

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
**Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I**



**AVANCES EN EL METABOLISMO DEL ÁCIDO  
FENILACÉTICO EN “PSEUDOMONAS sp. Y2”:  
APROXIMACIÓN GENÉTICA Y PROTEÓMICA.**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR**  
**PRESENTADA POR**

**Julio Miguel Rubio Aranda**

Bajo la dirección de los doctores

José Luis García López  
Julián Perera González

**Madrid, 2009**

- ISBN: 978-84-692-7197-1

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I**



**AVANCES EN EL METABOLISMO DEL  
ÁCIDO FENILACÉTICO  
EN *Pseudomonas* sp. Y2: APROXIMACIÓN  
GENÉTICA Y PROTEÓMICA**

**MEMORIA PRESENTADA POR Julio Miguel Rubio Aranda**

**PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR**

Bajo la dirección de los Doctores

José Luis García López y Julián Perera González

Autor

Vº Bº de los Directores de la Tesis

José Luis García López  
Profesor de Investigación  
Centro de Investigaciones Biológicas  
(CSIC)

Julio Miguel Rubio Aranda

Julián Perera González  
Profesor Titular de Universidad  
Universidad Complutense de Madrid

**Madrid, 2009**





**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I**

**AVANCES EN EL METABOLISMO DEL**

**ÁCIDO FENILACÉTICO EN**

***Pseudomonas* sp. Y2:**

**APROXIMACIÓN GENÉTICA Y**

**PROTEÓMICA**

**TESIS DOCTORAL**

**JULIO MIGUEL RUBIO ARANDA**

**DIRECTORES**

**Dr. JOSÉ LUIS GARCÍA LÓPEZ**

**Dr. JULIÁN PERERA GONZÁLEZ**

**MADRID, 2009**







---

# ÍNDICE

<b>1. Abreviaturas</b> .....	<b>1</b>
<b>2. Introducción</b> .....	<b>7</b>
2.1. Biodegradación de compuestos aromáticos .....	7
2.1.1. Rutas de degradación de compuestos aromáticos.....	8
2.1.2. Rutas catabólicas anaerobias.....	9
2.1.3. Rutas catabólicas aerobias.....	10
2.1.4. Rutas híbridas.....	13
2.2. Degradación del ácido fenilacético.....	14
2.2.1. Ruta enzimática del catabolismo del AFA.....	15
2.3. Organización genética de la ruta <i>paa</i> .....	19
2.4. Regulación de rutas de degradación de compuestos aromáticos.....	20
2.5. Regulación de la ruta catabólica del AFA.....	26
2.5.1. Papel regulador de PaaY.....	28
2.6. Género <i>Pseudomonas</i> .....	29
2.7. <i>Pseudomonas</i> sp. Y2.....	30
<b>3. Objetivos</b> .....	<b>35</b>
<b>4. Material y métodos</b> .....	<b>39</b>
4.1. Estirpes bacterianas.....	39
4.2. Plásmidos.....	40
4.3. Oligonucleótidos.....	42
4.4. Medios, conservación y condiciones de cultivo de microorganismos.....	45
4.4.1. Conservación.....	45
4.4.2. Medios de cultivo.....	45
4.4.3. Procedimientos de cultivo.....	46
4.4.4. Vitaminas.....	46
4.4.5. Antibióticos.....	47
4.4.6. Suministro de compuestos aromáticos en fase gaseosa.....	47

4.4.7. Curvas de crecimiento.....	48
<b>4.5. Procedimientos de transferencia genética. ....</b>	<b>48</b>
4.5.1. Transformación bacteriana mediante choque térmico. ....	48
4.5.2. Electrotransformación.....	49
4.5.3. Conjugación. ....	50
4.5.4. Construcción de mutantes por doble recombinación. ....	50
4.6.2. Aislamiento de DNA total.....	52
4.6.3. Purificación de fragmentos de DNA tras electroforesis.....	52
4.6.4. Aislamiento de RNA.....	53
4.6.5. Cuantificación de ácidos nucleicos.....	53
4.6.6. Modificación de ácidos nucleicos.....	54
<b>4.7. Síntesis de ácidos nucleicos.....</b>	<b>55</b>
4.7.1. Amplificación de fragmentos de DNA mediante PCR. ....	55
4.7.2. Oligonucleótidos cebadores. ....	56
4.7.3. Síntesis de cDNA.....	56
4.7.4. Secuenciación de DNA. ....	57
<b>4.8. Preparación de extractos celulares. ....</b>	<b>57</b>
4.8.1. Obtención de extractos proteicos.....	57
4.8.2. Determinación de la concentración de proteínas. ....	58
<b>4.9. Técnicas electroforéticas. ....</b>	<b>58</b>
4.9.1. Electroforesis de DNA en geles de agarosa. ....	58
4.9.2. Electroforesis de RNA en geles de agarosa.....	59
4.9.3. Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida (1DE).....	60
4.9.4. Separación de las proteínas por electroforesis bidimensionales (2DE) .....	60
<b>4.10. Transferencia e hibridación de ácidos nucleicos. ....</b>	<b>65</b>
4.10.1. Marcaje de sondas.....	65
4.10.2. <i>Northern blot</i> . ....	66
<b>4.11. Análisis de los metabolitos acumulados en el medio de cultivo. ...</b>	<b>66</b>
4.11.1. Ensayo de Gibbs. ....	66
<b>4.12. Ensayos enzimáticos.....</b>	<b>67</b>
4.12.1. Medida de actividad $\beta$ -galactosidasa. ....	67
<b>4.13. Análisis informático de secuencias de ácidos nucleicos.....</b>	<b>68</b>
4.13.1. Visualización y corrección de los cromatogramas.....	68
4.13.2. Ensamblaje de secuencias. ....	68

4.13.3. Mapas de restricción .....	68
4.13.4. Localización de marcos abiertos de lectura.....	68
4.13.5. Predicción de genes y operones.....	69
4.13.6. Plegamiento de secuencias de RNA.....	69
4.13.7. Búsqueda de secuencias repetidas y palindrómicas.....	69
4.13.8. Comparación y búsqueda de secuencias en el DNA.....	69
<b>4.14. Análisis informático de proteínas.....</b>	<b>70</b>
4.14.1. Escaneo de geles 2-DE y recorte de manchas.....	70
4.14.2. Análisis de las manchas seleccionadas.....	70
4.14.3. Identificación de las proteínas.....	70
4.14.4. Criterios de asignación en la identificación de proteínas.....	72
4.14.5. Bases de datos en línea consultadas.....	72
4.14.6. Comparación de secuencias con las bases de datos (SwissProt y trEMBL) y alineamiento de proteínas.....	73
<b>5. Resultados.....</b>	<b>77</b>
5.1 Estudio de la transcripción de los genes del <i>cluster paa1</i> en <i>Pseudomonas</i> sp. Y2.....	77
5.1.1. Análisis de la organización transcripcional de la región génica <i>paa1</i> en <i>Pseudomonas</i> sp. Y2.....	77
5.2. Estudio de promotores del <i>cluster paa1</i> de <i>Pseudomonas</i> sp. Y2 en el sistema heterólogo de <i>Escherichia coli</i> AF141.....	89
5.3. Estudio de la expresión de proteínas. Proteómica sobre <i>Pseudomonas</i> sp. Y2.....	99
5.3.1. Separación electroforética de proteínas, comparación de imágenes 2D y análisis de manchas.....	99
5.3.2. Comparaciones de manchas procedentes de diferentes estirpes crecidas en distintos medios.....	103
5.4. Funcionalidad del gen <i>paaY</i> de <i>Pseudomonas</i> sp. Y2.....	105
5.4.1. Análisis de comparación de secuencia de la proteína PaaY.....	105
5.4.2. Construcción y estudio de mutantes de <i>Pseudomonas</i> sp. Y2.....	106
<b>6. Discusión.....</b>	<b>149</b>
6.1. Organización transcripcional del <i>cluster paa1</i> de <i>Pseudomonas</i> sp. Y2.....	149
6.2. Promotores de la región <i>paa1</i> de <i>Pseudomonas</i> sp. Y2.....	156
6.2.1. Actividad de las regiones promotoras de <i>paa1</i> de <i>Pseudomonas</i> sp. Y2 en <i>E. coli</i> .....	158

6.2.2. Actividad de las regiones promotoras de <i>paal</i> en <i>Pseudomonas</i> sp. Y2T2.....	159
6.3. Proteoma parcial de <i>Pseudomonas</i> sp. Y2 y expresión de proteínas Paa. ....	161
6.3.1. Detección de isoformas.....	165
6.3.2. Proteínas de <i>Pseudomonas</i> sp. Y2 identificadas.....	167
6.4. Estudio de la funcionalidad de PaaY. ....	175
<b>7. Conclusiones .....</b>	<b>187</b>
<b>8. Apéndice .....</b>	<b>191</b>
8.1. Tablas de proteínas.....	191
8.2. Figuras de geles 2-DE. ....	215
<b>9. Bibliografía .....</b>	<b>269</b>

*Abreviaturas*

---

---



# 1. ABREVIATURAS

2-HPA	ácido 2-hidrosifenilacético
2-DE	electroforesis bidimensional
A <sub>260</sub>	absorbancia a 260nm
A <sub>280</sub>	absorbancia a 280nm
aa	aminoácido(s)
Abs <sub>(nm)</sub>	absorbancia medida a una determinada longitud de onda (en nanómetros)
ADP	adenosina-5'-difosfato
AFA	ácido fenilacético
Ap	ampicilina
APS	persulfato amónico
ATP	adenosina -5'-trifosfato
ATPasa	ATP fosfohidrolasa
BLAST	herramienta de búsqueda de alineamiento local básico ( <i>Basic Local Aligment Search Tool</i> )
BSA	albúmina de suero bovino
BTEX	benceno, tolueno, etilbenceno y xileno
cAMP	adenosina monofosfato cíclico
cDNA	DNA complementario
CHAPS	3-[(3-colamidopropil)dimetilamonio]-1-propanosulfonato
Cm	cloramfenicol
CoA	coenzima A
Crc	proteína de control de la represión por catabolito ( <i>catabolite repression control</i> )
CRP	proteína receptora de cAMP ( <i>cAMP receptor protein</i> )
C-terminal	carboxilo terminal
Δ	delección
Da	dalton(s)
dATP	desoxiadenosina-5'-trifosfato
dCTP	desoxicitosina-5'-trifosfato
DEPC	dietilpirocarbonato
dG	energía libre o de Gibbs
dGTP	desoxiguanosina-5'-trifosfato
DIG	digoxigenina
DNA	ácido desoxirribonucleico
DNasa	desoxirribonucleasa
dNTPs	desoxirribonucleótidos-5'-trifosfato
DO <sub>420nm</sub>	densidad óptica a 420nm
DO <sub>550nm</sub>	densidad óptica a 550nm
DO <sub>600nm</sub>	densidad óptica a 600nm
DO <sub>610nm</sub>	densidad óptica a 610nm
DTT	ditiotreitól
dTTP	desoxitimidina-5'-trifosfato
EDTA	ácido etilendiaminotetraacético
FA-CoA	fenilacetil coenzima A

FAD	dinucleótido de flavina y adenina
FADH	dinucleótido de flavina y adenina reducido
FNR	Ferredoxina-NADP <sup>+</sup> reductasa
Gm	gentamicina
GO	clasificación ontológica de genes ( <i>Gene Ontology</i> )
GTP	guanosina-5'-trifosfato
GTPasa	GTP fosfohidrolasa
h	hora(s)
HTH	dominio hélice-giro-hélice ( <i>helix-turn-helix</i> )
IEE	IsoElectroEnfoque
IHF	factor de integración del huésped ( <i>integration host factor</i> )
IMP	inosina-5'-monofosfato
IPTG	isopropil-b-D-tiogalactósido
kb	kilobases
kcal	kilocalorías
kDa	kiloDalton
Km	kanamicina
λ	fago lambda
λ <sub>(nm)</sub>	longitud de onda en nanómetros
LB	medio Luria-Bertani
LβH	domino mano izquierda paralela a beta hélice ( <i>Lef-handed parallel β-Helix</i> )
<i>m-</i>	<i>meta-</i>
M63	medio mínimo 63
M9	medio mínimo 9
MALDI	desorción/ionización asistida por matriz ( <i>Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization</i> )
MPa	megapascal(es)
mRNA	RNA mensajero
MS	espectrometría de masas ( <i>Mass Spectrometry</i> )
MS/MS	espectrometría de masas en tándem
NAD <sup>+</sup>	dinucleótido de nicotinamida y adenina
NADH	dinucleótido de nicotinamida y adenina reducido
NADP <sup>+</sup>	dinucleótido fosfato de nicotinamida y adenina
NADPH	dinucleótido fosfato de nicotinamida y adenina reducido
Nal	ácido nalidíxico
nt	nucleótido(s)
N-terminal	amino terminal
NTPs	ribonucleótidos-5'-trifosfato
<i>o-</i>	<i>orto-</i>
OCDE	Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico
ONPG	<i>o</i> -nitrofenoltiogalactósido
ORF	marco abierto de lectura
<i>p-</i>	<i>para-</i>
p/v	peso / volumen
Pa	pascal(es)
PAGE	electroforesis en gel de poliacrilamida

pb	par(es) de bases
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
PEP	fosfoenolpiruvato
pI	punto isoelectrico
Pi	fosfato inorgánico
Pip	piperacilina
PM	peso molecular
PPi	pirofosfato inorgánico
(p)ppGpp	polifosfatos de guanosina: pppGpp, pentafofato de guanosina; ppGpp, tetrafofato de guanosina
PTS	sistema de fosfoenolpiruvato fosfotransferasa ( <i>phosphotransferase system</i> )
R	resistencia
RBS	sitio de unión al ribosoma
REP	secuencia palindrómica extragénica repetitiva
Rif	rifampicina
RNA	ácido ribonucleico
RNasa	ribonucleasa
rpm	revoluciones por minuto
rRNA	RNA ribosómico
RT	transcriptasa reversa
RT-PCR	PCR acoplada a una reacción de transcripción reversa
s	sensibilidad
$\sigma$	factor sigma de la RNA polimerasa
sales MT	sales de metales de transición
SDS	dodecilsulfato sódico
Sm	estreptomicina
SSC	tampón citrato sódico salino
STY	estireno
TAE	solución Tris, ácido acético y EDTA
TBE	solución Tris, ácido bórico y EDTA
Tc	tetraciclina
TCA	ciclo de los ácidos tricarbósílicos ( <i>tricarboxilic acid cycle</i> )
Tn	transposón
TNT	trinitrotolueno
TOF	detector de iones acoplado al MALDI ( <i>Time-Of-Flight</i> )
Tris	trishidroximetilaminometano
tRNA	RNA transferente
U	unidad(es) de actividad enzimática
ufc	unidades formadoras de colonias
v/v	volumen / volumen
X-Gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-galactopiranosido



## *Introducción*

---

---



## 2. INTRODUCCIÓN.

### 2.1. Biodegradación de compuestos aromáticos

El actual crecimiento demográfico junto con el notable desarrollo industrial han provocado a lo largo de los últimos años una gran acumulación de sustancias contaminantes en el medio ambiente (OCDE, 1994), conduciendo a graves problemas en el equilibrio de los ecosistemas y, consecuentemente, en la salud humana debido a su gran actividad biológica, tóxica y en ocasiones mutagénica o carcinogénica (La Voie y col., 1988; Willems y col., 1992). Muchos de estos contaminantes son compuestos sintéticos de origen industrial que presentan unas estructuras químicas que nunca han estado presentes en la biosfera (xenobióticos), lo que hace que su degradación sea lenta, cuando no imposible (Pieper y Reineke, 2000). Otros son compuestos naturales que están siendo extraídos de sus depósitos y convertidos en una forma biodisponible que resulta tóxica para los seres vivos, como es el caso de los hidrocarburos de los combustibles fósiles y de los metales pesados que se encuentran en ciertos minerales (Díaz, 2004). Un grupo particular de estas sustancias contaminantes está formado por compuestos aromáticos tóxicos, en especial los hidrocarburos aromáticos (benceno, tolueno, etilbenceno y xilenos (BTEX)) presentes en la gasolina y producidos en cantidades de megatoneladas por año para su uso industrial en forma de disolventes y como sustrato para la producción de pesticidas, plásticos y fibras sintéticas (Swoboda-Colberg, 1995).

Además, los compuesto aromáticos de origen natural se encuentran ampliamente distribuidos y es posible encontrarlos como moléculas de bajo peso molecular (como, por ejemplo, el benceno), como componentes de biopolímeros (como la lignina), como componentes de taninos, pigmentos, cofactores y formando estructuras propias de proteínas, DNA y RNA (Gibson y Harwood, 2002). Otros compuestos aromáticos como el ácido cinámico y derivados, y el ácido fenilpropiónico y derivados, son producidos por las plantas como consecuencia de su metabolismo secundario (Elder y Kelly, 1994).

La estructura de las moléculas aromáticas dota a estas compuestos de una alta estabilidad, lo que eleva su persistencia en el medio ambiente e incrementa su capacidad contaminante (Dagley, 1986).

La eliminación de los contaminantes ambientales mediante procedimientos físico-químicos es por norma general un proceso ambiental y energéticamente ineficiente. Por ello, hace tiempo que se ha incorporado una nueva estrategia para luchar contra la contaminación de forma más eficiente y que consiste en aprovechar las capacidades degradadoras de los

microorganismos, que, con su enorme capacidad de adaptación habilitan distintas rutas metabólicas que les permiten degradar distintos contaminantes (Smith, 1990; Harayama y col., 1992; van der Meer y col., 1992). La abundancia de microorganismos, su capacidad para transferir genes horizontalmente y su alta velocidad de crecimiento les permiten evolucionar rápidamente y adaptarse a los cambios en el ambiente incluso en condiciones extremas que no permitirían la proliferación de otros seres vivos (Timmis y Pieper, 1999; Schmid y col., 2001; Dua y col., 2002).

Los esfuerzos para estudiar, mejorar y explotar desde diferentes aproximaciones experimentales (bioquímicas, genéticas, microbiológicas, etc.) los procesos catabólicos microbianos implicados en la degradación de moléculas contaminantes, así como para desarrollar artificialmente nuevas rutas catabólicas capaces de degradar a éstas últimas, han dado lugar a una disciplina que recibe el nombre genérico de Biodegradación/Biorremediación (Ramos y col., 1994; Pieper y Reineke, 2000), entre cuyos objetivos incluye un mayor conocimiento de estos procesos que pueden conducir a la eliminación de contaminantes de la naturaleza mediante bacterias modificadas genéticamente (de Lorenzo, 2001).

### **2.1.1. Rutas de degradación de compuestos aromáticos**

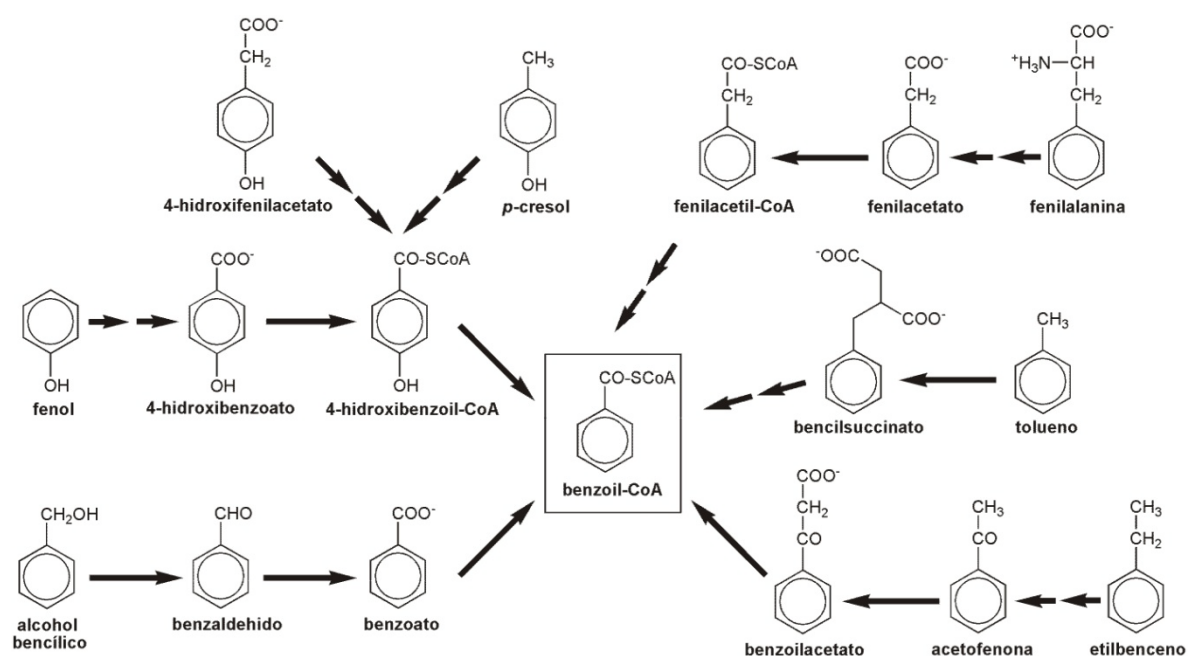
El catabolismo de los diferentes compuestos aromáticos tiene lugar a través de dos tipos de rutas: periféricas y centrales. Las primeras llevan a cabo la conversión de los distintos compuestos en unos pocos intermediarios centrales, y las segundas incluyen la ruptura del anillo aromático de los intermediarios y conducen sus productos al metabolismo central de la célula (Heider y Fuchs, 1997; Díaz, 2004). Existe una gran diversidad de rutas periféricas, casi tantas como compuestos aromáticos existentes, formadas por enzimas muy específicas e inducidas por los compuestos aromáticos a degradar (Harwood y col., 1998; Heider y col., 1998). Las rutas centrales son mucho más reducidas, en número y diversidad ya que muchas rutas periféricas convergen en un menor número de rutas centrales, lo que recibe el nombre de “embudo catabólico” (Harayama y Timmis, 1989).

El catabolismo de compuestos aromáticos se inicia por lo general mediante dos procesos enzimáticos clave que suceden de forma secuencial: (1) desestabilización del anillo aromático mediante la modificación de la densidad electrónica del mismo y (2) ruptura del anillo. Los microorganismos han sido capaces de desarrollar diferentes estrategias para llevar a cabo estos dos pasos, en función de su metabolismo sea aeróbico o anaeróbico. En el caso de los microorganismos aerobios, la desestabilización del anillo aromático se produce a través de reacciones de oxidación y el aceptor final de los electrones es la molécula de oxígeno. Los

microorganismos anaerobios forman un derivado tioesterificado para favorecer las reacciones de reducción del anillo aromático y el aceptor final de electrones es una molécula distinta del oxígeno, como por ejemplo  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ , etc. En ambos casos la siguiente etapa es la ruptura del anillo.

### 2.1.2. Rutas catabólicas anaerobias.

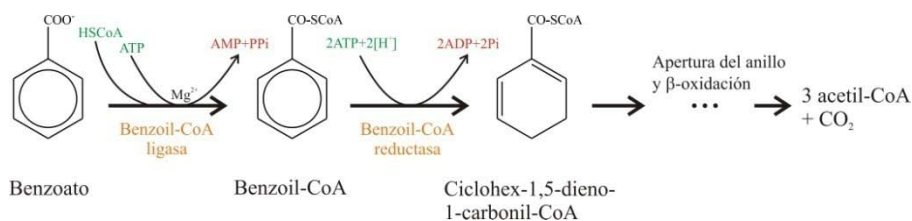
La mayor parte de las rutas periféricas del metabolismo anaerobio de compuestos aromáticos convergen en la ruta central del benzoil-coenzima A (benzoil-CoA) (Heider y Fuchs, 1997; Harwood y col., 1998) (Figura 2.1).



**Figura 2.1. Esquema de reacciones periféricas, descritas en bacterias capaces de metabolizar de forma anaeróbica algunos compuestos aromáticos, que convergen en benzoil-CoA.** En la figura se representa, de forma esquemática, algunas de las rutas propuestas para la degradación de 4-hidroxifenilacetato, *p*-cresol, fenol, alcohol bencílico, fenilalanina, tolueno y etilbenceno, en condiciones anaerobias; el intermediario en el que convergen todas estas rutas es el benzoil-CoA, el cual aparece recuadrado (figura modificada de (Fuchs, 2008); tomada de(Mascaraque-Martín, 2009)).

La activación del compuesto aromático mediante su unión a la molécula de coenzima A (CoA) puede ser catalizada por diferentes CoA ligasas (Villemur, 1995) y es un paso fundamental para que ocurra la posterior reducción del anillo aromático (Heider y Fuchs, 1997). El benzoil-CoA sufre una reducción que le hace perder su carácter aromático y que es llevada a cabo por una reductasa multicomponente que requiere poder reductor y dos moléculas de ATP (Boll y col., 2002; Gibson y Harwood, 2002). En esta reacción se forman productos alicíclicos y

alifáticos que continúan su degradación a través de una vía similar a la oxidación de los ácidos grasos (Gibson y Harwood, 2002; Carmona y Díaz, 2005) (Figura 2.2).



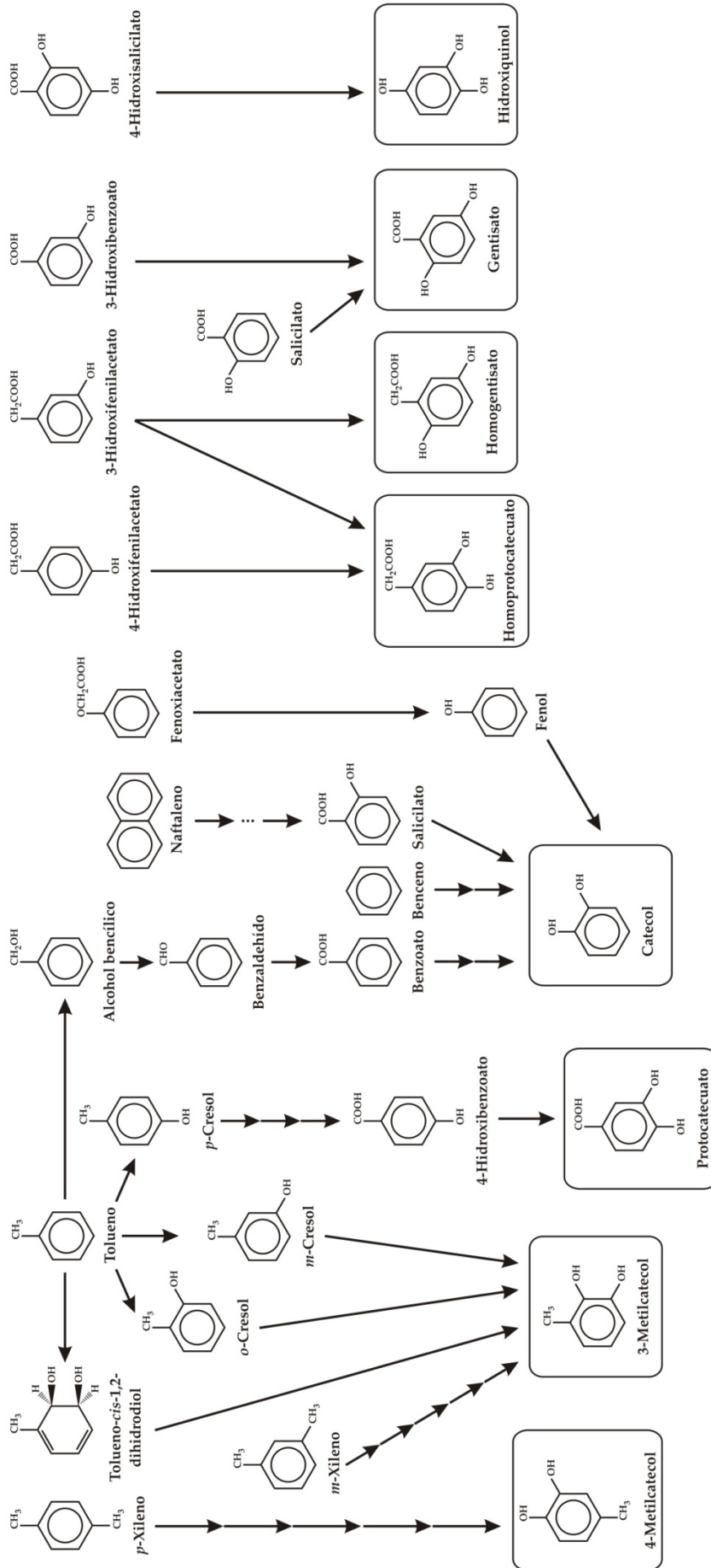
**Figura 2.2. Esquema simplificado de la degradación anaerobia del benzoato en *Thauera aromatica*.** (Modificado a partir de (Gibson y Harwood, 2002; Díaz, 2004)).

Existen otras rutas periféricas que convergen en compuestos hidroxilados como el floroglucinol (1,3,5-trihidrobenceno), el resorcinol (1,3-dihidroxibenceno) o la hidroxihidroquinona (1,2,4-trihidroxibenceno) (Boll y col., 2002). Estos compuestos tienen una baja aromaticidad por lo que no requieren ser activados por CoA, y la reducción de su anillo aromático solo requiere el aporte de poder reductor a partir de NADPH, para los casos del floroglucinol y la hidroxiquinona (Haddock y Ferry, 1989; Schink y col., 2000), o bien a partir de la ferredoxina, en el caso del resorcinol (Kluge y col., 1990).

### 2.1.3. Rutas catabólicas aerobias.

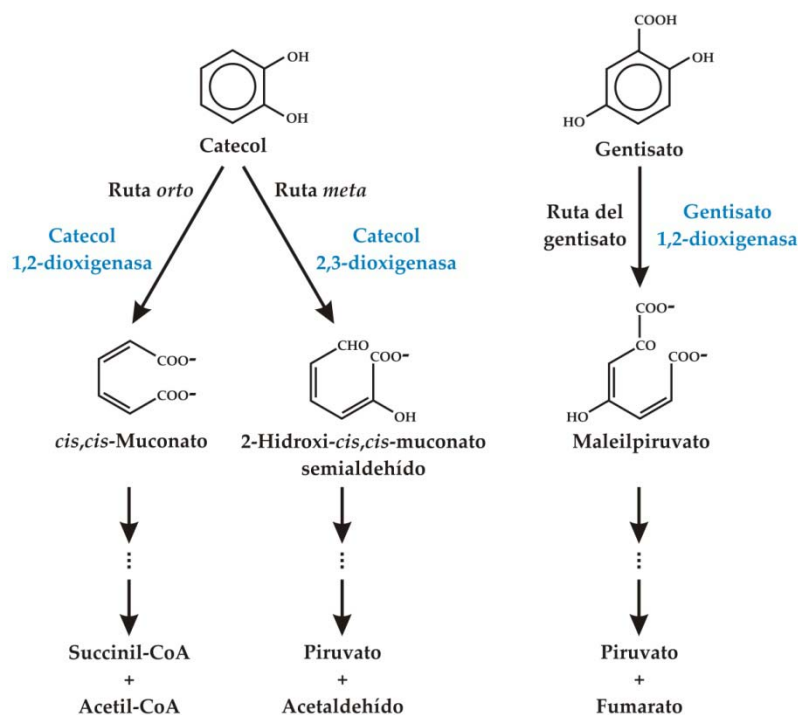
Las rutas catabólicas aeróbicas de compuestos aromáticos se encuentran entre las mejor estudiadas a nivel molecular, especialmente las descritas en especies del género *Pseudomonas* (van der Meer y col., 1992; Jiménez y col., 2002; Wackett, 2003). Los compuestos aromáticos se catabolizan, inicialmente, a través de una serie de rutas periféricas que implican la adición de uno o dos grupos hidroxilos sobre el anillo aromático, catalizada por monooxigenasas y/o dioxigenasas. Este hecho provoca el aumento de la densidad electrónica del anillo y le dota de gran sensibilidad a la oxidación. Los distintos compuestos iniciales se convierten en unos pocos intermediarios considerados centrales como son el catecol, el protocatecuato, el homoprotocatecuato, el 3-metilcatecol, el 4-metilcatecol, el gentisato, el homogentisato y diversos hidroxiquinoles (Figura 2.3.), que más tarde sufren la acción de las dioxigenasas de ruptura del anillo produciendo su apertura (Harayama y Reki, 1989; Harayama y Timmis, 1992; van der Meer y col., 1992; Harwood y Parales, 1996). Existen descritas dos tipos de dioxigenasas de ruptura del anillo (Figura 2.4.): las intradiol dioxigenasas, que realizan la ruptura del anillo en posición *orto* (entre los dos grupos hidroxilos), y las extradiol dioxigenasas, que lo hacen en posición *meta* (adyacente a uno de los grupos hidroxilo)

(Harayama y Reik, 1989; Harayama y Timmis, 1989; van der Meer y col., 1992; Vaillancourt y col., 2006). Tras la acción de las dioxigenasas de ruptura del anillo se forman compuestos no aromáticos que son oxidados progresivamente hasta formar intermediarios directamente asimilables por el metabolismo central bacteriano (Figura 2.4.).



**Figura 2.3. Esquema de algunas rutas periféricas del catabolismo aeróbico bacteriano de compuestos aromáticos.** En la figura se muestran recuadrados los principales intermediarios centrales que resultan de las rutas periféricas del catabolismo aeróbico: catecol y sus derivados (4-metilcatecol, 3-metilcatecol, protocatecuato y homoprotocatecuato), gentisato y su derivado homogentisato. La existencia de cinco rutas diferentes para el metabolismo aeróbico del tolueno manifiesta la diversidad metabólica bacteriana (figura modificada de(Guilensoy y Álvarez, 1999; Fernández, 2005; López-Barragán, 2005); tomada de (Bartolomé-Martín, 2006)).

También se han descrito compuestos monohidroxilados que pueden ser sustrato de las dioxigenasas de ruptura del anillo, como el 2-aminofenol (Takenaka y col., 1997) y el 1-hidroxi-2-naftoato (Iwabuchi y Harayama, 1998), así como trihidroxilados, como el hidroxiquinol (Armengaud y col., 1999) y el galato (Nogales y col., 2005).



**Figura 2.4. Rutas catabólicas centrales más habituales en el metabolismo aeróbico bacteriano de compuestos aromáticos.** Rutas de degradación del catecol y del gentisato, donde se muestran dioxigenasas tanto del tipo intradiol como del tipo extradiol. Los productos resultantes son degradados posteriormente hasta intermediarios del metabolismo central (figura modificada de Vaillancourt, 2006 y tomada de Bartolomé-Martín, 2006).

#### 2.1.4. Rutas híbridas.

En el metabolismo de compuestos aromáticos se han descrito rutas aeróbicas mixtas (mezcla entre el catabolismo aerobio y anaerobio), en las que la activación del anillo aromático se consigue a través de su tioesterificación por una molécula de coenzima A. Esta activación se lleva a cabo mediante CoA ligasas, como las descritas en la degradación del ácido fenilacético en *Pseudomonas putida* U (Martínez-Blanco y col., 1990; Miñambres y col., 1996), *Pseudomonas* sp. Y2 (Velasco y col., 1998; Alonso y col., 2003; Bartolomé-Martín y col., 2004), *Escherichia coli* (Ferrández y col., 1998; Díaz y col., 2001), *Azoarcus evansii* (Mohamed, 2000; Rost y col., 2002), *Burkholderia cenocepacia* (Law y col., 2008) y *Thermus thermophilus* (Erb y col., 2008). También se han descrito este tipo de enzimas en el metabolismo del benzoato en *A. evansii* (Altenschmidt y col., 1993; Zaar y col., 2001), *Bacillus stearothermophilus* (Zaar y col., 2001), *Thauera aromatica* (Schühle y col., 2003) y

*Burkholderia xenovorans* LB400 (Denef y col., 2004), así como en el catabolismo del 2-aminobenzoato en *A. evansii* (Altenschmidt y Fuchs, 1992), del ferulato en *P. putida* (Venturi y col., 1998) y *P. fluorescens* (Gasson y col., 1998) y del ácido 2-furoico en *P. putida* (Koenig y Andreesen, 1990). La actuación de este tipo de enzimas también se ha descrito en los mecanismos de deshalogenación de compuestos aromáticos en condiciones aerobias (Crooks y Copley, 1994; Dunaway-Mariano y Babbitt, 1994; Romanov y Hausinger, 1996; Zhuang y col., 2003).

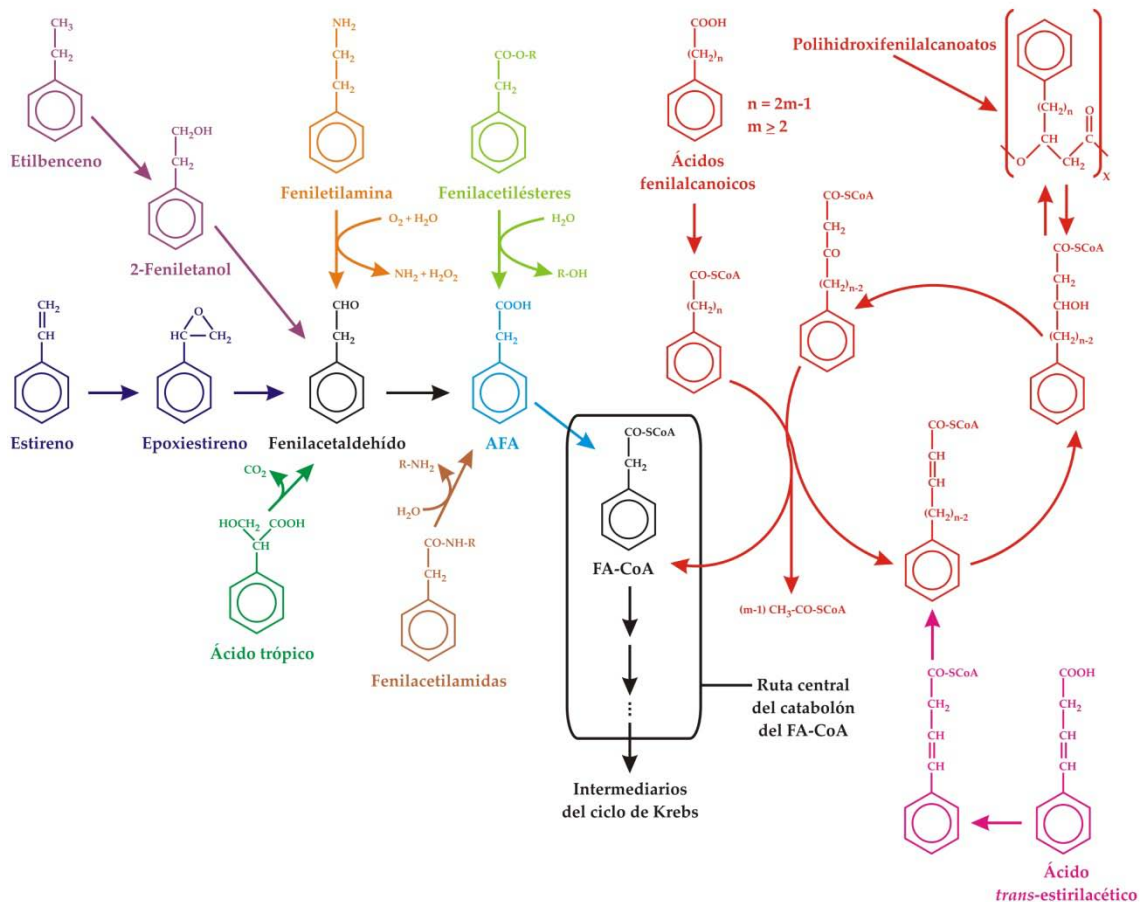
Aunque las rutas híbridas comienzan con una reacción típica del metabolismo anaerobio, la apertura del anillo aromático tiene lugar mediante la hidroxilación y posterior actuación de una dioxigenasa, característica típica del metabolismo aerobio. La causa de la existencia de este tipo de rutas es aún desconocido, aunque se propone la hipótesis de que representan una ventaja para los microorganismos que tienen que sobrevivir en ambientes en los que la concentración de oxígeno puede sufrir importantes variaciones (Niemetz y col., 1995).

## 2.2. Degradación del ácido fenilacético.

El ácido fenilacético ( $C_8H_8O_2$ , CAS-103-82-2) (AFA) es uno de los compuestos aromáticos más abundantes en la naturaleza. Se forma por transformación aeróbica o anaeróbica, de compuestos tales como: los aminoácidos fenilalanina y tirosina (Mohamed y col., 1993); los ácidos monoaromáticos derivados de la lignina (ácido cinámico, ácido ferúlico y cafeico); los ácidos grasos con un grupo fenilo terminal y fenilalcanos de cadena lateral con un número para de átomos de carbono (Sariaslani y col., 1974). El AFA se utiliza industrialmente para la producción de perfumes, herbicidas (Zumin y col., 2005), penicilina G (Austin, 1984; Surburg y Panten, 2006), ácido 2-hidroxifenilacético (García y col., 2001) y se puede utilizar en la síntesis de drogas (anfetamina, metanfetamina y fenilacetona). El AFA también se viene utilizando desde hace tiempo en el campo de la medicina (Zumin y col., 2005) para tratar desórdenes en el ciclo de la urea en humanos (Brusilow, 1984; Scaglia y col., 2004) y para aprovechar sus posibles propiedades antitumorales (Samid y col., 1992; Sawatsri y col., 2001; Sidell y col., 2009). También funciona como un efectivo agente antifúngico (Hwang y col., 2001; Mao y col., 2005) y antimicrobiano (Kim y col., 2004c).

### 2.2.1. Ruta enzimática del catabolismo del AFA

El catabolismo aeróbico del AFA es una de las rutas híbridas más estudiadas (Ferrández y col., 1998; Olivera y col., 1998) y presente en gran cantidad de bacterias gram-negativas, como *E. coli* W y *E. coli* K12 (Ferrández y col., 1998), *P. putida* U (Olivera y col., 1998), *P. putida* KT2440 (Luengo y col., 2001; Jiménez y col., 2002), *A. Evansii* (Mohamed y col., 2002; Rost y col., 2002), *P. fluorescens* ST (di Gennaro y col., 2007) y *Thermus thermophilus* (Erb y col., 2008), y gram-positivas, como *Rhodococcus* sp. RHA1 (Navarro-Llorens y col., 2005), *Arthrobacter oxydans* (Navarro-Llorens y col., 2008) y *Burkholderia cenocepacia* (Law y col., 2008). El catabolismo del AFA pasa por una primera etapa de activación mediante la tioesterificación por una molécula de CoA, llevada a cabo por la fenilacetil-CoA ligasa para dar como producto el fenilacetil-CoA (FA-CoA) (Martínez-Blanco y col., 1990; Olivera y col., 1994; Schleissner y col., 1994; Miñambres y col., 1996; Ferrández, 1998). Existen estudios que revelan que el gen que codifica la FA-CoA ligasa se encuentra ampliamente distribuido entre los organismos procariotas (Abe-Yoshizumi y col., 2004) e incluso en hongos como *Penicillium chrysogenum* (Lamas-Maceiras y col., 2006; Wang y col., 2007; Koetsier y col., 2009).



**Figura 2.5. Esquema del catabolismo del FA-CoA.** Se muestran algunas de las rutas catabólicas incluidas en este catabolismo. La ruta de degradación del ácido fenilacético se considera el núcleo del catabolismo y se muestra recuadrado y en negro (figura modificada de Luengo y col., 2001; tomada de Bartolomé, 2006).

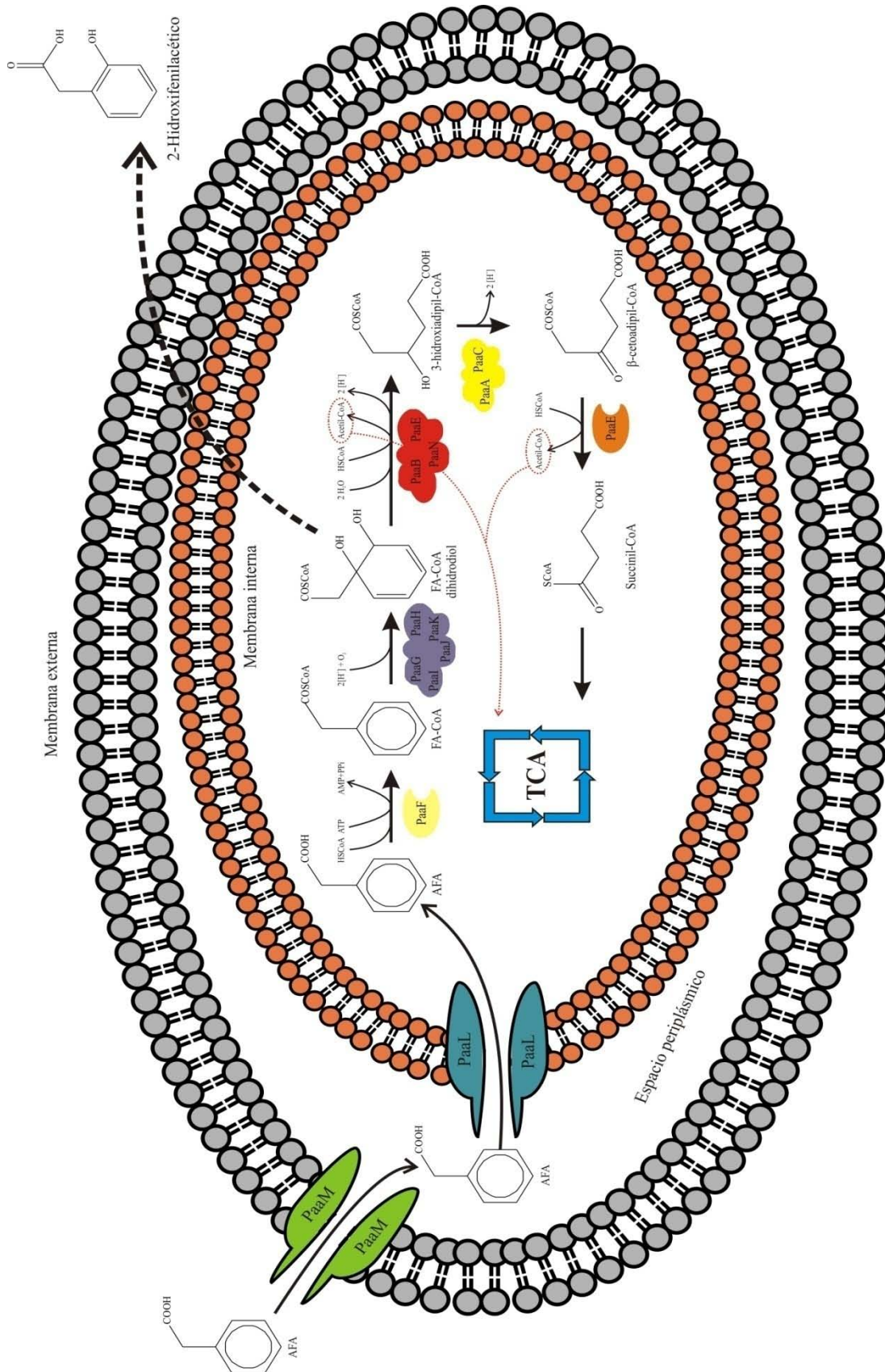
La ruta de degradación del AFA constituye una ruta central en el metabolismo aerobio de compuestos aromáticos, en la que convergen diversos compuestos aromáticos de estructura relacionada con el AFA y que se ha venido a denominar catabolismo FA-CoA (Figura 2.5), cuyo núcleo sería la ruta de degradación del AFA (Olivera y col., 1998; Luengo y col., 2001).

Estudios recientes sobre *E. coli* K12 y *E. coli* W (Ismail y col., 2003; Nogales y col., 2007) aportan la propuesta más completa y actual sobre los pasos a través de los cuales el AFA es catabolizado, así como de los intermediarios de este proceso. Estos modelos exponen que el AFA primeramente es transformado por la enzima fenilacetil-CoA ligasa, PaaF, en FA-CoA (Martínez-Blanco y col., 1990; Ferrández y col., 1998; Olivera y col., 1998). Posteriormente el FA-CoA es atacado por el complejo fenilacetil-CoA (di)oxigenasa/reductasa, complejo multicomponente compuesto por las proteínas PaaGHIJK, dando lugar a 1,2-dihidroxi-1,2-dihidrofénilacetil-CoA. Este intermediario, que ya ha perdido la aromaticidad, sufre la apertura del anillo mediante una serie de reacciones en las que actúan las proteínas PaaB (enoil-CoA hidratasa/isomerasa), PaaN (enzima de ruptura del anillo, con módulos aldehído deshidrogenasa y Mao-C deshidratasa) y PaaE (cetotiolasa). El producto formado tras esta apertura, el 3-

hidroxiadipil-CoA, es metabolizado a través de un proceso similar a una  $\beta$ -oxidación, en el que se transforma en  $\beta$ -cetoadipil-CoA por intervención de las proteínas PaaA (enoil-CoA hidratasa/isomerasa) y PaaC (3-hidroxiacil-CoA deshidrogenasa). Posteriormente la proteína PaaE (cetotiolasa), interviene en la transformación del  $\beta$ -cetoadipil-CoA en succinil-CoA y acetil-CoA (Nogales y col., 2007) (Figura 2.6.). La proteína PaaD, incluida inicialmente en los pasos de  $\beta$ -oxidación (Díaz y col., 2001), parece no tener una función imprescindible (o insustituible) en el catabolismo del AFA ya que su ausencia en algunos mutantes de *E. coli* K12 no afecta al crecimiento en AFA como única fuente de carbono y energía (Ismail y col., 2003).

En *P. putida* U existen dos proteínas más cuya función estaría relacionada con el transporte del AFA al interior de la célula. PaaM es una porina que permitiría el paso del AFA al espacio periplásmico a través de la membrana externa y PaaL es una permeasa que introduciría el AFA en el citoplasma celular atravesando la membrana plásmática (Olivera y col., 1998).

Con respecto a la regulación de esta ruta se ha demostrado que su expresión está condicionada a la presencia de AFA u otros compuestos del catabolón del FA-CoA en el medio (Ferrández y col., 1998; Olivera y col., 1998). Se ha demostrado que el verdadero inductor de la ruta del catabolismo del AFA, tanto en *E. coli* W (Ferrández y col., 2000) como en *P. putida* U (García y col., 2000), es el FA-CoA. Estudios llevados a cabo sobre *E. coli* W han revelado que la proteína PaaX tiene una actividad represora mediante su unión a los promotores de los genes catabólicos, y que esa unión se libera en presencia de FA-CoA (Ferrández y col., 2000). Además, se ha sugerido la intervención de la proteína PaaY en procesos de inducción de la ruta, ya que su ausencia provoca un retraso significativo en el crecimiento en AFA como única fuente de carbono y energía solo y exclusivamente cuando PaaX está presente (Fernández, 2005).

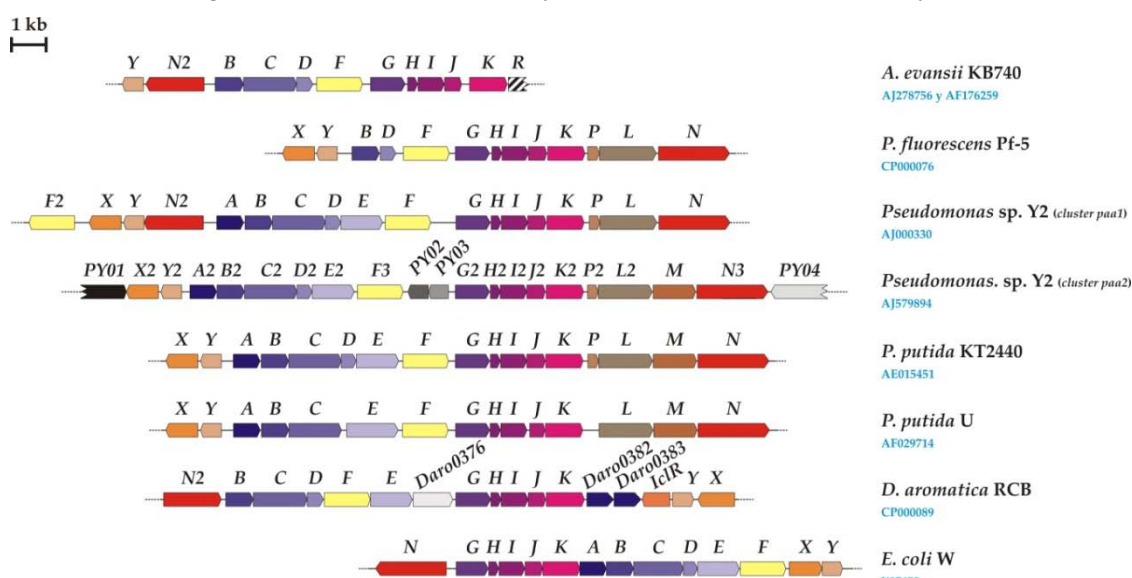


**Figura 2.6. Esquema de la ruta del catabolismo del AFA.** Esquema basado en los datos obtenidos de *E. coli* K-12 y *E. coli* W (Ismail y col., 2003; Nogales y col., 2007). Se ha incluido el sistema de transporte (PaaM, porina; PaaL, permeasa) de *P. putida* U (Olivera y col., 1998), así como la etapa en la que el FA-CoA dihidrol se transforma en el ácido 2-hidroxifenilacético (Ismail y col., 2003), que se detecta y cuantifica en el medio de cultivo mediante el ensayo de Gibbs (Kayser y col., 1993).

## 2.3. Organización genética de la ruta *paa*

En muchos de los microorganismos estudiados los genes que codifican las actividades enzimáticas que colaboran en la degradación de compuestos aromáticos están agrupados en una misma región génica. Esta ordenación permite que los genes se transcriban conjuntamente, lo que supone una ventaja a la hora de la regulación de su expresión. Los genes que codifican actividades reguladoras de estas rutas normalmente están situados en posiciones cercanas a los operones de los genes estructurales (Alonso, 2002).

El conjunto de genes responsables del catabolismo aeróbico del AFA han sido identificados y caracterizados en bacterias tales como *E. coli* W y *E. coli* K12 (Ferrández y col., 1998), *P. putida* U (Olivera y col., 1998; Luengo y col., 2001), *P. putida* KT2440 (Luengo y col., 2001; Jiménez y col., 2002), *A. evansii* (Mohamed y col., 2002; Rost y col., 2002), *Pseudomonas* sp. Y2 (Alonso y col., 2003; Bartolomé-Martín y col., 2004) y, parcialmente, en *P. putida* CA-3 (O'Leary y col., 2005), *Rhodococcus* sp. RHA1 (Navarro-Llorens y col., 2005), *P. fluorescens* ST (di Gennaro y col., 2007), *Arthrobacter oxydans* CECT386 (Navarro-Llorens y col., 2008), *Thermus thermophilus* (Erb y col., 2008) y *Burkholderia cenocepacia* (Law y col., 2008). En *Pseudomonas* sp. Y2 se ha descubierto la coexistencia de dos *clusters* génicos funcionales que codifican las actividades enzimáticas responsables de la degradación del AFA: el *cluster paa1*, que se encuentra localizado a continuación de los genes *sty*, que codifican actividades enzimáticas para la transformación de estireno en AFA, y el *cluster paa2*, que se localiza en otro lugar del cromosoma (Alonso y col., 2003; Bartolomé-Martín y col., 2004).



**Figura 2.7. Comparación de la organización de los clusters *paa* en varios microorganismos.** Los números de acceso en el GenBank de las secuencias correspondientes se muestran en azul. Se ha utilizado la nomenclatura consenso propuesta por Luengo y col. (2001), denominando *paaN2* a los genes de *A. evansii* KB740 y *D. aromatica* RCB similares a *paaN2* de *Pseudomonas* sp. Y2. El gen *paaR* de *A. evansii* KB740 codifica un regulador transcripcional de la familia TetR, que podría realizar las funciones del represor de la ruta, PaaX, ausente en esta bacteria (Mohamed y col., 2002). Los genes *Daro0376*, *Daro0382*, *Daro0383* y *IclR* de *D. aromatica* RCB, al igual que los genes *PY01*, *PY02*, *PY03* y *PY04* del *cluster paa2* de *Pseudomonas* sp. Y2, parecen no estar relacionados con el catabolismo del AFA. Figura tomada de Bartolomé, 2006.

La organización de los genes *paa* en las distintas bacterias estudiadas presenta algunas diferencias, como puede observarse en la Figura 2.7. En *E. coli*, los genes catabólicos se agrupan en dos operones divergentes (*paaGHIJKABCDEF* y *paaN*), mientras que los genes reguladores *paaXY* constituyen el tercer operón (Ferrández y col., 2000). En el caso de *P. putida* U, los genes *paa* se encuentran organizados en cinco operones contiguos: *paaABCEF*, *paaGHIJK*, *paaLMN*, *paaY* y *paaX* (Olivera y col., 1998). En *P. putida* KT2440 la región *paa* está organizada en cinco operones contiguos, al igual que *P. putida* U pero con la ausencia del gen *paaD* (Jiménez y col., 2002). Los genes *paa* de *A. Evansii* están agrupados en tres operones: *paaBCDF*, *paaGHIJK* y *paaNY*.

*E. coli* y *A. Evansii* carecen de los genes que codifican el sistema de transporte del AFA al interior celular, *paaM* y *paaL*. Estos dos genes también se han identificado en el *cluster paa2* de *Pseudomonas* sp. Y2, mientras que en el *cluster paa1* de esta bacteria el gen *paaM* está ausente. Además *A. Evansii* también carece del gen regulador *paaX*.

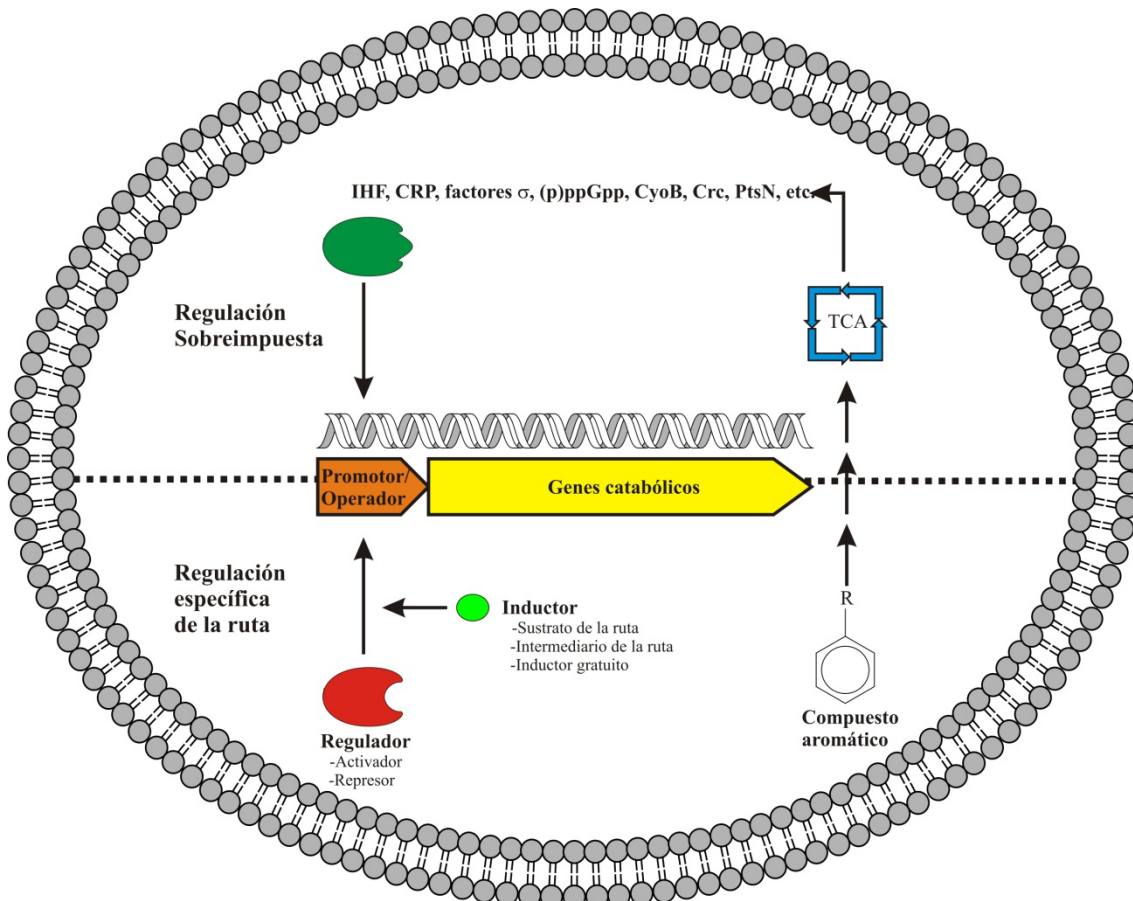
Por último, en los dos *clusters paa* de *Pseudomonas* sp. Y2 se ha propuesto la existencia de un gen *paaP*, que también está presente en *P. fluorescens* ST y *P. putida* KT2440 (Bartolomé-Martín y col., 2004).

## 2.4. Regulación de rutas de degradación de compuestos aromáticos

Una característica importante en los genomas bacterianos es que la mayoría de genes están organizados en operones poligénicos que facilitan una regulación coordinada. Además los productos individuales de estos operones pueden ser requeridos en diferentes cantidades. Las bacterias son capaces de emplear varios métodos para controlar la producción de proteínas de un mismo operón, incluyendo el uso de promotores internos y terminadores de la transcripción, procesamiento postranscripcional y diferentes estabilidades del transcrito primario, así como variaciones en la eficiencia del inicio de la traducción (Hoopes y McClure, 1987; Yager y von Hippel, 1987; Condon, 2003).

La regulación de una ruta catabólica debe garantizar una respuesta apropiada, precisa y rápida frente a la presencia de un determinado sustrato, así como una conexión acorde con el estado fisiológico de la célula en cada momento. Generalmente los compuestos aromáticos no son una fuente de carbono preferencial, para las bacterias y la expresión de los genes catabólicos de dichos compuestos está sometida a un preciso control transcripcional que puede ejercerse a dos niveles: (1) regulación específica de cada ruta, mediada por proteínas reguladoras codificadas por el propio *cluster* catabólico, y (2) regulación sobreimpuesta a la específica

basada en mecanismos de regulación globales que actúan sobre los promotores específicos en función del estado energético de la célula o bien de la presencia de una fuente de carbono preferencial para la bacteria (Díaz y Prieto, 2000; Cases y de Lorenzo, 2001; Shingler, 2003; Morales y col., 2004; Prieto y col., 2004; Tropel y van der Meer, 2004; Cases y de Lorenzo, 2005; Ruiz-Manzano y col., 2005) (Figura 2.8).



**Figura 2.8. Esquema de los dos niveles de regulación transcripcional del catabolismo de compuestos aromáticos en bacterias.** El primer nivel lo constituye el mecanismo de regulación específico de una determinada ruta catabólica, que se basa en la interacción regulador-promotor. El regulador puede actuar como un activador transcripcional en presencia del inductor, o como un represor transcripcional en ausencia del inductor. El segundo nivel de control transcripcional lo constituye la regulación sobreimpuesta, que ajusta el nivel de transcripción a partir de un determinado promotor dependiendo del estado fisiológico y energético de la célula. En este tipo de regulación participan reguladores y factores transcripcionales como IHF (*Integration Host Factor*), CRP (*cAMP Receptor Protein*), factores  $\sigma$  alternativos de la RNA polimerasa, (p)ppGpp, CyoB (Citocromo *o* ubiquinol oxidasa), Crc (*Catabolite repression control*), PtsN (proteína IIA<sup>Ntr</sup> del sistema fosfoenol piruvato:azúcar fosfotransferasa), etc. Figura modificada a partir de (Díaz y Prieto, 2000).

Además de existir un control a nivel transcripcional también existe un control postraduccional basado en la modulación de mRNA, en el control de la eficacia de la traducción (Cases y de Lorenzo, 1998; Laurie y col., 2003; Rojo y Dinamarca, 2004; Marqués y col., 2006), en la inhibición de determinadas enzimas por análogos del sustrato (retroinhibición) o en

el control de transportadores específicos que se encargan de la entrada del compuesto en cuestión al interior de la célula (Brzostowicz y col., 2003).

Los elementos clave en la regulación específica son las proteínas reguladoras y los promotores que dirigen la transcripción de los operones catabólicos. Cuando en el medio existe una cantidad de sustrato suficiente como para servir de nutriente, es detectado por las proteínas reguladoras que se encargan de activar la transcripción de los operones. Actualmente se han descrito muchas proteínas reguladoras, pertenecientes a diferentes familias de reguladores transcripcionales procariotas, que se encargan de controlar la expresión de las rutas catabólicas de compuestos aromáticos. La mayoría de estos reguladores actúan activando la transcripción, mediante su interacción con la región operadora del promotor, a través de un dominio hélice-giro-hélice (HTH: *helix-turn-helix*) cuando el inductor está presente en el medio. La molécula que actúa de inductor puede ser desde el propio sustrato aromático alguno de los metabolitos intermediarios de dicho catabolismo (Díaz y Prieto, 2000; Tropel y van der Meer, 2004). Existen casos en los que ciertos análogos estructurales del sustrato, llamados inductores gratuitos, pueden funcionar como inductores de la ruta aunque no sean sustrato de las enzimas catabólicas. Aunque son pocos, existen reguladores cuya función consiste en reprimir la expresión de los genes catabólicos en ausencia del inductor. En la Tabla 2.1 se muestran algunos reguladores descritos y su clasificación (Díaz y Prieto, 2000; Tropel y van der Meer, 2004).

**Tabla 2.1. Reguladores e específicos de rutas de degradación de compuestos aromáticos en bacterias** (Díaz y Prieto, 2000; Tropel y van der Meer, 2004); tomada de Del Peso-Santos, 2008). TCRS, sistema regulador de dos componentes (*two-component regulatory system*).

Proteína reguladora	Familia	Microorganismo [plásmido]	Sustrato(s) de la(s) ruta(s) regulada(s)	Función	Nº de acceso en el NCBI
XylR	NtrC	<i>P. putida</i> mt-2 [pWW0]	Tolueno, <i>m</i> - y <i>p</i> -xileno	Activador	AAB59162
TouR	NtrC	<i>Pseudomonas stutzeri</i> OX1	Tolueno, <i>o</i> -xileno, fenol	Activador	CAB52211
DmpR	NtrC	<i>Pseudomonas</i> sp. CF600 [pVI150]	Fenol, <i>o</i> -, <i>m</i> - y <i>p</i> -cresol, 3,4-dimetilfenol	Activador	CAA48174
CatR	LysR	<i>P. putida</i> / <i>Acinetobacter lwoffii</i> K24	Catecol, fenol	Activador	AAN69313 / AAC46229
CleR	LysR	<i>P. putida</i> / <i>Rhodococcus opacus</i> 1CP	3-Clorocatecol	Activador	AAA25771 / AAC38250
NahR	LysR	<i>P. putida</i> [pNAH7] / <i>P. stutzeri</i> AN10	Naftaleno, salicilato	Activador	BAE92164 / AAD02145
XylS	AraC	<i>P. putida</i> mt-2 [pWW0]	<i>m</i> -Toluato (tolueno, ruta meta)	Activador	AAB59163
HpaA	AraC	<i>E. coli</i> W	4-hidroxifenilacetato	Activador	CAA86047
PcaR	IclR	<i>P. putida</i> PRS2000	Protocatecuato	Activador	Q52154
MhpR	IclR	<i>E. coli</i> K-12 / <i>Comamonas testosteroni</i> TA441	3-hidroxifenilpropionato	Activador	P77569 / BAA82877
TodS / TodT	TCRS	<i>P. putida</i> F1	Tolueno	Activador	AAC45438 / AAC45439
TodS/TodT	TCRS	<i>P. putida</i> DOT-T1	Tolueno	Activador	CAB43735 / CAB43736
TutB/TutC	TCRS	<i>Thauera</i> sp. T1	Tolueno	Activador	AAD12185 / AAD12184
StyS / StyR	TCRS	<i>Pseudomonas</i> sp. Y2	Estireno	Activador	CAA03998 / CAA03999
StyS / StyR	TCRS	<i>P. fluorescens</i> ST	Estireno	Activador	AAC06272 / AAC06271
HbaR	FNR	<i>Rhodopseudomonas palustris</i>	4-hidroxibenzoato	Activador	AAF04013
BadR	MarR	<i>R. palustris</i>	Benzoato	Activador	AAC23923
BenR	AraC	<i>P. putida</i>	Benzoato	Activador	AAF63447
HpaR	MarR	<i>E. coli</i> W	Homoprotocatecuato	Represor	CAA86039
CymR	TetR	<i>P. putida</i> F1	<i>p</i> -Cumeno, <i>p</i> -cumato	Represor	AAB62296
PaaX	GntR	<i>E. coli</i> W / <i>P. putida</i> U	Fenilacetato	Represor	CAA66101 / AAC24342
BphS	GntR	<i>Ralstonia eutropha</i> A5	Bifenilo, 4-clorobifenilo	Represor	CAC05302
VanR	GntR	<i>P. putida</i> WCS358	Vanillato	Represor	CAB64602

La expresión de las rutas catabólicas bacterianas dependen tanto de la presencia o ausencia del sustrato inductor como del estado fisiológico de la célula (Cases y de Lorenzo, 1998). Los promotores de estas rutas catabólicas responden al control específico y al control fisiológico, regulación global o sobrepuesta, que resulta dominante respecto al control específico y que está mediado por diversos reguladores y factores globales. En la Tabla 2.2 se resumen los casos más representativos de regulación global descritos.

**Tabla 2.2. Ejemplos de regulación global sobre la degradación de compuestos aromáticos en bacterias.** A partir de la revisión de (Shingler, 2003). Tomado de (Bartolomé-Martín, 2006) y actualizado.

