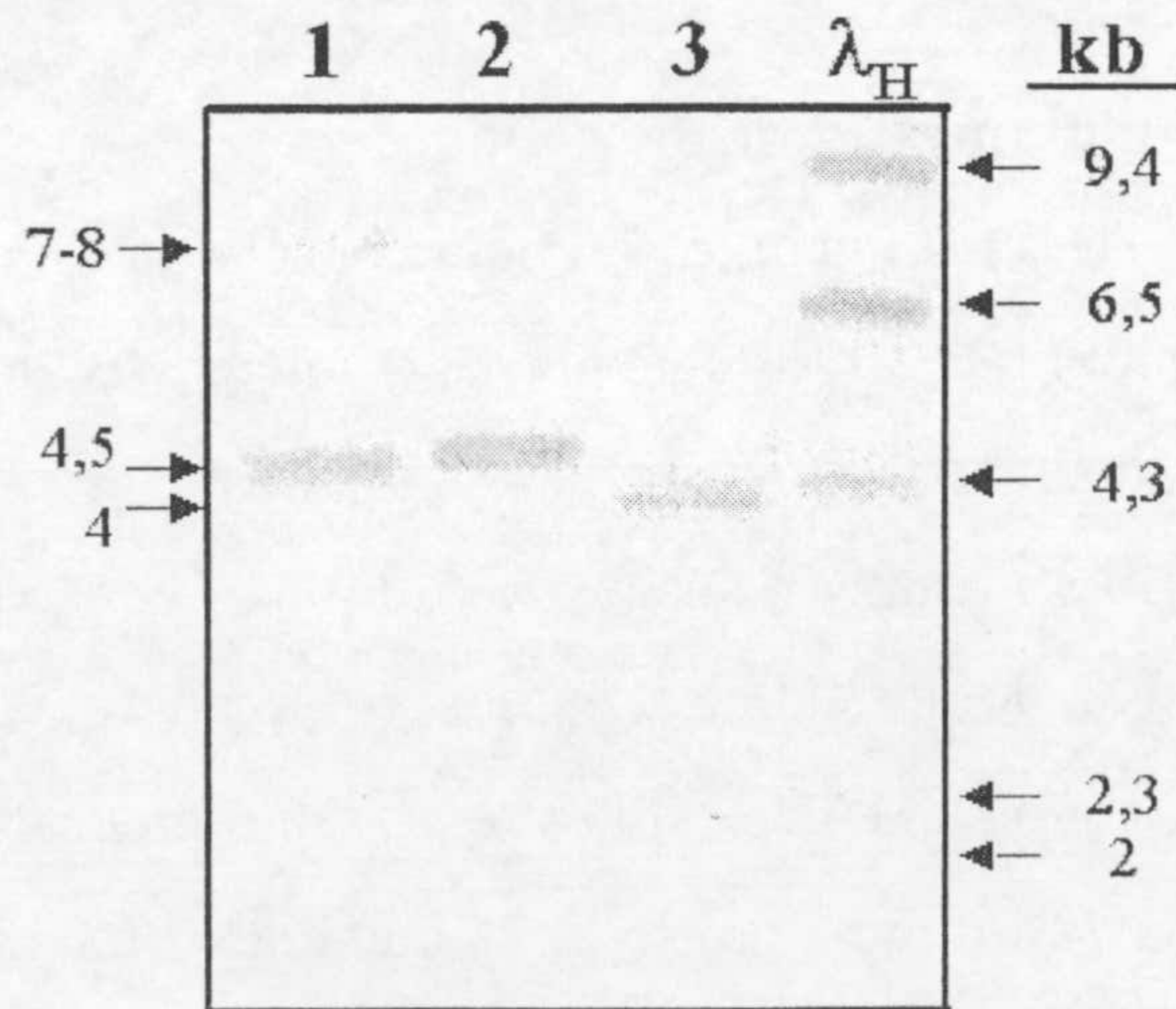


Figura R.3.6. Estrategia seguida en la construcción del mutante *P. putida* DOT-T1E*exbD* y análisis mediante hibridación de ADN de la región donde se encuentra el gen *exbD*. (A) Esquema del reemplazamiento alélico. Se procedió como se describe en la leyenda de la **Figura R.3.2A**, excepto que se utilizó el plásmido pPAT24 en lugar del plásmido pPAT26. Abreviaturas: E, *EcoRV*; N, *NotI*; P, *PstI*; Km^R/Km^S, resistencia o sensibilidad a kanamicina (50 µg/ml), respectivamente; Sm^R/Sm^S, resistencia o sensibilidad a estreptomicina (100 µg/ml), respectivamente; Sac^R/Sac^S, resistencia o sensibilidad a sacarosa (10%, p/v), respectivamente. Los dibujos no están a escala. (B) Patrón de hibridación contra una sonda *exbD* de la cepa parental DOT-T1E, un derivado merodiploide para *exbD* y un mutante *exbD*. Diez microgramos de ADN total de la cepa merodiploide (calle 1), del mutante *exbD* (calle 2), y de la cepa silvestre DOT-T1E (calle 3) se digirieron con *PstI*, a continuación los fragmentos se separaron en electroforesis de agarosa (0,8%, p/v) y se transfirieron a membranas de nailon. Como sonda de ADN se utilizó un fragmento de 547 pb localizado entre las posiciones 1.396 y 1.943 de la secuencia génica mostrada en la **Figura R.2.4**. A la derecha se indican los tamaños del marcador de peso molecular λ /*HindIII* (λ_H). Las flechas y números a la izquierda señalan la posición de las bandas resultantes de las digestiones enzimáticas de ADN que hibridan con la sonda *exbD*.

2. CARACTERIZACIÓN FISIOLÓGICA Y MORFOLÓGICA DE LOS MUTANTES *exbB*, *exbD* Y *tonB* DE *P. putida* DOT-T1E.

Los mutantes no polares en los genes *exbB*, *exbD* y *tonB* de *P. putida* DOT-T1E se analizaron en un estudio que contempla los caracteres que resultaron afectados en la cepa PhoA5, un mutante *exbD* polar sobre *tonB*.

2.1. Crecimiento de los mutantes en medio sólido.

P. putida DOT-T1E y los mutantes no polares en cada uno de los genes del operón *exbBDtonB* se incubaron durante 16-24 h en placas de medio sólido LB y de medio mínimo M9 suplido, alternativamente, con una de las siguientes fuentes de carbono y energía: glucosa (0,5%, p/v), citrato (10 mM), succinato (10 mM), benzoato (10 mM), PHBA (10 mM) o tolueno (suministrado en la fase gaseosa), en ausencia o en presencia de un suplemento de FeCl₃ (60 µg/ml). La cepa silvestre presentó un crecimiento robusto en todas las condiciones ensayadas. Sin embargo, los tres mutantes necesitaron del suplemento de hierro para formar colonias bien definidas en medio LB, resultando los mutantes *exbD* y *tonB* especialmente sensibles a la falta del suplemento. Todos los mutantes presentaron un

crecimiento robusto en placas de medio mínimo independientemente de la fuente de carbono, excepto con PHBA, que ni en condiciones de suplemento de hierro pudieron soportar el crecimiento.

2.2. Crecimiento de los mutantes en medio líquido.

Se evaluó el crecimiento de *P. putida* DOT-T1E y de los mutantes *exbB*, *exbD* y *tonB* en medio líquido LB y en medio mínimo M9 con glucosa 0,5% (p/v) como fuente de carbono. Los resultados se muestran en la **Tabla R.3.1**. El tiempo de generación de los mutantes en medio mínimo fue similar al de la cepa parental, excepto en el caso del mutante *tonB* cuyo tiempo de generación fue ligeramente superior. En estos ensayos de crecimiento en medio mínimo, donde pequeños cambios en variables ajenas a nuestro control ejercen una mayor influencia sobre el crecimiento que en un medio rico (LB), se ha observado una mayor variabilidad en los datos, como indican los datos obtenidos de desviación estándar (**Tabla R.3.1**). El crecimiento en LB estuvo especialmente impedido en el mutante *exbD*, con un tiempo de generación que dobló al de la cepa silvestre (**Tabla R.3.1**).

Tabla R.3.1. Tiempo de generación de los mutantes *exbB*, *exbD* y *tonB* de *P. putida* DOT-T1E.

Cepa	LB	M9 glucosa
<i>P. putida</i> DOT-T1E	44 ± 3 ^a	82 ± 24
DOT-T1E <i>exbB</i>	46 ± 7	73 ± 19
DOT-T1E <i>exbD</i>	91 ± 15	74 ± 25
DOT-T1E <i>tonB</i>	69 ± 4	98 ± 6

^a Los tiempos de generación se determinaron en la fase exponencial de crecimiento. Los valores indican la media obtenida de tres cultivos independientes, expresada en minutos, con un margen de error correspondiente a la desviación estándar en cada caso.

2.3. Susceptibilidad a antibióticos.

El patrón de resistencia/sensibilidad a distintos antibióticos de los mutantes *exbB*, *exbD* y *tonB* se comparó con el de la cepa silvestre *P. putida* DOT-T1E, utilizando el método del halo de inhibición (ver **apartado 3.3** de la sección *Materiales y Métodos*). Los resultados se muestran en la **Tabla R.3.2**. Todos los mutantes fueron más sensibles a

tetraciclina, norfloxacin, ciprofloxacina, cefotaxina e imipenem que la cepa silvestre, aunque resultaron ser más resistentes a neomicina, como consecuencia del casete *aphA3*.

Tabla R.3.2. Inhibición del crecimiento de los mutantes *exbB*, *exbD* y *tonB* de *P. putida* DOT-T1E ejercida por antibióticos.

Cepa	Nor	Cip	Pip	Ctx	N	Te	Ip
<i>P. putida</i> DOT-T1E	27	27	16	13	20	14	24
DOT-T1E <i>exbB</i>	32	36	16	16	9	17	41
DOT-T1E <i>exbD</i>	31	33	17	20	10	17	36
DOT-T1E <i>tonB</i>	32	36	18	17	9	16	41

^a El número indica el tamaño del halo en mm, incluido el diámetro del disco que fue 6 mm. Abreviaturas: Nor (norfloxacin), Cip (ciprofloxacina), Pip (piperacilina), Ctx (cefotaxina), N (neomicina), Te (tetraciclina), Ip (imipenem).

2.4. Tolerancia a PHBA.

La tolerancia a PHBA de los mutantes *exbB*, *exbD* y *tonB* de *P. putida* DOT-T1E se determinó utilizando placas de doble difusión de medio mínimo M9-glucosa y un gradiente de PHBA (ver **Tabla R.3.3**). Los mutantes sólo crecieron a una concentración de PHBA por debajo de 4 g/l, en contraste con la cepa silvestre utilizada como control que creció bien hasta alrededor de 18-19 g/l.

Tabla R.3.3. Tolerancia a PHBA de los mutantes *exbB* y *tonB* de *P. putida* DOT-T1E en placas de gradiente.^a

Cepa	g/l PHBA
<i>P. putida</i> DOT-T1E	18,8 ± 0,6
DOT-T1E <i>exbB</i>	2,5 ± 0,3
DOT-T1E <i>exbD</i>	4,0 ± 0,1
DOT-T1E <i>tonB</i>	2,3 ± 0,0

^a Todas las cepas se cultivaron en medio mínimo M9-glucosa hasta que alcanzaron la fase exponencial media de crecimiento. Entonces se sembraron alícuotas en placas de doble difusión de medio mínimo M9-glucosa y un gradiente de PHBA de 0 a 20 g/l para la cepa silvestre y de 0 a 10 g/l para las cepas mutantes, como se describe en el **apartado 4.3** de la sección *Materiales y Métodos*. Las placas se incubaron a 30°C durante 24-48 horas. Los valores indican la media obtenida de tres cultivos independientes, con un error correspondiente a la desviación estándar en cada caso.

2.5. Tolerancia a un choque de tolueno.

Se estudió la respuesta a corto plazo a un choque de tolueno de las cepas mutantes DOT-T1EexbB, DOT-T1EexbD y DOT-T1EtonB. En la **Figura R.3.7** se muestran los resultados. Para la cepa silvestre (**Fig. R.3.7A**), los resultados fueron similares a los descritos previamente (Ramos *et al.*, 1998), de manera que una exposición repentina a tolueno de células no pre-expuestas originó una pérdida en la viabilidad de unos 4 órdenes de magnitud, mientras que más del 90% de las células pre-expuestas toleraron el choque. Los mutantes DOT-T1EexbB (**Fig. R.3.7B**) y DOT-T1EtonB (**Fig. R.3.7D**) resultaron ser hipersensibles a tolueno, de modo que la supervivencia de las células pre-expuestas y las no pre-expuestas al choque de tolueno fue indetectable. El mutante DOT-T1EexbD (**Fig. R.3.7C**) sólo sobrevivió cuando se preindujeron las células en presencia del aromático, alcanzando en este último caso niveles de supervivencia ligeramente inferiores a los de la cepa silvestre.

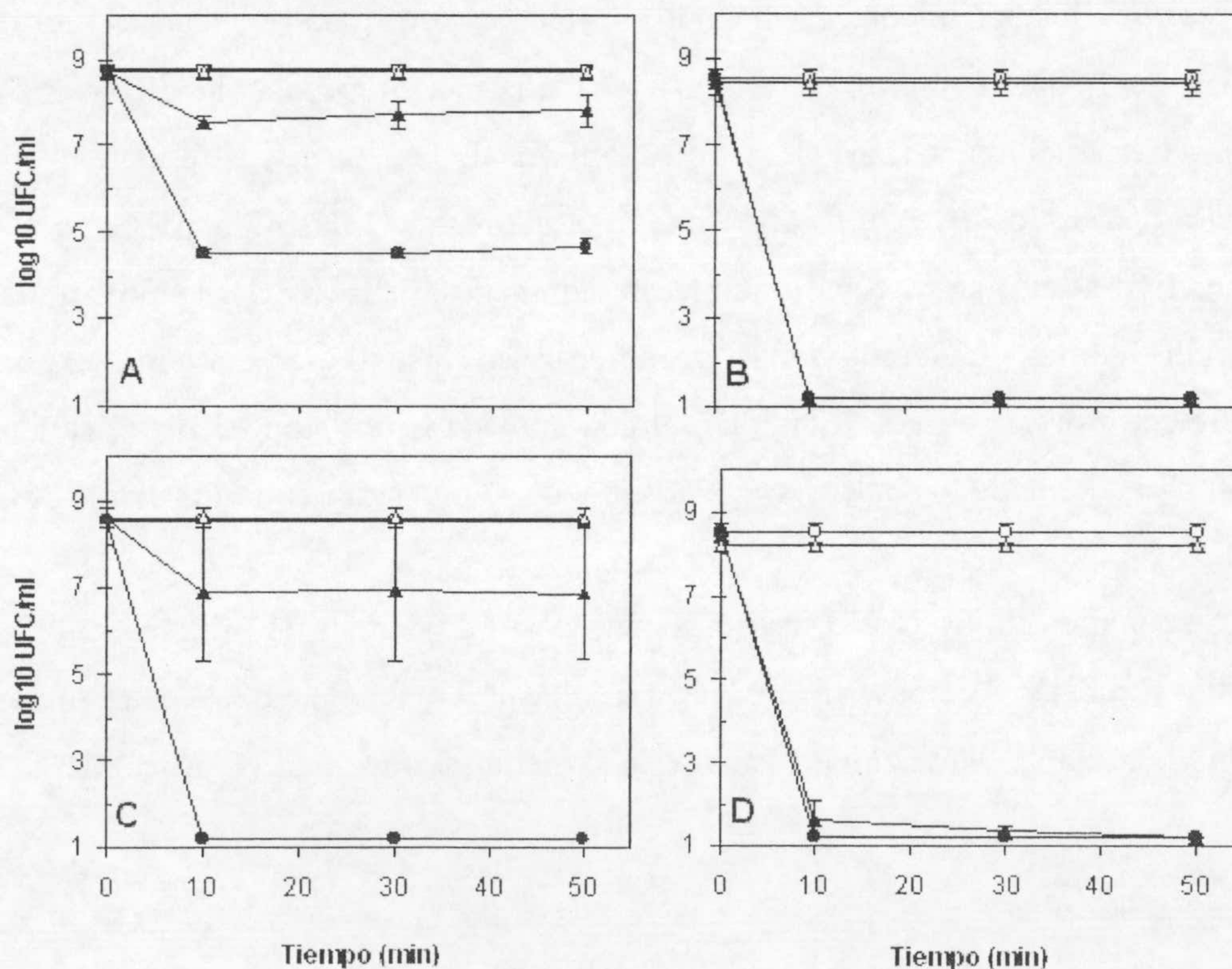


Figura R.3.7. Supervivencia a corto plazo de *P. putida* DOT-T1E y los mutantes DOT-T1E*exbB*, DOT-T1E*exbD* y DOT-T1E*tonB* a un choque de tolueno. Cultivos de 14-16 h de *P. putida* DOT-T1E (A), DOT-T1E*exbB* (B), DOT-T1E*exbD* (C), y DOT-T1E*tonB* (D) en medio líquido LB con (Δ , \blacktriangle) y sin (\circ , \bullet) tolueno suministrado en la fase gaseosa, se diluyeron en el mismo medio de cultivo y cuando alcanzaron una turbidez a 660 nm de 0,8 aproximadamente, los cultivos se dividieron en dos alícuotas, a una de ellas se le añadió tolueno (0,3%, v/v) (símbolos rellenos), mientras que la otra se mantuvo como control (símbolos huecos). El tiempo cero es inmediatamente anterior a la adición de tolueno. La supervivencia se determinó como UFC/ml a los tiempos indicados tras la adición de tolueno. Se representan los valores de la media de tres ensayos independientes y las barras de error corresponden a la desviación estándar.

2.6. Liberación de enzimas periplásmicos al medio extracelular.

Se analizó si los mutantes *exbB*, *exbD* y *tonB* de *P. putida* DOT-T1E, afectados en proteínas de membrana, liberaban o no enzimas periplásmicos al medio extracelular. Para ello, primero se transfirió el plásmido pJB3-Tc19, que porta el gen *bla* que codifica la enzima periplásmica β -lactamasa, mediante conjugación “tripartita” desde *E. coli* JM109 a la cepa silvestre *P. putida* DOT-T1E y a los mutantes DOT-T1E*exbB*, DOT-T1E*exbD* y DOT-T1E*tonB*. Posteriormente, utilizando la técnica de transferencia de proteínas a membranas de PVDF e inmunodetección, se analizó la presencia de dicha enzima (β -lactamasa) en la fracción sobrenadante de los cultivos de la cepa silvestre y de los mutantes *exbB*, *exbD* y *tonB* de *P. putida* DOT-T1E portadores del plásmido pJB3-Tc19. Como control positivo se utilizó la cepa mutante *P. putida* QX (pJB3Km1), suministrada por la Dra. Marian Llamas. Los cultivos se recogieron en fase de crecimiento exponencial. Mediante electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS y tinción de plata, se analizó la fracción sobrenadante de los cultivos. Los resultados se muestran en la **Figura R.3.8**.

No se pudieron observar diferencias en el perfil de bandas de proteínas en las cuatro cepas (**Fig. R.3.8A**). Además, ni en la cepa silvestre ni en las tres cepas mutantes se observó la liberación de la enzima β -lactamasa al medio extracelular (**Fig. R.3.8B**).

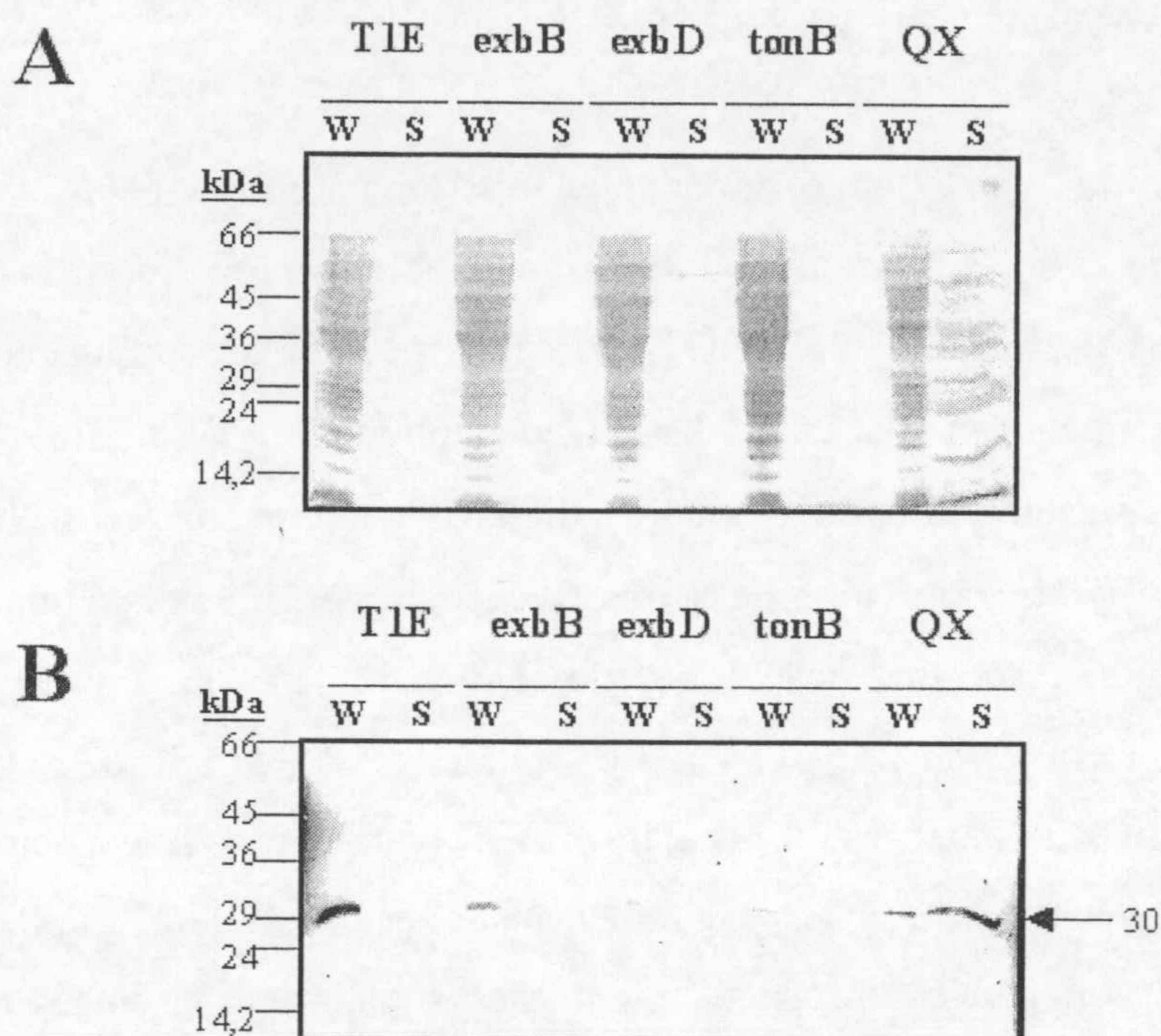


Figura R.3.8. Estudio de la liberación de β -lactamasa periplásmica en los mutantes *exbB*, *exbD* y *tonB* de *P. putida* DOT-T1E. Células de *P. putida* DOT-T1E (pJB3Tc19), de los mutantes DOT-T1E*exbB* (pJB3Tc19), DOT-T1E*exbD* (pJB3Tc19), DOT-T1E*tonB* (pJB3Tc19) y del mutante *P. putida* QX (pJB3Kml) se cultivaron en medio líquido LB con los respectivos antibióticos, y se recogieron por centrifugación en fase de crecimiento exponencial. Se prepararon lisados de células totales (W) y precipitados de proteínas del sobrenadante (S) de dichos cultivos como se indicó en los apartados 14.1 y 14.2 respectivamente de la sección de *Materiales y Métodos*. (A) Las distintas muestras se separaron por electroforesis en gel de poliacrilamida al 10% (p/v) con SDS y se tiñeron con plata. (B) Las proteínas separadas electroforéticamente se transfirieron a PVDF, se realizó una detección inmunológica con un anticuerpo policlonal contra el enzima periplásmico β -lactamasa (cedido por el Dr. LLoubès, CNRS, Marsella, Francia) y el revelado se realizó por el método colorimétrico. Para el análisis de las muestras de sobrenadante de cultivos se utilizaron 0,5 equivalentes de DO_{660} -ml/calle y para el de los lisados de células totales, 0,3 equivalentes/calle. A la izquierda de cada panel se indican los tamaños correspondientes a los marcadores de peso molecular. La flecha situada a la derecha del panel (B) indica el tamaño de la proteína β -lactamasa.

3. COMPLEMENTACIÓN DE LAS MUTACIONES DE *P. putida* DOT-T1E *exbB*, DOT-T1E *exbD* y DOT-T1E *tonB* POR EL PLÁSMIDO pPAT7 PORTADOR DE LOS GENES *exbBDtonB* SILVESTRES.

El plásmido pPAT7, que contiene el operón completo *exbBDtonB* de la cepa silvestre *P. putida* DOT-T1E, se transfirió mediante conjugación “tripartita” a los mutantes de *exbB*, *exbD* y *tonB* de *P. putida* DOT-T1E. Las mezclas de conjugación se incubaron durante toda la noche en placas de LB y LB suplido con Fe-citrato (60 µg/ml). Los transconjugantes se seleccionaron en medio sólido M9 suplementado con citrato (10 mM) y tetraciclina (10 µg/ml), obtuyéndose a una frecuencia de 10^{-2} por célula de receptor. A continuación, se realizaron una serie de ensayos para determinar el grado de complementación conferido por pPAT7. Los mutantes DOT-T1E*exbB*, DOT-T1E*exbD* y DOT-T1E*tonB* que portaban este plásmido pPAT7 recuperaron la capacidad para formar colonias robustas en medio LB después de 24 h, sin necesidad de un suplemento adicional de hierro. Otras deficiencias en el crecimiento que se subsanaron en los mutantes con la adquisición de pPAT7 fueron la capacidad de utilizar PHBA como única fuente de carbono, tanto en medio líquido como en medio sólido. En cuanto a la tolerancia a PHBA en placas de gradiente de doble difusión, la introducción del plásmido pPAT7 permitió recuperarla al mismo nivel que la cepa silvestre (~17 g/l). Asimismo, la tolerancia a antibióticos fue similar en todos los casos a los niveles tolerados por la cepa silvestre. Sin embargo se encontraron diferencias a destacar respecto a la tolerancia a un choque por tolueno (**Figura R.3.9**).

En este ensayo se incluyó la cepa DOT-T1E (pPAT7) como control, para eliminar la posibilidad de que un aumento en la dosis génica del operón *exbBDtonB*, conferido por la presencia de este plásmido, ejerciera un efecto negativo sobre la tolerancia. Los niveles de tolerancia a tolueno de esta cepa DOT-T1E (pPAT7) fueron similares a los presentados por la cepa silvestre (**Fig. R.3.9A y E**).