Proteína o factor global	Microorganismo [plásmido] en el que se encuentra la ruta catabólica	Tipo de regulación	Referencia
$\sigma^S$ y $\sigma^H$	<i>P. putida</i> mt-2 [pWW0]	Su patrón de expresión permite la opción de transcripción continua a partir del promotor $P_m$ (dependiente de XylS).	(Marqués y col., 1999)
$\sigma^{54}$ y $\sigma^{70}$	<i>P. sp.</i> CF600 [pVI150]	La competición entre el factor constitutivo $\sigma^{70}$ y el factor $\sigma^{54}$ por cantidades limitantes del <i>core</i> o núcleo de la RNA polimerasa afecta a la expresión del promotor $P_o$ (dependiente de $\sigma^{54}$ y activado por DmpR).	(Laurie y col., 2003)
(p)ppGpp	<i>P. sp.</i> CF600 [pVI150] / <i>P. putida</i> mt-2 [pWW0]	En respuesta a un estrés nutricional, aumentan los niveles de la "alarmona" (p)ppGpp, que estimula de forma directa e indirecta la transcripción en los sistemas DmpR- $P_o$ y XylR- $P_u$ .	(Carmona y col., 2000; Sze y col., 2002; Laurie y col., 2003)
IHF (factor de integración del huésped)	<i>P. putida</i> mt-2 [pWW0] / <i>P. sp.</i> CF600 [pVI150]	Tanto el sistema XylR - $P_u$ como el sistema DmpR - $P_o$ requieren el factor IHF para una expresión óptima.	(de Lorenzo y col., 1991; Sze y col., 2001)
IHF	<i>Pseudomonas fluorescens</i> ST	IHF se une a una región dentro del promotor $P_{styA}$ y potencia la transcripción del operón <i>styABCD</i> .	(Santos y col., 2002)
PtsN (IIA <sup>Ntr</sup> ) y PtsO (NPr)	<i>P. putida</i> mt-2 [pWW0]	Proteínas implicadas en la represión catabólica por glucosa sobre el promotor $P_u$ .	(Cases y col., 1999; Cases y col., 2001)
PtsN (IIA <sup>Ntr</sup> )	<i>P. putida</i> KT2440 [pWW0]	Proteína implicadas en la represión catabólica por succinato sobre el promotor $P_u$ .	(Aranda-Olmedo y col., 2006)
Cyo (citocromo o ubiquinol oxidasa)	<i>P. putida</i> H [pPGH1]	Interviene en la represión catabólica por succinato del promotor $P_{phIA}$ (degradación de fenol).	(Petruschka y col., 2001)
Crc (control de la represión por catabolito)	<i>P. putida</i> KT2440	Participa en la represión catabólica en medio rico LB de las rutas de degradación de 4-hidroxifenilpiruvato, homogentisato, benzoato, catecol, 4-hidroxibenzoato y protocatecuato.	(Morales y col., 2004)
CRP (proteína receptora de cAMP)	<i>E. coli</i> W	Interviene activando la expresión de las rutas de degradación de AFA, 3- y 4-hidroxifenilacetato, 3-hidroxifenilpropiónico, feniletilamina, tiramina y dopamina cuando no hay represión catabólica por glucosa.	(Prieto y col., 2004)

Unos de los tipos de regulación global más importantes es la represión catabólica, fenómeno común en la regulación de las rutas catabólicas de compuestos aromáticos en el género *Pseudomonas* (Shingler, 2003). La represión catabólica se define como el proceso regulador que permite a las células usar preferentemente una fuente de carbono determinada frente a otras cuando están mezcladas en el medio (Magasanik, 1970; Ullmann, 1996; Moreno y

Rojo, 2008). Esta regulación ha sido descrita ampliamente en *E. coli* (Inada y col., 1996; Saier y Ramseier, 1996; Busby y Ebright, 1999), especialmente la represión por glucosa, con un mecanismo en el que intervienen el AMP cíclico (cAMP) y la proteína CRP (*cAMP receptor protein*) (Pastan y Adhya, 1976; Magasanik y Neidhardt, 1987; Botsford y Harman, 1992) y también forma parte de represión por catabolito el sistema PTS (*phosphotransferase system*) de la fosfoenolpiruvato fosfotransferasa (Saier, 1989; Postma y col., 1993; Saier y Ramseier, 1996). Sobre *E. coli* W se ha demostrado que la glucosa tiene un efecto represor mediado por CRP, solo y exclusivamente sobre los promotores de los genes catabólicos de AFA (Ferrández y col., 2000; Fernández, 2005).

En el género *Pseudomonas* los mecanismos de represión catabólica no están controlados por los niveles de cAMP (Siegel y col., 1977; Phillips y Mulfinger, 1981; MacGregor y col., 1992).

La proteína Crc (*catabolite repression control*) (Wolff y col., 1991), es la encargada de controlar la represión por catabolito en *P. aeruginosa*. Se demostró que la presencia o ausencia de esta proteína no altera los niveles de cAMP ni las actividades adenilato ciclasa y cAMP-fosfodiesterasa (MacGregor y col., 1991). Esta proteína Crc de 259 aminoácidos presentó cierta similitud con miembros de la familia de endonucleasas apurínicas/apirimidínicas, enzimas encargadas de la reparación del DNA, pero aún no se ha podido demostrar función endonucleasa ni capacidad de unión a DNA en la proteína Crc (MacGregor y col., 1996; Ruiz-Manzano y col., 2005). Otros estudios han demostrado la intervención de la proteína Crc en el control de la formación de biopelículas en *P. aeruginosa* (O'Toole y col., 2000).

Aunque la glucosa no es una fuente de carbono preferente para *Pseudomonas* (Basu y col., 2007), se ha demostrado que la proteína Crc interviene en la represión catabólica de las enzimas glucosa-6-fosfato deshidrogenasa y amidasa en *P. aeruginosa* (Wolff y col., 1991; Collier y col., 1996; MacGregor y col., 1996; Collier y col., 2001) y en *P. putida* (Hester y col., 2000a; del Castillo y Ramos, 2007), así como en la represión catabólica del operón *bkd* que codifica la deshidrogenasa de cetoácidos de cadena ramificada en estas dos especies. La proteína Crc también interviene en la represión catabólica en medio rico LB de la ruta de degradación de alcanos en *P. putida* GP01 (Yuste y Rojo, 2001) y de benzoato, catecol, 4-hidroxibenzoato, protocatecuato, 4-hidroxifenilpiruvato y homogentisato en *Pseudomonas putida* KT2440. En cambio Crc no interviene en el mecanismo de represión catabólica en medio rico LB de los genes que permiten el catabolismo del AFA (Morales y col., 2004).

Recientemente, en trabajos realizados en ciertas estirpes de *P. putida* se ha confirmado que el mecanismo de actuación de este regulador global, se basa en su unión al mRNA que

codifica la proteína activadora impidiendo la traducción posterior (Moreno y col., 2007; Moreno y Rojo, 2008).

### 2.5. Regulación de la ruta catabólica del AFA.

Los genes *paa* se inducen por la presencia de AFA en el medio (Ferrández y col., 1998; Olivera y col., 1998), aunque el verdadero inductor de su expresión es un metabolito intermediario, el FA-CoA, tanto en *E. coli* W (Ferrández y col., 2000) como en *P. putida* U (García y col., 2000). La proteína reguladora esta ruta es PaaX, que actúa como represor transcripcional uniéndose a las regiones operadoras e impidiendo la transcripción por parte de la RNA polimerasa. En presencia de FA-CoA la unión entre la proteína PaaX y los operadores se deshace, permitiendo la transcripción de estos genes antes reprimidos (Ferrández y col., 2000). Este fenómeno ha sido observado sobre *E. coli* W tanto en los promotores de los genes *paa* (*P<sub>x</sub>*, *P<sub>a</sub>* y *P<sub>n</sub>*) (Ferrández y col., 2000; Fernández, 2005), como en el promotor del gen *pac*, que codifica la penicilina G acilasa en *E. coli* W y *Kluyvera. citrophila* (Galán y col., 2004; Kim y col., 2004b).

La proteína represora PaaX está clasificada dentro de la familia de reguladores transcripcionales del tipo GntR e incluida en una subfamilia compuesta por proteínas similares al producto del gen *paaX* de *E. coli* W (Fernández, 2005). PaaX presenta en su extremo N-terminal un dominio HTH (*helix-turn-helix*) de unión al DNA. Los represores de la familia GntR realizan su función impidiendo que la RNA polimerasa se una a la región promotora o bien evitando la formación del complejo abierto de transcripción (Tropel y van der Meer, 2004).

La secuencia consenso a la que PaaX se une en las regiones operadoras de *E. coli* W consiste en dos repeticiones invertidas de 6pb separadas entre sí por unas 27 pb (5'-TGATTC---27pb(N)---GAATCA-3'). En *Pseudomonas* sp. Y2 (del Peso-Santos y col., 2006) la secuencia consenso de unión a la proteína PaaX es parecida en tamaño, aunque no en secuencia y consiste en dos repeticiones invertidas de 6 pb separadas por 26 pb (5'-GATACA---26pb (N)---TGTATC-3'). Esta secuencia consenso se ha encontrado en las regiones operadoras de los genes *paa* de *P. putida* KT2440 (*P<sub>A</sub>* y *P<sub>G</sub>*), *P. putida* U (*P<sub>A</sub>* y *P<sub>G</sub>*), *P. fluorescens* Pf-5 (*P<sub>B</sub>*) y *Pseudomonas* sp. Y2 (*P<sub>A</sub>*, *P<sub>G</sub>*, *P<sub>A2</sub>* y *P<sub>G2</sub>*), así como en la región operadora de genes *sty* de *Pseudomonas* sp. Y2 (*P<sub>A</sub>*) (Figura 2.9.) (del Peso-Santos y col., 2006).

aacaatg <b>TGATTC</b> gtgtttttaattaattcacgaaaactg- <b>GAATC</b> gtaa	<i>P<sub>G</sub></i> ( <i>P<sub>a</sub></i> ) ( <i>E. coli</i> W) (+7/+45)
cttttta <b>TGATTC</b> gcgatttaactatttagcaacagaaatgt <b>GAAACA</b> tct	<i>P<sub>N</sub></i> ( <i>P<sub>Z</sub></i> ) ( <i>E. coli</i> W) (-26/+14)
tgtgcta <b>TGATTC</b> ataaatcacaacaataacaacagact-- <b>GAATC</b> gaat	<i>P<sub>X</sub></i> ( <i>E. coli</i> W) (-9/+28)
aataaagc <b>GATTC</b> gttttagatcacattaatgaaatTTTT- <b>GtATCA</b> aaa	<i>P<sub>pac</sub></i> ( <i>E. coli</i> W) (-121/-83)
attgaaa <b>TGATTC</b> gctttggatcacatttagttatttatc- <b>GtATCA</b> ata	<i>P<sub>pac</sub></i> ( <i>K. citrophila</i> )
..... <b>TGATTC</b> -----27 bp aprox.----- <b>GAATCA</b> ...	<b>CONSENSO <i>E.coli</i></b>
aaaaaaga <b>GATAC</b> gcgaaaacattttgcgcttgcattgt <b>TGTATC</b> gcat	<i>P<sub>paaA</sub></i> ( <i>P. putida</i> KT2440)
tcttactt <b>GATACA</b> cataaatgtgtttgacgttat-gttt <b>TGTATC</b> gctt	<i>P<sub>paaG</sub></i> ( <i>P. putida</i> KT2440)
cactatga <b>GATACA</b> cgaaacaattttcgatgttgcatTTCC <b>GATAC</b> gCGT	<i>P<sub>paaA</sub></i> ( <i>P. putida</i> U)
tcttattt <b>GATACA</b> cctaaaactgtttgacgttGT-gttt <b>TGTATC</b> gctt	<i>P<sub>paaG</sub></i> ( <i>P. putida</i> U)
aaaatcaa <b>GAACA</b> ttaaattcacgtcgctattgttttta <b>TGTATC</b> acat	<i>P<sub>paaB</sub></i> ( <i>P. fluorescens</i> Pf-5)
aaaacaa <b>GAACA</b> taataaattttaaatattgtt-ttac <b>TGTATC</b> gctt	<i>P<sub>paaA</sub></i> ( <i>P. sp.</i> Y2) (-60/-24)
tcataagc <b>GAACA</b> ctatttattgtttgatatttg-tttc <b>TGTATC</b> gctt	<i>P<sub>paaG</sub></i> ( <i>P. sp.</i> Y2) (-51/-15)
tatcatta <b>GAACA</b> tatttttgtttgatgttgtttttc <b>TGTATC</b> gcat	<i>P<sub>paaA2</sub></i> ( <i>P. sp.</i> Y2) (-50/-13)
acaattac <b>GAAC</b> Attttttgtgtttgatatttg-gttt <b>TGTATC</b> actt	<i>P<sub>paaG2</sub></i> ( <i>P. sp.</i> Y2) (-51/-15)
..... <b>GATACA</b> -----26 bp aprox.----- <b>TGTATC</b> ...	<b>CONSENSO <i>paa Pseudomonas</i></b>
agcaaccacaca <b>ACA</b> aaaaaagggtataagccatgaaaaagc- <b>GTATC</b> ggta	<i>P<sub>styA</sub></i> ( <i>P. sp.</i> Y2) (+12/+48)
----- <i>footprint</i> -----	

**Figura 2.9.. S secuencias de unión de PaaX.** Comparación de los sitios de unión de PaaX de distintos promotores de *E. coli* W (número de acceso en el GenBank X97452) y *Kluyvera citrophila* (M15418) con los sitios de unión de PaaX putativos encontrados en los promotores *paa* de *P. putida* KT2440 (AE015451), *P. putida* U (AF029714), *P. fluorescens* Pf-5 (NC004129) y *Pseudomonas* sp. Y2 (AJ000330 y AJ579894) y el sitio de unión de PaaX localizado en el promotor *P<sub>styA</sub>*·*P<sub>G</sub>* (anteriormente *Pa*), *P<sub>N</sub>* (anteriormente *P<sub>Z</sub>*) y *P<sub>X</sub>* son los promotores que controlan la transcripción de los genes *paa* en *E. coli* W. *P<sub>pac</sub>* es el promotor del gen *pac* que codifica la penicilina G acilasa. *P<sub>paaA</sub>*, *P<sub>paaG</sub>*, *P<sub>paaA2</sub>*, *P<sub>paaG2</sub>* y *P<sub>paaB</sub>* son promotores de los genes *paa* de *Pseudomonas*. *P<sub>styA</sub>* es el promotor que controla la transcripción del operón *styABCD* catabólico en *Pseudomonas* sp. Y2. Las posiciones de la región flanqueada por las repeticiones invertidas de 6 pb, que constituyen el motivo de unión de PaaX, relativas al sitio de inicio de la transcripción, aparecen entre paréntesis para cada promotor. Las secuencias consenso de unión de PaaX para *E. coli* y *Pseudomonas* aparecen en negrita. Los nucleótidos de las cajas de unión de PaaX de los distintos promotores que se encuentran conservados respecto a la secuencia consenso se muestran en negrita. Los nucleótidos conservados entre las secuencias consenso de *E. coli* y *Pseudomonas* están subrayados. La región de *P<sub>styA</sub>*·*styA* que resulta protegida en la digestión por DNasa I se encuentra resaltada por un rectángulo (*footprint*), modificada de (del Peso-Santos, 2008).

Se ha demostrado que la proteína PaaX de *Pseudomonas* sp. Y2 no sólo actúa como represor de los genes *paa* en ausencia de FA-CoA, sino que reprime la expresión de los genes *sty*, implicados en la ruta superior de degradación del estireno, y que dicha represión desaparece en presencia de FA-CoA (del Peso-Santos y col., 2006).

En cuanto a la regulación global o sobreimpuesta de los genes *paa*, se ha observado represión por glucosa en *P. putida* U (Olivera y col., 1998) y en *E. coli* W (Ferrández y col., 2000; Fernández, 2005). En *E. coli* W esta represión se produce exclusivamente sobre los promotores de los genes catabólicos de la ruta y está mediada por CRP (Ferrández y col., 2000; Fernández, 2005). Además, las proteínas CRP e IHF, encargadas de la regulación global, ejercen un control a su vez sobre la regulación específica de los genes *paa* llevada a cabo por PaaX, conectando así la expresión de los genes catabólicos de esta ruta con el estado metabólico y energético de la célula (Ferrández y col., 2000).

En el caso de *Pseudomonas* sp. Y2 no se ha observado represión catabólica de los genes *paa* por glucosa, pero sí en medio rico LB, aunque en esta bacteria, esta represión no está medida por la proteína Crc (Bartolomé-Martín, 2006).

### 2.5.1. Papel regulador de PaaY.

Se ha demostrado que el producto del gen *paaY*, no es necesario para el crecimiento de *P. putida* U en medio mínimo con AFA como única fuente de carbono y energía (Olivera y col., 1998). En *E. coli* W, sin embargo, se ha comprobado que la ausencia de PaaY provoca un retraso significativo sobre el crecimiento en AFA de esta bacteria. Esto sucede sólo y exclusivamente cuando PaaX está presente, ya que la bacteria presenta un crecimiento normal en AFA cuando se deleta tanto *paaY* como *paaX*. Este resultado ha permitido sugerir la intervención de PaaY en procesos de inducción de la ruta (Fernández, 2005).

La proteína PaaY de *E. coli* W consta de una estructura primaria de 196 aa que muestra varias secuencias repetidas de motivos hexapéptidos [LIV]-[GAED]-X-X-[STAV]-X-X-X-X que caracterizan a los miembros de la familia de transferasas bacterianas (Base de datos Prosite, <http://www.expasy.org/prosite/>) (Bairoch, 1993). Esta proteína muestra similitud con la proteína CaiE del operón de la carnitina de *E. coli*, aunque la función de esta proteína se desconoce, y con la Fbp (anhidrasa carbónica) de *Pseudomonas aeruginosa* (Fernández, 2005). Se ha demostrado que la proteína PaaY carece de función anhidrasa carbónica, aunque sí que funciona como tioesterasa utilizando como sustrato acetoacil-CoA, lauril-CoA, miristoil-CoA y fenilacetil-CoA, y que une tanto Fe<sup>2+</sup> como Ca<sup>2+</sup> en tres histidinas conservadas y que se agrupa en homotrímeros en su estructura cuaternaria (Fernández, 2005).

## 2.6. Género *Pseudomonas*.

Las *Pseudomonas* son bacterias gram-negativas, normalmente móviles y con uno o varios flagelos polares. Son aerobias, con metabolismo respiratorio estricto y con el oxígeno como aceptor terminal de electrones, aunque en algunos casos pueden utilizar nitrato como aceptor alternativo de electrones y mostrando un crecimiento anaerobio. Se ha descrito la capacidad de utilizar el 2,4,6-trinitrotolueno (TNT) como aceptor alternativo de electrones para el caso de *Pseudomonas putida* JLR11 (Esteve-Núñez, 2000). La mayoría son quimiorganotróficas y se cultivan a pH próximos a la neutralidad, temperaturas mesófilas y sin requerimiento de factores de crecimiento. Todas ellas son catalasa positivas y pueden dar resultado positivo o negativo para el test de la oxidasa. La mayoría de las especies de este género no acumulan gránulos de poli- $\beta$ -hidroxialcanoatos salvo cuando se cultivan en alcanoatos o gluconato (Haywood y col., 1990). No se conocen estados celulares viables no cultivables. Las cepas de las especies de este género cuentan en su composición con ácidos grasos hidroxilados 3-OH 10:0 y 12:0, y 2-OH 12:0, y ubiquinona Q-9.

El espectro nutricional de cada especie de este género es característico, presentando una menor variabilidad entre cepas de una misma especie. El género *Pseudomonas* se caracteriza por su extrema versatilidad metabólica (Stanier y col., 1966; Palleroni, 1993). Entre los compuestos orgánicos que son capaces de metabolizar se encuentran hidratos de carbono, ácidos alifáticos, aminas, amidas, aminoácidos, compuestos aromáticos y alcoholes.

Dentro del género *Pseudomonas* se han descrito aproximadamente 60 especies que se caracterizan por una extraordinaria versatilidad metabólica y una amplia distribución en el medio ambiente. Este género incluye cepas patógenas oportunistas de animales, *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 y *P. entomophila* L48, patógenas de plantas, *P. syringae* y cepas que estimulan el crecimiento de plantas actuando como fungicidas, *P. fluorescens* (Lugtenberg y Dekkers, 1999), inócua como *P. putida* KT2440.

Actualmente se conoce la secuencia completa del genoma de varias estirpes de este género: *P. aeruginosa* PAO1 (Stover y col., 2000), *P. putida* KT2440 (Nelson y col., 2002), *P. syringae* pv tomato str. DC3000 (Buell y col., 2003), *P. fluorescens* Pf-5 (Paulsen y col., 2005), *P. fluorescens* Pf0-1 (<http://www.jgi.doe.gov>, 2005), *P. syringae* pv phaseolicola 1448a (Joardar y col., 2005), *P. syringae* pv *syringae* B728a (Feil y col., 2005), *P. aeruginosa* UCBPP-PA14 (Lee y col., 2006), *P. entomophila* L48 (Vodovar y col., 2006), *P. stutzeri* A1501 (Yan y col., 2008), *P. mendocina* ymp (<http://www.jgi.doe.gov>, 2007), *P. putida* F1 (<http://www.jgi.doe.gov>, 2007, [http://genome.jgi-psf.org/finished\\_microbes/pseme/pseme.info.html](http://genome.jgi-psf.org/finished_microbes/pseme/pseme.info.html)), *P. putida* GB1 (<http://www.jgi.doe.gov>,

2008), *P. putida* W619 (<http://www.jgi.doe.gov> , 2008), *P. aeruginosa* LESB58 (Winstanley y col., 2009).

El análisis del genoma de cinco especies diferentes de *Pseudomonas* ha revelado que comparten unos 2000 genes de entre los 4000-6400 genes que se han identificado (del Castillo Santaella, 2008) , aunque muchos de ellos sin función conocida, aún. El porcentaje de contenido de G+C del DNA genómico está comprendido entre 58-67%.

Las cepas del género *Pseudomonas* son muy tolerantes y resistentes a agentes tóxicos presentes en suelos, incluyendo antibióticos, desinfectantes, detergentes, metales pesados y disolventes orgánicos. En este género es característica la presencia de plásmidos y transposones conjugativos o transmisibles que codifican los genes necesarios para el metabolismo de hidrocarburos y la resistencia a agentes nocivos. Por esta razón existe un gran interés en explorar las características de estas bacterias con vistas a sus posibles aplicaciones en biotecnología, incluyendo la biorremediación de sitios contaminados (Timmis y col., 1994; Dejonghe y col., 2001), la mejora de la calidad de combustibles mediante desulfurización (Galán y col., 2000), la biocatálisis para la producción de sustancias químicas de valor añadido (Zeyer y col., 1985; Wubbolts y Timmis, 1990; Schmid y col., 2001; Rojas y col., 2004), la producción de bioplásticos (Olivera y col., 2001) y agentes que fomentan el crecimiento de plantas y el control de plagas en plantas (Walsh y col., 2001).

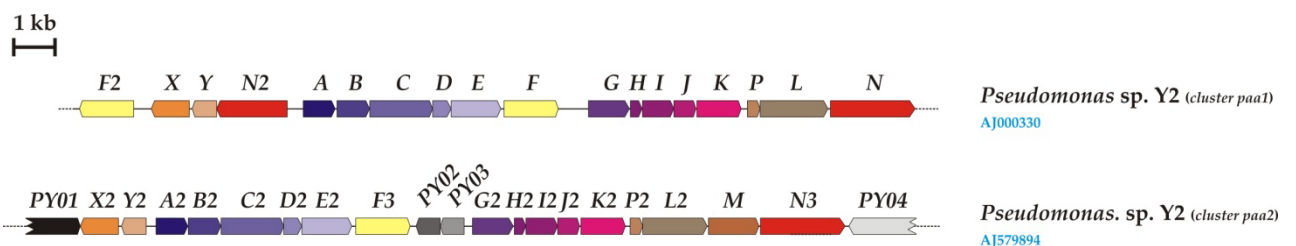
### **2.7. *Pseudomonas* sp. Y2.**

Este trabajo que se describe en esta Memoria se ha centrado en el estudio de la regulación transcripcional de los genes responsables del catabolismo del AFA en *Pseudomonas* sp. Y2.

En 1991 se informó a la comunidad científica del hallazgo de una bacteria perteneciente al género *Pseudomonas*, aislada a partir de suelos contaminados con gasolina, que era capaz de crecer utilizando como única fuente de carbono y energía los siguientes compuestos: estireno, etilbenceno, 2-feniletanol, 1-feniletanol, acetofenona, fenilacetato y mandelato (Utkin y col., 1991). Los autores del hallazgo la denominaron *Pseudomonas* sp. Y2 y propusieron que la degradación del etilbenceno y estireno ocurría vía 2-feniletanol y fenilacetato, aunque sin descartar la existencia de rutas alternativas.

Fue en 1996 cuando nuestro grupo de investigación comenzó los estudios sobre la cepa *Pseudomonas* sp. Y2. Los primeros trabajos se centraron en reproducir su cultivo en etilbenceno, con objeto de analizar la ruta de degradación de este compuesto, pero todos los intentos fueron infructuosos, sin que a día de hoy se haya podido precisar la causa de esta

pérdida de capacidad metabólica (Alonso, 2002). Por otro lado se logró la caracterización genética y funcional de los genes que codifican la ruta superior de degradación del estireno (genes *sty*) (Velasco y col., 1998; Alonso, 2002a) integrada por las actividades enzimáticas encargadas de la transformación del estireno en AFA. Posteriormente, se llevó a cabo la caracterización de los genes responsables de la ruta inferior de degradación del estireno, también denominada ruta de degradación del AFA (genes *paa*) (Alonso y col., 2003; Bartolomé-Martín y col., 2004; Bartolomé-Martín, 2006), que supone la transformación de este último compuesto en intermediarios del ciclo de Krebs. En *Pseudomonas* sp. Y2 se ha descubierto la coexistencia de dos *clusters* funcionales para la degradación del AFA, denominados *clusters paa1* y *paa2*, respectivamente (Figura 2.10.). El primero se encuentra localizado contiguo de los genes *sty*, mientras que el *cluster paa2* se localiza en otro lugar del cromosoma.



**Figura 2.10. Organización de los genes *paa* en los *cluster paa1* y *paa2* de *Pseudomonas* sp. Y2.** Se observan claramente las diferencias más importantes entre ambos *cluster*.

Los *clusters paa1* y *paa2* de *Pseudomonas* sp. Y2 son parecidos pero no idénticos. La organización de los genes *paa2* es prácticamente igual a la de los genes *paa* de *P. putida* KT2440 (Luengo y col., 2001; Jiménez y col., 2002; Nelson y col., 2002). Sin embargo, al comparar los *clusters paa1* y *paa2* entre sí, se aprecian algunas diferencias: (a) el *cluster paa1* carece de la copia de *paaM* presente en *paa2*, que codifica una porina putativa; (b) el *cluster paa1* presenta una copia del gen *paaN2*, ausente en el *cluster paa2* y cuya función se encuentra en estudio; (c) en el *cluster paa2* aparecen, entre los genes *paaF3* y *paaG2*, los ORFs PY02 y PY03, ausentes en el *cluster paa1* y cuya función es desconocida; (d) el *cluster paa1* contiene una copia adicional de *paaF*, denominada *paaF2*; Ambos genes codifican proteínas con actividad FA-CoA ligasa (Velasco y col., 1998; Alonso y col., 2003).



*Objetivos*





### 3. OBJETIVOS

El objetivo principal de este trabajo fue el avance en el conocimiento del proceso degradativo del AFA en *Pseudomonas* sp. Y2. Para conseguir este objetivo se plantearon las siguientes líneas de actuación:

1. La determinación de la organización en operones de los genes pertenecientes al *cluster paa1* de *Pseudomonas* sp. Y2.
2. La identificación y estudio de los promotores que conducen la transcripción de los genes del *cluster paa1*.
3. La determinación del patrón de expresión de las proteínas Paa de los *cluster paa1* y *paa2* en diferentes medios.
4. El estudio del papel de la funcionalidad de PaaY en la degradación de AFA.



*Material y métodos*

---

---



## 4. MATERIAL Y MÉTODOS.

### 4.1. Estirpes bacterianas.

Las estirpes bacterianas usadas en este trabajo así como su procedencia y características genotípicas y fenotípicas más relevantes se muestran en la siguiente tabla:

**Tabla 4.1. Estirpes bacterianas.**

Estirpe	Genotipo/fenotipo relevante	Referencia
<i>Pseudomonas</i> sp. Y2	AFA+, STY+, Ap <sup>R</sup> , Cm <sup>R</sup> , Km <sup>S</sup> , Tc <sup>S</sup> , Sm <sup>S</sup> , lacZ-	(Utkin y col., 1991)
<i>Pseudomonas</i> sp. Y2 K1	<i>Pseudomonas</i> sp. Y2 Δ <i>paa1</i> ::Km <sup>R</sup> , AFA+, STY+, Ap <sup>R</sup> , Cm <sup>R</sup> , Km <sup>R</sup> , Tc <sup>S</sup> , Sm <sup>S</sup> , lacZ-	(Bartolomé-Martín y col., 2004)
<i>Pseudomonas</i> sp. Y2 T2	<i>Pseudomonas</i> sp. Y2 Δ <i>paa2</i> ::Tc <sup>R</sup> , AFA+, STY+, Ap <sup>R</sup> , Cm <sup>R</sup> , Km <sup>S</sup> , Tc <sup>R</sup> , Sm <sup>S</sup> , lacZ-	(Bartolomé-Martín y col., 2004)
<i>Pseudomonas</i> sp. Y2 K1 T2	<i>Pseudomonas</i> sp. Y2 Δ <i>paa1</i> ::Km <sup>R</sup> , Δ <i>paa2</i> ::Tc <sup>R</sup> , AFA-, STY-, Ap <sup>R</sup> , Cm <sup>R</sup> , Km <sup>R</sup> , Tc <sup>R</sup> , Sm <sup>S</sup> , lacZ-	(Bartolomé-Martín y col., 2004)
<i>Pseudomonas</i> sp. Y2 C1	<i>Pseudomonas</i> sp. Y2 <i>crc</i> ::Tc <sup>R</sup> , AFA+, STY+, Ap <sup>R</sup> , Cm <sup>R</sup> , Km <sup>S</sup> , Tc <sup>R</sup> , Sm <sup>S</sup> , lacZ-	(Bartolomé-Martín, 2006)
<i>Pseudomonas</i> sp. Y2 T2X1	<i>Pseudomonas</i> sp. Y2 T2 Δ <i>paaX1</i> ::Km <sup>R</sup> , AFA+, STY+, Ap <sup>R</sup> , Cm <sup>R</sup> , Km <sup>R</sup> , Tc <sup>R</sup> , Sm <sup>S</sup> , lacZ-	(del Peso-Santos y col., 2006)
<i>Pseudomonas</i> sp. Y2 T2N1	<i>Pseudomonas</i> sp. Y2 T2 <i>paaN1</i> ::Km <sup>R</sup> , Ap <sup>R</sup> , Cm <sup>R</sup> , Km <sup>R</sup> , Tc <sup>R</sup> , Sm <sup>S</sup> , lacZ-	(Mascaraque-Martín, 2009)
<i>Pseudomonas</i> sp. Y2 T2N2	<i>Pseudomonas</i> sp. Y2 T2 <i>paaN2</i> ::Km <sup>R</sup> , Ap <sup>R</sup> , Cm <sup>R</sup> , Km <sup>R</sup> , Tc <sup>R</sup> , Sm <sup>S</sup> , lacZ-	(Mascaraque-Martín, 2009)
<i>Pseudomonas</i> sp. Y2 K1N3	<i>Pseudomonas</i> sp. Y2 K1 <i>paaN3</i> ::Tc <sup>R</sup> , Ap <sup>R</sup> , Cm <sup>R</sup> , Km <sup>R</sup> , Tc <sup>R</sup> , Sm <sup>S</sup> , lacZ-	(Mascaraque-Martín, 2009)
<i>Pseudomonas</i> sp. Y2 T2Y1	<i>Pseudomonas</i> sp. Y2 T2 Δ <i>paaY1</i> ::Km <sup>R</sup> , Ap <sup>R</sup> , Cm <sup>R</sup> , Km <sup>R</sup> , Tc <sup>R</sup> , Sm <sup>S</sup> , lacZ-	Este trabajo
<i>Pseudomonas</i> sp. Y2 T2Y1Pn2	<i>Pseudomonas</i> sp. Y2 T2 Δ <i>paaY1</i> ::Km <sup>R</sup> ::Pn2, Ap <sup>R</sup> , Cm <sup>R</sup> , Km <sup>R</sup> , Tc <sup>R</sup> , Sm <sup>S</sup> , lacZ-	Este trabajo
<i>Pseudomonas</i> sp. Y2 T2R1	<i>Pseudomonas</i> sp. Y2 T2 Δ <i>paaN2Y1X1</i> ::Km <sup>R</sup> , Ap <sup>R</sup> , Cm <sup>R</sup> , Km <sup>R</sup> , Tc <sup>R</sup> , Sm <sup>S</sup> , lacZ-	Este trabajo
<i>Escherichia coli</i> CC118 λpir	F Δ( <i>ara-leu</i> ) <i>araD</i> Δ <i>lacX74</i> <i>galE</i> <i>galK</i> <i>phoA20</i> <i>thi-1</i> <i>rpsE</i> <i>rpoB</i> <i>argE</i> (Am) <i>recA1</i> lisógeno λpir	(Herrero y col., 1990)
<i>Escherichia coli</i> DH5α	F <i>endA1</i> <i>hsdR17</i> (r <sub>k</sub> <sup>-</sup> m <sub>k</sub> <sup>+</sup> ) <i>supE44</i> <i>thi-1</i> <i>recA1</i> <i>gyrA</i> (Nal <sup>R</sup> ) <i>relA1</i> D( <i>argF-lac</i> )U169 <i>deoR</i> (f80 <i>dlacD</i> ( <i>lacZ</i> )M15)	(Sambrook y col., 1989)
<i>Escherichia coli</i> DH5αF'	F' <i>endA1</i> <i>hsdR17</i> (r <sub>k</sub> <sup>-</sup> m <sub>k</sub> <sup>+</sup> ) <i>glnV44</i> <i>thi-1</i> <i>recA1</i> <i>gyrA</i> (Nal <sup>R</sup> ) <i>relA1</i> D( <i>lacIZYA-argF</i> )U169 <i>deoR</i> (f80 <i>dlacD</i> ( <i>lacZ</i> )M15)	(Woodcock y col., 1989)

**Tabla 4.1. Estirpes bacterianas (continuación).**

Estirpe	Genotipo/fenotipo relevante	Referencia
<i>Escherichia coli</i> HB101	F <sup>-</sup> <i>thi-1 hsdS20</i> (r <sub>B</sub> <sup>-</sup> m <sub>B</sub> <sup>-</sup> ) <i>recA13 ara-14 leuB6 proA2 lacY1 galK2 rpsL20</i> (Sm <sup>R</sup> ) <i>xyl-5 mtl-1 supE44</i>	(Boyer y Roulland-Dussoix, 1969)
<i>Escherichia coli</i> S17-1 λpir	F <sup>+</sup> <i>recA thi pro hsdR M<sup>+</sup> RP4::2-Tc::Mu::Km Tn7</i> Tp <sup>R</sup> Sm <sup>R</sup> lisógeno λpir	(de Lorenzo y Timmis, 1994)
<i>Escherichia coli</i> W	(ATCC11105) derivada de <i>E. coli</i> ATCC9637 auxótrofa para la vitamina B <sub>12</sub> . AFA <sup>+</sup> , STY <sup>-</sup>	(Davis y Mingioli, 1950)
<i>Escherichia coli</i> W14	<i>E. coli</i> W Δ <i>paa</i> . AFA <sup>-</sup> , STY <sup>-</sup>	(Ferrández y col., 1997)
<i>Escherichia coli</i> W14Rif	<i>E. coli</i> W Δ <i>paa</i> . AFA <sup>-</sup> , STY <sup>-</sup> , Rif <sup>R</sup>	(Ferrández y col., 1997)
<i>Escherichia coli</i> AF141	<i>E. coli</i> W14Rif Δ <i>lacZ</i> , Δ <i>paa</i> , AFA <sup>-</sup> , STY <sup>-</sup> , Rif <sup>R</sup>	(Ferrández y col., 1998)

## 4.2. Plásmidos.

A continuación se presentan todos los plásmidos empleados en este trabajo reseñando las características más relevantes así como su origen.

**Tabla 4.2 Plásmidos.**

Plásmido	Marcador	Características	Referencia
pBluescript II KS <sup>+</sup>	Ap <sup>R</sup>	Fagómido derivado de pUC19 con los orígenes de replicación f1 y ColE1, P <sub>lac</sub> , lacZα	Stratagene™
pBluescript II SK <sup>+</sup>	Ap <sup>R</sup>	Fagómido derivado de pUC19 con los orígenes de replicación f1 y ColE1, P <sub>lac</sub> , lacZα	Stratagene™
pBKm	Ap <sup>R</sup> , Km <sup>R</sup>	Derivado de pBluescript II KS <sup>+</sup> con inserto <i>EcoRI/XbaI</i> con Δ <i>paaN2::Km<sup>R</sup></i> y Δ <i>paaA</i> de la región <i>paa1</i> de <i>Pseudomonas</i> sp. Y2	(Bartolomé-Martín, 2006)
pFA	Ap <sup>R</sup>	Derivado de pBluescript II KS <sup>+</sup> , con inserto <i>HindIII/XbaI</i> de 20,4kb con la región <i>paa1</i> de <i>Pseudomonas</i> sp. Y2	(Bartolomé-Martín, 2006)
pFA0.7HidPst		Derivado de pBluescript II KS <sup>+</sup> con inserto <i>PstI</i> de 0,7 kb con Δ <i>paaN</i> de la región <i>paa1</i> de <i>Pseudomonas</i> sp. Y2	(Bartolomé-Martín, 2006)
pFA2.5Sal	Ap <sup>R</sup>	Derivado de pBluescript II KS <sup>+</sup> con inserto <i>SalI</i> de 2,5 kb con los genes <i>paaGHIΔJ</i> de <i>Pseudomonas</i> sp. Y2	(Bartolomé-Martín, 2006)
pIZ1016	Gm <sup>R</sup>	Vector de amplio rango de huésped derivado de pBBR1MCS-5 y pMM40; <i>oriPBBR1, P<sub>lac</sub>, lacI<sup>q</sup></i>	(Martínez-Perez y col., 2004)
pIZexN2	Gm <sup>R</sup>	Derivado de pIZ1016 con inserto correspondiente al gen <i>paaN2</i> clonado en <i>EcoRI/XbaI</i>	(Mascaraque-Martín, 2009)
pIZN	Gm <sup>R</sup>	Derivado de pIZ1016 con inserto correspondiente al gen <i>paaN</i> clonado en <i>SalI/XbaI</i> .	(Mascaraque-Martín, 2009)
pIZN3	Gm <sup>R</sup>	Derivado de pIZ1016 con inserto correspondiente al gen <i>paaN3</i> clonado en <i>EcoRI/XbaI</i> .	(Mascaraque-Martín, 2009)

Tabla 4.2 Plásmidos (continuación).

Plásmido	Marcador	Características	Referencia
pIZX	Gm <sup>R</sup>	Derivado de pIZ1016 con inserto correspondiente al gen <i>paaX</i> clonado en <i>EcoRI/XbaI</i> .	(Bartolomé-Martín, 2006)
pKDN2KmDX	Sm <sup>R</sup> , <i>sacB</i> , Km <sup>R</sup>	Derivado de pKNG101 con casete de Km <sup>R</sup> entre un inserto del final del gen <i>paaN2</i> y principio de <i>paaX</i> de <i>Pseudomonas</i> sp. Y2 para la delección de <i>paaY</i> .	Este trabajo
pKDN2KmPn2DX	Sm <sup>R</sup> , <i>sacB</i> , Km <sup>R</sup>	Derivado de pKNG101 con el casete de Km <sup>R</sup> y un inserto del final del gen <i>paaN2</i> (región promotora de <i>paaN2</i> ) entre el principio de <i>paaX</i> y el final de <i>paaN2</i> de <i>Pseudomonas</i> sp. Y2 para la delección de <i>paaY</i> .	Este trabajo
pKNG101	Sm <sup>R</sup> , <i>sacB</i>	<i>oriR6K</i> , <i>mob</i> RP4, vector “suicida” para mutagénesis mediante inserción de marcadores por recombinación homóloga, <i>sacB</i> .	(Kaniga y col., 1991)
pKPN2KmXF2	Sm <sup>R</sup> , <i>sacB</i> , Km <sup>R</sup>	Derivado de pKNG101 con el casete de Km <sup>R</sup> entre un inserto de la región promotora de <i>paaN2</i> y la región intergénica comprendida entre <i>paaX</i> y <i>paaF2</i> de <i>Pseudomonas</i> sp. Y2; para la delección de <i>paaN2</i> , <i>paaY</i> , <i>paaX</i> .	Este trabajo
pMPO234	Ap <sup>R</sup> Pip <sup>R</sup>	Vector de amplio rango de huésped derivado de pBBR1MCS-4 y pJES379 para fusiones transcripcionales y prueba de promotores. <i>rep</i> , <i>mob</i> .	(García-González y col., 2005)
pMPa	Ap <sup>R</sup> Pip <sup>R</sup>	Derivado de pMPO234 con un inserto de 390 pb de la región precedente a <i>paaA</i> , clonado en <i>EcoRI/BamHI</i>	Este trabajo
pMPg	Ap <sup>R</sup> Pip <sup>R</sup>	Derivado de pMPO234 con un inserto de 791 pb de la región precedente a <i>paaG</i> , clonado en <i>EcoRI/BamHI</i>	Este trabajo
pMPn2	Ap <sup>R</sup> Pip <sup>R</sup>	Derivado de pMPO234 con un inserto de 378 pb de la región precedente a <i>paaN2</i> , clonado en <i>EcoRI/SmaI</i>	Este trabajo
pMPp	Ap <sup>R</sup> Pip <sup>R</sup>	Derivado de pMPO234 con un inserto de 180 pb de la región precedente a <i>paaP</i> , clonado en <i>EcoRI/BamHI</i>	Este trabajo
pMPx	Ap <sup>R</sup> Pip <sup>R</sup>	Derivado de pMPO234 con un inserto de 413 pb de la región precedente a <i>paaX</i> , clonado en <i>EcoRI/BamHI</i>	Este trabajo
pMPy	Ap <sup>R</sup> Pip <sup>R</sup>	Derivado de pMPO234 con un inserto de 719 pb de la región precedente a <i>paaY</i> , clonado en <i>EcoRI/BamHI</i>	Este trabajo
pRK600	Cm <sup>R</sup>	Proporciona las funciones <i>tra</i> para la conjugación bacteriana; no replicativo en <i>Pseudomonas</i>	(Kessler y col., 1992)
pUC18	Ap <sup>R</sup>	Vector de clonación, <i>oriMB1</i> , <i>P<sub>lac</sub></i> , <i>lacZα</i>	(Sambrook y Russell, 2001)
pUC19	Ap <sup>R</sup>	Vector de clonación, <i>oriMB1</i> , <i>P<sub>lac</sub></i> , <i>lacZα</i>	(Sambrook y Russell, 2001)

**Tabla 4.2 Plásmidos (continuación).**

Plásmido	Marcador	Características	Referencia
pUC4K	Ap <sup>R</sup> , Km <sup>R</sup>	Plásmido con casete de Km <sup>R</sup> flanqueado por dianas de restricción	(Taylor y Rose, 1988)
pVLT31	Tc <sup>R</sup>	<i>ori</i> RSF1010, <i>lac</i> F <sup>l</sup> , <i>P<sub>tac</sub></i>	(de Lorenzo y col., 1993)
pVLTX1	Tc <sup>R</sup>	Derivado de pVLT31 con un inserto correspondiente al gen <i>paaX1</i> de <i>Pseudomonas</i> sp. Y2	(del Peso-Santos y col., 2006)

### 4.3. Oligonucleótidos.

La síntesis de los oligonucleótidos utilizados en este trabajo fue encargada a la empresa SIGMA-Genosys. El nombre y la secuencia de los oligonucleótidos empleados en el desarrollo de este trabajo, así como el fin con el que se han utilizado en cada caso, se detallan en la siguiente tabla. Las secuencias de reconocimiento de enzimas de restricción que aparecen en algunos de los oligonucleótidos (introducidas artificialmente) se han señalado mediante subrayado.

**Tabla 4.3. Oligonucleótidos.**

Nombre	Secuencia (5'→3')	Utilización
T3	AATTAACCCTCACTAAAGGG	Secuenciación de insertos de plásmidos derivados de pBluescript II KS(+)
T7	GTAATACGACTCACTATAGGGC	
Mod1F	CCGGAATTCAAGGGCTCGGTCCGTGAGCA	Amplificación de <i>styS</i> como control negativo de RT-PCR.
Mod2R	GCTCTAGACTATTGAACGAAGTCTGCATTGTG	Amplificación de <i>styS</i> como control negativo de RT-PCR.
PaaF2-1(F)	CCCAGGCGCAGCTTGAGGTC	Amplificación de <i>paaF2</i> para RT-PCR
PaaF2-1(R)	CTCCACCAGCTATCGGCGCTC	Amplificación de <i>paaF2</i> para RT-PCR
EcoPf2	CTGCTGGAATTCACCATAGCTGCCTGCC	Comprobación de la cotranscripción de <i>paaX-paaF2</i> por RT-PCR.
BamPf2	GGTATTGGGGATCCTGTTTCATGACGTTACTC	
PaaX1(F)	CGGCAGGCTGGAGCTGTAGA	Comprobación de la cotranscripción de <i>paaY-paaX</i> por RT-PCR.
PaaY1(R)	CCGAGCAATCCCTGGTGATG	Comprobación de la cotranscripción de <i>paaN2-paaY</i> por RT-PCR.
PaaY'(F)	GGCCGATATGACCGTTGCAC	
PaaN2'(R)	AGCGACCGTGCGGCCTAC	Comprobación de la cotranscripción de <i>paaN2-paaA</i> por RT-PCR. Control negativo.
ControlN2(F)	GGGTCAAAAGCATCGAGAAA	
ControlA(R)	GCAGGGTGATCAGGCGTA	Comprobación de la cotranscripción de <i>paaA-paaB</i> por RT-PCR.
PaaA'(F)	CGCTCAATGCCCTCAATAC	
PaaB(R)	GTAGATCAGCCCCACTGTTC	Comprobación de la cotranscripción de <i>paaB-paaC</i> por RT-PCR.
PaaB'(F)	ACCTACGGCCTGGCACTGAT	
PaaC'(R)	GATCGACAGCGACGAGGTGT	Comprobación de la cotranscripción de <i>paaC-paaD</i> por RT-PCR.
PaaC'(F)	CGGGGTCAATTACCCACAGG	
PaaD'(R)	GTTGCCTGTGCTGGTTCTCG	Comprobación de la cotranscripción de <i>paaD-paaE</i> por RT-PCR.
PaaD''(F)	GCCTTCGCTGCAACAGCTA	
PaaE''(R)	CGCGGACATAGACTCCACA	Comprobación de la cotranscripción de <i>paaE-paaF</i> por RT-PCR.
PaaE'(F)	CACGCGCAAGGTACTGGAAC	
PaaF'(R)	GATACAGCGGGACGTTGTCCG	

Tabla 4.3. Oligonucleótidos (continuación).

Nombre	Secuencia (5'→3')	Utilización
EcoPg	CTCGGAATTC AAGGCCTGCCACGTCTAC	Comprobación de la cotranscripción de <i>paaF-paaG</i> por RT-PCR.
BamPg	CGCCGGATCCA ACCAGTTGTGCGTACAT	
PaaG-2-(F)	ATTCCCAACATGCCACT	Comprobación de la cotranscripción de <i>paaG-paaH</i> por RT-PCR.
PaaH(R)	AACTCGTAGAAGCTGGCGTG	Comprobación de la cotranscripción de <i>paaH-paaI</i> por RT-PCR.
PaaH(F)	GAGTGGACCC TTTTCGAAGTC	
PaaI(R)	ACAGGCGTTGTTCTACTTCGTC	
PaaI(F)	GAACCACGACCTGATCGAATAC	Comprobación de la cotranscripción de <i>paaI-paaJ</i> por RT-PCR.
PaaJ(R)	TGCACTTGAAATAGTCAATGG	
PaaJ(F)	GCGACCTGGTGAGCTGAT	Comprobación de la cotranscripción de <i>paaJ-paaK</i> por RT-PCR.
3' paaK	CCTGCGGGCCACAAATGAA	
PaaJ(F)	GCGACCTGGTGAGCTGAT	Comprobación de la cotranscripción de <i>paaJ-paaK-paaP</i> por RT-PCR.
PaaP(R)	GATCGAGAACCTTGTGGTCTG	
5' paaK	GCGCCGCTCCTACTCCATCTG	Comprobación de la cotranscripción de <i>paaK-paaP</i> por RT-PCR.
PaaP(R)	GATCGAGAACCTTGTGGTCTG	
PaaP(F)	AAAGAGAGAGCGACCATGACTC	Comprobación de la cotranscripción de <i>paaP-paaL</i> por RT-PCR.
PaaL2	GGTGCTGAAGTTGAAGTGCCTGAG	
PaaL4	GCTCGGCCAGCGATTCTATACA	Comprobación de la cotranscripción de <i>paaL-paaN</i> por RT-PCR.
PaaN1	GGTGAAGTCCAGGGTCTCCTCGTG	
PaaN2"(F)	GGTGGCGTGGAAGTCACTGAA	Comprobación de la transcripción de <i>paaN2</i> por RT-PCR.
PaaN2"(R)	ATCTCAAGGCGGTGGCGAAG	
PaaY(F)	GCTGGGCTAGCAACTGGTACT	Comprobación de la transcripción de <i>paaY</i> por RT-PCR.
PaaY(R)	ATCGGTCCGAAGTCTATGTC	
PaaN4	CCCTACCCTGCAGAGTTTCAT	Comprobación de la transcripción de <i>paaN</i> por RT-PCR.
PaaN5	TTGCGTTCGCTAAGGTATTTG	
BamX3	AGCAGGATCCGGGCAAGGAAGCAGTC	Amplificación de la sonda de <i>paaX</i> para <i>northern blot</i> con diana <i>ApaI</i>
ApaX5	GCAACGGGCCAGGACAAGCG	
Ligup	CGGAATTCGCCCTCACACTCAACG	Amplificación de la sonda de <i>paaF</i> para <i>northern blot</i>
Sm1.4	CGAACATGCCGAAGGGG	
PaaP(F)	AAAGAGAGAGCGACCATGACTC	Amplificación de la sonda de <i>paaP</i> para <i>northern blot</i>
PaaP(R)	GATCGAGAACCTTGTGGTCTG	
KmUp	TCAGCAACACCTTCTTCACG	Secuenciación y amplificación desde los extremos del casete de Km <sup>R</sup> hacia el exterior.
KmDown	TTGAGACACAACGTGGCTTT	
BamHI-Px_JR	GGCGGATCCGTGGGGCGAGGGACGTCATAGG	Amplificación de la región promotora de <i>paaX</i> , diana <i>BamHI</i>
EcoRI-Px_JR	GCCGAATTCGCGAGGACGTGCTGGTGGGG	Amplificación de la región promotora de <i>paaX</i> , diana <i>EcoRI</i>
BamHI-Py_JR	CCGGGATCCGGCCATTGAGGCTATA	Amplificación de la región promotora de <i>paaY</i> , diana <i>BamHI</i>
EcoRI-Py_JR	CTGGAATTCCTCCCTCAGCCTCTATT	Amplificación de la región promotora de <i>paaY</i> , diana <i>EcoRI</i>
Romo-Pn2_JR	TGTGGCATTGGCCGCATGGTGGGGA	Amplificación de la región promotora de <i>paaN2</i> .
EcoRI-Pn2_JR	TGACGAATTCCTCAGGCTGCACGCAC	Amplificación de la región promotora de <i>paaN2</i> , diana <i>EcoRI</i>
EcoRI-Pa_JR	TCGAATTCGGTCAAAGCATCGAGAAAAAC	Amplificación de la región promotora de <i>paaA</i> , diana <i>EcoRI</i>
BamPa	TGTTCCGGGCGGATCCACGCTAAGGGTAT	Amplificación de la región promotora de <i>paaA</i> , diana <i>BamHI</i>
EcoPg	CTCGGAATTC AAGGCCTGCCACGTCTAC	Amplificación de la región promotora de <i>paaG</i> , diana <i>EcoRI</i>

**Tabla 4.3. Oligonucleótidos (continuación).**

Nombre	Secuencia (5'→3')	Utilización
BamHI-Pg_JR	CGCCGGTCCGATCCAGTTGTGCGTACAT	Amplificación de la región promotora de <i>paaG</i> , diana <i>BamHI</i>
EcoRI-Pl-Pp_JR	GTACTCGAATTCGACCAGATTTGATTGAGCACCC	Amplificación de la región promotora de <i>paaP</i> , diana <i>EcoRI</i>
BamHI-Pp_JR	CCGGATCCTGCGGAGTCATGGTCGCTCTCT	Amplificación de la región promotora de <i>paaP</i> , diana <i>BamHI</i>
N2.5'_EcoRV	ACCGATATCAGGCCATTGAGGCTATAGCA	Amplificación de fragmento final <i>paaN2</i> para delección de <i>paaY</i> , diana <i>EcoRV</i>
N2.3'_SalI	CCAGGTCGACGATACCCTGGCCAGCGCCATCAATG	Amplificación de fragmento final <i>paaN2</i> para delección de <i>paaY</i> , diana <i>SalI</i> .
X5'_XbaI	GAGCTCTAGACGCGCTTGAAGG	Amplificación de fragmento inicial de <i>paaX</i> para delección de <i>paaY</i> , diana <i>XbaI</i>
X3'_BamHI	GCGGATCCCGACCGGGGCTTGCGA	Amplificación de fragmento inicial de <i>paaX</i> para delección de <i>paaY</i> , diana <i>BamHI</i> .
BamPa	TGTTCCGGGCGGATCCACGCTAAGGGTAT	Amplificación de región promotora de <i>paaN2</i> para clonarlo en el mutante de <i>paaY</i> , diana <i>BamHI</i> .
BamHI_Pn2_mutY	TGGTGGGATCCTCGTATCGGGTCAAAA	Amplificación de región promotora de <i>paaN2</i> para clonarlo en el mutante de <i>paaY</i> , diana <i>BamHI</i> .
PaaX1 (F)	CGGCAGGCTGGAGCTGTAGA	Amplificación para la comprobación del mutante por delección de <i>paaY</i> y sustitución por casete de Km <sup>R</sup> .
PaaN2' (R)	AGCGACCGTGC GG CCTAC	
PaaY (F)	GCTGGGCTAGCAACTGGTACT	Amplificación de <i>paaY</i> para la comprobación del mutante defectivo en <i>paaY</i> .
PaaY (R)	ATCGGTCCGA ACTGCTATGTC	
X3	GCTCTAGACCAGCAGCGGATTCGAG	Amplificación del gen <i>paaX</i> para su clonaje en pIZ1016
X5	CGGAATTCGAAAGGCCAGGTGTGATG	
IniF2_Sac I-F	ACGGAGCTCTCGGGGCGGGT	Amplificación de de región intergénica entre <i>paaX</i> y <i>paaF2</i> para realizar mutante defectivo en <i>paaN2YX</i> , diana <i>SacI</i> .
FinX_Xba I-R	GCTCTCTAGAATCCGCTGCT	Amplificación de de región intergénica entre <i>paaX</i> y <i>paaF2</i> para realizar mutante defectivo en <i>paaN2YX</i> , diana <i>XbaI</i> .
PF2_3	TCCTGCCGCTCTTACATCTC	Amplificación para la comprobación del mutante por delección de <i>paaN2YX</i> y sustitución por casete de Km <sup>R</sup> .
PaaN2 (R)	ATTCTCCAGCGACTCAATGC	

## 4.4. Medios, conservación y condiciones de cultivo de microorganismos.

### 4.4.1. Conservación.

La conservación de las diferentes bacterias se llevó a cabo por congelación a  $-80^{\circ}\text{C}$  en medio de cultivo al que se añadió glicerol estéril hasta una concentración final del 20% (v/v).

### 4.4.2. Medios de cultivo.

Los medios de cultivo utilizados fueron:

- Medio Luria Bertani (LB): bacto-triptona 10 g/L, extracto de levadura 5 g/L, NaCl 10 g/L (Sambrook y col., 1989).
- Medio SOB: bacto-triptona 20 g/L, extracto de levadura 5 g/L, NaCl 10 mM, KCl 2,5 mM,  $\text{MgSO}_4$  10 mM,  $\text{MgCl}_2$  10 mM (Hanahan, 1983).
- Medio M9:  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  42 mM,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  22 mM, NaCl 10 mM,  $\text{NH}_4\text{Cl}$  20 mM,  $\text{MgSO}_4$  1 mM,  $\text{CaCl}_2$  0,1 mM, pH 7,0 (Miller, 1972).
- Medio M63:  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  100 mM,  $(\text{NH}_4)\text{SO}_4$  15 mM,  $\text{FeSO}_4$  1,7  $\mu\text{M}$ ,  $\text{MgSO}_4$  1 mM, pH 7,0 (Miller, 1972).

Los medios mínimos (M63 y M9) se complementaron con las siguientes sales a la concentración final que se indica:  $\text{FeSO}_4$  10  $\mu\text{M}$ ,  $\text{MnCl}_2$  10  $\mu\text{M}$ ,  $\text{CoSO}_4$  10  $\mu\text{M}$ ,  $\text{CaCl}_2$  10  $\mu\text{M}$ ,  $\text{CuCl}_2$  1  $\mu\text{M}$ ,  $\text{ZnSO}_4$  1  $\mu\text{M}$ . La adición de estos oligoelementos a los medios mínimos se realizó a partir de una solución 1000 veces concentrada con todos estos componentes disueltos en HCl 1N (“solución 1000X de sales MT”).

Los medios M9 y M63 se suplementaron con la fuente de carbono apropiada a la concentración final siguiente: AFA al 0,2 ó 0,4% (p/v), glicerol al 0,1, 0,4 ó 1% (p/v) para los cultivos de *Pseudomonas* y 0,1% (p/v) para *E. coli*, y estireno en fase gaseosa (concentración saturante).

Los medios de cultivo se esterilizaron en un autoclave 21L (Matachana) durante 30 minutos a  $121^{\circ}\text{C}$  y una presión de 1  $\text{kg}/\text{cm}^2$ .

### 4.4.3. Procedimientos de cultivo.

Los cultivos en medio líquido se realizaron en tubos de ensayo o matraces tipo Erlenmeyer. La temperatura de crecimiento fue 37°C para las estirpes de *E. coli* y 28-30°C para las diferentes estirpes de *Pseudomonas*. La incubación se realizó en un agitador orbital (200-250 rpm) en el caso de los matraces, o en rotores para tubos de ensayo colocados en cámaras acondicionadas. Se monitorizó el crecimiento de los cultivos midiendo la  $DO_{600nm}$  con un espectrofotómetro DU800 (Beckman Coulter) frente al blanco apropiado.

Los cultivos en medio sólido se llevaron a cabo empleando Bacto-Agar (Pronadisa) al 1,5% (p/v) en la preparación del medio correspondiente. En el caso del LB, el agar se añadió antes de autoclavar el medio, mientras que en el del M9 y el M63 el agar se esterilizó por separado en agua y posteriormente se añadió un volumen apropiado de medio estéril diez veces concentrado, obteniéndose la concentración final adecuada. En todos los casos, tras la esterilización, se esperó a que se atemperase el medio (sin llegar a solidificar), se incorporaron los antibióticos, vitaminas, fuentes de carbono o suplementos diversos (según los casos) y se distribuyeron en placas Petri (aproximadamente 20 mL de medio por cada placa Petri).

Para la selección de los clones recombinantes utilizando el método de la  $\alpha$ -complementación de la  $\beta$ -galactosidasa (selección blanco/azul) se suplementó cada placa de LB/agar con 50  $\mu$ l de X-Gal al 2% (p/v) (en dimetilformamida).

Para la selección de las células receptoras transconjugantes dobles recombinantes (frente a las simples recombinantes) en las conjugaciones en que se transfirieron plásmidos derivados de pKNG101, se prepararon placas de LB/agar (con los antibióticos adecuados en cada caso) a las que se añadió sacarosa para conseguir una concentración final del 10% (p/v) (aproximadamente 0,4 M).

Los medios de cultivo se esterilizaron en un autoclave de 21L (Matachana) durante 30 minutos a 121°C de temperatura y una presión de 1kg/cm<sup>2</sup>.

### 4.4.4. Vitaminas.

En los cultivos en medio mínimo de microorganismos auxótrofos para ciertas vitaminas, vitamina B12 y B1, (*E. coli* W14 y AF1411), éstas se añadieron a una concentración final de 1  $\mu$ g/mL.

#### 4.4.5. Antibióticos.

Los antibióticos utilizados se suministraron a las concentraciones que se detallan en la tabla 4.4. La tetraciclina se proporcionó a diferentes concentraciones finales en función del microorganismo cultivado: 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  y 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  en el caso de *Pseudomonas* sp. Y2 y 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  para las distintas estirpes de *E. coli*. Como algunas de las bacterias utilizadas en este estudio (es el caso de las distintas especies de *Pseudomonas*) pueden utilizar etanol como única fuente de carbono y energía y crecer a expensas de este sustrato, en aquellas pruebas de crecimiento en que se quiso evitar esta contingencia la tetraciclina se disolvió en agua destilada y se filtró de la manera habitual (filtro de 0,22  $\mu\text{m}$  de tamaño de poro).

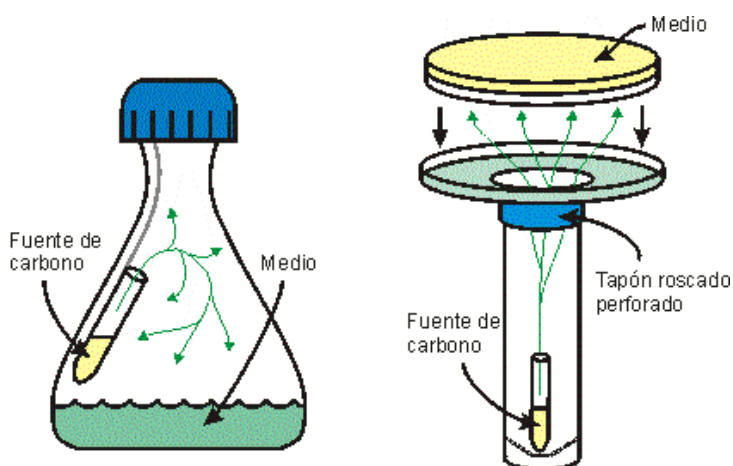
**Tabla 4.4. Antibióticos utilizados, concentraciones usadas y método de preparación.**

Antibiótico	Concentración final	Concentración stock	Disolvente	Esterilización
Ampicilina	100 $\mu\text{g}/\text{mL}$	100 mg/mL	H <sub>2</sub> O	Por filtración (filtro de 0,22 $\mu\text{m}$ de tamaño de poro)
Cloranfenicol	35 $\mu\text{g}/\text{mL}$	35 mg/mL	EtOH	No necesaria
Estreptomicina	150 $\mu\text{g}/\text{mL}$	150 mg/mL	H <sub>2</sub> O	Por filtración (filtro de 0,22 $\mu\text{m}$ de tamaño de poro)
Gentamicina	50 $\mu\text{g}/\text{mL}$	50 mg/mL	H <sub>2</sub> O	Por filtración (filtro de 0,22 $\mu\text{m}$ de tamaño de poro)
Kanamicina	50 $\mu\text{g}/\text{mL}$	50 mg/mL	H <sub>2</sub> O	Por filtración (filtro de 0,22 $\mu\text{m}$ de tamaño de poro)
Piperacilina	100 $\mu\text{g}/\text{mL}$	100 mg/mL	H <sub>2</sub> O	Por filtración (filtro de 0,22 $\mu\text{m}$ de tamaño de poro)
Tetraciclina	100 $\mu\text{g}/\text{mL}$	10 mg/mL	EtOH	No necesaria

#### 4.4.6. Suministro de compuestos aromáticos en fase gaseosa.

Para suministrar el estireno evitando el efecto tóxico que supone la administración directa sobre el cultivo, se equiparon los matraces con un depósito interno que permite la evaporación de la fuente de carbono volátil y la consiguiente saturación de la fase gaseosa (Figura 4.1). En estos cultivos se consideró que la concentración del compuesto en la fase líquida alcanzaba, al cabo de unas horas, una concentración máxima igual a su constante de solubilidad en agua.

Los cultivos en medio sólido se realizaron en placas Petri con la tapa modificada, de forma que incorporan un depósito en el que se puede dispensar el compuesto aromático, que llega a los microorganismos tras su difusión en la fase gaseosa (Figura 4.1).



**Figura 4 .1.** Sistema para el suministro de estireno a cultivos en medio líquido (izquierda) o sólido (derecha). Tomado de Alonso, 2002.

#### 4.4.7. Curvas de crecimiento.

Las cepas a estudiar se cultivaron a 28-30°C con agitación continua de 200 rpm en medio mínimo M9 suplementado con la fuente de carbono y antibióticos correspondientes. Los cultivos se diluyeron inicialmente hasta una turbidez a 600 nm ( $DO_{600nm}$ ) de 0,1 aproximadamente, en el medio de estudio. Se monitorizó el incremento de la turbidez con un espectrofotómetro DU800 (Beckman Coulter) frente al blanco apropiado, hasta que el cultivo alcanzó la fase estacionaria de crecimiento, dependiendo de la cepa, entre 20 y 80 horas.

Para la realización de cultivos seriados con células lavadas se procedió al crecimiento de las células en medio mínimo M9 con AFA 5mM hasta alcanzar la fase estacionaria, en torno a una  $DO_{600}$  de 2-2,5. Se sedimentó un volumen de células de 1-3 mL, y fueron lavadas dos veces con un volumen de medio M9 fresco. Seguidamente, se inoculó con estas células lavadas un nuevo medio mínimo M9 con AFA con el volumen necesario para conseguir un cultivo con una  $DO_{600}$  inicial de 0,1. Este cultivo se incubó siguiendo las indicaciones del inicio de éste aparatado.

### 4.5. Procedimientos de transferencia genética.

#### 4.5.1. Transformación bacteriana mediante choque térmico.

Para preparar células competentes de *E. coli* se empleó un método basado en el de (Hanahan, 1983) pero con modificaciones para conseguir una eficacia de transformación mayor,

del orden de  $10^9$  ufc/ $\mu$ g de DNA plasmídico (Inoue y col., 1990). En la preparación de las células competentes se utilizó el medio SOB (ver apartado 4.2.).

El protocolo de transformación consistió en los siguientes pasos: el DNA plasmídico o el resultado de la reacción de ligación se añadió a 200  $\mu$ L de células competentes, incubándose la mezcla durante 30 minutos en hielo. Se llevó a cabo entonces un choque térmico a 42°C durante 1 minuto y medio, con una incubación posterior en hielo de 5 minutos. A continuación se añadieron 800  $\mu$ L de medio de cultivo SOC atemperado, y se incubó a 37°C con agitación durante 1 hora, para permitir la expresión de los genes de resistencia a antibióticos codificados en los plásmidos (excepto para el caso de la tetraciclina, en el que se incrementó el tiempo de incubación a 2h). Finalmente, se sembraron las células en placas Petri con el medio sólido selectivo correspondiente y se incubaron a 37°C durante una noche.

#### 4.5.2. Electrotransformación.

Para la electrotransformación de *E. coli* con DNA plasmídico se utilizó un equipo *Gene Pulser II* acoplado a un controlador de resistencia *Pulse Controller II* (Bio-Rad), siguiendo los métodos descritos en la bibliografía (Dower y col., 1988). Las células se cultivaron en medio líquido hasta alcanzar la fase exponencial, se enfriaron a 4°C y se lavaron 2 ó 3 veces con agua destilada estéril a 4°C. Tras el último lavado se resuspendieron en un pequeño volumen de agua y se utilizaron a continuación, o bien se añadió glicerol (para alcanzar una concentración final del 20% (v/v)) y se congelaron a -80°C hasta su uso. Las transformaciones se realizaron fijando las siguientes condiciones: una diferencia de potencial de 12,5 kV/cm, una capacitancia de 25  $\mu$ F y una resistencia de 200  $\Omega$ ; se utilizó una cubeta de electroporación de 0,2 cm. Tras la transformación de las células por electroporación, se adicionó 1mL de medio LB y se procedió a su incubación a temperatura óptima durante el tiempo apropiado: para *E. coli*, a 37°C durante 1 hora (2 horas en el caso de selección mediante tetraciclina). Posteriormente se sembraron e incubaron en el medio sólido selectivo oportuno.

Para la electroporación de *Pseudomonas* con DNA plasmídico se utilizó el mismo equipo que para *E. coli*, pero con un protocolo diferente. Las células se cultivaron en medio líquido hasta alcanzar una  $DO_{600nm}$  de entre 0,8-1,0; se enfriaron a 4°C y se lavaron 3 veces con una solución de glicerol 10% (p/v) estéril a 4°C (Los lavados se llevaron a cabo en centrífuga refrigerada y 5000 rpm durante 10 minutos). Tras el último lavado se resuspende en un pequeño volumen de la solución de glicerol 10%, unos 200  $\mu$ L. Si procede se congelarán a -80°C o se usarán en el momento. Las transformaciones se realizaron fijando las siguientes condiciones: una diferencia de potencial de 8kV/cm, una capacitancia de 25  $\mu$ F y una resistencia de 200  $\Omega$ ; se utilizó una cubeta de electroporación de 0,2 cm. Como mezcla se añade 100  $\mu$ L de células

electrocompetentes y 1 µg de DNA plasmídico. Tras la transformación de las células por electroporación, se adicionó 1 mL de medio LB y se procedió a su incubación durante el tiempo apropiado: para *Pseudomonas*, a 28-30°C durante 2-3 horas. Posteriormente se sembraron en el medio sólido selectivo adecuado.

### 4.5.3. Conjugación.

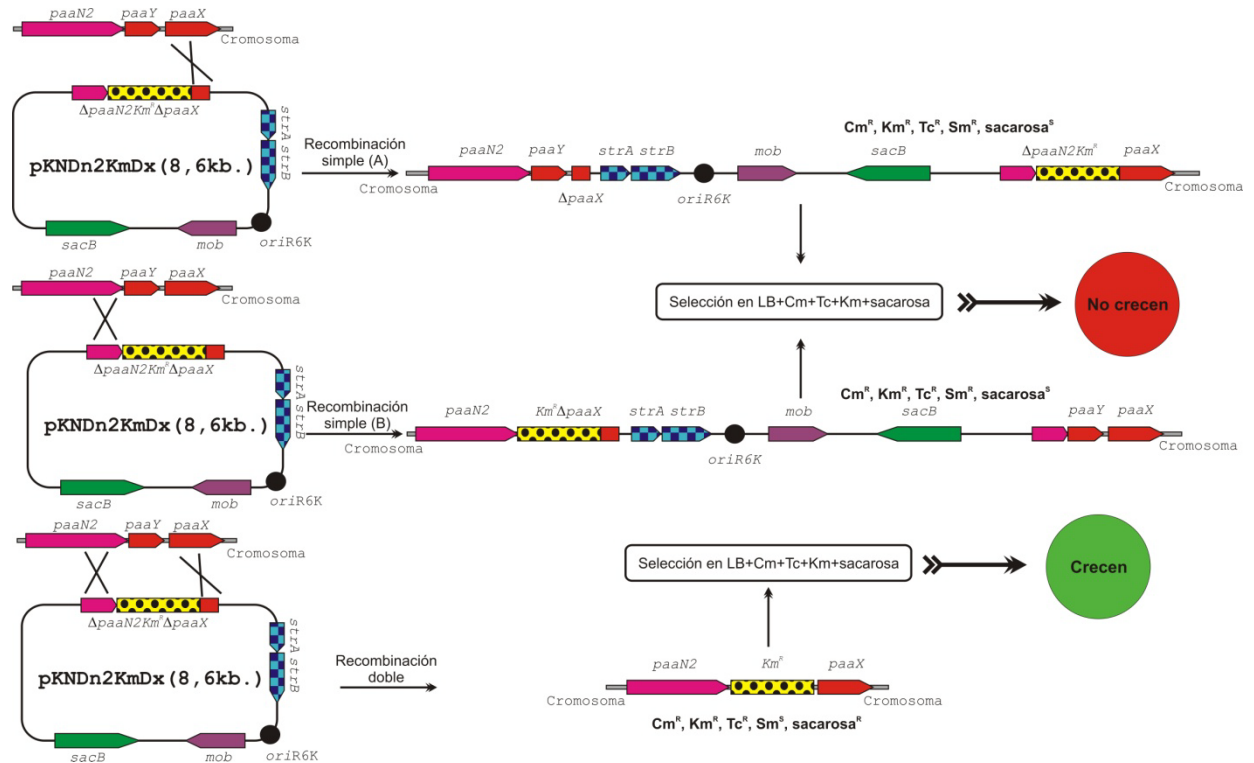
En la transferencia de plásmidos mediante conjugación se empleó generalmente la estirpe *E. coli* S17-1  $\lambda$ pir (F<sup>+</sup>), portando el plásmido a transferir (un derivado del pKNG101 en unos casos y derivados del pMPO234 en otros casos) como donadora, y estirpes F<sup>-</sup> de *Pseudomonas* como receptoras (conjugación biparental). Se cultivaron las células donadoras y receptoras por separado, en sus respectivas condiciones óptimas, hasta alcanzar la fase exponencial. Tras un lavado con una solución de cloruro sódico 0,14 M, se mezclaron en una relación 1:1 y se dispensaron sobre un filtro estéril (tamaño de poro de 0,45 µm) dispuesto sobre una placa de LB. Tras una incubación de 6-24 h a 28-30°C el filtro se recogió; las células se resuspendieron (mediante agitación con vórtex en un tubo de 15 mL estéril) y lavaron en 2mL de cloruro sódico 0,14 M, quedando finalmente suspendidas en 1 mL de la misma solución salina estéril. La siembra se realizó en medios selectivos que permitían el crecimiento exclusivamente de las células receptoras transformadas, impidiendo la proliferación tanto de las células donadoras como de las receptoras no transformadas.

En algunas ocasiones se realizaron conjugaciones triparentales, con *E. coli* CC118  $\lambda$ pir o *E. coli* DH5 $\alpha$  F' como donadoras, una estirpe F<sup>-</sup> de *Pseudomonas* como receptora y *E. coli* HB101 [pRK600] como *helper* o ayudante. En este caso, se mezclaron cantidades iguales de cada una de las estirpes, y se siguió el protocolo de la misma manera, sembrando al final el resultado de la conjugación en medios selectivos que impidiesen también el crecimiento de la estirpe ayudante (de Lorenzo y Timmis, 1994).

### 4.5.4. Construcción de mutantes por doble recombinación.

Para la construcción de mutantes por el sistema de doble recombinación se utilizó el plásmido pKNG101, que presenta un origen de replicación R6K, la región *mob* (que le permite transferirse a otras bacterias por conjugación desde estirpes donadoras F<sup>+</sup>) y el gen *sacB*. El origen R6K requiere para el inicio de la replicación de la proteína  $\pi$ , codificada por el gen *pirR6K*, el cual se encuentra integrado en el cromosoma de estirpes  $\lambda$ pir en forma de profago (Kolter y col., 1978). El gen *sacB* codifica la levansacarasa (EC 2.4.1.10), enzima cuya

expresión es inducida por la presencia de sacarosa al 10% (p/v) y produce la lisis celular en un amplio rango de bacterias gram-negativas (Gay y col., 1985). Gracias a estas dos características, este método permite seleccionar únicamente los clones en los que se ha producido doble recombinación (Figura 4.2.).



**Figura 4.2. Ejemplo ilustrativo de la selección de dobles recombinantes empleando el sistema del plásmido pKNG101.** En este caso se trata de mutar el gen *paaY* de *Pseudomonas* sp. Y2 T2 mediante la inserción de un casete de resistencia a Km ( $Km^R$ ). El plásmido pKNDn2KmDx, derivado de pKNG101, se transfiere por conjugación desde *E. coli* S17.1  $\lambda$ pir [pKNDn2KmDx] ( $Cm^S$ ,  $Km^R$ ,  $Sm^R$ ,  $sacarosa^S$ ) a *Pseudomonas* sp. Y2 T2 ( $Cm^R$ ,  $Tc^R$ ,  $Km^S$ ,  $Sm^S$ ,  $sacarosa^R$ ), según lo descrito en el apartado 5.4. El plásmido pKNDn2KmDx no es replicativo en *Pseudomonas* sp. Y2 T2. En la figura se muestran las tres posibles situaciones que pueden ocurrir en el interior de la bacteria receptora, es decir, que se de una simple recombinación homóloga (de dos formas distintas) o una doble recombinación homóloga. Al seleccionar en el medio adecuado sólo crecerán aquellas bacterias receptoras que hayan incorporado el casete de  $Km^R$  en el cromosoma y, por tanto, la mutación. *strAB*, genes que proporcionan resistencia a Sm; *sacB*, gen que codifica la levansacarasa; *oriR6K*, origen de replicación R6K; *mob*, región de movilización que permite la transferencia del plásmido por conjugación.

El DNA plasmídico fue extraído por el método rápido de lisis alcalina (Birboim y Doly, 1979) y posteriormente purificado mediante dos extracciones con fenol:cloroformo:alcohol isoamílico 25:24:1 (v/v/v) y una última extracción con cloroformo:alcohol isoamílico 24:1 (v/v/v) (Sambrook y col., 1989). Para precipitar el DNA se añadieron 2 volúmenes de etanol absoluto ó 0,8 volúmenes de isopropanol y tras una centrifugación de 15 minutos a 12.000 rpm y 4°C se lavó el sedimento con etanol 70% (v/v) para eliminar las sales. El DNA sedimentado se secó en un

termobloque a 55-60°C antes de resuspenderlo en agua destilada y desionizada o en TE 0,2X (Tris·HCl 2 mM, EDTA 0,2 mM, pH 8,0).

En ocasiones se purificó el DNA plasmídico usando el *kit* de extracción *High Pure™ Plasmid Isolation Kit* (comercializado por Roche), *Real Miniprep Turbo kit* (comercializados por REAL) y *FavorPrep™, plasmid DNA Mini Extraction Kit* (comercializado por Favorgen biotech corp.), siguiendo las indicaciones de la casa comercial.

### 4.6.2. Aislamiento de DNA total.

El DNA total se obtuvo mediante lisis enzimática con lisozima (1 mg/mL) seguida de un tratamiento con proteinasa K (3 mg/mL) y SDS 1,5% (p/v). Posteriormente, el DNA se purificó mediante dos extracciones sucesivas con fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1) y una extracción con cloroformo:alcohol isoamílico (24:1). La fase acuosa se transfirió a un tubo de vidrio estéril y se añadieron cuidadosamente dos volúmenes de etanol absoluto frío, formándose dos fases. El DNA se recogió mediante *spooling* utilizando una varilla fina de vidrio. Tras lavarlo con etanol al 70% (v/v) para eliminar las sales, el DNA se dejó secar a temperatura ambiente. Finalmente el DNA se resuspendió en un volumen adecuado de agua destilada y desionizada o en TE 0,2X, y se conservó congelado a -20°C.

### 4.6.3. Purificación de fragmentos de DNA tras electroforesis.

Para purificar fragmentos de DNA separados por electroforesis en geles de agarosa se escindió la pieza del gel utilizando un bisturí estéril, se sumergió en TE 1X hasta un volumen de 500 µl y se incubó a 55°C durante 5-10 minutos. Tras la adición de un volumen de fenol y agitación vigorosa en un vortex, la mezcla se congeló en nitrógeno líquido para potenciar la ruptura de la agarosa e inmediatamente se centrifugó a 15.000 rpm a temperatura ambiente durante 15 minutos. A la fase acuosa se añadieron acetato sódico hasta una concentración final de 300 mM y 0,8 volúmenes de isopropanol. Tras incubación a -20°C durante 15 minutos, el DNA precipitado se separó por una centrifugación de 30 minutos a 4°C y 12.000 rpm, se lavó con etanol al 70% (v/v), se resuspendió en TE 0,2X y se conservó a -20°C.

Alternativamente, se llevó a cabo el proceso de purificación utilizando los *kits* comerciales *GeneClean Turbo Kit* (Q-BIOgene) y *High Pure™ PCR Product Purification Kit* (Roche), siguiendo el correspondiente protocolo del fabricante.

#### 4.6.4. Aislamiento de RNA.

Para todo el trabajo de laboratorio con RNA se utilizó siempre material libre de RNasas (de fábrica o por esterilización rigurosa); las soluciones y reactivos que lo permitieron fueron tratados con dietilpicrocarbonato (DEPC) y esterilizadas.

El RNA total se aisló utilizando el reactivo *RNAwiz*, o bien el *TRI-Reagent* (de Ambion ambos) siguiendo las indicaciones del fabricante. Cultivos de *Pseudomonas* sp. Y2 (estirpe silvestre y mutantes) crecidos hasta una  $DO_{600nm}$  de 0,6 (en la mitad de la fase exponencial de crecimiento, aproximadamente) fueron usados como material de partida. Para facilitar la lisis, las células fueron resuspendidas vigorosamente en el reactivo *RNAwiz* o *TRI-Reagent* y congeladas en nitrógeno líquido (-196°C), continuando seguidamente con el protocolo o bien conservándose a -80°C hasta proceder a la extracción del RNA. Tras el aislamiento, el RNA se resuspendió en agua destilada, desionizada, estéril y tratada con DEPC; se determinó su concentración (ver apartado 6.5.) y se conservó congelado a -80°C.

Para la realización de las RT-PCRs el RNA total fue sometido a reacción de DNasa I para eliminar cualquier resto de DNA contaminante. Se usó para tal fin el kit *DNA-free*<sup>TM</sup> (de Ambion). Se siguió el protocolo del fabricante excepto el último paso de inactivación de la enzima, ya que el reactivo para tal fin pone en compromiso el rendimiento de RT-PCR posterior. Con el fin de eliminar la DNasa I las preparaciones de RNA total fueron purificadas con el *RNAqueous kit* (de Ambion), con vistas a la síntesis subsiguiente de cDNA en los experimentos de RT-PCR. Además este tratamiento mejora sustancialmente la calidad de las muestras, eliminando restos de DNA genómico contaminante así como RNAs de muy pequeño tamaño molecular (5S rRNA, tRNAs), así como enzimas contaminantes, en este caso la DNasa I. Este tratamiento con el kit *DNA-free*<sup>TM</sup> y *RNAqueous kit* no se llevó a cabo en el RNA total destinado a la realización de *northern blot*.

La integridad y calidad general de las muestras de RNA fue estimada mediante el electroforesis en geles de agarosa debidamente tratados.

#### 4.6.5. Cuantificación de ácidos nucleicos.

La concentración de ácidos nucleicos en las muestras se determinó mediante medida de la absorbancia a 260 nm ( $A_{260nm}$ ), teniendo en cuenta las siguientes relaciones:

DNA de doble hebra	→	1 unidad de $A_{260\text{nm}}$ equivale a una concentración de 50 $\mu\text{g/mL}$
DNA monohebra (cDNA, oligonucleótidos)	→	1 unidad de $A_{260\text{nm}}$ equivale a una concentración de 33 $\mu\text{g/mL}$
RNA	→	1 unidad de $A_{260\text{nm}}$ equivale a una concentración de 40 $\mu\text{g/mL}$

Se prepararon diluciones de las muestras para obtener valores de  $A_{260\text{nm}}$  entre 0,1 y 1,0, y asegurarse así una estimación fiable. Las medidas se realizaron en un espectrofotómetro DU-800 (Beckman Coulter), utilizando cubetas de cuarzo de 1 cm de paso óptico con capacidad para 1ml, 100  $\mu\text{l}$  ó 10  $\mu\text{l}$  de muestra, según fuera conveniente, o bien en un *NanoDrop*<sup>®</sup> *ND-1000 UV-Vis Spectrophotometer* (*NanoDrop Technologies*).

Se midió también la absorbancia a 280 nm, puesto que la relación  $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$  da idea de la pureza de la preparación: valores entre 1,8 y 2,1 son aceptables, mientras que valores por debajo de 1,8 indican posible contaminación con proteínas y valores por encima de 2,1 indican la existencia de degradación de los ácidos nucleicos.

### 4.6.6. Modificación de ácidos nucleicos.

#### 4.6.6.1. Reacciones de restricción.

Para la digestión de DNA mediante endonucleasas de restricción se siguieron las recomendaciones de las casas suministradoras de cada enzima, principalmente Amersham Biosciences, New England Biolabs y Roche. La inactivación de estas enzimas se realizó por un tratamiento con calor (60, 65 ó 70°C durante 15 minutos, dependiendo de la enzima) cuando fue posible o mediante una desproteización de las muestras por tratamiento con una mezcla de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico 25:24:1 (v/v/v) y precipitación mediante la adición de acetato sódico 300 mM y 0,8 volúmenes de isopropanol (Sambrook y col., 1989).

#### **4.6.6.2. Tratamiento con fosfatasa alcalina.**

En algunos casos, para mejorar el rendimiento en la obtención de plásmidos recombinantes, el vector se desfosforiló tras la digestión del DNA e inactivación de la enzima de restricción, añadiendo 1 unidad de fosfatasa alcalina, *shrimp alkaline phosphatase* (SAP) (Promega) por  $\mu\text{g}$  de DNA e incubando 15 minutos a  $37^{\circ}\text{C}$ , seguido de una posterior inactivación de la enzima por tratamiento de la mezcla a  $75^{\circ}\text{C}$  durante 15 minutos.

#### **4.6.6.3. Rellenado de extremos.**

Para el relleno de extremos 5' protuberantes y su conversión en extremos romos, se empleó el fragmento *Klenow* de la DNA polimerasa I (USB), en presencia de dNTPs. Se siguieron las indicaciones del fabricante.

#### **4.6.6.4. Unión de fragmentos de DNA.**

En las reacciones de ligación de fragmentos de DNA se utilizó la DNA ligasa del fago T4 (USB). Las reacciones tuvieron lugar a  $16^{\circ}\text{C}$  durante 16 h. Cuando se requirió, la enzima se inactivó mediante una incubación a  $65^{\circ}\text{C}$  durante 10 minutos.

Alternativamente, se utilizó el *ligaFast™ Rapid DNA ligation System* (Promega), incubando la mezcla a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 1 h, según las indicaciones del fabricante.

### **4.7. Síntesis de ácidos nucleicos.**

#### **4.7.1. Amplificación de fragmentos de DNA mediante PCR.**

La amplificación de fragmentos de DNA mediante PCR (reacción en cadena de la polimerasa; (Saiki y col., 1985; Mullis y col., 1986)) se llevó a cabo utilizando un termociclador *Mastercycler personal* de la casa Eppendorf y sirviéndose del *Expand High Fidelity PCR*

*System* (Roche), basado en una mezcla de una *Taq* DNA polimerasa termoestable y una DNA polimerasa que posee actividad exonucleasa 3'→5' correctora de errores (Barnes, 1994). El tampón de reacción utilizado fue el suministrado con las enzimas. La concentración de los reactivos (dNTPs, oligonucleótidos, tampón, mezcla enzimática y DNA molde) en la mezcla de reacción fue generalmente la recomendada por el fabricante, aunque hubo de optimizarse en ocasiones. La temperatura de hibridación (*annealing*) y el número de ciclos de amplificación se ajustaron empíricamente en cada ensayo hasta obtener la cantidad y pureza adecuada de producto amplificado. El tiempo de elongación o polimerización dependió del tamaño del producto de PCR que se esperaba obtener y se determinó siguiendo las instrucciones de Roche. Tras la PCR, se comprobó la amplificación de fragmentos del tamaño esperado mediante electroforesis en un gel de agarosa, tras lo que se purificaron directamente del gel. Los clones obtenidos mediante amplificación por PCR fueron secuenciados para verificar la ausencia de mutaciones introducidas por la polimerasa.

### 4.7.2. Oligonucleótidos cebadores.

La síntesis de los oligonucleótidos utilizados en este trabajo fue encargada a la empresa SIGMA-Genosys. El diseño de los oligonucleótidos se llevó a cabo utilizando el programa *Primer Select* incluido en el paquete informático DNASTAR<sup>TM</sup> de Lasergene (<http://www.dnastar.com/web/index.php>), así como mediante el servidor *Primer3* ([http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3\\_www.cgi](http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi)).

### 4.7.3. Síntesis de cDNA.

Para la síntesis de cDNA se utilizó la enzima SuperScript II RT (200 U/μL; Invitrogen). Siguiendo las instrucciones del fabricante. Para una reacción de 20 μL se partió de 10 μg de RNA total tratado con *RNAqueous* (ver apartado 6.4.), añadiendo 2 μL de *Random primers* (3 μg/μL) de Roche (hexámeros), completando hasta 11 μL con H<sub>2</sub>O destilada, desionizada, estéril y libre de RNasas. La mezcla se incubó durante 5 minutos a 70°C en el bloque térmico y luego 2 minutos en hielo, tras lo que se adicionaron 4 μL de tampón de reacción *First-Strand Buffer 5X*, 2 μL de DTT 0,1 M, 2 μL de una mezcla 10 mM de dNTPs (dATP, dCTP, dGTP y dTTP) y 1 μL de *SuperScript II RT* (200 U/μL). La reacción de 20 μL se incubó durante 10 minutos a

25°C, y luego a 42°C en un baño durante 3 h, añadiendo 0,5 µL de enzima al cabo de 90 minutos.

Tras la síntesis del cDNA, se eliminó el RNA añadiendo 1 µL de RNasa A (10 mg/mL) de Roche y 0,5 µL de RNasa H (5 U/µL), de USB. La digestión se realizó durante 30 minutos a 37°C. Tras esto, se agregaron 25µL de H<sub>2</sub>O estéril destilada y desionizada y 2,7 µL de acetato sódico 3 M, pH 5,2, para lograr un pH < 7,5. Se procedió entonces a la purificación del cDNA sintetizado (con el objetivo de eliminar enzimas, tampones, dNTPs, etc.) empleando el *QIAquick PCR purification kit* (Qiagen), siguiendo las instrucciones de la casa comercial. Se efectuaron dos eluciones consecutivas con 30 µL de H<sub>2</sub>O estéril (pH ajustado a 8,0 con 0,2 N NaOH) calentada a 60-70°C. La concentración del cDNA se determinó según lo expuesto en apartado 6.5.

#### **4.7.4. Secuenciación de DNA.**

Las reacciones de secuenciación automática se realizaron en la Unidad de Genómica (Campus de Moncloa) del Parques Científico de Madrid, donde se empleó un secuenciador multicapilar ABI PRISM 3730 (Applied Biosystems), o en el Servicio de Secuenciación Automática de DNA de la empresa Secugen, ubicada en el Centro de Investigaciones Biológicas, que dispone de los secuenciadores automáticos ABI PRISM 3700 (Applied Biosystems) y ABI PRISM 3730. Generalmente se utilizaron como cebadores oligonucleótidos comerciales que hibridan en zonas conocidas de los vectores en los que se encontraban clonados los fragmentos de DNA analizados. Sin embargo, para el estudio de aquellas zonas cuya clonación presentaba mayores dificultades, se diseñaron oligonucleótidos específicos (ver tabla 4.3.) que se utilizaron como cebadores en la reacción de secuenciación.

### **4.8. Preparación de extractos celulares.**

#### **4.8.1. Obtención de extractos proteicos.**

Para la preparación de los extractos proteicos utilizados para el análisis del proteoma, se crecieron los cultivos en el medio correspondiente y a la temperatura adecuada, 28-30°C y se

recogieron las células a una  $DO_{600nm}$  de aproximadamente 0,6. Se recogieron las células por centrifugación a 5000 rpm durante 10 minutos en una centrífuga Sorvall RC5C equipada con un rotor GSA (Sorvall Instruments). Las células fueron congeladas (-80°C durante 12 h) y descongeladas, se resuspendieron en 100 mM de tampón trietanolamina hidrocloreto/NaOH a pH 8,0, conteniendo 2 mM de  $MgCl_2$ , glicerol 10% (p/v) y 0,1 mg de DNasa I/mL. Las células fueron lisadas usando una prensa de French (Aminco Corp.) usando una presión de 137 MPa (la muestra fue pasada 2 veces por esta prensa). El lisado celular se centrifugó a 40.000 rpm (100.000g), 4°C y durante 1 h en la ultracentrífuga Beckman L60 (Beckman) en el rotor 75Ti (Beckman) y se recogió la fracción soluble, el sobrenadante.

### 4.8.2. Determinación de la concentración de proteínas.

La concentración de proteína total de los extractos, se determinó mediante el método de Bradford (Bradford, 1976) empleando albúmina de suero bovino (BSA) como patrón.

## 4.9. Técnicas electroforéticas.

### 4.9.1. Electroforesis de DNA en geles de agarosa.

El análisis electroforético de DNA se realizó en geles horizontales de agarosa D-2 (Pronadisa) a una concentración del 0,8%-2,0% (p/v) en TAE 1X (Tris 40mM, ácido acético 40 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0) sumergidos en una cubeta con el mismo tampón. A las muestras se les añadió tampón de carga (glicerol 30% (v/v), azul de bromofenol 0,25% (p/v), xilencianol FF 0,25% (p/v)). Como marcadores de tamaño se utilizaron (en función del tamaño esperado de los fragmentos) el DNA de  $\lambda$  digerido con *Bst*EII (fragmentos de 117, 224, 702, 1264, 1371, 1929, 2323, 3675, 4324, 4822, 5686, 6369, 7242, 8454 y 14140 pb) (En una electroforesis en un gel de agarosa al 0,8-1% (p/v), desarrollada hasta que el frente constituido por el azul de bromofenol se acerca al final del gel, las bandas de 117 y 224 pb han migrado fuera del gel. En cualquier caso, son apenas visibles debido a la pequeña proporción del genoma que representan.) (Formada por la unión de las bandas de 5686 y 8454 pb, que contienen los extremos *cos* del fago  $\lambda$ ) o bien una escalera de 100 pb (fragmentos de 80, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 y 1031 pb). El campo eléctrico aplicado se ajustó en función de las

características de los fragmentos analizados, variando entre 4 V/cm y 8 V/cm. Tras la electroforesis, el gel se tiñó mediante inmersión en una solución de bromuro de etidio (1 µg/mL), y el DNA se visualizó bajo luz ultravioleta ( $\lambda_{(302\text{ nm})}$ ) en un transiluminador UVIPro V1.0 de UVItec Limited equipado con un sistema de captura y análisis de imágenes.

En el caso de electroforesis preparativas y con la finalidad de extraer fragmentos de DNA del gel, se empleó agarosa LM (Pronadisa), de baja temperatura de fusión y gelificación, para facilitar el proceso y mejorar el rendimiento de la purificación.

#### **4.9.2. Electroforesis de RNA en geles de agarosa.**

Con el fin de valorar la integridad y calidad general de las extracciones de RNA total, se llevaron a cabo electroforesis en condiciones nativas utilizando geles horizontales de agarosa al 1% (p/v) en TBE 0,5X (Tris 45 mM, ácido bórico 45 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0) y siguiendo el protocolo, con ligeras modificaciones, que aparece en el manual del *RNAqueous kit* (Ambion). Se analizó 1 µg de cada muestra de RNA, añadiendo tampón de carga (15% Ficoll 400, azul de bromofenol 0,25% (p/v), xilencianol FF 0,25% (p/v)) y utilizando como referencia una muestra de RNA intacta. La electroforesis se desarrolló a 5 V/cm, y la tinción del gel y visualización de las bandas correspondientes se realizó como se indica en el apartado anterior.

Alternativamente, para los experimentos de *northern blot* se llevó a cabo electroforesis en condiciones desnaturizantes utilizando geles horizontales de agarosa D-5 (Pronadisa) al 0,6-0,8% (p/v) en MOPS (ácido 3-(N-morfolino)propanosulfónico) 1X y 2% (v/v) de formaldehído, a las muestras se les añadió 3 volúmenes de tampón de carga, *Formaldehyde Load Dye* (Ambion) y se desnaturizó a 70°C durante 15 minutos, dejar enfriar en baño de hielo 2 minutos y cargar. Como marcador se utilizó 100 ng *RNA molecular weight marker DIG-labeled* (Roche) con unos tamaños de 310, 438, 575, 1049, 1517, 1821, 2661, 4742, 6948 bases. Estos geles fueron sometidos a campo eléctrico de 160 Vh (5 V/cm) en tampón 1X MOPS y 0,246 M de formaldehído y la tinción del gel y visualización de las bandas correspondientes se realizó como se indica en el apartado anterior.

### **4.9.3. Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida (1DE).**

El análisis de muestras de extractos proteicos se llevó a cabo en condiciones desnaturizantes en presencia de SDS, en geles de poliacrilamida (PAGE) a una concentración del 12,5% según el método de (Laemmli, 1970). Las muestras se calentaron a 95°C durante 5 minutos en presencia de tampón de ruptura (Tris-HCl 125 mM, glicerol 20% (v/v),  $\beta$ -mercaptoetanol 10% (v/v), SDS 4% (p/v), azul de bromofenol 0,04 mg/mL) y se sometieron a una campo eléctrico de 18 V/cm en tampón Tris-HCl 25 mM, pH 8,0, glicina 192 mM y SDS 0,1% (p/v) en equipos Miniprotean II (Bio-Rad). Los geles se fijaron y tiñeron con una solución de Coomassie (2,5 g/L de Coomassie G-250 en una mezcla de agua:ácido acético:metanol 40:10:50 (v/v/v)) durante 30 segundos en agitación (balancín) y se destiñeron posteriormente con una solución de agua:ácido acético:metanol 67:8:25 (v/v/v). Los geles se sacaron sobre papel de filtro Whatman 3MM por calentamiento durante 1 hora a 80°C utilizando un equipo seca-geles acoplado a una bomba de vacío.

Las mezclas de proteínas empleadas como marcadores de tamaño molecular (Fosforilasa B, 97 kDa; BSA, 67 kDa; ovoalbúmina, 45 kDa; lactato deshidrogenasa, 34 kDa; carboanhidrasa, 29 kDa y lisozima, 14 kDa.) se adquirió en Bio-Rad.

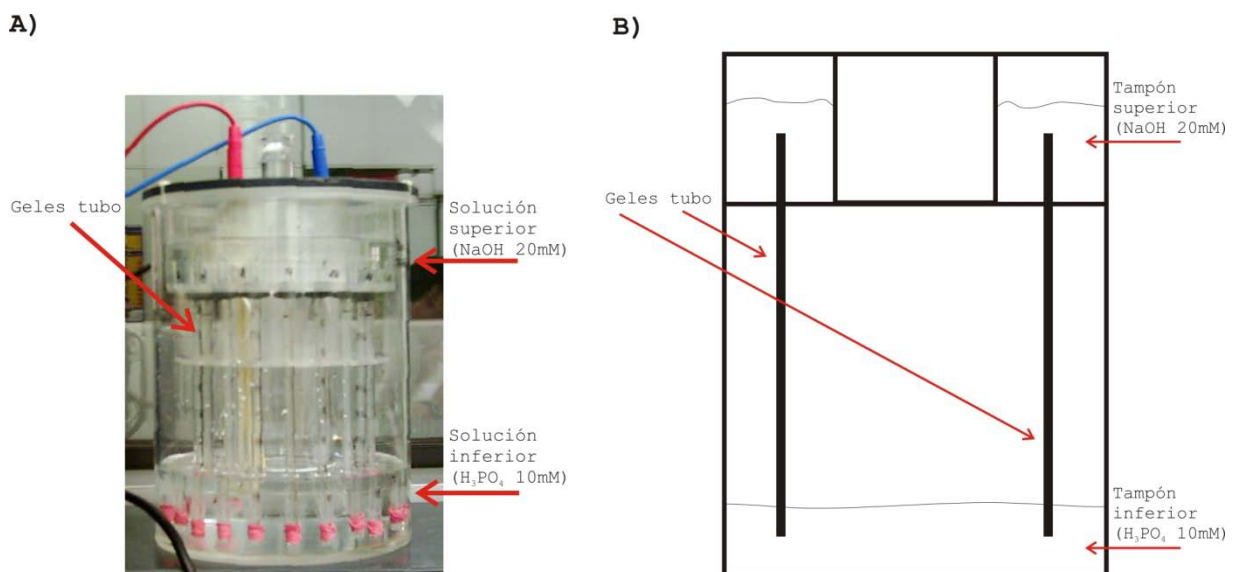
### **4.9.4. Separación de las proteínas por electroforesis bidimensionales (2DE)**

Las proteínas provenientes de los extractos de proteína total fueron separados por electroforesis en geles de dos dimensiones de acuerdo con (O'Farrell, 1975).

#### **4.9.4.1. Primera dimensión. Isoelectroenfoque (IEE).**

La primera dimensión (IEE) fue llevada a cabo en geles de tubo, para ello se utilizan unos tubos de 18 cm de largo y 3mm de diámetro de hueco interno. Estos tubos se rellenan con una mezcla de 6,6% (p/v) de poliacrilamida usando 10% (v/v) de anfolito pH 4-7, pH 5-7 ó pH 3-10, dependiendo del rango de pH a ensayar, 15,7 M de urea, 3,4% (v/v) Nonidet P40 en agua. Esta mezcla se mantiene en baño a 45°C y en agitación. Una vez mezclado se añade 0,01% (v/v) de

APS (Persulfato amónico) y 0,12% (v/v) de Temed (N,N,N',N'-Tetrametiletilenediamina) para la polimerización, se rellenan los tubos hasta completar con 15 cm y se deja polimerizar a 4°C impidiendo la formación de burbujas en el recorrido del gel. El orificio inferior de los tubos se precinta con membrana de diálisis para impedir el derramamiento del gel antes de polimerizarse. Tras la polimerización de estos geles tubo se montan en la carcasa donde se llevará a cabo el isoelectroenfoque, se añade 50 µL de solución de lisis (17,3 M de urea, 3,6% (v/v) Nonidet P40 (nonilfenilpolietileno glicol), 9% (v/v) β-mercaptoetanol y 10% (v/v) de anfolito pH 4-7, pH 5-7 ó pH 3-10) a cada tubo y se realiza el pre-isoelectroenfoque, que consiste en la distribución en gradiente de los anfolitos permitiendo un gradiente de pH a lo largo de todo el gel. El pre-enfoque se realiza durante 30 minutos con un voltaje de 500 V (250 Vh). La separación (isoelectroenfoque) se realizó tras aplicar entre 250 y 350 µg de extracto de proteína soluble mezclado con 25 µL de solución de aplicación (17,4 M de urea, 0,005% (p/v) de azul de bromofenol y 10% (v/v) de anfolito pH 4-7, pH 5-7 ó pH 3-10, dependiendo del rango de pH a ensayar a cada tubo), para ello las proteínas añadidas permanecen expuestas 16 horas a un campo eléctrico de 600 V y 2 h a 1000 V (11600Vh). Los tampones que se usan para llevar a cabo el pre-isoelectroenfoque y isoelectroenfoque son en el polo positivo 10 mM de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> y en el negativo 20 mM de NaOH, (ver figura 4.3.).



**Figura 4.3. Equipo de IEE. A)** Foto de la carcasa en la que se lleva a cabo el IEE de los geles tubo. **B)** Esquema donde se muestran la disposición de los geles tubo y los tampones usados.

#### 4.9.4.2. Equilibrado de los geles tubo.

Tras realizar el isoelectroenfoque de las proteínas se procede a la extracción de los geles del interior de los tubos y estos son equilibrados para lo cual se incuban en solución de

equilibrio (60 mM Tris-HCl (pH 6,8), 2,3% (v/v) SDS, 5% (v/v) β-mercaptoetanol, 10% (p/v) glicerol y 0,005% (p/v) azul de bromofenol) durante 20 minutos en agitación. Esta etapa es necesaria realizarla ya que este tratamiento desnaturaliza y despliega las proteínas, las dota de carga negativa y se reducen los puentes de disulfuro.

#### 4.9.4.3. Determinación del gradiente de pH en geles tubo.

Para determinar la distribución gradual del pH en los geles tubo, se deja unos de los tubos sin añadir muestra, pero si el resto de soluciones. Una vez realizado el isoelectroenfoque se extrae el gel del tubo y se fracciona en fragmentos de 1 cm y se añade 250 μL de agua destilada y se procede a medir el pH de cada fragmento.

#### 4.9.4.4. Isoelectroenfoque mediante IPGphor.

Alternativamente, se utilizó para realizar el isoelectroenfoque el sistema IPGphor, usando IPGphor™ Isoelectric Focusing System, (Amersham Bioscience), (Figura 4.4), para lo cual se utilizaron tiras Immobiline™ DryStrip de rango de pH 3-10 y 18 cm (Amersham Bioscience), estas tiras se suministran deshidratadas y han de ser rehidratadas, para lo cual se usa una solución que contiene Urea 8M, CHAPS 2%, *IPG Buffer* 0,5% (Amersham Bioscience), Azul de bromofenol 0,001% (p/v) y reactivo *DeStreak*™ (Amersham Bioscience). El montaje y la preparación de las tiras se realizó siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante. Se cargó 100 μg. de extracto de proteína soluble mezclado con 350 μL de tampón de rehidratación. Tras el montaje se lleva a cabo un programa de gradiente lineal, (Tabla 4.5.), para llevar a cabo esta separación por pI. Una vez realizado el isoelectroenfoque las tiras fueron congeladas a -20°C hasta el momento de la separación de las proteínas en función de su PM.

**Tabla 4.5. Programa seguido para llevar a cabo el IPGphor, siguiendo el protocolo del fabricante. 50 μA/tira, 20°C usando gradiente lineal.**

Paso	Voltaje	Duración	V/h	Tipo de gradiente
Rehidratación	0	12 h	0	
1	500	1 h	500	gradual
2	1000	1 h	1000	gradual
3	8000	4 h	32000	gradual



**Figura 4.4.** Equipo *IPGphor™ Isoelectric Focusing System* de Amersham Bioscience en el que se llevó a cabo IEE de tiras *Immobiline™ DryStrip* de rango de pH 3-10 y 18cm (Amersham Bioscience). **A)** Detalle frontal. **B)** Detalle de las carcasas de porcelana en cuyo interior se encuentran las tiras.

#### 4.9.4.5. Equilibrado de tiras.

El equilibrado de las proteínas isoelectroenfocadas se realiza con agentes desnaturizantes como el SDS que además de desnaturizar las proteínas la dota de carga negativa, con agentes reductores como el DTT que se encarga de reducir los puentes disulfuro y con agentes alquilantes como la iodoacetamida (IAA) que alquilará los grupos SH reducidos anteriormente y evitará su posterior oxidación. Estos tratamientos constituyen la fase de equilibrio de las muestras (Klein y col., 2004).

Esta fase se lleva a cabo mediante dos soluciones de equilibrio.

La solución de equilibrio 1: con 2% de SDS, 50 mM Tris-HCl pH 8,8, 6M urea, 30% (p/v) glicerol, 0,002% azul de bromofenol y 1% (p/v) de Ditiotreitól (DTT). Se incuban las tiras 15 minutos en agitación en esta solución.

Después se pasa a la solución de equilibrio 2: con 2% de SDS, 50 mM Tris-HCl pH 8,8, 6 M Urea, 30% (p/v) glicerol, azul de bromofenol 0,002% y de Iodoacetamida 2,5% (p/v) (IAA), donde se incuban las tiras durante 15 minutos en agitación.

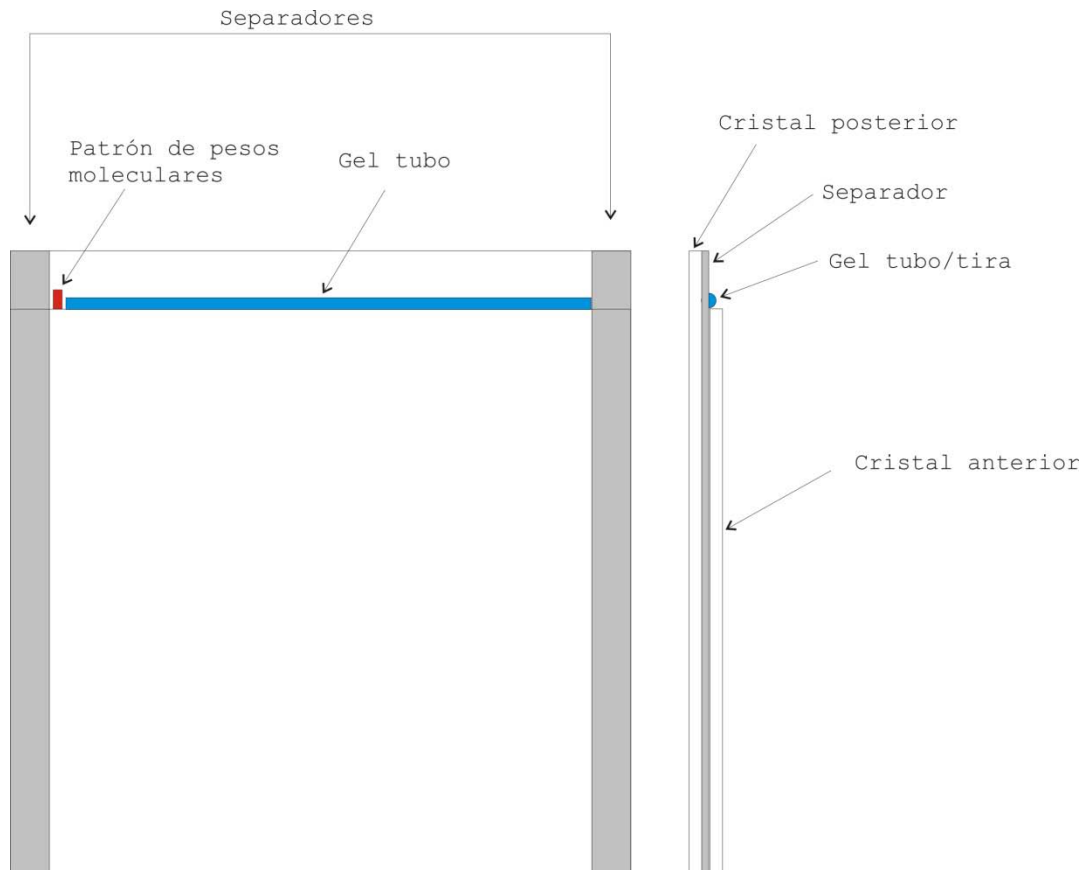
#### **4.9.4.6. Segunda dimensión.**

Las proteínas, separadas por su pI, se separarán ahora en la segunda dimensión, por peso molecular. Para ello se usa un gel SDS-PAGE que se preparan a una concentración de 9% y 11% (p/v) de poliacrilamida según el método de (Laemmli, 1970). Los geles tubo se fijaron a la parte superior del gel de la segunda dimensión mediante agarosa al 2% (p/v), mientras que las tiras se inmovilizaron con agarosa al 0,5% (p/v), ver figura 4.5. Los geles se sometieron a un campo eléctrico de 310 V (1240-1550Vh), durante 4-5 horas refrigerados a 10°C en tampón Tris-HCl 25 mM, pH 8,0, glicina 192 mM y SDS 0,1% (p/v), en equipos Protean Ixi cell (Bio-Rad). Como patrones de pesos moleculares se usan una mezcla de fosforilasa B, 97 kDa; BSA, 67 kDa; ovoalbúmina, 45 kDa; lactato deshidrogenasa, 34 kDa; carboanhidrasa, 29 kDa y lisozima, 14 kDa. que se adquirió en Bio-Rad. El tamaño de los geles de esta segunda dimensión fueron para los geles tubo de 200 X 200 mm y para las tiras 180 X 160mm.

#### **4.9.4.7. Tinción de geles bidimensionales (2DE).**

Los geles se fijaron y tiñeron con una solución de Coomassie (2,5 g/L de Coomassie G-250 en una mezcla de agua:ácido acético:metanol 40:10:50 (v/v/v)) durante 10-12 horas en agitación (balancín), esta tinción es capaz de revelar la presencia de puntos con una concentración de proteína de incluso 100 ng (Neuhoff y col., 1988) y se destiñeron posteriormente con una solución de agua:ácido acético:metanol 60:10:30 (v/v/v) durante 30 minutos y después con una solución agua:ácido acético 90:10 (v/v).

Para el posterior secado de geles se utilizó una solución glicerol:metanol:agua 10:40:50 (v/v/v) en la cual se incubaron durante 1 hora. A continuación se hermetizaron usando plástico secante y dejado secar.



**Figura 4.5. Esquema de gel de la segunda dimensión.** Colocación y montaje de los geles tubo y tiras tras el IEE en el gel de la segunda dimensión. Una vez colocado ahí se fija con agarosa para evitar que se desplace o caiga de su posición.

## 4.10. Transferencia e hibridación de ácidos nucleicos.

### 4.10.1. Marcaje de sondas.

Los fragmentos de DNA utilizados como sondas, cuyas características se muestran en la tabla 4.6, se marcaron con digoxigenina mediante el método *random priming* por PCR descrito en el manual *The DIG System User's Guide for Filter Hybridization* editado por Roche y utilizando los reactivos suministrados por esta misma compañía.

**Tabla 4.6. Fragmentos de DNA marcados y utilizados como sondas.**

Nombre de la sonda	Tamaño (nt.)	Origen
Sonda X	344	PCR ( oligos BamX3 y ApaX5)
Sonda F	312	PCR ( oligos Ligup y Sm1.4)
Sonda G	718	Restricción (pFA2.5Sal, <i>PstI/SalI</i> )
Sonda P	286	PCR (oligos PaaP(F) y PaaP(R))
Sonda N	609	Restricción (pFA0.7HidPst, <i>PstI</i> )

#### **4.10.2. Northern blot.**

La transferencia de RNA desde geles desnaturalizantes de agarosa a membranas de Nylon se realizó siguiendo el método descrito por (Sambrook y col., 1989). Se utilizaron membranas de nailon cargadas positivamente *Hybond<sup>TM</sup>-N+* (Amersham Biosciences). Tras la transferencia, el RNA se fijó a la membrana mediante la exposición a luz ultravioleta (254 nm) durante 3 minutos. Una vez fijado, el RNA se sometió a hibridación con sondas marcadas con digoxigenina (ver apartado 9.1). La hibridación y posterior detección de señales se llevaron a cabo utilizando los reactivos suministrados por Roche y siguiendo los protocolos especificados en el manual *The DIG System User's Guide for Filter Hybridization* de esta misma compañía, pero teniendo en cuenta la optimización de este método para reducir los problemas de señales de fondo (Engler-Blum y col., 1993). Para la detección de la señal quimioluminiscente, la exposición de las membranas se llevó a cabo por autorradiografía utilizando películas Kodak *X-OMAT UV* en un casete equipado con un amplificador de señal *BioMax TranScreen-HE* (Kodak). La hibridación de las membranas se realizó utilizando como sonda fragmentos de DNA.

En algunas ocasiones se procedió a la tinción de las membranas de nylon donde se había fijado previamente el RNA total con azul de metileno al 0,03% (p/v) y 0,3 M de NaAc pH 5,2. Se sumerge la membrana 30 segundos en esta solución de tinte en agitación y se procede a desteñir con agua destilada tres lavados.

### **4.11. Análisis de los metabolitos acumulados en el medio de cultivo.**

#### **4.11.1. Ensayo de Gibbs.**

Para detectar de forma rápida la presencia del ácido 2-hidroxifenilacético en el medio de cultivo se empleó el ensayo de Gibbs (Kayser y col., 1993). La 2,6-dicloroquinona-4-cloroimida (reactivo de Gibbs) reacciona con los grupos –OH en posición *orto* del anillo aromático dando lugar a un complejo de color azul que se analiza espectrofotométricamente.

El procedimiento experimental para llevar a cabo el análisis es el siguiente, se recoge el sobrenadante de 1 mL de cultivo y se ajusta a pH 8,0 con Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (10% (p/v)). Se añaden 10 µL de reactivo de Gibbs (10 mg /mL, en etanol), se incuba durante 30 minutos a temperatura ambiente para que se desarrolle el color. Pasado este tiempo, se mide la absorbancia a 610 nm, empleando un espectrofotómetro DU800 (Beckman Coulter). Para poder relacionar este valor

con la concentración de 2-HPA se realiza una curva de calibrado con concentraciones conocidas de 2-HPA (Figura 5.51 del apartado Resultados).

## 4.12. Ensayos enzimáticos.

### 4.12.1. Medida de actividad $\beta$ -galactosidasa.

La actividad  $\beta$ -galactosidasa de distintos clones y estirpes, tanto de *E. coli* como de *Pseudomonas*, se determinó según el ensayo descrito por (Miller, 1972). Las células se cultivaron en los medios adecuados y condiciones de inducción variables según el experimento. A partir de alícuotas de 1 ml de cultivo, las células se lavaron con *buffer Z* (tampón fosfato sódico 0,1 M pH 7,0, KCl 10 mM, MgSO<sub>4</sub> 10 mM,  $\beta$ -mercaptoetanol 50 mM) y se tomaron 100  $\mu$ l ó 200  $\mu$ l de muestra, según los casos, adicionándose *buffer Z* hasta completar un volumen final de 1 ml. Se añadieron 100  $\mu$ l de cloroformo y 50  $\mu$ l de SDS al 0,1% (p/v) y se agitó mediante vortex durante 10 segundos para provocar la permeabilización de la membrana. Las muestras se atemperaron en un baño a 28°C durante 5 minutos, se añadieron 200  $\mu$ l de una solución de ONPG (*o*-nitrofenil- $\beta$ -D-galactósido 4 mg/ml en tampón fosfato 0,1M pH 7,0) y se incubaron con agitación suave hasta observar la aparición de una coloración amarilla, producto de la formación del *o*-nitrofenol resultante de la ruptura enzimática del ONPG. La reacción se detuvo mediante la adición de 500  $\mu$ l de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 1 M. Tras valorar la DO<sub>420nm</sub> y la DO<sub>550nm</sub> de las muestras, así como la DO<sub>600nm</sub> del cultivo en el momento de la recolección de la muestra, las unidades Miller se calcularon según la fórmula:

$$\text{Unidades Miller} = 1000 \cdot \frac{\text{DO}_{420\text{nm}} - 1,75 \cdot \text{DO}_{550\text{nm}}}{\text{Tiempo} \cdot \text{Volumen} \cdot \text{DO}_{600\text{nm}}}$$

Esta fórmula relaciona el *o*-nitrofenol producido (DO<sub>420nm</sub>) con el tiempo de reacción (en minutos) y con una estimación del número de células en la muestra (volumen·DO<sub>600nm</sub>). La DO<sub>550nm</sub> se incluye para disminuir el error producido por la presencia de restos celulares en las muestras. Los resultados que se muestran son una media de al menos tres experimentos independientes.

## **4.13. Análisis informático de secuencias de ácidos nucleicos.**

### **4.13.1. Visualización y corrección de los cromatogramas.**

Los cromatogramas obtenidos en la secuenciación automática se analizaron y corrigieron utilizando el programa Chromas 2.22 (Conor McCarthy. School of Biomolecular and Biomedical Science. Faculty of Science and Technology. Griffith University. Brisbane, Queensland. Australia. Programa de libre distribución; (<http://trishul.sci.gu.edu.au/~conor/chromas.html>). Este programa permite la edición de cromatogramas archivados en los formatos ABI y SCF.

### **4.13.2. Ensamblaje de secuencias.**

Las secuencias corregidas se ensamblaron utilizando el programa SeqMan integrado en el paquete informático DNASTAR de Lasergene (<http://dnastar.com>). Las discrepancias se analizaron utilizando este mismo programa y se corrigieron para generar secuencias consenso libres de errores.

### **4.13.3. Mapas de restricción.**

La búsqueda de dianas de restricción en las secuencias se realizó mediante el programa pDRAW32 (Kjeld Olesen. ACACLONE software). Programa de libre distribución; (<http://www.geocities.com/acacclone>). Alternativamente se utilizó el programa MapDraw o bien SeqBuilder pertenecientes al paquete informático DNASTAR de Lasergene (<http://dnastar.com>).

### **4.13.4. Localización de marcos abiertos de lectura.**

La localización de marcos abiertos de lectura (ORFs) en las secuencias de DNA se realizó utilizando los programas Artemis, MapDraw, SeqBuilder y, ocasionalmente, el servidor del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> ) Los parámetros para considerar una región de DNA como marco abierto de lectura fueron: una longitud mínima de nucleótidos, la existencia de un codón de inicio de la traducción (ATG) y la existencia de un codón de terminación (TAA, TAG, TGA).

#### 4.13.5. Predicción de genes y operones.

Para la predicción de genes y operones se utilizó la versión disponible en Internet del programa FgenesB (<http://www.softberry.com/berry.phtml?topic=fgenesb&group=programs&subgroup=gfindb>) (Softberry, Inc.). Para el funcionamiento del programa, se consideró a *Pseudomonas putida* KT2440 como organismo más cercano a *Pseudomonas*. sp. Y2. Este programa emplea modelos de cadenas de Markov para la predicción de genes, mientras que la búsqueda de operones está basada en predicción de promotores y terminadores, en las distancias entre ORFs y en las frecuencias de genes adyacentes en genomas bacterianos conocidos.

#### 4.13.6. Plegamiento de secuencias de RNA.

El plegamiento teórico de las regiones de RNA se ha llevado a cabo utilizando los programas m-fold ((Zuker y col., 1999); <http://frontend.bioinfo.rpi.edu/applications/mfold/>), RNAfold (Vienna RNA secondary structure servers; <http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAfold.cgi>) y el GeneQuest, incluido en el paquete de programas DNASTAR de Lasergen (<http://dnastar.com>).

#### 4.13.7. Búsqueda de secuencias repetidas y palindrómicas.

La búsqueda de repeticiones, directas e inversas, y palíndromes en las secuencias correspondientes a las regiones intergénicas de los *clusteres paal* se realizó utilizando el módulo “DotPlot” del programa MegAlign, y GeneQuest pertenecientes al paquete informático DNASTAR (<http://dnastar.com>).

#### 4.13.8. Comparación y búsqueda de secuencias en el DNA.

La comparación de secuencias de DNA con las almacenadas en las bases de datos se llevó a cabo utilizando el servidor del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). La búsqueda de secuencias específicas en el DNA se realizó empleando los programas Fuzznuc (<http://emboss.sourceforge.net/>), Virtual Footprint (Münch y col., 2005) ([http://www.prodoric.de/vfp/vfp\\_promoter.php](http://www.prodoric.de/vfp/vfp_promoter.php)) y WebLogo (Crooks y col., 2004) (<http://weblogo.berkeley.edu/>).

## **4.14. Análisis informático de proteínas.**

### **4.14.1. Escaneo de geles 2-DE y recorte de manchas.**

Los geles fueron digitalizados mediante un escáner Astra 12205 (UMAX) y fueron comparados y analizados tanto de forma manual usando transparencias de las impresiones de los geles como con el programa *PDQuest™ Advanced, 2-D Analysis Software Vs 8.01* (Bio-Rad). Para la selección de las manchas correspondientes a proteína única se comparan los geles correspondientes a los diferentes extractos de las estirpes crecidas en los diferentes medios. Las manchas seleccionadas son aisladas y tratadas en condiciones esterilidad para su posterior análisis.

### **4.14.2. Análisis de las manchas seleccionadas.**

Las manchas seleccionadas son procesadas identificando su procedencia y se envían a la Unidad de Proteómica del Parque Científico de Madrid para ser analizadas. Se someten a digestión trípica (endopeptidasa tripsina), con la ayuda del equipo *Digestor Multiple probe 215 liquid handler* y *Turbo Vap 96 Workstation* (Amersham Bioscience). Los péptidos resultantes se analizaron mediante MALDI-TOF o bien MALDI-TOF-TOF. Los equipos utilizados para tal fin fueron un espectrómetro de masas con fuente de ionización MALDI (*Matrix Assisted Laser Desorption Ionization*) y analizador tipo tiempo de vuelo TOF (*Time Of Flight*), modelo Voyager DE-STR Biospectrometry Workstation con un *Voyager 2 GHz Acquisition System* y CID (Cámara de Colisión) para trabajo en modo PSD (Applied Biosystems) y espectrómetro de masas 4700 *Proteomics Analyzer* con TOF/TOFTM, con fuente de ionización tipo MALDI y dos analizadores tipo tiempo de vuelo en tándem y cámara de colisión (CID) para fragmentación de iones (Applied Biosystems), pertenecientes a la Unidad de Proteómica del Parque Científico de Madrid.

### **4.14.3. Identificación de las proteínas.**

Las manchas seleccionadas fueron recortadas de los geles 2D SDS-PAGE y sometidas a una digestión parcial con tripsina, que corta enlaces peptídicos por el lado carboxilo de lisina y arginina. El número y característica de los péptidos resultantes como consecuencia de estos cortes específicos es característico de cada secuencia de aminoácidos y en consecuencia de cada proteína (Gattiker y col., 2002a; Gattiker y col., 2002b); el listado de masas de los péptidos

resultantes de la digestión proteolítica recibe el nombre de huella peptídica -del inglés *Peptide Mass Fingerprint*- y fue analizada mediante espectrometría de masas del tipo MALDI-TOF. Está aceptado que la sensibilidad del equipo MALDI-TOF está limitada a un picomol de proteína, es decir, una mancha teñida de las que se recortan en los geles debe contener la cantidad de un picomol para que una vez digerida con tripsina y depositada en la placa de lectura de MALDI obtengamos una cantidad de péptidos suficiente para detectar la masa de los péptidos con una intensidad suficiente. Cuando los datos de huella peptídica no fueron suficientes para la identificación de la proteína problema, se realizó un nuevo análisis mediante MALDI-TOF-TOF con el cual se realiza una fragmentación peptídica, secuenciación de péptidos, analizados previamente por MALDI-TOF. De esta forma, para la identificación de las proteínas seleccionadas se utilizaron los datos de huella peptídica (PMF) o la secuencia de algunos péptidos (MS/MS) o los datos combinados de huella peptídica y fragmentación peptídica.

Los espectros obtenidos en el análisis por MALDI-TOF se ajustaron para generar un listado de valores que correspondieran a los iones monoisotópicos de cada péptido detectado. Posteriormente se realizó la comparación de los datos obtenidos con las bases de datos en línea utilizando el programa Mascot (<http://www.matrixscience.com/home.html>, Matrixscience, Londres, RU), el cual utiliza el algoritmo denominado MOWSE (Pappin y col., 1993). Este programa contrasta los datos obtenidos de MALDI-TOF así como de MALDI-TOF-TOF con aquellos contenidos en las bases de datos NCBI y SWISS-PROT.

Los datos obtenidos de huella peptídica fueron comparados con las bases de datos mediante la utilización de la herramienta *Peptide Mass Fingerprint* (PMF, huella peptídica) del programa Mascot. Como base de datos de referencia se utilizó NCBI nr (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) bajo las siguientes condiciones: digestión con tripsina, como modificación fija la carbamidometilación de cisteínas y como variable la oxidación de metioninas (estas modificaciones son artefactos que se producen con una alta frecuencia tanto en la separación de proteínas en SDS-PAGE como durante o después de la digestión con tripsina, (Steen y Mann, 2001)), sin restricción de masa, masas monoisotópicas ( $MH^+$ ) y un error de 50 y 80 ppm en la masa molecular de los péptidos. En el caso de los espectros obtenidos en el análisis por MALDI-TOF-TOF de los repertorios peptídicos, la identificación de la secuencia se realizó utilizando la herramienta *MS/MS Ion* del programa Mascot. Las condiciones de comparación fueron: las mismas utilizadas en la comparación por huella peptídica a excepción de la base de datos, en este caso se utilizó SwissProt, y una tolerancia de 100 ppm y 0,3 Da en la masa molecular de los aminoácidos en la fragmentación. Para el análisis de los espectros mixtos, usando tanto el obtenido por MALDI-TOF (huella peptídica) como por MALDI-TOF-TOF (fragmentación de péptidos) se usó la herramienta *Sequence Query* del programa Mascot,

fijándose la mismas condiciones que las usadas en la herramienta de huella peptídica excepto las tolerancias de la masa molecular , que fueron de 80 ppm para péptidos y 0,3-0,35 Da para la fragmentación.

#### **4.14.4. Criterios de asignación en la identificación de proteínas.**

En la actualidad existe cierta discrepancia acerca de los criterios necesarios para asignar una identificación inequívoca a cada una de las proteínas analizadas. Se basan en parámetros resultantes del análisis de MALDI-TOF y de las comparaciones con las bases de datos teóricas como son: péptidos coincidentes, probabilidad asociada a cada búsqueda y porcentaje de cobertura de la secuencia de la proteína candidata que cubren los péptidos coincidentes. Cuanto mayor sea el valor de cada uno de estos parámetros, mayor es la probabilidad de una identificación correcta. Pero los umbrales de estos parámetros que han de superarse para una buena identificación son: que la probabilidad asociada a cada coincidencia supere el valor límite de significancia establecido por el programa en cada búsqueda, un número de péptidos coincidentes mínimo de 3 ( en el caso de huella peptídica, en MS/MS es suficiente con uno) y que el porcentaje de cobertura de la secuencia de la proteína candidata sea igual o superior a 15% (en el caso de la huella peptídica, en MS/MS es suficiente con menor porcentaje de cobertura). Hay que tener en cuenta que una identificación puede ser aceptable, por superar estos parámetros umbrales, pero podemos estar ante una identificación errónea. Por esta razón en las identificaciones de las proteínas analizadas en estos experimentos nos hemos apoyado de los datos de punto isoeléctrico y pesos moleculares teóricos y experimentales de cada una de las manchas para minimizar posibles errores.

#### **4.14.5. Bases de datos en línea consultadas.**

Para obtener todo la información relevante y actualizada acerca de las proteínas identificadas se hace uso de las siguientes bases de datos:

**PSI-BLAST** (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST> )

**BYPASS** (<http://bioinf.uab.es/cgi-bin/bypass/bypass.pl?home=1> )

**MODFUN** (<http://salilab.org~marcius/ModFun/> )

**InterPro** (<http://www.ebi.ac.uk/interpro> )

**PROTLOC** (<http://bioinf.uab.es/cgi-bin/trsdb/protloc.cgi> )

**UniPro** (<http://www.uniprot.org/uniprot/> )

**KEGG** (<http://www.genome.jp/kegg/kegg2.html> )

**JVCI.CMR** (<http://cmr.jcvi.org/cgi-bin/CMR/CmrHomePage.cgi> )

**iHOP** (<http://www.ihop-net.org/UniPub/iHOP/> )

#### **4.14.6. Comparación de secuencias con las bases de datos (SwissProt y trEMBL) y alineamiento de proteínas.**

La comparación de las secuencias de aminoácidos de los ORFs con las secuencias de proteínas almacenadas en las bases de datos trEMBL y SwissProt se realizó mediante el programa BLAST de los servidores EXPASY (<http://ca.expasy.org/>) y EMBL (<http://www.embl.org/>). Para el alineamiento múltiple de proteínas se utilizó el programa ClustalW, que se encuentra disponible en varios servidores a los que se puede llegar desde EXPASY.



*Resultados*





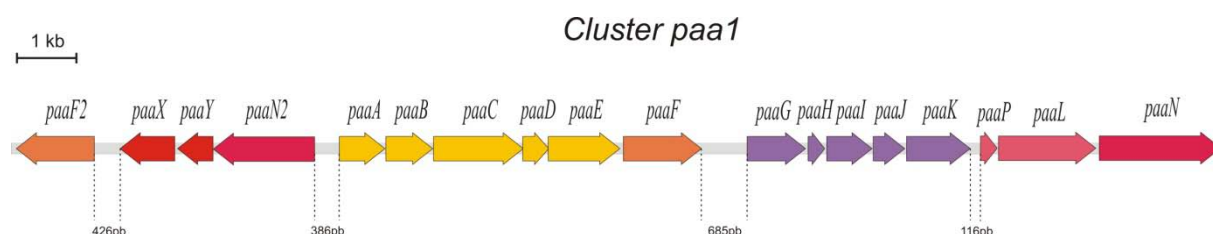
## 5. RESULTADOS

### 5.1 Estudio de la transcripción de los genes del *cluster paa1* en *Pseudomonas* sp. Y2.

Los estudios realizados previamente sobre la ruta de degradación de AFA en *Pseudomonas* sp. Y2 habían permitido identificar los genes implicados en dicha vía catabólica, así como descubrir las dos agrupaciones independientes y funcionales de genes (*cluster paa1* y *paa2*) responsables de la metabolización de este compuesto (Alonso y col., 2003; Bartolomé-Martín y col., 2004; Bartolomé-Martín, 2006). Sin embargo poco se sabía acerca de la expresión y organización transcripcional de estas regiones en la estirpe *Pseudomonas* sp. Y2, temas que se han estudiado como objetivo de esta Tesis y cuyos resultados se exponen a continuación.

#### 5.1.1. Análisis de la organización transcripcional de la región génica *paa1* en *Pseudomonas* sp. Y2.

El *cluster paa1* se organiza en varios conjuntos de genes dispuestos en ambas orientaciones (Figura 5.1), lo que permite presumir la existencia de varios promotores, y la existencia de regiones intergénicas localizadas entre los genes *paaX* y *paaF2* (426 pb), *paaN2* y *paaA* (384 pb), *paaF* y *paaG* (685 pb) y *paaK* y *paaP* (116 pb).

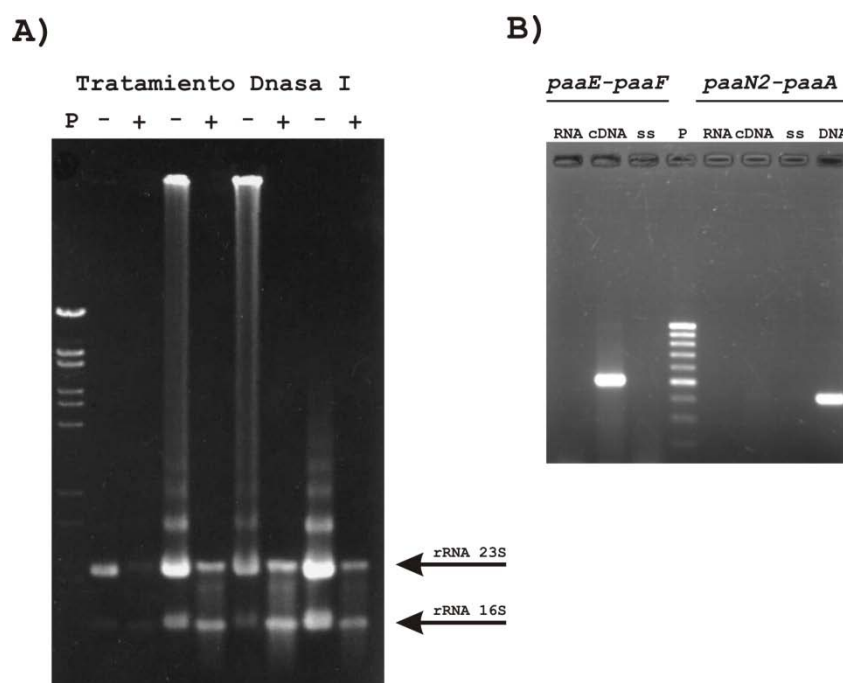


**Figura 5.1.** *Cluster paa1* de *Pseudomonas* sp. Y2. Detalle esquemático de la organización génica de la región *paa1*. Delimitadas por líneas discontinuas se muestran las regiones intergénicas y su tamaño.

### 5.1.1.1. Co-transcripción en la región génica *paa1* de *Pseudomonas* sp. Y2 mediante RT-PCR.

Con el fin de analizar la organización transcripcional de los genes del *cluster paa1*, se realizó un conjunto de experimentos de RT-PCR sobre el cDNA preparado a partir del RNA aislado de un cultivo del mutante *Pseudomonas* sp. Y2T2 crecido en medio mínimo con AFA (apartado 4.6.4 de Material y métodos), y tratado con DNasa I para eliminar posibles restos de DNA cromosómico. Para comprobar que se ha eliminado todo resto de DNA contaminante se realizan diferentes controles de amplificación sobre DNA, RNA total y cDNA (Figura 5.2). La aparición de cualquier producto de amplificación del tamaño esperado en las PCR llevadas a cabo con RNA total como molde sería indicativo de la existencia de DNA cromosómico en la muestra y como consecuencia la obtención de falsos positivos.

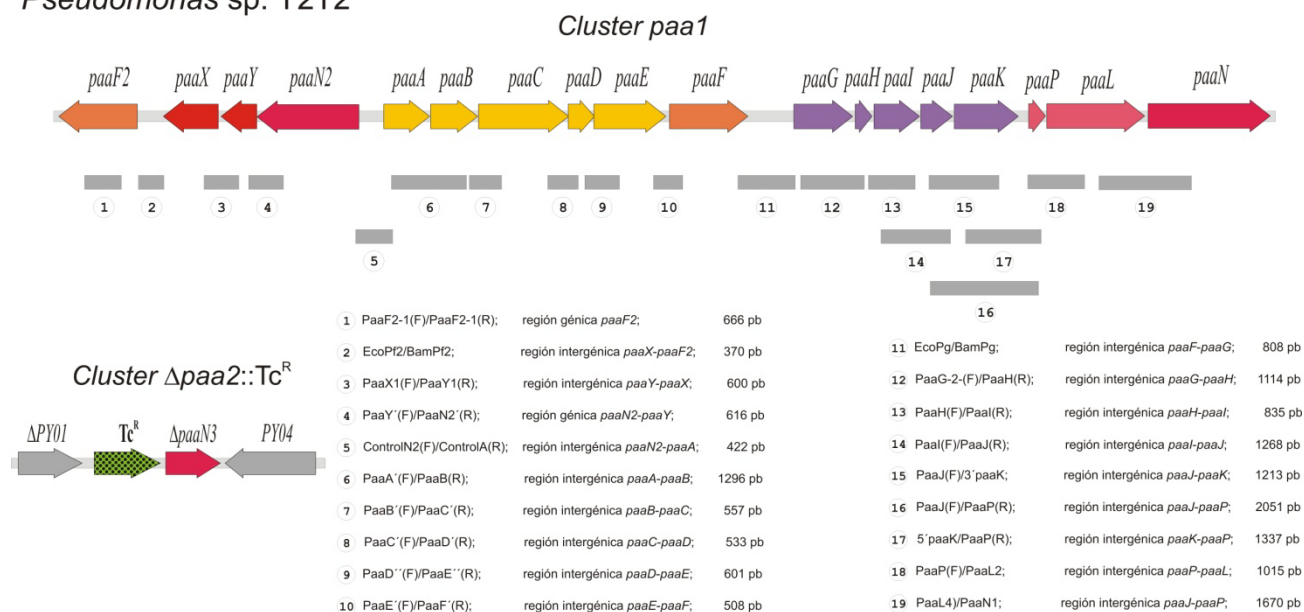
Se sintetizó el cDNA (apartado 4.7.3 de Material y métodos) y se realizaron las reacciones de amplificación por PCR (apartado 4.7.1 de Material y métodos).



**Figura 5. 2. Electroforesis en gel de agarosa del RNA total extraído de *Pseudomonas* sp. Y2T2 y amplificaciones control.** **A)** Gel de agarosa al 1% (p/v). Diferentes muestras independientes de RNA total extraído de *Pseudomonas* sp. Y2 T2 sin tratamiento DNasaI (-) y tras el tratamiento con DNasaI (+). P: patrón estándar de fragmentos de DNA del fago  $\lambda$  digerido con *Bst*EII. Se señalan las bandas correspondientes al rRNA 23S con un tamaño de, 2500 nt y de rRNA 16S de unos 1500 nt de tamaño. **B)** Gel de agarosa al 2% (p/v). Amplificaciones por PCR de fragmento *paaE-paaF* cuyo producto tiene un tamaño de 508 pb. del fragmento *paaN2-paaA* de 422 pb de tamaño, sobre DNA, cDNA, RNA o sin sustrato (ss) de *Pseudomonas* sp. Y2T2. P: patrón de fragmentos de DNA de 100 pb.