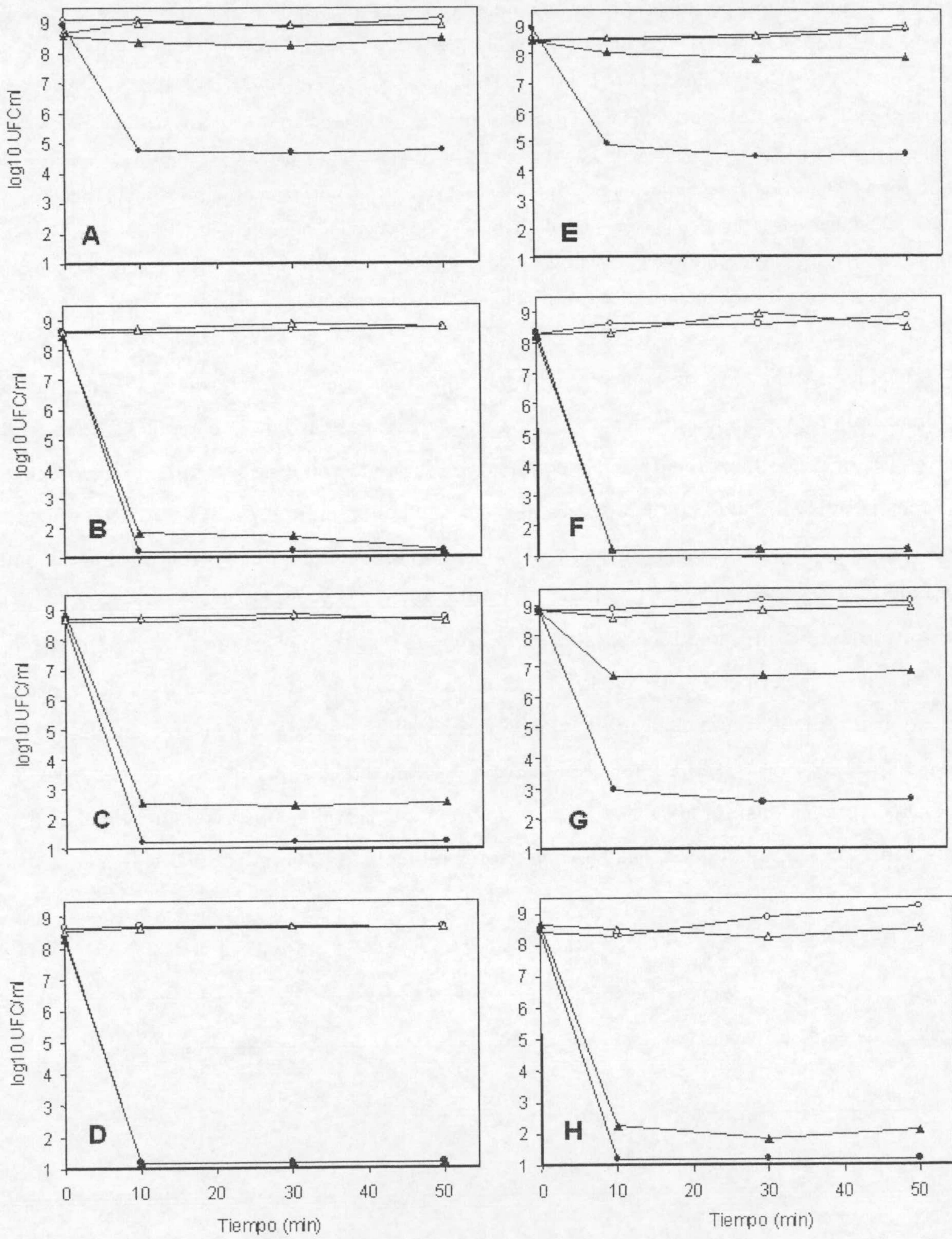
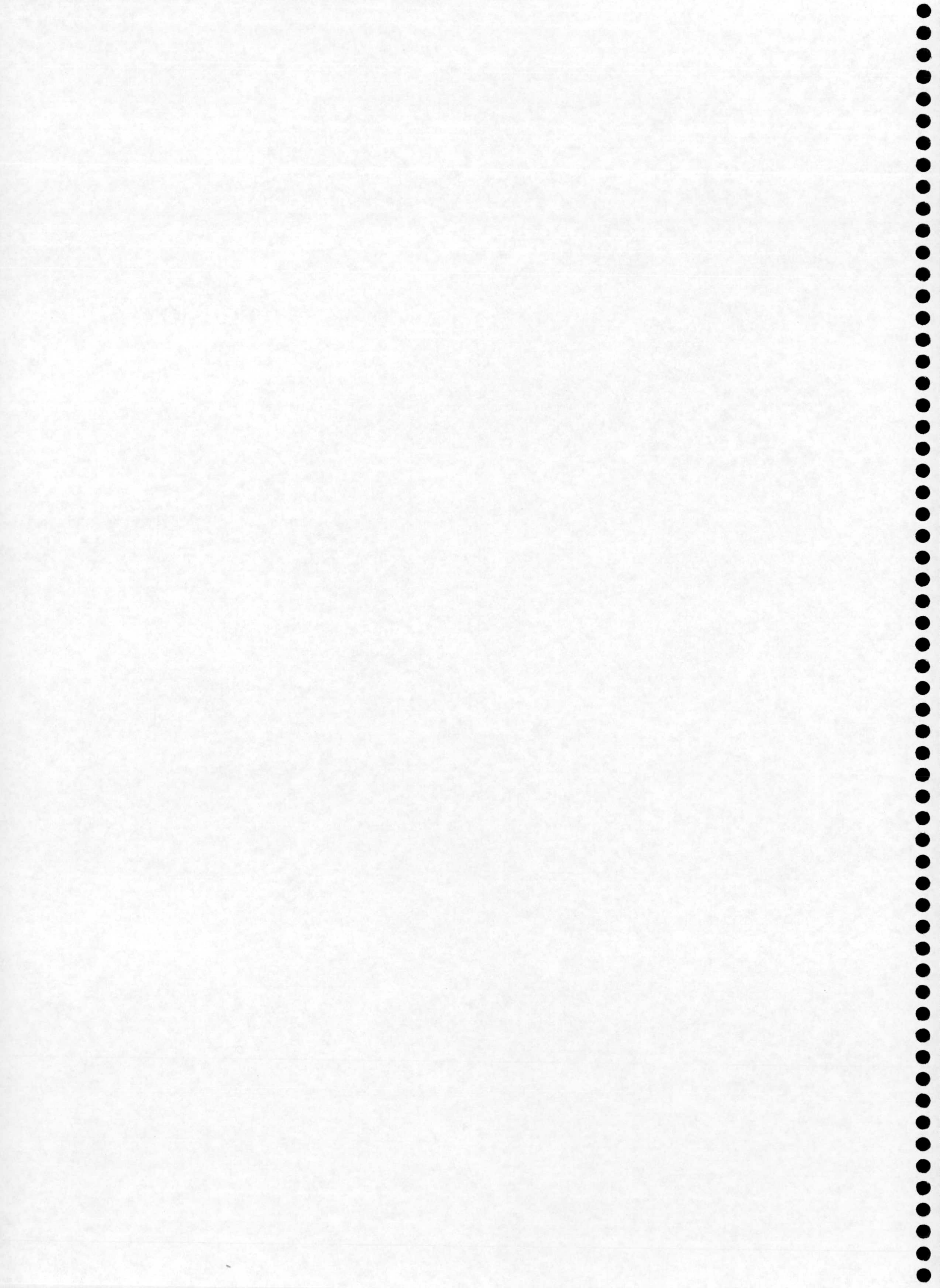


Figura R.3.9. Efecto de la complementación por el clúster de genes *exbBDtonB* silvestres sobre la tolerancia a un choque por tolueno en los mutantes *exbB*, *exbD* y *tonB* de *P. putida* DOT-T1E. Cultivos de 14-16 h de *P. putida* DOT-T1E (A), DOT-T1E*exbB* (B), DOT-T1E*exbD* (C), DOT-T1E*tonB* (D), DOT-T1E (pPAT7) (E), DOT-T1E*exbB* (pPAT7) (F), DOT-T1E*exbD* (pPAT7) (G) y DOT-T1E*tonB* (pPAT7) (H) en medio LB suplido con los antibióticos correspondientes, en ausencia (○,●) o en presencia (△,▲) de tolueno en la fase gaseosa, se diluyeron 50 veces en los mismos medios. Cuando los cultivos alcanzaron una turbidez a 660 nm de 0,8 se dividieron en dos alícuotas, manteniendo una como control (símbolos huecos) y añadiendo tolueno (0,3% v/v) a la otra (símbolos rellenos). Se determinó el número de UFC/ml a los tiempos indicados. La cinética se repitió con tres cultivos independientes y la figura muestra un resultado obtenido con uno de los cultivos, que representa la tendencia en todos los experimentos.

La introducción del plásmido pPAT7 no trajo consigo el restablecimiento de la tolerancia a tolueno a los niveles de la cepa silvestre. En el caso de la cepa DOT-T1E *exbB* (pPAT7), independientemente de las condiciones de inducción o no por tolueno, se observó la misma sensibilidad al compuesto aromático que en el mutante *exbB* (**Fig. R.3.9B y F**). El comportamiento de la cepa *exbD* (pPAT7) en presencia de tolueno fue similar al que mostró la cepa PhoA5 (pPAT7) (**Fig. R.3.9C y G**) (para comparar, ver **Fig. R.2.32** del **Capítulo 2** de la presente sección de *Resultados*), de manera que, el nivel de supervivencia al choque fue intermedio a la supervivencia de las cepas silvestre y mutante. Por otra parte, el comportamiento de la cepa *tonB* (pPAT7) frente al choque de tolueno fue similar al del mutante *tonB*, observándose una ligera recuperación de la supervivencia en el caso de células preinducidas. En el caso de células no preinducidas no se observó supervivencia con *tonB* (pPAT7), al igual que no se observó para el mutante *tonB* (**Fig. R.3.9D y H**).

DISCUSIÓN



DISCUSIÓN

Desde la Revolución Industrial, se ha incrementado considerablemente la producción y el uso de productos químicos como el tolueno, xilenos y estireno, compuestos que tienen múltiples aplicaciones en la industria como disolventes orgánicos y como materias primas para la producción de compuestos químicos de alto valor añadido (Gibson *et al.*, 1970; Ensley *et al.*, 1983; Mermod *et al.*, 1986; Whited *et al.*, 1986; Wubbolts y Timmis, 1990; Ramos *et al.*, 1991). Aunque el tolueno, xilenos y otros aromáticos monocíclicos son componentes del petróleo, su alta demanda industrial requiere que se sinteticen en gran cantidad, generalmente a partir de benceno. La biotransformación de tolueno en productos de alto valor añadido tiene gran importancia en diferentes áreas biotecnológicas, como biotransformaciones, alimentación, farmacología y cosmética. Este es el caso del *p*-hidroxibenzoato (PHBA), precursor de polímeros empleados en la síntesis de cristal líquido y de conservantes de tipo parabeno. El PHBA puede biosintetizarse a partir de tolueno utilizando cepas que dispongan de la ruta *tmo*, ruta que implica la aparición de distintos intermedios tóxicos de tipo hidroxilado (Whited y Gibson, 1991a y 1991b). La cepa *P. putida* DOT-T1E es un microorganismo con una capacidad inusual de crecer en presencia de altas concentraciones de tolueno (hasta 90%, v/v) (Ramos *et al.*, 1995), además de tolerar altas concentraciones de otros disolventes orgánicos, antibióticos y otros compuestos aromáticos, entre ellos PHBA.

En el apartado 1 del Capítulo 1 de *Resultados* se recogió el dato de la elevada tolerancia natural de *P. putida* DOT-T1E a PHBA (18 g/l), dato que contrasta con los bajos datos de tolerancia a PHBA de otras cepas de *Pseudomonas*, como *P. mendocina* (8,5 g/l), *P. fluorescens* (12 g/l), *P. stutzeri* (7,2 g/l), *P. solanacearum* (6,7 g/l), *P. aeruginosa* (1,6 g/l) y *P. versicularis* (1,6 g/l) (E. Duque, comunicación personal). Sin embargo, en el proceso de producción de PHBA utilizando microorganismos, la actividad de las enzimas en la ruta metabólica de degradación de tolueno aún se ven inhibidas en presencia de las altas concentraciones de PHBA, el cual se va acumulando a lo largo del proceso. Por esta razón, se profundizó en la caracterización fisiológica de la tolerancia a PHBA y en los factores que podrían incrementar la tolerancia intrínseca a PHBA de DOT-T1E.

1. FACTORES QUE INFLUYEN EN LA TOLERANCIA DE PHBA EN *P. putida* DOT-T1E.

Una de las dificultades que nos encontramos a la hora de abordar experimentos fisiológicos para el estudio de la tolerancia a PHBA de la cepa *P. putida* DOT-T1E fue la pérdida de correlación entre la turbidez y el número de UFC/ml en aquellos ensayos en los que se utilizaron concentraciones de PHBA iguales o superiores a 12 g/l (**Figura R.1.7**), donde se observó que aunque la turbidez del cultivo aumentó, se produjo un notable descenso en el número de células viables. Para explicar este fenómeno debe aclararse el concepto de turbidez. Una suspensión de células parece turbia a la vista debido a la dispersión de la luz producida por cada célula. Esta dispersión es directamente proporcional a la cantidad de material celular presente en el medio. Habitualmente en el laboratorio, la turbidez se expresa en unidades de absorbancia. En organismos unicelulares, la absorbancia es proporcional al número de células, de ahí que las medidas de turbidez dan una estimación de la densidad celular y pueden utilizarse como una alternativa al conteo de colonias. En nuestro caso, los restos de células muertas presentes en el medio debido a la toxicidad del PHBA, pueden contribuir a dispersar la luz con el consiguiente aumento de la turbidez sin que originen colonias. Esta situación impuso la necesidad de hacer siempre conteos de UFC/ml en el seguimiento del crecimiento en todos los casos en que se suplió el medio con PHBA.

1.1. Efecto de un suplemento de cationes Mg^{2+} .

Se ha descrito que la presencia de cationes divalentes como Ca^{2+} , Mg^{2+} en el medio de cultivo es esencial para la existencia de la membrana de bacterias Gram-negativas. Estos cationes fortalecen las interacciones laterales entre moléculas de lipopolisacáridos (LPS), ya que neutralizan parcialmente la repulsión electrostática de los LPS entre sí, debida a la presencia de numerosos grupos cargados en la región del lípido A y del núcleo interno (Pinkart y White, 1997). Estas fuertes asociaciones de los LPS entre sí y con moléculas de proteína vecinas son de gran importancia para el mantenimiento de una barrera de permeabilidad eficaz y favorecen la formación de una red estable de naturaleza hidrofílica sobre la superficie de la membrana externa (Nikaido y Vaara, 1985), incrementando así la

tolerancia de las cepas a agentes tóxicos, predominantemente de naturaleza hidrofóbica (Inoue *et al.*, 1991; Weber y de Bont, 1996). Habría que resaltar que a pH neutro, la carga neta de la superficie celular de un gran número de bacterias es negativa (Bayer y Sloyer, 1990). En especies bacterianas que poseen cápsula aniónica, ésta es la principal contribuyente a la carga final, pero en especies sin cápsula, el LPS es el contribuyente más importante. Este hecho indica que la neutralización de los LPS es incompleta con lo que la superficie de las células bacterianas se podría describir como una capa con un potencial electrostático altamente negativo con cationes divalentes y monovalentes fluyendo rápidamente a través de su superficie (Hancock *et al.*, 1994). De esta manera, la baja permeabilidad que presenta la membrana externa hacia las moléculas hidrofóbicas refleja la dificultad de las mismas para atravesar dicho área de potencial electrostático negativo, manifestándose así el papel protector de la membrana externa frente a los efectos tóxicos de los disolventes..

En un trabajo realizado en nuestro grupo, previo a esta Tesis, Huertas (1999) describió que la adición al medio de cationes Mg^{2+} ejerció un papel beneficioso en la tolerancia a tolueno de DOT-T1E y de algunas cepas sensibles a disolventes orgánicos. Parece que los iones Mg^{2+} también mejoran la tolerancia de la cepa *P. putida* DOT-T1E en presencia de concentraciones inhibitorias del crecimiento de compuestos hidroxilados derivados del metabolismo del tolueno (*p*-cresol; alcohol, aldehído y ácido *p*-hidroxibencílicos) (Fig. R.19 a R.12); no obstante, excepto en el caso del PHBA, este efecto fue más bien leve, pues sólo se consiguió incrementar la supervivencia celular en 0,5 unidades log, frente a las 2 unidades log de incremento en el caso de la tolerancia a concentraciones inhibitorias de PHBA (18g/l). En resumen, los resultados sugieren que, si bien los iones Mg^{2+} pueden ejercer algún efecto protector y así, incrementar la tolerancia a compuestos hidroxilados, se trataría de un efecto sutil, a excepción del PHBA. Una posible explicación de este efecto podría ser la formación de esferas de coordinación de iones Mg^{2+} (cargados positivamente) alrededor de las moléculas de PHBA (cargadas negativamente debido al grupo COO^-), con lo cual su acceso a la membrana celular se vería impedido estéricamente, hecho que no se produciría en el caso de los sustituyentes OH, CH_2OH y CHO del *p*-cresol, alcohol y aldehído *p*-hidroxibencílico, respectivamente, grupos sensiblemente más apolares que el grupo carboxilato COO^- .

1.2. Efecto de la exposición a bajas concentraciones de PHBA.

Estudios previos realizados en nuestro laboratorio mostraron que la pre-exposición de células de *P. putida* DOT-T1E a bajas concentraciones de tolueno (suministrado en la fase gaseosa), originó la supervivencia de casi el 100% de las células cuando éstas se sometieron a un choque repentino de tolueno (0,3 %, v/v), en contraposición con la pérdida de viabilidad celular de casi 4 órdenes de magnitud experimentada por células de la misma cepa que no habían sido expuestas previamente al compuesto aromático (Ramos *et al.*, 1998). De igual modo, la pre-adaptación de las células de *P. putida* DOT-T1E a bajas concentraciones de PHBA (5 g/l) también ejerció un efecto beneficioso sobre la posterior tolerancia a altas concentraciones de este compuesto (hasta 36 g/l) (**Fig. R.1.13**).

La respuesta adaptativa de *P. putida* DOT-T1E a PHBA fue relativamente rápida: pues tras sólo tras 1 ó 2 horas de incubación en presencia de 5 g/l de PHBA, se observó una mejoría en la tolerancia a un choque de 18g/l de PHBA, al contrario que células que no habían sido preadaptadas a este compuesto (**Fig. R.1.15**). Sin embargo, se observó que cuando se expusieron las células durante más tiempo a PHBA (4 ó 5 h) antes de someterlas al choque, se produjo un descenso significativo en la viabilidad celular (no mostrado). Esto pudo deberse a que, cuanto más avanzada estuvo la fase de crecimiento, más se incrementó el ritmo metabólico y, consecuentemente, los requerimientos energéticos fueron mayores, que se hubieron de repartir entre las propias funciones celulares y los mecanismos de respuesta frente a situaciones de estrés, en este caso la exposición a PHBA.

Por otro lado, cuando las células preadaptadas se transfirieron posteriormente a un medio no selectivo como LB, la re-exposición de estas células a PHBA originó una inhibición del crecimiento (**apdo.4, capítulo 1**). Este hecho apoya la hipótesis de una adaptación fisiológica de células de *P. putida* DOT-T1E a altas concentraciones de PHBA, más que la aparición de células mutantes que mostrasen una tolerancia a PHBA mayor que la cepa silvestre.

La exposición de las células a bajas concentraciones de compuestos tóxicos previamente al choque con altas concentraciones de los mismos, activa los distintos mecanismos presentes en las células frente a la toxicidad de compuestos aromáticos y disolventes orgánicos en el medio (ver sección de *Introducción*). En cepas del género

Pseudomonas, la adaptación de las células a los efectos tóxicos del tolueno y otros disolventes implica, por un lado, la isomerización *cis/trans* de ácidos grasos insaturados de fosfolípidos, que origina un incremento en la rigidez de la membrana para así compensar el incremento en la fluidez de la membrana provocado por los disolventes (Heipieper *et al.*, 1992, 1994, 1995, 1996; Heipieper y de Bont, 1994; Pinkart *et al.*, 1996; Pinkart y White, 1997; Ramos *et al.*, 1997; Weber *et al.*, 1994), y por otro lado, mecanismos de extrusión activa de disolventes fuera de las membranas (Isken y de Bont, 1996; Kieboom *et al.*, 1998; Ramos *et al.*, 1997a y 1998; Rojas *et al.*, 2001).

1.2.1. Rol del mecanismo de isomerización *cis/trans*.

La isomerización *cis/trans* de los ácidos grasos insaturados de fosfolípidos de la membrana se ha considerado un mecanismo de adaptación en respuesta no sólo a cambios de temperatura (Diefenbach *et al.*, 1992), sino a la presencia de disolventes orgánicos en cepas tolerantes a los mismos (Ramos *et al.*, 1997a; Sikkema *et al.*, 1995; Weber y de Bont, 1996; Segura *et al.*, 1999a).

En ausencia de PHBA, la cepa *P. putida* DOT-T1E mostró niveles bajos de ácidos grasos *trans*. La exposición de DOT-T1E a concentraciones crecientes de PHBA y otros compuestos hidroxilados provocó un aumento de los niveles de ácidos grasos insaturados en forma *trans*, que se tradujo en un descenso en la relación de ácidos grasos insaturados *cis/trans* (Tablas R.1.4 a R.1.7). Para analizar el papel de este fenómeno de isomerización *cis/trans* en la tolerancia a PHBA de *P. putida* DOT-T1E, se utilizó un mutante de esta cepa generado en nuestro laboratorio que carecía de la proteína Cti (del inglés, *cis/trans* isomerase), enzima responsable de la isomerización *cis/trans* de ácidos grasos insaturados de fosfolípidos (Junker y Ramos, 1999). Este mutante toleró la misma cantidad de PHBA que la cepa silvestre en placas de doble difusión. Este hecho no es sorprendente dado que la isomerización *cis/trans* se considera un mecanismo de defensa a corto plazo (del orden de minutos tras la exposición al agente tóxico), y el efecto negativo que ejerce el PHBA requiere una larga exposición al compuesto (Fig. R.1.8). De esta forma, se sugiere que el mecanismo de isomerización *cis/trans* de ácidos grasos de fosfolípidos forma parte de un mecanismo de defensa general e inespecífico que funciona, no sólo en respuesta a PHBA, sino a otros disolventes y compuestos orgánicos tóxicos (Heipieper *et al.*, 1994; Junker y

Ramos, 1999; Segura *et al.*, 1999a) e incluso metales pesados como cadmio y zinc (Godoy y Ramos, resultados sin publicar).

1.2.2. Posible sistema de exclusión activo de PHBA.

La hipótesis del funcionamiento de posibles bombas de eflujo de tolueno en cepas tolerantes a este aromático se vió confirmada con el aislamiento de mutantes sensibles a tolueno, cuyas mutaciones estaban localizadas en genes que codificaban proteínas pertenecientes a la familia de proteínas RND de bombas de eflujo (Kieboom *et al.*, 1997; Ramos *et al.*, 1998). De igual forma, los sucesivos intentos en este trabajo de Tesis por obtener mutantes de *P. putida* DOT-T1E más sensibles a PHBA que la cepa silvestre, en los cuales un hipotético mecanismo de eflujo pudiera estar afectado, rindieron un mutante en el sistema de energización de membrana externa TonB, denominado *P. putida* DOT-T1E-PhoA5, que contiene un transposón mini-Tn5-*phoA* en el gen *exbD* que forma parte del sistema TonB (**apdo. 2, capítulo 2**). Para determinar si el sistema TonB estaba implicado en un hipotético mecanismo de eflujo de PHBA, se estudió la acumulación de [¹⁴C-PHBA] en la cepa PhoA5. Este mutante se utilizó junto a otro mutante de *P. putida* DOT-T1E en el gen *pobA*, que codifica por la enzima *p*-hidroxibenzoato hidrolasa, responsable de la transformación de PHBA en protocatecuato (PCA) (Ramos-González *et al.*, 2001). Ni el mutante *exbD* ni el *pobA* de DOT-T1E pueden usar PHBA como única fuente de carbono, de ahí que la posible interferencia del metabolismo del PHBA fue eliminada. En el mutante PhoA5, probablemente el PHBA no sea transformado en su compuesto inmediato de la ruta, PCA, ya que el mutante sí fue capaz de utilizar protocatecuato como única fuente de carbono, al igual que el mutante *pobA* (no se muestra). En el estudio de acumulación de [¹⁴C-PHBA], se observó que el mutante PhoA5 acumuló PHBA al mismo nivel que la cepa silvestre (**Fig. R.2.25**), mientras que el mutante *pobA* alcanzó un máximo de [¹⁴C-PHBA] acumulado equivalente al 10% del máximo alcanzado por PhoA5. La acumulación de radiactividad no pudo ser consecuencia de incorporarla a la biomasa, ya que las células de ambos mutantes no asimilan PHBA, pero sí debido a la persistencia en las membranas.

Puesto que el mutante *pobA* fue tan tolerante a PHBA como la cepa silvestre (toleró 15-17 g/l de PHBA en placas de gradiente de doble difusión), y la cepa PhoA5 no toleró

concentraciones de PHBA superiores a 6 g/l (**Fig. R.2.18**), puede ocurrir que un sistema putativo de eflujo de PHBA esté aún activo en el mutante *pobA* e inactivo en el mutante PhoA5. Una posibilidad alternativa, aunque no incompatible, podría ser que el ácido aromático hidroxilado no penetre en el citosol de las células del mutante PhoA5 y así no provoque la respuesta adaptativa, aunque es una hipótesis que todavía no se ha elucidado.

La tolerancia a tolueno en *P. putida* DOT-T1E implica el funcionamiento de tres bombas de eflujo, denominadas TtgABC, TtgDEF y TtgGHI (Ramos *et al.*, 1998; Mosqueda y Ramos, 2000; Rojas *et al.*, 2001). Mutantes en los genes de las bombas TtgABC y TtgGHI son hipersensibles a tolueno (Ramos *et al.*, 1998; Rojas *et al.*, 2001). Se ha observado que mutantes en las bombas TtgABC y TtgDEF son ligeramente más sensibles a PHBA que la cepa silvestre DOT-T1E y que el mutante en la bomba TtgGHI, siendo este efecto mas evidente a pH 8,1. La cepa silvestre y el mutante de la bomba TtgGHI toleraron hasta 17 g/l de PHBA, mientras que los mutantes en las bombas TtgABC y TtgDEF toleraron sólo 12-13 g/l. Debido a la mayor tolerancia a tolueno del mutante PhoA5 respecto al mutante de la bomba TtgABC, se postula que debe existir un elemento común a la tolerancia a tolueno y a PHBA. Aunque las dos bombas de eflujo mencionadas arriba (TtgABC y TtgDEF) podrían estar implicadas en la extrusión de PHBA, no se descarta la existencia de otros sistemas de extrusion que eliminen PHBA de las membranas celulares. Sin embargo, la obtención de evidencias concluyentes de que otras bombas de flujo extruyan realmente PHBA requiere el aislamiento de cepas que contengan mutaciones en los genes que codifican otras proteínas implicadas en la eliminación de PHBA. De esta manera se puede concluir que en *P. putida* DOT-T1E debe funcionar una jerarquía de elementos en la tolerancia a agentes tóxicos, como PHBA y tolueno.

1.3. Efecto del transporte de PHBA.

El ácido *p*-hidrobenzoico, una molécula apolar, puede difundir pasivamente dentro de la célula, mientras que la entrada de su forma cargada (*p*-hidroxibenzoato), necesita de un mecanismo de transporte mediado por el producto del gen *pcaK* (Harwood *et al.*, 1994), el cual también está implicado en fenómenos de quimiotaxis hacia este compuesto. En un trabajo previo a esta Tesis llevado a cabo en nuestro grupo, se estudió la posible

implicación de los mecanismos de transporte de PHBA al interior de la célula en la tolerancia a PHBA de *P. putida* DOT-T1E. Ensayos realizados con un mutante *pcaK* de *P. putida* DOT-T1E (Alaminos, 2000), revelaron que dicho mutante no mostró quimiotaxis hacia PHBA, y que el crecimiento con PHBA como única fuente de carbono a pHs alcalinos estuvo significativamente retardado respecto al de la cepa silvestre (Alaminos, 2000), al igual que se ha observado en otras cepas de *P. putida* (Harwood *et al.*, 1994). Por otra parte, la tolerancia a PHBA del mutante *pcaK* de *P. putida* DOT-T1E en placas de gradiente de doble difusión a pH 7 y 8,1 fue similar a la obtenida con la cepa silvestre, aunque la tolerancia de ambas cepas a PHBA a pH 8,1 fue ligeramente superior. Esto sugiere que el transportador PcaK no juega un papel decisivo en la tolerancia adaptativa de PHBA en *P. putida* DOT-T1E.

2. LA TOLERANCIA A PHBA EN *P. putida* DOT-T1E ES INDUCIDA POR EL PROPIO PHBA.

Pocas son las especies capaces de crecer en medios que presentan PHBA como única fuente de carbono. El metabolismo de PHBA en *P. putida* conduce a protocatecuato (PCA), el cual es posteriormente transformado a través de la ruta del β -cetoadipato a productos intermedios del ciclo de Krebs (Harwood y Parales, 1996). Otros compuestos relacionados como son ferulato, vainillato, shikimato o quinato también son degradados a PCA y, posteriormente, metabolizados a través de la ruta del β -cetoadipato (Harwood y Parales, 1996; Ornston y Stanier, 1966). En el capítulo 1 de *Resultados* se puso de manifiesto la incapacidad de *P. putida* DOT-T1E para utilizar ferulato y vainillato como fuentes de carbono, pero sí fue capaz de utilizar quinato y shikimato como única fuente de carbono en su crecimiento (Fig. R.1.18).

En *P. putida*, además de la inducción de *pobA* por parte de PHBA (Nichols y Harwood, 1995), se ha observado que otros compuestos intermediarios de la ruta del β -cetoadipato actúan como inductores o represores de distintos genes de la misma: PCA y β -carboximuconato actúan como inductores para la expresión de los genes *pcaI* y *pcaJ*; PHBA y β -cetoadipato se comportan como inductores de *pcaB* (Zylstra *et al.*, 1989); de igual forma, los genes *pcaC* y *pcaD* son regulados de forma positiva por el PHBA (Parke y

Ornston, 1976). En *A. calcoaceticus*, los genes que contribuyen al cluster supraoperónico *pca-qui-pob*, que codifican enzimas de rutas fisiológicamente relacionadas, responden a dos inductores metabólicos diferentes, PCA y PHBA. En esta cepa, tanto los genes *pca* como el gen *pobA* se expresan en respuesta a la presencia en el medio de sus respectivos sustratos, esto es, PCA (para los genes *pca*) y PHBA (para el gen *pobA*) (Gerischer *et al.*, 1998; Kowalchuk *et al.*, 1994). En cambio, los genes *qui* se inducen por el producto (PCA) y no por el sustrato (quinato), aunque éste sí aparece como inductor de esta ruta en eucariotas y bacterias gram-positivas (Giles *et al.*, 1985; Euverlink *et al.*, 1992). Puesto que muchos compuestos aromáticos son catabolizados rindiendo PCA, el crecimiento de *A. calcoaceticus* utilizando un precursor de PCA, p.ej. PHBA, podría inducir gratuitamente la ruta catabólica del quinato.