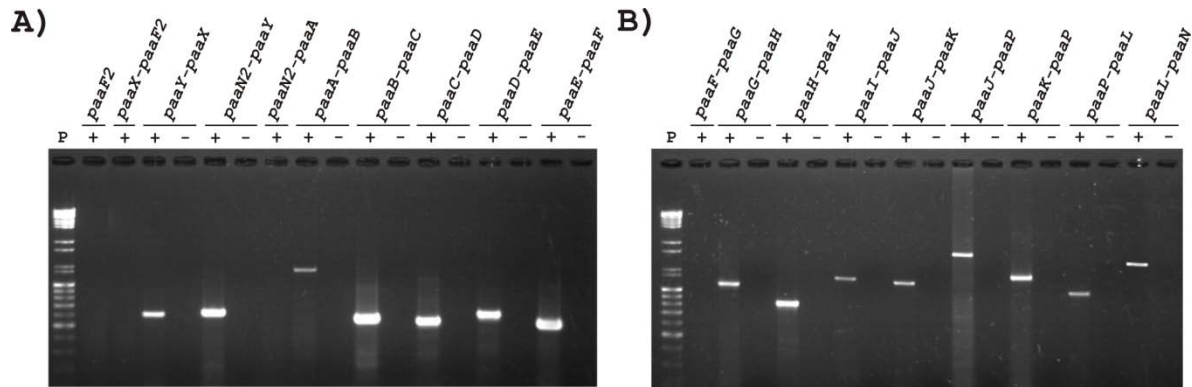
Las ampliaciones que se llevaron a cabo están esquematizadas en la Figura 5.3.

### *Pseudomonas* sp. Y2T2



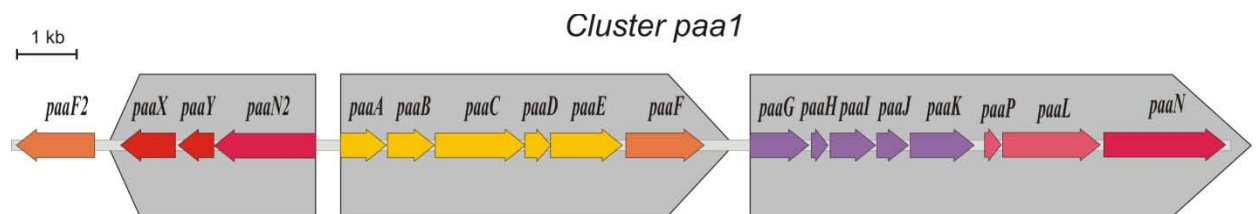
**Figura 5.3. Esquema de los cluster *paa1* y *paa2* de *Pseudomonas* sp. Y2T2 y diseño de los productos amplificados por RT-PCR.** Los rectángulos grises corresponden al diseño de ampliaciones llevadas a cabo para este estudio. En la parte inferior se indican las parejas de oligonucleótidos (ver Tabla 4.3 del apartado Material y métodos) usados para cada ampliación junto con el tamaño del producto esperado.

Los resultados obtenidos en este estudio (Figura 5.4) muestran la presencia en el cDNA de secuencias procedentes de las regiones *paaN2-paaY* y *paaY-paaX*, pero no del gen *paaF2* ni de la región intergénica *paaX-paaF2*, lo que revela: i) la co-transcripción de los genes *paaN2YX*; ii) la ausencia de co-transcripción en los genes *paaXF2*; iii) la ausencia de expresión del gen *paaF2* en cultivo crecido en presencia de AFA. Por otro lado, se observa la existencia de cDNAs con secuencias procedentes de las regiones *paaA-paaB*, *paaB-paaC*, *paaC-paaD*, *paaD-paaE*, *paaE-paaF*, lo que apoya la existencia de la unidad transcripcional *paaABCDEF*. La región intergénica *paaF-paaG* no pudo ser amplificada en las condiciones ensayadas lo que sugiere que estos genes no forman parte de la misma unidad transcripcional. Por último también se observan productos derivados de las ampliaciones *paaG-paaH*, *paaH-paaI*, *paaI-paaJ*, *paaJ-paaK*, *paaJ-paaP*, *paaK-paaP*, *paaP-paaL*, *paaL-paaN*, lo cual sugiere la existencia de una unidad transcripcional *paaGHIJKPLN*.



**Figura 5.4. Electroforesis de agarosa al 2% (p/v) de los productos de RT-PCR amplificados a partir del cDNA de *Pseudomonas* sp. Y2T2. A) Bandas correspondientes a las amplificaciones desde el gen *paaF2* hasta el *paaF*. (+): amplificación sobre cDNA sintetizado, RT+. (-): amplificación sobre RNA, sin enzima retrotranscriptasa, RT- . P: Mezcla de patrón de fragmentos de DNA del fago  $\lambda$  digerido con *Bst*EII y patrón de fragmentos de DNA de 100 pb. B) Bandas correspondientes a las amplificaciones desde el gen *paaF* hasta el *paaN*. (+): amplificación sobre cDNA sintetizado, RT+. (-): amplificación sobre RNA, sin enzima retrotranscriptasa, RT- . P: Mezcla de patrón de fragmentos de DNA del fago  $\lambda$  digerido con *Bst*EII y patrón de fragmentos de DNA de 100 pb.**

En resumen los experimentos de RT-PCR muestran la expresión de los genes *paa1* de *Pseudomonas* sp. Y2 en los cultivos inducidos por AFA y revelan que se organizan transcripcionalmente en tres operones: *paaN2XY*, *paaABCDEF* y *paaGHIJKPLN* (Figura 5.5). Al mismo tiempo, estos resultados confirman que el gen *paaF2* no se expresa en presencia de AFA.

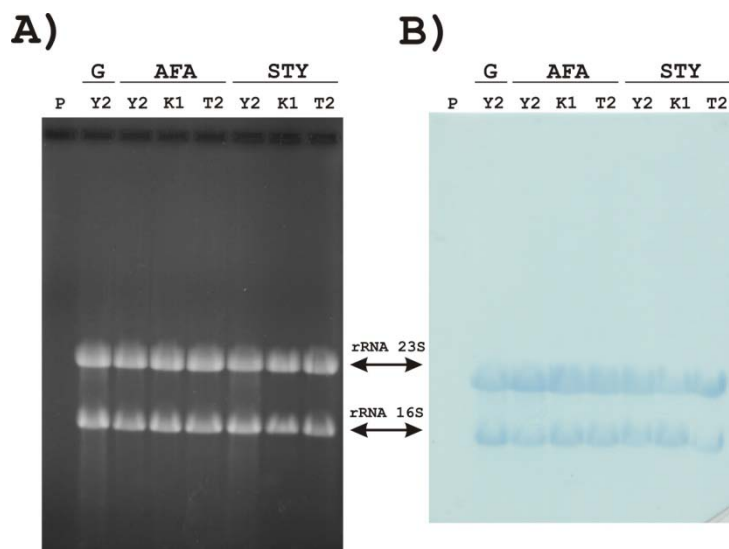


**Figura 5.5. Esquema de la organización transcripcional de los genes *paa1* de *Pseudomonas* sp. Y2T2. Los genes incluidos dentro de la misma flecha hueca forman parte de un mismo operón y su expresión se encuentra inducida en las condiciones ensayadas (AFA 0,2% (p/v)).**

### 5.1.1.2. Tamaño de los transcritos correspondientes a la región génica *paa1* de *Pseudomonas* sp. Y2 mediante *northern blot*.

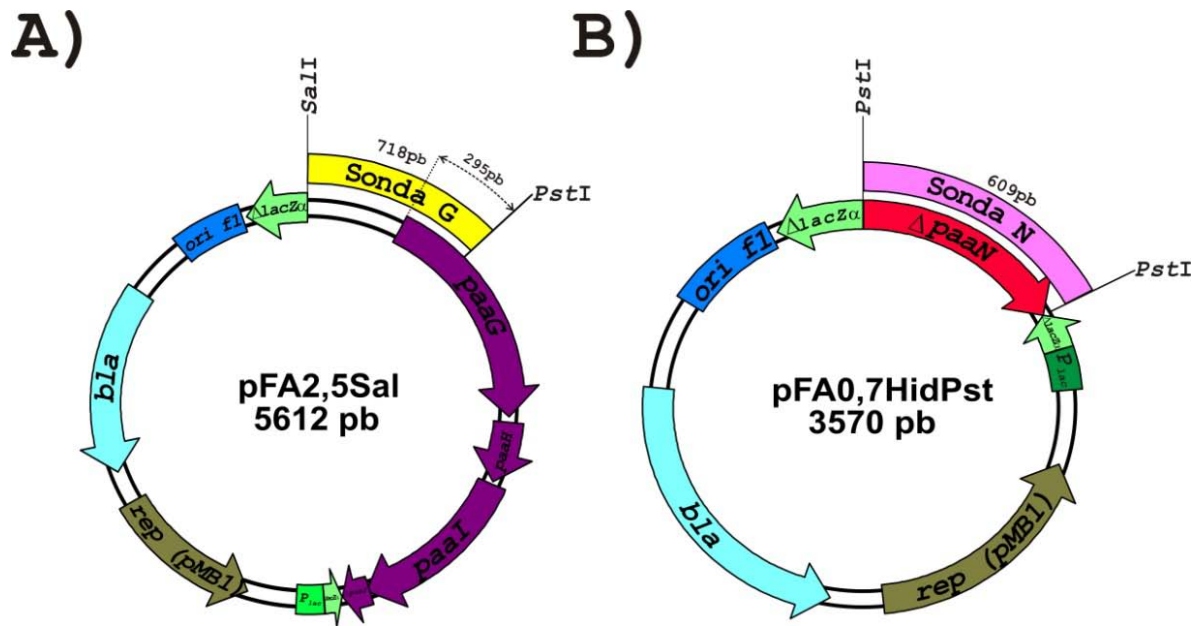
La técnica de RT-PCR no es capaz de discernir entre la existencia de transcritos parciales o totales, como consecuencia de la presencia de promotores o terminadores alternativos, o de algún procesamiento de mensajero. Por eso, se procedió al estudio de la detección directa de transcritos y de su longitud por medio de experimentos de *northern blot*.

El RNA total de las estirpes *Pseudomonas* sp. Y2, *Pseudomonas* sp. Y2K1 y *Pseudomonas* sp. Y2T2 se aisló según se describe en el apartado 4.6.4 del apartado Material y métodos. El RNA aislado se aplicó en un gel desnaturizante de agarosa al 0,6-0,8% p/v y tras su electroforesis se transfirió a una membrana de nailon Hybond™-N+ (Amersham), (apartados 4.9.2 y 4.10.2 de Material y métodos), Figura 5.6.

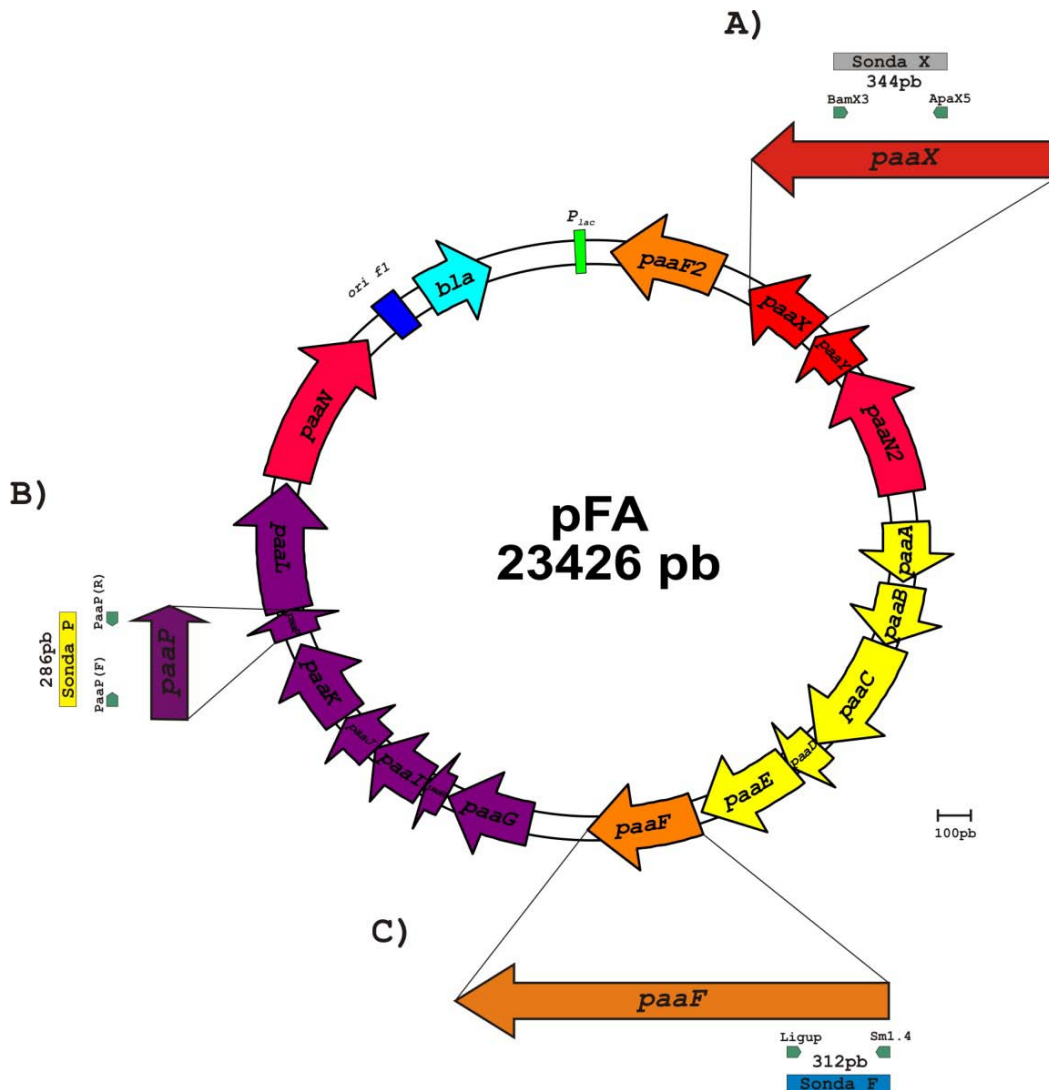


**Figura 5.6. Transferencia de RNA de electroforesis a una membrana de nailon.** En cada pocillo se cargó 5 µg de RNA total de *Pseudomonas* sp. Y2 (Y2), *Pseudomonas* sp. Y2K1 (K1) y *Pseudomonas* sp. Y2T2 (T2) crecidas en medio M9 con glicerol (0,2% (v/v)), AFA (0,2% (p/v)) o STY. Se señala la posición de los rRNA 23S (aproximadamente 2500 nt) y 16S (aproximadamente 1500 nt), como marcadores de la integridad y calidad de las muestras de RNA total. **P:** 100 ng de RNA molecular weight marker DIG-labeled (Roche) (310, 438, 575, 1049, 1517, 1821, 2661, 4742, 6948 nt). AFA: ácido fenilacético. STY: estireno. G: glicerol. **A)** Gel de electroforesis de agarosa al 0,8% (p/v) en condiciones desnaturizantes. **B)** Membrana de nailon Hybond™-N+ (Amersham) a la cual se transfiere el RNA separado en la electroforesis, teñida con azul de metileno.

Para la hibridación sobre las membranas de nailon (apartado 4.10.2. de Material y métodos), se utilizaron las sondas preparadas tanto a partir de fragmentos de DNA obtenidos por restricción (sondas G y N, Figura 5.7), como por amplificación mediante PCR (sondas X, F y P, Figura 5.8) y marcadas mediante el sistema DIG de Roche con digoxigenina (ver apartado 4.10.1 de Material y Métodos).



**Figura 5.7. Obtención de fragmentos de DNA para la construcción de las sondas G y N.** A) El plásmido pFA2,5Sal (Tabla 4.2 de Material y métodos) se digirió con las enzimas *PstI/SalI* para al obtención del fragmento de 718pb el cual fue aislado y se utilizó para el marcaje de la sonda G. Esta sonda solo tiene 295pb de la región codificante de *paaG*. B) El plásmido pFA0,7HidPst (Tabla 4.2 de Material y métodos) se digirió con la enzima *PstI* para al obtención del fragmento de 609pb el cual fue aislado y se utilizó para el marcaje de la sonda N.



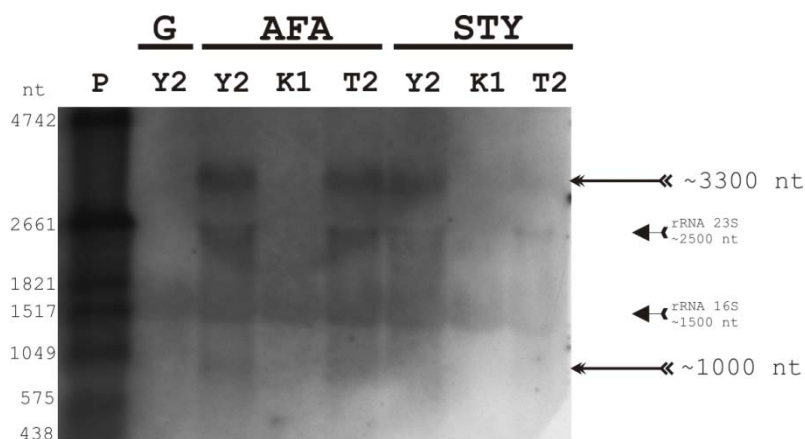
**Figura 5.8. Obtención de fragmentos de DNA para la construcción de las sondas X, F y P.** Estas sondas se preparan mediante amplificación por PCR de ciertas regiones del plásmido pFA (Tablas 4.2 y 4.6 del apartado de Material y métodos) con el uso de determinados cebadores (Tabla 4.3 de Material y métodos). **A)** Amplificación con la pareja de cebadores ApaX5 y BamX3 de una región de *paaX* de 344pb para la construcción de la sonda X. **B)** Amplificación utilizando la pareja de cebadores PaaP(F) y PaaP(R) de una región de *paaP* de 286pb para la construcción de la sonda P. **C)** Amplificación usando la pareja de cebadores Ligup y Sm1.4 de una región de 312pb de *paaF* para la construcción de la sonda F.

Los resultados de este estudio se recogen en las Figuras 5.9 a 5.13. La primera conclusión que se deduce de estos resultados es la falta de expresión de los genes *paa* en cultivos crecidos en glicerol. La segunda conclusión es que debido a la alta especificidad de las condiciones en las que se llevaron a cabo las hibridaciones, en la mayoría de los casos, la cepa *Pseudomonas* sp. Y2K1 (portadora del *cluster paa2*) da resultados negativos.

En las autorradiografías obtenidas con las diferentes sondas se observan hibridaciones positivas con bandas de, aproximadamente 2500 nt y 1500 nt, que coinciden con los rRNA 23S y 16S, respectivamente (Figura 5.6). Se trata de hibridaciones específicas, ya que solo aparecen en las calles de cultivos en los que el *cluster paa1* está inducido y que podría ser el resultado de

la existencia de posibles conformaciones secundarias (resistentes a las condiciones desnaturalizantes ensayadas) del rRNA asociado a fragmentos de RNA mensajeros producto de la incipiente transcripción de los genes *paa1* o bien de pequeños transcritos procesados de los genes *paa1* que quedan atrapados en los rRNA. Este aspecto será tratado más detalladamente en el apartado de Discusión. Estas señales positivas podrían enmascarar la presencia de algunos transcritos específicos cuyos tamaños coincidiera con el de estas bandas, como se comenta más adelante.

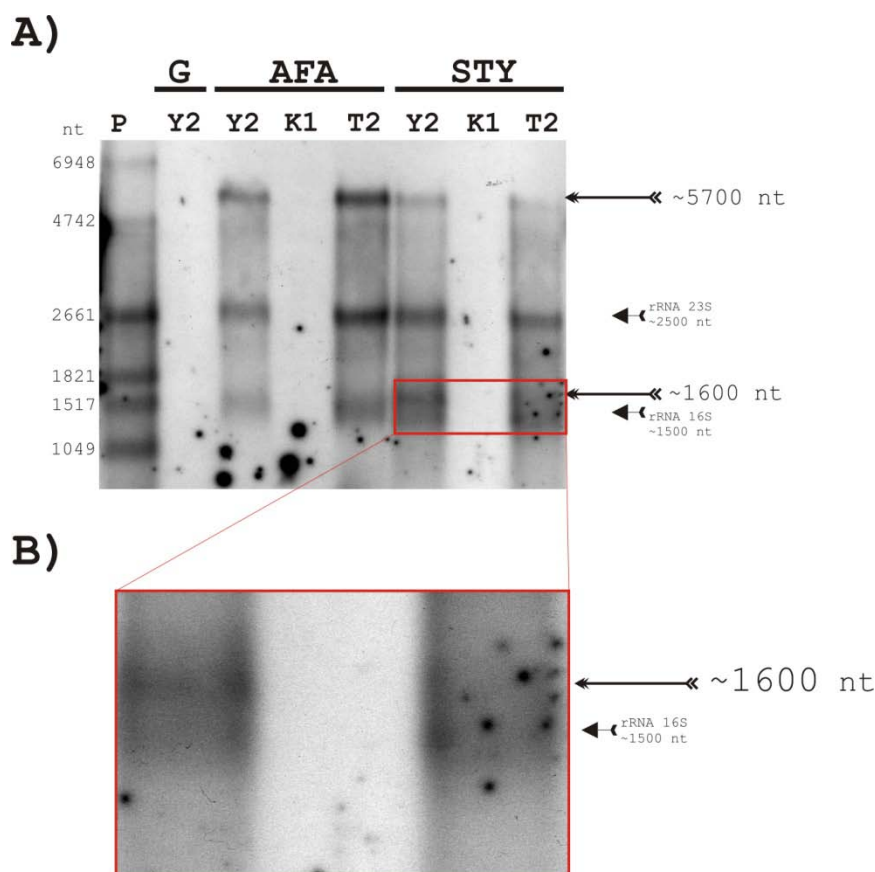
En el resultado de la hibridación con la **sonda X**, (Figura 5.9), se observó la presencia de un mensajero de aproximadamente 3300 nt, en el RNA total de *Pseudomonas* sp. Y2 y *Pseudomonas* sp. Y2T2 crecidas en AFA y en STY, que corresponde, muy probablemente, al transcrito *paaN2YX*. Se observa además hibridación positiva leve con el RNA total de *Pseudomonas* sp. Y2 crecida con glicerol, en *Pseudomonas* sp. Y2K1 crecida con AFA, y en *Pseudomonas* sp. Y2K1 crecida con STY que podría ser el resultado de la detección del mensajero *paaY2X2*, tanto por tamaño como por semejanza de la secuencia del gen *paaX2* con la sonda usada (veasé en el apartado de Discusión). Finalmente es posible detectar una tenue hibridación con un transcrito de tamaño aproximado de 1000 nt que podría corresponder a la expresión exclusiva del gen *paaX*.



**Figura 5.9. Autorradiografía de northern blot obtenido hibridando con la sonda X.** En la imagen se señala, con flechas, la posición y el tamaño de los transcritos observados junto con los de rRNA. En cada pocillo se cargó 5 µg de RNA total de *Pseudomonas* sp. Y2 (Y2), *Pseudomonas* sp. Y2K1 (K1) y *Pseudomonas* sp. Y2T2 (T2) crecidas en medio M9 con glicerol (0,2% (v/v)), AFA (0,2% (p/v)) o STY. P: 100 ng de RNA molecular weight marker DIG-labeled (Roche) (310, 438, 575, 1049, 1517, 1821, 2661, 4742, 6948 nt). AFA: ácido fenilacético. STY: estireno. G: glicerol.

En los ensayos en los que se utilizó la **sonda F** para hibridar, (Figura 5.10), se detectó un transcrito con un tamaño aproximado de 5700 nt en el RNA total de *Pseudomonas* sp. Y2 y

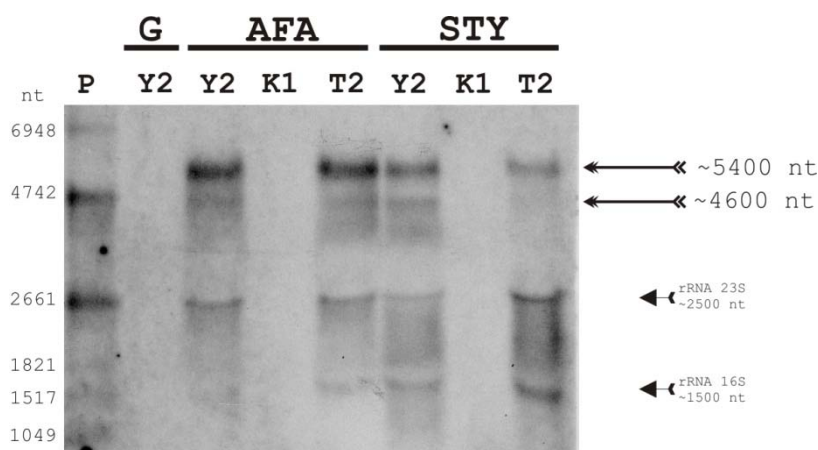
*Pseudomonas* sp.Y2T2 crecidas en AFA y en STY, que podría ser el mensajero policistrónico *paaABCDEF*. También se detectó otra banda con un tamaño aproximado de 1600 nt solamente en el RNA total de *Pseudomonas* sp. Y2 y *Pseudomonas* sp.Y2T2 crecidos en STY, que correspondería al transcrito de *paaF2*.



**Figura 5.10. Autorradiografía de northern blot obtenido hibridando con la sonda F.** En la imagen se señalan la posición y el tamaño de los transcritos observados junto con los de rRNA. En cada pocillo se cargó 5 µg de RNA total de *Pseudomonas* sp. Y2 (Y2), *Pseudomonas* sp. Y2K1 (K1) y *Pseudomonas* sp. Y2T2 (T2) crecidas en medio M9 con glicerol (0,2% (v/v)), AFA (0,2% (p/v)) o STY. **P:** 100 ng de RNA molecular weight marker DIG-labeled (Roche) (310, 438, 575, 1049, 1517, 1821, 2661, 4742, 6948 nt). AFA: ácido fenilacético. STY: estireno. G: glicerol. **A)** Se muestra con flechas, las bandas positivas de un transcrito de 5700 nt aproximadamente y otro de unos 1600 nt **B)** Ampliación de la región que ocupa el transcrito de 1600 nt las calles correspondientes a RNA de cultivos en STY. En esta imagen se observa más claramente el transcrito de 1600 nt, rRNA de 16S.

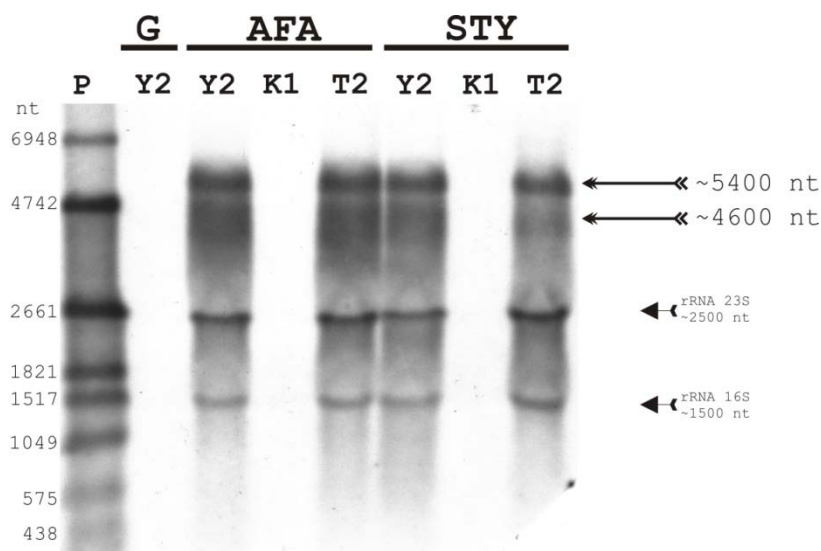
Los transcritos observados en el northern hibridado con la sonda G, (Figura 5.11), tienen un tamaño que corresponde al de los posibles mensajeros *paaGHIJKP* (4,6 kb) y *paaGHIJKPAL* (5,4 kb). La formación de estos mensajeros podría ser el resultado de una terminación prematura provocada por estructuras secundarias del mRNA que podrían funcionar como terminadores de la transcripción, detectadas dentro de la región codificante de *paaP*

(Figura 5.14 y 15, horquilla 4) (Alonso y col., 2003) y *paaL* (Figura 5.14 y 15, horquilla 5) (Bartolomé-Martín, 2006); así como el producto del procesamiento del largo transcrito primario, *paaGHIJKPLN* de 7,7 kb (Figura 5.15).



**Figura 5.11. Autorradiografía de *northern blot* obtenido hibridando con la sonda G.** Las flechas indican la posición y el tamaño de los transcritos observados junto con los de rRNA. En cada pocillo se cargó 5  $\mu$ g de RNA total de *Pseudomonas* sp. Y2 (Y2), *Pseudomonas* sp. Y2K1 (K1) y *Pseudomonas* sp. Y2T2 (T2) crecidas en medio M9 con glicerol (0,2% (v/v)), AFA (0,2% (p/v)) o STY. **P:** 100 ng de *RNA molecular weight marker DIG-labeled* (Roche) (310, 438, 575, 1049, 1517, 1821, 2661, 4742, 6948 nt). AFA: ácido fenilacético. STY: estireno. G: glicerol.

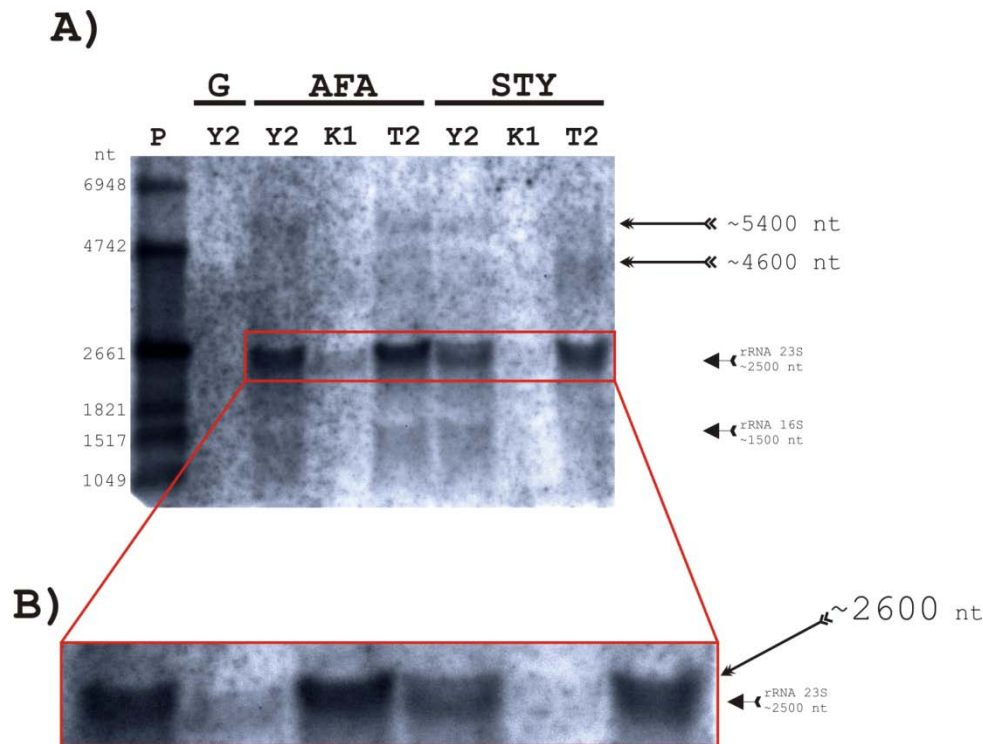
En el *northern* hibridado con la **sonda P** (Figura 5.12.) se observaron transcritos de 5,4 y 4,6 kb que podrían ser los mismos que se detectan con la sonda G, ya que ambos incluirían secuencias complementarias a ambas sondas. Pero, al mismo tiempo estas señales podrían corresponder a los transcritos *paa $\Delta$ KPLN* y *paaPLN*, productos derivados bien de un procesamiento postranscripcional a baja escala, o resultantes de la transcripción minoritaria iniciada en el promotor *Pp* (*upstream paaP*), para el caso de *paaPLN*.



**Figura 5.12. Autorradiografía de *northern blot* obtenido hidridando con la sonda P.** En la imagen se señala, con flechas, la posición y el tamaño de los transcritos observados junto con los de rRNA. En cada pocillo se cargó 5  $\mu$ g de RNA total de *Pseudomonas* sp. Y2 (Y2), *Pseudomonas* sp. Y2K1 (K1) y *Pseudomonas* sp. Y2T2 (T2) crecidas en medio M9 con glicerol (0,2% (v/v)), AFA (0,2% (p/v)) o STY. P: 100 ng de *RNA molecular weight marker DIG-labeled* (Roche) (310, 438, 575, 1049, 1517, 1821, 2661, 4742, 6948 nt). AFA: ácido fenilacético. STY: estireno. G: glicerol.

En los *northern* hibridado con la **sonda N**, (Figura 5.13), se detectaron bandas débilmente positivas de 4,6 kb y 5,4 kb, además de una banda de mayor intensidad de unos 2,6 kb muy próxima a la del rRNA 23S, (Figura 5.13.B). Esta última señal podría corresponder al mRNA quizá fruto del procesamiento postranscripcional de algún transcrito más largo. El transcrito de 4,6 kb también sería compatible con la transcripción iniciada en el promotor *Pp* y que produciría el mensajero *paaPLN*, mientras que el mensajero observado de 5,4 kb podría ser producto del procesamiento postranscripcional del transcrito primario de 7,7 kb. Esta interpretación es coherente con los resultados, ya comentados, de la hibridación con la sonda P (Figura 5.12).

Hibridando con esta sonda N, también fue posible detectar una banda de hibridación correspondiente a un mensajero de 2500 nt, aproximadamente, en las calles con RNA total de *Pseudomonas* sp. Y2K1 crecidas en AFA y en STY. La razón de esta hibridación se tratará más adelante, en el apartado de Discusión.



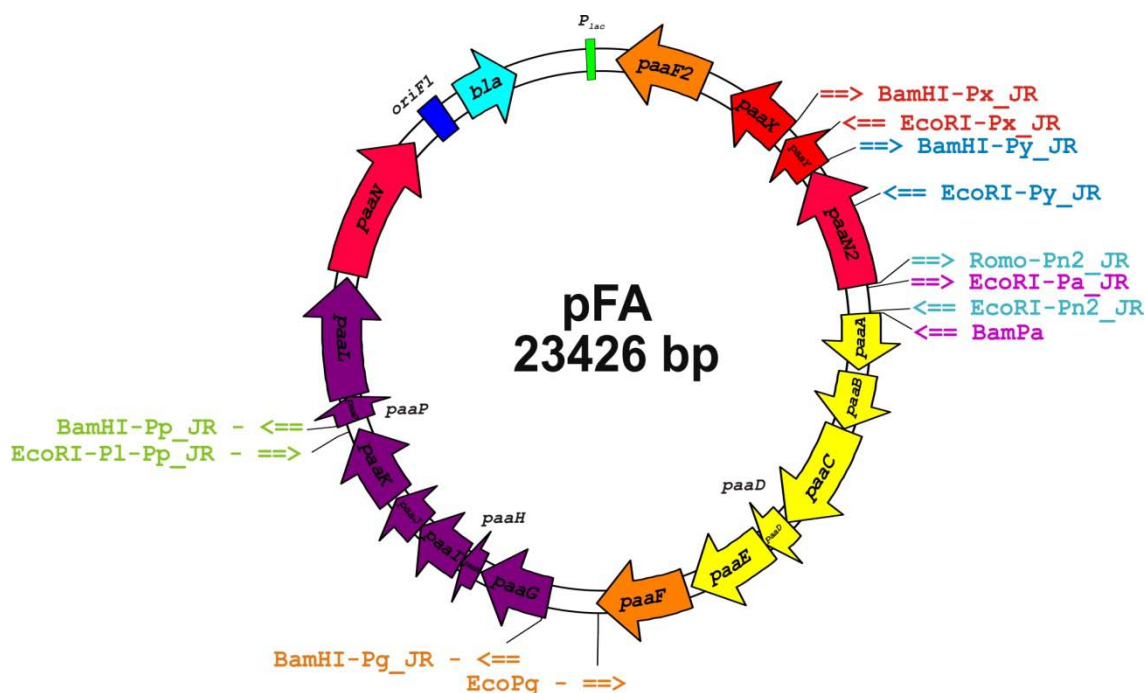
**Figura 5.13. Autorradiografía de *northern blot* obtenido hibridando con la sonda N.** En la imagen se indica la posición y el tamaño de los transcritos observados junto con los de rRNA. En cada pocillo se cargó 5 µg de RNA total de *Pseudomonas* sp. Y2 (Y2), *Pseudomonas* sp. Y2K1 (K1) y *Pseudomonas* sp. Y2T2 (T2) crecidas en medio M9 con glicerol (0,2% (v/v)), AFA (0,2% (p/v)) o STY. P: 100 ng de RNA molecular weight marker DIG-labeled (Roche) (310, 438, 575, 1049, 1517, 1821, 2661, 4742, 6948 nt). AFA: ácido fenilacético. STY: estireno. G: glicerol. **A)** Se marcan, con flechas, la posición de unos débiles transcritos de 5400nt y otro de 4600nt. **B)** Ampliación de la región de hibridación del rRNA 23S de las calles de RNA obtenido de cultivos en AFA o STY, en la que se puede apreciar una banda doble de hibridación.

Estos resultados, (ver Figura 6.1 del apartado 6.1 de Discusión), revelan la transcripción de los genes *paal* impuesta por la presencia de sustrato, tanto AFA (ruta inferior) como STY (ruta superior), pero no por glicerol. También confirman la organización transcripcional descrita por RT-PCR a la vez que detectan transcritos parciales, como es el caso del mensajero de *paaX* y los productos generados a partir del operón *paaGHIJKPLN*, debido, bien a la existencia de promotores alternativos (caso de *paaX* y *paaPLN*), o bien a procesamientos postranscripcionales. Los resultados de la hibridación con la sonda F, demuestran la inducción del gen *paaF2* por la presencia en el medio de cultivo de STY pero no de AFA.

## 5.2. Estudio de promotores del *cluster paa1* de *Pseudomonas* sp. Y2 en el sistema heterólogo de *Escherichia coli* AF141.

Los resultados de los análisis recogidos en la sección anterior, sobre la expresión de los genes de la ruta de degradación de AFA han demostrado la presencia de varios mensajeros que deberían ser transcritos a partir de, al menos, cuatro regiones promotoras situadas delante de los genes *paaN2* (*Pn2*), *paaA* (*Pa*), *paaG* (*Pg*) y *paaP* (*Pp*). El estudio *in silico* realizado previamente (Bartolomé-Martín, 2006) sobre las regiones intergénicas del *cluster paa1* de *Pseudomonas* sp. Y2 concluyó que las regiones previas (*upstream*) a los genes *paaX* (*Px*), *paaN2* (*Pn2*), *paaA* (*Pa*), *paaG* (*Pg*) y *paaP* (*Pp*) podrían funcionar como promotores ya que presentan secuencias probables de unión del factor  $\sigma^{70}$  (RpoD) e, incluso, en el caso de *Pa* y *Pg*, contienen la secuencia reconocida por la proteína PaaX, reguladora del sistema de degradación de AFA. Con la finalidad de comprobar la función promotora de estas regiones se realizaron fusiones génicas con ellas y el gen testigo *lacZ*, que codifica la enzima  $\beta$ -galactosidasa de *E. coli*. Para este estudio se seleccionó también la región 5' de *paaY* (*Py*), ya que a pesar de no existir región intergénica previa (los genes *paaN2* y *paaY* solapan) se sospecha de la existencia de un promotor en esta región (comunicación personal de Victoria Mascaraque).

Las posibles regiones promotoras fueron amplificadas mediante PCR, empleando oligonucleótidos diseñados con dianas de restricción *EcoRI* y *BamHI* introducidas artificialmente (ver Tabla 4.2 del apartado Material y métodos y Tabla 5.1), y utilizando como molde el plásmido pFA (Tabla 4.2 del apartado Material y métodos y Figura 5.14.). El tamaño de cada región amplificada se muestra en la Tabla 5.1. Estos fragmentos (ver Figura 5.14) se clonaron, utilizando las dianas de restricción *EcoRI*, *SmaI* y *BamHI*, en el plásmido pMPO234 (Tabla 4.2 del apartado Material y métodos), construyendo una fusión transcripcional de las regiones promotoras putativas con el gen *lacZ* como testigo.



**Figura 5.14. Esquema del plásmido pFA.** Plásmido derivado de pBluescript II KS<sup>+</sup> portador de todos los genes del cluster *paaI* de *Pseudomonas* sp. Y2. Este plásmido se usó como molde para las amplificaciones por PCR de las regiones intergénicas en las que se valoró su efecto promotor mediante ensayo de la actividad β-galactosidasa. Se detalla en el mismo color la pareja de cebadores (Tabla 5.1) que se usó para cada amplificación. La orientación de las flechas indican la posición *forward* (hacia la derecha) y *reverse* (hacia la izquierda). La pareja de cebadores **rojos** se usó para la amplificación de la región *Px*. La pareja de cebadores **azules** se usó para la amplificación de la región *Py*. La pareja de cebadores **azul claro** se usó para la amplificación de la región *Pn2*. La pareja de cebadores **morados** se usó para la amplificación de la región *Pa*. La pareja de cebadores **naranjas** se usó para la amplificación de la región *Pg*. La pareja de cebadores **verdes** se usó para la amplificación de la región *Pp*.

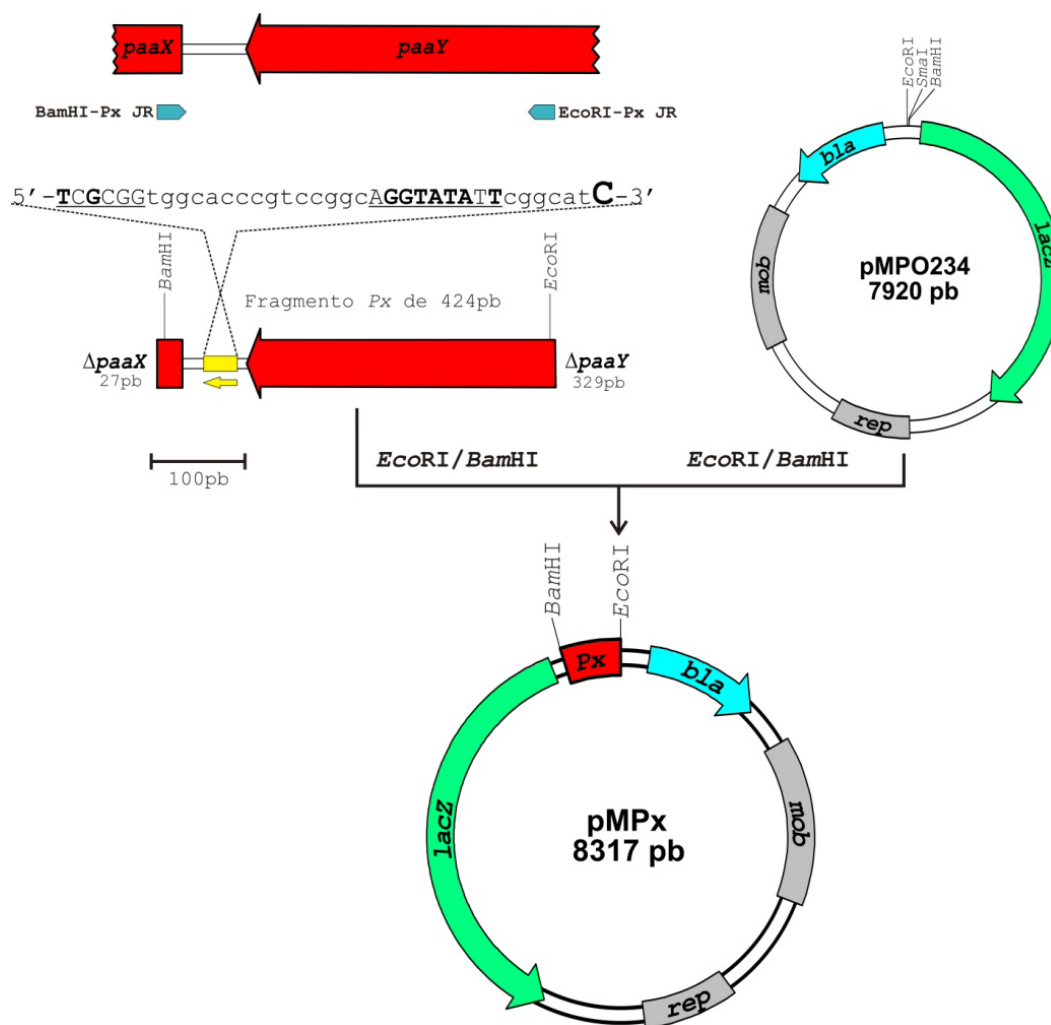
**Tabla 5.1. Regiones amplificadas por PCR y clonadas en el plásmido pMPO234 para el ensayo β-galactosidasa.**

Región	Tamaño (pb)	Oligonucleótidos usados	DNA molde	Plásmidos recombinantes
<i>Px</i>	424	BamHI-Px_JR/EcoRI-Px_JR	pFA	pMPx
<i>Py</i>	730	BamHI-Py_JR/EcoRI-Py_JR	pFA	pMPy
<i>Pn2</i>	401	Romo-Pn2_JR/EcoRI-Pn2_JR	pFA	pMPn2
<i>Pa</i>	406	EcoRI-Pa_JR/BamPa	pFA	pMPa
<i>Pg</i>	808	EcoPg/BamHI-Pg_JR	pFA	pMPg
<i>Pp</i>	193	EcoRI-P1-Pp_JR/BamHI-Pp_JR	pFA	pMPp

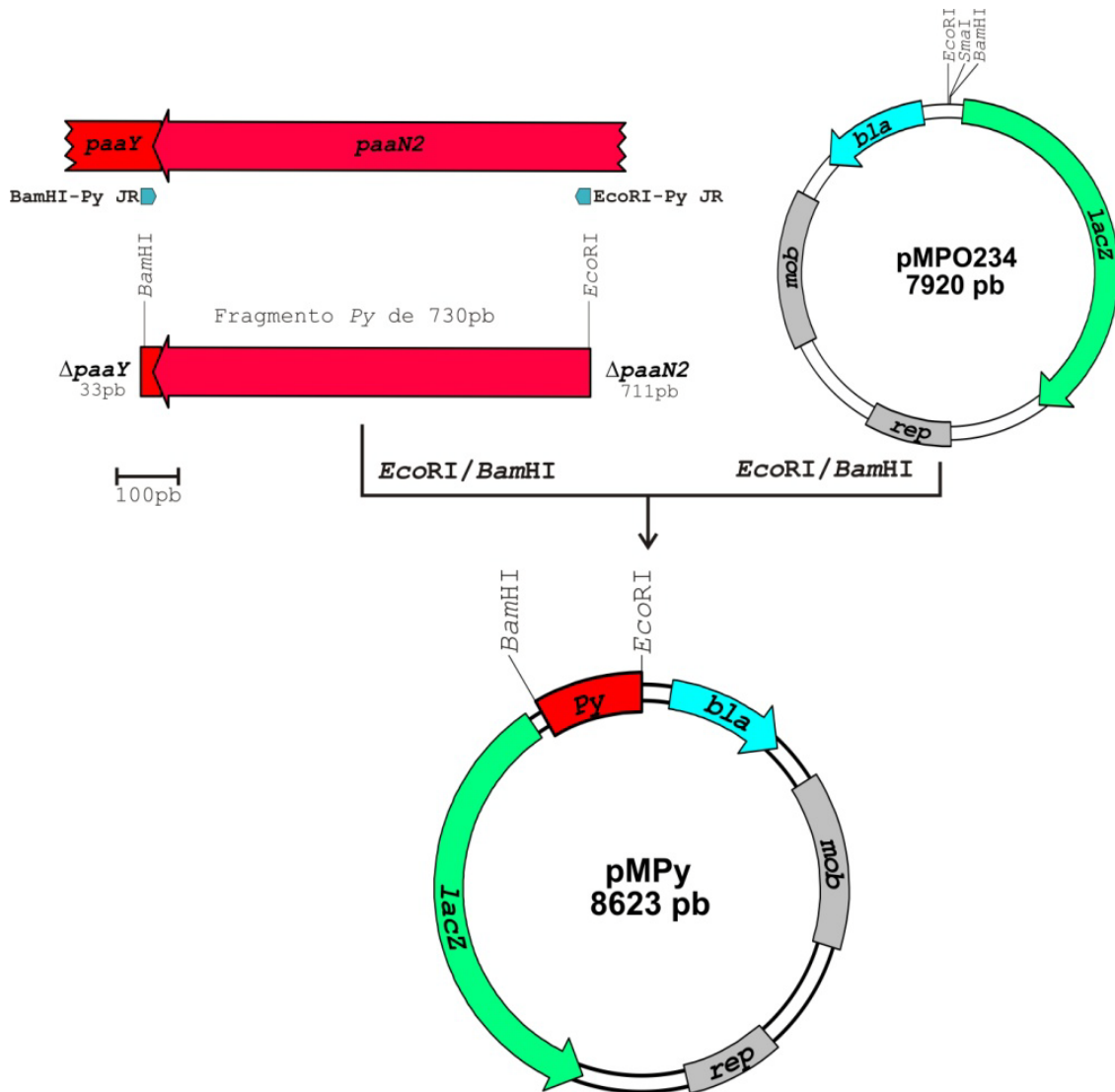
Los plásmidos recombinantes formados a partir de pMPO234 con las regiones *Px*, *Py*, *Pn2*, *Pa*, *Pg* y *Pp* clonadas, recibieron los nombres pMPx, pMPy, pMPn2, pMPa pMPg y pMPp respectivamente (Figuras 5.15 a 5.20), y fueron transferidos a *E. coli* DH5αF' por transformación mediante choque térmico (apartado 4.5.1 del apartado Material y métodos). Tras la selección en medio LB + Ap de los clones que albergaban los plásmidos recombinantes, se comprobó su presencia mediante restricción (*EcoRI/BamHI*) y su secuencia para confirmar la ausencia de errores. Posteriormente estos plásmidos recombinantes fueron aislados, (apartado 4.6.1 de Material y métodos), y transferidos mediante electrotransformación (apartado 4.5.2 de

material y métodos) a *E. coli* AF141 ( $\Delta paa$  y  $\Delta lacZ$ , Tabla 4.1 del apartado Material y métodos), seleccionando en medio LB + Ap los clones con los plásmidos recombinantes.

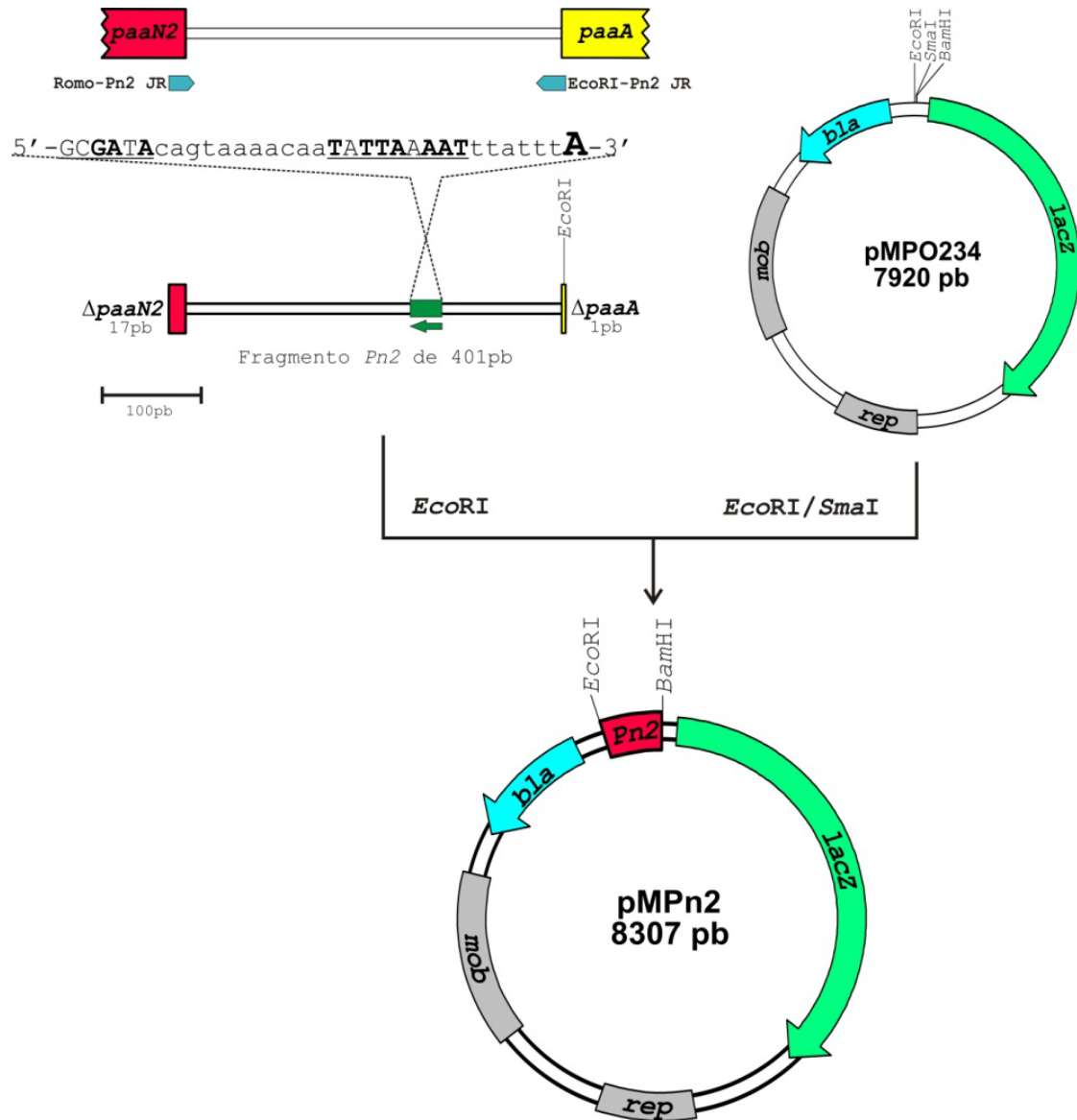
Estos clones presentan un color azul intenso cuando se cultivan en placas con medio mínimo M63 suplementado con glicerol 0,1% (v/v), y con el sustrato cromogénico (X-gal) de la enzima  $\beta$ -galactosidasa, lo que indica que todos estos promotores son funcionales en *E. coli*.



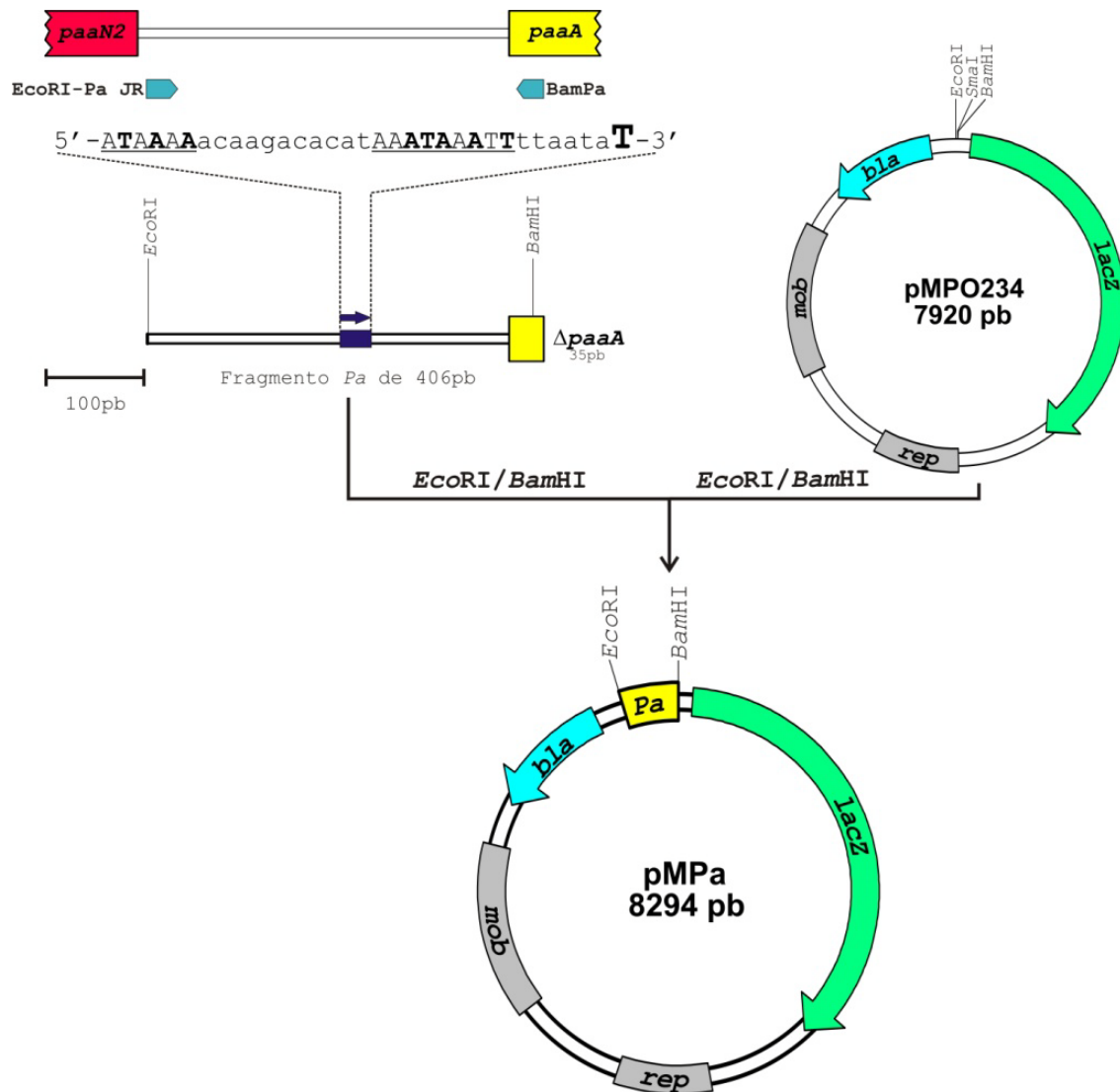
**Figura 5.15. Esquema de construcción del plásmido pMPx.** La región intergénica *paaY-paaX* fue amplificada por PCR utilizando los oligonucleótidos *Bam*HI-Px\_JR y *Eco*RI-Px\_JR (Tabla 4.3 de Material y métodos y Tabla 5.2) y el plásmido pFA como molde (ver Figura 5.16). El producto de PCR obtenido se clonó en el plásmido pMPO234 empleando las enzimas de corte *Eco*RI y *Bam*HI y quedó construido la fusión transcripcional *Px::lacZ* en el plásmido recombinante que se llamó pMPx. En la parte superior se muestra la secuencia promotora  $\sigma^{70}$  putativa así como su localización en la región amplificada. La base correspondiente al sitio +1 aparece en negrita, mayúscula y en tamaño de fuente mayor. Las cajas -35 y -10 están en mayúsculas y subrayadas, y se han señalado en negrita las bases coincidentes con las cajas consenso -35 (TTGACA) y -10 extendida (TGNTATAAT) (Bartolomé-Martín, 2006). Las abreviaturas utilizadas son: *bla*: gen que confiere resistencia a ampicilina y piperacilina, codifica la  $\beta$ -lactamasa. *lacZ*: gen que codifica la  $\beta$ -galactosidasa. *rep* y *mob*: genes de replicación y movilización.



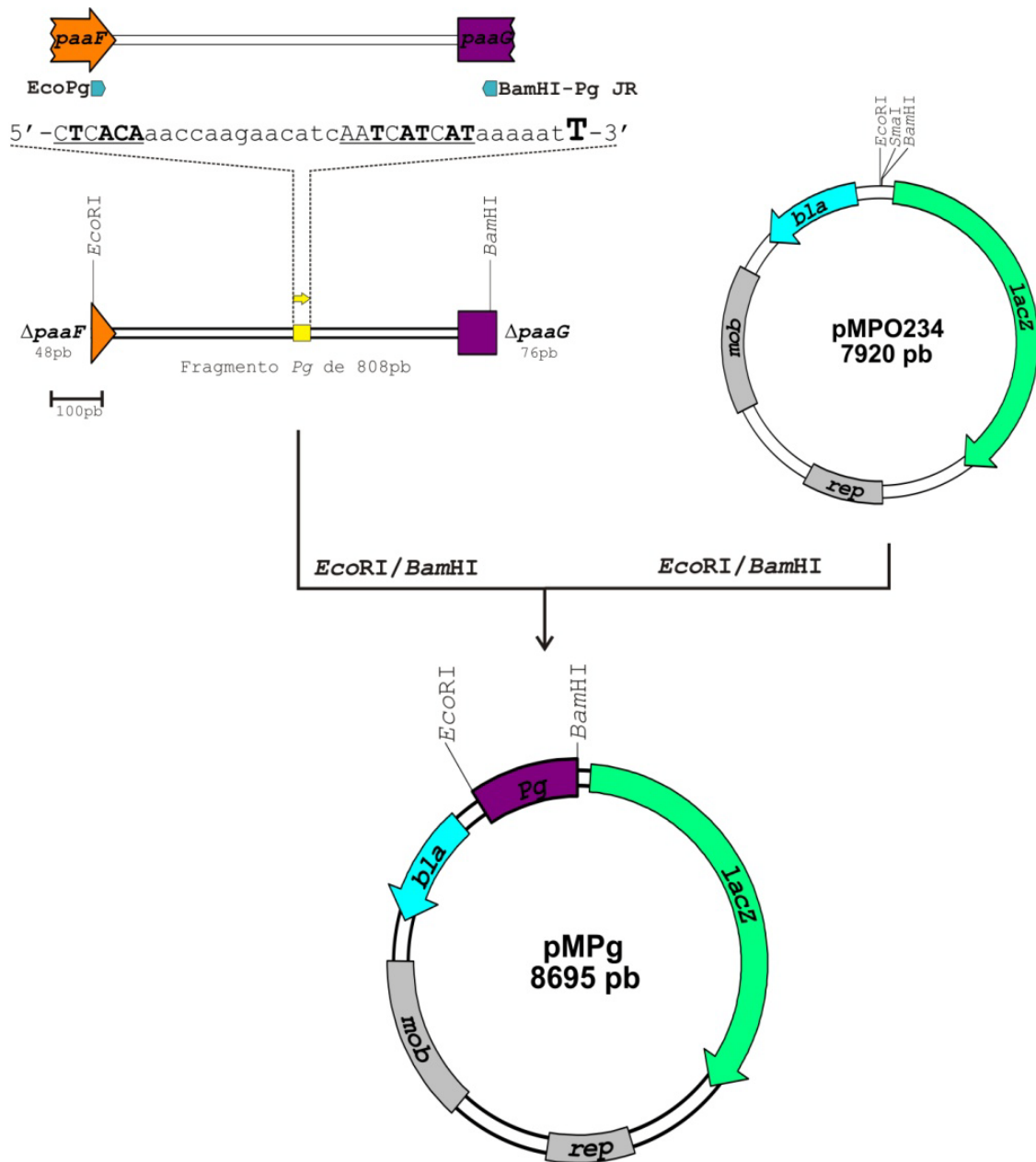
**Figura 5.16. Construcción del plásmido pMPy.** La región comprendida entre *paaN2-paaY* fue amplificada por PCR utilizando los oligonucleótidos BamHI-Py\_JR y EcoRI-Py\_JR (Tabla 4.3 de Material y métodos y Tabla 5.2) y el plásmido pFA como molde (ver Figura 5.16.). El producto de PCR obtenido se clonó en el plásmido pMPO234 empleando las enzimas de corte *EcoRI* y *BamHI* y quedó construida la fusión transcripcional *Py::lacZ* en el plásmido recombinante que recibió el nombre de pMPy. No se detectó ningún promotor  $\sigma^{70}$  putativo localizado en la región *upstream* a *paaY*. Las abreviaturas utilizadas son: *bla*: gen que confiera resistencia a ampicilina y piperacilina, codifica la  $\beta$ -lactamasa. *lacZ*: gen que codifica la  $\beta$ -galactosidasa. *rep* y *mob*: genes de replicación y movilización.



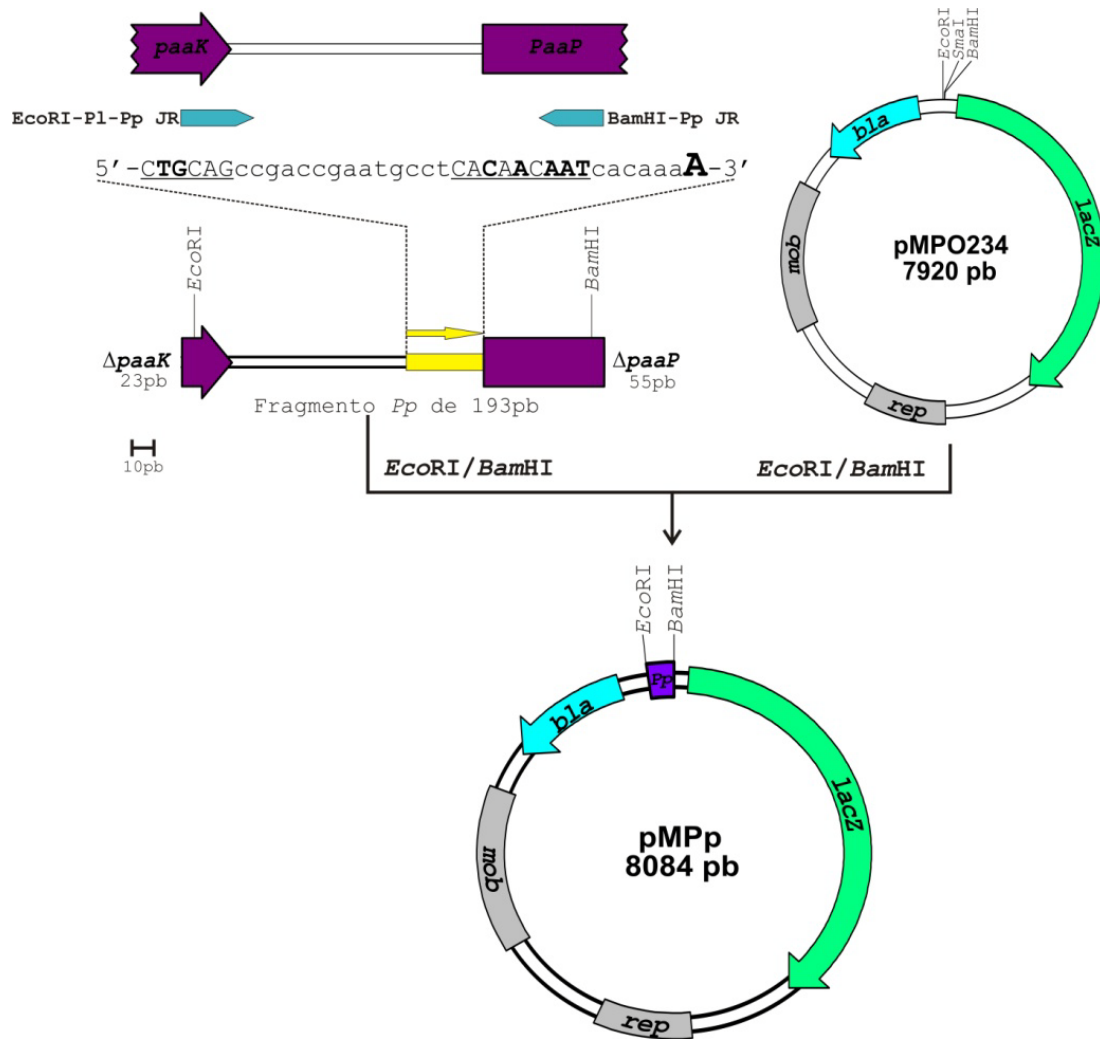
**Figura 5.17. Esquema de construcción del plásmido pMPn2.** La región intergénica comprendida entre los genes *paaA-paaN2* fue amplificada por PCR utilizando el plásmido pFA como molde (ver Figura 5.22.) y la pareja de oligonucleótidos Romo-Pn2\_JR y EcoRI-Pn2\_JR (Tabla 4.3 de material y métodos y Tabla 5.2.). El producto de PCR obtenido se cortó mediante la enzima de corte *EcoRI* y se clonó en el plásmido pMPO234 previamente cortado con las enzimas de corte *EcoRI* y *SmaI*. Quedó así construida la fusión transcripcional *Pn2::lacZ* en el plásmido recombinante llamado pMPn2. En la parte superior se muestra la secuencia promotora  $\sigma^{70}$  putativa así como su localización en la región amplificada. La base correspondiente al sitio +1 aparece en negrita, mayúscula y en tamaño de fuente mayor. Las cajas -35 y -10 están en mayúsculas y subrayadas, y se han señalado en negrita las bases coincidentes con las cajas consenso -35 (TTGACA) y -10 extendida (TGNTATAAT) (Bartolomé-Martín, 2006). Las abreviaturas utilizadas son: *bla*: gen que confiera resistencia a ampicilina y piperacilina, codifica la  $\beta$ -lactamasa. *lacZ*: gen que codifica la  $\beta$ -galactosidasa. *rep* y *mob*: genes de replicación y movilización.



**Figura 5.18. Construcción del plásmido pMPa.** La región intergénica *paaN2-paaA* fue amplificada por PCR utilizando la pareja de oligonucleótidos EcoRI-Pa\_JR y BamPa (Tabla 4.3 de Material y métodos y Tabla 5.2) y el plásmido pFA como molde (ver Figura 5.22.). El producto de PCR obtenido se clonó en el plásmido pMPO234 empleando las enzimas de corte *EcoRI* y *BamHI* y quedó construida la fusión transcripcional *Pa::lacZ* en el plásmido recombinante fue nombrado pMPa. En la parte superior se muestra la secuencia promotora  $\sigma^{70}$  putativa así como su localización en la región amplificada. La base correspondiente al sitio +1 aparece en negrita, mayúscula y en tamaño de fuente mayor. Las cajas -35 y -10 están en mayúsculas y subrayadas, y se han señalado en negrita las bases coincidentes con las cajas consenso -35 (TTGACA) y -10 extendida (TGNTATAAT) (Bartolomé-Martín, 2006). Las abreviaturas utilizadas son: *bla*: gen que confiera resistencia a ampicilina y piperacilina, codifica la  $\beta$ -lactamasa. *lacZ*: gen que codifica la  $\beta$ -galactosidasa. *rep* y *mob*: genes de replicación y movilización.



**Figura 5.19. Construcción del plásmido pMPg.** La región intergénica comprendida entre los genes *paaF-paaG* fue amplificada por PCR utilizando el plásmido pFA como molde (ver Figura 5.22.) y los oligonucleótidos *EcoPq* y *BamHI-Pg<sub>JR</sub>* (Tabla 4.3 de Material y métodos y Tabla 5.2.). El producto de PCR obtenido se clonó en el plásmido pMPO234 tras la digestión de ambos con las enzimas de corte *EcoRI* y *BamHI* y quedó construida la fusión transcripcional *Pg::lacZ* en el plásmido recombinante que recibió el nombre de pMPg. En la parte superior se muestra la secuencia promotora  $\sigma^{70}$  putativa así como su localización en la región amplificada. La base correspondiente al sitio +1 aparece en negrita, mayúscula y en tamaño de fuente mayor. Las cajas -35 y -10 están en mayúsculas y subrayadas, y se han señalado en negrita las bases coincidentes con las cajas consenso -35 (TTGACA) y -10 extendida (TGNTATAAT) (Bartolomé-Martín, 2006). Las abreviaturas utilizadas son: *bla*: gen que confiera resistencia a ampicilina y piperacilina, codifica la  $\beta$ -lactamasa. *lacZ*: gen que codifica la  $\beta$ -galactosidasa. *rep* y *mob*: genes de replicación y movilización.

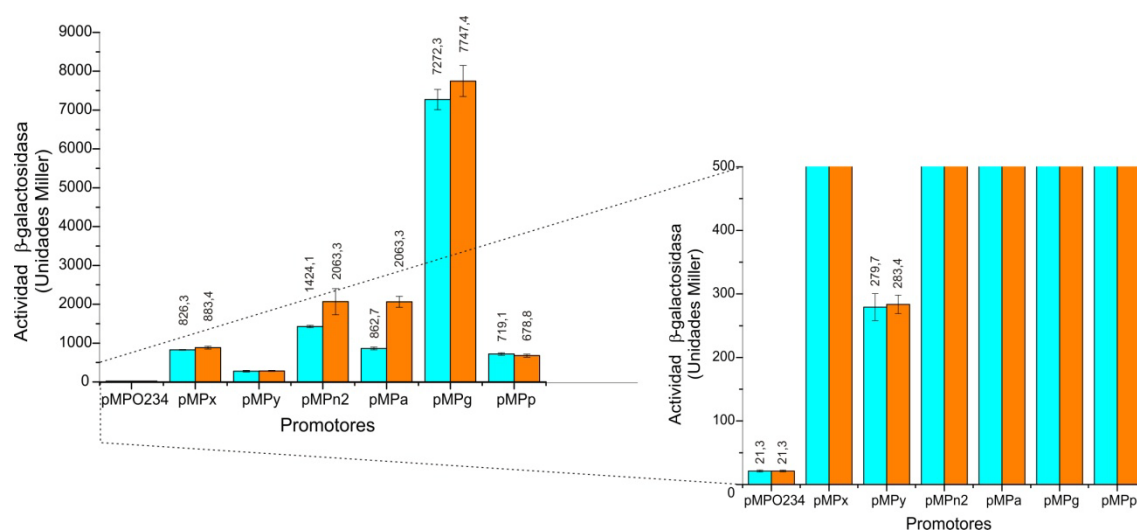


**Figura 5. 20. E** esquema de construcción del plásmido pMPp. La región intergénica *paaK-paaP* fue amplificada por PCR utilizando los oligonucleótidos *EcoRI-P1-Pp\_JR* y *BamHI-Pp\_JR* (Tabla 4.3 de Material y métodos y Tabla 5.2) y el plásmido pFA como molde (ver Figura 5.22.). El producto de PCR obtenido se clonó en el plásmido pMPO234 empleando las enzimas de corte *EcoRI* y *BamHI* y quedó construida la fusión transcripcional *Pp::lacZ* en el plásmido recombinante llamado pMPp. En la parte superior se muestra la secuencia promotora  $\sigma^{70}$  putativa así como su localización en la región amplificada. La base correspondiente al sitio +1 aparece en negrita, mayúscula y en tamaño de fuente mayor. Las cajas -35 y -10 están en mayúsculas y subrayadas, y se han señalado en negrita las bases coincidentes con las cajas consenso -35 (TTGACA) y -10 extendida (TGNTATAAT) (Bartolomé-Martín, 2006). Las abreviaturas utilizadas son: *bla*: gen que confiere resistencia a ampicilina y piperacilina, codifica la  $\beta$ -lactamasa. *lacZ*: gen que codifica la  $\beta$ -galactosidasa. *rep* y *mob*: genes de replicación y movilización.

Tras este resultado preliminar, se procedió a la realización de ensayos de valoración de la actividad  $\beta$ -galactosidasa con células de *E. coli* AF141 que contienen los plásmidos pMPO234, pMPx, pMPy, pMPn2, pMPa, pMPg o pMPp, cultivadas en medio LB y en medio mínimo M63 suplementado con glicerol 0,1% (v/v) y posteriormente, permeabilizadas. En ambas condiciones se realizaron ensayos  $\beta$ -galactosidasa. El genotipo de *E. coli* AF141 (Tabla 4.1 de Material y métodos) no permite crecer esta cepa en AFA, es decir, en condiciones de inducción para estos

promotores, pero tampoco existe la proteína represora de los genes *paa*, *PaaX*, lo que permitirá la expresión constitutiva de *lacZ* que está bajo el control de las regiones promotoras clonadas en los plásmidos anteriores.

Los resultados obtenidos mostraron que la actividad de todas las fusiones transcripcionales probadas eran significativamente superiores a la del plásmido sin promotor, (Figura 5.21.), lo que confirmó la existencia de los promotores *Px*, *Py*, *Pn2*, *Pa*, *Pg* y *Pp* con unas actividades de 41,5, 13,3, 96,9, 96,9, 363,7 y 31,9 veces superior, respectivamente, a la mostrada por las células transformadas con el plásmido pMPO234 control. Se observaron diferencias significativas entre la actividad  $\beta$ -galactosidasa cuantificada en los medios LB y M63 con glicerol para las regiones promotoras *Pa* y *Pn2*, que muestran una represión en LB posiblemente ocasionada por mecanismos de represión por catabolito que actúan sobre estos promotores de la ruta *paa* de *Pseudomonas* sp. Y2. En el resto de promotores las diferencias detectadas entre cultivos en estos dos medios no son significativas. Los resultados obtenidos en los cultivos en medios M63 con glicerol muestran que el promotor *Pg* es el más fuerte, con una actividad de 27,3 veces superior a la del promotor *Py*, el de menor actividad. Los promotores *Pn2* y *Pa* presentan una actividad de 7,3 veces superior a la de *Py*, y los promotores *Px* y *Pp* una actividad 3,1 y 2,4 veces superior a la de *Py*.



**Figura 5.21. Actividad  $\beta$ -galactosidasa en cepas derivadas de *E. coli* AF141.** Las células de *E. coli* AF141 portando los plásmidos pMPO234 (como control), pMPx (con el promotor *Px*), pMPy (con el promotor *Py*), pMPn2 (con el promotor *Pn2*), pMPa (con el promotor *Pa*), pMPg (con el promotor *Pg*) y pMPp (con el promotor *Pp*) se cultivaron hasta una  $DO_{600}$  comprendida entre 0,6-0,7 en medio LB (barras de color cian) y M63+glicerol 0,1% (v/v) (barras de color naranja). Los ensayos de actividad  $\beta$ -galactosidasa se realizaron con células permeabilizadas como se indica en el apartado 12.1. de Material y métodos. Los valores representados (en Unidades Miller) son la media de tres experimentos independientes con una desviación estándar que se indica en la figura.

Los datos más llamativos resultan de la confirmación de la actividad de los promotores *Px*, *Py* e *Pp*. Es muy interesante la presencia de promotores independientes controlando los genes *paaX* y *paaY* cuya función solapa con del promotor *Pn2* que controla la expresión de los genes *paaN2*, *paaY* y *paaX*. Llama también la atención la presencia del promotor *Pp*, coherente con la presencia de transcritos parciales *paaPLN*, y que plantea la existencia de un doble sistema de expresión que afectaría a los genes finales del operón *paaGHIJKPLN*, controlados por el promotor *Pg* y, quizá en menor medida, por *Pp*. El hecho de la presencia de los promotores alternativos, *Px*, *Py* y *Pp*, indica la existencia de un control muy complejo de la expresión de los genes *paa*.

### **5.3. Estudio de la expresión de proteínas. Proteómica sobre *Pseudomonas* sp. Y2.**

Para profundizar en el conocimiento de la expresión de los genes *paa* de *Pseudomonas* sp. Y2 se llevó a cabo un estudio parcial del proteoma de *Pseudomonas* sp. Y2, centrado fundamentalmente en la expresión de las proteínas de los *clusters paa1* y *paa2* en diferentes medios.

La utilización del análisis diferencial de proteínas expresadas en cultivos crecidos en distintos medios, hizo necesario ajustar las condiciones experimentales al caso concreto de las proteínas Paa de *Pseudomonas* sp. Y2. En el trabajo de selección e identificación de estas proteínas fue posible la detección de otras diferentes a Paa las cuales fueron estudiadas para determinar patrones de expresión relacionados con nuestro estudio. Con tal fin se realizaron diversos ensayos previos cuyos resultados se exponen a continuación.

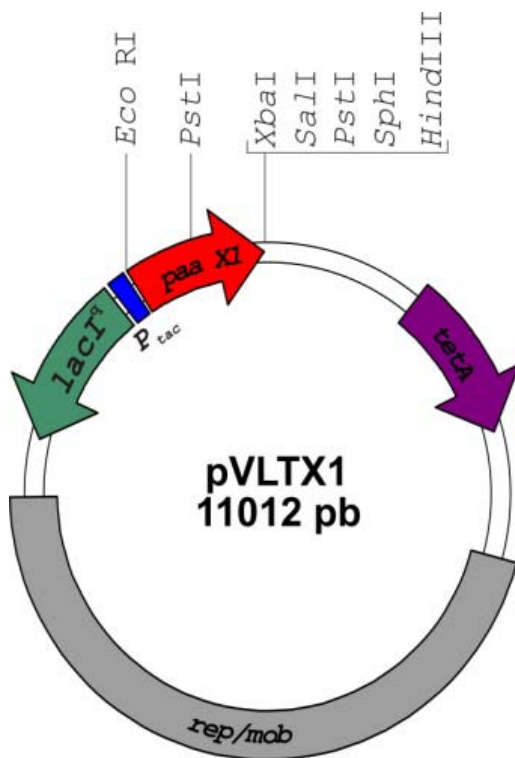
#### **5.3.1. Separación electroforética de proteínas, comparación de imágenes 2D y análisis de manchas.**

Para la obtención de extractos de proteína soluble (apartado 4.8.1 de Material y métodos) se recogieron células crecidas en medio mínimo M9 suplementado con glicerol 0,4% (v/v) o con AFA 0,2% (p/v), así como en medio rico LB con AFA 0,2% (p/v) (ver Tabla 5.2). En primer lugar se realizó un gel monodimensional en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE al 12% (p/v) de poliacrilamida) para comprobar si de este modo puede detectarse una expresión diferencial de proteínas en mutantes derivados de *Pseudomonas* sp. Y2 (Figura 5.23), crecidos en el mismo o en diferentes medios, tras realizar una primera valoración de la concentración de proteínas (apartado 4.8.2 de Material y métodos). En este ensayo previo se pudo observar un patrón de bandas diferente, resultado de una expresión cuantitativa y cualitativamente distinta entre las diferentes estirpes en un mismo medio, y en la misma estirpe en diferentes medios de cultivo (Figura 5.23). Tras este resultado preliminar se procedió al análisis de proteínas en geles bidimensionales (Tabla 5.2).

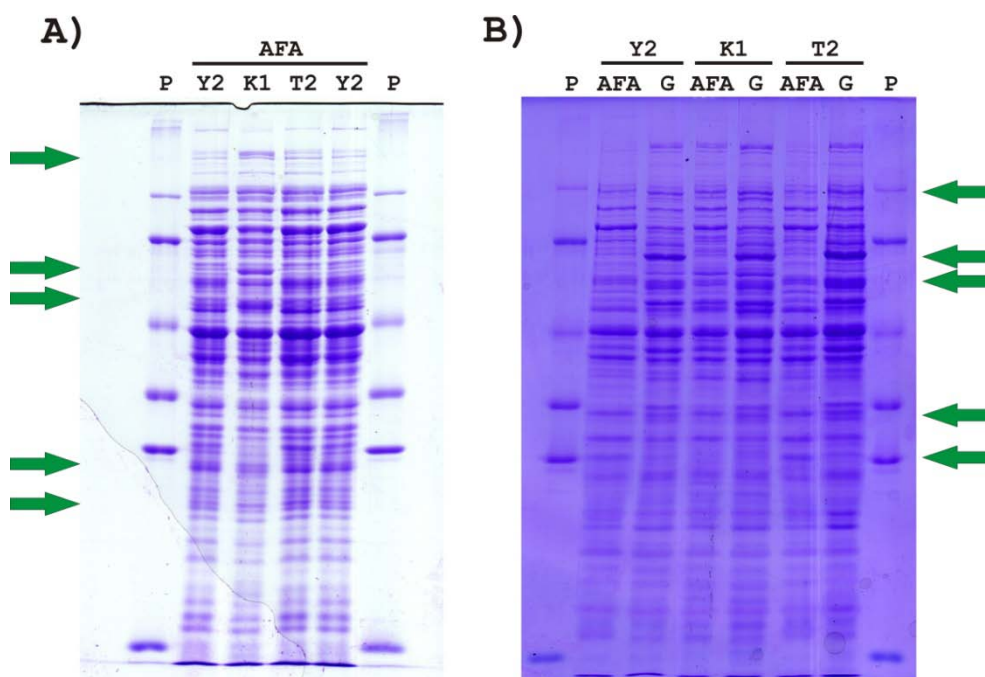
**Tabla 5.2. Estirpes de *Pseudomonas* sp. Y2 utilizadas en este estudio.**

Estirpes	M9 + Glicerol	M9 + AFA	LB + AFA
<i>Pseudomonas</i> sp. Y2			
<i>Pseudomonas</i> sp. Y2K1			
<i>Pseudomonas</i> sp. Y2T2			
<i>Pseudomonas</i> sp. Y2C1			
<i>Pseudomonas</i> sp. Y2T2X1			
<i>Pseudomona</i> sp. Y2[pVLTX1] <sup>1</sup> +IPTG			
<i>Pseudomonas</i> sp. Y2[pVLTX1] <sup>1</sup>			

1: en la Figura 5.22 se muestra un esquema del plásmidos pVLTX1.



**Figura 5. 22. P lásmido pVLTX.**  
Plásmido que lleva clonado el gen *paaX* del *cluster paa1* de *Pseudomonas* sp. Y2 (Tabla 4.2 del apartado Material y métodos). *lacI<sup>g</sup>*: gen represor del promotor *P<sub>tac</sub>*. *tetA*: gen que confiere resistencia a tetracilina. *rep/mob*: regiones que permiten la replicación y movilización.



**Figura 5.23. Imágenes electroforéticas de extractos de proteína soluble de *Pseudomonas* sp. Y2 y e stirpes mutantes d erivadas c recidas e n d iferentes s ustratos.** Los extractos proteicos solubles de *Pseudomonas* sp. Y2 (Y2), *Pseudomonas* sp. Y2K1 (K1) y *Pseudomonas* sp. Y2T2 (T2) fueron separados en geles de SDS y 12% (p/v) de poliacrilamida, teñido con azul de Coomassie. Se cargó 30  $\mu$ g de extracto proteico en cada pocillo. **A)** Extractos proteicos de células crecidas en medio M9 con AFA. **P:** patrones de pesos moleculares (fosforilasa B, 97 kDa; BSA, 67 kDa; ovoalbúmina, 45kDa; lactato deshidrogenasa, 34 kDa; carboanhidrasa, 29 kDa y lisozima, 14 kDa.). **B)** Extractos proteicos de células crecidas en medio M9 con AFA (0,2% (p/v)) o glicerol (0,4% (p/v)) (G). **P:** patrones de pesos moleculares (fosforilasa B, 97 kDa; BSA, 67 kDa; ovoalbúmina, 45 kDa; lactato deshidrogenasa, 34 kDa; carboanhidrasa, 29 kDa y lisozima, 14 kDa). Las flechas verdes horizontales señalan las zonas donde se observan diferencias cualitativas y cuantitativas en el patrón de expresión de proteínas entre las estirpes estudiadas.

Las proteínas fueron separadas, en primer lugar, según su punto isoelectrico (pI) mediante isoelectroenfoque (IEE) y posteriormente según su peso molecular (PM) mediante la electroforesis en gel en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) (apartados 4.9.4.1 y 4.9.4.6 de Material y métodos, respectivamente). Estos geles fueron luego revelados por tinción con Coomassie. En estas condiciones se detectaron hasta 293 manchas, con valores de PM y pI comprendidos entre 9-141 kDa y 4-7, respectivamente. La comparación de geles de proteínas obtenidos de diferentes cultivos (Tabla 2 5.2 y 5.3) permitió seleccionar las manchas correspondientes a proteínas presentes en unos geles y ausentes en otros. Esta comparación fue realizada manualmente, mediante impresiones en transparencias de los geles previamente digitalizadas, o con la ayuda del programa informático *PDQuest™ Advanced, 2-D Analysis Software Vs 8.01* (Bio-Rad). Se recortaron 134 manchas provenientes de geles generados con gradientes de pH de 4 a 7 y de 5 a 7, y las proteínas presentes en ellos fueron estudiadas mediante su digestión con tripsina y el análisis posterior de los péptidos generados mediante espectrometría de masas. En los casos necesarios, se llevó a cabo la secuenciación de algunos

péptidos trípticos de mayor tamaño, recuperados tras el análisis MALDI-TOF (apartado 4.14.3 de Material y métodos).

**Tabla 5.3. Nomenclatura de las manchas.** Se muestra la nomenclatura utilizada para identificar la procedencia de cada mancha. La letra N hace referencia al número de mancha por orden de extracción.

Nombre de mancha	Estirpe y cultivo
PY <u>N</u>	<i>Pseudomonas</i> sp. Y2 en M9 + AFA
PK <u>N</u>	<i>Pseudomonas</i> sp. Y2 K1 en M9 + AFA
PT <u>N</u>	<i>Pseudomonas</i> sp. Y2 T2 en M9 + AFA
PdX <u>N</u>	<i>Pseudomonas</i> sp. Y2 T2 X1 en M9 + AFA
PpX <u>N</u>	<i>Pseudomonas</i> sp. Y2[pVLTX1]+ IPTG en M9 + AFA
LPY <u>N</u>	<i>Pseudomonas</i> sp Y2 en LB + AFA
LPC <u>N</u>	<i>Pseudomonas</i> sp Y2 C1 en LB + AFA
LPdX <u>N</u>	<i>Pseudomonas</i> sp. Y2 T2 X1 en LB + AFA
LPpX <u>N</u>	<i>Pseudomonas</i> sp. Y2[pVLTX1] en LB + AFA
LPpX <u>IN</u>	<i>Pseudomonas</i> sp. Y2[pVLTX1]+ IPTG en LB + AFA

De las 134 manchas analizadas se identificaron 83, 53 lo fueron por análisis de la huella peptídica, 3 mediante fragmentación peptídica y 27 se identificaron utilizando las dos técnicas combinadas. Las 83 manchas identificadas correspondieron a 60 proteínas diferentes. En la Tabla 5.3. se muestra la nomenclatura utilizada para la identificación de cada mancha y su procedencia.

El proceso de identificación de las proteínas analizadas se basó en la comparación de los datos obtenidos experimentalmente con los deducidos teóricamente de las secuencias disponibles en las bases de datos. La fiabilidad de estas deducciones teóricas conseguidas a partir de secuencias de genes que codifican proteínas o de secuencias de aminoácidos de proteínas purificadas, limita el número de proteínas que pueden ser identificadas. En los casos en que el organismo objetivo del estudio no está secuenciado la probabilidad de éxito en las identificaciones aumenta al utilizar bases de datos de secuencias de organismos filogenéticamente próximos. Es por esta razón que muchas de las identificaciones de proteínas y enzimas descritas en este trabajo se han realizado sobre el proteoma de especies de microorganismos diferentes a *Pseudomonas* sp. Y2.

Los resultados de este estudio se recogen en las Tablas I y II del Apéndice. El hecho de que se hayan identificado estas proteínas indica que están presentes en *Pseudomonas* sp. Y2, a pesar de no haber sido secuenciado su genoma y, por lo tanto, no poder corroborar esta información con la secuencia genómica. Entre las proteínas detectadas e identificadas en *Pseudomonas* sp. Y2 se incluyen proteínas de membrana, algo extraño teniendo en cuenta que sólo se ha utilizado la fracción soluble de proteínas sin el uso de detergentes especiales. Esto

ocurre para el caso de las proteínas ATP sintasa F1, subunidad alfa (AtpA) y beta (AtpD), aunque estas proteínas, que forman parte de la subunidad F1 del complejo ATP sintasa, están localizadas en la cara interna de la membrana plasmática y no están incluidas en la membrana, por lo que no son hidrofóbicas.

### 5.3.2. Comparaciones de manchas procedentes de diferentes estirpes crecidas en distintos medios.

La comparación de los geles procedentes de una determinada cepa crecida en diferentes medios y de diferentes cepas crecidas en un mismo medio, se muestra en la Tabla III del Apéndice.

Dejando a un lado los datos correspondientes a la expresión diferencial de muchas de las proteínas identificadas, que serán discutidos en el apartado correspondiente, los resultados de la expresión de las proteínas Paa confirman muchos detalles de su expresión (Tabla 5.4). Las proteínas Paa que se han identificadas en el actual estudio han sido 11, (Tabla 5.4 y Tabla I y II del Apéndice), del *cluster paa1*: PaaB, PaaC, PaaF, PaaI, PaaK, PaaN y PaaN2, y del *cluster paa2*: PaaC2, PaaE2, PaaF3 y PaaN3. El resto de proteínas que completan estos *clusters* no han podido ser detectadas ni identificadas, bien por su baja expresión (proteínas reguladoras PaaX, PaaY, PaaX2 y PaaY2), por sus características hidrofóbicas y pI (PaaL, PaaP, PaaL2 y PaaP2), o por migrar en zonas de difícil *screening*.

**Tabla 5.4. Patrón de expresión de las proteínas Paa en diferentes medio y estirpes.** Color verde y signo (+) presencia; color rojo y signo (-) ausencia. En caso de presencia, la cuantificación de la cantidad de proteína se mostrará en graduación de signos (+): hiperexpresión= +++, hipoexpresión=+.

Manchas	Proteína	M9 + GLI <sup>1</sup>			M9 + AFA <sup>2</sup>					LB + AFA				
		Y2 <sup>a</sup>	K1 <sup>b</sup>	T2 <sup>c</sup>	Y2 <sup>a</sup>	K1 <sup>b</sup>	T2 <sup>c</sup>	X1 <sup>d</sup>	h X1+I <sup>e</sup>	Y2 <sup>a</sup>	C1 <sup>f</sup>	X1 <sup>b</sup>	h X1+I <sup>e</sup>	h X1 <sup>g</sup>
	<b>Paa1</b>													
PT3, LPdX10	PaaN2	-	-	-	++	-	+++	+++	++	-	-	+++	-	-
PT6, LPdX20	PaaB	-	-	-	++	-	+++	+++	++	-	-	++	-	-
PT4, PpX15, PdX18, PdX19, LPdX24	PaaC	-	-	-	++	-	+++	+++	++	-	-	+++	-	-
PT5	PaaF	-	-	-	+++	-	+++	+++	++	-	-	++	-	-
PdX13, PdX14, LPdX19	PaaI	-	-	-	+	-	++	+++	+	-	-	+++	-	-
LPdX14	PaaK	-	-	-	++	-	+++	+++	++	-	-	+++	-	-
PT2, LPdX8	PaaN	-	-	-	++	-	+++	+++	++	-	-	+++	-	-
	<b>Paa2</b>													
PK7	PaaC2	-	-	-	+	+++	-	-	-	-	-	-	-	-
PK17	PaaE2	-	-	-	++	+++	-	-	+	-	-	-	-	-
PK8	PaaF3	-	-	-	+	+++	-	-	+	-	-	-	-	-
PK1	PaaN3	-	-	-	+	+++	-	-	+	-	-	-	-	-

a: *Pseudomonas* sp. Y2. b: *Pseudomonas* sp. Y2K1( $\Delta paa1::Km$ ). c: *Pseudomonas* sp. Y2T2 ( $\Delta paa2::Tc$ ). d: *Pseudomonas* sp. Y2T2X1 ( $\Delta paa2::Tc \Delta paaX::Km$ ). e: *Pseudomonas* sp. Y2[pVLTX1]+IPTG. f: *Pseudomonas* sp. Y2C1 (*crec::Tc*). g: *Pseudomonas* sp. Y2[pVLTX1].1: glicerol. 2: ácido fenilacético.

En medio mínimo M9 con glicerol, no fue posible detectar ninguna proteína Paa de las identificadas (Tabla 5.4), lo cual indica la ausencia de inducción de estas proteínas en este medio, mientras que en los cultivos con AFA hubo expresión de todas estas proteínas (Tabla 5.4), siempre y cuando estuvieron presentes en el genoma los genes que las codifican (están ausentes en el caso de las estirpes mutantes), consecuencia de la inducción que produce el AFA sobre esta ruta. En medio LB con AFA se detecta una fuerte represión de los *cluster paa1* y *paa2* (Tabla 5.4), pese a la presencia de AFA en el medio. Esta represión no está mediada por Crc, ya que en la estirpe mutante para este gen *crc* tampoco se detecta proteínas Paa. Únicamente se detecta una alta presencia de proteínas Paa1 en la estirpe *Pseudomonas* sp. Y2T2X1 (esta estirpe tiene delecionada el *cluster paa2*), en la que el represor PaaX está ausente.

Un dato sorprendente es la falta de expresión de la proteína PaaC2 en *Pseudomonas* sp. Y2 [pVLTX1]+IPTG, ya que si que se expresan las proteínas PaaE2 y PaaF3, cuyos genes codificantes forman parte de la misma unidad transcripcional, *paaA2B2C2E2F3*, y cuya explicación podría encontrarse en la existencia de algún proceso de regulación postranscripcional o podría deberse a algún artefacto experimental.

## 5.4. Funcionalidad del gen *paaY* de *Pseudomonas* sp. Y2.

La proteína PaaY de *Pseudomonas* sp. Y2 está constituida por 197 aminoácidos, 20.869 Da y un punto isoeléctrico teórico de 5,81, cuyo papel en el metabolismo del AFA permanece aún desconocido. Los últimos datos obtenidos sobre *E. coli* indican su inclusión entre los elementos reguladores del sistema (Fernández, 2005). Pero los resultados obtenidos en este trabajo la orientan más hacia una función mixta: reguladora y catabólica.

### 5.4.1. Análisis de comparación de secuencia de la proteína PaaY.

La secuencia de PaaY fue comparada en las bases de datos de proteínas y en las Tablas 5.5 y 5.6 se muestran algunas de las proteínas que presentaron un grado de identidad significativa con PaaY. Entre estas proteínas se encuentra PaaY de *P. putida* U (Olivera y col., 1998), PaaY2 de *Pseudomonas* sp. Y2 (Bartolomé-Martín y col., 2004), PaaY de *A. evansii* (Mohamed, 2000) y PaaY de *E. coli* (Ferrández y col., 1997). Pero la proteína PaaY también presenta semejanzas significativas con proteínas de unión a metales, anhidrasas carbónicas, acetiltransferasas y con la proteína CaiE cuya función es desconocida pero que está implicada en el metabolismo de carnitina (Eichler y col., 1994).

**Tabla 5.5. Proteínas que presentan gran identidad aminoacídica con la secuencia de PaaY de *Pseudomonas* sp. Y2.**

Productos génicos relacionados				
Nombre	Función	Organismo	% Identidad (aa)	Nº Acceso
PaaY	Desconocida	<i>Pseudomonas fluorescens</i> Pf-5	78.1% (197)	YP 260235
PaaY	Desconocida	<i>Pseudomonas putida</i> F1	78.1% (199)	YP 001267793
PaaY	Desconocida	<i>Pseudomonas putida</i> KT2440	77.0% (199)	NP 745428
PaaY	Desconocida	<i>Pseudomonas putida</i> W619	77.0% (199)	YP 001749485
PhaM	Desconocida	<i>Pseudomonas entomophila</i> L48	76.5% (199)	YP 608364
PaaY	Desconocida	<i>Pseudomonas putida</i> GB-1	76.5% (199)	YP 001668846
PaaY	Desconocida	<i>Pseudomonas putida</i>	76.0% (199)	AAC24341
PaaY2	Desconocida	<i>Pseudomonas</i> sp. Y2	73.2% (199)	CAE45101
CaiE	Desconocida	<i>Citrobacter koseri</i>	62,9% (197)	A8ALR8
PaaY	Desconocida	<i>Azoarcus evansii</i>	62.5% (201)	AAG28963
CaiE	Desconocida	<i>Escherichia coli</i>	60.8% (203)	Q8XA36
PaaY	Desconocida	<i>Escherichia coli</i>	60.5% (196)	CAA66102
ABO11776	Anhidrasa carbónica	<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 17978	56.9% (201)	ABO11776
Bamb_3897	Anhidrasa carbónica	<i>Burkholderia ambifaria</i> AMMD	55.3% (176)	YP 775785
PA3753	Desconocida	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	38.3% (174)	P40882
YrdA	Desconocida	<i>Escherichia coli</i>	30.5% (184)	P0A9W9
Cat4	Cloranfenicol acetiltransferasa	<i>Morganella morganii</i>	27.5% (210)	P50869

**Tabla 5.6. Comparación del motivo hexapéptido [LIV]-[GAED]-X-X-[STAV]-X (PS00101), conservado en PaaY de *Pseudomonas* sp. Y2.**

Función	Nombre	Organismo	aa	% Identidad	% Alineado
Serina O-acetiltransferasa	CysE	<i>Pseudomonas putida</i> KT2440	174	41	39,1
Tiogalactósido acetiltransferasa	LacA	<i>Escherichia coli</i>	203	19	68
UDP-N-acetilglucosamina aciltransferasa	LpxA	<i>Pseudomonas putida</i> KT2440	258	25	48,1
UDP-3-O-[3-Hidroximiristoil] glucosamina N-acetiltransferasa	LpxD	<i>Pseudomonas putida</i> KT2440	351	30	30,2
Cloramfenicol O-acetiltransferasa	Cat	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	212	22	78,8
Tetrahidrodipicolinato N-succiniltransferasa	DapD	<i>Escherichia coli</i>	274	30	15,7
N-acetilglucosamina-1-fosfato uridiltransferasa	GlmU	<i>Pseudomonas putida</i> KT2440	455	26	23
Maltosa O-acetiltransferasa	Maa	<i>Escherichia coli</i>	183	43	17,5

La proteína PaaY contiene el dominio conservado L $\beta$ H-*paaY*, también presente en un conjunto de proteínas pero no caracterizadas con alto grado de identidad con la proteína producto del gen *paaY* de *E. coli*, gen integrante del *cluster* génico *paa* responsable de la degradación del AFA. Este dominio L $\beta$ H se caracteriza por adoptar una estructura del tipo *left-handed parallel beta-helix* (L $\beta$ H) y contiene una secuencia repetida imperfecta de seis aminoácidos, cuyo consenso es [LIV]-[GAED]-X-X-[STAV]-X (Bairoch, 1993). Esta secuencia fue identificada inicialmente en aciltransferasas bacterianas (Vaara, 1992) y está anotada en la base de datos PROSITE con la referencia de acceso PS00101. Este motivo está presente habitualmente en proteínas de la familia  $\gamma$  anhidrasa carbónica, proteínas de unión a ferripiquelina (Fbp), proteínas que tienen relación con el transporte de metales y la iniciación de la traducción y que muestran estructuras homotrimeros en sus formas activas. Esta estructura de hexapéptidos repetidos también se presenta conservada en transferasas bacterianas tales como CysE (SAT, Serina O-acetiltransferasa, (Wigley y col., 1990)), LacA (Tiogalactósido acetiltransferasa, (Wang y col., 2002)), LpxA (UDP-N-acetilglucosamina aciltransferasa, (Vaara, 1992; Raetz y Roderick, 1995)), LpxD (UDP-3-O[Hidroximiristoil] glucosamina N-acetiltransferasa, (Vuorio y col., 1994)), Cat (Cloramfenicol O-acetiltransferasa, (Parent y Roy, 1992)), DapD (Tetrahidrodipicolinato N-succiniltransferasa, (Beaman y col., 2002)), GlmU (N-acetilglucosamina-1-fosfato uridiltransferasa, (Brown y col., 1999)) y Maa (Maltosa O-acetiltransferasa, (Brand y Boos, 1991)) entre otras.

#### 5.4.2. Construcción y estudio de mutantes de *Pseudomonas* sp. Y2.

En este trabajo, la investigación sobre el papel de la proteína PaaY se abordó a través del estudio de mutantes defectivos en el gen *paaY* procedentes de la bacteria *Pseudomonas* sp. Y2T2, derivada de la estirpe *Pseudomonas* sp. Y2 por delección de todo el *cluster paa2*.

### 5.4.2.1. Construcción del mutante *Pseudomonas* sp. Y2T2Y1.

Para la construcción del mutante *Pseudomonas* sp. Y2T2Y1 ( $\Delta paa2::Tc$ ,  $\Delta paaY::Km$ ) se partió de la cepa parental *Pseudomonas* sp. Y2T2 ( $\Delta paa2::Tc$ ) que sólo contiene una copia de *paaY* en su cromosoma. La mutación por delección del gen *paaY* produjo una estirpe deficiente para este gen pero que porta el resto de genes *paa* intactos.

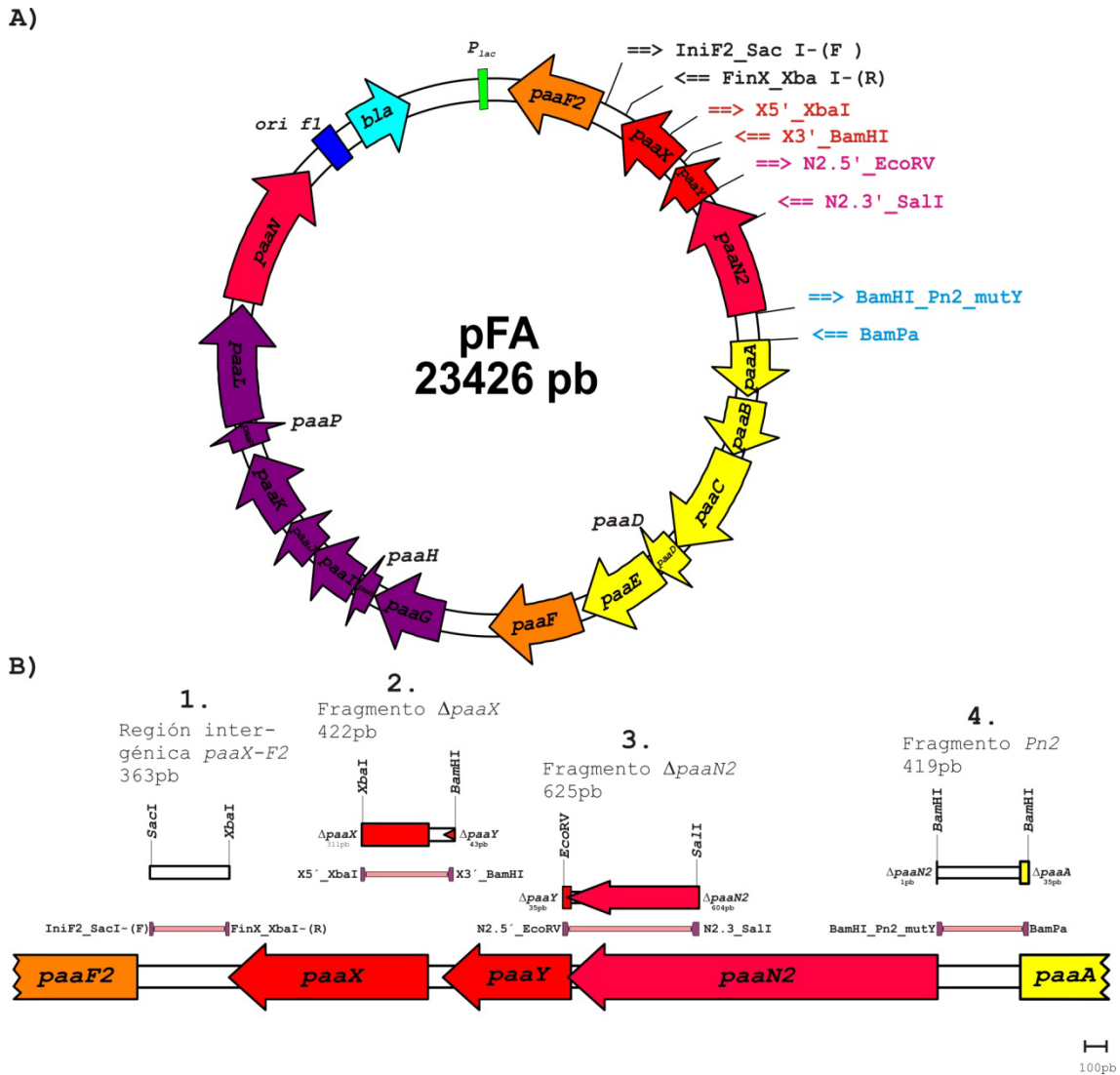
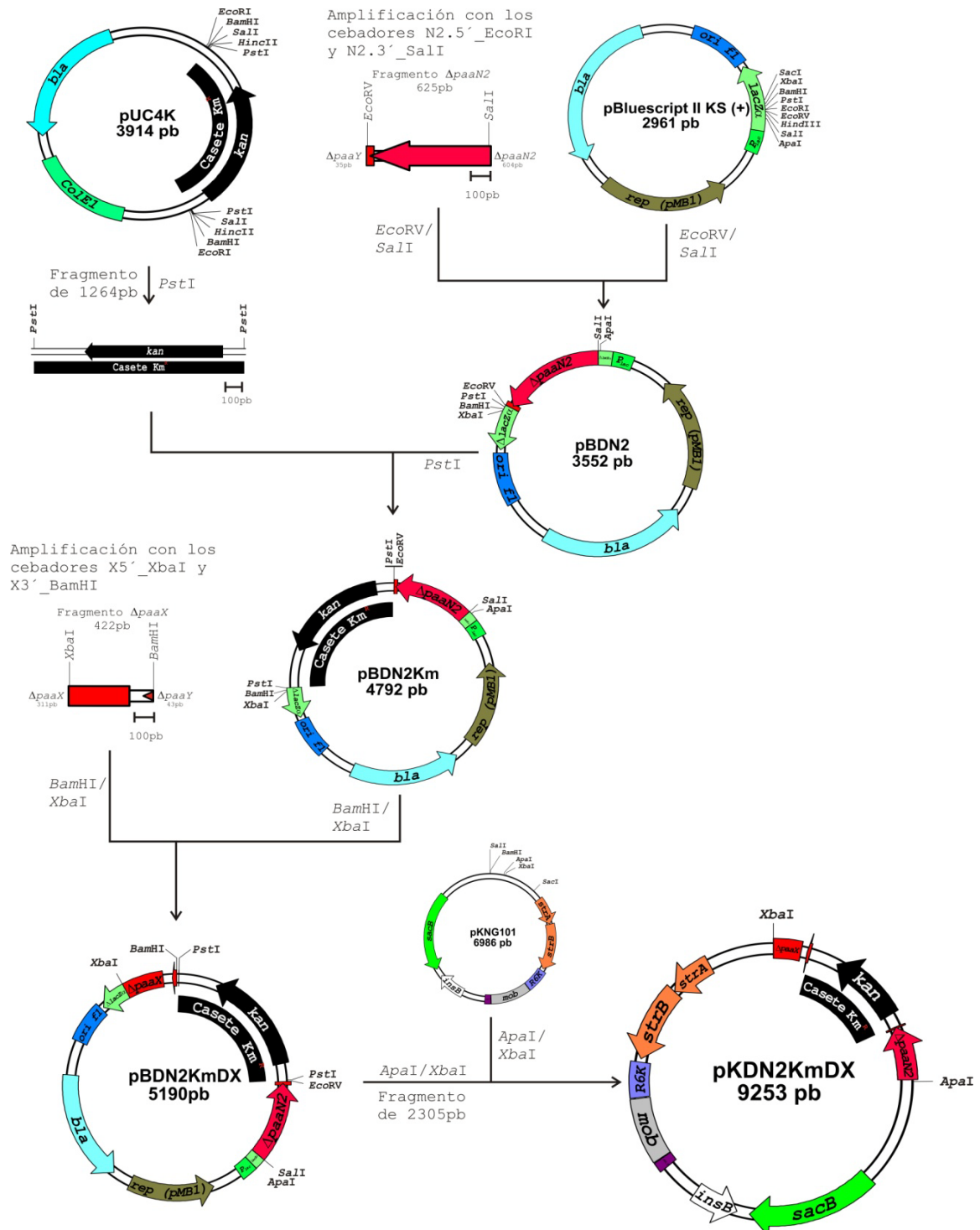


Figura 5.24. Amplificaciones necesarias para llevar a cabo la construcción de mutantes de *Pseudomonas* sp. Y2T2. A). Plásmido pFA que se utiliza como molde de las PCRs para las amplificaciones de fragmentos del *cluster paaI* que permitieron la construcción de los plásmidos recombinantes pKDN2KmDX, pKDN2KmPn2DX y pKPN2KmXF2 necesarios para la construcción de estirpes mutantes a partir de *Pseudomonas* sp. Y2T2. Se muestran en el mismo color las parejas de cebadores para una determinada amplificación. La dirección de la flecha indica el sentido de unión de los cebadores, la flecha hacia la derecha indica la unión del cebador *forward*. La flecha hacia la izquierda indica la unión del cebador *reverse*. B). Amplificaciones que se llevaron a cabo. 1). Amplificación para la construcción del plásmido pKPN2KmXF2. 2) y 3). Amplificaciones para la construcción del plásmido pKDN2KmDX. 4). Amplificación para la construcción del plásmido pKDN2KmPn2DX.



**Figura 5.25. Construcción del plásmido pKDN2KmDX.** Etapas sucesivas necesarias para la construcción del plásmido pKDN2KmDX. En primer lugar se realizó una amplificación con los cebadores N2.5' EcoRI y N2.3' SalI (Tabla 4.3. del apartado Material y métodos) del extremo 3' terminal de *paaN2* de 625pb usando como molde el plásmido pFA, Figura 5.26, este fragmento se digirió con las enzimas *EcoRI* y *SalI* y se clonó en los mismos sitios en pBluescript II KS (+), (Tabla 4.2 del apartado Material y métodos), obteniéndose el plásmido pBDN2. Se aisló el fragmento *PstI* de 1264pb del plásmido pUC4K, (Tabla 4.2 del apartado Material y métodos), conteniendo el casete de resistencia a Km, y se clonó en la misma diana en pBDN2, obteniéndose pBDN2Km. La amplificación de 422pb con los cebadores X5' XbaI y X3' BamHI (Tabla 4.3. del apartado Material y métodos) del extremo 5' inicial del gen *paaX* (Figura 5.24) fue cortada con las enzimas *XbaI* y *BamHI*, y clonadas en pBDN2Km cortado previamente con las mismas enzimas, dando lugar al plásmido pBDN2KmDX. Este plásmido fue cortado con las enzimas *ApaI* y *XbaI* y el fragmento de 2305pb fue clonado con las mismas dianas en pKNG101, (Tabla 4.2 del apartado Material y métodos), dando lugar a pKDN2KmDX. Este plásmido fue transferido por conjugación desde *E. coli* S17.1 $\lambda$ pir a *Pseudomonas* sp. Y2T2 con la finalidad de dar la estirpe mutante *Pseudomonas* sp. Y2T2  $\Delta$ paaY::Km, llamada *Pseudomonas* sp. Y2T2Y1 (Figura 5.28).

Inicialmente se construyó el plásmido pKDN2KmDX, (Figura 5.25) que fue transferido a la cepa receptora *Pseudomonas* sp. Y2T2 por conjugación desde la cepa donadora *E. coli* S17.1  $\lambda$ pir, según el procedimiento descrito en el apartado 4.5.4 de Material y métodos. Los dobles recombinantes, (Figura 5.26), se identificaron por su capacidad de crecer en medio sólido de LB con sacarosa, Cm, Km y Tc y por su sensibilidad a Sm. En los conjugantes seleccionados se comprobó la mutación del gen *paaY* por PCR (Figura 5.27).

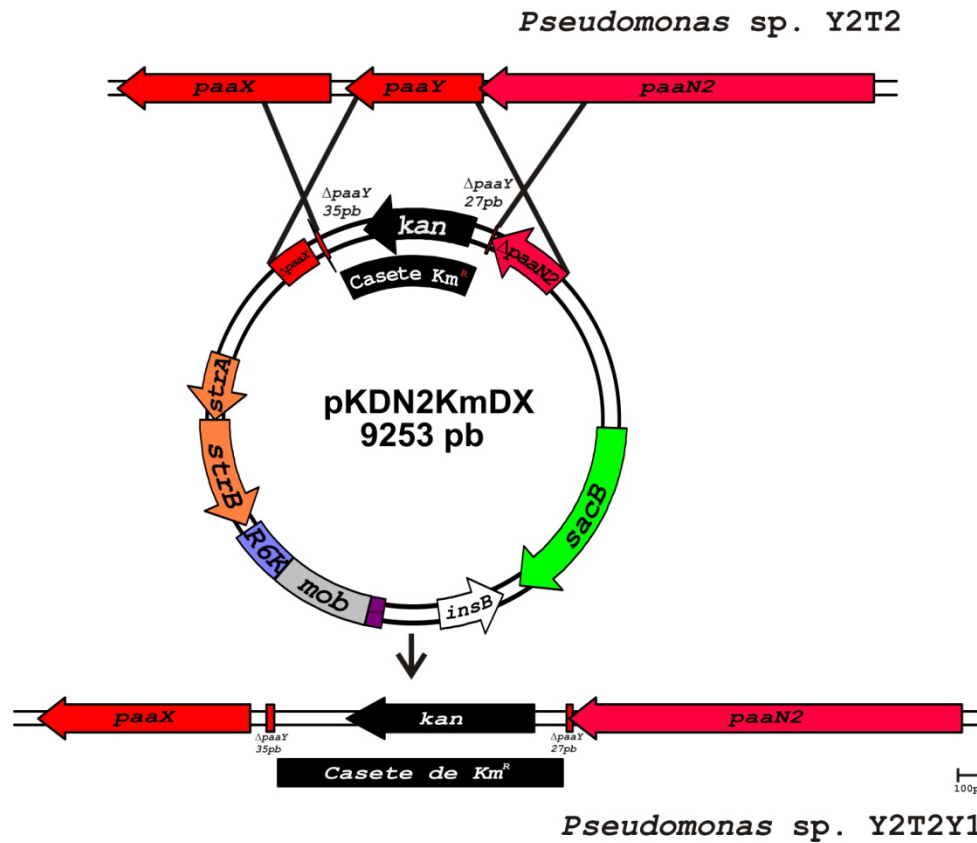
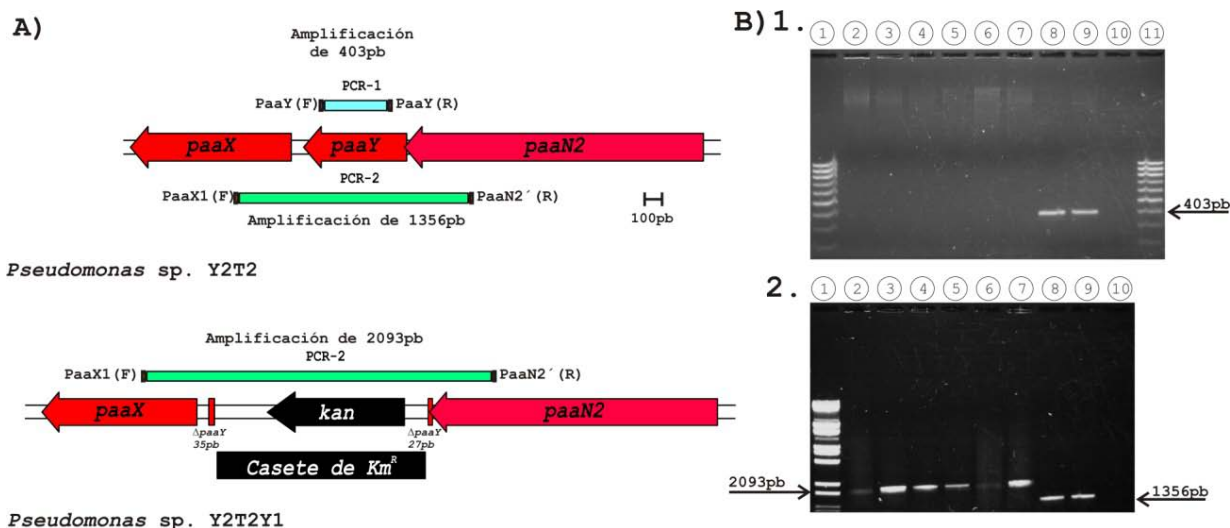


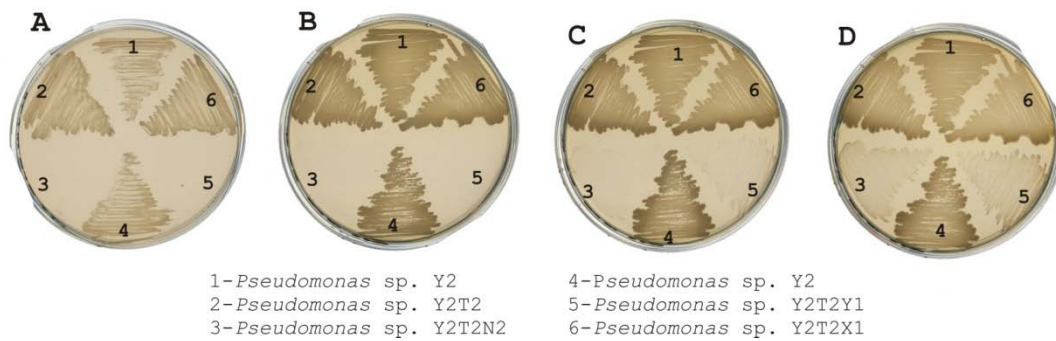
Figura 5 .26. Construcción del mutante *Pseudomonas* sp. Y2T2Y1. Se muestra esquemáticamente la doble recombinación que tiene lugar entre el *cluster paa1* del cromosoma de *Pseudomonas* sp. Y2T2 y el plásmido pKDN2KmDX para dar lugar a la estirpe *Pseudomonas* sp. Y2T2Y1.



**Figura 5.27. Comprobación de la mutación en *paaY* de la estirpe *Pseudomonas* sp. Y2T2Y1.** A) Contexto cromosómico en el que encuentra *paaY* tanto en *Pseudomonas* sp. Y2T2 como en *Pseudomonas* sp. Y2T2Y1, donde éste gen está casi totalmente deletado y truncado por el casete de resistencia a Km. También se muestra el esquema de las amplificaciones PCR-1 y PCR-2 que se realizaron para la comprobación de la mutación, así como las parejas de cebadores, el tamaño de estas amplificaciones y las regiones que incluye. B) Imágenes electroforéticas donde se muestran los fragmentos amplificados por PCR utilizando las parejas de cebadores que aparecen en la sección A. **B.1)** Imagen perteneciente a la amplificación PCR-1 de *paaY*, se muestra con flechas el tamaño de la amplificación. Calles 1 y 11: marcador de escalera de 100pb (apartado 4.9.1 de Material y métodos). Calles 2, 3, 4, 5, 6 y 7: DNA cromosómico de diferentes conjugantes seleccionados de *Pseudomonas* sp. Y2T2Y1. Calle 8: amplificación utilizando como molde DNA cromosómico de *Pseudomonas* sp. Y2, calle 9: amplificación sobre DNA cromosómico de *Pseudomonas* sp. Y2T2 como molde. Calle 10: amplificación sin molde. **B.2)** Imagen perteneciente a la amplificación PCR-2, con flechas se muestra el tamaño de cada amplificación. Calle 1: marcado DNA/*Bst*EII, calles 2, 3, 4, 5, 6 y 7 DNA cromosómico de diferentes conjugantes seleccionados de *Pseudomonas* sp. Y2T2Y1. Calle 8: amplificación utilizando como molde DNA cromosómico de *Pseudomonas* sp. Y2, calle 9: amplificación sobre DNA cromosómico de *Pseudomonas* sp. Y2T2 como molde. Calle 10: amplificación sin molde.

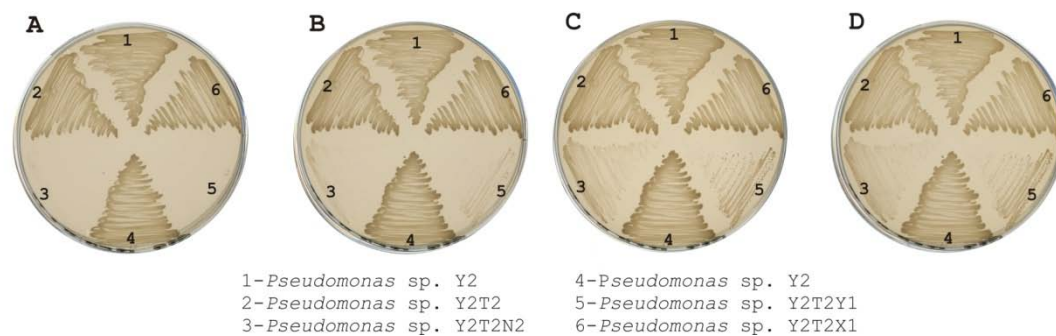
#### 5.4.2.1.1. Crecimiento de *Pseudomonas* sp. Y2T2Y1 en medio sólido con AFA.

La estirpe *Pseudomonas* sp. Y2T2Y1 se creció en medio mínimo M9 sólido suplementado con AFA (5 mM) como única fuente de carbono y energía junto con la estirpe *Pseudomonas* sp. Y2 silvestre y los mutantes *Pseudomonas* sp. Y2T2 ( $\Delta paa2::Tc$ ), *Pseudomonas* sp. Y2T2X1 ( $\Delta paa2::Tc$ ,  $\Delta paaX::Km$ ) y *Pseudomonas* sp. Y2T2N2 ( $\Delta paa2::Tc$ ,  $paaN2::Km$ ) (Figura 5.38). Se observó que la estirpe mutante en el gen *paaY*, *Pseudomonas* sp. Y2T2Y1, presentó un crecimiento anómalo en este medio, mientras que las estirpes *Pseudomonas* sp. Y2, *Pseudomonas* sp. Y2T2 y *Pseudomonas* sp. Y2T2X1 mostraron un crecimiento normal sobre la placa. Sin embargo, en el caso de la estirpe *Pseudomonas* sp. Y2T2Y1 no fue posible detectar un crecimiento claro aunque muy leve hasta las 144 horas. Merece la pena señalar que *Pseudomonas* sp. Y2T2N2 presentan también una ralentización similar en el crecimiento.



**Figura 5.28.** Cultivo en medio mínimo M9 suplementado con AFA 5 mM de *Pseudomonas* sp. Y2, *Pseudomonas* sp. Y2T2 ( $\Delta paa2::Tc$ ), *Pseudomonas* sp. Y2T2N2 ( $\Delta paa2::Tc$ ,  $paaN2::Km$ ), *Pseudomonas* sp. Y2T2Y1 ( $\Delta paa2::Tc$ ,  $\Delta paaY::Km$ ) y *Pseudomonas* sp. Y2T2X1 ( $\Delta paa2::Tc$ ,  $\Delta paaX::Km$ ). Las placas se incubaron a 30°C durante 24 horas (A), 48 horas (B), 72 horas (C) y 144 horas (D).

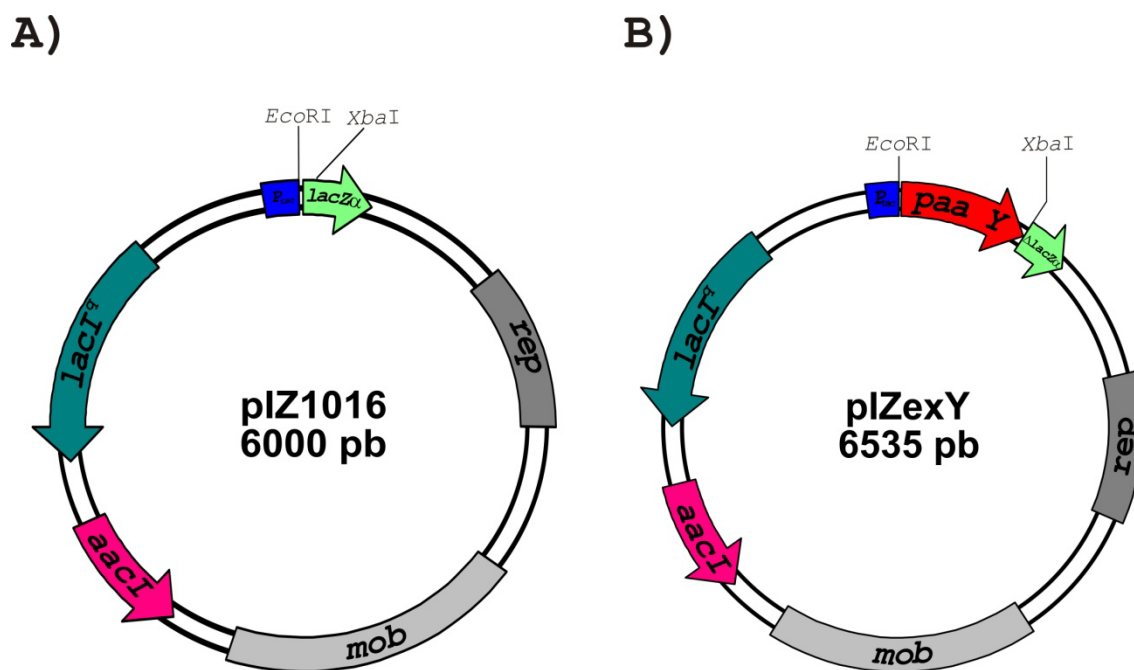
Con el fin de estudiar con mayor detalle el comportamiento de las células del mutante *Pseudomonas* sp. Y2T2Y1 que crecen al cabo de 144 h, se resiembran placas de medio mínimo M9 con AFA con algunas de esas colonias y se incuban a 30°C, (Figura 5.29). En estas condiciones se observa una ralentización del crecimiento de *Pseudomonas* sp. Y2T2Y1 y *Pseudomonas* sp. Y2T2N2, aunque reducida.



**Figura 5.29.** Cultivo en medio mínimo M9 suplementado con AFA 5 mM desde AFA de *Pseudomonas* sp. Y2, *Pseudomonas* sp. Y2T2 ( $\Delta paa2::Tc$ ), *Pseudomonas* sp. Y2T2N2 ( $\Delta paa2::Tc$ ,  $paaN2::Km$ ), *Pseudomonas* sp. Y2T2Y1 ( $\Delta paa2::Tc$ ,  $\Delta paaY::Km$ ) y *Pseudomonas* sp. Y2T2X1 ( $\Delta paa2::Tc$ ,  $\Delta paaX::Km$ ). Las placas se incubaron durante 150 horas a 30°C durante 24 horas (A), 48 horas (B), 72 horas (C) y 144 horas (D).

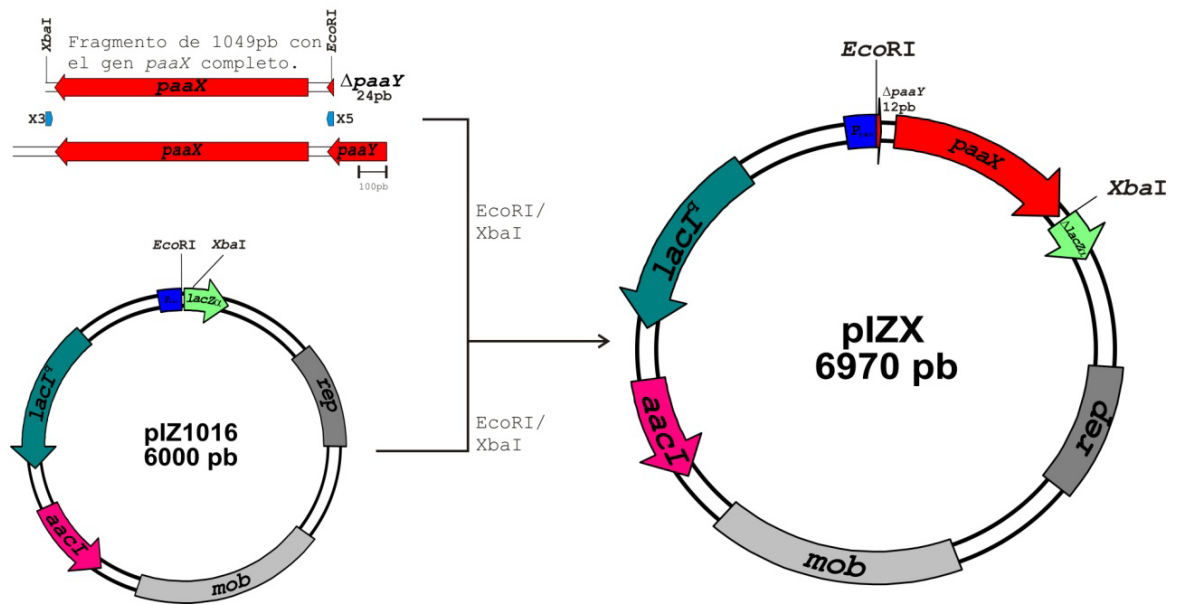
A partir de la estirpe mutante *Pseudomonas* sp. Y2T2Y1 se realizaron varios experimentos de complementación, mediante su transformación con plásmidos portadores de algunos genes *paa* cuya expresión en multicopia podría tener algún efecto significativo sobre el mutante.

La introducción en *Pseudomonas* sp. Y2T2Y1 de los genes *paaX*, *paaY*, *paaN*, *paaN2* y *paaN3* en *trans* se realizó mediante su incorporación al vector pIZ1016, plásmido con un sistema de expresión controlada del inserto y que comporta resistencia a Gm, (Figura 5.30 A). Los plásmidos pIZexY (con el gen *paaY*) (Figura 5.30 B), pIZX (con el gen *paaX*) (Figura 5.31), pIZN (con el gen *paaN*) (Figura 5.32 A), pIZexN2 (con el gen *paaN2*) (Figura 5.32 B) y pIZN3 (con el gen *paaN3*) (Figura 5.32 C), son introducidos en las cepas hospedadoras mediante electrotransformación tal y como se detalla en el apartado 4.5.2 de Material y métodos. Tras la selección de transformantes en Cm, Km, Tc y Gm se comprobó la presencia de plásmidos (apartado 4.6.1 de Material y métodos). De esta forma se consiguieron las cepas *Pseudomonas* sp. Y2[pIZ1016], *Pseudomonas* sp. Y2T2 [pIZ1016], *Pseudomonas* sp. Y2T2Y1 [pIZ1016], *Pseudomonas* sp. Y2T2Y1 [pIZexY], *Pseudomonas* sp. Y2T2Y1 [pIZX], *Pseudomonas* sp. Y2T2Y1 [pIZN] (con el gen *paaN* en *trans*), *Pseudomonas* sp. Y2T2Y1 [pIZexN2] y *Pseudomonas* sp. Y2T2Y1 [pIZN3].

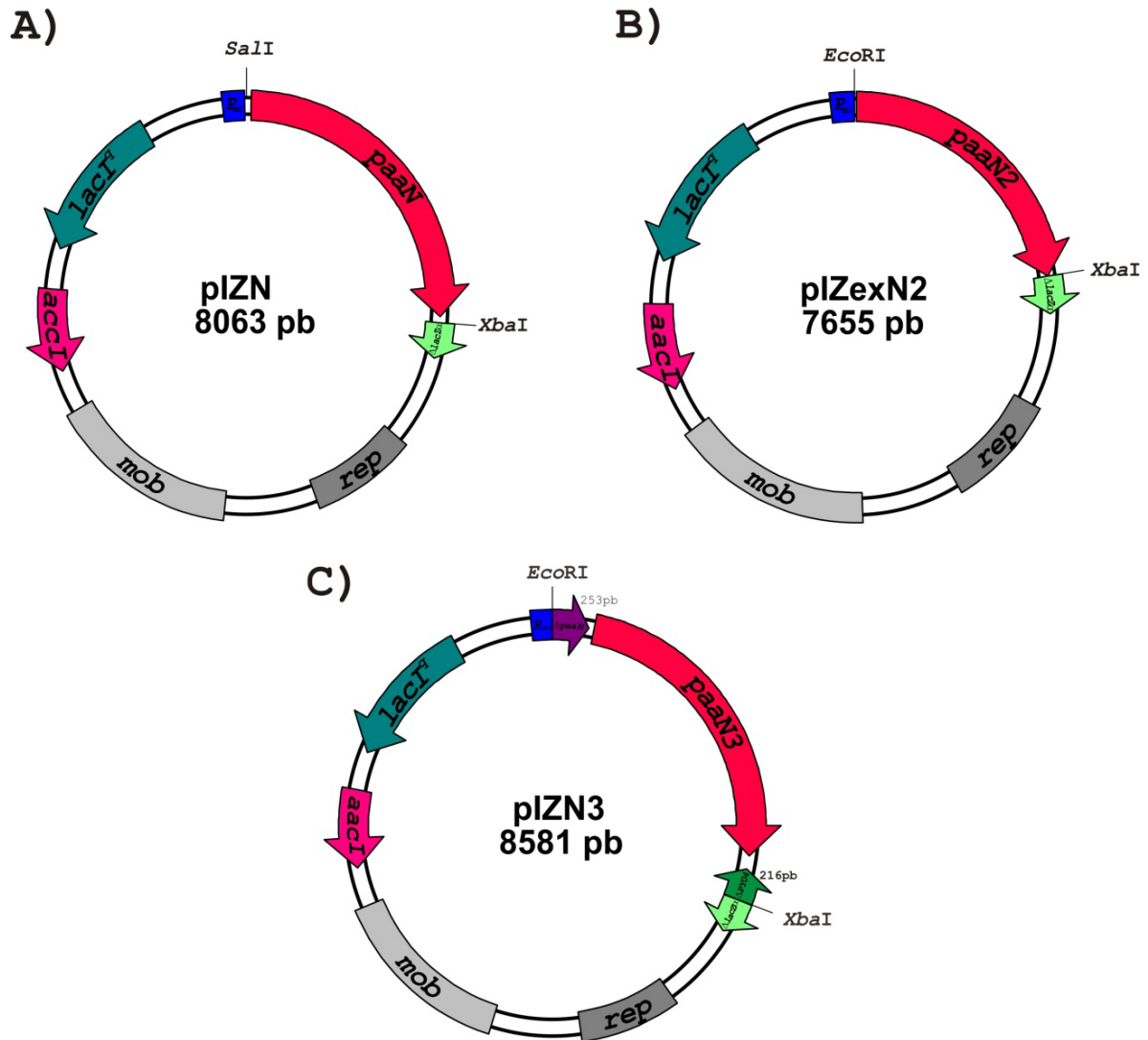


**Figura 5.30. Plásmido pIZ1016 y pIZexY.** A). Plásmidos pIZ1016. Esquema del plásmido pIZ1016 (Tabla 4.2 del apartado Material y métodos), plásmido de expresión controlada.. B). Plásmido pIZexY. Detalle esquemático del plásmido pIZexY, derivado de pIZ1016 que lleva el gen *paaY* de *Pseudomonas* sp. Y2 en las dianas *EcoRI* y *XbaI*. *lacI<sup>d</sup>*: gen represor del promotor *P<sub>lac</sub>*, *aacI*: gen de resistencia a Gentamicina. *lacZ $\alpha$* : gen que permite la selección blanco/azul sobre estirpes con la mutación *deoR* (f80 $\Delta$ *lacZ*M15). *rep/mob*: regiones que contienen las funciones de replicación y movilización, respectivamente.