Para determinar si la tolerancia a PHBA en *P. putida* DOT-T1E fue promovida por el PHBA en sí mismo o por un producto resultante de su metabolismo, en primer lugar, se estudió la capacidad de quinato y shikimato para actuar como posibles inductores de la tolerancia a un choque de PHBA. Células de *P. putida* DOT-T1E preinducidas con quinato o shikimato no toleraron choques repentinos de 15 g/l de PHBA (**Fig. R.1.19**), al contrario que células preexpuestas a bajas concentraciones de PHBA, que toleraron choques posteriores de hasta 24 g/l de PHBA (**Fig. R.1.15**). Por otra parte, se utilizó el mutante *pobA* de *P. putida* DOT-T1E, contruido en nuestro laboratorio (Ramos-González *et al.*, 2001) que, como ya hemos descrito, es capaz de crecer en PCA pero no en PHBA como única fuente de carbono, aunque sí tolera bajas concentraciones de PHBA utilizando glucosa como fuente de carbono. Al someter células del mutante *pobA* cultivadas alternativamente en PCA o en glucosa con PHBA a un choque de PHBA (18 g/l), se observó que las células preinducidas en presencia de bajas concentraciones de PHBA toleraron el choque repentino de PHBA, pero no así las células crecidas en PCA (Ramos-González *et al.*, 2001).

Estos resultados apoyan el argumento de que la respuesta a PHBA es una consecuencia del propio sustrato, PHBA, y no de un producto resultante de su metabolismo. Este resultado es de suprema importancia para la producción de PHBA a partir de tolueno, debido al hecho de que en el proceso de producción, la acumulación de

PHBA con el tiempo induce las respuestas de tolerancia, un proceso que ocurre relativamente rápido como mostró en el apartado 4 del capítulo 1 de *Resultados*.

3. EL GEN MUTADO EN LA CEPA PhoA5 SENSIBLE A PHBA CODIFICA LA PROTEÍNA ExbD.

Con objeto de identificar posibles genes involucrados en la tolerancia a PHBA de *P. putida* DOT-T1E, se generó una colección de mutantes al azar utilizando el transposón mini-Tn5*phoA* y se analizó la tolerancia de los mismos a PHBA (**apdo. 1, capítulo 2**). Se encontró un clon, al que se llamó *P. putida* DOT-T1E-PhoA5, que mostraba una sensibilidad incrementada a PHBA y a otros compuestos aromáticos, además de una marcada deficiencia en la adquisición de hierro extracelular, en comparación con la cepa silvestre. En el apartado 2 del capítulo 2 de *Resultados* se mostró que la fase de lectura abierta interrumpida por el transposón en la cepa mutante, corresponde al gen *exbD* de *P. putida*, que codifica una proteína de membrana interna asociada al sistema de transporte de alta afinidad de complejos ferrisideróforos y vitamina B₁₂ (Kadner, 1990; Moeck y Coulton, 1998). El polipéptido codificado por dicha región mostró una gran similitud con las proteínas ExbD de otras bacterias Gram-negativas (**Tabla R.2.2**). Las proteínas ExbD se caracterizan, entre otros aspectos, por su pequeño tamaño (las que están secuenciadas hasta el momento varían entre 104 y 146 aminoácidos). Las regiones más conservadas entre las proteínas ExbD son un segmento transmembrana potencial de expansión localizado en el dominio N-terminal (aproximadamente, residuos 17-40 en ExbD_{*E. coli*}), y un dominio periplásmico C-terminal que se cree que interacciona con TonB y ExbB. Algunas posiciones, a las que se le atribuye un papel importante, están conservadas en todas las proteínas ExbD secuenciadas hasta la fecha, p. ej. Asp25 y Lci132 en ExbD_{*E. coli*} (Braun *et al.*, 1996); esta última está sustituida conservativamente por Phe en *B. brochiseptica* (residuo 133), *X. campestris* y *N. meningitidis*.

4. EL GEN *exbD* DE *P. putida* DOT-T1E FORMA PARTE DEL SISTEMA TonB.

Cuando se secuenciaron las regiones de ADN adyacentes al gen *exbD* de *P. putida*, se encontraron dos fases de lectura abierta, una corriente arriba de *exbD* y otra corriente abajo, que se disponían en la misma dirección que *exbD*, y que mostraron gran similitud con los genes del sistema TonB, ya secuenciados total o parcialmente, en otras bacterias gram-negativas (**Tablas R.2.1 a R.2.3**).

El gen que se localizó corriente arriba de *exbD* fue *exbB*, separado de aquél por sólo 3 pb, mientras que el comienzo del gen identificado corriente abajo, *tonB*, solapa con el final de *exbD* (**Fig R.2.4**). No se ha podido discernir ningún promotor potencial corriente arriba del gen *exbB* de *P. putida* DOT-T1E, aunque sí se ha identificado una posible caja *fur* de unión a la proteína reguladora Fur, localizada a 98 pb del comienzo del codon de iniciación de *exbB* (**Fig. R.2.4**), que tiene una identidad de 11 pb con la secuencia consenso de caja *fur* propuesta para de *E. coli* (de Lorenzo *et al.*, 1987).

Incluyendo el gen *exbB* de *P. putida* DOT-T1E, se han secuenciado hasta la fecha 49 posibles genes *exbB* (8 de ellos putativos) (**Tabla R.2.1**). ExbB es la proteína más conservada de todas las que conforman el sistema TonB (**Fig. R.2.10**). Esto probablemente se deba al hecho de que ExbB es una proteína relativamente pequeña que posee 3 ó 4 segmentos transmembrana (dependiendo de la capa bacteriana) claves para su función y que, por tanto, debe estar sometida a una fuerte presión selectiva. Entre las distintas proteínas ExbB alineadas, las zonas de similitud aparecieron distribuidas por toda la secuencia (**Fig. R.2.10**). Como ya se comentó en la *Introducción*, es interesante resaltar la presencia de una extensión N-terminal de 91, 75 ó 64 aminoácidos, respecto a ExbB_{*E. coli*}, en los homólogos ExbB de las cepas *P. putida* WCS358 (Bitter *et al.*, 1993), *Bordetella pertussis* y *B. bronchiseptica* (Nicholson y Beall, 1999; Pradel *et al.*, 1999), respectivamente. Esta extensión contiene un segmento transmembrana adicional respecto a ExbB_{*E. coli*} con un alto contenido en residuos de alanina y prolina, cuyo análisis a nivel de la estructura primaria predijo la existencia de un péptido señal con características muy similares a las de los péptidos estándar en el caso de ExbB_{*P. putida*} WCS358 (Pugsley, 1993), que no se ha observado en el resto de proteínas ExbB que no poseen esta extensión N-terminal. Este hecho también se ha confirmado en ExbB_{*P. putida*} DOT-T1E, (y en ExbB_{*P. putida*} KT2240) que contiene una extensión de 82 aminoácidos rica en alanina y prolina (47,56% del total de

aminoácidos correspondientes a este segmento) (**Fig. R.2.10**). La región N-terminal de ExbB_{*P. putida* WCS358} que se extiende desde el residuo 30 hasta el 83, contiene 8 secuencias pentaméricas con el consenso Pro-Ala/Val-Ala-X-Ala/Pro (**Fig. R.2.10**); número que en ExbB_{*P. putida* DOT-T1E} se reduce a 7 secuencias. En el caso de *P. putida* WCS358 se especuló que la presencia de este dominio N-terminal en ExbB estaba de alguna forma relacionada, por un lado, con la naturaleza de algunos receptores de sideróforos férricos dependientes de TonB en este microorganismo, los cuales se caracterizan por presuntas extensiones periplásmicas que no son típicas de la mayoría de los receptores de membrana externa dependientes de TonB (Bitter *et al.*, 1993); por otro lado, se ha encontrado que esta extensión de ExbB podría tener alguna homología con la proteína H.8 de *N. gonorrhoeae* (Baehr *et al.*, 1989), lipoproteína asociada a virulencia, que también está compuesta por secuencias pentaméricas repetidas Pro-Ala-Ala-Glu-Ala. Sin embargo, las consecuencias funcionales de esta homología observada no están claras y se necesitan posteriores investigaciones para determinar la importancia de este dominio en la función de ExbB.

El gen *tonB* de *P. putida* DOT-T1E, localizado corriente abajo de *exbD*, mostró homología con los genes *tonB* de distintas bacterias gram-negativas (**Tabla R.2.3**), especialmente en las regiones que codifican por el dominio transmembrana y las repeticiones Lys-Pro (**Fig. R.2.14**). Aunque la homología global entre las proteínas TonB de *P. putida* y de enterobacterias es relativamente baja (30,4 %), el contenido y la distribución de residuos de prolina es muy similar en todas las proteínas TonB (**Fig. R.2.14**). Las proteínas TonB de enterobacterias contienen dos regiones ricas en prolina que están íntimamente ligadas: la primera, es una región central Glu-Pro y la segunda, una región de repeticiones Lys-Pro (Postle y Good, 1993). La región Glu-Pro de TonB_{*P. putida* DOT-T1E} (cuyo contenido en Pro es el 19% del total de aminoácidos), localizada entre las posiciones 70 y 102 en la secuencia de *E. coli* (Larsen *et al.*, 1993) (**Fig. R.2.14**), se ha demostrado que no es esencial, y solamente sirve para extender TonB a través del espacio periplásmico hacia la membrana externa (Larsen *et al.*, 1993). De igual modo, parece ser que las repeticiones del motivo PXYP (donde X es A-127; Q-168 y G-233; e Y es S-128; Y-169 y K-234, en TonB_{*E. coli*}) son las responsables de interaccionar directamente con receptores de membrana externa a través de las cajas TonB (Brewer *et al.*, 1990). En *P.*

putida y las especies enterobacteriaceas, hay un mayor grado de conservación de estas repeticiones que la región Glu-Pro. Además de la región de repeticiones Lys-Pro (residuos 96-107 en *E. coli*), otro aminoácido (Gln-165) localizado fuera de esta región se ha visto que es importante para la interacción con receptores de membrana externa en *E. coli* (Schöffler y Braun, 1989; Gudmundsdottir *et al.*, 1989), aminoácido que no está conservado ni en *P. putida* ni en *S. marcescens*.

Puesto que la homología en conjunto entre las proteínas TonB de *E. coli* y *P. putida* es relativamente baja (27,8% identidad), no es sorprendente que el gen *tonB* de *E. coli* sea incapaz de complementar un mutante *tonB* de *P. putida* WCS358 y viceversa (Bitter *et al.*, 1993). Una posible explicación para esta pérdida de complementación podría ser la presencia de extensiones N-terminales delante de la caja TonB en receptores de *Pseudomonas*, que están ausentes en receptores de *E. coli*, y que podrían ser importantes para las interacciones con *tonB* en *Pseudomonas* (Bitter *et al.*, 1993). De igual modo, una región aún sin identificar en el receptor de *E. coli*, que no está conservada en *Pseudomonas*, es importante para la unión a TonB (Bitter *et al.*, 1993).

El alineamiento presentado en la **Figura R.2.14** muestra un grupo de 61 residuos adicionales en la proteína TonB1 de *P. aeruginosa* respecto a TonB2, localizado en el extremo N-terminal de la proteína, aguas arriba del segmento transmembrana predicho en TonB_{*P. putida*} DOT-T1E, que constituye un péptido señal putativo de anclaje a la membrana interna (Poole *et al.*, 1996). Como tal, es probable que los residuos extra estén dispuestos hacia la cara citoplasmática de la membrana interna. El significado funcional de esta nueva extensión N-terminal es desconocido y no se ha identificado ninguna homología entre este dominio y proteínas conocidas en las bases de datos.

Los genes *exbB* y *exbD* son los genes de la agrupación que tienen mayor grado de conservación (**Fig. R.2.10 y R.2.12**), pero no ocurre lo mismo con el gen *tonB*, cuya secuencia parece la menos conservada (**Fig. R.2.14**). Paradójicamente, la proteína menos conservada, TonB, es la que interviene en la mayoría de las interacciones que se producen entre los componentes del sistema TonB, como se describió en la sección de *Introducción*, e incluso no parece que las secuencias de TonB implicadas en dichas interacciones, presentes en el dominio N-terminal, estén más conservadas que el resto de la proteína. En

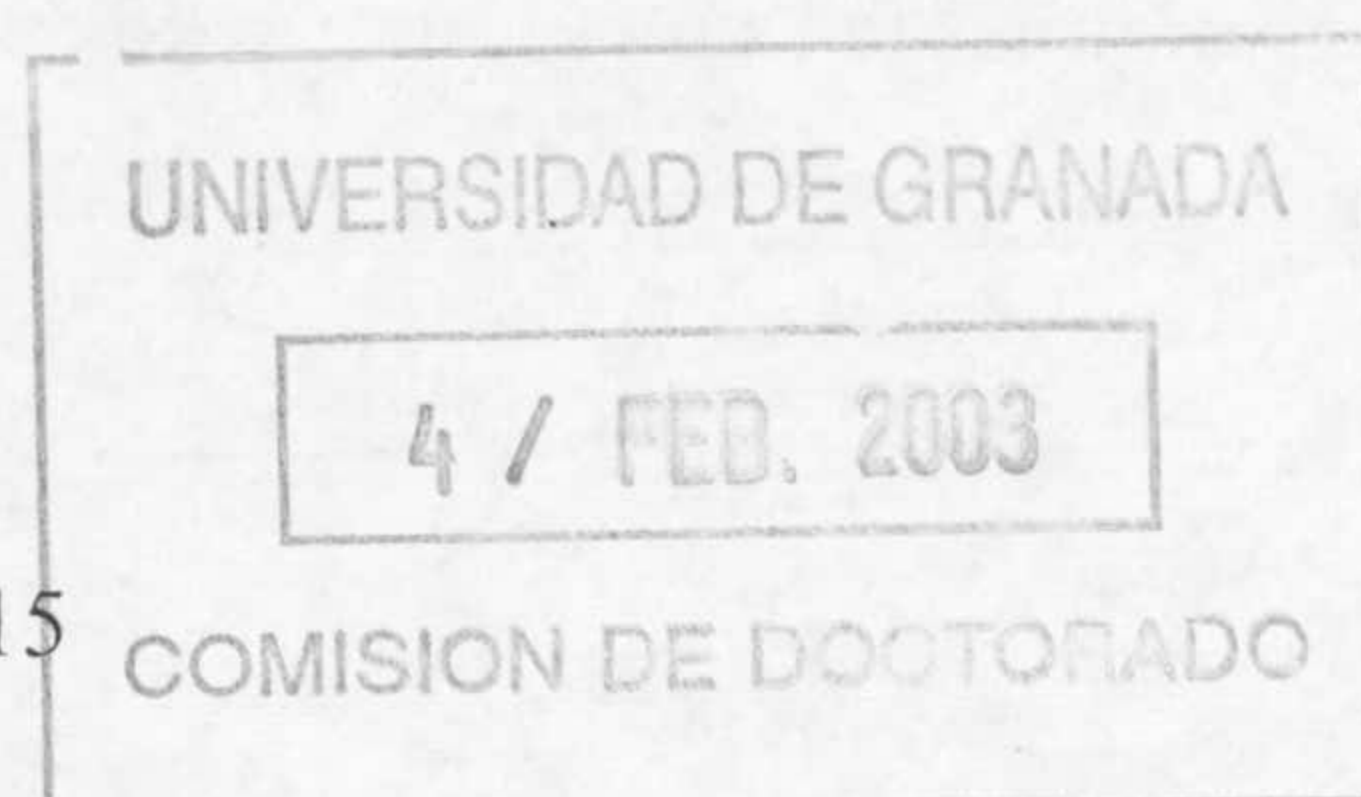
este sentido se ha sugerido que, dado que TonB, al igual que la proteína TolA del sistema Tol-Pal(OprL), es la principal proteína del sistema utilizada tanto por colicinas como por fagos filamentosos para entrar en la célula, cabría la posibilidad de que ciertas mutaciones en el gen *tonB* fuesen más ventajosas selectivamente al producir una mayor inmunidad de la célula frente a estos agentes infecciosos, pudiendo ser éste el motivo de su mayor variabilidad (Sturgis, 2001).

Los productos codificados por los genes *exbB*, *exbD* y *tonB*, ampliamente estudiados en *E. coli* y otras bacterias Gram-negativas, forman un complejo en la membrana interna en el que las proteínas interaccionan entre sí a través de sus dominios transmembrana (Larsen *et al.*, 1994; Braun *et al.*, 1996), al igual que los productos de los genes *tolQ*, *tolR* y *tolA* de *E. coli* y *P. putida* (Germon *et al.*, 1998; Deoiche *et al.*, 1999; Lazzaroni *et al.*, 1995; Rodríguez-Herva, 1999; Llamas, 2002). Como se deduce de los alineamientos múltiples (Fig. R.2.10, R.2.12 y R.2.14), estos dominios coinciden con las regiones más conservadas entre las distintas proteínas. Aparte de los homólogos de genes *exbB* y *exbD* que se encuentran ampliamente distribuidos en el genoma de distintos microorganismos, se ha encontrado que los genes *exbB* y *exbD* de *P. putida* mostraron una alta similitud con otros genes que no forman parte de la agrupación TonB (Tablas R.2.1 y R.2.2), como es el caso de los genes *tolQ* y *tolR*, respectivamente, pertenecientes al sistema *tol-oprL(pal)* (Dérrouiche *et al.*, 1995; Lazzaroni *et al.*, 1995; Dennis *et al.*, 1996), o con genes implicados en el movimiento de flagelos, como es el caso del gen *motA*. MotA es un componente esencial del motor del flagelo que usa un gradiente de protones para generar el movimiento rotativo en el flagelo (van Way *et al.*, 2000). Estos genes están, por tanto, predominantemente asociados con una proteína periplásmica tipo TonB o TolA, y esta asociación parece ser capaz de funcionar como un complejo transmisor de la energía generada en la membrana interna (Larsen *et al.*, 1999; Cascales *et al.*, 2000). La familia de proteínas del canal de protones MotA/TolQ/ExbB agrupa conjuntamente proteínas integrales de membrana interna que parecen estar implicadas en la translocación de proteínas a través de la membrana. Dichas proteínas son probablemente canales de protones, ya que utilizan la fuerza protón motriz generada en la membrana interna (Cascales *et al.*, 2001). Sin embargo, hasta el momento no está claro cómo el gradiente

Discusión

electroquímico se traduce en las interacciones proteína-proteína con los receptores de la membrana externa en los sistemas TolA o TonB, o cómo este gradiente desencadena los procesos de transporte. Recientemente se ha determinado de la estructura cristalina del dominio III del proteína TolA de *P. aeruginosa* (Witty *et al.*, 2002), el cual está relacionado a nivel estructural con el dominio C-terminal de proteínas TonB, sugiriendo un origen evolutivo común y una posible relación funcional entre ambas proteínas. De este estudio se extrae una posible explicación a cómo transcurre la interacción de la proteína TonB con los receptores de ferrisideroforos y vitamina B₁₂ de la membrana externa: el correspondiente extremo terminal en el dímero TonB podría actuar como una superficie para la interacción con el péptido de la caja TonB a través de la formación de una estructura en forma de hoja extendida (Witty *et al.*, 2002). De igual modo se ha sugerido que el motivo conservado S-XXX-H-XXXXXX-L-XXX-S presente en el dominio transmembrana de TolA y de TonB (Germon *et al.*, 1998; Karlsson *et al.*, 1993) podría intervenir en el proceso de transporte. Estos residuos conservados parecen disponerse como una tira co-axial a lo largo de la hélice transmembrana para formar una superficie de empaquetamiento intermolecular, y sea posiblemente este empaquetamiento el que esté afectado por la fuerza protón motriz, causando desplazamientos axiales en las regiones inter-dominios como parte del mecanismo alostérico (Witty *et al.*, 2002).

Un hecho interesante fue la capacidad de TolQ de *P. putida* para complementar un mutante *exbB* de *E. coli*, aunque no pudo complementar un mutante *exbB* de *P. putida* (Bitter *et al.*, 1993). La explicación podría residir en el hecho de que incluso TolQ de *P. putida* (231 aminoácidos) guarda más similitud con ExbB de *E. coli* (244 aminoácidos) que con ExbB de *P. putida* WCS358 (329 aminoácidos) (**Tabla R.2.1**). Además, Bitter *et al.* (1993) sugirieron que la causa de que un mutante *P. putida exbB* presentase un fenotipo claro *tonB* (una vez descartado un efecto polar de la mutación), mientras que un mutante *exbB* de *E. coli* presentaba tan sólo un fenotipo *tonB* parcial, podría ser la incapacidad de TolQ de *P. putida* para complementar parcialmente esa mutación, complementación que sin embargo sí se produciría en *E. coli* (Braun, 1989).



En la mayoría de las bacterias donde se ha identificado el gen *tonB*, dicho gen no aparece ligado a los genes *exbB* y *exbD* (Fig. D.1). El sistema TonB de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* consta de 4 genes: *exbD2*, *exbD1*, *exbB* y *tonB*, donde los genes *tonB*, *exbB* y *exbD1* pueden expresarse independientemente, mientras que *exbD2* parece corregularse con *exbD1* (Wiggerich *et al.*, 1997). En *Xanthomonas axonopodis* y *Xylella fastidiosa*, donde también se han encontrado dos genes *exbD*, la agrupación de genes es *tonB*, *exbB*, *exbD-1* y *exbD-2* (da Silva *et al.*, 2002; van Sluys *et al.*, 2003). Los genes *tonB*, *exbB* y *exbD* de *N. meningitidis* y *N. gonorrhoeae* se agrupan de una forma parecida (Stojiljkovic y Srinivasan, 1997). Los genes *tonB*, *exbB* y *exbD* de *P. putida* WCS358, *P. haemolytica*, *H. ducreyi*, y *H. influenzae* también se agrupan formando un operón, pero en estas cepas el gen *tonB* se localiza detrás de los genes *exbB* y *exbD* (Bitter *et al.*, 1993; Jarosik *et al.*, 1994; Jarosik y Hansen, 1995, Elkins *et al.*, 1998; Graham y Lo, 1997). En *Pasteurella multocida* los genes *exbB*, *exbD* y *tonB* también están ligados físicamente, pero se transcriben independientemente (Bosch *et al.*, 2002). En *P. aeruginosa*, además de un gen *tonB* (*tonB1*) que se encuentra aislado en el cromosoma, se ha encontrado un segundo gen *tonB* (*tonB2*) ligado a los genes *exbB* y *exbD* (Zhao y Poole, 2000). Sin embargo, en *E. coli*, el gen *tonB* está separado del operón formado por *exbB* y *exbD* (Bachmann, 1990). El agrupamiento de estos genes en forma de operones reflejan la dependencia de las proteínas entre sí en *Pseudomonas*, donde tanto ExbB como TonB se ha visto que son esenciales, mientras que en *E. coli* sólo la proteína TonB es indispensable. En *Campylobacter coli*, el gen *tonB* se organiza divergentemente junto al gen *cfrA* (receptor férrico de membrana externa de *Campylobacter*) con los promotores localizados entre los dos genes con orientaciones opuestas (Guerry *et al.*, 1997).

Los genes *exbBDtonB* de *B. japonicum*, específicos para el importe de haem e indispensable para el importe de sideróforos, parecen estar organizados en un operón junto con *hmuR* (receptor de membrana externa de haem dependiente de TonB) y otras dos fases abiertas de lectura de función desconocida (Nienaber *et al.*, 2001). Experimentos recientes postulan que *B. japonicum* posee una segunda copia de *tonB* y probablemente también de *exbBD*, que funcionarían en el importe de quelatos de hierro. La capacidad para expresar un sistema TonB que sea específico para el importe de haem se ha descrito anteriormente en

otras bacterias; así, *P. aeruginosa* y *V. cholerae* sintetizan dos versiones de TonB, una de las cuales está dedicada al importe de haem (Occhino *et al.*, 1998; Zhao y Poole, 2000; Seliger *et al.*, 2001).

En *V. cholerae* se han encontrado dos conjuntos de genes que codifican las proteínas TonB, ExbB y ExbD. El primero, *tonB1-exbB1-exbD1*, forma parte de un operón que incluye además tres genes del transporte de haem (*hutBCD*). El segundo grupo también conforma un operón, *tonB2-exbB2-exbD2* (Occhino *et al.*, 1998; Seliger *et al.*, 2001). Ambos operones tienen funciones tanto comunes, como algunas más específicas de cada uno. La presencia de más de un sistema TonB no es única de *V. cholerae*. En los genomas de *V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticus*, *Serratia marcescens*, *Yersinia pestis* y *Pseudomonas aeruginosa* también se han identificado dos genes *tonB* (Letoffe *et al.*, 1999; O'Malley *et al.*, 1999; Zhao y Poole, 2000) y también puede estar presente en *Neisseria meningitidis* y *N. gonorrhoeae* (Desai *et al.*, 2000). En el genoma de *H. pylori* 26695 se han identificado hasta tres copias de los genes *exbB* y *exbD*, cada pareja de los cuales se agrupa en un operón, pero sólo se ha identificado una única copia del gen *tonB* junto a una de estas parejas (Tomb *et al.*, 1997). En el caso de *V. alginolyticus*, las dos proteínas TonB también parecen estar implicadas en procesos celulares distintos (O'Malley *et al.*, 1999), al igual que en *V. cholerae*. Sería interesante conocer si estas proteínas TonB adicionales tienen funciones específicas en todas estas especies, al igual que las tienen en *V. cholerae* y *V. alginolyticus*, donde la presencia de dos sistemas TonB no representa una redundancia en su función, sino que contribuye a la capacidad del microorganismo para utilizar una gran variedad de compuestos de hierro bajo diferentes condiciones ambientales. Además, la presencia de dos sistemas TonB permitiría al microorganismo secuestrar compuestos de hierro más eficientemente que otros organismos presentes en el entorno (Seliger *et al.*, 2001).

Mediante ensayos de hibridación realizados en este trabajo, se ha comprobado que, en el cromosoma de *P. putida* DOT-T1E, cada uno de los genes del sistema TonB está presente en una copia simple (Fig. R.2.15), al igual que en *P. putida* WCS358 (Bitter *et al.*, 1993). Este hecho no descarta la posible existencia de otros homólogos *tonB*, como se ha descrito en *P. aeruginosa* (Zhao y Poole, 2000), debido a la baja homología encontrada entre las secuencias de ambos genes *tonB1* y *tonB2* (46,2% homología, 27,9% identidad).

Basándonos en la proximidad del final del gen *exbB* y el comienzo del gen *exbD*, separados tan sólo por 3 pb, y el solapamiento entre los genes *exbD* y *tonB* de *P. putida* DOT-T1E (Fig. R.2.4), se sugirió que los genes *exbB*, *exbD* y *tonB* podrían formar parte de un operón. Los experimentos de RT-PCR confirmaron que los tres genes se transcriben de forma conjunta en *P. putida* DOT-T1E (Fig. R.2.16) y se agrupan formando el cluster *exbB-exbD-tonB*, al igual que en *P. putida* WCS358 (Bitter *et al.*, 1993). Este hecho está de acuerdo con la observación de que la organización de estos genes en forma de operón reflejan la dependencia de las proteínas entre sí en *Pseudomonas* (Postle, 1993).

6. POSIBLES FUNCIONES DEL SISTEMA TonB en *P. putida* DOT-T1E.

Las proteínas ExbB, ExbD y TonB están implicadas en varios procesos celulares tales como la energización de la membrana citoplasmática para el importe de colicinas en *E. coli* (Lazdunski *et al.*, 1998), el eflujo de antibióticos vía la bomba MexAB en *P. aeruginosa* (Zhao *et al.*, 1998), y el importe de complejos Fe(III)-sideróforo a través de la membrana externa de *E. coli* y *Pseudomonas* (Moeck y Coulton, 1998; Bitter *et al.*, 1993) y de otras bacterias Gram-negativas.

La función más conocida del sistema TonB es su mediación en el proceso de transporte al interior de la célula de complejos ferrisideroforos y vitamina B₁₂, donde las proteínas ExbBD/TonB forman un sistema que se encarga de transducir la energía producida en la membrana citoplasmática a la membrana externa (Jarosik *et al.*, 1994; Torres y Payne, 1997). El complejo de transducción de energía dependiente de TonB consiste de al menos tres proteínas, TonB, ExbB y ExbD. Aunque ExbB y ExbD son esenciales para la actividad de TonB, TonB funciona como un verdadero transductor de energía que acopla la fuerza proton motriz de la membrana citoplasmática para impulsar procesos de transporte activo en la membrana externa (Karlsson *et al.*, 1993; Braun, 1995; Letain y Postle, 1997; Kadner, 1990; Postle, 1993; Moeck y Coulton, 1998). El mutante PhoA5 de *P. putida* DOT-T1E, cuya mutación estaba localizada en el gen *exbD*, fue incapaz de crecer en un medio deficiente en hierro, esto es, cuando se añadió al medio el quelante de hierro EDDHA (Fig. R.2.28); de hecho, este mutante precisó de un suplemento

extra de este elemento en el medio de cultivo para la formación de colonias definidas en medio sólido (**apdo 6.1, capítulo 2**). Asimismo, gracias a la fusión traduccional de *exbD* a *'phoA* generada en el mutante PhoA5 que permite realizar estudios de expresión del promotor P_{exbB} , se observó un aumento considerable de la expresión bajo condiciones limitantes de hierro (en presencia del quelante EDDHA) (**Fig. R.2.29**), al igual que se ha descrito para otros sistemas TonB bacterianos (Bosch *et al.*, 2002; Venturi *et al.*, 1995; Poole *et al.*, 1996c). Estos hallazgos apoyan la hipótesis de que el sistema TonB también participa en la entrada de hierro en *P. putida* DOT-T1E.