Amplificación utilizando los cebadores X3 y X5

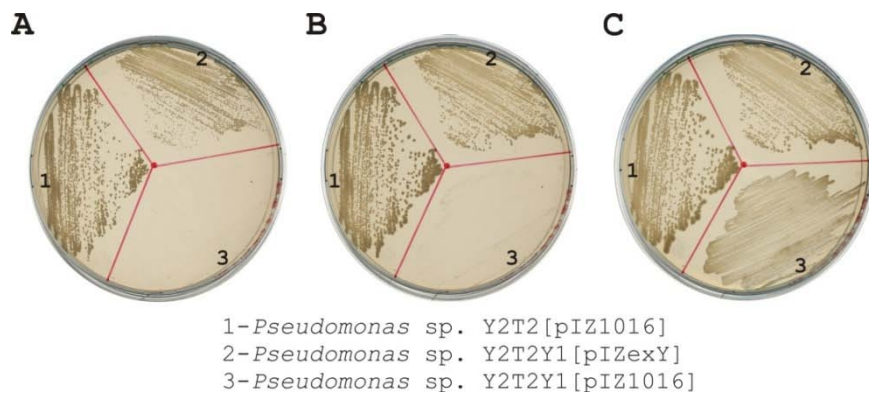


**Figura 5.31. Construcción del plásmido pIZX.** Etapas sucesivas necesarias para la construcción del plásmido pIZX. Amplificación del gen *paaX* con la pareja de cebadores X3 y X5 (Tabla 4.3 del apartado Material y métodos), digestión del fragmento amplificado de 1049 pb con las enzimas *EcoRI* y *XbaI* y clonaje en pIZ1016 previamente cortado con las mismas enzimas, para dar lugar a pIZX. *lacI<sup>r</sup>*: gen represor del promotor  $P_{lac}$ , *aacI*: gen de resistencia a Gentamicina. *lacZ $\alpha$* : gen que permite la selección blanco/azul sobre estirpes con la mutación *deoR* ( $f80\Delta lacD(lacZ)M15$ ). *rep/mob*: regiones que contienen las funciones de replicación y movilización, respectivamente.



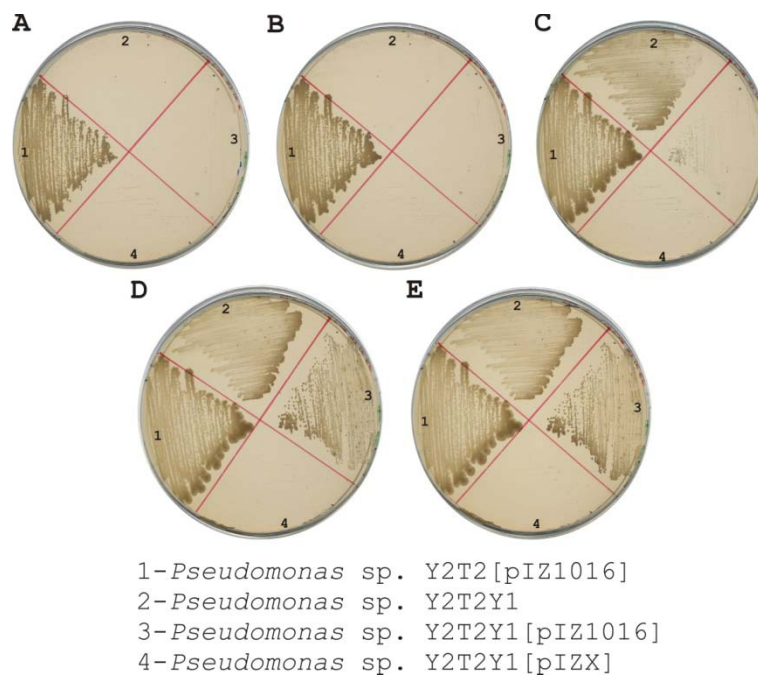
**Figura 5.32. Plásmidos p para complementaciones con los genes *paaNs*.** A). Plásmido pIZN. Esquema del plásmido pIZN, derivado de pIZ1016 el cual lleva clonado el gen *paaN* de *Pseudomonas* sp. Y2 en las dianas *SalI* y *XbaI*. B). Plásmido pIZexN2. Detalle del plásmido pIZexN2, derivado de pIZ1016 el cual lleva clonado el gen *paaN2* de *Pseudomonas* sp. Y2 en las dianas *EcoRI* y *XbaI*. C). Plásmido pIZN3. Detalle del plásmido pIZN3, derivado de pIZ1016 el cual lleva clonado el gen *paaN3* de *Pseudomonas* sp. Y2 en las dianas *EcoRI* y *XbaI*. *lacI<sup>r</sup>*: gen represor del promotor *P<sub>tac</sub>*, *accI*: gen de resistencia a Gentamicina. *lacZα*: gen que permite la selección blanco/azul sobre estirpes con la mutación *deoR* (*f80ΔlacD(lacZ)M15*). *rep/mob*: regiones que contienen las funciones de replicación y movilización, respectivamente.

El crecimiento en medio sólido M9 con AFA de las cepas obtenidas y su comparación con las correspondientes hospedadoras, arrojó un conjunto interesante de resultados. El crecimiento de *Pseudomonas* sp. Y2T2 [pIZ1016], *Pseudomonas* sp. Y2T2Y1 [pIZ1016] y *Pseudomonas* sp. Y2T2Y1 [pIZexY] en medio M9 con AFA e IPTG (0,5 mM) (Figura 5.33) permitió observar cómo el gen *paaY* en multicopia es capaz de complementar la mutación de *Pseudomonas* sp. Y2T2Y1 y devolver al mutante la capacidad de crecimiento de su estirpe parental *Pseudomonas* sp. Y2T2.



**Figura 5.33. C cultivo en medio mínimo M9 suplementado con AFA 5 mM, IPTG (0,5 mM) y Gm de *Pseudomonas* sp. Y2T2 [pIZ1016], *Pseudomonas* sp. Y2T2Y1 [pIZ1016] y *Pseudomonas* sp. Y2T2Y1 [pIZexY]. Las placas se incubaron 24 horas (A), 48 horas (B) y 96 horas (C) a 30°C.**

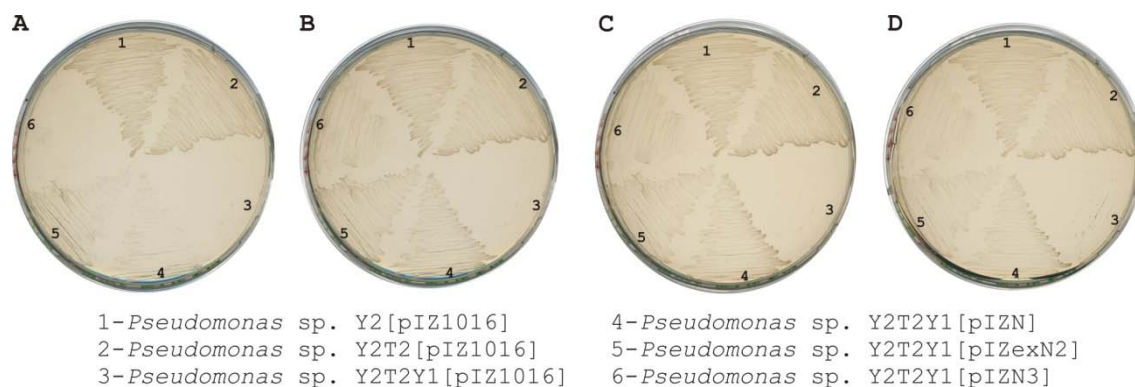
El crecimiento de *Pseudomonas* sp. Y2T2[pIZ1016], *Pseudomonas* sp. Y2T2Y1, Y2T2Y1[pIZ1016] y *Pseudomonas* sp. Y2T2Y1[pIZX] en medio mínimo M9 con AFA e IPTG (Figura 5.34) mostró que la expresión de *paaX* en multicopia en la estirpe en *Pseudomonas* sp. Y2T2Y1[pIZX] provoca el retraso de su crecimiento, a causa de la ausencia de PaaY y de su posible función auxiliar desrepresora.



**Figura 5.34. C cultivo en medio mínimo sólido M9 suplementado con AFA 5 mM, IPTG (0,5 mM) de *Pseudomonas* sp. Y2T2 [pIZ1016], *Pseudomonas* sp. Y2T2Y1, *Pseudomonas* sp. Y2T2Y1 [pIZ1016] y *Pseudomonas* sp. Y2T2Y1 [pIZX]. Las placas se incubaron a 30°C durante 24 horas (A), 48 horas (B), 96 horas (C), 144 horas (D) y 168 horas (E).**

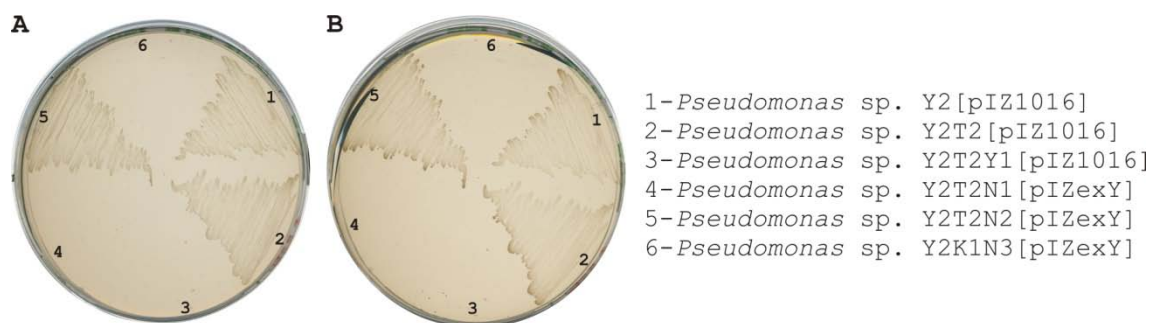
El crecimiento de las estirpes *Pseudomonas* sp. Y2 [pIZ1016], *Pseudomonas* sp. Y2T2 [pIZ1016], *Pseudomonas* sp. Y2T2Y1 [pIZ1016], *Pseudomonas* sp. Y2T2Y1 [pIZN], *Pseudomonas* sp. Y2T2Y1 [pIZexN2] y *Pseudomonas* sp. Y2T2Y1 [pIZN3] en medio M9 con AFA e IPTG permitió observar que la expresión de *paaN*, de *paaN2* y en menor medida de *paaN3* complementan la delección de *paay* (Figura 5.35).

Este resultado, en principio sorprendente, relacionaba la función del gen *paay* con un posible papel regulador no totalmente confirmado, y la de los genes (*paaN* y *paaN3*) con clara función catabólica. Para profundizar en este punto, se pensó en llevar a cabo experimentos inversos de complementación, utilizando los mutantes *Pseudomonas* sp. Y2T2N1 ( $\Delta paay::Tc$ , *paaN::Km*), *Pseudomonas* sp. Y2T2N2 ( $\Delta paay::Tc$ , *paaN2::Km*) y *Pseudomonas* sp. Y2K1N3 ( $\Delta paay::Km$ , *paaN3::Tc*) (Tabla 4.1 del apartado de Material y métodos).



**Figura 5.35. Cultivo en medio mínimo M9 suplementado con AFA 5 mM, IPTG (0,5 mM) y G m de *Pseudomonas* sp. Y2 [pIZ1016], *Pseudomonas* sp. Y2T2 [pIZ1016], *Pseudomonas* sp. Y2T2Y1 [pIZ1016], *Pseudomonas* sp. Y2T2Y1 [pIZN], *Pseudomonas* sp. Y2T2Y1 [pIZexN2] y *Pseudomonas* sp. Y2T2Y1 [pIZN3]. Las placas fueron incubadas durante 24 horas (A), 48 horas (B), 72 horas (C) y 168 horas (D).**

Con este fin se procedió al crecimiento de las estirpes *Pseudomonas* sp. Y2 [pIZ1016], Y2T2 [pIZ1016], *Pseudomonas* sp. Y2T2Y1 [pIZ1016], *Pseudomonas* sp. Y2T2N1 [pIZexY], *Pseudomonas* sp. Y2T2N2 [pIZexY] y *Pseudomonas* sp. Y2T2N3 [pIZexY] en medio mínimo M9 suplementado con AFA e IPTG (Figura 5.36). Solamente se observó complementación por la expresión de *paay* en multicopia en el caso de la estirpe *Pseudomonas* sp. Y2T2N2 y no en los casos de *Pseudomonas* sp. Y2T2N1 o de *Pseudomonas* sp. Y2T2N3.

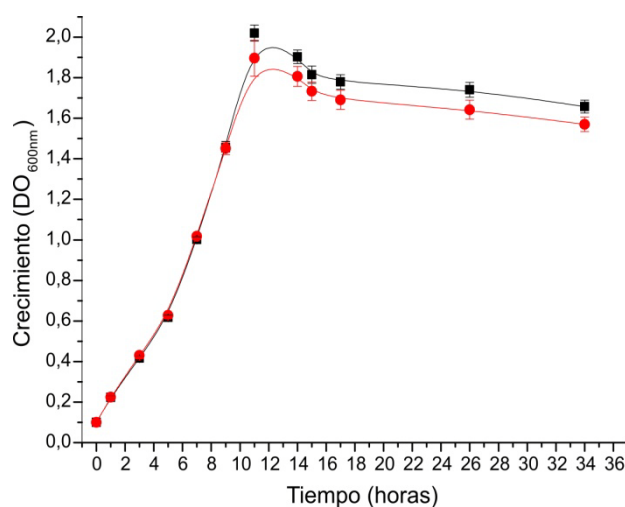


**Figura 5.36.** Cultivo en medio mínimo sólido M9 suplementado con AFA 5 mM, IPTG (0,5 mM) y Gm de *Pseudomonas* sp. Y2 [pIZ1016], *Pseudomonas* sp. Y2T2 [pIZ1016], *Pseudomonas* sp. Y2T2Y1 [pIZ1016], *Pseudomonas* sp. Y2T2N1 ( $\Delta paa2::Tc$ ,  $paaN::Km$ ) [pIZexY], *Pseudomonas* sp. Y2T2N2 ( $\Delta paa2::Tc$ ,  $paaN2::Km$ ) [pIZexY] y *Pseudomonas* sp. Y2K1N3 ( $\Delta paa1::Km$ ,  $paaN3::Tc$ ) [pIZexY]. Las placas se incubaron a 30°C durante 24 horas (A) y 168 horas (B).

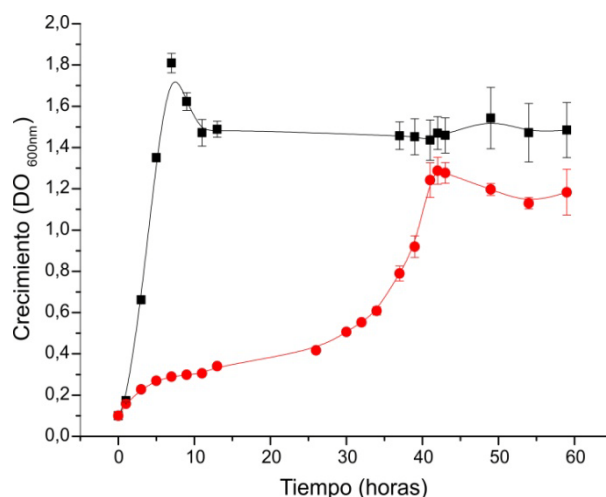
En el apartado de discusión se comentarán con detalle todos estos resultados.

#### 5.4.2.1.2. Crecimiento de algunas cepas mutantes de *Pseudomonas* sp. Y2 en medios líquidos.

Con el fin de estudiar con más detalle la cinética del crecimiento de algunas mutantes de *Pseudomonas* sp. Y2 en medios líquidos, se obtuvieron las correspondientes curvas a partir de los cultivos de *Pseudomonas* sp. Y2T2 y *Pseudomonas* sp. Y2T2Y1, en medio mínimo M9 suplementado bien con glicerol 0,1% (Figura 5.37) o bien con AFA 5 mM (Figura 5.38) (apartados 4.4.2 y 4.4.3 de Material y métodos).



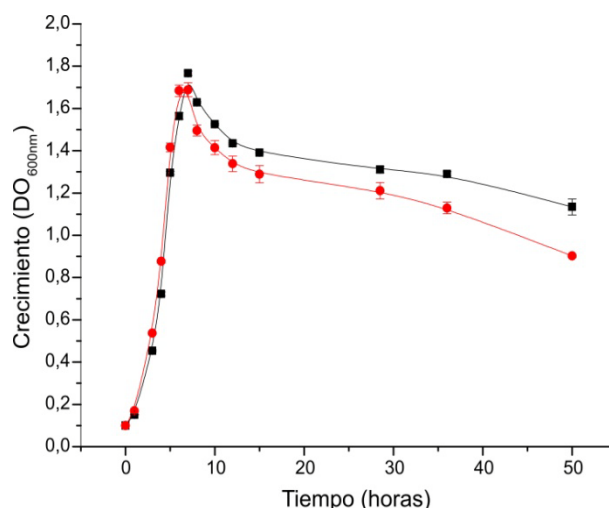
**Figura 5.37.** Curvas de crecimiento de *Pseudomonas* sp. Y2T2 (■) y *Pseudomonas* sp. Y2T2Y1 (●) en medio mínimo M9 con glicerol 0,1%. Cada punto de la gráfica representa el valor medio de tres ensayos independientes. Las barras de error corresponden al error estándar.



**Figura 5 .38. C urvas de c recimiento de *Pseudomonas* sp. Y2T2 (■) y *Pseudomonas* sp. Y2T2Y1 (●) en medio mínimo M9 con AFA 5 mM. Cada punto de la gráfica representa el valor medio de tres ensayos independientes. Las barras de error corresponden al error estándar.**

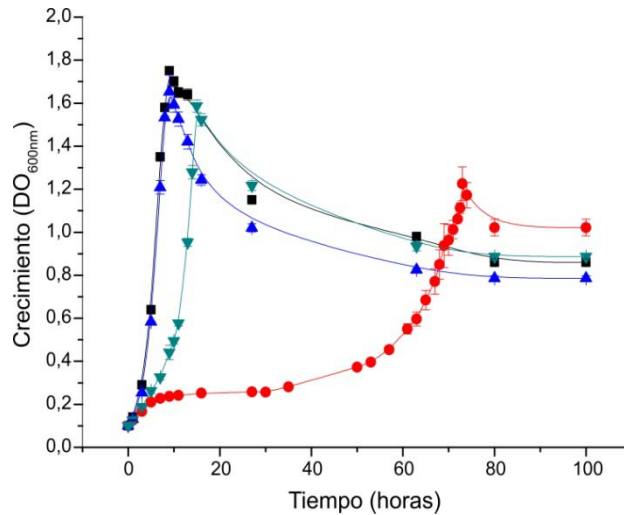
De este conjunto de curvas puede deducirse que la carencia del gen *paaY* no afecta al crecimiento del mutante *Pseudomonas* sp. Y2T2Y1 en medio mínimo con glicerol como fuente de carbono y energía, pero sí cuando crece sobre AFA como única fuente de carbono y energía, ya que en este medio de cultivo la fase exponencial de la curva se prolonga hasta 42 horas.

Se comparó igualmente el crecimiento en presencia de AFA de la estirpe *Pseudomonas* sp. Y2T2 y del mutante *Pseudomonas* sp. Y2T2X1 ( $\Delta paa2::Tc$ ,  $\Delta paaX::Km$ ) (Figura 5.39). La ausencia de diferencias significativas permite concluir que la pérdida de la función de *paaX* no afecta al crecimiento en AFA de *Pseudomonas* sp. Y2T2X1. Esto anula la posibilidad de que el retardo observado en el crecimiento del mutante *Pseudomonas* sp. Y2T2Y1 pudiera deberse a que la delección de *paaY* afectase por efecto polar a la expresión de *paaX* en el operón *paaN2YX*. Por consiguiente, el retraso en el crecimiento de *Pseudomonas* sp. Y2T2Y1 puede atribuirse a la pérdida de función de *paaY*.



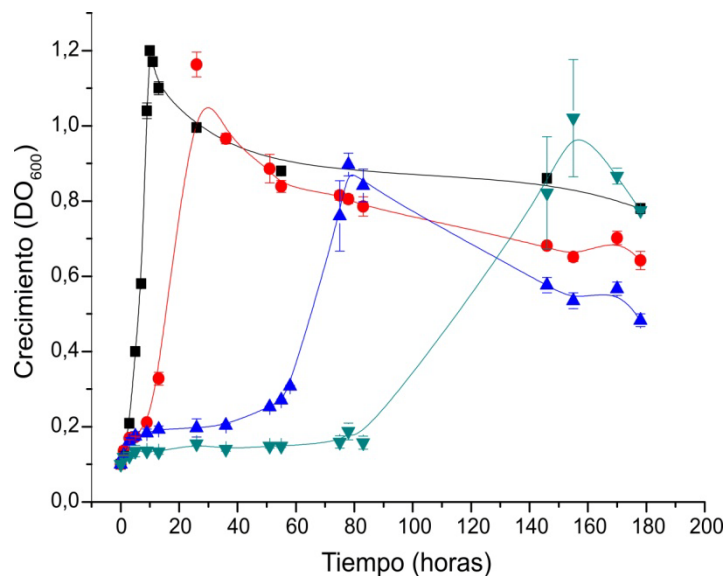
**Figura 5 .39. C urvas de c recimiento de *Pseudomonas* sp. Y2T2 (■) y *Pseudomonas* sp. Y2T2X1 (●) en medio mínimo M9 con AFA 5 mM. Cada punto de la gráfica representa el valor medio de tres ensayos independientes. Las barras de error corresponden al error estándar.**

A partir del mutante *Pseudomonas* sp. Y2T2Y1 se realizaron experimentos de complementación con otros genes *paa*. La complementación con *paaY* en *trans* hace que la cepa *Pseudomonas* sp. Y2T2Y1 [pIZexY] recupere la velocidad de crecimiento de la estirpe parental *Pseudomonas* sp. Y2T2 (Figura 5.40). Es interesante la observación de que la estirpe *Pseudomonas* sp. Y2T2Y1 [pIZexN2] crece con la una velocidad que se aproxima mucho a la de la cepa *Pseudomonas* sp. Y2T2 (Figura 5.40), indicando que la presencia en multicopia del gen *paaN2* (*Pseudomonas* sp. Y2T2Y1 posee una copia intacta de este gen) complementa la ausencia de *paaY* en *Pseudomonas* sp. Y2T2Y1.



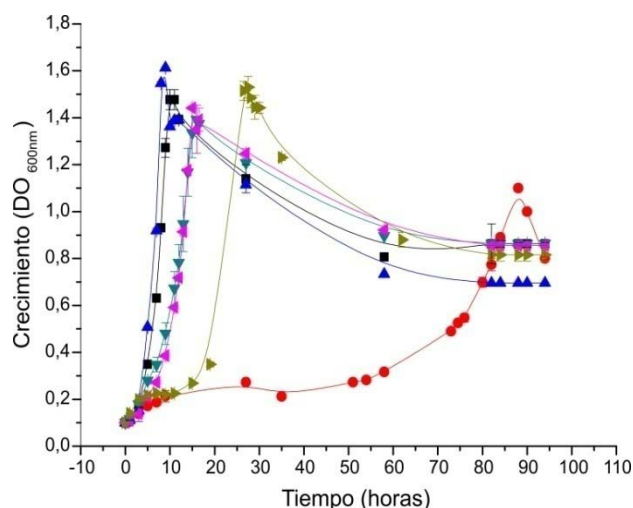
**Figura 5.40.** Curvas de crecimiento de *Pseudomonas* sp. Y2T2 [pIZ1016] (■), *Pseudomonas* sp. Y2T2Y1 [pIZ1016] (●), *Pseudomonas* sp. Y2T2Y1 [pIZexY] (▲) y *Pseudomonas* sp. Y2T2Y1 [pIZexN2] (▼) en medio mínimo M9 con AFA 5 mM, IPTG (0,5 mM) y Gm. Cada punto de la gráfica representa el valor medio de tres ensayos independientes. Las barras de error corresponden al error estándar.

La complementación de *Pseudomonas* sp. Y2T2 y de su derivada *Pseudomonas* sp. Y2T2Y1 (carente de *paaY*) con el gen *paaX* en multicopia produce un retardo en el crecimiento de ambas, mostrando el efecto cuantitativo en la actividad represora de un exceso de PaaX en presencia de AFA (Figura 5.41).



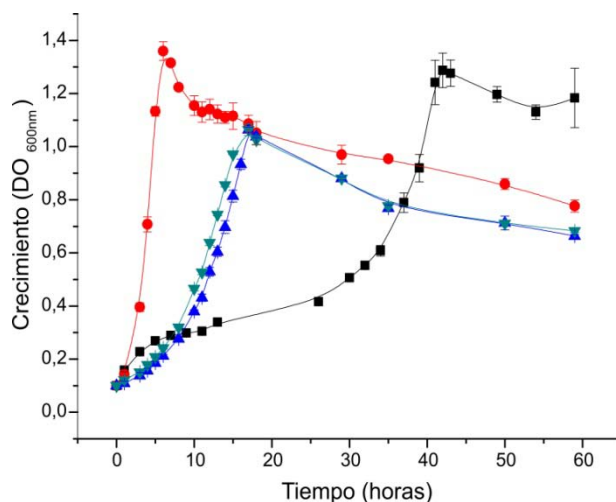
**Figura 5.41.** Curvas de crecimiento de *Pseudomonas* sp. Y2T2 [pIZ1016] (■), *Pseudomonas* sp. Y2T2 [pIZX] (●), *Pseudomonas* sp. Y2T2Y1 [pIZ1016] (▲) y *Pseudomonas* sp. Y2T2Y1 [pIZX] (▼) en medio mínimo M9 con AFA 5 mM, IPTG (0,5 mM) y Gm. Cada punto de la gráfica representa el valor medio de tres ensayos independientes. Las barras de error corresponden al error estándar.

La complementación de *Pseudomonas* sp. Y2T2 y de su derivada *Pseudomonas* sp. Y2T2Y1 con los genes *paaN*, *paaN2* y *paaN3* en multicopia permitieron observar su efecto sobre el crecimiento del mutante de *paaY*. Copias extras de *paaN* y de *paaN2* (Figura 5.42) ayudan a *Pseudomonas* sp. Y2T2Y1 a recuperar casi totalmente la velocidad de crecimiento de *Pseudomonas* sp. Y2T2. La complementación con *paaN3* también lleva a acelerar el crecimiento de *Pseudomonas* sp. Y2T2Y1, aunque de forma menos eficiente.



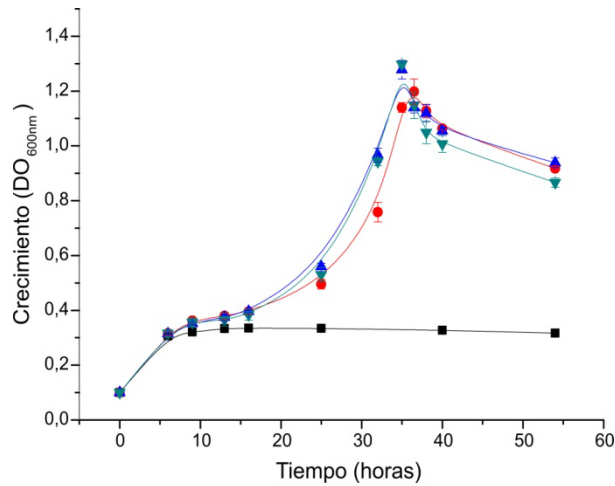
**Figura 5.42.** Curvas de crecimiento de *Pseudomonas* sp. Y2T2 [pIZ1016] (■), *Pseudomonas* sp. Y2T2Y1 [pIZ1016] (●), *Pseudomonas* sp. Y2T2Y1 [pIZexY] (▲), *Pseudomonas* sp. Y2T2Y1 [pIZN] (▼), *Pseudomonas* sp. Y2T2Y1 [pIZexN2] (◆) y *Pseudomonas* sp. Y2T2Y1 [pIZN3] (▲) en medio mínimo M9 con AFA 5 mM, IPTG (0,5 mM) y Gm. Cada punto de la gráfica representa el valor medio de tres ensayos independientes. Las barras de error corresponden al error estándar.

Con el fin de estudiar si el crecimiento de *Pseudomonas* sp. Y2T2Y1 en AFA puede ser causado por un efecto de adaptación, se crecieron las estirpes *Pseudomonas* sp. Y2T2 y *Pseudomonas* sp. Y2T2Y1 en medio mínimo M9 con AFA hasta que alcanzaron la fase estacionaria, tras lo que las células crecidas se sedimentaron, se lavaron y se utilizaron para inocular el mismo medio fresco (apartado 4.4.7 de Material y métodos). El crecimiento de estos nuevos cultivos se comparó al de otro preparado sin esa primera fase de crecimiento en AFA (Figura 5.43). Efectivamente, el crecimiento previo en AFA facilita en gran medida el crecimiento del mutante *Pseudomonas* sp. Y2T2Y1.



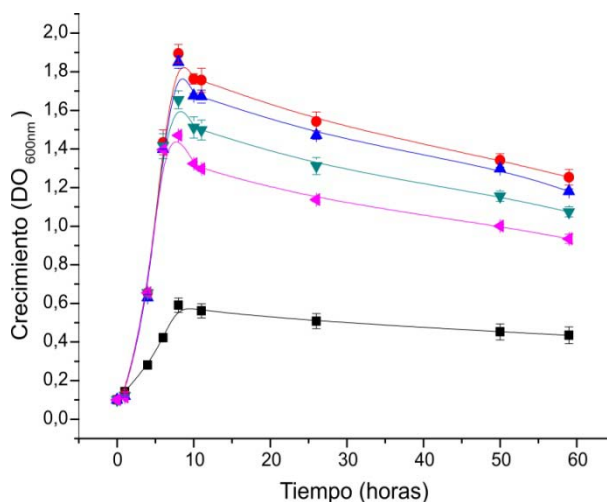
**Figura 5.43.** Curvas de crecimiento de *Pseudomonas* sp. Y2T2 (●) y *Pseudomonas* sp. Y2T2Y1 (▲) en cultivos crecidos en medio mínimo M9 con AFA 5 mM y preparados con células previamente crecidas en el mismo medio frente a la curva de crecimiento de *Pseudomonas* sp. Y2T2Y1 (■) crecida por primera vez en el mismo medio. Cada punto de la gráfica representa el valor medio de tres ensayos independientes. Las barras de error corresponden al error estándar.

A la vista del comportamiento de *Pseudomonas* sp. Y2T2Y1, deficiente en PaaY, es posible que esta proteína estuviera relacionada con la creación de señales del tipo “quórum sensing”. Para comprobar esta hipótesis estudiamos el medio de cultivo de la estirpe *Pseudomonas* sp. Y2T2 cultivada en AFA como única fuente de carbono y energía porque podría contener alguna señal que facilitara de alguna forma el crecimiento de *Pseudomonas* sp. Y2T2Y1. Se cultivó *Pseudomonas* sp. Y2T2 en medio mínimo M9 suplementado con AFA (5 mM) hasta alcanzar una  $DO_{600}$  de 1,8, momento en el que se recogió el sobrenadante por centrifugación, se ajustó su pH a 7 y se filtró. A continuación se compararon las curvas de crecimiento de *Pseudomonas* sp. Y2T2Y1 en este “medio gastado”, en ausencia o en presencia de AFA, y en medio fresco. El mutante *Pseudomonas* sp. Y2T2Y1 no crece en ausencia de AFA (Figura 5.44), pero en su presencia la bacteria crece de manera similar en el “medio gastado” que en el medio fresco. No parece que en el medio se acumule ningún compuesto producido por *Pseudomonas* sp. Y2T2 (por intervención de PaaY) que facilite el crecimiento de la bacteria.



**Figura 5.44.** Curvas de crecimiento de *Pseudomonas* sp. Y2T2Y1 en medio mínimo M9 "gastado" (■), en medio M9 "gastado" suplementado con AFA 5 mM (●), en medio M9 mixto (50% "gastado" y 50% fresco) suplementado con AFA 5 mM (▲) y en medio M9 fresco suplementado con AFA 5 mM (▼).

Con el fin de averiguar si PaaY está implicada en la producción de energía o en la activación del estado energético de la célula cuando crece en presencia de AFA, se comparó el crecimiento de las estirpes *Pseudomonas* sp. Y2T2 y *Pseudomonas* sp. Y2T2Y1 en medio M9 suplementado con AFA y con diferentes concentraciones de glicerol (máximo de 2 mM), para precisar si la presencia de este compuesto en el medio hace disminuir la fase de latencia y acelera el crecimiento (Figuras 5.45 y 5.46). El resultado demostró que pequeñas cantidades de glicerol no son suficientes para desencadenar la activación del crecimiento a partir de AFA por parte de la estirpe *Pseudomonas* sp. Y2T2Y1.



**Figura 5.45** Curvas de crecimiento de *Pseudomonas* sp. Y2T2 en medio mínimo M9 suplementado con glicerol 2 mM (■), con glicerol 2 mM y AFA 5 mM (●), con glicerol 1 mM y AFA 5 mM (▲), con glicerol 0,5 mM y AFA 5 mM (▼) y con AFA 5 mM (◀). Cada punto de la gráfica representa el valor medio de tres ensayos independientes. Las barras de error corresponden al error estándar.

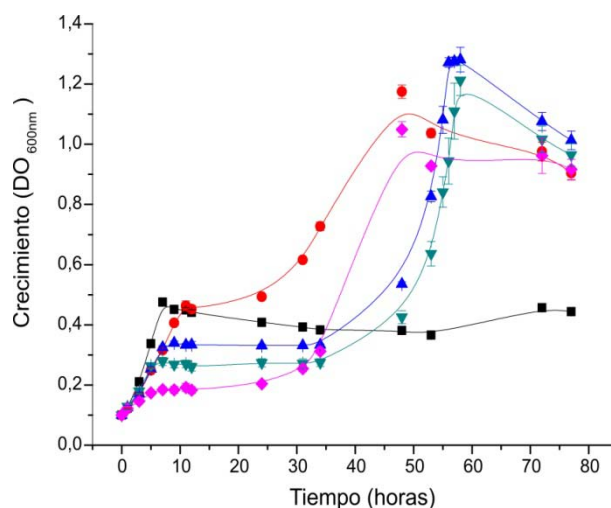
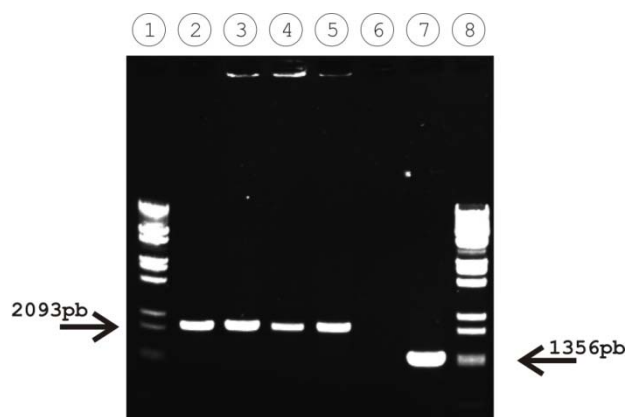


Figura 5.46. Curva de crecimiento de *Pseudomonas* sp. Y2T2Y1 en medio mínimo M9 suplementado con glicerol 2 mM (■), con glicerol 2 mM y AFA 5 mM (●), con glicerol 1 mM y AFA 5 mM (▲), con glicerol 0,5 mM y AFA 5 mM (▼) y con AFA 5 mM (◆). Cada punto de la gráfica representa el valor medio de tres ensayos independientes. Las barras de error corresponden al error estándar.

#### 5.4.2.1.3. Recombroación de mutantes *Pseudomonas* sp. Y2T2Y1 tras crecer en AFA.

Para comprobar que la capacidad de la estirpe *Pseudomonas* sp. Y2T2Y1 de crecer en AFA como única fuente de carbono y energía tras varias horas incluso días no se debe a una reversión de la mutación. Para su comprobación se extrajo DNA cromosómico (apartado 4.6.2 de Material y métodos) y se analizó la presencia y estabilidad de la construcción mutante, mediante PCR, de forma semejante a como se hizo anteriormente en la comprobación de los mutantes en el apartado 5.4.2.1. (Figura 5.27.). Se utilizó el DNA cromosómico de cuatro crecimientos independientes y como se muestra en la Figura 5.49, la construcción cromosómica mutante (cuya amplificación da un producto de 2093pb) permanece estable. Por lo tanto el crecimiento de *Pseudomonas* sp. Y1T2Y1 en medio mínimo M9 con AFA se realiza sin reversión de la mutación inicial.

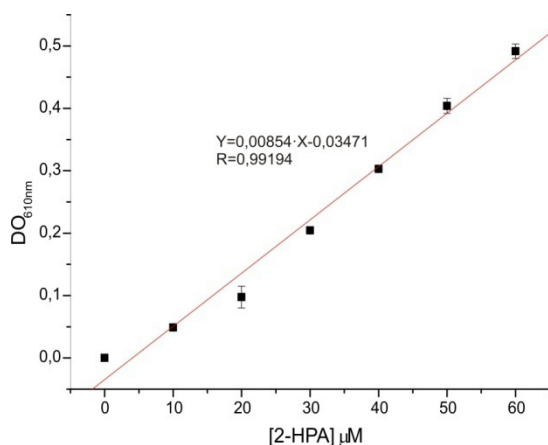


**Figura 5.47. Imagen de electroforesis de los productos de amplificación por PCR de comprobación del mutante Y2T2Y1 tras crecer en medio mínimo líquido M9 con AFA 5 mM.** Las amplificaciones por PCR se realizaron con la pareja de cebadores PaaX1(F) y PaaN2'(R) (Tabla 4.3 del apartado Material y métodos). Calles 1 y 8: marcador  $\lambda$ DNA/*BstEII*. Calles 2, 3, 4 y 5: amplificaciones sobre DNA cromosómico de *Pseudomonas* sp. Y2T2Y1 obtenido de diferentes crecimientos en medio líquido AFA tras alcanzar la fase estacionaria. Calle 6: amplificación sin molde. Calle 7: amplificación sobre DNA cromosómico de *Pseudomonas* sp. Y2T2. Se indican con flechas el tamaño de los productos obtenidos.

#### 5.4.2.1.4. Acumulación de 2-HPA en el medio de cultivo de *Pseudomonas* sp. Y2T2Y1 crecido en AFA.

El ácido 2-hidroxifenilacético (2-HPA) es un compuesto residual que se forma en el catabolismo del AFA y que es secretado al medio cuando el mutante *E. coli* W14, transformado con plásmidos que permiten la expresión de los genes *paaF*, *paaGHIJK* y *paaXY*, se cultiva en medio mínimo M63 con glicerol como única fuente de carbono y AFA como inductor de los genes *paa* (Ferrández y col., 1998). Este compuesto no actúa como sustrato de la ruta de catabólica del AFA (Ismail y col., 2003). Se produce a través de una rama divergente de la ruta, y se acumula cuando el producto formado por el complejo (di)oxigenasa reductasa (codificado por los genes *paaGHIJK*) no continúa su degradación. Con el fin de estudiar si PaaY está implicada en el paso siguiente al mediado por el complejo (di)oxigenasa-reductasa (en el que intervienen PaaN y PaaN3), se analizó la acumulación de 2-HPA en los cultivos del mutante *Pseudomonas* sp. Y2T2Y1 en medio mínimo M9 suplementado con glicerol 0,1% (v/v) como fuente de carbono y AFA (5 mM) como inductor. La detección de 2-HPA se realizó mediante el ensayo de Gibbs (apartado 4.11.1 de Material y métodos), y se cuantificó en base a la recta de calibrado representada en la Figura 5.48. *Pseudomonas* sp. Y2T2Y1 acumula 3,7 veces más 2-HPA que su estirpe parental *Pseudomonas* sp. Y2 y 2,4 veces más que *Pseudomonas* sp. Y2T2, relaciones despreciables frente a lo que acumulan *Pseudomonas* sp. Y2T2N1 y *Pseudomonas*

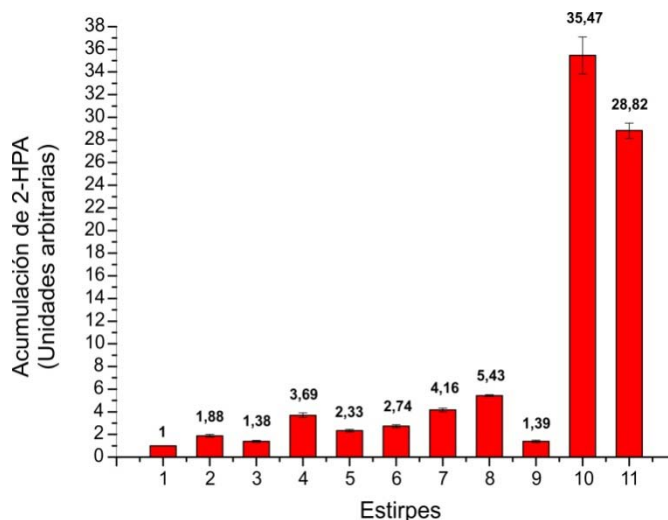
sp. Y2T2N3 en las que sí está claramente interrumpido el metabolismo del AFA (Figura 5.49), concretamente en el paso posterior a la oxidación del anillo, etapa en la que se cree que actúan las proteínas PaaN y PaaN3 (Ferrández y col., 1998; Mascaraque-Martín, 2009). Estos resultados, sugieren que PaaY no interviene directamente en el paso siguiente a la oxidación del anillo.



**Figura 5. 48. R ecta de calibrado p ara determinar l a concentración d e 2-HPA en los cultivos d e *Pseudomonas* sp. Y2. S e representó el valor de absorbancia medido a 610nm tras realizar el ensayo de Gibbs empleando concentraciones conocidas de 2-HPA (0-60 µM). Cada un de los puntos del gráfico representa el valor medio de tres ensayos independientes. Las barras de error indican el error estándar.**

**Tabla 5.7.** Correspondencia de número de la gráfica de barras de acumulación de 2-HPA con la estirpe de *Pseudomonas* correspondiente, así como la concentración acumulada en el medio y detectada de este compuesto.

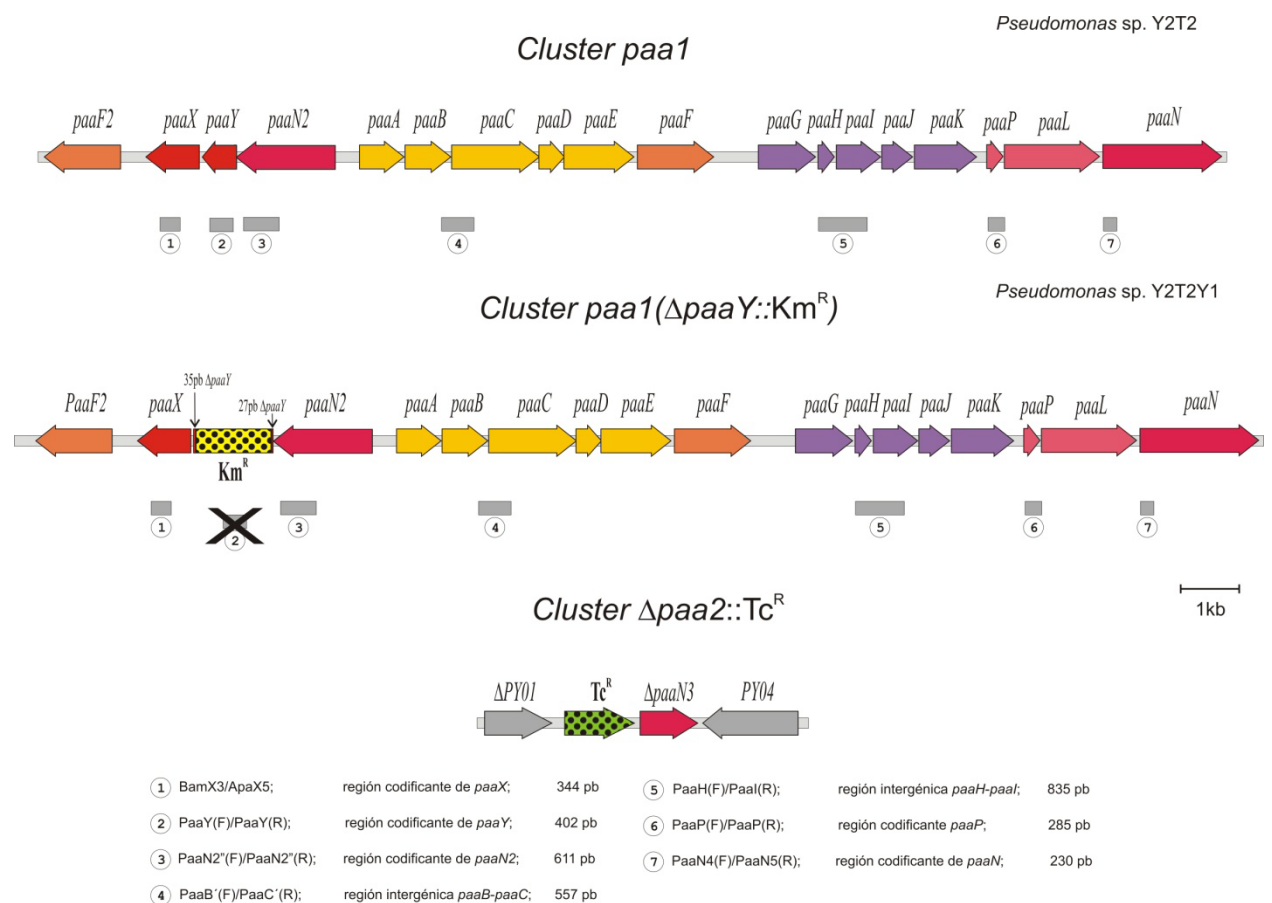
Número	Estirpes	[2-HPA] µM
1	<i>Pseudomonas</i> sp. Y2	20,67
2	<i>Pseudomonas</i> sp. Y2K1	36,32
3	<i>Pseudomonas</i> sp. Y2T2	30,32
4	<i>Pseudomonas</i> sp. Y2T2Y1	71,96
5	<i>Pseudomonas</i> sp. Y2T2Y1[pIZexY]	50,79
6	<i>Pseudomonas</i> sp. Y2T2Y1[pIZN]	53,73
7	<i>Pseudomonas</i> sp. Y2T2Y1[pIZexN2]	89,49
8	<i>Pseudomonas</i> sp. Y2T2Y1[pIZN3]	110,67
9	<i>Pseudomonas</i> sp. Y2T2N2	26,55
10	<i>Pseudomonas</i> sp. Y2T2N1	699,38
11	<i>Pseudomonas</i> sp. Y2T2N3	581,73



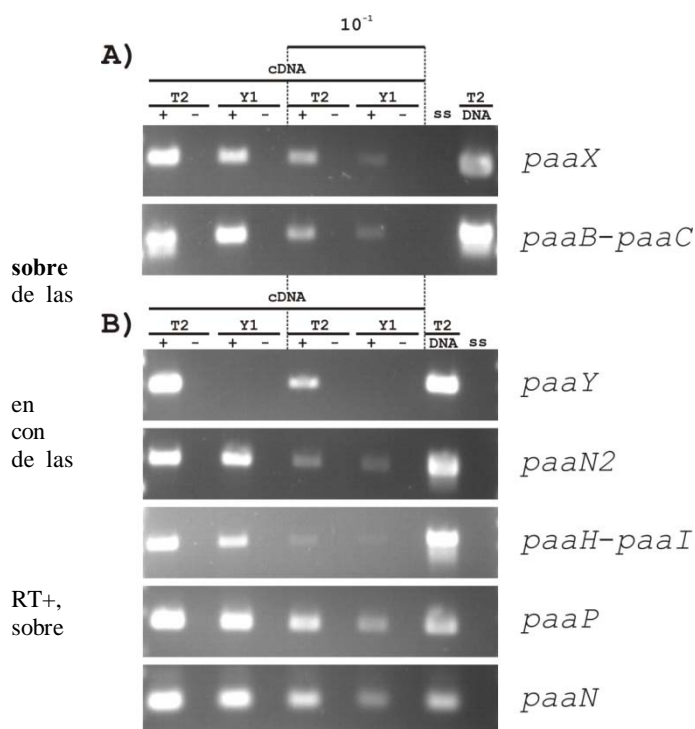
**Figura 5.49. Acumulación de 2-HPA en los cultivos de las estirpes *Pseudomonas* sp. Y2 y sus mutantes.** Las estirpes *Pseudomonas* sp. Y2, *Pseudomonas* sp. Y2T2, *Pseudomonas* sp. Y2K1, *Pseudomonas* sp. Y2T2Y1 transformada con los genes *paaY*, *paaN*, *paaN2* y *paaN3* junto con los mutantes *Pseudomonas* sp. Y2T2N1, *Pseudomonas* sp. Y2T2N2 y *Pseudomonas* sp. Y2K1N3 se cultivaron en medio mínimo M9 suplementado con AFA 5mM y glicerol 0,4% (p/v). Los cultivos se centrifugaron y se cuantificó el 2-HPA acumulado en el sobrenadante, mediante el ensayo de Gibbs. En la Tabla 5.14 se indica la concentración de 2-HPA en los diversos cultivos de *Pseudomonas* sp. Y2, en base a la recta de calibrado de la Figura 5.48. Los genes *paaY*, *paaN*, *paaN2* y *paaN3* se encuentran clonados en los plásmidos pIZexY, pIZN, pIZexN2 y pIZN3, respectivamente. Los niveles de 2-HPA se representan en el gráfico de barras con respecto a los obtenidos en el cultivo control de *Pseudomonas* sp. Y2; dichos niveles se indican sobre cada una de las barras y el número de estirpe hace referencia a aquél asignado en la Tabla 5.7. Cada una de las barras del gráfico representa el valor medio de tres ensayos independientes. Las barras de error corresponden al error estándar.

#### 5.4.2.1.5. Estudio de la expresión de los genes *paa* en *Pseudomonas* sp. Y2T2Y1.

La posible implicación de PaaY en el control de la expresión de los genes *paa* fue estudiada mediante análisis de transcritos por RT-PCR. Las estirpes *Pseudomonas* sp. Y2T2 y *Pseudomonas* sp. Y2T2Y1 fueron crecidas en medio mínimo M9 suplementado con glicerol 0,4% (v/v) y AFA (5 mM) A partir del RNA total aislado de estos cultivos (apartado 4.6.4 de Material y métodos) se procedió a la síntesis de cDNA (apartado 4.7.3 de Material y métodos), que fue usado como molde de distintas reacciones de PCR. En la Figura 5.50 se muestra un esquema de los transcritos estudiados acompañado de las parejas de cebadores usadas en cada reacción de PCR. Como se observa en la Figura 5.51, hay expresión de todos los operones del *cluster paa1* a excepción de *paaY*, como es de esperar en el mutante *Pseudomonas* sp. Y2T2Y1 donde está deletado. Con esto demostramos que el efecto que la ausencia de *paaY* produce sobre el crecimiento de *Pseudomonas* sp. Y2 en AFA no está causado por deficiencias en la expresión de los genes estudiados.



**Figura 5.50. Esquema del análisis de la expresión del cluster *paa1* en *Pseudomonas* sp. Y2T2Y1.** Detalle de las regiones cromosómicas correspondientes al cluster *paa1* de *Pseudomonas* sp. Y2T2 y *Pseudomonas* sp. Y2T2Y1 así como del cluster *paa2* de ambas estirpes. También se muestra en forma de rectángulos grises las posiciones de las amplificaciones que se llevaron a cabo mediante RT-PCR para estudiar la expresión de los genes *paa1* en el mutante Y2T2Y1. Debajo de la figura se muestran las parejas de cebadores utilizados así como el tamaño de cada amplificación.



**Figura 5.51. Electroforesis de las amplificaciones por RT-PCR para el estudio de la expresión de los genes *paaI* *Pseudomonas* Y2T2Y1. A) y B). Resultado amplificaciones realizadas sobre cDNA sintetizado a partir de mRNA de *Pseudomonas* sp. Y2T2 (T2) y *Pseudomonas* sp. Y2T2Y1 (Y1) cultivadas medio mínimo líquido M9 suplementado AFA 5mM y glicerol 0,4% (p/v). Cada una muestras fue diluida hasta una concentración de 79 ng/μL. Se preparó una dilución 10<sup>-1</sup> y se estudió la expresión de los transcritos *paaX*, *paaY*, *paaN2*, *paaB-paaC*, *paaH-paaI*, *paaP* y *paaN*. (+): reacción PCR sobre cDNA. (-): reacción RT-, PCR RNAm. ss: reacción de PCR sin sustrato o molde.**

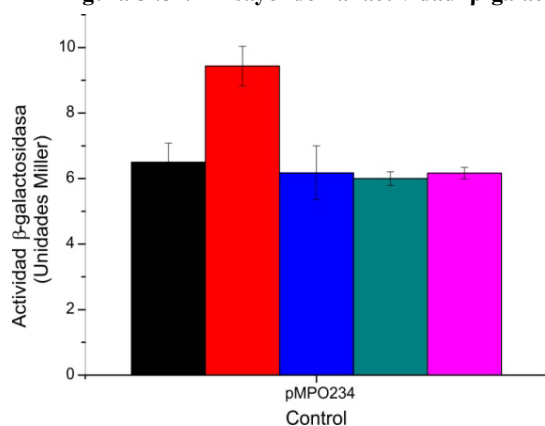
#### 5.4.2.1.6. E estudio del efecto de PaaY sobre los promotores del *cluster paaI* en *Pseudomonas* sp. Y2.

Otra aproximación a la investigación del posible papel regulador de PaaY se basó en el estudio de sus efectos sobre promotores de los genes *paaI*.

Los plásmidos pMPO234, pMPx, pMPy, pMPn2, pMPa, pMPg y pMPp (ver apartado 5.2 de Resultados y las Figuras 5.15 a 5.20) fueron introducidos tanto en *Pseudomonas* sp. Y2T2 como en *Pseudomonas* sp. Y2T2Y1 mediante las técnicas de conjugación triparental (apartado 4.5.3 de Material y métodos) y de electrotransformación (apartado 4.5.2 de Material y métodos). Tras la selección de conjugantes mediante crecimiento en LB con Pip se cultivaron estas cepas en medio M9 con AFA (5 mM) o glicerol (0,1% (v/v)) para realizar los ensayos de actividad β-galactosidasa con células permeabilizadas (apartado 4.12.1 de Material y métodos). Sobre las células de *Pseudomonas* sp. Y2T2Y1 se realizó el ensayo β-galactosidasa en fase de latencia (DO<sub>600</sub> 0,3) y en fase exponencial (DO<sub>600</sub> 0,7-0,8) para estudiar el efecto de la ausencia de PaaY en estas dos condiciones de crecimiento. En las Figuras 5.52 a 5.58, se muestran los resultados obtenidos. Hay que destacar que el plásmido pMPg portador de la región *Pg* produce muy poca actividad al contrario de lo observado en *E. coli*, en donde fue el promotor que mostró más actividad (ver apartado 5.2.).

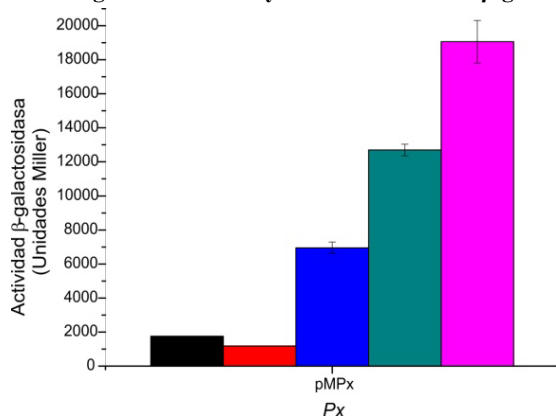
El resto de regiones promotoras, analizadas en la estirpe *Pseudomonas* sp. Y2T2, manifiestan una respuesta al AFA variada. Los promotores *Px* (Figura 5.53) y, sobre todo, *Py* (Figura 5.56) son reprimidos en presencia de AFA (-1,5 y -4,25 veces, respectivamente). El promotor *Pn2* (Figura 5.55), parece no responder a la presencia de AFA. Tanto *Pa* (Figura 5.56), como *Pp* (Figura 5.58) aumentaron considerablemente su actividad en presencia de AFA (1,6 y 2,1 veces, respectivamente).

**Figura 5.52. Ensayo de la actividad  $\beta$ -galactosidasa llevado a cabo sobre células portadoras del plásmido pMPO234 (con el gen testigo *lacZ*), cultivo de *Pseudomonas* sp. Y2T2 [pMPO234] crecido en medio mínimo M9 suplementado con glicerol 0,1% (v/v) (en color negro) o con AFA 5 mM (en color rojo).**

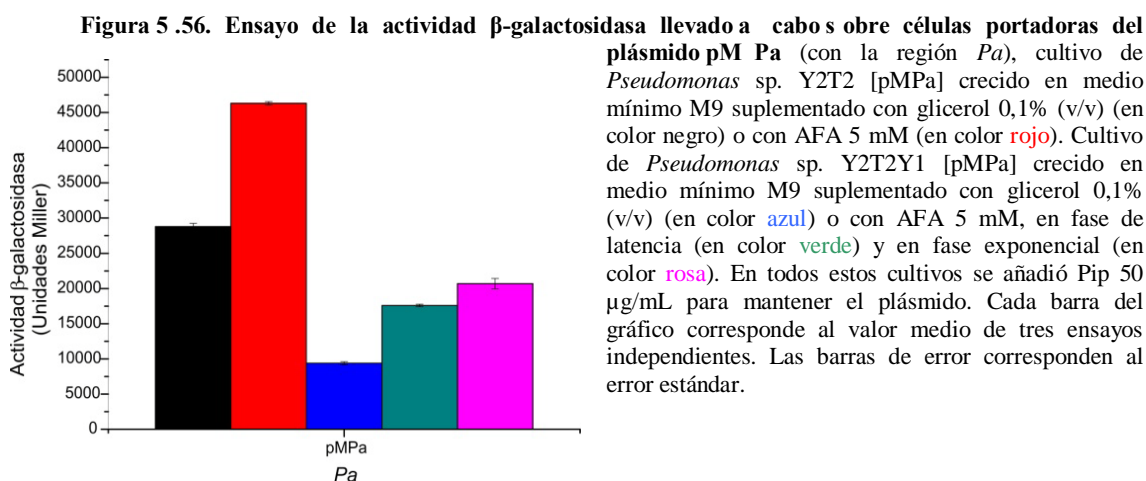
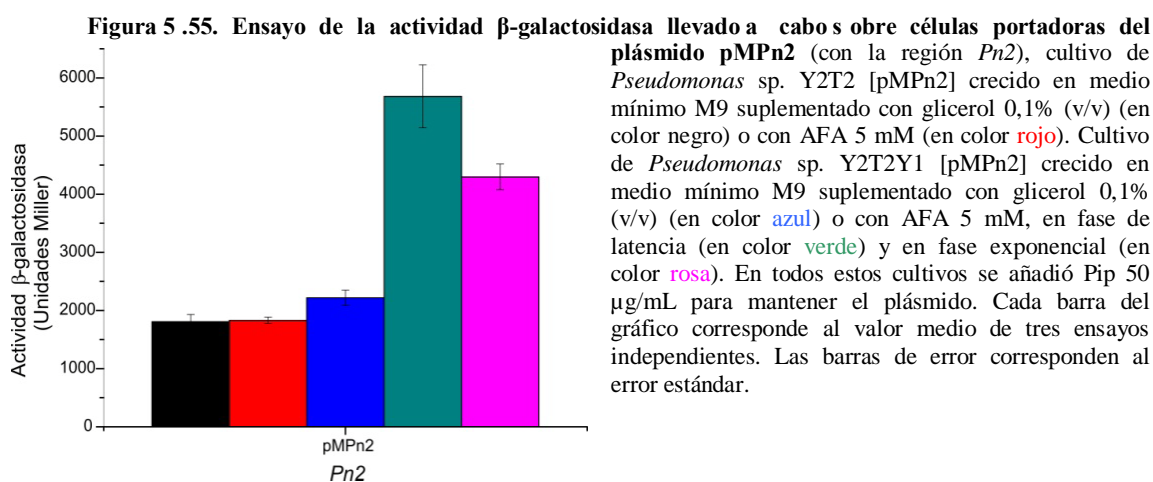
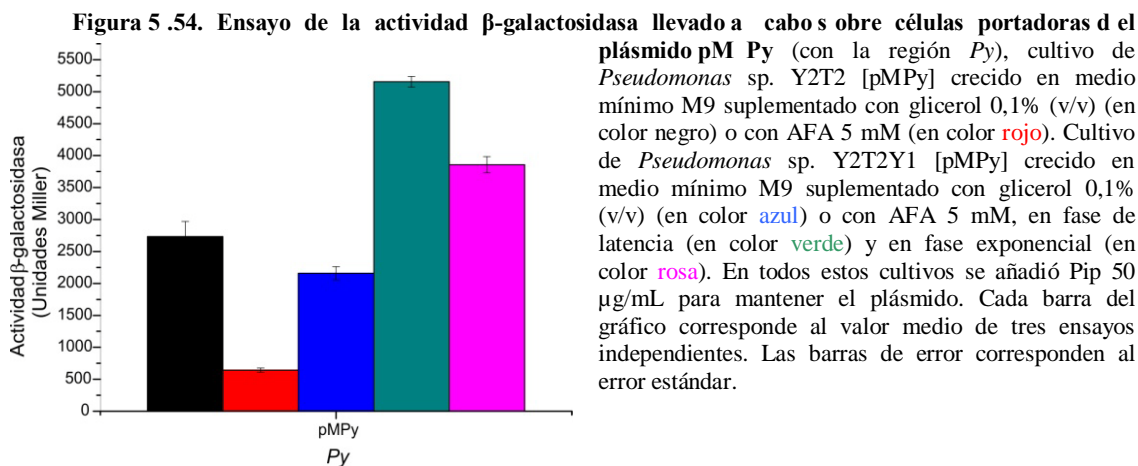


plásmido pMPO234 (con el gen testigo *lacZ*), cultivo de *Pseudomonas* sp. Y2T2Y1 [pMPO234] crecido en medio mínimo M9 suplementado con glicerol 0,1% (v/v) (en color azul) o con AFA 5 mM, en fase de latencia (en color verde) y en fase exponencial (en color rosa). En todos estos cultivos se añadió Pip 50  $\mu$ g/mL para mantener el plásmido. Cada barra del gráfico corresponde al valor medio de tres ensayos independientes. Las barras de error corresponden al error estándar.

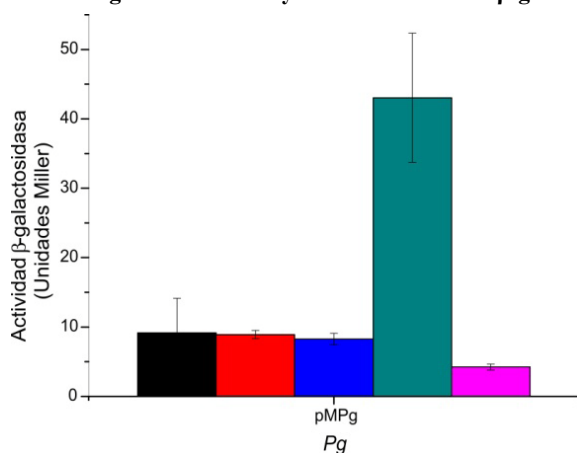
**Figura 5.53. Ensayo de la actividad  $\beta$ -galactosidasa llevado a cabo sobre células portadoras del plásmido pM Px (con la región *Px*), cultivo de *Pseudomonas* sp. Y2T2 [pMPx] crecido en medio mínimo M9 suplementado con glicerol 0,1% (v/v) (en color negro) o con AFA 5 mM (en color rojo).**



plásmido pM Px (con la región *Px*), cultivo de *Pseudomonas* sp. Y2T2Y1 [pMPx] crecido en medio mínimo M9 suplementado con glicerol 0,1% (v/v) (en color azul) o con AFA 5 mM, en fase de latencia (en color verde) y en fase exponencial (en color rosa). En todos estos cultivos se añadió Pip 50  $\mu$ g/mL para mantener el plásmido. Cada barra del gráfico corresponde al valor medio de tres ensayos independientes. Las barras de error corresponden al error estándar.

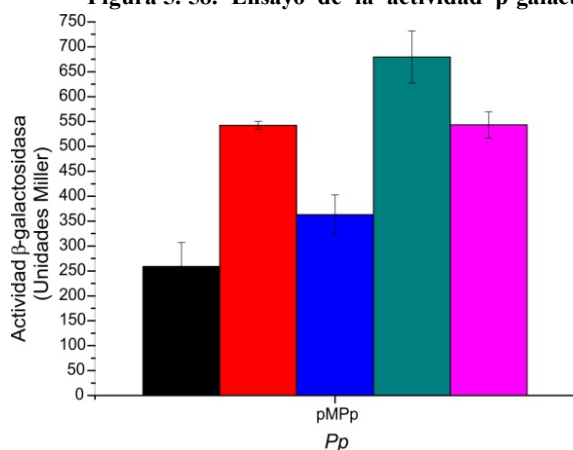


**Figura 5.57. Ensayo de la actividad  $\beta$ -galactosidasa llevado a cabo sobre células portadoras del plásmido pM Pg (con la región Pg), cultivo de *Pseudomonas* sp. Y2T2 [pMPg] crecido en medio mínimo M9 suplementado con glicerol 0,1% (v/v) (en color negro) o AFA 5 mM (en color rojo). Cultivo de *Pseudomonas* sp. Y2T2Y1 [pMPg] crecido en medio mínimo M9 suplementado con glicerol 0,1% (v/v) (en color azul) o con AFA 5 mM, en fase de latencia (en color verde) y en fase exponencial (en color rosa).**



En todos estos cultivos se añadió Pip 50  $\mu$ g/mL para mantener el plásmido. Cada barra del gráfico corresponde al valor medio de tres ensayos independientes. Las barras de error corresponden al error estándar.

**Figura 5.58. Ensayo de la actividad  $\beta$ -galactosidasa llevado a cabo sobre células portadoras del plásmido pM Pp (con la región Pp), cultivo de *Pseudomonas* sp. Y2T2 [pMPp] crecido en medio mínimo M9 suplementado con glicerol 0,1% (v/v) (en color negro) o con AFA 5 mM (en color rojo). Cultivo de *Pseudomonas* sp. Y2T2Y1 [pMPp] crecido en medio mínimo M9 suplementado con glicerol 0,1% (v/v) (en color azul) o con AFA 5 mM, en fase de latencia (en color verde) y en fase exponencial (en color rosa).**



En todos estos cultivos se añadió Pip 50  $\mu$ g/mL para mantener el plásmido. Cada barra del gráfico corresponde al valor medio de tres ensayos independientes. Las barras de error corresponden al error estándar.

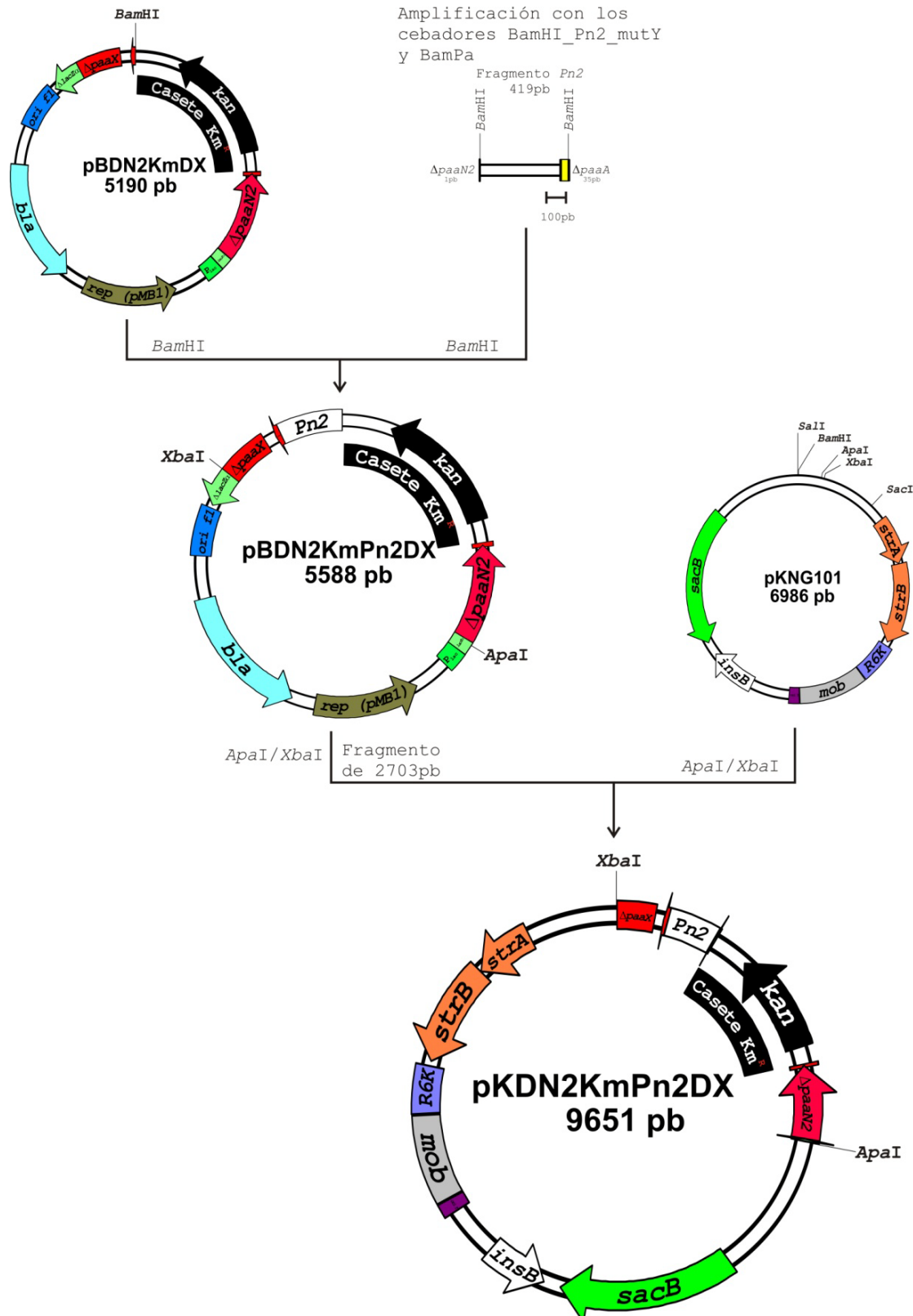
En los ensayos llevados a cabo sobre células de *Pseudomonas* sp. Y2T2Y1 todos los promotores aumentaron su actividad en presencia de AFA. Para *Py* (Figura 5.54), se observó algo similar a *Px* (Figura 5.53), un fuerte aumento de la actividad de 1,8 y 2,4 veces, respectivamente, para la fase de latencia ( $DO_{600}$  de 0,3) y 2,7 y 1,8 veces respectivamente, para la fase exponencial ( $DO_{600}$  0,7). Esta región *Px* presentó un aumento de la actividad de 10,7 veces en fase de latencia y 16,1 veces en fase exponencial frente a *Pseudomonas* sp. Y2T2 en AFA. La región *Pn2* (Figura 5.55), presenta una actividad residual en presencia de glicerol, semejante a la obtenida por este fragmento en *Pseudomonas* sp. Y2T2, y cuando en el medio existe AFA hay una primera fase de activación, aumento de la actividad  $\beta$ -galactosidasa estudiada (2,6 veces), durante la fase de latencia mientras que en plena fase exponencial se observó una clara represión de este promotor. En el promotor *Pa* (Figura 5.56), observamos un aumento de la actividad en presencia de AFA y que se superó en la fase exponencial frente a la fase de latencia, aunque no llegó a conseguir actividades del rango de las obtenidas por este

promotor en *Pseudomonas* sp. Y2T2 y AFA en el medio (-2,6 y -2,2 veces, respectivamente). *Pp* (Figura 5.58), tuvo un comportamiento diferente a lo observado hasta ahora, fue más activo en fase de latencia (1,9 veces) frente a la exponencial (1,5 veces) con AFA aunque ambos valores son superiores a los obtenidos por este promotor en presencia de glicerol. Resultó curioso que la actividad del promotor *Pp* en la fase de latencia con AFA fue mayor que en *Pseudomonas* sp. Y2T2 con AFA (1,25 veces), como ocurre con *Py* y *Pn2*.

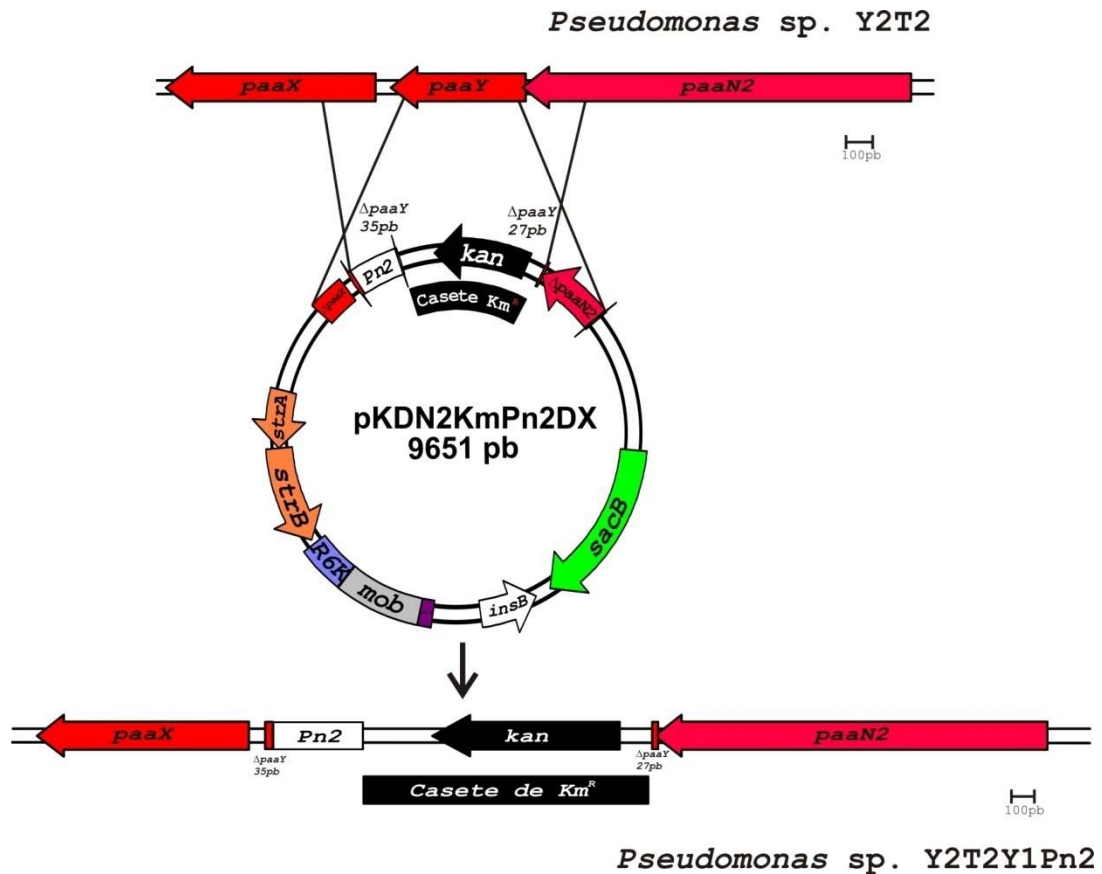
Respecto al comportamiento inducible de estas regiones cuando se ensaya en las cepas *Pseudomonas* sp. Y2T2 y *Pseudomonas* sp. Y2T2Y1, estos resultados muestran que la ausencia de *paaY* puede relacionarse con un incremento de la respuesta a AFA en las regiones *Pn2*, *Px* y *Pp* (que, como consecuencia, estimularía la expresión de los genes *paaX*, *paaN2*, *paaP*, *paaL* y *paaN*). Mientras que hay una disminución de esta respuesta en la región *Pa* (y la consiguiente disminución de la expresión de los genes *paaA*, *paaB*, *paaC*, *paaD*, *paaE* y *paaF*). Este efecto cuantitativo sobre la expresión de los genes *paa*, en especial el aumento de expresión de *paaX* (y la consiguiente producción de la proteína represora) y la disminución de la expresión de *paaA*, *paaB*, *paaC*, *paaD*, *paaE* y *paaF* (y el correspondiente complejo proteico con actividad oxigenasa), provocados por la ausencia de *paaY*, podría ser la causa del bajo ritmo de crecimiento que tiene la estirpe *Pseudomonas* sp. Y2T2Y1, como se discutirá más adelante.

### 5.4.2.2. Construcción del mutante *Pseudomonas* sp. Y2T2Y1Pn2.

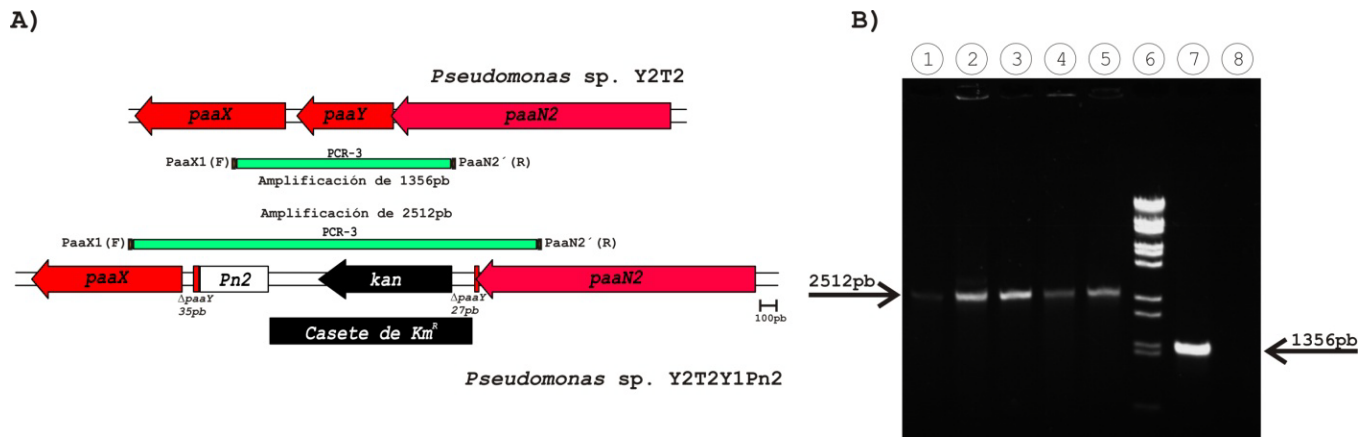
El mutante *Pseudomonas* sp. Y2T2Y1 se construyó truncando el gen *paaY*. Aunque es probable la existencia de un promotor particular situado delante de *paaX* que dirige su transcripción, los datos de análisis de transcritos sugerían la existencia de un mensajero policistrónico *paaN2YX*, forzosamente ausente en el mutante *Pseudomonas* sp. Y2T2Y1. Ante la posibilidad de que este hecho pudiera tener un efecto adicional a la ausencia de *PaaY*, se preparó un nuevo mutante con una copia de la región *Pn2* situada delante de *paaX*, con el fin de colocar la expresión de *paaX* bajo el control del promotor *Pn2*. El plásmido pKDN2KmPn2DX, (Figura 5.59) lleva una copia integrada del promotor *Pn2* detrás del casete de resistencia a Km y delante del gen *paaX*. Para la construcción del nuevo mutante se introdujo el plásmido suicida pKDN2KmPn2Dx, mediante conjugación biparental, desde la cepa donadora *E. coli* S17.1  $\lambda$ pir (apartado 4.5.4 de Material y métodos) a *Pseudomonas* sp. Y2T2 y se identificaron los dobles recombinantes (Figura 5.60) por su capacidad de crecer en LB con sacarosa, Cm, Km y Tc y por su sensibilidad a Sm. Esta nueva estirpe mutante recibió el nombre de *Pseudomonas* sp. Y2T2Y1Pn2 ( $\Delta paa2::Tc$ ,  $\Delta paaY::KmPn2$ ) y la estructura de su región *paaN2-paaX* fue comprobada por PCR (Figura 5.61).



**Figura 5.59. Construcción del plásmido pKDN2KmPn2DX.** En el plásmido pBDN2KmDX se clonó en el sitio *Bam*HI el fragmento amplificado de 419 pb con la pareja de cebadores *Bam*HI\_Pn2\_mutY y *Bam*Pa (Tabla 4.3 del apartado Material y métodos) previamente cortado con la enzima *Bam*HI, (Figura 5.24). A partir del plásmido resultante, pBDN2KmPn2DX, se aisló el fragmento *Apa*I y *Xba*I de 2703 pb y se clonó en pKNG101, (Tabla 4.2 del apartado Material y métodos) previamente cortado con las mismas enzimas para producir el plásmido pKDN2KmPn2DX. Éste plásmido se transfirió por conjugación desde *E. coli* S17.1 $\lambda$ pir a *Pseudomonas* sp. Y2T2 con el fin de conseguir la estirpe mutante *Pseudomonas* sp. Y2T2  $\Delta$ paaY::KmPn2, denominada *Pseudomonas* sp. Y2T2Y1Pn2 (Figura 5.62).



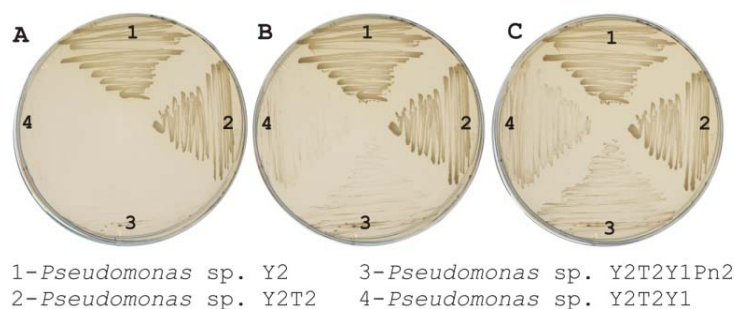
**Figura 5.60.** Construcción del mutante *Pseudomonas* sp. Y2T2Y1Pn2. Esquema detallado de la doble recombinación que se produce entre el cluster *paaI* del cromosoma de *Pseudomonas* sp. Y2T2 y el plásmido pKDN2KmPn2DX para dar lugar a la estirpe *Pseudomonas* sp. Y2T2Y1Pn2.



**Figura 5.61.** Comprobación de la delección de *paaY* y la inserción de *Pn2* de la estirpe *Pseudomonas* sp. Y2T2Y1Pn2. **A)** Contexto cromosómico en el que encuentra *paaY* tanto en *Pseudomonas* sp. Y2T2 como en *Pseudomonas* sp. Y2T2Y1Pn2, donde este gen está casi totalmente delecionado y truncado por el casete de resistencia a Km delante de la región *Pn2* (promotor *Pn2*). También se muestra el esquema de la amplificación PCR-3 que se realizó para comprobar la mutación, así como el tamaño y los oligos utilizados para llevar a cabo esta comprobación. **B)** Imagen de la electroforesis donde se muestran los fragmentos amplificados por PCR utilizando la pareja de cebadores que aparecen en la sección A, donde se muestra con flechas los tamaños de cada amplificación. Calle 1, 2, 3, 4 y 5: amplificación sobre DNA cromosómico de diferentes conjugantes seleccionados de *Pseudomonas* sp. Y2T2Y1Pn2. Calle 6: marcador  $\lambda$ DNA/*Bst*EII. Calle 7: amplificación utilizando como molde DNA cromosómico de *Pseudomonas* sp. Y2T2, y calle 8: amplificación sin molde.

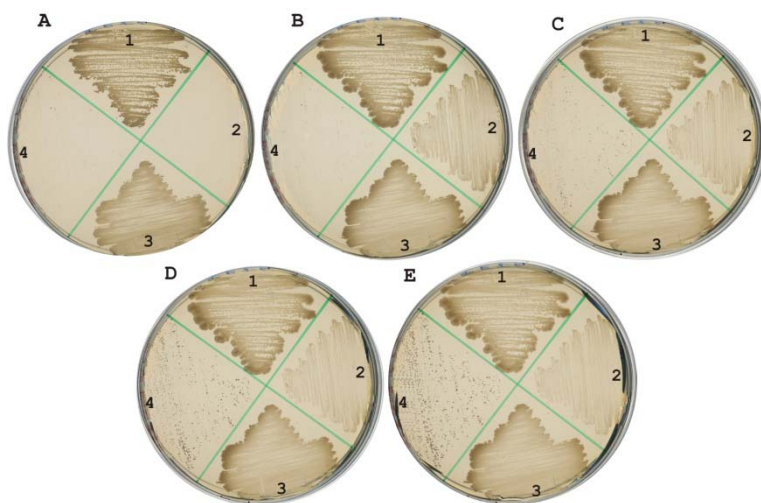
#### 5.4.2.2.1. Crecimiento de *Pseudomonas* sp. Y2T2Y1Pn2 en medio sólido con AFA.

El crecimiento del mutante *Pseudomonas* sp. Y2T2Y1Pn2 se contrastó con el de la cepa *Pseudomonas* sp. Y2T2Y1 (Figura 5.62) observándose un comportamiento similar de los dos mutantes.



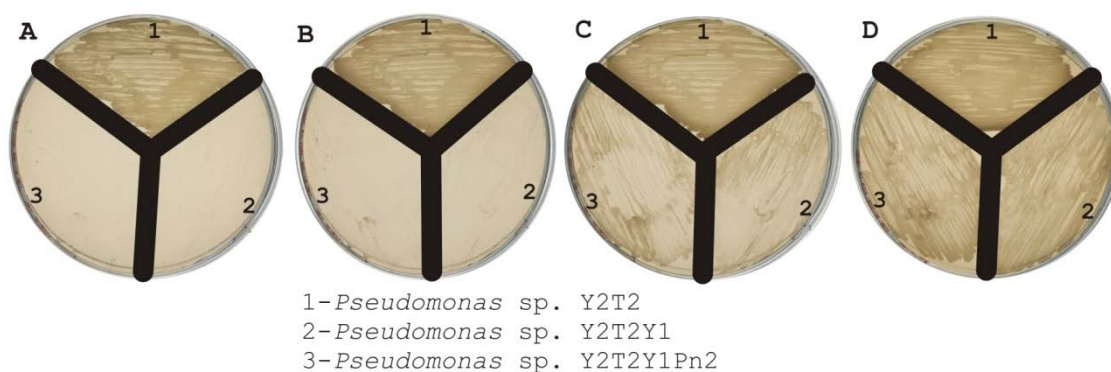
**Figura 5.62. Cultivo en medio mínimo M9 suplementado con AFA 5 mM de *Pseudomonas* sp. Y2, *Pseudomonas* sp. Y2T2 ( $\Delta paa2::Tc$ ), *Pseudomonas* sp. Y2T2Y1Pn2 ( $\Delta paa2::Tc$ ,  $\Delta paaY::KmPn2$ ), *Pseudomonas* sp. Y2T2Y1 ( $\Delta paa2::Tc$ ,  $\Delta paaY::Km$ ). Las placas se incubaron a 30°C durante 24 horas (A), 48 horas (B) y 96 horas (C).**

También se estudió el comportamiento de este nuevo mutante después de ser transformado con los plásmidos pIZexY (Figura 5.30 A) y pIZX (Figura 5.31), portadores de los genes *paaY* y *paaX*, respectivamente. Las estirpes *Pseudomonas* sp. Y2T2Y1Pn2 [pIZexY] e *Pseudomonas* sp. Y2T2Y1Pn2 [pIZX] fueron crecidas en medio mínimo M9 suplementado con AFA, Gm e IPTG (Figura 5.63). *Pseudomonas* sp. Y2T2Y1Pn2 [pIZexY] recuperaba la velocidad de crecimiento en AFA de la cepa. En el caso de *Pseudomonas* sp. Y2T2Y1Pn2 [pIZX] crece mucho más lentamente.



**Figura 5.63. Cultivo en medio mínimo M9 suplementado con AFA 5 mM, IPTG (0,5 mM) y Gm de *Pseudomonas* sp. Y2T2 [pIZ1016], *Pseudomonas* sp. Y2T2Y1Pn2 [pIZ1016], *Pseudomonas* sp. Y2T2Y1Pn2 [pIZexY] y *Pseudomonas* sp. Y2T2Y1Pn2 [pIZX]. Las placas se incubaron a 30°C durante 24 horas (A), 96 horas (B), 144 horas (C), 168 horas (D) y 214 horas (E).**

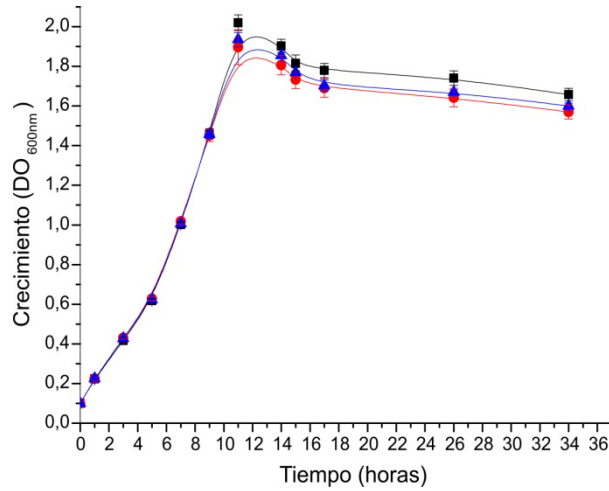
De manera análoga a como se comporta *Pseudomonas* sp. Y2T2Y1, cuando células de *Pseudomonas* sp. Y2T2Y1Pn2 crecidas en medio M9 suplementado con AFA se volvieron a incubar en el mismo medio fresco (Figura 5.64) el nuevo mutante *Pseudomonas* sp. Y2T2Y1Pn2 acelera levemente su velocidad de crecimiento.



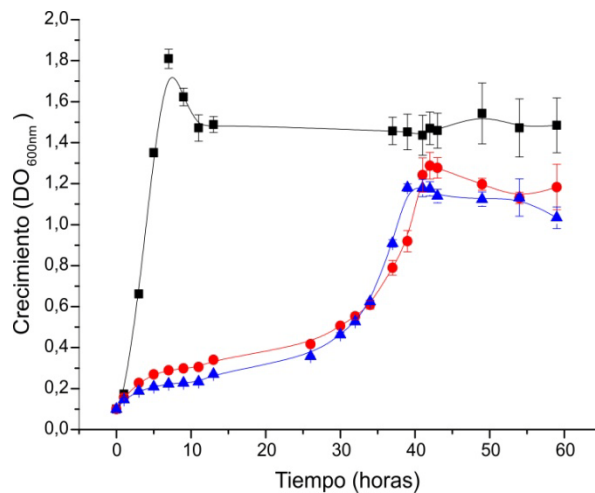
**Figura 5.64.** Cultivo en medio mínimo M9 suplementado con AFA 5 mM desde AFA de *Pseudomonas* sp. Y2T2, *Pseudomonas* sp. Y2T2Y1 y *Pseudomonas* sp. Y2T2Y1Pn2. Las placas se incubaron a 30°C durante 24 horas (A), 48 horas (B), 72 horas (C) y 96 horas (D).

#### 5.4.2.2.2. Crecimiento de *Pseudomonas* sp. Y2T2Y1Pn2 en medio líquido.

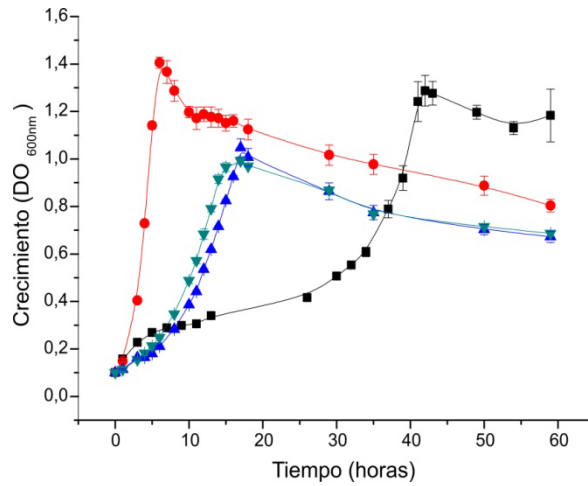
Siguiendo un proceso paralelo al recorrido con el mutante *Pseudomonas* sp. Y2T2Y1, se llevó a cabo un estudio comparativo del crecimiento de ese y del nuevo mutante *Pseudomonas* sp. Y2T2Y1Pn2, en medio líquido y en distintas condiciones. Los cultivos en medio M9 con glicerol 0,1% (v/v) (Figura 5.65), en M9 suplementado con AFA (Figura 5.66) y en medio fresco después de un crecimiento hasta la fase estacionaria (Figura 5.67), mostraron un comportamiento muy semejante de ambas cepas. Estos datos indican que la posible diferencia en la expresión de *paaX* provocada por la interrupción del operón *paaN2YX* resultado de la inserción del casete de resistencia a Km no afecta al crecimiento de *Pseudomonas* sp. Y2 en AFA.



**Figura 5 .65. Curvas de crecimiento de *Pseudomonas* sp. Y2T2 ( $\Delta paa2::Tc$ ) (■), *Pseudomonas* sp. Y2T2Y1 ( $\Delta paa2::Tc \Delta paaY::Km$ ) (●) y *Pseudomonas* sp. Y2T2Y1Pn2 ( $\Delta paa2::Tc \Delta paaY::KmPn2$ ) (▲) en medio líquido M9 suplementado con glicerol 0,1%. Cada punto de la gráfica representa el valor medio de tres ensayos independientes. Las barras de error corresponden al error estándar.**



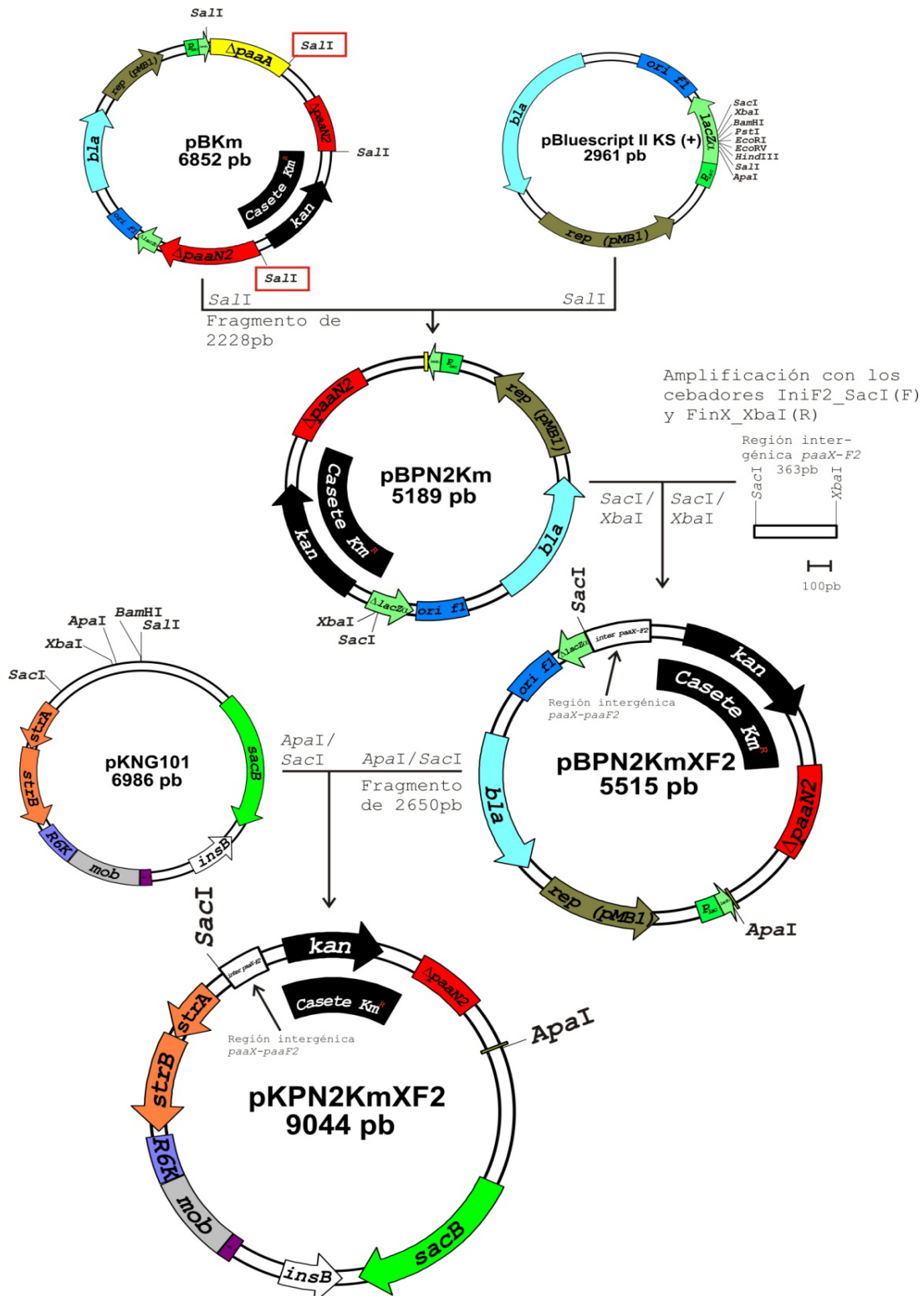
**Figura 5 .66. Curvas de crecimiento de *Pseudomonas* sp. Y2T2 (■), *Pseudomonas* sp. Y2T2Y1 (●) y *Pseudomonas* sp. Y2T2Y1Pn2 (▲) en medio líquido M9 suplementado con AFA 5 mM. Cada punto de la gráfica representa el valor medio de tres ensayos independientes. Las barras de error corresponden al error estándar.**



**Figura 5.67. Curva de crecimiento de *Pseudomonas* sp. Y 2T2 (●), *Pseudomonas* sp. Y 2T2Y1 (▲) y *Pseudomonas* sp. Y 2T2Y1Pn2 (▼) en medio líquido M9 suplementado con AFA 5 mM y reparado con células previamente crecidas en el mismo medio, frente a la curva de crecimiento de *Pseudomonas* sp. Y 2T2Y1 (■) crecida por primera vez en el mismo medio. Cada punto de la gráfica representa el valor medio de tres ensayos independientes. Las barras de error corresponden al error estándar.**

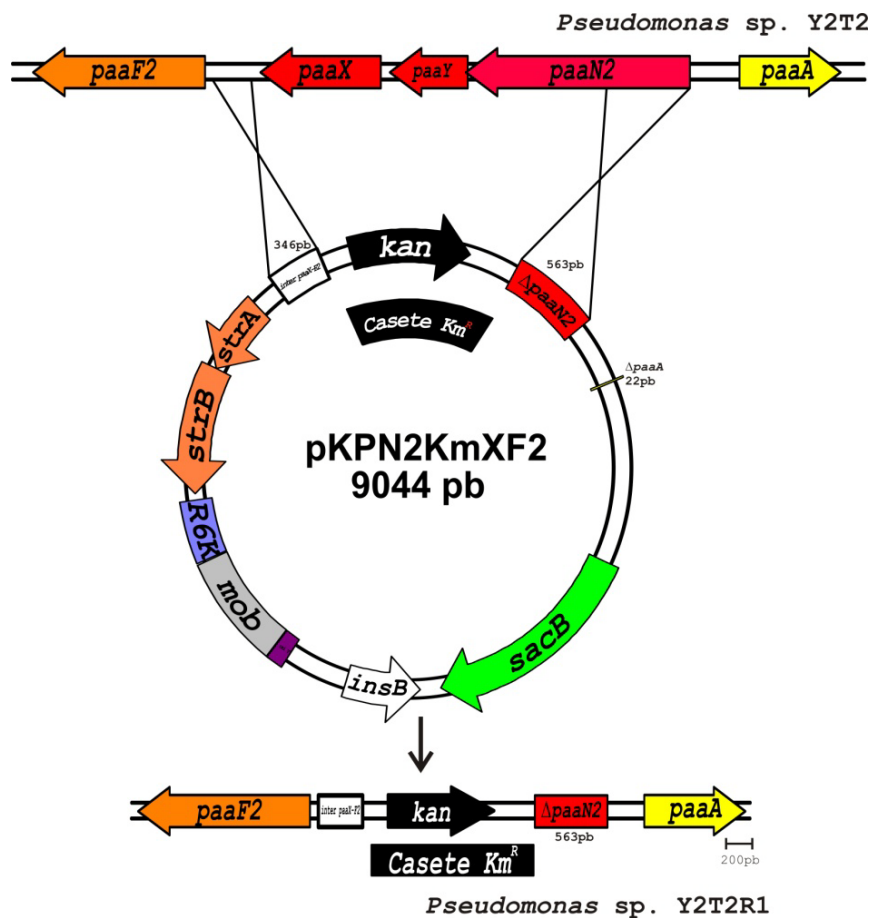
#### 5.4.2.3. Construcción del mutante *Pseudomonas* sp. Y2T2R1.

Dentro del estudio de mutantes en la región que rodea a *paaY*, también se llevó a cabo la obtención de un mutante por delección de todo el operón *paaN2YX*.

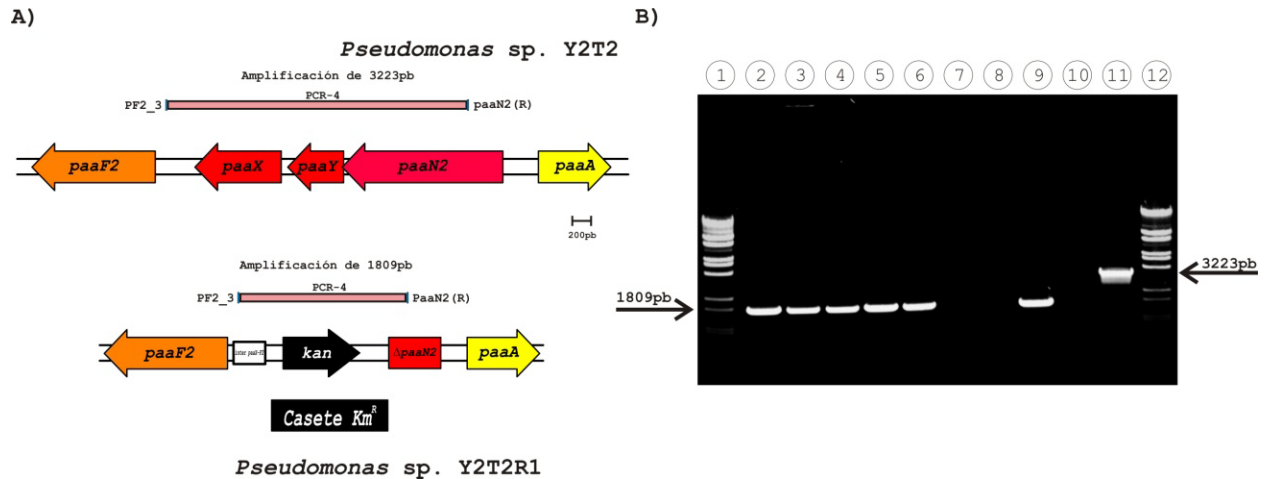


**Figura 5.68. Construcción del plásmido pKPN2KmXF2.** Primeramente se realizó una digestión parcial del plásmido pBKm con la enzima *SalI* aislándose el fragmento de 2228 pb que fue clonado en pBluescript II KS (+), (Tabla 4.2 del apartado Material y métodos), previamente cortado con la misma enzima, en la orientación adecuada para producir pPN2Km. El fragmento amplificado de 363 pb con las parejas de cebadores Inif2\_SacI(F) y FinX\_XbaI(R), (Tabla 4.3 del apartado Material y métodos) (Figura 5.24), se cortó con las enzimas *SacI* y *XbaI* se clonó en pBPN2 previamente cortado con las mismas enzimas para producir el plásmido pPN2KmXF2. Este plásmido resultante fue digerido con las enzimas *ApaI* y *SacI* aislándose el fragmento de 2650 pb que se clonó en pKNG101, (Tabla 4.2 del apartado Material y métodos), previamente cortado con las mismas enzimas, para producir el plásmido pKPN2KmXF2. Este plásmico se transfirió mediante conjugación desde *E. coli* S17.1 $\lambda$ pir a *Pseudomonas* sp. Y2T2 con el fin de conseguir la estirpe mutante *Pseudomonas* sp. Y2T2  $\Delta$ paa2::Tc,  $\Delta$ paaN2YX::Km, denominada *Pseudomonas* sp. Y2T2R1 (Figura 5.71).

A la estirpe parental *Pseudomonas* sp. Y2T2 se transfirió, mediante conjugación biparental (apartado 4.5.4 de Material y métodos), el plásmido suicida pKPN2KmXF2 (Figura 5.68) desde la cepa donadora *E. coli* S17.1  $\lambda$ pir. La delección de los genes *paaN2*, *paaY* y *paaX* produjo una estirpe portaba el resto de genes *paa* y que se denominó *Pseudomonas* sp. Y2T2R1 ( $\Delta paa2::Tc$ ,  $\Delta paaN2YX::Km$ ). Los dobles recombinantes (Figura 5.69) fueron identificados en función de su resistencia a sacarosa, Cm, Tc, Km y por su sensibilidad a Sm y en ellos se comprobó la mutación de los genes *paaN2*, *paaY* y *paaX* mediante PCR (Figura 5.70).



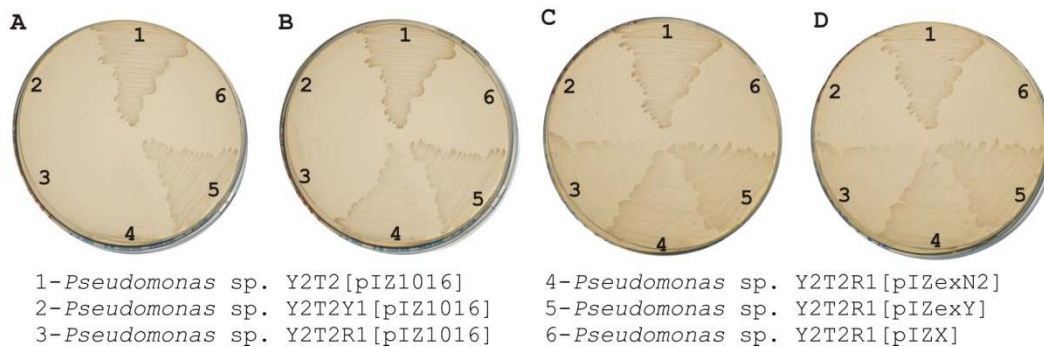
**Figura 5.69.** Construcción del mutante *Pseudomonas* sp. Y2T2R1. Detalle de la doble recombinación que tiene lugar entre el *cluster paaI* del cromosoma de *Pseudomonas* sp. Y2T2 y el plásmido pKPN2KmXF2 para dar lugar a la estirpe *Pseudomonas* sp. Y2T2R1.



**Figura 5.70. Comprobación de la mutación en *paaN2*, *paaY* y *paaX* de la estirpe *Pseudomonas sp. Y2T2* N2Y1X1.** A) Contexto cromosómico en el que encuentra *paaN2*, *paaY* y *paaX* en *Pseudomonas sp. Y2T2* y el cromosoma resultante tras la mutación de *Pseudomonas sp. Y2T2R1*, donde el gen *paaN2* está casi totalmente deletado y los genes *paaY* y *paaX* totalmente deletados y truncados por el casete de resistencia a Km. Se muestra el esquema de la amplificación PCR-4 que se realizó para comprobar la mutación, así como el tamaño y los oligos utilizados para llevarla a cabo. B) Imagen de la electroforesis donde aparecen los fragmentos amplificados por PCR utilizando la pareja de cebadores que aparecen en la sección A, donde se muestra con flechas los tamaños de cada amplificación. Calle 1y12: marcador  $\lambda$ DNA/*BstEII*. Calles 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 y 9: amplificación sobre DNA cromosómico de diferentes conjugantes seleccionados de *Pseudomonas sp. Y2T2R1*. Calle 10: amplificación sin molde. Calle 11: amplificación utilizando como molde DNA cromosómico de *Pseudomonas sp. Y2T2*.

#### 5.4.2.3.1. Crecimiento de *Pseudomonas sp. Y2T2R1* en medio sólido con AFA.

El mutante *Pseudomonas sp. Y2T2R1* fue transformado, independientemente con los plásmidos pIZ1016, pIZexY, pIZX o pIZexN2 (Figuras 5.30 A, 5.30 B, 5.31 y 5.32 B, respectivamente). Las estirpes *Pseudomonas sp. Y2T2R1* [pIZ1016], *Pseudomonas sp. Y2T2R1* [pIZexY], *Pseudomonas sp. Y2T2R1* [pIZX] y *Pseudomonas sp. Y2T2R1* [pIZexN2] fueron crecidas en medio mínimo M9 suplementado con AFA (Figura 5.71).

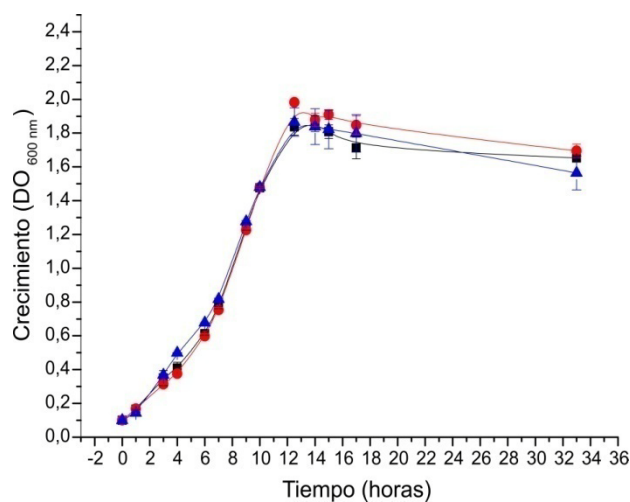


**Figura 5.71. Cultivo en medio mínimo M9 con AFA, IPTG (0,5 mM) y Gm de *Pseudomonas sp. Y2T2* ( $\Delta$ *paa2*::Tc) [pIZ1016], *Pseudomonas sp. Y2T2Y1* ( $\Delta$ *paa2*::Tc,  $\Delta$ *paaY*::Km) [pIZ1016], *Pseudomonas sp. Y2T2R1* ( $\Delta$ *paa2*::Tc,  $\Delta$ *paaN2YX*::Km) [pIZ1016], *Pseudomonas sp. Y2T2R1* [pIZexN2], *Pseudomonas sp. Y2T2R1* [pIZexY] y *Pseudomonas sp. Y2T2R1* [pIZX]. Las placas se incubaron a 30°C durante 24 horas (A), 48 horas (B), 120 horas (C) y 336 horas (D).**

El mutante *Pseudomonas* sp. Y2T2R1 complementado con *paaY* es capaz de crecer al mismo ritmo que la estirpe parental, *paaN2* complementa parcialmente el efecto de la mutación. El mutante *Pseudomonas* sp. Y2T2R1, aunque con retardo, crece más deprisa que la cepa *Pseudomonas* sp. Y2T2Y1, deficiente exclusivamente en *paaY* quizá efecto de la ausencia del gen represor *paaX* en el primero. La estirpe *Pseudomonas* sp. Y2T2R1 [pIZX] es incapaz de crecer, indicativo de una fuerte represión por parte de PaaX sobre los genes *paa* que la célula deficiente en los genes *paaN2* y *paaY* no es capaz de evitar, incluso en presencia de AFA.

#### 5.4.2.3.2. Crecimiento de las cepas mutantes de *Pseudomonas* sp. Y2 en medios líquidos.

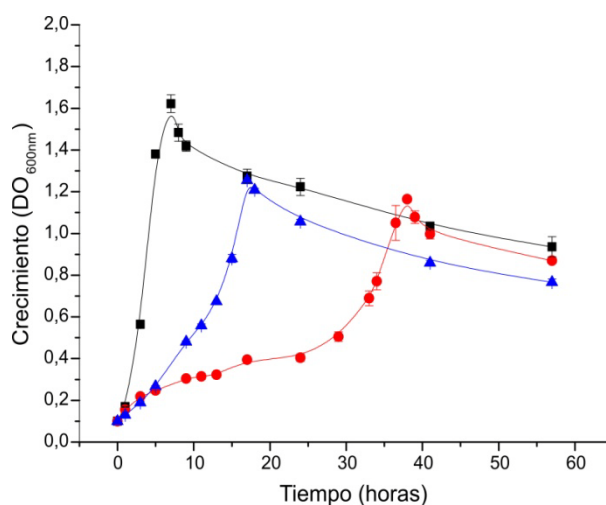
El crecimiento en medio líquido del nuevo mutante *Pseudomonas* sp. Y2T2R1 se comparó con el de las estirpes *Pseudomonas* sp. Y2T2 y *Pseudomonas* sp. Y2T2Y1 creciendo en M9 suplementado con glicerol o con AFA. Las tres cepas crecen en glicerol con la misma velocidad (Figura 5.72), indicando que los genes deletionados en *Pseudomonas* sp. Y2T2R1 no intervienen directa o indirectamente en el metabolismo general de *Pseudomonas* sp. Y2.



**Figura 5.72.** Curvas de crecimiento de *Pseudomonas* sp. Y2T2 ( $\Delta paa2::Tc$ ) (■), *Pseudomonas* sp. Y2T2Y1 ( $\Delta paa2::Tc, \Delta paaY::Km$ ) (●) y *Pseudomonas* sp. Y2T2R1 ( $\Delta paa2::Tc, \Delta paaN2YX::Km$ ) (▲) en medio líquido M9 suplementado con glicerol 0,1%. Cada punto de la gráfica representa el valor medio de tres ensayos independientes. Las barras de error corresponden al error estándar.

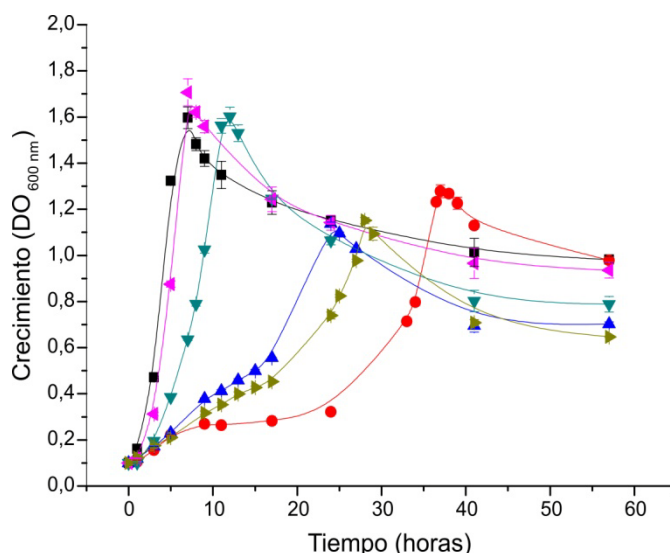
Las curvas de crecimiento en AFA (Figura 5.73) muestran un comportamiento intermedio del mutante *Pseudomonas* sp. Y2T2R1 respecto a las cepas *Pseudomonas* sp. Y2T2 y

*Pseudomonas* sp. Y2T2Y1, probablemente consecuencia, por un lado, de la ausencia del elemento represor PaaX, y, por otro, de la ausencia de la participación de las proteínas PaaY y, quizá, PaaN2, como se discutirá en su momento.



**Figura 5.73.** Curvas de crecimiento de *Pseudomonas* sp. Y2T2 (■), *Pseudomonas* sp. Y2T2Y1 (●) y *Pseudomonas* sp. Y2T2R1 (▲) en medio líquido M9 suplementado con AFA 5 mM. Cada punto de la gráfica representa el valor medio de tres ensayos independientes. Las barras de error corresponden al error estándar.

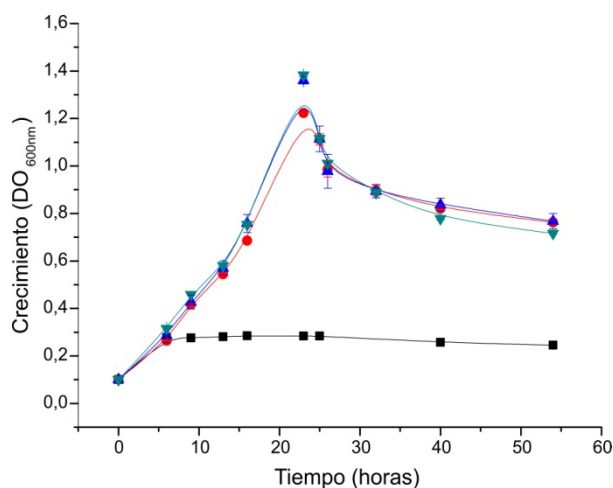
Por otro lado, también se estudió el crecimiento en medio líquido del mutante *Pseudomonas* sp. Y2T2R1 complementado en *trans* con los genes *paaY*, *paaN2* y *paaX*. Las estirpes *Pseudomonas* sp. Y2T2R1 [pIZ1016], *Pseudomonas* sp. Y2T2R1 [pIZexY], *Pseudomonas* sp. Y2T2R1 [pIZexN2], *Pseudomonas* sp. Y2T2R1 [pIZX], *Pseudomonas* sp. Y2T2 [pIZ1016] y *Pseudomonas* sp. Y2T2Y1 [pIZ1016] fueron cultivadas en medio líquido M9 suplementado con AFA (Figura 5.74). La presencia en multicopia de *paaY* y, en menor medida, de *paaN2* aproximan la velocidad de crecimiento de las estirpes correspondientes a la de la cepa parental Y2T2. Por el contrario, la expresión del gen *paaX* en multicopia, acentuó el retardo en el crecimiento en comparación con *Pseudomonas* sp. Y2T2R1.



**Figura 5.74. Curvas de crecimiento de *Pseudomonas* sp. Y2T2R1 complementada con genes *paa* en medio mínimo M9 con AFA 5 mM, IPTG (0,5 mM) y Gm.** Crecimiento de *Pseudomonas* sp. Y2T2 [pIZ1016] (■), *Pseudomonas* sp. Y2T2Y1 [pIZ1016] (●), *Pseudomonas* sp. Y2T2R1 [pIZ1016] (▲), *Pseudomonas* sp. Y2T2R1 [pIZexY] (◆), *Pseudomonas* sp. Y2T2R1 [pIZexN2] (▼) y *Pseudomonas* sp. Y2T2R1 [pIZX] (►). Cada punto de la gráfica representa el valor medio de tres ensayos independientes. Las barras de error corresponden al error estándar.

#### 5.4.2.3.3. Efecto del medio de cultivo en la función de PaaY.

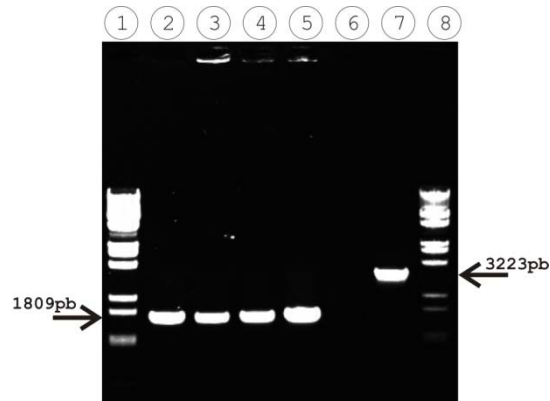
Finalmente, al igual que se hizo con el mutante *Pseudomonas* sp. Y2T2Y1, se preparó un medio “gastado” mediante cultivo de la estirpe *Pseudomonas* sp. Y2T2 en M9 líquido con AFA (5 mM), crecido hasta una  $DO_{600}$  de 1,8 recuperación del sobrenadante y ajuste a pH 7. Este “medio gastado” se inoculó con *Pseudomonas* sp. Y2T2R1. El comportamiento de este cultivo fue totalmente semejante al seguido por un cultivo paralelo del mismo mutante *Pseudomonas* sp. Y2T2R1 en medio fresco (Figura 5.75). Todos estos resultados se discutirán en la sección correspondiente.



**Figura 5.75. C** urvas de c recimiento de *Pseudomonas* sp. Y2T2R1 en medio mínimo M9 "gastado" (■), en medio M9 "gastado" suplementado con AFA 5mM (●), en medio M9 mixto (50% "gastado" y 50 % fresco) suplementado con AFA 5 mM (▲) y en medio M9 fresco suplementado con AFA 5 mM (▼). Cada punto de la gráfica representa el valor medio de tres ensayos independientes. Las barras de error corresponden al error estándar.

#### 5.4.2.3.4. Recombroación de mutantes *Pseudomonas* sp. Y2T2Y1 tras crecer en AFA.

Para comprobar que la capacidad de la estirpe *Pseudomonas* sp. Y2T2R1 de crecer en AFA como única fuente de carbono y energía tras varias horas no se debe a una reversión de la mutación, tras el crecimiento de estas estirpes en los medios M9 suplementados con AFA se realizó una extracción de DNA cromosómico (apartado 4.6.2 de Material y métodos) y se analizó la presencia y estabilidad de la construcción mutante mediante PCR, de forma semejante a la realizada en el apartado 5.4.2.3. (Figura 5.71) para comprobar los mutantes seleccionados *Pseudomonas* sp. Y2T2R1. Se utilizó el DNA cromosómico de cuatro crecimientos independientes y como se muestra en la Figura 5.76, en todas las situaciones la construcción permanece estable, por lo que podemos concluir que el crecimiento de *Pseudomonas* sp. Y1T2R1 en medio mínimo M9 con AFA se realiza sin reversión de la mutación inicial.



**Figura 5.76.** Imagen de electroforesis de los productos de amplificación por PCR de comprobación del mutante *Pseudomonas* sp. Y2T2R1 tras crecer en medio mínimo líquido M9 con AFA 5 mM. Las amplificaciones por PCR se realizaron con la pareja de cebadores PF2\_3 y PaaN2(R) (Tabla 4.3 del apartado Material y métodos). Calle1 y 8: marcador  $\lambda$ DNA/*Bst*EII. Calles 2, 3, 4 y 5 amplificaciones sobre DNA cromosómico de *Pseudomonas* sp. Y2T2R1 obtenido de diferentes crecimientos en medio líquido M9 con AFA. Calle 6: amplificación sin molde. Calle 7: amplificación sobre DNA cromosómico de *Pseudomonas* sp. Y2T2. Se indican con flechas el tamaño de los productos obtenidos.

*Discusión*





## 6. DISCUSIÓN.

### 6.1. Organización transcripcional del *cluster paa1* de *Pseudomonas* sp. Y2.

En *Pseudomonas* sp. Y2 han sido descritos dos conjuntos de genes cuyos productos se encargan de la degradación de compuestos aromáticos, los cuales fueron aislados y caracterizados. Estos genes pertenecen a las rutas del metabolismo del estireno, genes *sty* (Velasco y col., 1998; Alonso, 2002; del Peso-Santos y col., 2006) y el metabolismo del ácido fenilacético, genes *paa*, del cual existen dos regiones semejantes, *cluster paa1* y *paa2* (Alonso y col., 2003; Bartolomé-Martín y col., 2004; Bartolomé-Martín, 2006). Las enzimas codificadas por estos genes son capaces de metabolizar el estireno hasta intermediarios del ciclo de Krebs, pasando por ácido fenilacético.

En el análisis de secuencia de la región denominada *paa1* se detectó la presencia de 18 ORFs, todos identificados y correspondientes a genes *paa*: *paaF2*, *paaX*, *paaY*, *paaN2*, *paaA*, *paaB*, *paaC*, *paaD*, *paaE*, *paaF*, *paaG*, *paaH*, *paaI*, *paaJ*, *paaK*, *paaP*, *paaL* y *paaN* (Alonso y col., 2003; Bartolomé-Martín, 2006). Este conjunto de genes clonados y presentes en el plásmido pUFA, es capaz de dotar a mutantes de *P. putida* U y a *P. aeruginosa* EGSOX (que carece de genes *paa* en su genoma) de la capacidad de crecer utilizando AFA como única fuente de carbono y energía (Bartolomé-Martín, 2006).

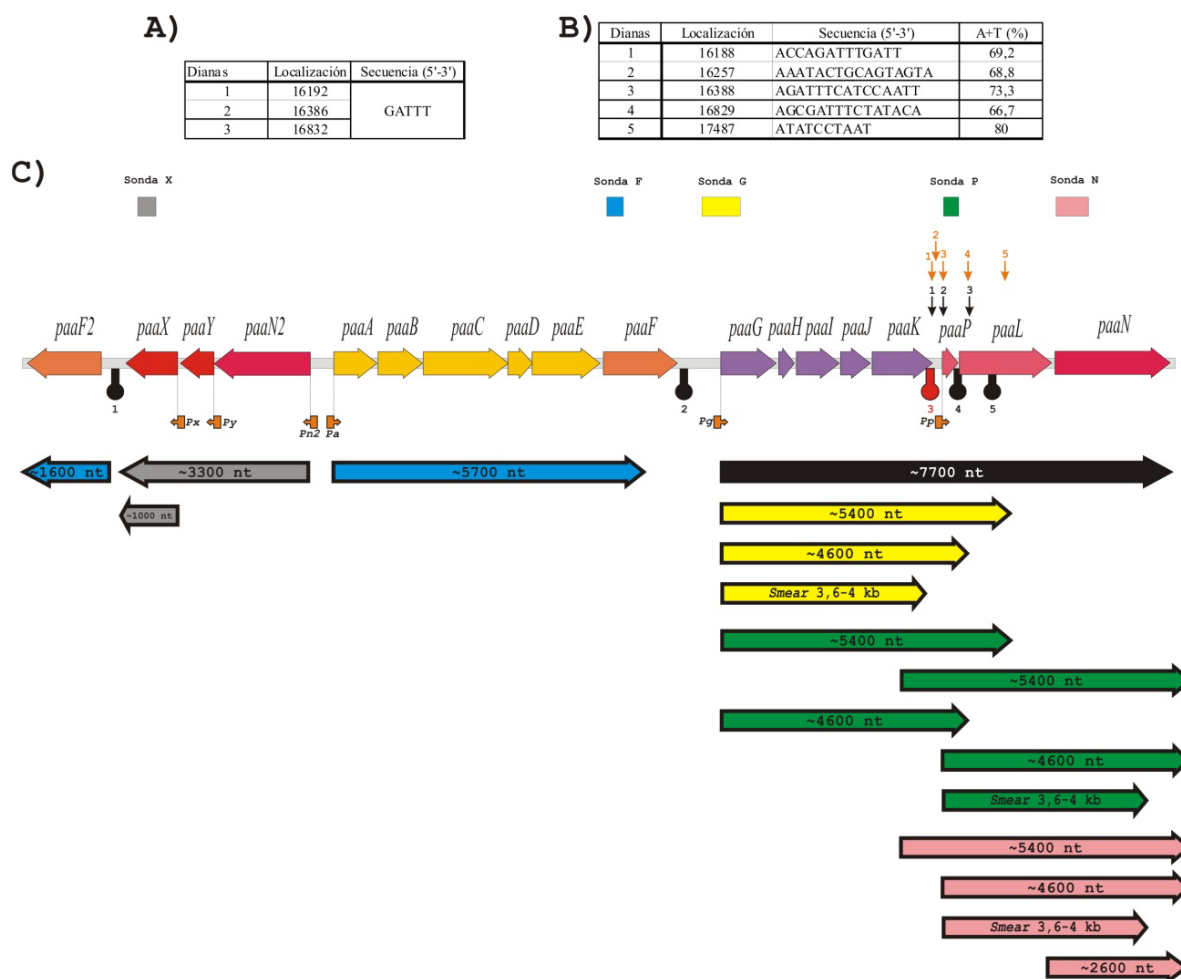
Por otro lado, el mutante *Pseudomonas* sp. Y2T2, derivado de *Pseudomonas* sp. Y2 por delección del *cluster paa2* completo, es capaz de crecer perfectamente en AFA (Bartolomé-Martín y col., 2004). El *cluster paa1*, por lo tanto, contiene un conjunto de genes que codifican la ruta catabólica del AFA.

La ordenación de los genes *paa1* de *Pseudomonas* sp. Y2 tiene una gran semejanza con la descrita para otras *Pseudomonas*, tal como *P. putida* KT2440 (Figura 2.7 del apartado Introducción) (Luengo y col., 2001; Jiménez y col., 2002; Nelson y col., 2002). Las principales diferencias que presenta el *cluster paa1* de *Pseudomonas* sp. Y2 respecto a *P. putida* KT2440 son la ausencia de un gen *paaM* y la presencia del gen *paaN2* entre los genes *paaY* y *paaA* y la del gen *paaF2* detrás del gen *paaX*.

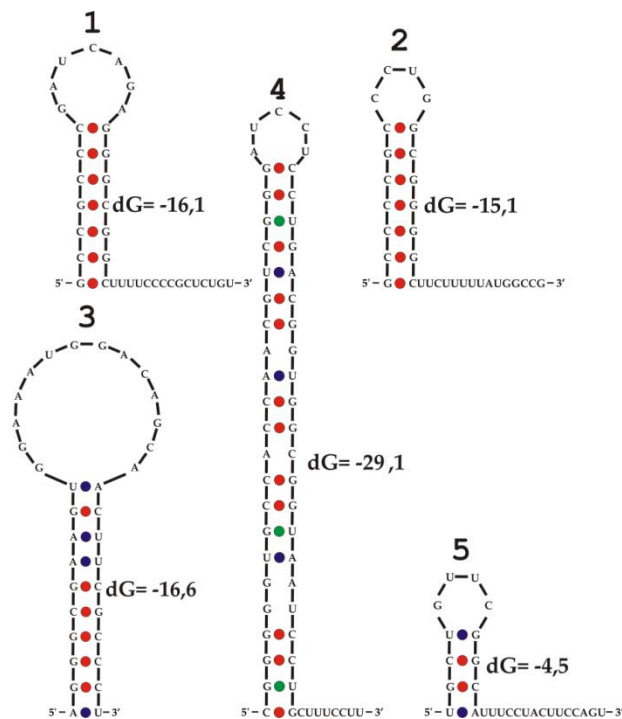
Una primera observación de la ordenación de los genes en este *cluster paa1* permite definir, al menos, dos grupos de operones, marcados por la posición divergente de estos genes. Un estudio más exhaustivo sobre las regiones intergénicas del *cluster paa1* permitió detectar la

presencia de determinadas secuencias que podrían ejercer funciones promotoras, que se propusieron como tales y que corresponden a las regiones anteriores a los genes *paaF2*, *paaX*, *paaN2*, *paaA*, *paaG* y *paaP*. Ese estudio también llevó a localizar secuencias que podrían funcionar como terminadores de la transcripción del tipo Rho-dependientes, detrás de los genes *paaX* y *paaF* (Alonso y col., 2003; Bartolomé-Martín y col., 2004; Bartolomé-Martín, 2006). Sobre la base de estos estudios *in silico*, se propuso la organización de los genes *paaI* en cuatro operones *paaN2YX*, *paaABCDEF*, *paaGHIJK* y *paaPLN*. Es importante resaltar que en las regiones anteriores a *paaA* y *paaG* se detectaron secuencias semejantes a los sitios de unión a DNA de la proteína reguladora PaaX, lo cual respalda la idea de la existencia de regiones promotoras en estas zonas (Figura 2.9 del apartado Introducción) (del Peso-Santos y col., 2006). Finalmente, se ha demostrado que la transcripción del gen *paaF2* está condicionada exclusivamente por la presencia de estireno en el medio, lo que ha llevado a considerarlo como un gen del *cluster sty*, y no del *cluster paaI* (Bartolomé-Martín, 2006; del Peso-Santos y col., 2008).

En este trabajo se ha tratado de profundizar en la definición de la organización del *cluster paaI* mediante la realización de experimentos de RT-PCR y *northern blot*, junto con ensayos de cuantificación de actividad  $\beta$ -galactosidasa generada a partir de regiones que pudieran actuar como promotores. Los resultados obtenidos de las RT-PCRs (Figura 5.4, del apartado 5.1.1.1. de Resultados) prueban la existencia de cotranscripción de ciertos genes y su ausencia entre *paaF2* y *paaX* sustentando una clara división del *cluster* en tres operones: *paaN2YX*, *paaABCDEF* y *paaGHIJKPLN* (Figura 6.1) y confirmando los estudios *in silico* realizados con anterioridad sobre esta región (Bartolomé-Martín, 2006). Por otro lado, este tipo de análisis experimental puede no revelar promotores alternativos, lo que podría explicar ciertas discrepancias entre los datos aquí aportados y los deducidos del estudio *in silico*. Es el caso del operón *paaN2YX*, donde podría darse la transcripción conjunta de los genes *paaN2*, *paaY* y *paaX* e, independientemente una expresión particular de *paaX* controlada por el promotor putativo detectado *in silico* delante de este gen (Bartolomé-Martín, 2006). Una situación semejante se da en el caso del operón *paaGHIJKPLN* y el posible promotor situado delante de *paaP* (detectado por secuencia).



**Figura 6.1. Esquema de la posible producción de transcritos a partir del cluster *paaI* de *Pseudomonas* sp. Y2.** **A).** Tabla en la que se indica la posición y secuencia localizada en el operón *paaGHIJKPLN* y que es afín a la secuencia consenso, ((G/A)AUU(A/T)), definida por Ehretsmann y col., 1992, reconocida por la RNasa E. Las dianas se corresponden con las flechas verticales negras del apartado C. **B).** Tabla en la que se indican regiones del operón *paaGHIJKPLN* ricas en A+T y que podrían ser dianas de RNasa E, (Lin-Chao y col., 1994; McDowall y col., 1994; Cohen y McDowall, 1997; Callaghan y col., 2005). Las dianas se corresponden con las flechas rojas verticales del apartado C. **C).** Detalle-resumen de los transcritos identificados mediante *northern blot*. Los rectángulos superiores muestran la localización y el tamaño de los fragmentos utilizados como sondas. Las flechas gruesas inferiores muestran el tamaño de los mensajeros observados en las autorradiografías; el código de colores corresponde a los mensajeros detectados con cada sonda. Las horquillas negras numeradas corresponden a terminadores Rho-independientes putativos detectados en la secuencia *paaI* (1, 2, 4 y 5), (Alonso y col., 2003; Bartolomé-Martín, 2006), mientras que la horquilla roja numerada, (3), es una repetición invertida que forma una horquilla de alta estabilidad que podría funcionar interrumpiendo la transcripción o protegiendo el extremo 3' del RNAm (ver estructuras detallada de las horquillas en Figura 6.2). Los cuadrados con flechas naranjas señalan indican la posición de los promotores detectados. La localización de las flechas coloreadas horizontales corresponde a los cistrones del cluster *paaI* que incluiría cada transcrito. Las flechas verticales pequeñas indican la localización de secuencias que podrían ser diana de endoribonucleasas (RNasa E) según la secuencia consenso determinada por (Ehretsmann y col., 1992), ((G/A)AUU(A/T)), de color negro, y secuencias ricas en A+T que podrían ser también diana de corte de RNasa E, (Lin-Chao y col., 1994; McDowall y col., 1994; Cohen y McDowall, 1997; Callaghan y col., 2005).



**Figura 6.2. E estructuras secundarias d el mRNA.** Estructura de los terminadores transcripcionales putativos determinados para el cluster *paa1*. Las estructuras 1, 2, 4 y 5 corresponden a las conformaciones de los terminadores Rho-independientes detectados downstream *paaX*, *paaF* y dentro de la región codificante de *paaP* y *paaL*, respectivamente. La estructura 3 corresponde a la conformación de una repetición invertida detectada en el extremo 3' del gen *paaK* y que podría funcionar como terminador de la transcripción a juzgar por los resultados de *northern blot*. dG: energía libre de la horquilla, en Kcal/mol, calculada por el programa mfold 3.1 (<http://www.bioinfo.rpi.edu/applications/mfold/cgi-bin/rna-form1.cgi>). Figura modificada de (Bartolomé-Martín, 2006). Los círculos rellenos entre bases en las horquillas indican puentes de hidrógeno; rojos 3 puentes de hidrógeno, azul 2 puentes de hidrógeno y verde un puente de hidrógeno. Datos obtenidos de (Alonso y col., 2003; Bartolomé-Martín, 2006).

El estudio de la transcripción de los genes *paa1* se complementó con la estimación del tamaño de los transcritos, tanto parciales como totales, mediante experimentos de *northern blot* utilizando diferentes sondas derivadas de genes *paa* (Tabla 4.6 del apartado Material y métodos y Figuras 5.7 y 5.8 del apartado 5.1.1.2 de Resultados). Este análisis del tamaño de mensajeros permitió detectar la presencia del transcrito correspondiente al operón *paaN2YX*, (Figura 5.9 del apartado 5.1.1.2 de Resultados), y la de un transcrito quizá correspondiente a *paaX* lo que demostraría la existencia de un promotor en la región anterior a dicho gen (Figura 6.1). Respecto al operón *paaABCDEF*, los experimentos de *northern blot* realizados con la sonda F detectaron el mensajero completo que se expresa a partir del promotor *Pa* (Figura 5.10 del apartado 5.1.1.2 de Resultados), así como el mensajero individual de *paaF2* (Figura 6.1) (debido a la gran identidad nucleotídica, un 95,2% existente entre la secuencia de la sonda utilizada, procedente de *paaF*, y la de este gen (Bartolomé-Martín y col., 2004)). Éste último mensajero sólo se detecta en cultivos crecidos en presencia de estireno (Figura 5.10 del apartado 5.1.1.2 de Resultados), en coincidencia con los resultados anteriores que demostraron que el gen *paaF2* solamente se expresa en presencia de estireno (del Peso-Santos y col., 2006; del Peso-Santos, 2008). Por el contrario, no se detectó el mensajero correspondiente al operón *paaA2B2C2D2E2F3* en cultivos de *Pseudomonas* sp. Y2 ó *Pseudomonas* sp. Y2K1 crecidos en AFA o STY debido a la menor semejanza existente entre la sonda utilizada y el gen *paaF3*. Los transcritos procedentes del operón *paaGHIJKPLN* se estudiaron con tres diferentes sondas (G, P y N). En ningún caso se pudo detectar un mensajero del operón completo (Figuras 5.11 a 5.13

del apartado 5.1.1.2 de Resultados). Los transcritos parciales mayoritariamente detectados en estos experimentos presentan tamaños que permiten asignarlos a las secuencias *paaGHIJKP*, *paaGHIJKPAL* (que incluiría parcialmente a *paaL*) y *paaPLN* (Figura 6.1). Con estos resultados no queda clara la continuidad del operón *paaGHIJKPLN*, ya que los resultados obtenidos por RT-PCR son compatibles con los transcritos detectados por *northern blot*, solamente confirman una cotranscripción entre genes contiguos o próximos pero no de todos los genes del *cluster* en un único mensajero. A favor de la existencia de un transcrito primario de unos 7,7 kb que incluiría el policistrón *paaGHIJKPLN* (Figura 6.1) está la descripción (pero no comprobación experimental) de grandes operones correspondientes a genes *paa* como son el *paaGHIJKABCDEF* (9,8 kb) en *E. coli* (Ferrández y col., 1998) y *paaABCDEFGHI* (8,8 kb) de *Azoarcus evansii* (Rost y col., 2002). Además, en estos experimentos de *northern blot*, también se detectó un mensajero que podría ser el resultado de la transcripción del gen *paaN*, aunque su presencia fue difícil de observar debido al solapamiento de esta banda con la del mensajero con el rRNA 23S (Figura 5.13 B del apartado 5.1.1.2 de Resultados). Este mensajero de unos 2600 nt sería fruto del procesamiento postranscripcional de transcritos más largos (Figura 6.1), debido a que experimentalmente no se ha detectado ningún promotor anterior a *paaN* (comunicación personal de Victoria Mascaraque Martín). Este procesamiento explicaría el predominio del mensajero *paaN* frente al mRNA de *paaPLN* y *paaAKPLN* observado con la sonda N (Figura 5.13 del apartado 5.1.1.2 de Resultados).