Aunque, generalmente, las proteínas TonB están implicadas en el importe a través de la membrana externa, se ha descrito que el sistema TonB también funciona como un sistema de transducción de energía para el eflujo de ciertas moléculas (Howard *et al.*, 1996; Poole *et al.*, 1996c; Xian-Zhi *et al.*, 1998; Zgurskaya y Nikaido, 2000). En *Aeromonas hydrophila* se ha identificado una proteína semejante a TonB que juega un papel en el exporte dependiente de energía de la exotoxina aerolisina (Howard *et al.*, 1996), aunque no está del todo claro que TonB sea la proteína involucrada en el proceso de exporte dependiente de energía.

Mientras que los genes del sistema TonB, así como la organización de los mismos se han identificado y caracterizado en un gran número de microorganismos, no se ha encontrado bibliografía en la que se haya descrito que los genes del sistema TonB estén implicados en la tolerancia a compuestos aromáticos como tolueno, PHBA, parabenos y aminoácidos aromáticos. Lo que es más, no se han encontrado antecedentes de que los mutantes TonB sean más sensibles a los compuestos arriba mencionados. Los resultados obtenidos en el capítulo 2 de la sección de *Resultados* suponen la primera referencia bibliográfica de la implicación del sistema TonB en la tolerancia a estos compuestos en las cepas *P. putida* DOT-T1E y PhoA5.

Por otra parte, se ha descrito en bibliografía la implicación del sistema TonB en la tolerancia inducible de *P. aeruginosa* y *Neisseria* a algunos compuestos de naturaleza antibacteriana, como algunos antibióticos, colorantes, detergentes y péptidos

antibacterianos (Li y Poole, 2001; Hagman *et al.*, 1995; Shafer *et al.*, 1998; Eda *et al.*, 2003), a través de su implicación en el funcionamiento de bombas de eflujo específicas de antibióticos (ver *Introducción*). La sobreexpresión de un sistema de eflujo o su expresión desde un plásmido conduce a una resistencia incrementada de las bacterias a una gran variedad de antibióticos y otras sustancias tóxicas para la célula, mientras que la inactivación de un sistema de eflujo causa un incremento en la sensibilidad a dichas sustancias (Li *et al.*, 1998; Ramos *et al.*, 1998). Tales sistemas de eflujo están siendo reconocidos cada vez más en un amplio espectro de microorganismos, particularmente en bacterias gram-negativas.

En *P. aeruginosa*, la resistencia intrínseca a antibióticos se consigue en parte gracias a una bomba de eflujo de múltiples antibióticos que pertenece a la familia RND y que codifica el operón *mexAB-oprM* (Poole *et al.*, 1993, 1996a, 1996b), donde *oprM* codifica una proteína de membrana externa formadora de canales (la cual se cree que participa en el transporte de antibióticos a través de la membrana externa) y las proteínas MexA y MexB forman parte del complejo translocasa. Un mutante *tonB* de *P. aeruginosa* deficiente en el transporte de sideróforos de hierro también fue más susceptible a una amplia variedad de antibióticos que la cepa silvestre, un fenotipo reminiscente de mutantes deficientes en el operón *mexAB-oprM* de eflujo de antibióticos (Zhao *et al.*, 1998; Li y Poole, 2001). El antibiótico tetraciclina es eliminado a través del sistema de eflujo MexAB en *Pseudomonas aeruginosa* (Zhao *et al.*, 1998). Otra serie de antibióticos que podrían ser eliminados via el mismo sistema de bombas son: cefotaxima, imipenem, norfloxacin, y ciprofloxacina (Zhao *et al.*, 1998). El incremento en la sensibilidad de *P. putida* DOT-T1E PhoA5 a los antibióticos tetraciclina, ciprofloxacina, norfloxacin, cefotaxin, e imipenem (**Tabla R.2.9**) puede atribuirse a un eflujo defectuoso de estos compuestos por parte de las bombas de eflujo RND, ya que las bombas TtgABC y TtgGHI están implicadas en el eflujo de antibióticos β -lactámicos además de disolventes (Duque *et al.*, 2000). La sensibilidad del mutante PhoA5 a los antibióticos anteriormente mencionados no se vio afectada por la concentración de hierro en el medio, como demuestra el hecho de que, la cepa mutante fue tan sensible a estos antibióticos tanto en condiciones de exceso como de deficiencia de hierro (**Tabla R.2.9**). Por tanto es improbable que este efecto fuera debido, no a un efecto

Discusión

de la proteína Fur sobre la expresión de las bombas de flujo de tolueno y antibióticos, a pesar de haber encontrado secuencias putativas de cajas Fur en las regiones promotoras de estos genes (ver **Figura D.2**), sino a la mutación *exbD* en sí misma. Este hallazgo sugiere que la mutación en el sistema TonB es directa o indirectamente responsable del fenotipo que hemos observado.

consensus <i>E. coli</i>	G A T A A T G A T A - A T C A - T T A T C
<i>ttgDEF</i>	C A T A G T G A T A C A C T A - T T C T G
<i>ttgABC(1)</i>	G A T A A - G C T A - A T C A - A G C G C
<i>ttgABC(2)</i>	T G T A A - G T A T - A T T C C T T A G C
<i>ttgGHI</i>	C A T A A T G C T A C A - C T - C T A C C

Figura D.2 Alineamientos de posibles cajas Fur encontradas en las regiones promotoras de genes pertenecientes a las bombas de tolerancia a tolueno de *P. putida* DOT-T1E. En negrita se resaltan aquellos nucleótidos que están conservados respecto a la secuencia consenso de caja *fur* en *E. coli* (de Lorenzo *et al.*, 1987). En el promotor del sistema *ttgABC* se han encontrado dos posibles cajas *fur*, a las que denominamos *ttgABC(1)* y *ttgABC(2)*.

Previamente se ha descrito que la tolerancia a hidrocarburos aromáticos como tolueno implica el funcionamiento de las bombas de eflujo que eliminan compuestos tóxicos de las membranas (Ramos *et al.*, 1998; Mosqueda *et al.*, 1999). El aumento en la sensibilidad a tolueno y PHBA parece ser el resultado de una limitación en la eliminación de estos compuestos aromáticos por parte de bombas de eflujo específicas, como se sugiere por los datos de acumulación de estos compuestos en las membranas celulares (**apdo. 6.3.3, capítulo 2**). En *P. putida* DOT-T1E, el tolueno y algunos antibióticos son eliminados a través de una serie de bombas de eflujo, TtgABC, TtgDEF y TtgGHI, pertenecientes a la familia RND que son altamente homólogas a la bomba MexAB-OprM (ver sección de *Introducción*). El hecho de que la cepa mutante DOT-T1E-PhoA5 acumule de dos a tres veces más [¹⁴C]-tolueno que la cepa tolerante a este disolvente DOT-T1E Δ *todC* (mutante control de *P. putida* DOT-T1E incapaz de metabolizar tolueno) (**Fig. R.2.24**), demuestra que el funcionamiento de las bombas RND de eflujo de tolueno estaba afectado en el mutante PhoA5. Por otra parte, se ha observado que la preinducción de las bombas de eflujo en la cepa silvestre con concentraciones bajas de tolueno conduce a una menor

acumulación de [^{14}C]-tolueno en las células (Ramos *et al.*, 1997), fenómeno que no ocurrió en la cepa mutante PhoA5, lo cual indica un funcionamiento defectuoso de la bomba de eflujo constitutiva TtgABC y de las bombas inducibles TtgDEF y TtgGHI. Hasta el momento no se dispone de ninguna evidencia directa entre las bombas RND de eflujo y la tolerancia a PHBA, pero el hecho de que el mutante PhoA5 acumulase 10 veces más [^{14}C]-PHBA que la cepa control DOT-T1E*pobA* (**Fig. R.2.25**) sugirió que al menos un sistema de eflujo estaba involucrado en la exclusión de este ácido aromático carboxílico y que el funcionamiento de este sistema se vio afectado en la cepa mutante DOT-T1E-PhoA5. De esta forma, es posible que el sistema ExbBDTonB en *P. putida* DOT-T1 pueda funcionar en la energetización de las bombas implicadas en la extrusión de PHBA y de tolueno. Debido a la mayor toxicidad del tolueno en comparación con el PHBA, no nos sorprendió que una acumulación del doble de tolueno fuese tóxica, mientras que para llegar a ser tóxico, el incremento en la acumulación de PHBA necesitó ser casi un orden de magnitud mayor.

En ensayos de tolerancia a choques repentinos por tolueno, en el caso de la cepa silvestre DOT-T1E, un suplemento extra de hierro al medio condujo a una ligera pérdida de viabilidad en células que no estaban preinducidas, no observándose diferencias dependientes del hierro en las células preinducidas (**Fig. R.2.30**). En la misma figura se mostró cómo un suplemento extra de hierro fue responsable de la pérdida de inducción de la tolerancia a tolueno del mutante PhoA5, no observándose diferencias en la supervivencia de células inducidas y no inducidas. Este fenómeno no puede ser explicado atendiendo únicamente a la posible implicación del hierro en la regulación de las bombas implicadas en el eflujo de tolueno a través de sus potenciales cajas *fur*, sino que implica un mecanismo de regulación que implica al sistema TonB bastante más complejo (Ramos *et al.*, 2002)

Estudios acerca del importe de sideróforos han sugerido que TonB no sólo abre el canal correspondiente del receptor de membrana externa, sino que también ayuda a disociar el complejo sideróforo-receptor para permitir el paso al interior de la célula (Larsen *et al.*, 1999). Así, TonB parece comportarse como una proteína reguladora que influye en la conformación de otra proteína (Larsen *et al.*, 1999). Además, el funcionamiento de este sistema requiere una estequiometría adecuada de las proteínas ExbB, ExbD y TonB (Postle

y Good, 1993; Higgs *et al.*, 2002). Basándonos en estos hechos, se pueden formular varias hipótesis para explicar la participación del sistema TonB en la exclusión de antibióticos. Una de ellas implica que un desbalanceo en la producción de ExbD en la cepa DOT-T1E-PhoA5 puede interferir en la incorporación de componentes de la membrana citoplasmática de las bombas RND en dicha membrana, haciendo a las bombas no funcionales. Otra posibilidad es que dicho desbalanceo en la producción de ExbD pueda ejercer efectos indirectos sobre las funciones de la membrana, lo que comprometería la operatividad de los sistemas de eflujo. Una nueva posibilidad es que los componentes de las bombas de la familia RND se activen a través del sistema TonB, sin embargo, aún no se han elucidado ni el elemento de las bombas de eflujo que podría ser diana para el sistema TonB ni el mecanismo de acción en este proceso. Recientemente se ha elucidado la estructura tridimensional de TolC, que forma parte de la bomba AcrAB-TolC en *E. coli* (Koronakis *et al.*, 2000). Un trímero de proteínas TolC se ensamblan formando un conducto que se expande a través de la membrana externa hacia el espacio periplásmico, por el cual accede el disolvente. El extremo periplásmico o proximal de este tunel está sellado por un conjunto de hélices enrolladas, que podrían desenmarañarse mediante un mecanismo alostérico mediado por interacciones proteína-proteína (Koronakis *et al.*, 2000). El sistema TonB podría estar involucrado, directa o indirectamente, en este tipo de mecanismo alostérico, como también se ha sugerido recientemente por homología estructural del dominio C-terminal de TonB con el dominio III de TolA de *P. aeruginosa*, recientemente cristalizado (Witty *et al.*, 2002); pero la confirmación de este hecho requiere de posteriores investigaciones.

7. PAPEL DEL PHBA COMO AGENTE QUELANTE DE HIERRO.

Para adquirir hierro de su entorno, las bacterias gram-negativas han desarrollado sistemas especializados que emplean sideróforos, moléculas de carácter peptídico con una alta constante de complejación, capaces de secuestrar el hierro presente en el medio o utilizar directamente proteínas que contienen hierro del organismo hospedador. *P. aeruginosa* así como otras posibles especies patógenas en humanos del cluster *P. fluorescens/putida* son bacterias del suelo, que han logrado adaptarse a la supervivencia en

ambientes hostiles, gracias a la adquisición de un número de estrategias, entre ellas la producción de potentes sideróforos específicos que permiten secuestrar hierro incluso bajo las condiciones más restrictivas y deprivan a los competidores de este preciado metal. Los sideróforos presentes en *P. aeruginosa* y en otras especies potencialmente patógenas relacionadas se pueden clasificar en: pioverdinas (también llamadas pseudobactinas en el caso de cepas relacionadas con plantas), piochelina, ácido salicílico, y sideróforos foráneos.

Las pioverdinas son responsables de la clasificación de las "pseudomonas fluorescentes" pues, bajo condiciones de deficiencia de hierro, los cultivos presentan fluorescencia amarillo-verdosa (Abdallah, 1991). La pioverdina se ha convertido en el nombre generico para una serie de compuestos relacionados que tienen en común el cromoforo, un derivado del catecol, responsable del color y la fluorescencia que adquieren los cultivos en condiciones de deficiencia de hierro; pero difieren en la composición de la cadena peptídica unida al grupo carboxilo del cromóforo (Fuschs y Budzikiewicz, 2001; Fuschs *et al.*, 2001). La variabilidad de la cadena peptídica salvaguarda que una pioverdina dada puede ser reconocida y utilizada sólo por la cepa productora. Se conocen excepciones a esta regla, pero las respectivas pioverdinas tienen regiones parcialmente idénticas o similares de la cadena peptídica que son requeridas aparentemente para el reconocimiento (Weber *et al.*, 2000; Barelmann *et al.*, en preparación). Las pioverdinas tienen constantes de complejación entre 10^{24} y 10^{26} l/mol a pH 7,0.

P. aeruginosa y algunas otras *Pseudomonas* spp como *P. cepacia* tienen un segundo sistema de entrada de hierro que utiliza el sideróforo piochelina (Cox *et al.*, 1981), péptido derivado del ácido salicílico y de dos moléculas de cisteína (Cox y Graham, 1979; Cox *et al.*, 1981; Sokol, 1986). La entrada de piochelina tiene lugar via dos proteínas receptoras de membrana externa diferentes (Heinrichs *et al.*, 1991; Sokol y Woods, 1983). Tiene una constante de complejación menor que las pioverdinas (10^{-5} l/mol), pero también puede unir algunos metales divalentes, y puede ser así un vehículo de transporte para metales de transición (Visca *et al.*, 1992b). La ferripiochelina, pero no las ferripioverdinas, parece estar involucrada en la generación de radicales hidroxilo, responsables de daños celulares (Britigan *et al.*, 1992, 1994).

El ácido salicílico como tal, no es sólo un intermedio en la síntesis de piochelina, sino que representa un sideróforo endógeno auténtico en algunas cepas de *P. aeruginosa*

(Visca *et al.*, 1993), *P. fluorescens* (Meyer *et al.*, 1992) y *P. cepacia* (Sokol *et al.*, 1992). Debido a su baja capacidad complejante puede actuar como un sideroforo auxiliar cuando fallan los sistemas mas potentes de captacion de hierro (Visca *et al.*, 1993).

P. aeruginosa asi como otras *Pseudomonas* spp pueden actuar como oportunistas e incluso como predadores, siendo capaces de usar compuestos complejantes de hierro que son producidos por otros organismos, como el citrato (Cox, 1980; Harding y Royt, 1990) y el *myo*-inositol hexakisfosfato (Smith *et al.*, 1994), el sideroforo artificial ácido nitriloacetico (Meyer y Hohnadel, 1992) y la ferrioxamina B (Cornelis *et al.*, 1987) de *Streptomyces* spp. Como se menciona anteriormente, la aceptacion de un numero de pioverdinas de cepas extrañas puede explicarse por similitudes estructurales en las respectivas cadenas peptidicas, en el caso de *P. putida* WCS358 podria identificarse el gen que induce la formacion del receptor de la pioverdina de *P. fluorescens* (Koster *et al.*, 1993). Más aún, *P. aeruginosa* es capaz de usar el siderófor enterobactina producido por *E. coli* (Poole *et al.*, 1990), así como sus precursores biogénicos, el ácido 2,3-dihidroxibenzoico y la 2,3-dihidroxibenzoilserina (Screen *et al.*, 1995) La constante de complejacion de la enterobactina excede en varios ordenes de magnitud a las de las pioverdinas.

Como se mencionó en la sección de *Introducción*, existen además otras moléculas quelantes de hierro distintas de los sideróforos, como son citrato, salicilato, ácido 2,3-dihidroxibenzoico (DHB) y dihidroxibenzoilserina (DBS) (Neilands, 1981a) que poseen sus propios sistemas de transporte de alta afinidad en distintos microorganismos, y que tienen en su estructura ligandos de tipo fenolato y carboxilato, de baja polarizabilidad y alta electronegatividad, convenientemente dispuestos, que les confieren una afinidad preferente por el Fe^{3+} presente en el medio.

En el apartado 7.1 del capítulo 2 de *Resultados*, al analizar el efecto del hierro sobre la tolerancia a PHBA y su uso como fuente de carbono por parte del mutante de *P. putida* PhoA5, se observo una coloración purpura-violeta de las placas de gradiente de PHBA que contenían un suplemento extra de hierro, coloración que sólo aparecia en aquellas placas en las que se había inoculado el mutante PhoA5. Asimismo, en cultivos líquidos de PhoA5 en medio mínimo M9-glucosa con concentraciones crecientes de PHBA con un suplemento

adicional de Fe^{3+} también se observó coloración del sobrenadante desde colores rojo-vino hasta violetas y azul añil muy intensos. Estos colores pueden deberse a la formación de ciertos complejos entre el PHBA o algún derivado y los iones Fe^{3+} presentes en el medio, cuya naturaleza está pendiente de determinar. Debido a la disposición *para* de los dos sustituyentes del anillo aromático del PHBA, parece improbable la capacidad de actuar como quelante del PHBA.

Al analizar la posible actividad quelante de otras moléculas relacionadas con el PHBA como PCA y salicilato, hemos observado la presencia de complejos de color (morado-azul intenso y rojo claro con PCA y salicilato, respectivamente) tanto con iones Fe^{2+} como con iones Fe^{3+} .

Por otra parte, hemos observado que el crecimiento de *P. putida* DOT-T1E está inhibido en presencia del quelante 2,2'-bipiridilo (0,7 mM). Si el PHBA actuase como quelante de hierro en presencia de bipiridilo, siempre y cuando la constante de complejación del PHBA fuese mayor que la del bipiridilo, puesto que el PHBA sería utilizado como fuente de carbono, T1E debería recuperar el crecimiento. Se estudió el crecimiento de T1E en medio deficiente en hierro MB2, con concentraciones de bipiridilo inhibitorias del crecimiento (5mM), utilizando glucosa como fuente de carbono y añadiendo alternativamente PHBA, salicilato y PCA como posibles quelantes (5mM). Alternativamente se repitieron los ensayos en los mismos medios pero sin glucosa. Cuando se utilizan PHBA, salicílico y PCA como fuente de carbono, estos parecen actuar como quelantes de Fe^{3+} en presencia de bipiridilo, puesto que se observó crecimiento. En cambio, cuando se emplea como fuente de carbono mayoritaria la glucosa, los compuestos PCA y salicílico sí actúan quelando Fe^{3+} frente al bipiridilo, pero no así el PHBA, aunque parece haber una concentración crítica, ya que a veces se observa crecimiento y otras no. Esto puede ser debido a un posible efecto de represión catabólica ejercida por la glucosa. Estos resultados podrían aportar algo de luz a la incapacidad del mutante PhoA5, deficiente en la adquisición de hierro debido a la mutación en *exbD*, de utilizar PHBA como fuente de carbono, así como a las distintas coloraciones de cultivos de PhoA5 en presencia del ácido carboxílico aromático.

8. COMPARACIÓN FENOTÍPICA DEL MUTANTE POLAR EN *exbD* PhoA5 Y DE LOS MUTANTES NO POLARES EN LOS GENES *exbB*, *exbD* Y *tonB* DE *P. putida* DOT-T1E.

Debido a la naturaleza de la mutación en PhoA5, no se podía descartar que su fenotipo fuera consecuencia de: 1) una mutación polar sobre *tonB*, 2) una descompensación en la dosis de los tres elementos del sistema TonB, o 3) un efecto indirecto provocado por la fusión traduccional a *'phoA* como se he descrito para otras cepas bacterianas portadoras de este tipo de fusiones (Manoil y Traxler, 1995). Para abordar estudios finos que permitieran adjudicar a cada uno de los componentes del sistema ExbBDTonB su papel en la configuración del mutante PhoA5, se dedició generar mutantes no polares de cada uno de los genes del operón *exbBDtonB* (apdo. 1, capítulo 3).

Del análisis fenotípico de los mutantes PhoA5 y *exbB*, *exbD* y *tonB* de *P. putida* DOT-T1E se observó que compartieron su dependencia de un suplemento de hierro para el establecimiento de colonias bien definidas en medio LB (apdo 2.1, capítulo 3), mostrándose especialmente sensibles a la falta del suplemento los mutantes *exbD* y *tonB*. Este hecho está de acuerdo con el papel desempeñado por del sistema TonB en la entrada de hierro al interior de la célula (Earhart, 1996).

De igual manera todos los mutantes mostraron mayor sensibilidad a tetraciclina, norfloxacina, ciprofloxacina, cefotaxina e imipenen que la cepa silvestre (Tabla R.3.2). Asimismo, un mutante *tonB1* de *P. aeruginosa* deficiente en la incorporación de sideróforos de hierro (Poole *et al.*, 1996c; Tasake *et al.*, 2000) también fue susceptible a una amplia variedad de antibióticos, un fenotipo común a mutantes en el operón *mexAB-oprM*. Este comportamiento no está relacionado con la influencia de una mutación *tonB* sobre el estado de hierro en la célula y, de hecho, la susceptibilidad intrínseca a antibióticos y la expresión de *mexAB-oprM* no se vieron afectadas por los niveles de hierro en el medio de cultivo (Poole *et al.*, 1996; Tasake *et al.*, 2000).

La hipótesis de que el sistema de entrada de hierro TonB está claramente implicado en la tolerancia a PHBA de la cepa *P. putida* DOT-T1E está corroborada por varios hechos experimentales. De manera análoga al mutante PhoA5, los mutantes no polares *exbB*, *exbD* y *tonB* de DOT-T1E resultaron ser hipersensibles a la presencia de PHBA en el medio de

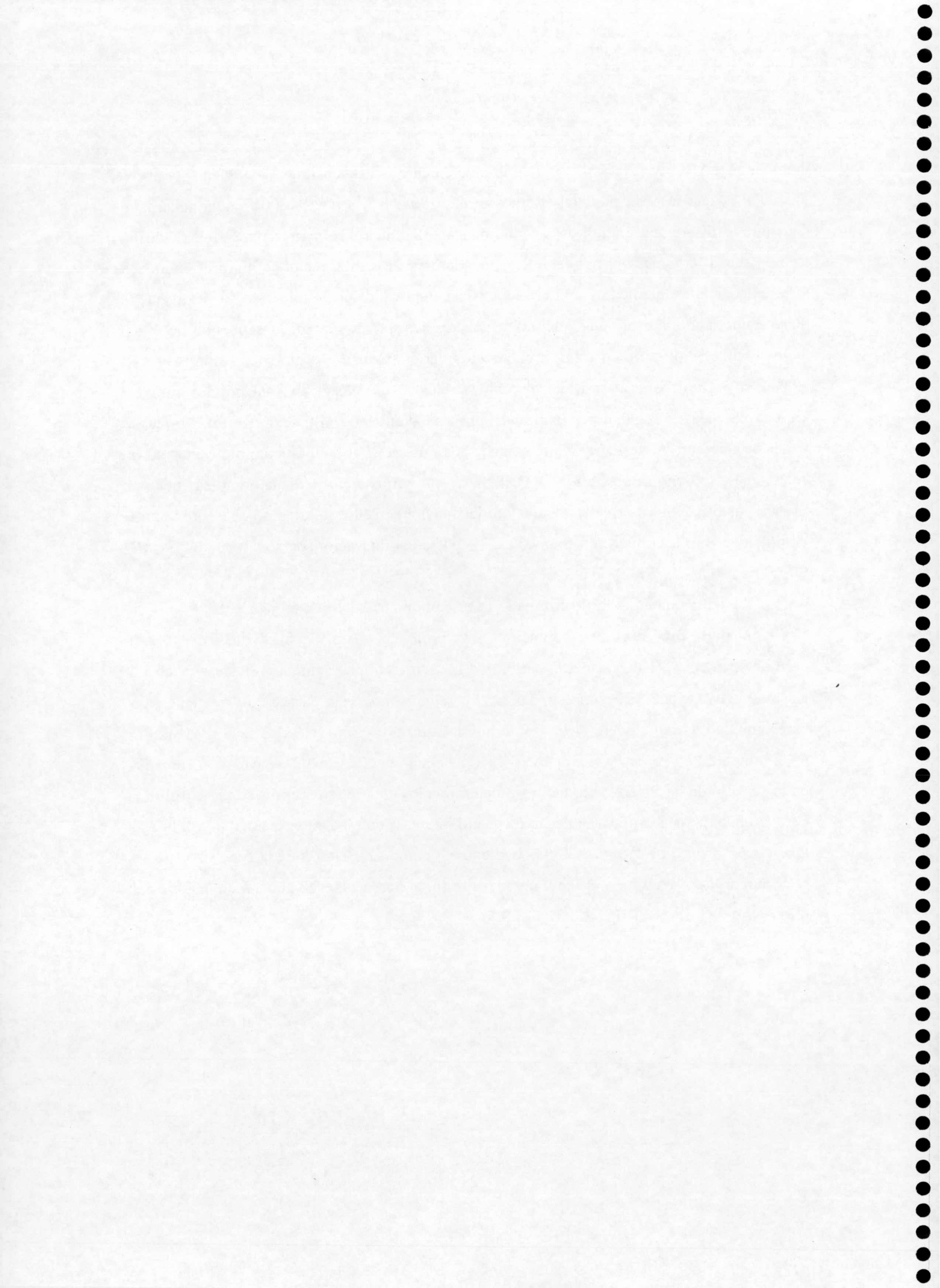
cultivo, ya que sólo crecieron a una concentración de PHBA por debajo de 4 g/l (Tabla R.3.3). Estos mutantes resultaron ser aún más sensibles a PHBA que el mutante por transposición PhoA5, cuya tolerancia a PHBA estuvo por debajo de 6g/l. Por otro lado, ninguno de los mutantes no polares *exbB*, *exbD* y *tonB* fue capaz de utilizar PHBA como única fuente de carbono y energía, al igual que el mutante PhoA5 (apdo. 2.1, capítulo 3). Paralelamente, al intentar complementar en el mutante PhoA5 la capacidad de crecimiento en PHBA como única fuente de carbono y energía, se aisló un cósmido portador de los genes *exbBDtonB* de *P. putida* KT2440 (apdo.8, capítulo 2). Estos resultados reafirman un posible papel del sistema de entrada de hierro TonB en la tolerancia a PHBA de la cepa DOT-T1E; sin embargo, el mecanismo concreto está pendiente de ser elucidado.

De igual forma, se estudió la contribución que tiene cada uno de los genes del operón *exbBDtonB* a la respuesta frente a un choque repentino de tolueno, encontrándose que mientras que el mutante no polar *exbD* mostró un comportamiento similar al encontrado en el mutante PhoA5, esto es, solamente sobrevivió cuando se expuso previamente a tolueno, sin llegar a alcanzar los niveles de la cepa silvestre, los mutantes *exbB* y *tonB* resultaron ser hipersensibles a un choque del aromático aún cuando estuvieron expuestos al mismo en la fase gaseosa (Fig. R.3.7). Con la generación del nuevo mutante *exbD* se confirmó que el fenotipo de PhoA5 respecto a la tolerancia a tolueno fue consecuencia de la mutación por transposición en *exbD* y no del resultado de mutaciones secundarias en otros *loci* en el cromosoma, como podría sugerir la complementación sólo parcial de este fenotipo en los mutantes PhoA5 y *exbD* por un plásmido portador de los genes *exbBDtonB* silvestres (plásmido pPAT7). Más aún, la introducción del plásmido pPAT7 no consiguió complementar ni parcialmente la tolerancia a tolueno de los mutantes *exbB* y *tonB* (Fig. R.3.9).

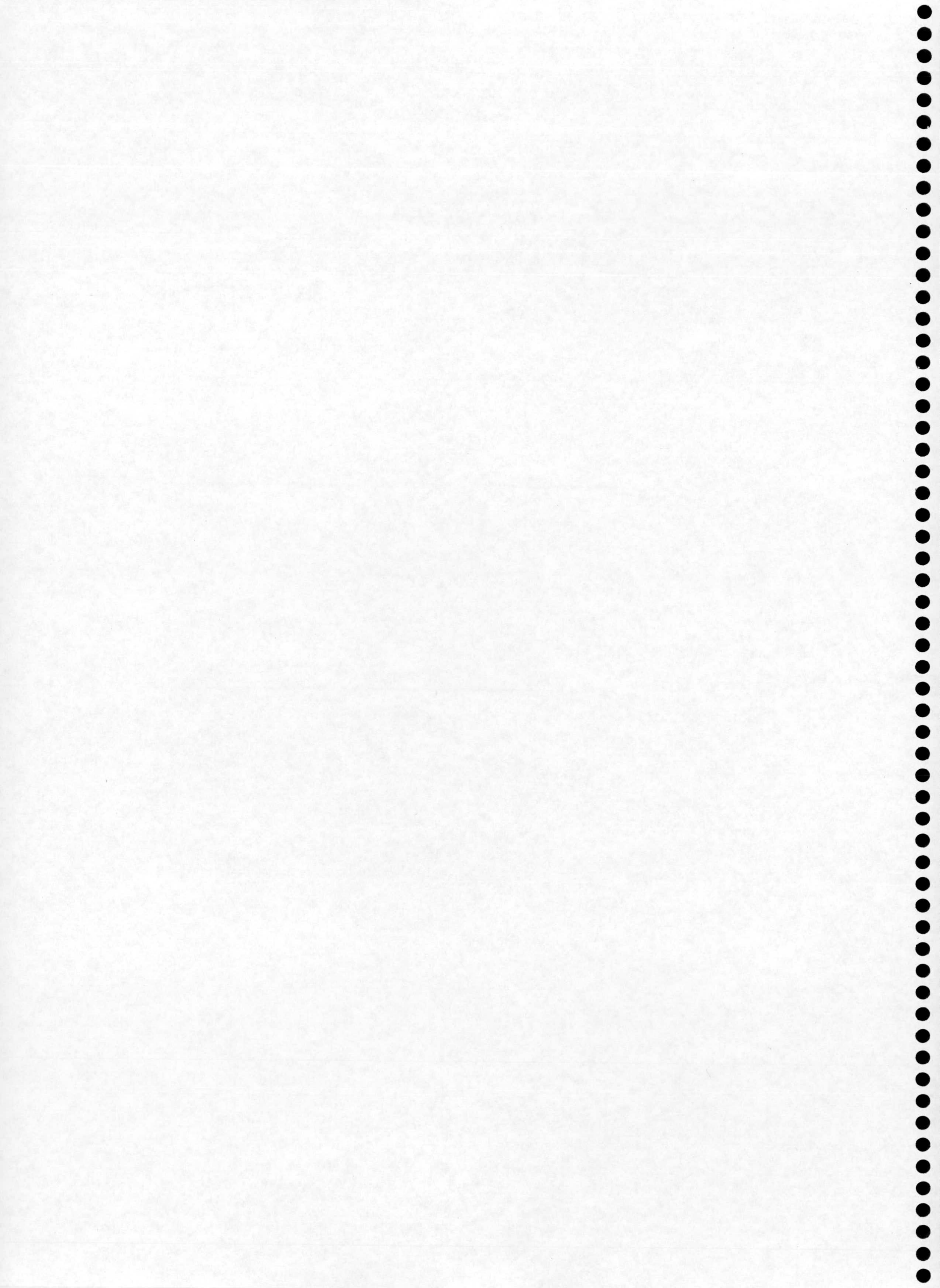
Como se ha descrito anteriormente, la tolerancia a tolueno en *P. putida* DOT-T1E implica el funcionamiento de tres bombas de eflujo pertenecientes al grupo RND, denominadas TtgABC, TtgDEF y TtgGHI (Ramos *et al.*, 1998; Mosqueda y Ramos, 2000; Rojas *et al.*, 2001), cuya caracterización se lleva a cabo en nuestro grupo de investigación. Se han aislado mutantes individuales en cada uno de los componentes de estas bombas y se ha analizado el papel que desempeña cada uno en la tolerancia a tolueno. Mutantes en las

bombas TtgABC y TtgGHI son significativamente más sensibles a tolueno y otros disolventes que la cepa parental (Ramos *et al.*, 1998; Rojas *et al.*, 2001), aunque se han encontrado diferentes grados de sensibilidad a diferentes disolventes dependiendo de la cepa. Estas diferencias normalmente implican la expresión diferencial de múltiples bombas o la existencia de elementos aún sin identificar implicados en la tolerancia a disolventes. Parece que, aunque está claro que existen represores que gobiernan la expresión de estas bombas de eflujo, también están involucrados varios reguladores globales (Ramos *et al.*, 2002), cuyo número y proceso por el cual las señales son sensadas y transmitidas a través de una cascada de reguladores, son cuestiones pendientes de dilucidar. De esta forma, a pesar de que aún no se han complementado los mutantes en las bombas implicadas en la tolerancia a tolueno de *P. putida* DOT-T1E, es muy probable que dicha complementación no sea posible debido a que la regulación del funcionamiento de estas bombas es bastante complejo e implica muchas variantes (A. Segura, comunicación personal; Duque *et al.*, 2001; Ramos *et al.*, 2002)

Recientemente se ha determinado la estequiometría del complejo ExbBD/TonB en *E. coli* que presenta una dotación de proteínas TonB:ExbD:ExbB de 1:2:7, aproximadamente (Higgs *et al.*, 2002). En este sentido, aunque se desconoce la estequiometría exacta del complejo TonB en *Pseudomonas*, ésta parece que ser clave para su estabilidad, como sugiere el hecho de que la sobreexpresión de ExbB respecto a ExbD en el mutante PhoA5 de *P. putida* DOT-T1E generado en este trabajo, provocó un aumento en la sensibilidad a PHBA, a tolueno y a determinados antibióticos (**apdo. 6.2, capítulo 2**). Esto también podría explicar el hecho de que al intentar complementar los mutantes PhoA5, *exbB*, *exbD* y *tonB* de *P. putida* DOT-T1E con el operón *exbBDtonB* de la cepa silvestre no se recuperase por completo el fenotipo silvestre (p. ej. en la supervivencia a un choque del 0,3% (v/v) de tolueno) (**Fig. R.2.32 y R.3.7**).



CONCLUSIONES



CONCLUSIONES

En este apartado se distinguen dos grupos de conclusiones: aquellas referidas a la caracterización fisiológica de la tolerancia de la cepa *Pseudomonas putida* DOT-T1E a PHBA y otros compuestos aromáticos hidroxilados, y las que se refieren a la caracterización del mutante PhoA5 afectado en la proteína ExbD y del estudio del sistema TonB en *P. putida* DOT-T1E, implicado en el transporte de ferrisideróforos.

En cuanto a la caracterización de la tolerancia a PHBA se extraen las siguientes conclusiones:

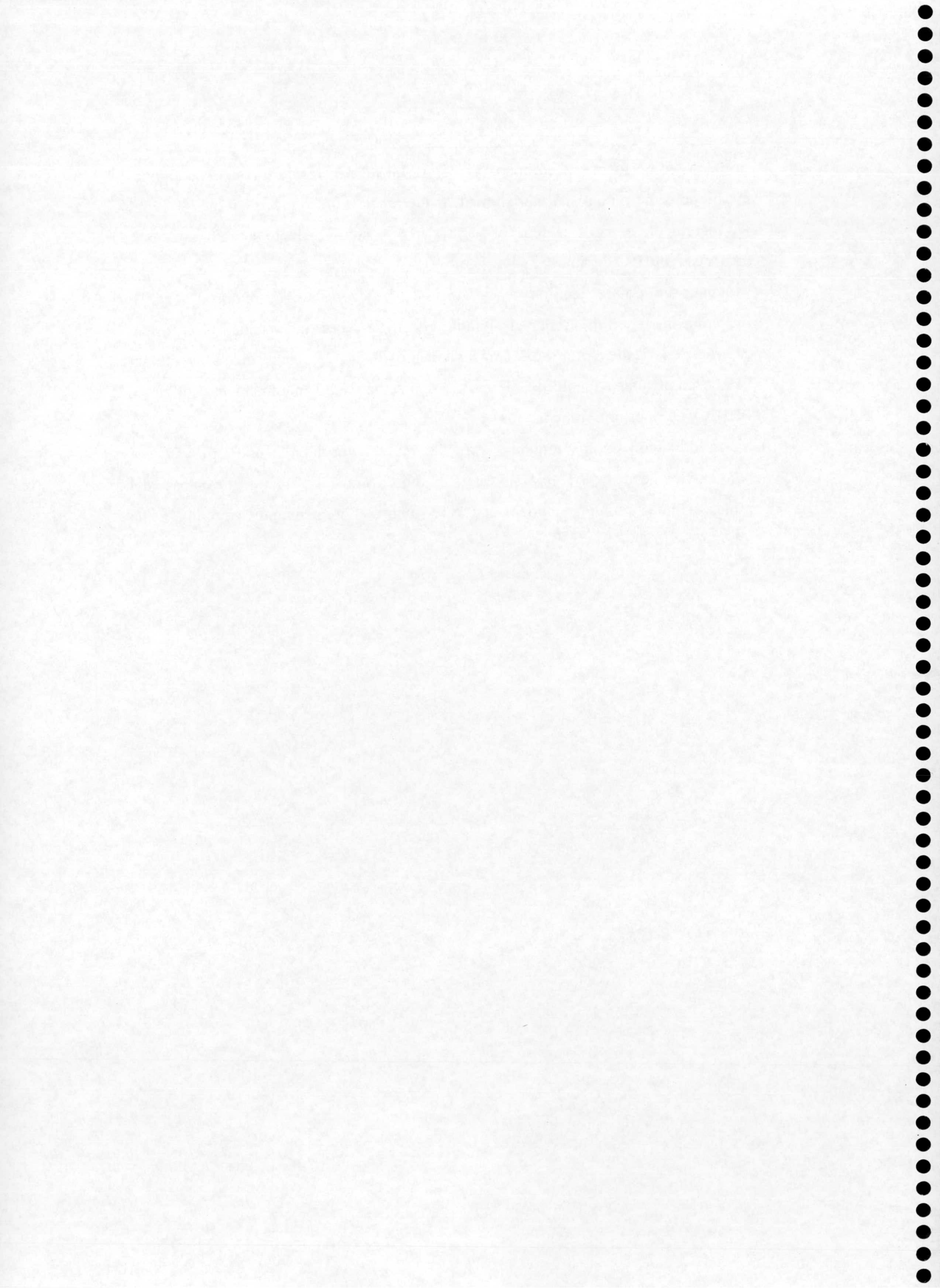
1. *Pseudomonas putida* DOT-T1E tolera concentraciones elevadas de PHBA (18 g/l) y utiliza éste como fuente de carbono y energía.
2. Los iones Mg^{2+} ejercen un papel importante aunque no decisivo en la tolerancia a PHBA y otros compuestos aromáticos hidroxilados en la cepa *P. putida* DOT-T1E, aliviando el efecto inhibitor del crecimiento ejercido por estos compuestos.
3. La cepa *P. putida* DOT-T1E presentó isomerización *cis/trans* como primer mecanismo de respuesta rápida a la presencia en el medio de PHBA y otros compuestos aromáticos hidroxilados. Estudios de acumulación en las membranas de ^{14}C -PHBA sugirieron que la cepa *P. putida* DOT-T1E presenta además un hipotético sistemas de exclusión de PHBA.
4. La preincubación de células de *P. putida* DOT-T1E en presencia de bajas concentraciones de PHBA alivia el efecto inhibitor del crecimiento ejercido por altas concentraciones de este compuesto aromático hidroxilado.
5. La tolerancia de *P. putida* DOT-T1E a altas concentraciones de PHBA es consecuencia de una adaptación fisiológica de las células de DOT-T1E, más que la aparición de mutantes altamente tolerantes.
6. La tolerancia a PHBA en *P. putida* DOT-T1E es una consecuencia del propio sustrato, PHBA, y no de un producto resultante de su metabolismo.

En lo que respecta a la caracterización del mutante PhoA5 y al estudio del sistema ExbBDTonB se extraen las siguientes conclusiones:

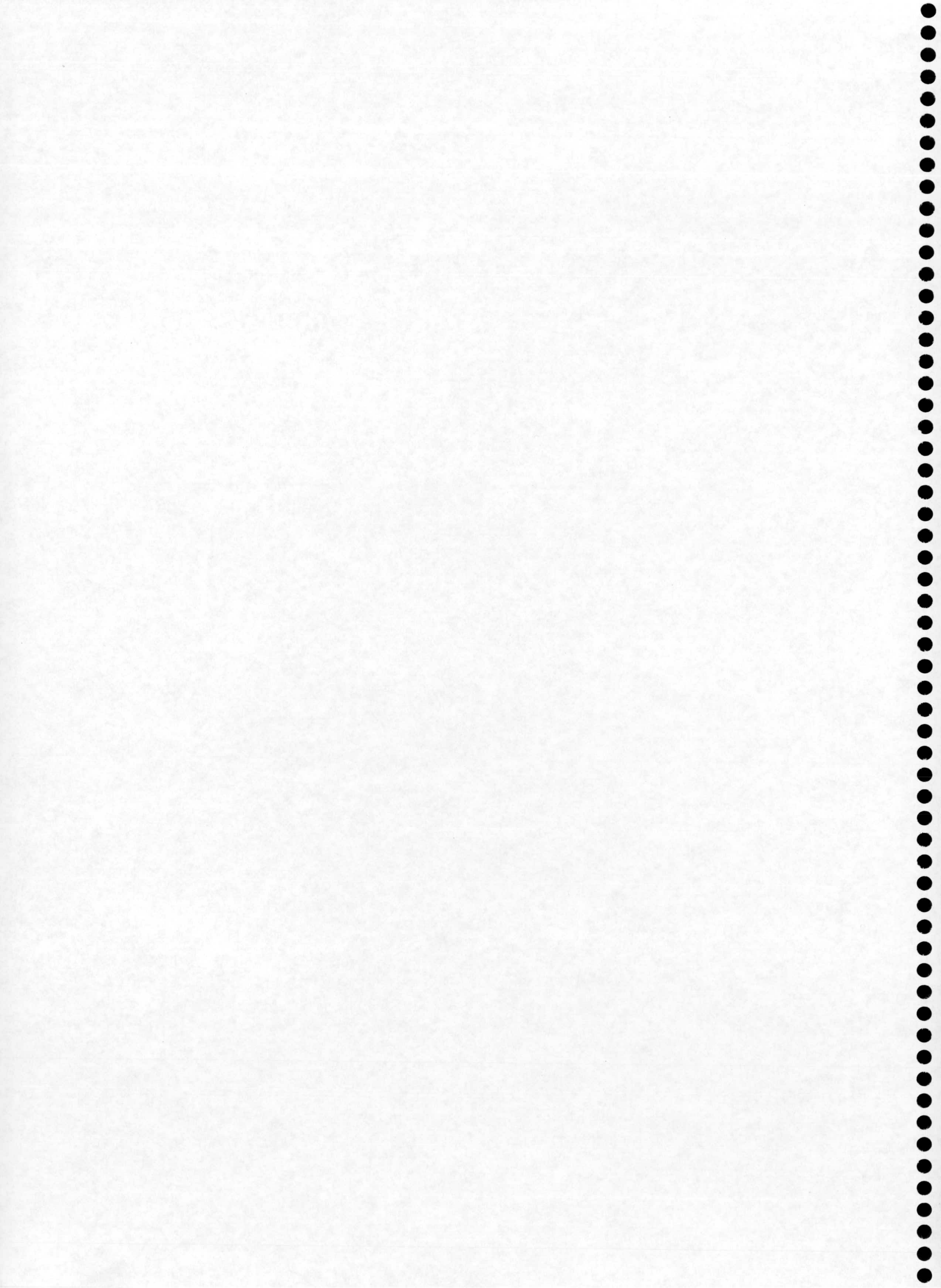
Conclusiones

1. El gen mutado en la cepa *P. putida* DOT-T1E-PhoA5 codifica la proteína ExbD de *Pseudomonas putida*, que pertenece al sistema TonB, implicado en el transporte de ferrisideróforos y vitamina B₁₂ al interior de la célula.
2. El gen *exbD* se localiza dentro de un grupo de genes cuyos productos presentan gran similitud con los del sistema TonB de otras bacterias gram-negativas. El sistema TonB en el cromosoma de *P. putida* DOT-T1E consta de tres genes *exbB*, *exbD* y *tonB*, de los cuales se ha encontrado una sola copia en el cromosoma, que se agrupan en este orden en una única unidad transcripcional.
3. La mutación *exbD*, pese a ser una proteína de membrana, no influye en el mantenimiento de la integridad de la membrana, pues no se observan alteraciones al microscopio electrónico ni se liberan proteínas periplásmica al medio extracelular.
4. La mutación *exbD*, polar sobre *tonB* en el mutante PhoA5, provoca la incapacidad de formar colonias definidas en medio LB sin un suplemento adicional de hierro, así como la incapacidad para utilizar PHBA como única fuente de carbono, y una mayor sensibilidad no sólo a dicho compuesto aromático, sino a distintos antibióticos, alquilparabenos, ácidos carboxílicos aromáticos, aminoácidos aromáticos y tolueno, que la cepa silvestre.
5. La cepa PhoA5 es deficiente en la adquisición de hierro, como se deduce del hecho de que es incapaz de formar colonias definidas en medio LB sin un suplemento adicional de hierro, y de que el crecimiento de este mutante resulta severamente inhibido en presencia del quelante de hierro EDDHA. Dicho crecimiento queda restaurado cuando se añade FeCl₃ a los cultivos.
6. La adición de un suplemento de hierro al medio de cultivo no tiene efecto, ni sobre la susceptibilidad a antibióticos, ni sobre la tolerancia a PHBA en medio sólido; sin embargo, ejerce un alivio sobre la toxicidad debida a un choque de PHBA en medio líquido. Por otra parte, la adición de hierro al medio produce pérdida de la inducción en la tolerancia a un choque de tolueno.
7. La introducción en el mutante PhoA5 del plásmido pPAT7 que contiene los genes *exbBDtonB* silvestres permite: recuperar la capacidad de formar colonias definidas en LB sin suplemento de hierro, restaurar la capacidad para tolerar PHBA y

- utilizarlo como fuente de carbono, e incrementar los niveles de tolerancia a algunos antibióticos; pero no restaura totalmente la tolerancia a un choque de tolueno.
8. Un incremento en la dosis de *ExbB*, *ExbD* y *TonB* no tuvo efecto sobre la tolerancia intrínseca a PHBA de la cepa silvestre.
 9. Mutantes no polares en los genes *exbB*, *exbD* y *tonB* de *P. putida* DOT-T1E muestran un fenotipo similar al mutante *PhoA5*, a saber, incapacidad para formar colonias en medio sólido LB sin suplemento de hierro, incapacidad de utilizar PHBA como única fuente de carbono, y una sensibilidad incrementada a tolueno, PHBA y algunos antibióticos.
 10. La introducción en los mutantes *exbB*, *exbD* y *tonB* del plásmido pPAT7 que contiene los genes *exbBDtonB* silvestres produjo los mismos efectos que en caso del mutante *PhoA5*, donde tampoco se observó una complementación completa de la tolerancia a tolueno.



BIBLIOGRAFÍA



- Abdallah, M.A.** 1991. Pyoverdines and pseudobactins. *En* CRC Handbook of Microbial Iron Chelates, pp. 139-153. G. Winkelmann (ed.). Boca Raton, CRC Press.
- Abdul-Tehrani, H., A.J. Hudson, Y.S. Chang, A.R. Timms, C. Hawkins, J.M. Williams, P.M. Harrison, J.R. Guest y S.C. Andrews.** 1999. Ferritin mutants of *Escherichia coli* are iron deficient and growth impaired, and *fur* mutants are iron deficient. *J. Bacteriol.* **181**:1415-1428.
- Abril, M.A., C. Michán, K.N. Timmis y J.L. Ramos.** 1989. Regulator and enzyme specificities of the TOL plasmid-encoded upper pathway for degradation of aromatic hydrocarbons and expansion of the substrate range of the pathway, *J. Bacteriol.* **171**:6782-6790.
- Ahmer, B.M.M., M.G. Thomas, R.A. Larsen, and K. Postle.** 1995. Characterization of the *exbBD* operon of *Escherichia coli* and the role of ExbB and ExbD in TonB function and stability. *J. Bacteriol.* **177**:4742-4747.
- Alaminos, M.** 2000. Mecanismo de transporte y biodegradación de *p*-hidroxibenzoato y síntesis de metionina en *Pseudomonas putida* DOT-T1E. Tesis Doctoral, Universidad de Granada.
- Alm, R.A. et al.** 1999. Genomic-sequence comparison of two unrelated isolates of the human gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature* **397**:176-180.
- Althaus, E.W., C.E. Outten, K.E. Olson, H. Cao y T.V. O'Halloran.** 1999. The ferric uptake regulation (Fur) repressor is a zinc metalloprotein. *Biochemistry* **38**:6559-6569.
- Altschul, S.F., T.L. Madden, A.A. Schäffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller y D.J. Lipman.** 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* **25**:3389-3402.
- Ames, G.F.L.** 1986. Bacterial periplasmic transport systems: structure, mechanism, and evolution. *Annu. Rev. Biochem.* **55**:397-425.
- Amsterdam, D.** 1991. Susceptibility testing of antimicrobials in liquid media, p. 72-78. *En* V. Lorian (ed.), Antibiotics in laboratory medicine. The Williams & Wilkins Co., Baltimore, Md.
- Anderson, T.F.** 1951. Techniques for the preservation of three-dimensional structure in preparing specimens for the electron microscope. *Trans. N.Y. Acad. Sci.* **13**:130.
- Aono, R., K. Aibe, A. Inoue y K. Horikoshi.** 1991. Preparation of organic solvent-tolerant mutants from *Escherichia coli* K12. *Agric. Biol. Chem.* **55**:1985-1938.
- Aono, R., M. Kobayashi, H. Nakajima y H. Kobayashi.** 1995. A close correlation between improvement of organic solvent tolerance levels and alteration of resistance toward low levels of multiple antibiotics in *Escherichia coli*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **59**:213-218.
- Aono, R., N. Tsukagoshi y M. Yamamoto.** 1998. Involvement of outer membrane protein TolC, a possible member of the *mar-sox* regulon, in maintenance and improvement of organic solvent tolerance in *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* **180**:938-944.
- Armstrong, S.K., G.S. Pettis, L.J. Forrester y M.A. McIntosh.** 1989. The *Escherichia coli* enterobactin biosynthesis gene, *entD*: nucleotide sequence and membrane localization of its protein product. *Mol. Microbiol.* **3**:757-766.
- Ausubel, F.M., R.E. Brent, D.D. Kingston, J.G. Moore, J.A. Seidman, A. Smith y K. Struhl (eds).** 1999. Current protocols in molecular biology. John Wiley and sons, New York.
- Bachmann, B.J.** 1990. Linkage map of *Escherichia coli* K-12, edition 8. *Microbiol. Rev.* **54**:130-197.
- Baehr, W., E.C. Gotschlich y P.J. Hitchcock.** 1989. The virulence associated gonococcal H.8 gene encodes 14 tandemly repeated pentapeptides. *Mol. Microbiol.* **3**:49-55.

- Baggs, A. y J.B. Neilands.** 1987. Ferric uptake regulation protein acts as a repressor, employing iron (II) as a cofactor to bind the operator of an iron transport operon in *Escherichia coli*. *Biochemistry* **26**:5471-5477.
- Baichoo, N. y J.D. Helmann.** 2002. Recognition of DNA by Fur: a reinterpretation of the Fur box consensus sequence. *J. Bacteriol.* **184**:5826-5832.
- Bannon, C.D., G.J. Breen, J.D. Craske, N.T. Hai, N.L. Harper y K.L. O'Rourke.** 1982. Analysis of fatty acid methyl esters with high accuracy and reability, III literature review of an investigations into the development of a rapid procedure for methoxide catalysed methanolysis of fats and oils. *J. Chromatograph.* **247**:71.
- Bayer, M.E. y J.L. Sloyer.** 1990. The electrophoretic mobility of gram-negative and gram-positive bacteria: an electrokinetic analysis. *J. Gen. Microbiol.* **136**:867-874.
- Bell, P.E., C.D. Nau, J.T. Brown, J. Konisky y R.J. Kadner.** 1990. Genetic suppression demonstrates direct interaction of TonB protein with outer membrane transport proteins in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **172**:3826-3829.
- Ben-Bassat, A., M. Cattermole, A.A. Gatenby, K.J. Gibson, M.I. Ramos-González, J.L. Ramos y S. Sariaslani.** 2001. Method for the production of *p*-hydroxybenzoate in species of *Pseudomonas* and *Agrobacterium*. PCT application WO 01/92539.
- Bentley, R.** 1990. The shikimate pathway- a metabolic tree with many branches. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **25**:307-384.
- Bernadac, A., M. Gavioli, J.C. Lazzaroni, S. Raina y R. Lloubès.** 1998. *Escherichia coli tol-pal* mutants form outer membrane vesicles. *J. Bacteriol.* **180**:4872-4878.
- Beveridge, T.J.** 1981. Ultrastructure, chemistry, and function of the bacterial wall. *Int. Rev. Cytol.* **72**:229-317.
- Bitter, W., J. Tommassen y P.J. Weisbeek.** 1993. Identification and characterization of the *exbB*, *exbD* and *tonB* genes of *Pseudomonas putida* WCS358: their involvement in ferric-pseudobactin transport. *Mol. Microbiol.* **7**:117-130.
- Blatny, J.M., T. Brautaset, H.C. Winther-Larsen, K. Haugan y S. Valla.** 1997. Construction and use of a versatile sets of broad-host-range cloning and expression vectors based on the RK2 replicon. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**:370-379.
- Bligh, E.G. y W.J. Dyer.** 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* **37**:911-917.
- Bloom, M., E. Evans y Q.G. Mouritsen.** 1991. Physical properties of the fluid lipid-bilayer component of cell membranes: a perspective. *Q. Rev. Biophys.* **24**:293-397.
- Bolivar, F.** 1978. Construction and characterization of new cloning vehicles, III. Derivatives of plasmid pBR322 carrying unique *EcoRI* sites for selection of *EcoRI* generated recombinant DNA molecules. *Gene* **4**:121-136.
- Bosch, M., E. Garrido, M. Llagostera, A.M. Pérez de Rozas, I. Badiola y J. Barbé.** 2002. *Pasteurella multocida exbB*, *exbD* and *tonB* genes are physically linked but independently transcribed. *FEMS Microbiol. Lett.* **210**:201-208.
- Bose, N., S.M. Payne y R.K. Taylor.** 2002. Type 4 pilus biogenesis and type II-mediated protein secretion by *Vibrio cholerae* occur independently of the TonB-facilitated proton motive force. *J. Bacteriol.* **184**:2305-2309.

- Bouveret, E., H. Bénédetti, A. Rigal, E. Loret, y C. Lazdunski.** 1999. In vitro characterization of peptidoglycan-associated lipoprotein (PAL)-TonB interactions. *J. Bacteriol.* **181**:6306-6311.
- Boyd, J., M.N. Oza y J.R. Murphy.** 1990. Molecular cloning and DNA sequence analysis of a diphtheria toxin iron-dependent regulatory element (*dtxR*) from *Corynebacterium diphtheriae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**:5968-5972.
- Boyer, H.W. y D. Roulland-Dussoix.** 1969. A complementation analysis of the restriction and modification of DNA in *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* **41**:459-472.
- Bradbeer, C.** 1993. The proton motive force drives the outer membrane transport of cobalamin in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **175**:3146-3150.
- Bradford, M.M.** 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.* **72**:248-254.
- Braun, V.** 1989. The structurally related *exbB* and *tolQ* genes are interchangeable in conferring TonB-dependent colicin, bacteriophage, and albomycin sensitivity. *J. Bacteriol.* **171**:6387-6390.
- Braun, V.** 1995. Energy-coupled transport and signal transduction through the Gram-negative outer membrane via TonB-ExbB-ExbD-dependent receptor proteins. *FEMS Microbiol. Rev.* **16**:295-307.
- Braun, V. y C. Herrmann.** 1993. Evolutionary relationship of uptake systems for biopolymers in *Escherichia coli*: cross-complementation between the TonB-ExbB-ExbD and the TolA-TolQ-TolR proteins. *Mol. Microbiol.* **8**:261-268.
- Braun, V. y H. Killmann.** 1999. Bacterial solutions to the iron-supply problem. *Trends Biochem. Sci.* **24**:104-109.
- Braun, V. y H.C. Wu.** 1994. Lipoproteins, structure, function, biosynthesis and model for protein export, p. 319-341. En J.M. Ghuysen and R. Hakenbeck (ed.), *Bacterial cell wall*. Elsevier, Amsterdam.
- Braun, V., C. Brazel-Faisst y R. Schneider.** 1984. Growth stimulation of *Escherichia coli* in serum by iron (III) aerobactin. Recycling of aerobactin. *FEMS Microbiol. Lett.* **21**:99-103.
- Braun, V., K. Hantke y W. Köster.** 1998a. *En Metal ions in biological systems. Iron transport and storage in microorganisms, plants and animals* (vol 35), p.67-145. Sigel, A. y D. Sigel (ed.), Marcel Dekker.
- Braun, V., K. Hantke y W. Köster.** 1998b. Bacterial iron transport: mechanisms, genetics, and regulation. *Metal. Ions Biol. Syst.* **35**:65-145.
- Braun, V., S. Gaisser, C. Herrmann, K. Kampfenkel, H. Killmann e I. Traub.** 1996. Energy-coupled transport across the outer membrane of *Escherichia coli*: ExbB binds ExbD and TonB in vitro, and leucine 132 in the periplasmic region and aspartate 25 in the transmembrane region are important for ExbD activity. *J. Bacteriol.* **178**:2836-2845.
- Breslauer, K.J., R. Frank, H. Blocker y L.A. Marky.** 1986. Predicting DNA duplex stability from the base sequence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**:3746-3750.
- Brewer, S., M. Tolley, I.P. Trayer, G.C. Barr, C.J. Dorman, K. Hannavy, C.F. Higgins, J.S. Evans, B.A. Levine y M.R. Wormald.** 1990. Structure and function of X-pro dipeptide repeats in the TonB proteins of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* **216**:883-895.
- Brickman, T.J. y M.A. McIntosh.** 1992. Overexpression and purification of ferric enterobactin esterase from *Escherichia coli*: demonstration of enzymatic hydrolysis of enterobactin and its iron complex. *J. Biol. Chem.* **267**:12350-12355.
- Britigan, B.E., G.T. Rasmussen y C.D. Cox.** 1994. *Pseudomonas* siderophore pyochelin enhances

neutrophil-mediated endothelial cell injury. *Am. J. Physiol.* **266**:L192-L198

Britigan, B.E., T.L. Roeder, G.T. Rasmussen, D.M. Shasby, M.L. McCormick y C.D. Cox. 1992. Interaction of the *Pseudomonas aeruginosa* secretory products pyocyanin and pyochelin generates hydroxyl radical and causes synergistic damage to endothelial cells. *J. Clin. Invest.* **90**:2187-2196.

Brunel, F. y J. Davison. 1988. Cloning and sequencing of *Pseudomonas* genes encoding vanillate demethylase. *J. Bacteriol.* **170**:4924-4930.

Bullen, J.J. y E. Griffiths. 1999. Iron binding proteins and host defense, p.327-368. *En* J.J. Bullen y E. Griffiths (ed.), *Iron and infection*, 2^a ed. John Wiley and Sons Ltd., New York.

Cadieux, N., C. Bradbeer y R.J. Kadner. 2000. Sequence changes in the Ton box region of BtuB affect its transport activities and interaction with TonB protein. *J. Bacteriol.* **182**:5954-5961.

Calderwood, S.B. y J.J. Mekalanos. 1987. Iron regulation of Shiga-like toxin expression in *Escherichia coli* is mediated by the *fur* locus. *J. Bacteriol.* **169**:4759-4764.

Cartwright, C.P., J.R. Juroszek, M.J. Beavan, F.M.S. Ruby, S.F.M. de Morais y A.H. Rose. 1986. Ethanol dissipates the proton-motive force across the plasma membrane of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Gen. Microbiol.* **132**:369-377.

Cartwright, N.J. y A.R.W. Smith. 1967. Bacterial attack on phenolic ethers. An enzyme system demethylating vanillic acid. *Biochem. J.* **102**:826-841.

Cartwright, N.J. y J.A. Buswell. 1967. The separation of vanillate O-demethylase from protocatechuate 3,4-oxygenase by ultra centrifugation. *Biochem. J.* **105**:767-770.

Cascales, E., M. Gavioli, J.N. Sturgis y R. Lloubes. 2000. Proton motive force drives the interaction of the inner membrane TolA and outer membrane Pal proteins in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **38**:904-915.

Cascales, E., R. Lloubés y J.N. Sturgis. 2001. The TolQ-TolR proteins energize TolA and share homologies with the flagellar motor proteins MotA-MotB. *Mol. Microbiol.* **42**:795-807.

Chang, C., A. Mooser, A. Plückthun y A. Wlodawer. 2001. Crystal structure of the dimeric C-terminal domain of TonB reveals a novel fold. *J. Biol. Chem.* **276**:27535-27540.

Chen, C.L., H.M. Chang y T. Kirk. 1982. Aromatic acids produced during degradation of lignin in spruce wood by *Phanerochaete chrysosporium*. *Holzforschung* **36**:3-9.

Chen, Q., A. Nijenhuis, H. Preusting, J. Dolfing, D.B. Janssen y B. Witholt. 1995. Effects of octane on the fatty acid composition and transition temperature of *Pseudomonas oleovorans* membrane lipids during growth in two-liquid-phase continuous culture. *Enzyme Microb. Technol.* **17**:647-652.

Clark, G.S. 1990. Vanillin. *Perfum. Flavor.* **15**:45-54.

Compan, I. y D. Touati. 1993. Interaction of six transcriptional regulators in expression of manganese superoxide dismutase in *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* **175**:1687-1696.

Cope, L.D., S.E. Thomas, Z. Hrkal y E.J. Hansen. 1998. Binding of heme-hemopexin complexes by soluble HxuA protein allows utilization of this complexed heme by *Haemophilus influenzae*. *Infect. Immun.* **66**:4511-4516.

Cornelis, P., N. Moguilevsky, J.F. Jacques y P.L. Masson. 1987. Studies of siderophores and receptors in different clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antibiot. Chemother.* **39**:290-306.

Cox, C.D. y R. Graham. 1979. Isolation of an iron binding compound from *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **137**:357-364.

- Cox, C.D., K.L. Rinehart, M.L. Moore y C.J. Cook.** 1981. Pyochelin: novel structure of an iron-chelating growth promoter for *Pseudomonas aeruginosa*. Proc. Nat. Acad. Sci. USA **78**:4256-4260.
- Cox, D.C.** 1980. Iron uptake with ferripyochelin and ferric citrate by *Pseudomonas aeruginosa*. J. Bacteriol. **142**:581-587.
- Coy, M. y J.B. Neilands.** 1991. Structural dynamics and functional domains of the Fur protein. Biochemistry **30**:8201-8210.
- Cronan, J.E. Jr y C.O. Rock.** 1996. Biosynthesis of membrane lipids. En: *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: cellular and molecular biology (Neidhard, F.C., J.L. Ingraham, K.W. Low, B. Magasanik, M. Schaechter, H.E. Umbarger, eds.) pp. 447-497. ASM, Washinton DC
- Cronan, J.E. Jr.** 1968. Phospholipid alterations during growth of *Escherichia coli*. J. Bacteriol. **95**:2054-2061.
- Cronan, J.E. Jr.** 1978. Molecular biology of bacterial membrane lipids. Annu. Rev. Biochem. **47**:163-189.
- Cronan, J.E. Jr. y E.P. Gelmann.** 1975. Physical properties of membrane lipids: biological relevance and regulation. Bacteriol. Rev. **39**:232-256.
- Cronan, J.E. Jr., C.H. Birge y P.R. Vagelos.** 1969. Evidence for two genes specifically involved in unsaturated fatty acid biosynthesis in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. **100**:601-604.
- Cronan, J.E. Jr., L.J. Weisberg y R.G. Allen.** 1975. Regulation of membrane lipid synthesis in *Escherichia coli*: accumulation of free fatty acids of abnormal length during inhibition of phospholipid synthesis. J. Biol. Chem. **250**:5835-5840.
- Cronan, J.E. Jr., R.B. Gennis y S.R. Maloy.** 1987a. Cytoplasmic membrane, p. 31-55. En: *En* F.C. Neidhardt, R. Curtis, J.L. Ingraham, E.C.C. Lin, B. Low, B. Magasanik, W.S. Reznikoff, M. Riley, M. Schaechter y H.E. Umbarger (ed.), *Escherichia coli* and *Salmonella*: cellular and molecular biology. ASM Press, Washington, D.C. (VER)
- Crosa, J.H.** 1989. Genetics and molecular biology of siderophore mediated iron transport in bacteria. Microbiol. Rev. **53**:517-530.
- Crosa, J.H.** 1997. Signal transduction and transcriptional and posttranscriptional control of iron-regulated genes in bacteria. Microbiol. Mol. Biol. Rev. **61**:319-336.
- Crosa, J.H. y C.T. Walsh.** 2002. Genetics and assembly line enzymology of siderophore biosynthesis in bacteria. Microbiol. Mol. Biol. Rev. **66**:223-240.
- Cruden, D.L., J.H. Wolfram, R.D. Rogers y D.T. Gibson.** 1992. Physiological properties of a *Pseudomonas* strain which grows with *p*-xylene in a two-phase (organic-aqueous) medium. Appl. Environ. Microbiol. **58**:2723-2729.
- de Kruijff, B.P., P.W.M. van Dijck, R.A. Demel, A. Schuijff, F. Brants y L.L.M. van Deenen.** 1974. Non-random distribution of cholesterol in phosphatidyl choline bilayers. Biochim. Biophys. Acta **356**:1-7.
- de Lorenzo, V. y K.N. Timmis.** 1994. Analysis and construction of stable phenotypes in Gram-negative bacteria with Tn5- and Tn10-derived minitransposons. Methods Enzymol. **235**:386-405.
- de Lorenzo, V., L. Eltis, B. Kessler y K.N. Timmis.** 1993. Analysis of *Pseudomonas* gene products using *lacI*^q/*P*_{trp-lac} plasmids and transposons that confer conditional phenotypes. Gene **123**:17-24.
- de Lorenzo, V., M. Herrero, U. Jakubzik y K.N. Timmis.** 1990. Mini-Tn5 transposon derivatives for

insertion mutagenesis, promoter probing, and chromosomal insertion of cloned DNA in Gram-negative eubacteria. *J. Bacteriol.* **172**:6568-6572.

de Lorenzo, V., S. Wee, M. Herrero y J.B. Neilands. 1987. Operator sequences of the aerobactin operon of plasmid ColV-K30 binding the ferric uptake regulation (fur) repressor. *J. Bacteriol.* **169**:2624-2630.

de Mendoza, D., A.K. Ulrich y J.E. Cronan Jr. 1983. Thermal regulation of membrane fluidity in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **258**:2098-2101.

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

Delany, I., G. Spohn, R. Rappuoli y V. Scarlato. 2001. The Fur repressor controls transcription of iron-activated and -repressed genes in *Helicobacter pylori*. *Mol. Microbiol.* **42**:1297-1309.

Dence, C.W. 1971. Halogenation and nitration, p.373-432. *En* K.V. Sarkanen y C.H. Ludwig (ed.), *Lignins: occurrence, formation, structure and reactions*. John Wiley and Sons, Inc., New York.

Dennis, J.J., E.R. Lafontaine y P.A. Sokol. 1996. Identification and characterization of the *tolQRA* genes of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **178**:7059-7068.

Deroiche, R., R. Llòubes, S. Sasso, H. Bouteille, R. Oughideni, C. Lazdunski y E. Loret. 1999. Circular dichroism and molecular modeling of the *E. coli* TolA periplasmic domains. *Biospectroscopy* **5**:1-9.

Dérouiche, R., H. Bénédicti, J.C. Lazzaroni, C. Lazdunski y R. Lloubes. 1995. Protein complex within *Escherichia coli* inner membrane TolA N-terminal domain interacts with TolQ and TolR proteins. *J. Biol. Chem.* **270**:11078-11084.

Desai, P.J., E. Garges y G. Genco. 2000. Pathogenic neisseriae can use hemoglobin, transferrin, and lactoferrin independently of the *tonB* locus. *J. Bacteriol.* **182**:5586-5591.

di Marco, A.A. y L.N. Ornston. 1994. Regulation of *p*-hydroxybenzoate hydroxylase synthesis by *pobR* bound to an operator in *Acinetobacter calcoaceticus*. *J. Bacteriol.* **176**:4277-4284.

Diefenbach, R., H.J. Heipieper y H. Keweloh. 1992. The conversion of *cis* into *trans* unsaturated fatty acids in *Pseudomonas putida* P8: evidence for a role in the regulation of membrane fluidity. *Appl. Environ. Microbiol.* **38**:382-387.

Dillis, S.S., A. Apperson, M.R. Schmidt y M.H. Saier. 1980. Carbohydrate transport in bacteria. *Microbiol. Rev.* **44**:385-418.

Duetz, W.A., C. de Jong, P.A. Williams y J.G. van Andel. 1994. Competition in chemostat culture between *Pseudomonas* strains that use different pathways for the degradation of toluene. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**:2858-2863.

Duque, E., A. Segura, G. Mosqueda y J.L. Ramos. 2000. Global and cognate regulators control expression of the organic solvent efflux pumps TtgABC and TtgDEF of *Pseudomonas putida*. *Mol. Microbiol.* **39**:1100-1106.

Earhart, C.F. 1996. Uptake and metabolism of iron and molybdenum. *En: Escherichia coli and Salmonella cellular and molecular biology*, vol. 1. Neidhart, F.C., Curtiss, R., Ingraham, J.L., Lin, E.C.C., Low, K.B., Magasanik, B., et al. (eds). Washington, D.C.: American Society for Microbiol. Press. Capítulo 71, p.1075-1090.

Eda, S., H. Maseda y T. Nakae. 2003. An elegant means of self-protection in gram-negative bacteria by recognizing and extruding xenobiotics from the periplasmic space. *J. Biol. Chem.* **4**:2085-2088.

- Eick-Helmerich, K. y V. Braun. 1989. Import of biopolymers into *Escherichia coli*: nucleotide sequences of the *exbB* and *exbD* genes are homologous to those of the *tolQ* and *tolR* genes, respectively. *J. Bacteriol.* **171**:5117-5126.
- Eliasz, A.W., D. Chapman y D.F. Ewing. 1976. Phospholipid phase transitions: effects of n-alcohols, n-monocarboxylic acids, phenylalkyl alcohols and quaternary ammonium compounds. *Biochim. Biophys. Acta* **448**:220-230.
- Elkins, C., P.A. Totten, B. Olsen y C.E. Thomas. 1998. Role of the *Haemophilus ducreyi* Ton system in internalization of heme from hemoglobin. *Infect. Immun.* **66**:151-160.
- Elsemore, D.A. 1995. Organization and characterization of genes for quinate degradation in *Acinetobacter calcoaceticus*. Tesis Doctoral, Universidad de Yale.
- Enderle, P.J. y M.A. Farwell. 1998. Electroporation of freshly plated *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* cells. *Biotechniques* **25**:954-956.
- Engleman, D.M. 1970. X-ray diffraction studies of phase transitions in the membrane of *Mycoplasma laidlawii*. *J. Mol. Biol.* **47**:115-117.
- Ensley, B.D., B.J. Ratzkin, T.D. Osslund, M.J. Simmon, L.P. Wackett y D.T. Gibson. 1983. Expression of naphthalene oxidation genes in *Escherichia coli* results in the biosynthesis of indigo. *Science* **222**:167-169.
- Escolar, L., J. Pérez-Martín y V. de Lorenzo. 1999. Opening the iron box: transcriptional metalloregulation by the Fur protein. *J. Bacteriol.* **181**:6223-6229.
- Euverlink, G.J.W., G.I. Hessels, J.W. Vrijbloed, J.R. Coggins y L. Dijkhuizen. 1992. Purification and characterization of a dual function 3-dehydroquinate dehydratase from *Amycolatopsis methanolica*. *J. Gen. Microbiol.* **138**:2449-2457.
- Evans, J.S., B.A. Levine, I.P. Trayer, C.J. Dorman y C.F. Higgins. 1986. Sequence-imposed structural constraints in the TonB protein of *E. coli*. *FEBS Lett.* **208**:211-216.
- Fewson, C.A. 1991. Metabolism of aromatic compounds by *Acinetobacter*, p.351-390. *En* K.J. Towner, E. Bergogne-Bezerin y C.A. Fewson (ed.), *The biology of Acinetobacter*. Plenum Press, New York.
- Fischer, E., K. Günter y V. Braun. 1989. Involvement of ExbB and TonB in transport across the outer membrane of *Escherichia coli*: Phenotypic complementation of *exb* mutants by overexpressed *tonB* and physical stabilization of TonB by ExbB. *J. Bacteriol.* **171**:5127-5134.
- Fischer, E., B. Strehlow, D. Hartz y V. Braun. 1990. Soluble and membrane-bound ferrisiderophore reductases of *Escherichia coli* K-12. *Arch. Microbiol.* **153**:329-336.
- Fognini-Lefebvre, N., J.C. Lazzaroni y R.C. Portalier. 1987. *tolA*, *tolB*, and *excC*, three cistrons involved in the control of pleiotropic release of periplasmic proteins by *Escherichia coli* K12. *Mol. Gen. Genet.* **209**:391-395.
- Fralick, 1996. Evidence that TolC is required for functioning of the Mar/AcrAB efflux pump of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **178**:5803-5805.
- Franklin, F.C.H., M. Bagdasarian, M.M. Bagdasarian y K.N. Timmis. 1981. Molecular and functional analysis of the TOL plasmid pWW0 from *Pseudomonas putida* and cloning of genes for the entire regulated aromatic ring meta-cleavage pathway. *Proc. Natl. Sci. USA* **78**: 7459-7462.
- Freedman, R.B. 1981. Membrane-bound enzyme, p.161-214. *En* R.H. Michell (ed.), *Membrane structure*. Elsevier, New York.
- Friedman, A.M., S.R. Long, S.E. Brow, W.J. Buikema y F.M. Ausubel. 1982. Construction of a

broad-host-range cosmid cloning vector and its use in the genetic analysis of *Rhizobium* mutants. *Gene* **18**:289-296.

Fuchs, R. y H. Budzikiewicz. 2001. Structural studies of pyoverdines by mass spectroscopy. *Curr. Org. Chem.* (pendiente de publicación)

Fuchs, R., M. Schäfer, V. Geoffroy y J.M. Meyer. 2001. Siderotyping- a powerful tool for characterization of pyoverdines. *Curr. Top. Med. Chem.* (pendiente de publicación)

Fukimori, F., H. Hirayama, H. Takami, A. Inoue y K. Horikoshi. 1998. Isolation and transposon mutagenesis of a *Pseudomonas putida* KT2442 toluene-resistant variant: involvement of an efflux system in solvent resistance. *Extremophiles* **2**:395-400.

Fung, J., T.J. MacAlister y L.I. Rothfield. 1978. Role of murein lipoprotein in morphogenesis of the bacterial division septum: phenotype similarity of *lkyD* and *lpo* mutants. *J. Bacteriol.* **133**:1467-1471.

Garwin, J.L., A.L. Klages y J.E. Cronan Jr. 1980. Structural, enzymatic, and genetic studies of β -ketoacyl carrier protein synthetase I and II of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **255**:11949-11956.

Gay, P., D. De Coq, M. Stemmentz, I. Berkelman y C.I. Kado. 1985. Positive selection procedure for entrapment of insertion sequence elements in Gram-negative bacteria. *J. Bacteriol.* **164**:918-921.

Genco, C. y P.J. Desai. 1996. Iron acquisition in the pathogenic *Neisseria*. *Trends Microbiol.* **4**:179-184.

Genco, C.A. y D.W. Dixon. 2001. Emergency strategies in microbial heme capture. *Mol. Microbiol.* **39**:1-11.

Gennis, R.B. y A. Jonas. 1977. Protein lipid interaction. *Annu. Rev. Biophys. Bioeng.* **6**:195-238.

Gerischer, U., A. Segura y N. Ornston. 1998. PcaU, a transcriptional activator of genes for protocatechuate utilization in *Acinetobacter*. *J. Bacteriol.* **180**:1512-1524.

Germon, P., T. Clavel, A. Vianney, R. Portalier y J.C. Lazzaroni. 1998. Mutational analysis of the *Escherichia coli* K-12 TolA N-terminal region and characterization of its TolQ-interacting domain by genetic suppression. *J. Bacteriol.* **180**:6433-6439.

Germon, P., T. Clavel, A. Vianney, R. Potalier y J.C. Lazzaroni. 1998. Mutational analysis of the *Escherichia coli* K-12 TolA N-terminal region and characterization of its TolQ-interacting domain by genetic suppression. *J. Bacteriol.* **180**:6433-6439.

Gibson, D.T. 1988. Microbial metabolism of aromatic hydrocarbons and the carbon cycle. p. 33-44. *En S.R. Hagedorn, R.S. Hanson, y D.A. Kunz (eds). Microbial metabolism and the carbon cycle.* Harwood Academic Press, Inc., New York.

Gibson, D.T. y V. Subramanian. 1984. Microbial degradation of organic compounds, p.181-252. *En D.T. Gibson (ed.).* Marcel Dekker, New York.

Gibson, D.T., G.E. Cardini, F.C. Maseles y R.E. Kallio. 1970. Incorporation of oxygen-18 into benzene by *Pseudomonas putida*. *Biochemistry* **9**:1631-1635.

Giles, N.H., M.E. Case, J. Baum, R. Geever, L. Huiet., V. Patel y B. Tyler. 1985. Gene organization and regulation in the *qa* (quinic acid) gene cluster of *Neurospora crassa*. *Microbiol. Rev.* **49**:338-358.

Gilleland, H.E. Jr., J.D. Stinnett y R.G. Eagon. 1974. Ultrastructural and chemical alteration of the cell envelope of *Pseudomonas aeruginosa*, associated with resistance to ethylenediaminetetraacetate resulting from growth in a Mg^{2+} -deficient medium. *J. Bacteriol.* **117**:302-311.

Godoy, P., M.I. Ramos-Gonzalez y J.L. Ramos. 2001. Involvement of the TonB system in tolerance to solvents and drugs in *Pseudomonas putida* DOT-T1E. *J. Bacteriol.* **183**:5285-5292.

- Gotoh, N., H. Tsujimoto, K. Poole, J.-I. Yamagishi y T. Nishino. 1995. The outer membrane protein OprM of *Pseudomonas aeruginosa* is encoded by *oprK* of the *mexA-mexB-oprM* multidrug resistance operon. *Antimicrob. Agents Chemother.* **39**:2567-2569.
- Gotoh, N., H. Wakebe, E. Yoshihara, T. Nakae y T. Nishino. 1989. Role of protein F in maintaining structural integrity of the *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane. *J. Bacteriol.* **171**:983-990.
- Graham, M.R. y R.Y.C. Lo. 1997. Cloning and characterization of the *exbB-exbD-tonB* locus of *Pasteurella haemolytica* A1. *Gene* **186**:201-205.
- Gray-Owen, S.D. y A.B. Schryvers. 1996. Bacterial transferrin and lactoferrin receptors. *Trends Microbiol.* **4**:185-191.
- Griggs, D.W. y J. Konisky. 1989. Mechanism for iron-regulated transcription of the *Escherichia coli* *fur* gene: metal-dependent binding of Fur protein to the promoters. *J. Bacteriol.* **171**:1048-1054.
- Gudmundsdottir, A., P.E. Bell, M.D. Lundrigan, C. Bradbeer y R.J. Kadner. 1989. Point mutations in a conserved region (TonB box) of *Escherichia coli* outer membrane protein BtuB affect vitamin B₁₂ transport. *J. Bacteriol.* **171**:6526-6533.
- Guerry, P., J. Pérez-Casal, R. Yao, A. McVeigh y T.J. Trust. 1997. A genetic locus involved in iron utilization unique to some *Campylobacter* strains. *J. Bacteriol.* **179**:3997-4002.
- Hagman, K.E., W. Pan, B.G. Spratt, J.T. Balthasar, R.C. Judd y W. M. Shafer. 1995. Resistance of *Neisseria gonorrhoeae* to antimicrobial hydrophobic agents is modulated by the *mtrRCDE* efflux system. *Microbiology* **141**:611-622.
- Hall, H.K. y J.W. Foster. 1996. The role of Fur in the acid tolerance response of *Salmonella typhimurium* is physiologically and genetically separable from its role in iron acquisition. *J. Bacteriol.* **178**:5683-5691.
- Halle, F. y J.M. Meyer. 1992a. Ferrisiderophore reductases of *Pseudomonas*: purification, properties and cellular location of the *Pseudomonas aeruginosa* ferripyoverdine reductase. *Eur. J. Biochem.* **209**:613-620.
- Halle, F. y J.M. Meyer. 1992b. Iron release from siderophores: a multi-step mechanism involving a NADH/FMN oxidoreductase and a chemical reduction by FMNH₂. *Eur. J. Biochem.* **209**:621-627.
- Hancock, R.E.W. 1997. The bacterial outer membrane as a drug barrier. *Trends Microbiol.* **5**:37-42.
- Hancock, R.E.W., D.N. Karunaratne y C. Bernegger-Egli. 1994. Molecular organization and structural role of outer membrane macromolecules, p.263-279. *En* J.M. Ghuyssen y R. Haeknbeck (ed.), *Bacterial cell wall*, Elsevier, Amsterdam.
- Hancock, R.E.W. y V. Braun. 1976. Nature of the energy requirement for the irreversible adsorption of bacteriophages T1 and ϕ 80 to *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **125**:409-415.
- Hantke, K. 1987b. Selection procedure for deregulated iron transport mutants (*fur*) in *Escherichia coli* K-12: *fur* not only affects iron metabolism. *Mol. Gen. Genet.* **210**:135-139.
- Hantke, K. y L. Zimmerman. 1981. The importance of the *exbB* gene for vitamin B₁₂ and ferric iron transport. *FEMS Microbiol. Lett.* **12**:31-35.
- Hantke, K. y V. Braun. 1998. Control of bacterial iron transport by regulatory proteins, p.11-44. *En* S. Silver y W. Walden (ed.), *Metal Ions in Gene Regulation*. Chapman & Hall, New York.
- Harding, R.A. y P.W. Royt. 1990. Acquisition of iron from citrate by *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Gen. Microbiol.* **136**:1859-1867.

- Harrop, A.J., M.D. Kocknull y M.D. Lilly.** 1989. Biotransformations in organic solvents: a difference between Gram-positive and Gram-negative bacteria. *Biotechnol. Lett.* **11**:807-810.
- Hartmann, A. y V. Braun.** 1980. Iron transport in *Escherichia coli*: uptake and modification of ferrichrome. *J. Bacteriol.* **143**:246-255.
- Harwood, C.S. y R.E. Parales.** 1996. The β -ketoadipate pathway and the biology of self-identity. *Annu. Rev. Microbiol.* **50**:553-590.
- Harwood, C.S., N.N. Nichols, M.K. Kim, J.L. Ditty y R.E. Parales.** 1994. Identification of the *pcaRKF* gene cluster from *Pseudomonas putida*: involvement in chemotaxis, biodegradation, and transport of 4-hydroxybenzoate. *J. Bacteriol.* **176**:6479-6488.
- Harwood, C.S., R.E. Parales y M. Dispensa.** 1990. Chemotaxis of *Pseudomonas putida* toward chlorinated benzoates. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**:1501-1503.
- Hawkins, A.R., H.K. Lamb, J.D. Moore, I.G. Charles y C.F. Roberts.** 1993. The pre-chorismate (shikimate) and quinate pathways in filamentous fungi: theoretical and practical aspects. *J. Gen. Microbiol.* **139**:2891-2899.
- Heidelberg, J.F. et al.** 2000. DNA sequence of both chromosomes of the cholera pathogen *Vibrio cholerae*. *Nature* **406**:477-483.
- Heinrichs, D.E., L. Young y K. Poole.** 1991. Pyochelin-mediated iron transport in *Pseudomonas aeruginosa*: involvement of a high molecular-mass outer membrane protein. *Infect. Immun.* **59**:3680-3684.
- Heipieper, H.J. y J.A.M de Bont.** 1994. Adaptation of *Pseudomonas putida* S12 to ethanol and toluene at the level of fatty acid composition of membranes. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**:4440-4444.
- Heipieper, H.J., B. Loffeld, H. Keweloh y J.A.M. de Bont.** 1995. The *cis/trans* isomerization of unsaturated fatty acids in *Pseudomonas putida* S12: an indicator for the environmental stress due to organic compounds. *Chemosphere* **30**:1041-1051.
- Heipieper, H.J., F.J. Weber, J. Sikkema, H. Keweloh y J.A.M. de Bont.** 1994. Mechanisms behind resistance of whole cells to toxic organic solvents. *Trends Biotechnol.* **12**:409-415.
- Heipieper, H.J., G. Meulenbeld, Q. van Oirschot y J.A.M. de Bont.** 1996. Effect of environmental factors on the *cis/trans* ratio of unsaturated fatty acids in *Pseudomonas putida* S12. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**:2773-2777.
- Heipieper, H.J., R. Diefenbach y H. Keweloh.** 1992. Conversion of *cis* unsaturated acids to *trans*, a possible mechanism for protection of phenol-degrading *Pseudomonas putida* P8 from substrate toxicity. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**:1847-1852.
- Held, K.G. y K. Postle.** 2002. ExbB and ExbD do not function independently in TonB-dependent energy transduction. *J. Bacteriol.* **184**:5170-5173.
- Heller, K.J., R.J. Kadner y K. Günter.** 1988. Suppression of the *btuB451* mutation by mutations in the *tonB* gene suggests a direct interaction between TonB and TonB-dependent receptor proteins in the outer membrane of *Escherichia coli*. *Gene* **64**:147-153.
- Herrero, M., V. de Lorenzo y K.N. Timmis.** 1990. Transposon vectors containing non-antibiotic resistance selection markers for cloning and stable chromosomal insertion of foreign genes in Gram-negative bacteria. *J. Bacteriol.* **172**:6557-6567.
- Higgins, C.F., S.C. Hyde, M.M. Mimmack, U. Gileadi, D.R. Gill y M.P. Galagher.** 1990. Binding protein-dependent transport systems. *J. Bioenerg. Biomembr.* **22**:571-592.

- Higgs, P.I., P.S. Myers y K. Postle. 1998. Interactions in the TonB-dependent energy transduction complex: ExbB and ExbD form homomultimers. *J. Bacteriol.* **180**:6031-6038.
- Higgs, P.I., R.A. Larsen y K. Postle. 2002. Quantification of known components of the *Escherichia coli* TonB energy transduction system: TonB, ExbB, ExbD y FepA. *Mol. Microbiol.* **44**:271-281.
- Howard, S.P., H.G. Meiklejohn, D. Shivak y R. Jahagirdan. 1996. A TonB-like protein and a novel membrane protein containing an ATP-binding cassette function together in exotoxin secretion. *Mol. Microbiol.* **22**:595-604.
- Huang, K., Y.G. Lin y H.H. Winter. 1992. *p*-hydroxybenzoate/ethylene terephthalate copolyester: structure of high-melting crystals formed during partially molten state annealing. *Polymer* **33**:4533-4537.
- Huertas, M.J. 1999. Supervivencia en suelos de bacterias del género *Pseudomonas* que degradan y metabolizan disolventes orgánicos. Tesis Doctoral. Universidad de Granada, Granada, España.
- Idei, A., E. Kawai, H. Akatsuka y K. Omori. 1999. Cloning and characterization of the *Pseudomonas fluorescens* ATP-binding cassette exporter, HasDEF, for the heme acquisition protein HasA. *J. Bacteriol.* **181**:7545-7551.
- Imlay, J.A., S.M. Chin y S. Linn. 1988. Toxic DNA damage by hydrogen peroxide through the Fenton reaction *in vivo* and *in vitro*. *Science* **240**:640-642.
- Ingram, L.O. 1977. Changes in lipid composition of *Escherichia coli* resulting from growth with organic solvents and with food additives. *Appl. Environ. Microbiol.* **33**:1233-1236.
- Inoue, A. y K. Horikoshi. 1989. A *Pseudomonas* thrives in high concentrations of toluene. *Nature* **338**:254-266.
- Inoue, A. y K. Horikoshi. 1991. Estimation of solvent tolerance of bacteria by the solvent parameter LogP. *J. Ferm. Bioeng.* **71**:194-196.
- Inoue, A., M. Yamamoto y K. Horikoshi. 1991. *Pseudomonas putida* which can grow in the presence of toluene. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**:1560-1562.
- Isken, S. y J.A.M. de Bont. 1996. Active efflux of toluene in a solvent-resistant bacterium. *J. Bacteriol.* **178**:6056-6058.
- Jacquamet, L., D. Aberdam, A. Adrait, J.L. Hazemann, J.M. Latour e I. Michaud-Soret. 1998. X-ray absorption spectroscopy of a new zinc site in the Fur protein from *Escherichia coli*. *Biochemistry* **37**:2564-2571.
- Jarosik, G.P. y E.J. Hansen. 1995. Cloning and sequencing of the *Haemophilus influenzae* *exbB* and *exbD* genes. *Gene* **152**:89-92.
- Jarosik, G.P., J.D. Sanders, L.D. Cope, U. Muller-Eberhard y E.J. Hansen. 1994. A functional *tonB* gene is required for both utilization of heme and virulence expression by *Haemophilus influenzae* type b. *Infect. Immun.* **62**:2470-2477.
- Jarosik, G.P., J.D. Sanders, L.D. Cope, U. Muller-Eberhard y E.J. Hansen. 1994. A functional *tonB* gene is required for both utilization of heme and virulence expression by *Haemophilus influenzae* type b. *Infect. Immun.* **62**:2470-2477.
- Jaskula, J.C., T.E. Letain, S.K. Roof, J.T. Skare y K. Postle. 1994. Role of the TonB amino terminus in energy transduction between membranes. *J. Bacteriol.* **176**:2326-2338.
- Junker, F. y J.L. Ramos. 1999. Involvement of the *cis/trans* isomerase Cti in solvent resistance of *Pseudomonas putida* DOT-T1E. *J. Bacteriol.* **181**:5693-5700.

- Junker, F., J.J. Rodríguez-Herva, E. Duque, M.I. Ramos-González, M. Llamas y J.L. Ramos.** 2001. A WbpL mutant of *Pseudomonas putida* DOT-T1E strain, which lacks the O-antigenic side chain of lipopolysaccharides, is tolerant to organic solvent shocks. *Extremophiles* **5**:93-99.
- Kaback, H.R.** 1989. Molecular biology of active transport: from membrane to molecule to mechanism. *Harvey Lect.* **83**:77-105.
- Kadner, R.J.** 1990. Vitamin B₁₂ transport in *Escherichia coli*: energy coupling between membranes. *Mol. Microbiol.* **4**:2027-2033.
- Kadner, R.J.** 1996. Cytoplasmic membrane, p.58-87. *En* F.C. Neidhardt, R. Curtis, J.L. Ingraham, E.C.C. Lin, B. Low, B. Magasanik, W.S. Reznikoff, M. Riley, M. Schaechter y H.E. Umbarger (ed.), *Escherichia coli* and *Salmonella*: cellular and molecular biology. ASM Press, Washington, D.C.
- Kampfenkel K. y V. Braun.** 1993. Topology of the ExbB protein in the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **268**:6050-6057.
- Kampfenkel, K. y V. Braun.** 1992. Membrane topology of the *Escherichia coli* ExbD protein. *J. Bacteriol.* **174**:5485-5487.
- Kaniga, K., I. Delor y G.R. Cornelis.** 1991. A wide-host-range suicide vector for improving reverse genetics in Gram-negative bacteria: inactivation of the *blaA* gene of *Yersinia enterocolitica*. *Gene* **109**:137-141.
- Karjalainen, T.K., D.G. Evans, D.J. Evans, D.Y. Graham Jr. y C.H. Lee.** 1991. Iron represses the expresion of CFA/I fimbriae of enterotoxigenic *E. coli*. *Microb. Pathog.* **11**:317-323.
- Karlsson, M., K. Hannavy y C.F. Higgins.** 1993. A sequence-specific function for the N-terminal signal-like sequence of the TonB protein. *Mol. Microbiol.* **8**:379-388.
- Kessler, B., V. de Lorenzo y K.N. Timmis.** 1992. A general system to integrate *lacZ* fusions into the chromosomes of Gram-negative eubacteria: regulation of the *Pm* promoter of the TOL plasmid studied with all controlling elements in monocopy. *Mol. Gen. Genet.* **233**:293-301.
- Keweloh, H., G. Weyrauch y H.J. Rehm.** 1990. Phenol-induced membrane changes in free and immobilized *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* **33**:66-71.
- Kieboom, J., J.J. Dennis, G.J. Zylstra y J.A.M. de Bont.** 1998. Active efflux of organic solvents by *Pseudomonas putida* S12 is induced by solvents. *J. Bacteriol.* **180**:6769-6772.
- Kieboom, J., J.J. Dennis, J.A.M. de Bont y G.J. Zylstra.** 1997. Identification and molecular characterization of an efflux pump involved in *Pseudomonas putida* S12 solvent tolerance. *J. Biol. Chem.* **273**:85-91.
- Klebba, P.E., J.M. Rutz, J. Liu y C.K. Murphy.** 1993. Mechanisms of TonB-catalyzed iron transport through the enteric bacterial cell envelope. *J. Bioenerg. Biomembr.* **25**:603-611.
- Klebba, P.E., M.A. McIntosh y J.B. Neilands.** 1982. Kinetics of biosynthesis of iron-regulated membrane proteins in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **149**:880-888.
- Kobayashi, K., N. Tsukagoshi y R. Aono.** 2001. Suppression of hypersensitivity of *Escherichia coli* *acrB* mutant to organic solvents by integrational activation of the *acrEF* operon with the IS1 or IS2 element. *J. Bacteriol.* **183**:2646-2653.
- Koebnik, R.** 1993. The molecular interaction between components of the TonB-ExbBD-dependent and of the TolQRA-dependent bacterial uptake systems. *Mol. Microbiol.* **9**:219.
- Koronakis, V., A. Sharff, E. Koronakis, B. Luisi y C. Hughes.** 2000. Crystal structure of bacterial

membrane protein TolC central to multidrug efflux and protein export. *Nature* **405**:914-919.

Koster, M., J. van der Vossen, J. Leong y P.J. Weisbeek. 1993. Identification and characterization of the *pupB* gene encoding an inducible ferric-pseudobactin receptor in *Pseudomonas putida* WCS358. *Mol. Microbiol.* **8**:591-601.

Kowalchuk, G.A., G.B. Hartnett, A. Benson, J.E. Houghton, K.L. Ngai y L.N. Ornston. 1994. Contrasting patterns of evolutionary divergence within the *Acinetobacter calcoaceticus* *pca* operon. *Gene* **146**:23-30.

Kowalchuk, G.A., G.B. Hartnett, A. Benson, J.E. Houghton, K.L. Ngai y L.N. Ornston. 1994. Contrasting patterns of evolutionary divergence within the *Acinetobacter calcoaceticus* *pca* operon. *Gene* **146**:23-30.

Kumar, P.A., P. Swathi, V.G.K.M. Pisipati y A.V. Rajeswari. 2002. Induced crystal-G phase through intermolecular hydrogen bonding Part XIV: Influence of alkyl carbons of *p*-hydroxybenzoate on phase distribution of induced phase. *Cryst. Res. Technol.* **37**:595-601.

Kyte, J. y R.F. Doolittle. 1982. A simple method for displaying the hydrophobic character of a protein. *J. Mol. Biol.* **157**:105-132.

Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature (London)* **227**:680-685.

Larsen, R.A. y K. Postle. 2001. Conserved residues Ser(16) and His(20) and their relative positioning are essential for TonB activity, cross-linking of TonB with ExbB, and the ability of TonB to respond to proton motive force. *J. Biol. Chem.* **276**:8111-8117.

Larsen, R.A., D. Foster-Hartnett, M.A. McIntosh y K. Postle. 1997. Regions of *Escherichia coli* TonB and FepA proteins essential for *in vivo* physical interactions. *J. Bacteriol.* **179**:3213-3221.

Larsen, R.A., G.E. Wood y K. Postle. 1993. The conserved proline-rich motif is not essential for energy transduction by *Escherichia coli* TonB protein. *Mol. Microbiol.* **10**:943-953.

Larsen, R.A., M.G. Thomas y K. Postle. 1999. Proton motive force, ExbB and ligand-bound FepA drive conformational changes in TonB. *Mol. Microbiol.* **31**:1809-1824.

Larsen, R.A., M.G. Thomas, G.E. Wood y K. Postle. 1994. Partial suppression of an *Escherichia coli* TonB transmembrane domain mutation ($\Delta V17$) by a missense mutation in ExbB. *Mol. Microbiol.* **13**:627-640.

Law, J.H. 1971. Biosynthesis of cyclopropane rings. *Acc. Chem. Res.* **4**:199-203.

Law, J.H., H. Zalkin y T. Kánechiro. 1963. Transmethylation reactions in bacterial lipids. *Biochim. Biophys. Acta* **70**:143-151.

Lazdunski, C., J.E. Bouveret, A. Rigal, L. Journet, R. Llobès y H. Bénédicti. 2000. Colicin import into *Escherichia coli* cells requires the proximity of the inner and outer membranes and other factors. *Int. J. Med. Microbiol.* **290**:337-344.

Lazdunski, C.J., E. Bouveret, A. Rigal, L. Journet, R. Llobès y Hélène Bénédicti. 1998. Colicin import into *Escherichia coli* cells. *J. Bacteriol.* **180**:4993-5002.

Lazzaroni, J.C. y R. Portalier. 1992. The *excC* gene of *Escherichia coli* K-12 required for the cell envelope integrity encodes the peptidoglycan-associated lipoprotein (Pal). *Mol. Microbiol.* **6**:735-742.

Lazzaroni, J.C. y R.C. Portalier. 1981. Genetic and biochemical characterization of periplasmic leaky mutants of *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* **145**:1351-1358.

- Lazzaroni, J.C., A. Vianney, J.L. Popot, H. Bénédicti, F. Samatey, C. Lazdunski, R.C. Portalier y V. Géli. 1995. Transmembrane α -helix interactions are required for the functional assembly of the *Escherichia coli* Tol complex. *J. Mol. Biol.* **246**:1-7.
- Lazzaroni, J.C., N. Fognini-Lefebvre y R. Portalier. 1989. Cloning of the *excC* and *excD* genes involved in the release of periplasmic proteins by *Escherichia coli* K12. *Mol. Gen. Genet.* **218**:460-464.
- Le Cam, E., D. Fréchon, M. Barray, A. Fourcade y E. Delain. 1994. Observation of binding and polymerization of Fur repressor onto operator-containing DNA with electron and atomic force microscopes. *Proc. Acad. Sci. USA* **91**:11816-11820.
- Leahy, J.G., A.M. Byrne y R.H. Olsen. 1996. Comparison of factors influencing trichloroethylene degradation by toluene-oxidizing bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**:825-833.
- Leemans, J., J. Langenakens, H. De Greve, R. Deblaere, M. Van Montagu y J. Schell. 1982. Broad-host-range cloning vectors derived from the W-plasmid Sa. *Gene* **19**:361-364.
- Letain, T.E. y K. Postle. 1997. TonB protein appears to transduce energy by shuttling between the cytoplasmic membrane and the outer membrane in Gram-negative bacteria. *Mol. Microbiol.* **24**:271-283.
- Letoffe, S., R. Binet, A. Paquelin, P. Arnoux, M. Szjzek, J.M. Ghigo, R. Haser, N. Izadi, A. Lecroisey, M. Delepierre y C. Wandersman. 1999. Hemophore dependent heme acquisition systems in gram-negative bacteria, p.118. *En World Congress on Iron Metabolism: BIOIRON 99*.
- Letoffe, S., V. Redeker y C. Wandersman. 1998. Isolation and characterization of an extracellular haem-binding protein from *Pseudomonas aeruginosa* that shares function and sequence similarities with the *Serratia marcescens* HasA haemophore. *Mol. Microbiol.* **28**:1223-1234.
- Levengood, S.K., W.F. Beyer Jr. y R.E. Webster. 1991. TolA: A membrane protein involved in colicin uptake contains an extended helical region. *Proc. Natl. Sci. USA* **88**:5939-5943.
- Lewis, J.P., J.A. Dawson, J.C. Hannis, D. Muddiman y F.L. Macrina. 1999. Hemoglobinase activity of the lysine gingipain protease (Kgp) of *Porphyromonas gingivalis* W83. *J. Bacteriol.* **181**:4905-4913.
- Li, X., L. Zhang y K. Poole. 1998. Organic solvent-tolerant mutants of *Pseudomonas aeruginosa* display multiple antibiotic resistance. *J. Bacteriol.* **180**:2987-2991.
- Li, X.Z. y K. Poole. 2001. Mutational analysis of the OprM outer membrane component of the MexA-MexB-OprM multidrug efflux system of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **183**:12-27.
- Li, X.Z., H. Nikaido y K. Poole. 1995. Role of MexA-MexB-OprM in antibiotic efflux in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **39**:1948-1953.
- Lindsey, A.S. y H. Jeskey. 1957. The Kolbe-Schmitt reaction. *Chem. Rev.* **57**:583-620.
- Litwin, C.M. y S.B. Calderwood. 1993. Role of iron in regulation of virulence genes. *Clin. Microbiol. Rev.* **6**:137-149.
- Llomas, M. 2002. El sistema Tol-OprL de *Pseudomonas putida* KT2440. Estudio de su función y análisis de su expresión génica. Tesis Doctoral, Universidad de Granada.
- Llomas, M.A., J.L. Ramos y J.J. Rodríguez-Herva. 2000. Mutations in each of the *tol* genes of *Pseudomonas putida* reveal that they are critical for maintenance of outer membrane stability. *J. Bacteriol.* **182**:4764-4772.
- Lohner, K. 1991. Effects of small organic molecules on phospholipid phase transition. *Chem. Phys. Lipid* **57**:341-362.
- Lugtenberg, B. y van Alphen. 1983. Molecular architecture and functioning of the outer membrane of

- Escherichia coli* and other Gram-negative bacteria. *Biochim. Biophys. Acta.* **737**:51-115.
- Ma, D., D.N. Cook, M. Alberti, N.G. Pon, H. Nikaido y J.E. Hearst.** 1993. Molecular cloning and characterization of *acrA* and *acrE* genes of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **175**:6299-6313.
- Magnuson, K., S. Jackovski, C.O. Rock y J.E. Cronan Jr.** 1993. Regulation of fatty acid biosynthesis in *Escherichia coli*. *Microbiol. Rev.* **57**:522-542.
- Makemson, J.C. y J.W. Hastings. 1982. Iron represses bioluminescence in *Vibrio harveyi*. *Curr. Microbiol.* **7**:181-186.
- Manoil, C. y B. Traxler.** 1995. Membrane protein assembly: genetic, evolutionary and medical perspectives. *Annu. Rev. Genet.* **29**:131-150.
- Manoil, C. y J. Beckwith.** 1985. Tn *phoA*: a transposon probe for protein export signals. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **82**:8129-8133.
- Marck, C.** 1998. "DNA Strider": a "C" program for the fast analysis of DNA and protein sequences on the Apple Macintosh family of computers. *Nucleic Acids Res.* **16**:1829-1836.
- Marger, M.D. y M.H. Saier.** 1993. A major superfamily of transmembrane facilitators that catalyze uniport, symport, and antiport. *Trends Biochem. Sci.* **18**:13-19.
- Marr, A.G. y J.L. Ingraham.** 1962. Effect of temperature on the composition of fatty acids in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **84**:1260-1267.
- Masuda, N., E. Sakagawa y S. Ohya.** 1995. Outer membrane proteins responsible for multiple drug resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **39**:645-649.
- McCarter, L. y M. Silverman.** 1989. Iron regulation of swarmer cell differentiation of *Vibrio parahaemolyticus*. *J. Bacteriol.* **171**:731-736.
- McIntosh, T.J., S.A. Simon y R.C. MacDonald.** 1980. The organization of *n*-alkanes in lipid bilayers. *Biochim. Biophys. Acta* **597**:445-463.
- Mermod, N., S. Harayana y K.N. Timmis.** 1986. New route to bacterial production of indigo. *Bio/Technol.* **4**:321-324.
- Meyer, J.M. y D. Hohnadel.** 1992. Use of nitriloacetic acid (NTA) by *Pseudomonas* species through iron metabolism. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **37**:114-118.
- Meyer, J.M., P. Azelvandre y C. Georges.** 1992. Iron metabolism in *Pseudomonas*: salicylic acid, a siderophore of *Pseudomonas fluorescens* CHAO. *Biofactors* **4**:23-27.
- Michaud-Soret, I., A. Adrait, M. Jaquinod, E. Forest, D. Touati y J.M. Latour.** 1997. Electrospray ionization mass spectroscopy analysis of the apo- and metal-substituted forms of the Fur protein. *FEBS Lett.* **413**:473-476.
- Miller, E.S. y S.W. Peretti.** 2002. Toluene bioconversion to *p*-hydroxybenzoate by fed-batch cultures of recombinant *Pseudomonas putida*. *Biotechnol. Bioeng.* **77**:340-351.
- Moeck, G.S. y J.W. Coulton.** 1998. TonB-dependent iron acquisition: mechanisms of siderophore-mediated active transport. *Mol. Microbiol.* **28**:675-681.
- Mosqueda, G. y J.L. Ramos.** 2000. A set of genes encoding a second toluene efflux system in *Pseudomonas putida* DOT-T1E is linked to the *tod* genes for toluene metabolism. *J. Bacteriol.* **182**:937-943.
- Mosqueda, G., M.I. Ramos-González y J.L. Ramos.** 1999. Toluene metabolism by the solvent-tolerant

- Pseudomonas putida* DOT-T1 strain, and its role in solvent impermeabilization. *Gene* **232**:69-76.
- Mülradt, P.F. y J.R. Golecki.** 1975. Asymmetrical distribution and artifactual reorientation of lipopolysaccharide in the outer membrane bilayer of *Salmonella typhimurium*. *Eur. J. Biochem.* **51**:343-352.
- Nakae, T., A. Nakajima, T. Ono, K. Saito y H. Yoneyama.** 1999. Resistance to beta-lactam antibiotics in *Pseudomonas aeruginosa* due to interplay between the MexAB-OprM efflux pump and beta-lactamase. *Antimicrob. Agents Chemother.* **43**:1301-1303.
- Neilands, J.B.** 1981a. Microbial iron compounds. *Ann. Rev. Biochem.* **50**:715-731.
- Neilands, J.B.** 1981b. Iron absorption and transport in microorganisms. *Ann. Rev. Nutr.* **1**:27-46.
- Neilands, J.B.** 1995. Siderophores: structure and function of microbial iron transport compounds. *J. Biol. Chem.* **270**:26723-26726.
- Nelson, K., I. Paulsen, C. Weinel, R. Dodson, H. Hilbert, D. Fouts, S. Gills, M. Pop, V. Martins Dos Santos, M. Holmes, L. Brinkac, M. Beanan, R. Deboy, S. Daugherty, J. Kolonay, R. Madupu, W. Nelson, O. White, J. Peterson, H. Khouri, I. Hance, P. Lee, E. Holtzapple, D. Scanlan, K. Tran, A. Moazzez, T. Utterback, M. Rizzo, K. Lee, D. Kosack, D. Moestl, H. Wedler, J. Lauber, J. Hoheisel, M. Stratz, S. Heim, C. Kiewitz, J. Eisen, K. Timmis, A. Duesterhoft, B. Tummler y C. Fraser.** 2002. Complete genome sequence and comparative analysis of the metabolically versatile *Pseudomonas putida* KT2440. *Environ. Microbiol.* **4**:799-808.
- Ngai, K.L., L.N. Ornston y R.G. Kallen.** 1983. Enzymes of the β -keto adipate pathway in *Pseudomonas putida*: kinetic and magnetic resonance studies of the *cis,cis*-muconate cycloisomerase catalyzed reaction. *Biochemistry* **22**:5223-5230.
- Nichols, N.N. y C.S. Harwood.** 1995. Repression of 4-hydroxybenzoate transport and degradation by benzoate: a new layer of regulatory control in the *Pseudomonas putida* β -keto adipate pathway. *J. Bacteriol.* **177**:7033-7040.
- Nichols, N.N. y C.S. Harwood.** 1997. PcaK, a high-affinity permease for the aromatic compounds 4-hydroxybenzoate and protochatechuate from *Pseudomonas putida*. *J. Bacteriol.* **179**:5056-5061.
- Nicholson, M.L. y B. Beall.** 1999. Disruption of *tonB* in *Bordetella bronchiseptica* and *Bordetella pertussis* prevents utilization of ferric siderophores, haemin and haemoglobin as iron sources. *Microbiology* **145**:2453-2461.
- Niederhoffer, E.C., C.M. Naranjo, K.L. Bradley y J.A. Fee. 1990. Control of *Escherichia coli* superoxide dismutase (*sodA* and *sodB* genes) by the ferric uptake regulation (*fur*) locus. *J. Bacteriol.* **177**:7194-7201.
- Nielsen, H., J. Engelbrecht, S. Brunak y G. von Heijne.** 1997. Identification of prokariotic and eukariotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. *Protein Eng.* **10**:1-6.
- Nienaber, A., H. Hennecke y H.M. Fischer.** 2001. Discovery of a haem uptake system in the soil bacterium *Bradyrhizobium japonicum*. *Mol. Microbiol.* **41**:787-800.
- Nikaido, H.** 1994b. Prevention of drug access to bacterial targets: permeability barriers and active efflux. *Science* **264**:382-388.
- Nikaido, H.** 1996a. Outer membrane, p.29-47. *En F.C. Neidhardt, R. Curtis, J.L. Ingraham, E.C.C. Lin, B. Low, B. Magasanik, W.S. Reznikoff, M. Riley, M. Schaechter y H.E. Umbarger (ed.), Escherichia coli and Salmonella: cellular and molecular biology.* ASM Press, Washington, D.C.
- Nikaido, H.** 1996b. Multidrug efflux pumps of Gram-negative bacteria. *J. Bacteriol.* **178**:5853-5859.
- Nikaido, H.** 1999. Microdematology: cell surface in the interaction of microbes with the external world.

J. Bacteriol. **181**:4-8.

Nikaido, H. y D.G. Thanassi. 1993. Penetration of lipophilic agents with multiple protonation sites into bacterial cells: tetracyclines and fluoroquinolones as examples. *Antimicrob. Agents Chemother.* **37**:1393-1399.

Nikaido, H. y E. Rosenberg. 1983. Porin channels in *Escherichia coli* studies with liposomes reconstituted from purified proteins. *J. Bacteriol.* **153**:241-252.

Nikaido, H. y E.Y. Rosenberg. 1983. Porin channels in *Escherichia coli*: studies with liposomes reconstituted from purified proteins. *J. Bacteriol.* **153**:241-252.

Nikaido, H. y M. Vaara. 1985. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability. *Microbiol. Rev.* **49**:1-32.

Nikaido, H. y M.H.J. Saier. 1992. Transport proteins in bacteria: common themes in their design. *Science* **258**:936-942.

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

Nishina, Y., S.I. Miyoshi, A. Nagase y S. Shinoda. 1992. Significant role of an exocellular protease in utilization of heme by *Vibrio vulnificus*. *Infect. Immun.* **60**:2128-2132.

Norrandner, K., T. Kempe y K. Messing. 1983. Construction of improved M13 vectors using oligodeoxynucleotide-directed mutagenesis. *Gene* **26**:101-106.

Nunoshiba, T., F. Obata, A.C. Boss, S. Oikawa, T. Mori y S. Kawanishi y K. Yamamoto. 1999. Role of iron and superoxide for generation of hydroxyl radical, oxidative DNA lesions, and mutagenesis in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **274**:34832-34837.

Occhino, D.A., E.E. Wyckoff, D.P. Henderson, T.J. Wrona y S.M Payne. 1998. *Vibrio cholerae* iron transport: haem transport genes are linked to one of two sets of *tonB*, *exbB*, *exbD* genes. *Mol. Microbiol.* **29**:1493-1507.

Ochsner, U. y M. Vasil. 1996. Gene repression by the ferric uptake regulator in *Pseudomonas aeruginosa*: cycle selection of iron-regulated genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**:4409-4414.

Ochsner, U.A., P.J. Wideman, A.I. Vasil y M.L. Vasil. 2002. GeneChip[®] expression analysis of the iron starvation response in *Pseudomonas aeruginosa*: identification of novel pyoverdine biosynthesis genes. *Mol. Microbiol.* **45**:1277-1287.

Okuyama, H., N. Okajima, S. Sasaki, S. Higashi y N. Murata. 1991. The *cis/trans* isomerization of the double bond of a fatty acid as a strategy for adaptation to changes in ambient temperature in the psychrophilic bacterium, *Vibrio* sp. strain ABE-1. *Biochem. Biophys. Acta* **1084**:13-20.

Oliver, D.B. 1987. **Periplasm and protein secretion.** *En: Escherichia coli and Salmonella typhimurium: cellular and molecular biology* (Neidhard, F.C., J.L. Ingrahm, K.W. Low, B. Magasanik, M. Schaechter, H.E. Umbarger, eds.) pp. 447-497. ASM, Washinton DC.

O'Malley, S.M., S.L. Mouton, D.A. Occhino, M.T. Deanda, J.R. Rashidi, K.L. Fuson, C.E. Rashidi, M.Y. Mora, S.M. Payne y D.P. Henderson. 1999. Comparison of the heme iron utilization systems of pathogenic vibrios. *J. Bacteriol.* **181**:3594-3598.

Ornston, L.N. y R.Y. Stanier. 1966. The conversion of catechol and protocatechuate to β -keto adipate by *Pseudomonas putida*. *J. Biol. Chem.* **241**:3776-3786.

Parke, D. y L.N. Ornston. 1976. Constitutive synthesis of enzymes of the protocatechuate pathway and of the β -keto adipate uptake system in mutant strains of *Pseudomonas putida*. *J. Bacteriol.* **126**:272-281.

- Parkhill, J. et al.** 2000. The genome sequence of the food-borne pathogen *Campylobacter jejuni* reveals hypervariable sequences. *Nature* **403**:665-668.
- Pearson, W.R. y D.J. Lipman.** 1988. Improved tools for biological sequence comparison. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**:2444-2448.
- Phillips, M.C., B.D. Ladbroke y D. Cahpman.** 1970. Molecular interactions in mixed lecitin systems. *Biochim. Biophys. Acta* **196**:35-44.
- Pinkart, H.C. y D.C. White.** 1997. Phospholipid biosynthesis and solvent tolerance in *Pseudomonas putida* strains. *J. Bacteriol.* **179**:4219-4226.
- Pinkart, H.C., J.W. Wolfram, R. Rogers y D.C. White.** 1996. Cell envelope changes in solvent-tolerant and solvent-sensitive *Pseudomonas putida* strains following exposure to *o*-xylene. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**:1129-1132.
- Pohl, E., R.K. Holmes y W.G. Hol.** 1999a. Crystal structure of a cobalt-activated diphteria toxin repressor-DNA complex reveals a metal-binding SH₃-like domain. *J. Mol. Biol.* **292**:653-667.
- Pohl, E., R.K. Holmes y W.G. Hol.** 1999b. Crystal structure of the iron-dependent regulator (IdeR) from *Mycobacterium tuberculosis* shows both metal binding sites fully occupied. *J. Mol. Biol.* **285**:1145-1156.
- Poole, K., K. Krebes, C. McNally y S. Neshat.** 1993. Multiple antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: evidence for involvemen of an efflux operon. *J. Bacteriol.* **175**:7363-7372.
- Poole, K., K. Tetro, Q.X. Zhao, S. Neshat, D.E. Heinrichs y N. Bianco.** 1996a. Expression of the multidrug-resistance operon MexA-MexB-OprM in *Pseudomonas aeruginosa*: MexR encodes a regulator of operon expression. *Antimicrob. Agents Chemother.* **40**:2021-2028.
- Poole, K., L. Young y S. Neshat.** 1990. Enterobactin mediated iron transport in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **172**:6991-6996.
- Poole, K., N. Gotoh, H. Tsujimoto, Q. Zhao, A Wada, T. Yamasaki, S. Neshat, J.I. Yamagishi, X.Z. Li y T. Nishino.** 1996b. Overexpression of the *mexC-mexD-oprJ* efflux operon in *nfxB* multidrug resistant strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol. Microbiol.* **21**:713-724.
- Poole, K., Q. Zhao, S. Neshat, D.E. Heinrichs y C.R. Dean.** 1996c. The *Pseudomonas aeruginosa tonB* gene encodes a novel TonB protein. *Microbiology* **142**:1449-1458.
- Pope, J.M. y D.W. Dubro.** 1986. The interaction of *n*-alkanes and *n*-alkanols with lipid bilayer membranes: a ²H-NMR study. *Biochim. Bophys. Acta* **858**:243-253.
- Postle, K y R.F. Good.** 1993. TonB protein and energy transduction between membranes. *J. Bioenerg. Biomemb.* **25**:591-601.
- Postle, K.** 1990a. TonB and the Gram-negative dilemma. *Mol. Microbiol.* **4**:2019-2025.
- Postle, K.** 1990a. TonB and the Gram-negative dilemma. *Mol. Microbiol.* **4**:2019-2025.
- Postle, K.** 1990b. Aerobic regulation of the *Escherichia coli tonB* gene by changes in iron availability and the *fur* locus. *J. Bacteriol.* **172**:2287-2293.
- Postle, K.** 1993. TonB protein and energy transduction between membranes. *J. Bioenerg. Biomembr.* **25**:591-601.
- Postle, K. y J.T. Skare.** 1988. *Escherichia coli* TonB protein is exported from the cytoplasm without proteolytic cleavage of its amino terminus. *J. Biol. Chem.* **263**:11000-11007.

- Pradel, E., N. Guiso y C. Loch. 1999. Construction and characterization of *Bordetella pertussis tonB* mutants. GenBank BPE132741, direct submission.
- Pressler, U., H. Staudenmaier, L. Zimmermann, y V. Braun. 1988. Genetics of the iron dicitrate transport system of *Escherichia coli*. J. Bacteriol. **170**:2716-2724.
- Priefert, H., J. Rabenhorst y A. Steinbüchel. 1997. Molecular characterization of genes of *Pseudomonas* sp. strain HR199 involved in bioconversion of vanillin to protocatechuate. J. Bacteriol. **179**:2595-2607.
- Pringle, M.J. y K.W. Miller. 1979. Differential effects on phospholipid phase transitions produced by structurally related long chain alcohols. Biochemistry **18**:3314-3320.
- Prodromou, C., P.J. Artymiuk y J.R. Guest. 1992. The aconitase of *E. coli*. Eur. J. Biochem. **204**:599-609.
- Pugsley, A.P. 1993. The complete general secretory pathway in gram-negative bacteria. Microbiol. Rev. **57**:50-108.
- Quioco, F.A. 1990. Atomic structures of periplasmic binding proteins and the high-affinity active transport systems in bacteria. Phil. Trans. R. Soc. London Ser. B **326**:341-351.
- Raetz, C.R.H. 1978. Enzymology, genetics, and regulation of membrane phospholipid synthesis in *Escherichia coli*. Microbiol. Rev. **42**:614-659.
- Raleigh, E.A., N.E. Murray, H. Revel, R.M. Blumenthal, D. Westaway, A.D. Reith, P.W. Rigby, J. Elhai y D. Hanahan. 1988. McrA and McrB restriction phenotypes of some *E. coli* strains and implications for gene cloning. Nucl. Acids Res. **16**:1563-1575.
- Ramos, J.L. y F. Rojo. 1990. Biodegradación e ingeniería genética. Investigación y Ciencia **164**:72-79.
- Ramos, J.L., E. Duque y M.I. Ramos-González. 1991. Survival in soils of an herbicide-resistant *Pseudomonas putida* strain bearing a recombinant TOL plasmid. Appl. Environ. Microbiol. **57**:260-266.
- Ramos, J.L., E. Duque, J.J. Rodríguez-Herva, P. Godoy, A. Haïdour, F. Reyes y A. Fernández-Barrero. 1997 Mechanisms for solvent tolerance in bacteria. J. Biol. Chem. **272**:3887-3890.
- Ramos, J.L., E. Duque, M.J. Huertas y A. Haïdour. 1995. Isolation and expansion of the catabolic potential of a *Pseudomonas putida* strain able to grow in the presence of high concentrations of aromatic hydrocarbons. J. Bacteriol. **177**:3911-3916.
- Ramos, J.L., E. Duque, M.T. Gallegos, P. Godoy, M.I. Ramos-González, A. Rojas, W. Terán y A. Segura. 2002. Mechanisms of solvent tolerance in bacteria. Annu. Rev. Microbiol. **56**:743-768.
- Ramos, J.L., E. Duque, P. Godoy y A. Segura. 1998. Efflux pumps involved in toluene tolerance in *Pseudomonas putida* DOT-T1E. J. Bacteriol. **180**:3323-3329.
- Ramos-González, M.I., M. Olson, A.A. Gatenby, G. Mosqueda, M. Manzanera, M.J. Campos, S. Vílchez y J.L. Ramos. 2002. Cross-regulation between a novel two-component signal transduction system for catabolism of toluene in *Pseudomonas mendocina* and the TodST system from *Pseudomonas putida*. J. Bacteriol. **184**:7062-7067.
- Ramos-González, M.I., P. Godoy, M. Alaminos, A. Ben-Bassat y J.L. Ramos. 2001. Physiological characterization of *Pseudomonas putida* DOT-T1E tolerance to *p*-hydroxybenzoate. Appl. Environ. Microbiol. **67**:4338-4341.
- Rekkert, R.F. y H.M. de Kort. 1979. The hydrophobic fragmental constant: an extension to a 1000 data point set. Eur. J. Med. Chem. **14**:479-488.

- Reynolds, P.R., G.P. Mottur y C. Bradbeer.** 1980. Transport of vitamin B₁₂ in *Escherichia coli*. Some observations on the roles of the gene products of *btuC* and *tonB*. *J. Biol. Chem.* **255**:4313-4319.
- Ribbons, D.W.** 1970. Stoichiometry of O-demethylase activity in *Pseudomonas aeruginosa*. *FEBS Lett.* **8**:101-104.
- Ribbons, D.W.** 1971. Requirement of to protein fractions for O-demethylase activity in *Pseudomonas testosteroni*. *FEBS Lett.* **12**:161-165.
- Rodríguez-Herva, J.J.** 1999. Caracterización molecular del gen *oprL* de *Pseudomonas putida*. Tesis doctoral. Universidad de Granada, Granada, España.
- Rodríguez-Herva, J.J. y J.L. Ramos.** 1996. Characterization of an OprL null mutant of *Pseudomonas putida*. *J. Bacteriol.* **178**:5836-5840.
- Rodríguez-Herva, J.J., M.I. Ramos-González y J.L. Ramos.** 1996. The *Pseudomonas putida* peptidoglycan-associated outer membrane lipoprotein is involved in maintenance of the integrity of the cell envelope. *J. Bacteriol.* **178**:1699-1706.
- Rojas, A., E. Duque, G. Mosqueda, G. Golden, A. Hurtado, J.L. Ramos y A. Segura.** 2001. Three efflux pumps are required to provide efficient tolerance to toluene in *Pseudomonas putida* DOT-T1E. *J. Bacteriol.* **183**:3967-3973.
- Rose, A.H.** 1989. Influence of the environment on microbial lipid composition, p. 255-278. En C. Ratledge y S.G. Wilkinson (ed.), *Microbial lipids*, vol. 2. Academic Press, Ltd., London.
- Roychoudhury, S., K. Sakai y A.M. Chakrabarty. 1992. AlgR2 is an ATP/GTP-dependent protein kinase involved in alginate synthesis by *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**:2659-2663.
- Saito, T., D. Duly y R.J. Williams.** 1991. The histidines of the iron-uptake regulation protein, Fur. *Eur. J. Biochem.* **197**:39-42.
- Salanoubat, M. et al.** 2002. Genome sequence of the plant pathogen *Ralstonia solanacearum*. *Nature* **415**:497-502.
- Sambrook, J., E.F. Fritsch y T. Maniatis.** 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Sandermann, H.** 1983. Lipid solvation and kinetics cooperativity of functional membrane proteins. *TIBS* **8**:408-411.
- Schlichtman, D., A. Kavanaugh-Black, S. Shankar y A.M. Chakrabarty.** 1994. Energy metabolism and alginate biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*: role of the tricarboxylic acid cycle. *J. Bacteriol.* **176**:6023-6029.
- Schöffner, H. y V. Braun.** 1989. Transport across the outer membrane of *Escherichia coli* via the FhuA receptor is regulated by the TonB protein of the cytoplasmic membrane. *Mol. Gen. Genet.* **217**:378-383.
- Screen, J., E. Moya, I.S. Blagbrough y A.W. Smith.** 1995. Iron uptake in *Pseudomonas aeruginosa* mediated by N-(2,3-dihydroxybenzoyl)-L-serine and 2,3-dihydroxybenzoic acid. *FEMS Microbiol. Lett.* **127**:145-149.
- Segura, A., E. Duque, G. Mosqueda, J.L. Ramos y F. Junker.** 1999a. Multiple responses of gram-negative bacteria to organic solvents. *Environ. Microbiol.* **1**:191-198.
- Segura, A., P.V. Bünz, D.A. D'Argenio y L.N. Ornston.** 1999b. Genetic analysis of a chromosomal region containing *vanA* and *vanB* genes required for conversion of either ferulate or vanillate to protocatechuate in *Acinetobacter*. *J. Bacteriol.* **181**:3494-3504.

- Seliger, S.S., A.R. Mey, A.M. Valle y S.M. Payne. 2001. The two TonB systems of *Vibrio cholerae*: redundant and specific functions. *Mol. Microbiol.* **39**:801-812.
- Shafer, W.M., X.D. Qu, A.J. Waring y R.I. Lehrer. 1998. Modulation of *Neisseria gonorrhoeae* susceptibility to vertebrate antibacterial peptides due to a member of the resistance/nodulation/division efflux pump family. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**:1829-1833.
- Shine, J. y L. Dalgarno. 1974. The 3'-terminal sequence of *Escherichia coli* 16S ribosomal RNA: complementarity to nonsense triplets and ribosome binding sites. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **71**:1342-1346.
- Shinitzky, M. 1982. Membrane fluidity and cellular functions, p. 1-51. *En: M. Shinitzky (ed.), Physiology of membrane fluidity, vol. 1.* CRC Press, Boca Raton, Fla.
- Shiotsu, Y., M. Samejima, N. Habu y T. Yoshimoto. 1989. Enzymatic conversion of stilbenes from the inner bark of *Picea glehnii* into aromatic aldehydes. *Mukuzai Gakkaishi* **35**:826-831.
- Sikkema, J., B. Poolman, W.N. Konings y J.A.M. de Bont. 1992. Effects of the membrane action of tetralin on the functional and structural properties of artificial and bacterial membranes. *J. Bacteriol.* **174**:2986-2992.
- Sikkema, J., F.J. Weber, H.J. Heipieper y J.A.M. de Bont. 1994b. Cellular toxicity of lipophilic compounds: mechanisms, implications, and adaptations. *Biocatalysis* **10**:113-122.
- Sikkema, J., J.A.M. de Bont y B. Poolman. 1994a. Interactions of cyclic hydrocarbons with biological membranes. *J. Biol. Chem.* **269**:8022-8028.
- Sikkema, J., J.A.M. de Bont y B. Poolman. 1995. Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. *Microbiol. Rev.* **59**:201-222.
- Simon, R., B. Höte, B. Klaoke y B. Kosier. 1991. Isolation and characterization of insertion sequence elements from Gram-negative bacteria by using new broad-host-range positive selection vectors. *J. Bacteriol.* **173**:1502-1508.
- Simpson, W., T. Olczak y C.A. Genco. 2000. Characterization and expression of HmuR, a TonB-dependent hemoglobin receptor of *Porphyromonas gingivalis*. *J. Bacteriol.* **182**:5737-5748.
- Skare, J.T., B.M.M. Ahmer, C.L. Seachord, R.P. Darveau, y K. Postle. 1993. Energy transduction between membranes: TonB, a cytoplasmic membrane protein, can be chemically cross-linked in vivo to the outer membrane receptor FepA. *J. Biol. Chem.* **268**:16302-16-308.
- Skare, J.T., S.K. Roof y K. Postle. 1989. A mutation in the amino terminus of a hybrid TrpC-TonB protein relieves overproduction lethality and results in cytoplasmic accumulation. *J. Bacteriol.* **171**:4442-4447.
- Smith, A.W., D.R. Poyner, H.K. Hughes y P.A. Lambert. 1994. Siderophore activity of myo-inositol hexakisphosphate in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **176**:3455-3459.
- Sokol, P.A. 1986. Production and utilization of pyochelin by clinical isolates of *Pseudomonas cepacia*. *J. Clin. Microbiol.* **23**:560-562.
- Sokol, P.A. y D.E. Woods. 1983. Demonstration of an iron siderophore-binding protein in the outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect. Immun.* **40**:665-669.
- Sokol, P.A., C.J. Lewis y J.J. Dennis. 1992. Isolation of a novel siderophore from *Pseudomonas cepacia*. *J. Med. Microbiol.* **36**:184-189.
- Stanier, R.Y. y L.N. Ornston. 1973. The β -ketoacid pathway. *Adv. Microb. Physiol.* **9**:89-151.

- Staskawicz, B., D. Dahlbeck, N. Keen y C. Napoli.** 1987. Molecular characterization of cloned avirulence gene from race 0 and race 1 of *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea*. *J. Bacteriol.* **169**:5789-5794.
- Stein, J.M., M.E. Tourtellotte, J.C. Reinert, R.N. McElhaney y R.L. Rader.** 1969. Calorimetric evidence for the liquid-crystalline state of lipids in a biomembrane. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **63**:104-109.
- Stojiljkovic, I. y K. Hantke.** 1995. Functional domains of the *Escherichia coli* ferric uptake regulator protein (Fur). *Mol. Gen. Genet.* **247**:199-205.
- Stojiljkovic, I. y N. Srinivasan.** 1997. *Neisseria meningitidis* *tonB*, *exbB*, and *exbD* genes: Ton-dependent utilization of protein-bound iron in *Neisseriae*. *J. Bacteriol.* **179**:805-812.
- Stojiljkovic, I., A.J. Baumler y K. Hantke.** 1994. Fur regulon in Gram-negative bacteria: identification and characterization of new iron-regulated *Escherichia coli* genes by a Fur titration assay. *J. Mol. Biol.* **236**:531-545.
- Sturgis, J.N.** 2001. Organization and evolution of the *tol-pal* gene cluster. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **3**:113-122.
- Sukupolvi, S., C.D. O'Connor y M.F. Edwards.** 1986. The TraT protein is able to normalize the phenotype of a plasmid-carried permeability mutation of *Salmonella typhimurium*. *J. Gen. Microbiol.* **132**:2079-2085.
- Switzer, R.C.III, C.R. Merrill y S. Shifrin.** 1979. A highly sensitive silver stain for detecting proteins and peptides in polyacrilamide gels. *Anal. Biochem.* **98**:231.
- Tadasa, K. y H. Kayahara.** 1983. Initial step of eugenol degradation pathway of a microorganism. *Agric. Biol. Chem.* **47**:2639-2640.
- Takeuchi, Y. y H. Nikaido.** 1981. Persistence of segregated phospholipid domains in the phospholipid-lipopolysaccharide mixed bilayers: Studies with spin-labelled phospholipids. *Biochem.* **20**:523-529.
- Tasake, H., H. Nitani, K. Hoshino y T. Otani.** 2000. *Infect. Immun.* **68**:4498.
- Tomb, J.F. et al.** 1997. The complete genome sequence of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature* **388**:539-547.
- Toms, A. y J.M. Wood.** 1970. The degradation of *trans*-ferulic acid by *Pseudomonas acidovorans*. *Biochemistry* **9**:337-343.
- Torres, A.G. y S.M. Payne.** 1997. Haem iron-transport system in enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Mol. Microbiol.* **23**:825-833.
- Traub, I., S. Gaisser y V. Braun.** 1993. Activity domains of the TonB protein. *Mol. Microbiol.* **8**:409-423.
- Trieu-Cuot, P. y P. Courvalin.** 1983. Nucleotide sequence of the *Streptococcus faecalis* plasmid gene encoding the 3'-aminoglycoside phosphotransferase type III. *Gene* **23**:331-341.
- Tsay, J.T., W. Oh, L.T.J.S. Jackowski y C.O. Rock.** 1992. Isolation and characterization of the β -ketoacyl-acyl carrier protein synthetase III gene (*fabH*) from *Escherichia coli* K-12. *J. Biol. Chem.* **267**:6807-6814.
- Tsolis, R.M., A.J. Baumler, I. Stojiljkovic y F. Heffron.** 1995. Fur regulation of *Salmonella typhimurium*: identification of new iron-regulated genes. *J. Bacteriol.* **177**:4628-4637.
- Tuckman, M. y M.S. Osburne.** 1992. In vivo inhibition of TonB-dependent processes by a TonB box consensus pentapeptide. *J. Bacteriol.* **174**:320-323.

- Vaara, M. 1992. Agents that increase the permeability of the outer membrane. *Microbiol. Rev.* **56**:395-411.
- van der Helm, D. 1998. The physical chemistry of bacterial outer-membrane siderophore receptor proteins. *Met. Ions Biol. Syst.* **35**:355-401.
- Van Haute, E., H. Joos, M. Maes, G. Warren, M. Van Montagu y J. Schell. 1983. Intergenic transfer and exchange recombination of restriction fragments cloned in pBR322: a novel strategy for the reversed genetics of Ti plasmids of *Agrobacterium tumefaciens*. *EMBO J.* **2**:411-417.
- van Vliet, A.H.M., M.L.A. Baillon, C.W. Penn y J.M. Ketley. 1999. *Campylobacter jejuni* contains two *fur* homologs: characterization of iron-responsive regulation of peroxide stress defense genes by the PerR repressor. *J. Bacteriol.* **181**:6371-6376.
- van Way, S.M., E.R. Hosking, T.F. Braun y M.D. Manson. 2000. Mot protein assembly into the bacterial flagellum: a model based on mutational analysis of the *motB* gene. *J. Mol. Biol.* **297**:7-24.
- Vassinova, N. y D. Kozyrev. 2000. A method for direct cloning of Fur-regulated genes: identification of seven new Fur-regulated loci in *Escherichia coli*. *Microbiology* **146**:3171-3182.
- Velayudhan, J., N.J. Hughes, A.A. McColm, J. Bagshaw, C.L. Clayton, S.C. Andrews y D.J. Kelly. 2000. Iron acquisition and virulence in *Helicobacter pylori*: a major role for FeoB, a high-affinity ferrous iron transporter. *Mol. Microbiol.* **37**:274-286.
- Venturi, V., C. Ottenvanger, J. Leong y P.J. Weisbeek. 1993. Identification and characterization of a siderophore regulatory gene (*prfA*) of *Pseudomonas putida* WCS358: homology to the alginate regulatory gene *algQ* of *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol. Microbiol.* **10**:63-73.
- Venturi, V., C. Ottevanger, M. Bracke, y P. Weisbeek. 1995. Iron regulation of siderophore biosynthesis and transport in *Pseudomonas putida* WCS358: involvement of a transcriptional activator and of the Fur protein. *Mol. Microbiol.* **15**:1081-1093.
- Venturi, V., F. Zennaro, G. Degrassi, B.C. Okeke y C.V. Bruschi. 1998. Genetics of ferulic acid bioconversion to protocatechuic acid in plant-growth-promoting *Pseudomonas putida* WCS358. *Microbiology* **144**:965-973.
- Vermüe, M., J. Sikkema, A. Verheul, R. Bakker y J. Tramper. 1993. Toxicity of homologous series of organic solvents for the Gram-positive bacteria *Arthrobacter* and *Nocardia* sp. and the Gram-negative bacteria *Acinetobacter* and *Pseudomonas* sp. *Biotech. Bioeng.* **42**:747-758.
- Vieira, J. y J. Messing. 1982. The pUC plasmids, and M13mp7-derived system for insertion mutagenesis and sequencing with synthetic universal primers. *Gene* **19**:259-268.
- Visca, P., A. Ciervo, V. Sanfilippo y N. Orsi. 1993. Iron-regulated salicylate synthesis by *Pseudomonas* spp. *J. Gen. Microbiol.* **139**:1995-2001.
- Visca, P., G. Colotti, L. Serino, D. Verzili, N. Orsi y E. Chiancone. 1992b. Metal regulation of siderophore synthesis in *Pseudomonas aeruginosa* and functional effects of siderophore-metal complexes. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**:2886-2893.
- Viswanatha, T., E. W. Szczepan y G.J. Murray. 1987. Biosynthesis of aerobactin: enzymological and mechanistic studies, p.117-131. *En* G. Winkelmann, D. van der Helm, y J.B. Neilands (ed.), *Iron Transport in Microbes, Plants and Animals*. VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, Germany.
- von Heijne, G. 1986. A new method for predicting signal sequence cleavage sites. *Nucleic Acids Res.* **14**:4683-4690.
- Vostrov, A.A., O.A. Vostrukhina, A.N. Svarchevsky y V.N. Rybchin. 1996. Proteins responsible for

lysogenic conversion caused by coliphages N15 and ϕ 80 are highly homologous. *J. Bacteriol.* **178**:1484-1486.

Wagner, K.U., B. Masepohl y E.K. Pistorius. 1995. The cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain PCC 7942 contains a second alkaline phosphatase encoded by *phoV*. *Microbiology* **141**:3049-3058.

Wandersman, C. e I. Stojiljkovic. 2000. Bacterial heme sources: the role of heme, hemoprotein receptors and hemophoros. *Curr. Opin. Microbiol.* **3**:215-220.

Warren, G.J.; Twigg, A.J. y Sherratt, D.J. 1978. ColE1 plasmid mobility and relaxation complex. *Nature* **274**: 259-261.

Watanabe, N.A., T. Nagasu, K. Katsu y K. Kitoh. 1987. E-0702, a new cephalosporin, is incorporated into *Escherichia coli* cells via the TonB-dependent iron transport system. *Antimicrob. Agents Chemother.* **31**:497-504.

Weber, F.J. 1995. Toluene: biological waste-gas treatment, toxicity and microbial adaptation. Tesis Doctoral. Universidad de Wageningen. Holanda.

Weber, F.J. y J.A.M. de Bont. 1996. Adaptation mechanisms of microorganisms to the toxic effects of organic solvents on membranes. *Biochim. Biophys. Acta* **1286**:225-245.

Weber, F.J., K.C. Hage y J.A.M. de Bont. 1995. Growth of the fungus *Cladosporium sphaerospermum* with toluene as the sole carbon and energy source. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**:3562-3566.

Weber, F.J., L.P. Ooijkaas, R.M.W. Schemen, S. Hartmans y J.A.M. de Bont. 1993. Adaptation of *Pseudomonas putida* S12 to high concentrations of styrene and other organic solvents. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**:3502-3504.

Weber, F.J., S. Isken y J.A.M. de Bont. 1994. *cis-trans* isomerization of fatty acids as a defense mechanism of *Pseudomonas putida* strains to toxic concentrations of toluene. *Microbiology* **140**:2013-2017.

Weber, M., K. Taraz, H. Budzikiewicz, V. Geoffroy y J.M. Meyer. 2000. The structure of a pyoverdine from *Pseudomonas* sp. CFML 96.188 and its relation to other pyoverdines with a cyclic C-terminus. *Biometals* **13**:301-309.

Webster, R.E. 1991. The *tol* gene products and the import of macromolecules into *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **5**:1005-1011.

White, A., X. Ding, J.C. van der Speck, J.R. Murphy y D. Ringe. 1998. Structure of the metal-ion-activated diphteria toxin repressor/tox operator complex. *Nature* **394**:502-506.

White, D.G., J.D. Goldman, B. Demple y S.D. 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**:6122-6126.

Whited, G.M. y D.T. Gibson. 1991a. Toluene-4-monooxygenase, a three-component enzyme system that catalyzes the oxidation of toluene to *p*-cresol in *Pseudomonas mendocina* KR1. *J. Bacteriol.* **173**:3010-3016.

Whited, G.M. y D.T. Gibson. 1991b. Separation and partial characterization of the enzymes of the toluene-4-monooxygenase catabolic pathway in *Pseudomonas mendocina* KR1. *J. Bacteriol.* **173**:3017-3020.

Whited, G.M., W.R. McCombie, L.D. Kwart y D.T. Gibson. 1986. Identification of *cis*-diols as intermediates in the oxidation of aromatic acids by a strain of *Pseudomonas putida* that contains a TOL plasmid. *J. Bacteriol.* **166**:1028-1039.

Widera, G., Gautier, F., Lindenmaier, W. y Collins, J. 1968. The expression of tetracycline resistance

after insertion of foreign DNA fragments between the *EcoRI* and *HindIII* sites of the plasmid cloning vector pBR322. *Mol. Gen. Genet.* **163**:301-305.

Wiggerich, H.G., B. Klauke, R. Köplin, U.B. Priefer y A. Pühler. 1997. Unusual structure of the *tonB-exb* DNA region of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*: *tonB*, *exbB*, and *exbD1* are essential for ferric iron uptake, but *exbD2* is not. *J. Bacteriol.* **179**:7103-7110.

Witty, M., C. Sanz, A. Shah, J.G. Grossmann, K. Mizuguchi, R.N. Perham y B. Luisi. 2002. Structure of the periplasmic domain of *Pseudomonas aeruginosa* TolA: evidence for an evolutionary relationship with the TonB transporter protein. *EMBO J.* **21**:4207-4218.

Wong, K.K.Y. y R.E.W. Hancock. 2000. *J. Bacteriol.* **182**:2402.

Woodcock D.M., P.J.Crowther, J. Doherty, S. Jefferson, E. DeCruz, M. Noyer-Weidner, S.S. Smith, M.Z. Michael y M.W. Graham (1989) Quantitative evaluation of *Escherichia coli* host strains for tolerance to cytosine methylation in plasmid and phage recombinants. *Nucleic Acids Res.* **17**:3469-78.

Woodruff, W.A. y R.E.W. Hancock. 1989. *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane protein F: structural role and relationship to the *Escherichia coli* OmpA protein. *J. Bacteriol.* **171**:3304-3309.

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

Wu, S.H. y H.M. McConnell. 1975. Phase separations in phospholipid membranes. *Biochem.* **14**:847-854.

Wubbolts, P. y K.N. Timmis. 1990. Biotransformation of substituted benzoates to the corresponding *cis*-diols by an engineered strain of *Pseudomonas oleovorans* producing the TOL plasmid specified enzyme toluate-1,2-dioxygenase. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**:569-571.

Xian-Zhi, L., L. Zhang y K. Poole. 1998. Role of the multidrug efflux systems of *Pseudomonas aeruginosa* in organic solvent tolerance. *J. Bacteriol.* **180**:2987-2991.

Young, G.M. y K. Postle. 1994. Repression of *tonB* transcription during anaerobic growth requires Fur binding at the promoter and a second factor binding upstream. *Mol. Microbiol.* **11**:943-954.

Zgurskaya, H.I. y H. Nikaido. 1999. AcrA is a highly asymmetric protein capable of spanning the periplasm. *J. Mol. Biol.* **285**:409-420.

Zgurskaya, H.I. y H. Nikaido. 2000. Multidrug resistance mechanisms: drug efflux across two membranes. *Mol. Microbiol.* **37**:219-225.

Zhao, Q. y K. Poole. 2000. A second *tonB* gene in *Pseudomonas aeruginosa* is linked to the *exbB* and *exbD* genes. *FEMS Microbiol. Lett.* **184**:127-132.

Zhao, Q., X.-Z. Li, A. Mistry, R. Srikumar, L. Zhang, O. Lomovskaya y K. Poole. 1998. Influence of the TonB energy-coupling protein on efflux-mediated multidrug resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **42**:2225-2231.

Zylstra, G.J., R.H. Olsen y D.P. Ballou. 1989. Cloning, expression, and regulation of the *Pseudomonas cepacia* protocatechuate 3,4-dioxygenase genes. *J. Bacteriol.* **171**:5907-5014.

Biblioteca Universitaria de Granada



01066950