Los resultados anteriores podrían explicarse (Figuras 6.1 y 6.2) proponiendo que desde el promotor *Pg*, se iniciaría la transcripción del operón *paaGHIJKPLN* para producir un mRNA primario de unos 7,7 kb, que más tarde sería procesado por endoribonucleasas, (RNasa E, RNasa III), de forma muy rápida, de ahí que no sea detectado en ninguno de los *northern* ensayados. El mensajero primario quedaría dividido en fragmentos que contendrían a *paaN*, *paaGHIJK*, *paaPLN* y *paaAKPLN*, y que serían minoritarios, lo que hace pensar que la transcripción completa de este operón no es muy efectiva. En un proceso que no excluye al anterior, el promotor *Pg* conduciría a la expresión de unos mensajeros que serían prematuramente interrumpidos a causa de las estructuras secundarias que podrían funcionar como terminadores de la transcripción (Figuras 6.1 y 6.2) dando lugar a unos mensajeros de tamaño aproximado a 4,6 kb (conteniendo *paaGHIJKP*), 5,4 kb (conteniendo *paaGHIJKPAL*) y unos 4 kb (conteniendo *paaGHIJK*). Este último sería fruto minoritario (terminación con baja eficacia) de la transcripción interrumpida por la estructura secundaria formada por la repetición invertida localizada próxima al extremo 3' de la región codificante del gen *paaK* (Figuras 6.1 y 6.2), que podría funcionar como potencial terminador de la transcripción (Belasco y col., 1985; Newbury y col., 1987b; Belasco y Higgins, 1988; Chen y col., 1988; Faubladiet y col., 1990; Klug y Cohen, 1990; Eddy y col., 1991; McLaren y col., 1991; Murakawa y col., 1991; Regnier

y Hajnsdorf, 1991; Gamper y col., 1992), como estructura estabilizadora del mRNA y protectora frente a de la actividad exoribonucleasa 3'-5' (Higgins y col., 1982; Belasco y col., 1985; Wong y Chang, 1986; Newbury y col., 1987b; Belasco y Higgins, 1988; Chen y col., 1988; Faubladiet y col., 1990; Klug y Cohen, 1990; Chen y col., 1991; Eddy y col., 1991; McLaren y col., 1991; Murakawa y col., 1991; Regnier y Hajnsdorf, 1991; Gamper y col., 1992; Higgins y col., 1992; Liu y col., 1992; Petersen, 1992; Belasco y Brawerman, 1993; Higgins y col., 1993; Py y col., 1994; Cohen, 1995; Winteler y col., 1996; Richards y col., 2008), aunque también se ha demostrado que ciertas repeticiones invertidas pueden llegar a funcionar como potencial dianas de endoribonucleasas como por ejemplo la RNasa III (Dunn y Studier, 1973; Schmeissner y col., 1984; Portier y col., 1987; Bardwell y col., 1989; Homuth y col., 1997). A partir del promotor *Pp*, situado delante de *paaP*, se produciría el transcrito *paaPLN*, de 4,6kb (Figura 6.1). Cuando se usa la sonda P, este mRNA y sus posibles productos de degradación por exonucleasas estarían encubiertos por los mensajeros de *paaGHIJKP* y *paaGHIJKPAL*, transcritos mayoritarios, que tienen unos tamaños semejantes y de mayor intensidad. Con la sonda N fue posible la detección de un mensajero de 2,6 kb que contendría al mRNA del gen *paaN* exclusivamente, y que sería fruto del procesamiento de transcritos primarios mayores (*paaGHIJKPLN*, *paaΔKPLN* y *paaPLN*) (Figura 6.1). Por el momento no hay evidencia de la presencia en la secuencia flanqueante de *paaN* de señales para un procesamiento específico por endoribonucleasas, aunque es la opción más plausible tras la comprobación experimental de la inexistencia de un promotor delante *paaN*.

Los mensajeros mayoritarios producidos a partir del operón *paaGHIJKPLN* fueron *paaGHIJKP* y *paaGHIJKPAL*, observados en las autorradiografías donde se usaron las sondas G y P. Estos transcritos serían producto de la gran efectividad de las estructuras secundarias que funcionarían como terminadores Rho-independientes y se localizan detrás de *paaP* y en las región codificante, (Homuth y col., 1997), de los genes *paaK* y *paaL* (Figuras 6.1 y 6.2). La presencia mayoritaria de estos transcritos puede relacionarse con las previsibles necesidades de la célula. En presencia de AFA ó STY en el medio, la célula requiere proteínas catabólicas del AFA, entre ellas PaaG, PaaH, PaaI, paaJ y PaaK, elementos del complejo multicomponente AFA-CoA dioxigenasa/reductasa (Ferrández, 1998; Olivera y col., 1998; Mascaraque-Martín, 2009). Es lógico pensar que estas proteínas son requeridas en mayor cantidad que las proteínas PaaP y PaaL, quizá implicadas en el transporte del AFA al interior de la célula (Olivera y col., 1998). La proteína PaaN, que intervendría en la apertura del anillo aromático, (Ferrández y col., 1998; Olivera y col., 1998), se produciría a partir de un transcrito aislado fruto de un más que probable procesamiento postranscripcional. En procariotas, los genes suelen estar organizados en operones policistrónicos, para facilitar así la coordinación de su regulación. Sin embargo los productos de un mismo operón pueden ser requeridos en diferentes cantidades y uno de los

mecanismos utilizado por la bacteria para regular estos requerimientos es el procesamiento postranscripcional (Condon, 2003). Este tipo de regulación ha sido observado en otros microorganismos como *E. coli* (McCarthy y col., 1988; Patel y Dunn, 1995) y *Bacillus subtilis* (Homuth y col., 1997; Ludwig y col., 2001). Generalmente, el mRNA es altamente inestable y sufre efectivos procesos de degradación por la actividad de endoribonucleasas, exoribonucleasas y oligoribonucleasas (Belasco y Higgins, 1988; Petersen, 1992; Cannistraro y Kennell, 1993; Steege, 2000; Deutscher, 2006; Condon, 2007; Richards y col., 2008). La principal razón de este hecho es permitir un rápido control sobre el repertorio de proteínas sintetizadas, produciendo una pronta adaptación metabólica de las bacterias frente a cambios en el medio o en la fuente de energía y de carbono (Nilsson y col., 1984; Carpousis y col., 1999; Steege, 2000; Condon, 2007; Richards y col., 2008). Este efecto provoca la aparición del *smear* en las autorradiografías proveniente de la degradación de mRNA específicos.

Generalmente, las endoribonucleasas son las enzimas que actúan fragmentando los transcritos primarios y produciendo el llamado procesamiento postranscripcional. Entre todas las endoribonucleasas descritas, la RNasa E es la que realiza la mayor parte del procesamiento de RNA, así como la que activa el inicio de la degradación (decaimiento) de estas moléculas (Tomcsanyi y Apirion, 1985; Faubladiet y col., 1990; Mudd y col., 1990; Lin-Chao y Cohen, 1991; Mackie, 1991; Regnier y Hajnsdorf, 1991; Yarchuk y col., 1992; Gamper y Haas, 1993; Hajnsdorf y col., 1994; McDowall y col., 1994; Patel y Dunn, 1995; Winteler y col., 1996; Drider y col., 1999; Steege, 2000; Spickler y col., 2001; Kushner, 2002; Jiang y Belasco, 2004; Callaghan y col., 2005; Aiba, 2007; Celesnik y col., 2007; Lodato y Kaper, 2009). Inicialmente se propuso como consenso de la diana de la RNasa E de *E. coli* la secuencia de RNA (A/G)AUU(A/U) (Ehretsmann y col., 1992). Más tarde, se confirmó que dicha enzima no reconoce una secuencia determinada, sino que corta por secuencias de RNA generalmente ricas en A+U (Lin-Chao y col., 1994; McDowall y col., 1994; Cohen y McDowall, 1997; Callaghan y col., 2005). En el operón *paaGHIJKPLN*, se detectaron tres dianas compatibles con la secuencia consenso (G/A)AUU(A/U) reconocidas por RNasa E (Figura 6.1), así como otras cinco regiones, ricas en A+U, que podrían ser potenciales dianas de la enzima RNasa E (Lin-Chao y col., 1994; McDowall y col., 1994; Cohen y McDowall, 1997; Callaghan y col., 2005), que permitirían explicar los procesamientos de mRNA anteriormente propuestos y que serían compatible con los resultados obtenidos en los experimentos de *northern blot* sobre el operón *paaGHIJKPLN*.

Procesamientos como los aquí descritos para el caso del operón *paaGHIJKPLN*, se han observado y descritos en otros operones y microorganismos, como por ejemplo el operón *unc* de *E. coli* (Schaefer y col., 1989; Patel y Dunn, 1995), operón *pst* de *B. subtilis* (Allenby y col., 2004), operón *lac* en *E. coli* (Cannistraro y col., 1986; Cannistraro y Kennell, 1989; McCormick

y col., 1991; Murakawa y col., 1991), operón *mal* de *E. coli* (Newbury y col., 1987a), operón *arc* de *P. aeruginosa* (Gamper y col., 1992; Gamper y Haas, 1993; Winteler y col., 1996), operón *his* de *Salmonella typhimurium* (Alifano y col., 1992), operón *gal* de *E. coli* (Schumacher y Ehring, 1975), operón *ompA* de *E. coli* (Nilsson y col., 1984; Melefors y von Gabain, 1988; Lundberg y col., 1990), operón *puf* de *Rhodopseudomonas capsulatus* (Chen y col., 1988), operón *rpsU-dnaG-rpoD* de *E. coli* (Lupski y Godson, 1984), operón *spc* de *E. coli* (Mattheakis y Nomura, 1988), operón *atp* de *E. coli* (McCarthy y col., 1988), operón *LEE4* de *E. coli* (Lodato y Kaper, 2009), en el fago *F1* (Kokoska y Steege, 1998), el operón *fts* de *E. coli* (Cam y col., 1996; Tamura y col., 2006), y el operón *pap* de *E. coli* (Nilsson y Uhlin, 1991; Nilsson y col., 1996), entre otros.

En todos los experimentos de *northern blot* realizados y con todas las sondas utilizadas para este trabajo se observaron unas hibridaciones sospechosas de unos tamaños aproximados de 1500 nt y 2500 nt, las cuales parecían ser específicas, ya que sólo se mostraban en los casos en los que los genes *paa1* se estaban expresando, es decir, en las calles donde se cargó RNA de *Pseudomonas* sp. Y2 y *Pseudomonas* sp. Y2T2 crecidas en AFA o STY. Al comparar los geles de agarosa en condiciones desnaturalizantes previos con las membranas (Figura 5.6 del apartado 5.1.1.2. de Resultados) y con las autorradiografías (Figuras 5.9 a 5.13 del apartado 5.1.1.2. de Resultados), se comprobó que las bandas de migración de los rRNA 16S y 23S se correspondían con las hibridaciones de 1500 y 2500 nt, respectivamente. Estas bandas podrían corresponder a agregados de rRNA con mRNA naciente o fragmentos de la degradación de éste último, que permitiría la hibridación de las sondas utilizadas con estos mRNA específicos (Willison y col., 1993; Homuth y col., 1997; Allenby y col., 2004). Además, estas hibridaciones podrían haber enmascarado a mensajeros parciales coincidentes en tamaño con los rRNA que no pudieron ser detectados, así como dificultar la detección de mensajeros próximos a esos tamaños como el transcrito de *paaF2* (Figura 5.10 del apartado 5.1.1.2. de Resultados) y *paaN* (Figura 5.13 del apartado 5.1.1.2. de Resultados).

## 6.2. Promotores de la región *paa1* de *Pseudomonas* sp. Y2.

La cuantificación de la actividad  $\beta$ -galactosidasa generada por las regiones anteriores a algunos genes del *cluster paa1* de *Pseudomonas* sp. Y2, clonadas delante de un gen testigo y transformadas en *E. coli* AF141 (ver apartado 5.2 de Resultados) evidenció la presencia de promotores que activados que dirigen la expresión de los genes *paa1*. La posición de estos promotores en el *cluster paa1* guarda cierta semejanza con los promotores detectados en el

mismo *cluster* de *P. putida* U (Olivera y col., 1998; García y col., 1999; García y col., 2000), con la salvedad, obvia, del promotor *Pn2*, ya que esta bacteria carece de gen *paaN2*.

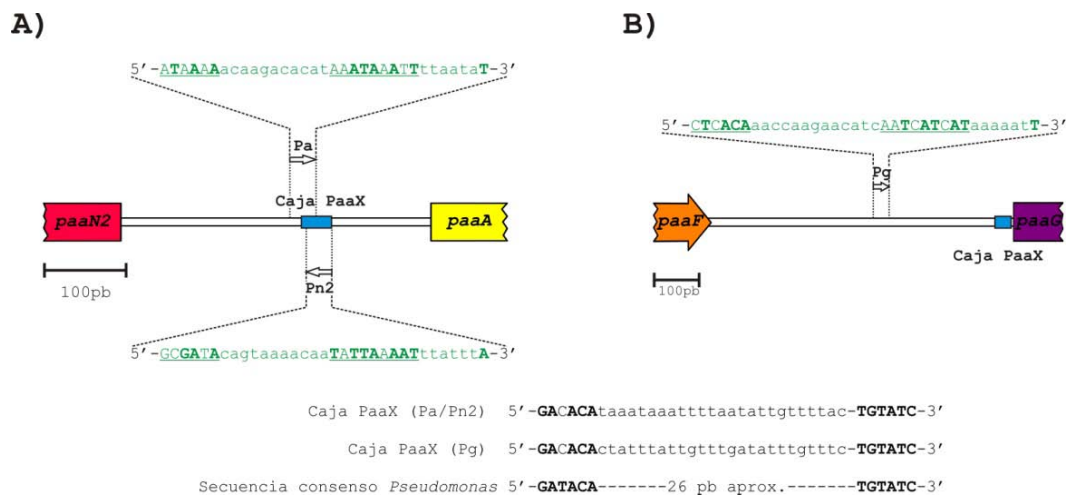
Análisis realizados con anterioridad (Bartolomé-Martín, 2006) mostraron el alto grado de conservación que existe entre el promotor putativo propuesto delante de *paaX* en *Pseudomonas* sp. Y2 y la secuencia en la misma posición en *P. putida* U, en la cual se ha sugerido la existencia de un promotor (García y col., 2000). El parecido se encuentra principalmente en la zona circundante a la caja -10 del promotor. También se ha detectado que esta zona está muy conservada en el caso de *P. putida* KT2440 y en el *cluster paa2* de *Pseudomonas* sp. Y2. En la región intergénica entre *paaN2* y *paaA*, donde se localizaban los promotores putativos de los genes *paaN2* y *paaA*, se observó una secuencia muy similar a la presente en el *cluster paa2* y en las regiones *paa* de *P. putida* KT2440 y *P. putida* U, especialmente en la zona correspondiente a la caja de unión de PaaX (Bartolomé-Martín, 2006; del Peso-Santos y col., 2006). En cuanto a la región intergénica entre *paaF* y *paaG*, donde se situó el promotor putativo de *paaG*, se ha localizado un posible sitio de unión de PaaX. Una secuencia muy similar a esta zona aparece también en *P. putida* KT2440 y *P. putida* U, así como en la región intergénica entre *PY03* y *paaG2* del *cluster paa2* (Bartolomé-Martín, 2006; del Peso-Santos y col., 2006). Por último, delante de *paaP*, zona en la que se localizó un promotor putativo en los análisis *in silico*, se ha observado una secuencia semejante a la de esta misma región del *cluster paa2*, más acusado en los alrededores de la caja -10. Una secuencia parecida en la misma región intergénica existe en los *clusters paa* de *P. putida* U y *P. putida* KT2440 (Bartolomé-Martín, 2006; del Peso-Santos y col., 2006).

Todos los fragmentos de DNA de *Pseudomonas* sp. Y2 que han dado positivo en el ensayo de la actividad  $\beta$ -galactosidasa en *E. coli* AF141 (Figura 5.21 del apartado 5.2 de Resultados) portan las secuencias promotoras detectadas *in silico* en estudios anteriores (Figura 5.15 a 5.20 del apartado 5.2 de Resultados) (Alonso y col., 2003; Bartolomé-Martín, 2006), excepto el fragmento situado delante del gen *paaY*, en el que no se detectó ningún promotor putativo. Sin embargo, esta región generó una actividad  $\beta$ -galactosidasa significativamente mayor a la producida por el plásmido control (Figura 5.21 del apartado 5.2 de Resultados), confirmando la existencia de un promotor en dicha región. Así, los promotores propuestos tras el análisis de secuencia (Bartolomé-Martín, 2006) coinciden con los confirmados ahora de forma experimental, lo que nos lleva a proponerlos como promotores reales de los genes *paa1* de *Pseudomonas* sp. Y2.

### 6.2.1. Actividad de las regiones promotoras de *paa1* de *Pseudomonas* sp. Y2 en *E. coli*.

El estudio de la actividad promotora de las regiones de *Pseudomonas* sp. Y2 clonadas delante del gen *lacZ* en *E. coli* mostró que el promotor *Pg* es el más potente en las circunstancias del ensayo. La actividad de *Pa* resultó ser bastante menor (entre 4 y 8 veces) lo que sugiere un desajuste de estas regiones, lo que podría deberse al hecho de actuar en un entorno celular heterólogo. Es interesante la detección de promotores anteriores a los genes *paaX*, y *paaY*, en lo que parece una alternativa a su expresión a partir del promotor *Pn2*. Esto abre la posibilidad de una regulación diferente para la expresión de los genes *paaN2*, *paaY* y *paaX*. De forma que el promotor *Pn2* dirigiera la transcripción del operón *paaN2YX*, en un proceso regulado por la acción de la proteína PaaX y su unión a la región operadora en el promotor *Pn2* y alternativamente pudiera existir una expresión constitutiva de los genes *paaX* y *paaY*.

En la región del operón *paaGHIJKPLN* se detectó la presencia de dos promotores activos, el *Pg*, que contiene la región operadora de PaaX (Bartolomé-Martín, 2006; del Peso-Santos y col., 2006) (Figura 6.3 B) y que dirigiría la expresión de todo el operón, y el *Pp*, delante del gen *paaP*, que podría dirigir la transcripción, de forma alternativa, de los genes *paaP*, *paaL* y *paaN*.



**Figura 6.3. Región intergénica *paaN2-paaA* (A) y *paaF-paaG* (B).** A) Esquema de la localización de los promotores de *Pa* y *Pn2* así como sus secuencias promotoras putativas en color verde: la base correspondiente al punto +1 aparece en negrita, mayúscula y en tamaño de fuente mayor. Las cajas -35 y -10 están en mayúsculas y subrayadas, y se han señalado en negrita las bases coincidentes con las cajas consenso -35 (TTGACA) y -10 extendida (TGNTATAAT) (Bartolomé-Martín, 2006). Se muestra con rectángulo azul la posición de la caja PaaX. En mayúsculas aparecen las repeticiones invertidas de la secuencia consenso. En negrita las bases coincidentes con la secuencia consenso. Secuencia consenso de *Pseudomonas*, repeticiones invertidas de 6 pb, (del Peso-Santos y col., 2006). B) Esquema de la localización del promotor *Pg*, así como su secuencia promotora putativa en color verde: la base correspondiente al punto +1 aparece en negrita, mayúscula y en tamaño de fuente mayor. Las cajas -35 y -10 están en mayúsculas y subrayadas, y se han señalado en negrita las bases coincidentes con las cajas consenso -35 (TTGACA) y -10 extendida (TGNTATAAT) (Bartolomé-Martín, 2006). El rectángulo azul indica la localización de la caja PaaX. En mayúsculas aparecen las repeticiones invertidas de la secuencia consenso. En negrita las bases coincidentes con la secuencia consenso. Secuencia consenso de *Pseudomonas*, repeticiones invertidas de 6 pb, (del Peso-Santos y col., 2006).

### 6.2.2. Actividad de las regiones promotoras de *paa1* en *Pseudomonas* sp. Y2T2.

Los plásmidos utilizados para el ensayo de actividad de promotores en *E. coli* AF141 (apartado 5.2 de Resultados), también fueron introducidos en la estirpe *Pseudomonas* sp. Y2T2 (apartado 5.4.2.1.6 de Resultados) para determinar de forma más precisa la actividad de estos promotores en su célula origen. Un primer resultado a resaltar es la actividad mostrada por los promotores *Px* y *Pn2*, que parece ser constitutiva. El hecho de que el promotor *Pn2* muestre una actividad no inducible, a pesar de la presencia de una secuencia de unión a PaaX en la región que lo antecede, hace pensar que tal operador puede ser tan sólo activo, para controlar la transcripción del operón *paaABCDEF*, cuyo promotor *Pa* se encuentra también en la región intergénica *paaN2-paaA* (Figura 6.3 A). Así la actividad de los promotores *Px* y *Py*, de un nivel medio, como la de *Pn2*, no aumenta en presencia de AFA (incluso se reduce en el caso de *Py*). Estos datos muestran un comportamiento muy particular de los promotores que dirigen la transcripción de los genes *paaN2YX*. El promotor *Pa* controla la expresión del operón *paaABCDEF* y resultó ser el más potente en estos ensayos de actividad (25 veces superior a la actividad de *Pn2*). Este promotor mostró una amplia expresión basal en ausencia de AFA, lo que permitiría una rápida respuesta de activación del metabolismo del AFA ante la presencia de este compuesto en el medio. El promotor *Pa* es inducible y presentó un fuerte aumento de la actividad ante la presencia de AFA en el medio, lo que se explica por la presencia en la región operadora de una secuencia de unión de PaaX (Figura 6.3 A). El promotor *Pp* resultó ser el promotor más débil entre los ensayados y mostró un patrón inducible por la presencia de AFA, a pesar de que no se ha detectado ninguna caja de unión de PaaX en su secuencia. La baja actividad de este promotor podría ser importante para colaborar a la expresión de los genes que controla, especialmente *paaN*.

Finalmente, el promotor *Pg*, que había manifestado la máxima actividad en los ensayos en *E. coli* (apartado 5.2 de Resultados), muestra una actividad casi nula cuando el sistema testigo de  $\beta$ -galactosidasa actúa en la propia célula de *Pseudomonas* sp. Y2. Este resultado, totalmente imprevisto, podría ser explicado sobre la base de la peculiar estructura de la región intergénica *paaF-paaG*.

Entre estos genes existe una región de 732 pb que contiene el terminador transcripcional Rho-independiente detrás de *paaF*, el promotor de *paaG*, la secuencia operadora de unión del represor PaaX y una zona rica en secuencias repetidas, algunas con repeticiones invertidas. Ninguna de ellas es similar a la secuencia REP consenso de 35 pb definida para *P. putida* KT2440 (Aranda-Olmedo y col., 2002), pero la mayor de estas repeticiones encontradas en

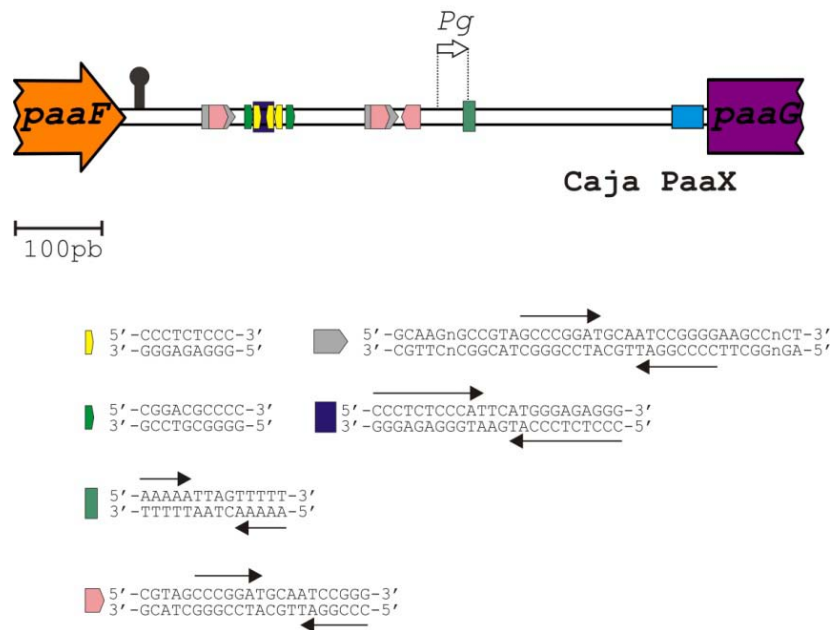
*Pseudomonas* sp. Y2 tiene una estructura equivalente, con 39 pb y un motivo palindrómico central:

Consenso REP (*P. putida* KT2440) 5' -ccggcctcTTCGCGGGtaaaCCCGCtCCtaCaggg-3'

Repetición larga (*Pseudomonas* sp. Y2) 5' -GCAAGnGCCGTAGCCCGGATGCAATCCGGGAAGCCnCT-3'

(Se muestran subrayadas las bases que forman el palíndromo en cada caso. En el caso del consenso REP de *P. putida* KT2440, en minúsculas se muestra las bases que aparecen en esa posición en el 50% de las secuencias, y en minúsculas las bases conservadas en el 90% de las secuencias (Aranda-Olmedo y col., 2002))

Esta secuencia de 39 pb se repite dos veces en forma directa, mientras que el motivo palindrómico central aparece una vez más, pero invertido (Figura 6.4).



**Figura 6.4. Región intergénica *paaF-paaG*.** Esquema de la localización del promotor *Pg* (flecha vacía), terminador transcripcional Rho-independiente (horquilla de color negro), la probable secuencia de unión del represor PaaX (rectángulo azul) (ver secuencia en Figura 6.3) y las repeticiones encontradas en la región intergénica *paaF-paaG*. Fuente (Alonso y col., 2003; Bartolomé-Martín, 2006).

Existe un gran número de estudios sobre las secuencias REP y sus posibles funciones entre las que están la atenuación y/o terminación de la transcripción (Rho-independientes) (Espeli y col., 2001; Manzanera y col., 2001), la estabilización de los mRNA (Newbury y col., 1987a; Newbury y col., 1987b; Stern y col., 1988; Khemici y Carpousis, 2004), la organización del cromosoma, inserción de elementos genéticos y reordenamientos del DNA por transposición

y/o recombinación (Kumagai y Ikeda, 1991; Clement y col., 1999; Wilde y col., 2001; Choi y col., 2003; Wilde y col., 2003), y la de unión para proteínas como IHF (Boccard y Prentki, 1993; Oppenheim y col., 1993; Engelhorn y col., 1995), DNA polimerasa I (Gilson y col., 1990) y DNA girasa (Yang y Ames, 1988; Espeli y Boccard, 1997). Por todo ello estas regiones REP han sido sugeridas como encargadas de la matización de la expresión génica (Tobes y Pareja, 2005).

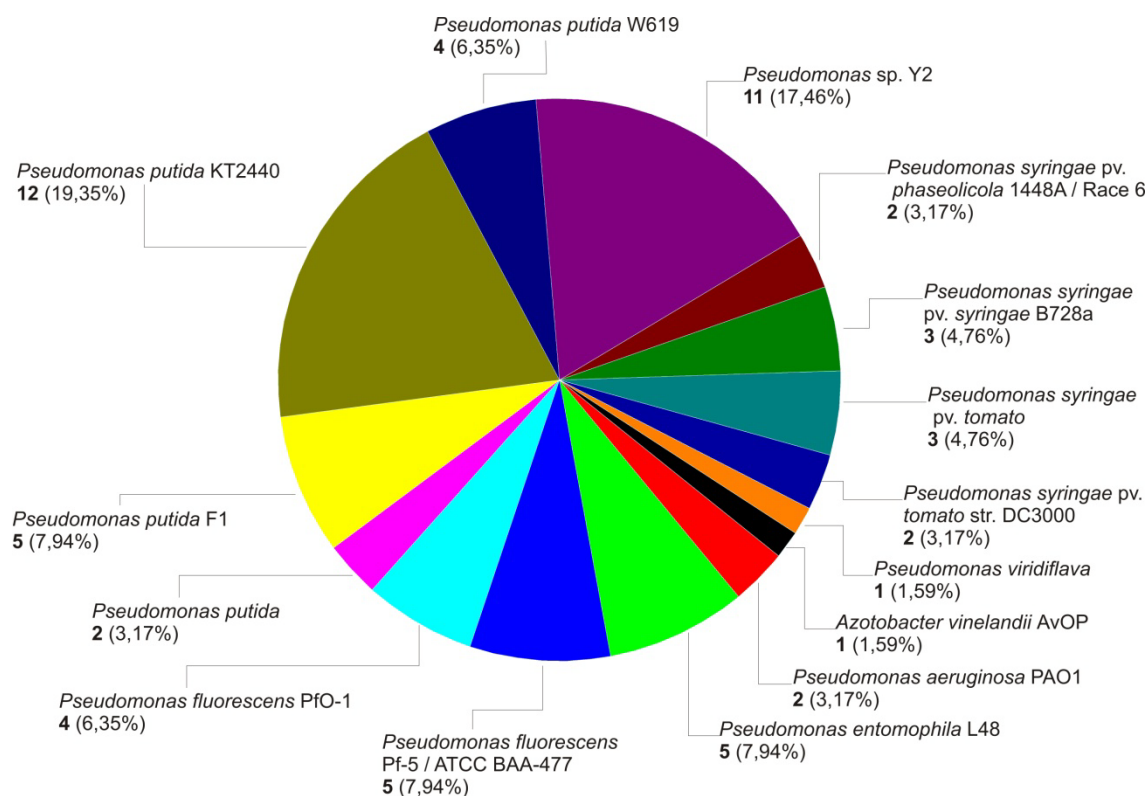
En el caso de *Pseudomonas* sp. Y2, algunas de las secuencias repetidas que se acumulan tras el gen *paaF* (Alonso y col., 2003; Bartolomé-Martín, 2006), podrían tener la función de estabilizar el mRNA con *paaF* y protegerlo frente a la degradación por ribonucleasas. Este cistrón es el último en el transcrito *paaABCDEF* y, por lo tanto, el más susceptible de ser degradado por exoribonucleasas 3'-5'. Las posibles estructuras secundarias que adoptarían estas repeticiones protegerían y aumentarían la vida media del transcrito con *paaF* en su extremo 3'. En el *cluster paa2*, tras *paaF3*, también se han encontrado secuencias análogas a las anteriores (Bartolomé-Martín y col., 2004; Bartolomé-Martín, 2006).

Por otro lado las secuencias detectadas en esta región intergénica *paaF-paaG*, podrían funcionar como diana de unión de determinadas proteínas que controlan directa o indirectamente la expresión de los genes que se encuentran detrás. Una proteína candidata podría ser la DNA girasa (Yang y Ames, 1988; Espeli y Boccard, 1997), cuya unión al DNA podría modificar el superenrollamiento de esta región y controlar positiva o negativamente la expresión de los genes *paaGHIJKPLN*. La incorporación de la región intergénica *paaF-paaG* en el plásmido pMPg, podría hacer que el superenrollamiento causado por la DNA girasa afectase negativamente a la expresión del promotor *Pg*. Las secuencias REP parecen ser especie-específicas (Tobes y Pareja, 2005), de forma que la unión de determinadas proteínas, en este caso de DNA girasa, se daría en *Pseudomonas* sp. Y2, provocando el efecto observado, y no en *E. coli*.

### **6.3. Proteoma parcial de *Pseudomonas* sp. Y2 y expresión de proteínas Paa.**

El genoma de *Pseudomonas* sp. Y2 no está secuenciado; en las bases de datos solamente se encuentran depositadas las regiones génicas que incluyen los genes *sty*, *paa1* y *paa2*, que codifican a las enzimas de la ruta del catabolismo del STY y del AFA, respectivamente, (Velasco y col., 1998; Alonso y col., 2003; Bartolomé-Martín y col., 2004). Por lo tanto, a la hora de la identificación de las proteínas presentes en las manchas electroforéticas seleccionadas

hubo que hacer uso de los datos incluidos dentro del grupo de  $\gamma$ -Proteobacterias en la base de datos NCBIInr. Son muchas las especies de *Pseudomonas* cuyos genomas ya han sido secuenciados en su totalidad, entre ellas: *P. putida* KT2440 (Nelson y col., 2002), *P. syringae* pv tomato str. DC3000 (Buell y col., 2003), *P. fluorescens* Pf-5 (Paulsen y col., 2005), *P. syringae* pv *syringae* B728a (Feil y col., 2005), *P. entomophila* L48 (Vodovar y col., 2006), *P. stutzeri* A1501 (Yan y col., 2008), *P. putida* F1 (<http://www.jgi.doe.gov> , 2007), *P. putida* GB-1 (<http://www.jgi.doe.gov> , 2008) y *P. putida* W619 (<http://www.jgi.doe.gov> , 2008), entre otras. El uso de esta gran cantidad de datos permite un alto rendimiento en el análisis de proteomas y en la identificación de proteínas de microorganismos basándose en la homología entre los organismos que pertenecen a una especie o género próximamente relacionados (Cao y Loh, 2008), tal y como se ha hecho en el caso de *Pseudomonas* sp. Y2 (Ver Tablas I y II del Apéndice). La gran mayoría de las proteínas de Y2 identificadas coinciden con proteínas de *P. putida* KT2440 (19,35%; Figura 6.5). Este dato, junto con los obtenidos de la secuencia que codifica el RNA ribosómico 16S (Alonso, 2002), la gran identidad nucleotídica que determinadas regiones génicas secuenciadas de *Pseudomonas* sp. Y2 presenta con sus homólogas del cromosoma de *P. putida* KT2440 y la gran semejanza en la disposición de los genes correspondientes (del Peso-Santos, 2004) (ver Figura 2.7 del apartado Introducción), demuestra el gran parentesco que existe entre *Pseudomonas* sp. Y2 y *P. putida* KT2440.

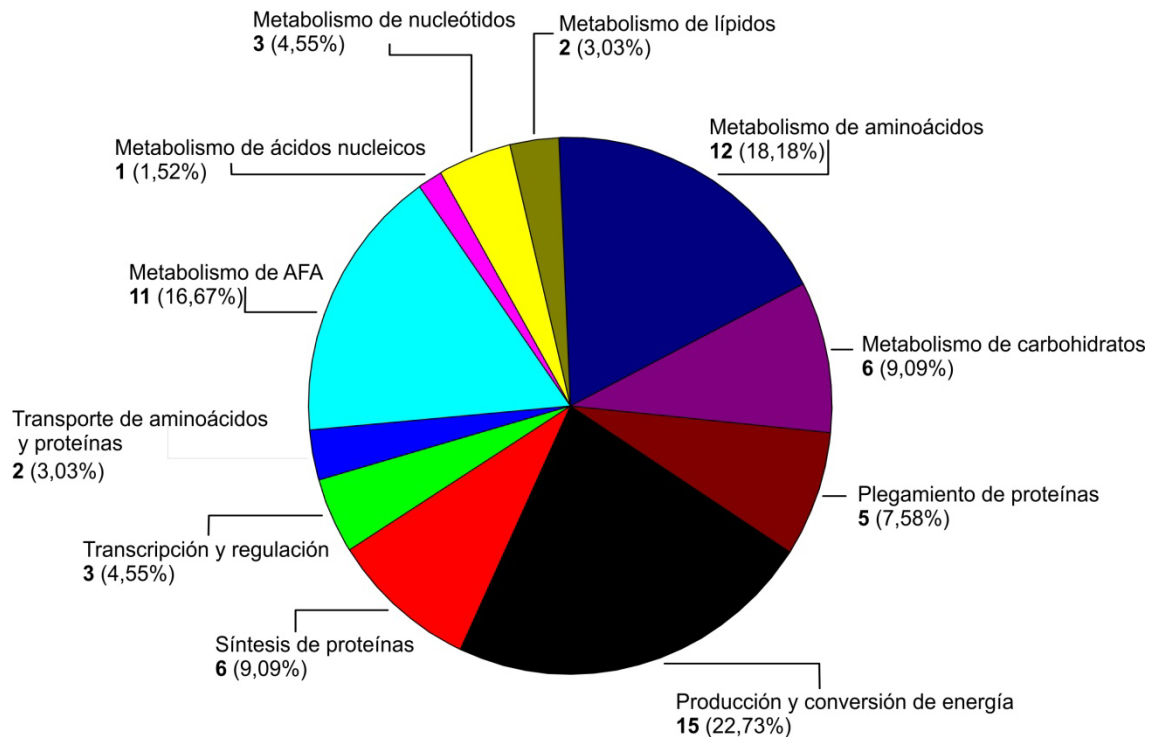


**Figura 6.5. Diagrama de sectores con las especies en las que se han identificado proteínas homólogas de *Pseudomonas sp.* Y2.** Diagrama resumen de especies en las que se han identificado proteínas homólogas de *Pseudomonas sp.* Y2 en la base de datos de referencia, NCBIInr. El número en negrita que sigue a la especie corresponde al número de proteínas identificadas en esa especie, entre paréntesis el porcentaje que constituyen las proteínas identificadas en esa especie con respecto al total de proteínas identificadas en otras especies.

Las proteínas identificadas en los geles 2-DE (Figuras y Tablas del Apéndice) fueron agrupadas de acuerdo a su actividad y al proceso biológico en el que intervienen (ver Tabla I y II del Apéndice). Estas agrupaciones se realizaron utilizando la base de datos SWISS-PROT ([www.expasy.org](http://www.expasy.org)), siguiendo la clasificación GO (*Gene Ontology*). Un resumen de estas agrupaciones se puede observar en las Figuras 6.6 y 6.7. Cabe remarcar que se han identificado muy pocas proteínas cuya localización sea la membrana, debido, muy probablemente, a que no se han utilizado detergentes especiales en la preparación de la muestra proteica y a que el análisis electroforético se realizó siempre sobre la fracción soluble de los extractos de proteína.

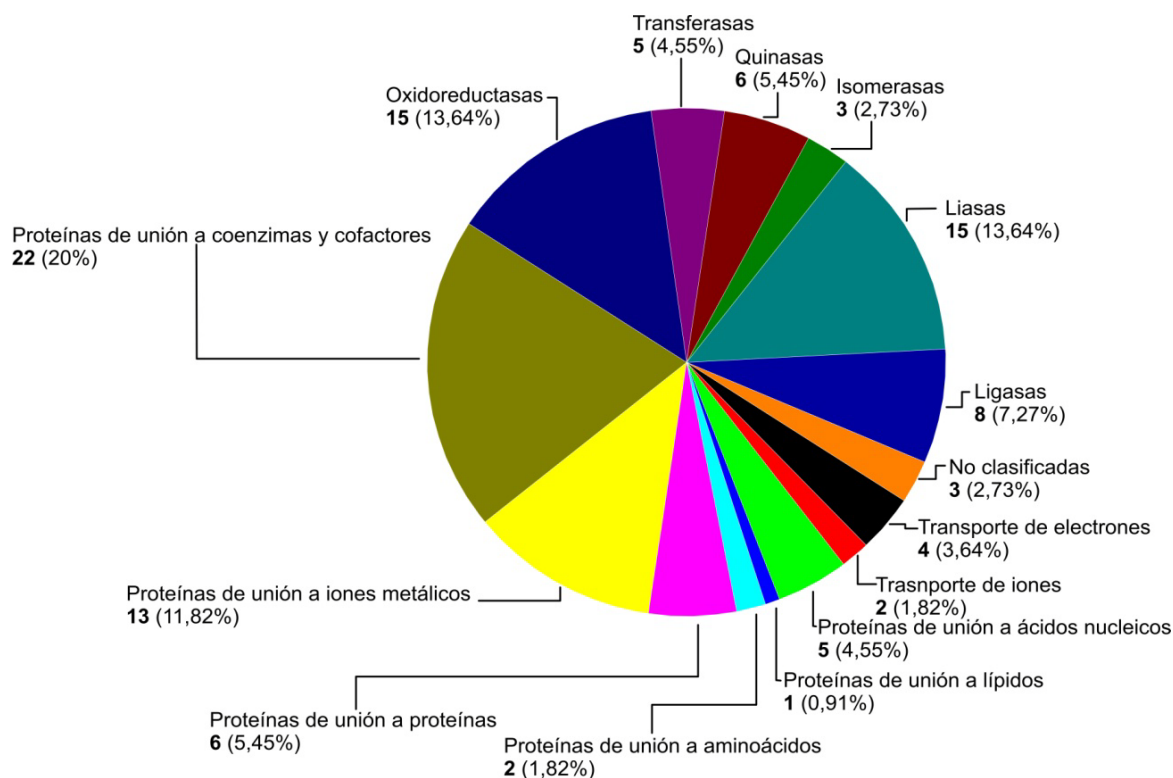
Como en la mayoría de los proteomas de microorganismos estudiados hasta el momento, la mayor parte de las proteínas identificadas en *Pseudomonas sp.* Y2, corresponde al grupo funcional de producción y conversión de energía, seguido de las proteínas implicadas en el metabolismo de aminoácidos y, en nuestro caso concreto, en el metabolismo del AFA (Figura 6.6). Estos resultados son coherentes con el hecho de que este estudio parcial del proteoma se realizó con células recogidas en plena fase exponencial ( $DO_{600nm}$  entorno a 0,6-0,7), fase de crecimiento máximo en la que se requieren grandes dosis de energía para prosperar, utilización de los nutrientes del medio para la construcción de proteínas estructurales y enzimas que

permitan la adaptación, el mantenimiento y el crecimiento bacterianos. Debido a las condiciones en las que se ha estudiado el proteoma de *Pseudomonas* sp. Y2 (en presencia de AFA, como única fuente de carbono y energía en medio mínimo M9) se ha logrado la identificación de 11 proteínas correspondientes a los *cluster paa1* (PaaB, PaaC, PaaF, PaaI, PaaK, PaaN y PaaN2) (ver tabla I y II del apartado Apéndice) y *paa2* (PaaC2, PaaE2, PaaF3 y PaaN3) (ver tabla I y II del apartado Apéndice), implicadas en el catabolismo específico del AFA, y cuya identificación se realizó sobre la propia base de datos de proteínas publicadas de *Pseudomonas* sp. Y2.



**Figura 6.6. Diagrama de sectores de la clasificación funcional de las proteínas identificadas.** Las proteínas identificadas se clasificaron de acuerdo a la actividad funcional que realizan en la célula (clasificación G.O.). En negrita aparecen las proteínas identificadas correspondientes a cada grupo. Entre paréntesis el porcentaje que constituyen esas proteínas con respecto a todas las identificadas.

Respecto a la actividad de las proteínas identificadas (Figura 6.7), existe un claro predominio de las proteínas de unión a coenzimas y cofactores (vitaminas, ATP, FAD, NAD(P), etc.), seguido de las liasas y de las oxidoreductasas. También son numerosas las proteínas de unión a iones metálicos, proteínas que con mucha frecuencia intervienen en procesos de producción de energía y de síntesis.



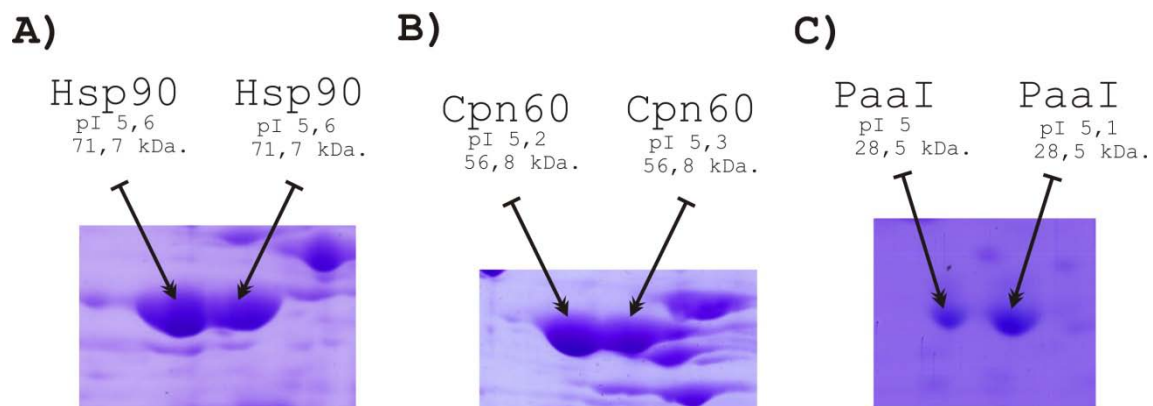
**Figura 6.7. Diagrama de sectores de clasificación según la actividad de las proteínas identificadas.** Las proteínas identificadas se clasificaron de acuerdo a la función molecular que realizan (clasificación G.O.). En negrita aparecen las proteínas identificadas correspondientes a cada grupo. Entre paréntesis el porcentaje que constituyen esas proteínas con respecto a todas las identificadas.

### 6.3.1. Detección de isoformas.

En los resultados de la Tabla I y II del Apéndice, respecto al PM y pI teóricos y experimentales de las proteínas identificadas, observamos unas leves diferencias, en unos casos, y en otros diferencias más abultadas, aunque ninguna desorbitada. Estas variaciones entre datos teóricos y experimentales son debidos, entre otras causas, al error de medida experimental, procesamientos postraduccionales o bien a proteólisis en el caso de observar PM inferiores a los teóricos, a uniones covalentes de grupos químicos en los casos de observar unos PM mayores a los establecidos como teóricos. Todos estos cambios o procesamientos que sufren las proteínas también afectan a la variación del pI experimental respecto al teórico.

Entre las proteína identificadas (ver Tablas I y II del apartado Apéndice) podemos observar ciertas variaciones entre los datos de PM y pI teóricos y los experimentales. Estas variaciones son consecuencia del error cometido en la determinación experimental de éstos y a que los datos teóricos no tienen en cuenta las modificaciones postraduccionales que muchas proteínas sufren durante su maduración: uniones covalentes de elementos o grupos orgánicos (fosforilación, glicosidación, metilación, nitrosilación, oxidación), proteólisis, etc. (Ahmed y Rice, 2005; Meinnel y Giglione, 2008). Estas modificaciones producen variaciones de PM y pI

entre datos teóricos y experimentales. Hay ocasiones en las que es posible detectar una misma proteína con diferentes características de PM y pI, incluso en el mismo gel, a las diferentes manchas se les llaman isoformas de una proteína. En este estudio se ha podido detectar este efecto para el caso de las proteínas HtpG, GroEL, PaaI (Figura 6.9), EF-Tu, AceA y FumA. En el caso de las isoformas de FumA, correspondientes a las manchas LPY5, LPpX18 y PdX2 (Tablas I y II del Apéndice), identificadas como fumarato hidratasa putativas (*fumA*). Las manchas LPpX18 y PdX2 son la misma mancha, pero en la identificación se hace referencia a proteínas homólogas de diferentes especies (sobre el genoma de *P. syringae* pv. *phaseolicola* 1448A y *P. putida* W619, respectivamente), mientras que LPY5 (identificada como homóloga sobre el genoma de *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* B728a) corresponde a una isoforma con un PM menor y un pI mayor al de las anteriores fumarato hidratasa consecuencia de modificaciones postraduccionales o bien se trataría de una proteína homóloga pero no la misma. Lo mismo ocurrió para el caso de las proteínas EF-Tu (Tuf1 y TufA), que no queda claro si son isoformas o bien proteínas homólogas identificadas sobre genomas de dos *Pseudomonas* diferentes (Tablas I y II del Apéndice). Con las proteínas HtpG, GroEL y PaaI queda claro que estamos frente a isoformas debido a que éstas aparecen en el mismo gel 2-DE (Figura 6.8). Existen otros estudios publicados en los que se ha observado diferentes isoformas de las proteínas GroEL y EF-Tu (De Bruyn y col., 2000; Wasinger y col., 2000; Heim y col., 2003). Para el caso de la proteína GroEL se ha demostrado que el cambio en el pI que provoca la aparición de varias manchas, correspondientes a esta proteína, con una despreciable variación en el PM puede ser provocado por la unión de lípidos y/o fosforilación (De Bruyn y col., 2000; Navarro, 2005).



**Figura 6.8. Isoformas.** Detalle de geles 2-DE donde se aprecian isoformas de las proteínas Hsp90 (HtpG) (A), Cpn60 (GroEL) (B) y PaaI (C). Se muestran las dos isoformas de cada proteína señaladas con flechas y los datos relativos de peso molecular y punto isoeléctrico de cada isoforma.

### 6.3.2. Proteínas de *Pseudomonas* sp. Y2 identificadas.

Existen tres tipos de respuestas generalizadas frente a medios contaminados con compuestos tóxicos del tipo de los hidrocarburos aromáticos. Éstas son: 1) Programa metabólico: expresión de conjuntos de genes para el catabolismo y anabolismo de nutrientes e intermediarios; 2) Programa de respuesta al estrés: adaptación al crecimiento en condiciones subóptimas; y 3) Programa morfológico: relacionado con la forma celular, transporte y superficie química de la célula. Estos tres programas están muy conectados y su función determina la supervivencia de la población (Dominguez-Cuevas y col., 2006). Cuando *Pseudomonas* sp. Y2 creció en medio mínimo con AFA, se observó la activación de estos tres programas.

Dentro del programa metabólico se incluyen tanto las enzimas propias de la degradación del AFA (proteínas Paa) como aquellas implicadas en la síntesis de aminoácidos, en la producción de energía (ciclo de Krebs, ciclo del glioxilato, glicólisis y gluconeogénesis), o en la síntesis de purinas. En el programa de respuesta al estrés se incluyen chaperonas y proteínas de plegamiento, así como reguladores de la transcripción, factores de elongación, etc. Del programa morfológico sólo se han detectado proteínas de síntesis de ácidos grasos y un transportador.

#### 6.3.2.1. Expresión de proteínas de respuesta a estrés.

Entre las proteínas de *Pseudomonas* sp. Y2 identificadas en este trabajo, se incluyen varias relacionadas con el denominado programa de respuesta al estrés, tales como GroES, GroEL, HtpG, SurA, TypA, Tig y CapB. GroES, GroEL y HtpG son proteínas chaperonas que actúan en la asistencia al plegamiento de gran cantidad de proteínas. SurA es una chaperona que se encarga del plegamiento de proteínas en el espacio periplásmico, donde se localiza. TypA es un factor de elongación que del que se ha observado un papel dual: normalmente es requerido para funciones generales de la célula, pero también permite la supervivencia de ésta en diferentes condiciones de estrés (Kiss y col., 2004). Tig es una chaperona que actúa previniendo el agregamiento de proteínas y asiste a su plegamiento (Huang y col., 2000). Se ha demostrado que esta última proteína se asocia con DnaK y este complejo a su vez se asocia con el ribosoma para asistir al plegamiento de proteínas nacientes (Deuerling y col., 2003; Kramer y col., 2004). CapB es una proteína con dominio de unión a DNA y que tiene como misión la regulación de la transcripción sobre genes encargados de la adaptación a condiciones adversas para la célula. Existen estudios que han demostrado que algunas de estas proteínas de respuesta a estrés son inducidas o hiperexpresadas en diferentes microorganismos cuando crecen en medios donde

haya presencia de compuestos aromáticos (Blom y col., 1992; Van Dyk y col., 1994; Applegate y col., 1998; Benndorf y col., 2001; Hallsworth y col., 2003; Desmond y col., 2004; Kim y col., 2004a; Santos y col., 2004; Tomas y col., 2004; Deneff y col., 2005; Segura y col., 2005; Dominguez-Cuevas y col., 2006; Kurbatov y col., 2006; Tam le y col., 2006; Tomas-Gallardo y col., 2006; Volkers y col., 2006; Agullo y col., 2007; Lee y col., 2007; Cao y Loh, 2008; Lee y col., 2008; Yoon y col., 2008). Se cree que la inducción de estas proteínas tiene como finalidad reparar o degradar las proteínas dañadas por el ataque lipofílico de los compuestos aromáticos, así como impedir agregados, evitar su desnaturalización y asistir a un buen plegamiento en las condiciones adversas que provocan estos compuestos (Benndorf y col., 1999; Benndorf y col., 2001). En nuestro estudio, se ha observado que estas proteínas de respuesta al estrés se inducen en los tres medios en los que se han crecido *Pseudomonas* sp. Y2 (medio mínimo M9 con glicerol como única fuente de carbono y energía, medio mínimo M9 con AFA como única fuente de carbono y energía, y en medio rico LB con AFA), lo que sugiere que tanto el medio mínimo y las condiciones limitantes del mismo, como el AFA podrían ser los causantes de esta inducción. Es posible que el AFA en medio acuoso entre en la célula como ácido y este ácido orgánico, al entrar en la bacteria, podría liberar protones y acidificar el citosol, lo que, junto con su proceso de descomposición, inducirían la respuesta de estrés para permitir la adaptación y la supervivencia de la célula usando el AFA como fuente de carbono y energía. En este sentido, es conocido que el estireno, el tolueno y los xilenos, por citar algunos ejemplos, pueden tener efectos tóxicos al desorganizar las membranas celulares (Sikkema y col., 1995).

Aunque es cierto que GroES y GroEL llegan a ser imprescindibles para el crecimiento de *E. coli* (Fayet y col., 1989), su papel no parece ser único. Existen proteínas que dependen de estas chaperonas para su correcto plegamiento (Ellis, 2005), pero estudios recientes han demostrado que las proteínas GroES y GroEL funcionan incrementando la estabilidad y los niveles de expresión de ciertos mRNAs. Su mecanismo de actuación consiste en la unión al mRNA (GroEL contiene un dominio de unión a RNA), para protegerlo de la actividad de endoribonucleasas como RNasa E (Georgellis y col., 1995; Yoon y col., 2008). Estas características de GroES y GroEL justificarían una expresión constitutiva, aunque en nuestro caso se observa una clara inducción, posiblemente causada por el estrés provocado por las condiciones restrictivas del medio mínimo y del AFA.

En los resultados presentados aquí (ver Tabla III del Apéndice) se observa un patrón de expresión distinto de las proteínas GroES y GroEL. Normalmente, los genes que codifican estas dos proteínas forman parte de un mismo operón, (por ejemplo, en *Pseudomonas aeruginosa* PA01, *P. aeruginosa* UCBPP-PA14, *P. entomophila* L48, *P. fluorescens* Pf-5, *P. mendocina* ymp, *P. putida* KT2440, *P. putida* F1 y *P. putida* W619). El hecho de que en *Pseudomonas* sp. Y2 estas dos proteínas muestren diferente patrón de expresión podría indicar, bien una

regulación postranscripcional diferente, o bien una localización independiente que les permita una expresión diferencial.

La proteína EF-Tu1, cuya función es la unión y el transporte del codón específico de aminoacil-tRNA al sitio adecuado del ribosoma (Brot, 1977; Miller y Weissbach, 1977), también puede actuar como chaperona (Kudlicki y col., 1997; Caldas y col., 1998; Berrier y col., 2000). La proteína EF-Tu1 de *Pseudomonas* sp. Y2 también presenta hiperexpresión en los tres medios estudiados.

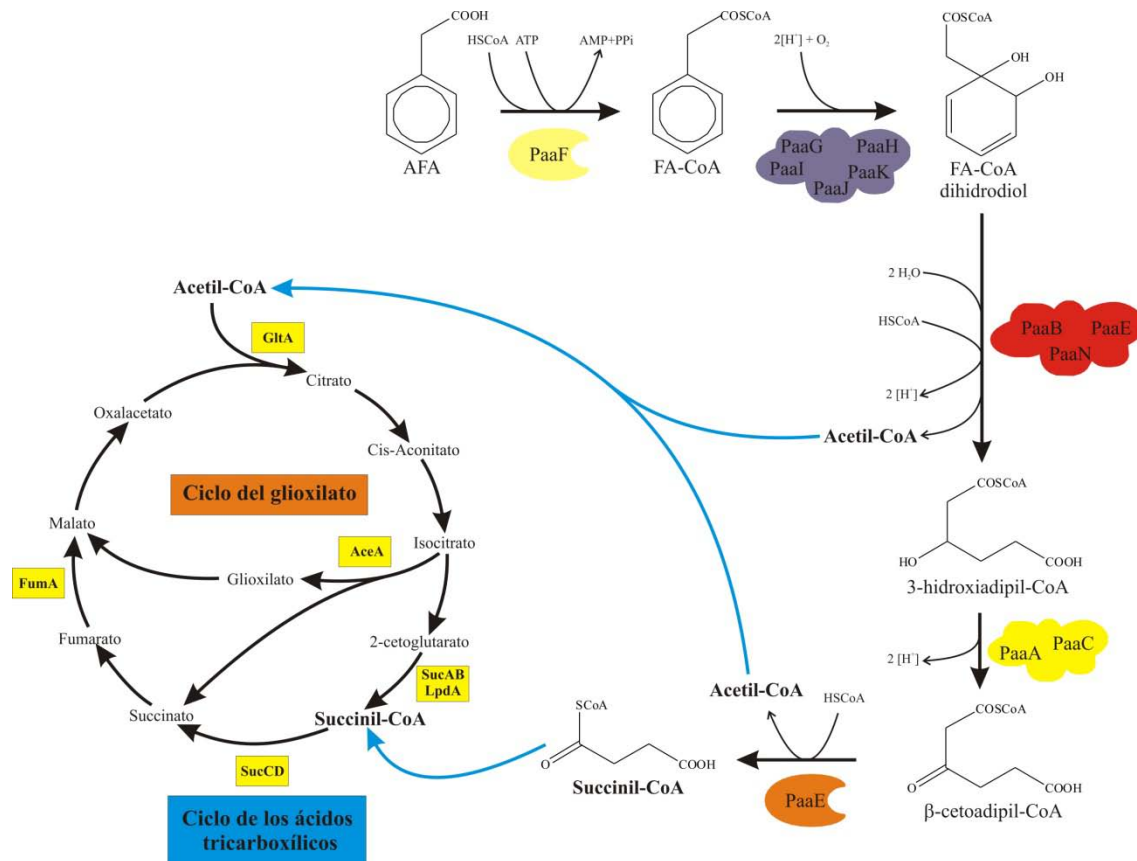
### 6.3.2.2. Proteínas del metabolismo energético central.

Otro conjunto de proteínas, detectadas en los cultivos de *Pseudomonas* sp. Y2 crecidos en presencia de AFA como única fuente de carbono y energía, se incluyen en el programa metabólico y se resumen a continuación.

Las enzimas implicadas en la síntesis de aminoácidos (PurL, ArgG, ArgC1, LeuA y MetK) se expresan a un mayor nivel en medio mínimo M9 que en LB. Esto es comprensible debido a la ausencia de aminoácidos en el medio mínimo; la célula creciendo en medio LB, rico en aminoácidos, no precisa la síntesis de estos ya que utilizan los del medio. Este tipo de hiperexpresión de enzimas implicadas en la biosíntesis de aminoácidos ya se ha observado con anterioridad en *P. putida* KT2440 creciendo en medios con presencia de compuestos aromáticos (Santos y col., 2004; Domínguez-Cuevas y col., 2006; Cao y Loh, 2008).

Otras proteínas identificadas en este estudio están implicadas en el ciclo de Krebs (ciclo de los ácidos tricarboxílicos, TCA) (ver Figura 6.9): SucB y LpdA (síntesis de succinil-CoA), SucC y D (síntesis de succinato), GltA (síntesis de citrato), AceA (síntesis de succinato en el ciclo del glioxilato) y FumA (síntesis de malato), todas inducidas en medio mínimo M9 con AFA (también en M9 con glicerol y en LB con AFA). La inducción de algunas de estas enzimas ya ha sido observado en *P. putida* KT2440 creciendo en presencia de compuestos aromáticos (Santos y col., 2004; Kim y col., 2006; Cao y Loh, 2008), en *Rhodococcus* sp. RHA1 (Navarro-Llorens y col., 2005) y en *P. putida* S12 (Volkers y col., 2006). Las proteínas Paa de *Pseudomonas* sp. Y2 catalizan la transformación del AFA en acetil-CoA y succinil-CoA, compuestos intermediarios del ciclo de Krebs, tal y como ya se había sugerido para *Rhodococcus* sp. RHA1 (Navarro-Llorens y col., 2005) y comprobado en *E. coli* y *P. putida* (Ismail y col., 2003; O'Leary y col., 2005; Kim y col., 2006; Nogales y col., 2007) (ver Figura 6.9). Estos intermediarios del ciclo de Krebs se utilizan para la producción de energía y poder reductor, consiguiendo un balance positivo respecto al gastado en etapas anteriores. Las enzimas

GltA, SucCD y AceA son imprescindibles para la total degradación del AFA y la obtención de energía, ya que permiten la entrada del acetyl-CoA y succinil-CoA al ciclo de Krebs (y ciclo del glioxilato). Además la producción de acetyl-CoA procedente de la descomposición del AFA por la ruta *paa* hace reducir el papel de AceE mientras que induce la hiperexpresión de AceA (ciclo del glioxilato), lo que permite cerrar el ciclo a través del glioxilato, con la consiguiente producción de energía y poder reductor (Kim y col., 2006).



**Figura 6.9. Esquema de la ruta de degradación de AFA hasta el ciclo de Krebs (ciclo de los ácidos tricarboxílicos).** Las enzimas Paa están mostradas junto con los intermediarios implicados en la ruta de degradación de AFA propuesta (Ismail y col., 2003). La nomenclatura de las enzimas Paa está basada en (Luengo y col., 2001). El O<sub>2</sub> y [H] consumidos en el metabolismo del FA-CoA son meramente postudados y podrían ser mayores a los mostrados. Las flechas azules muestran la entrada en el ciclo de ácidos tricarboxílicos de los productos finales de la ruta de degradación del AFA, indicados en un mayor tamaño de letra. También se muestra resumido el ciclo de los ácidos tricarboxílicos y el ciclo del glioxilato. Dentro de los rectángulos amarillos aparecen las enzimas detectadas e identificadas en los estudios de proteómica que intervienen en estos ciclos: Citrato sintasa (GltA), Succinil-CoA sintetasa (SucCD), Fumarato hidratasa (FumA), Complejo 2-Cetoglutarato deshidrogenasa (SucABLpdA) e Isocitrato liasa (AceA). Modificado de (Nogales y col., 2007).

Otras enzimas que resultan inducidas en AFA son FbaA y PckA. Esta inducción podría ser debido a la necesidad de desviar el oxalacetato hacia el ciclo de las pentosas-fosfato para la biosíntesis de purinas, lo que requiere la activación de la síntesis de ATP. En esta línea, también se ha observado la inducción de otras enzimas como PurM y PurL (biosíntesis de purinas)

(Segura y col., 2005). De esta forma la glicólisis/gluconeogénesis parecen estar conectadas con la degradación de aromáticos a través de la inducción de enzimas implicadas en estos procesos (LpdA, FbaA, Eno y PckA) que se ha detectado cuando *Pseudomonas* sp. Y2 crece en medio mínimo M9 con AFA, como ya se observó para otros compuestos aromáticos en *Corynebacterium glutamicum* (Qi y col., 2007).

### 6.3.2.3. Expresión de proteínas implicadas en la morfología de la célula.

La inducción en medio mínimo M9 con AFA de enzimas implicadas en la síntesis de ácidos grasos (FabH, AccB) podría estar provocada por el excedente en acetyl-CoA que se forma como resultado de la degradación del AFA por la ruta *paa*. Parte de este acetyl-CoA se destinaría a la síntesis de ácidos grasos bien para la acumulación de energía (O'Leary y col., 2005), o bien para la reparación de la membrana o modificación de su fluidez, probablemente dañada por la presencia de AFA (Santos y col., 2004).

En *Pseudomonas* sp. Y2, creciendo en medio mínimo con AFA, se observó la inducción de BraC (transportador de aminoácidos de cadena ramificada del tipo ABC), al igual que se observa en *P. putida* KT2440 creciendo en presencia de compuestos aromáticos (Santos y col., 2004). Es muy probable que, en las condiciones de limitación de fuente de carbono y energía, en las que está creciendo se induzcan mecanismos de transporte que introduzcan en el citosol todo tipo de nutrientes y que permitan un ahorro de energía evitando su síntesis.

### 6.3.2.3. Patrón de expresión de proteínas Paa.

Además de las proteínas ya comentadas, cuando *Pseudomonas* sp. Y2 crece en un medio de cultivo con AFA como única fuente de carbono y energía se observó la inducción de las proteínas PaaB, PaaC, PaaF, PaaI, PaaK, PaaN y PaaN2 del *cluster paa1* y PaaC2, PaaE2, PaaF3 y PaaN3 del *cluster paa2*. Esta inducción se ha detectado sólo cuando el AFA está presente en el medio pero no cuando la fuente de carbono y energía es otra, como por ejemplo glicerol. La utilización de los mutantes *Pseudomonas* sp. Y2K1 ( $\Delta paa1::Km$ ) y *Pseudomonas* sp. Y2T2 ( $\Delta paa2::Tc$ ), ha permitido demostrar que la expresión de las proteínas Paa1 y Paa2 siguen individualmente el mismo patrón. La inducción en medio mínimo con AFA de los genes *paa* y de las actividades enzimáticas codificadas por los mismos es conocida desde hace tiempo en *P. putida* U, *E. coli* W y en *Pseudomonas* sp. Y2 parecen seguir las mismas pautas. De tal forma que si en el medio no hay AFA que pueda convertirse en FA-CoA, verdadero inductor de

la ruta (Ferrández y col., 2000; García y col., 2000), no existe inducción de las proteínas Paa. Los datos obtenidos en estos estudios confirman los conseguidos con los análisis del mRNA con *microarrays* realizados con anterioridad sobre los genes *paa* de *Pseudomonas* sp. Y2 (Bartolomé-Martín, 2006) y que concluyeron que sólo en medio mínimo con AFA o STY existe inducción de los genes *paa*. En esos estudios de mRNA por *microarrays* se observó cierta expresión basal de los genes *paa* en ausencia de AFA que no se ve acompañada de la detección de proteínas Paa en los geles 2-DE ensayados en el presente estudio cuando en el medio no hay AFA. Es posible que este mínimo nivel de mRNA *paa* sea traducido para producir cantidades de proteínas Paa indetectables en nuestro estudio, pero esenciales en una rápida estrategia metabólica de la bacteria. En el momento en que aparezca AFA en el medio sería transformado a FA-CoA por las mínimas cantidades de fenilacetil-CoA ligasa (PaaF). La presencia de FA-CoA, inductor de la ruta *paa* (Ferrández y col., 2000; García y col., 2000), desencadenaría una rápida activación del catabolismo de AFA, lo que supondría una ventaja adaptativa para la supervivencia de *Pseudomonas* sp. Y2 y para su competencia frente a otras bacterias en el medio, semejante a lo que ocurre en *Thauera aromatica* en la degradación aeróbica/anaeróbica de benzoato (Heider y col., 1998).

### 6.3.2.3.1. Papel regulador de las proteínas Crc y PaaX.

Cuando *Pseudomonas* sp. Y2 crece en medio rico LB en presencia de AFA no se pudo detectar la presencia de ninguna de las proteínas Paa identificadas, a pesar de la presencia de AFA en el medio. Este comportamiento sugiere la existencia de un proceso de represión catabólica en medio LB sobre las proteínas Paa.

Se han descrito algunos casos en los que el gen *crc* está relacionado con la represión catabólica producida en medio rico: en la ruta de la deshidrogenasa de cetoácidos de cadena ramificada en *P. putida* y *P. aeruginosa* (Hester y col., 2000a; Hester y col., 2000b), en la ruta de degradación de alcanos de *P. putida* GPo1 (Yuste y Rojo, 2001) y en varias rutas de degradación de compuestos aromáticos (benzoato y catecol, 4-hidroxibenzoato y protocatecuato, 4-hidroxifenilpiruvato y homogentisato) de *P. putida* KT2440 (Morales y col., 2004) y en la degradación de tolueno en esta misma bacteria (Aranda-Olmedo y col., 2005). La represión ejercida por Crc en medio rico LB es mucho más fuerte que la que se da en medio mínimo más una fuente de carbono o en medio LB gastado (Yuste y Rojo, 2001; Ruiz-Manzano y col., 2005). Esto parece ser debido a que los niveles de Crc son mayores cuando la bacteria crece en medio rico LB; además, los niveles de Crc son unas 4-5 veces superiores durante la fase exponencial que en la fase estacionaria, en la que también hay una disminución de la represión catabólica producida por Crc (Yuste y col., 1998; Ruiz-Manzano y col., 2005).

En la bibliografía existen sugerencias acerca del mecanismo de actuación de Crc, en el sentido de que Crc ejerce su efecto represor a nivel postranscripcional (Hester y col., 2000a; Yuste y Rojo, 2001; Morales y col., 2004), ya que los niveles de los mRNA de los genes implicados en la degradación de estas rutas anteriormente citadas se mantenían constantes, tanto en presencia como en ausencia de Crc. Estudios recientes han hallado el mecanismo de actuación de Crc sobre la represión por catabolito de determinadas rutas como son la degradación de alcanos (Moreno y col., 2007) y benzoato (Moreno y Rojo, 2008) en *P. putida* KT2440. En ambos casos se ha demostrado la unión de la proteína Crc sobre regiones específicas del extremo 5' de los mRNAs de *alkS* y *benR*. Se ha observado que esta unión se da en el sitio de unión de los ribosomas al mRNA (RBS) para iniciar la traducción, impidiendo ésta. Estos mRNA codifican las proteínas AlkS y BenR, encargadas de activar la transcripción de los genes catabólicos de cada ruta (genes *alk* y *ben*, respectivamente) en presencia de los compuestos inductores, alcanos para AlkS (Kok y col., 1989; MacGregor y col., 1996) y benzoato para BenR (Cowles y col., 2000). Así, mediante la reducción del nivel de las proteínas activadoras AlkS y BenR, se inhibe la expresión de los genes *alk* y *ben* encargados de la degradación de alcanos y benzoato, respectivamente, (Moreno y col., 2007; Moreno y Rojo, 2008).

Anteriormente se ha demostrado que la proteína Crc media la represión por catabolito en medio LB y en medios con AFA sobre los genes *sty* de *Pseudomonas* sp. Y2 (Bartolomé-Martín, 2006). Además el AFA actúa como represor de los genes *sty* catabólicos incluso en presencia de estireno (Alonso, 2002; Alonso y col., 2003). Un efecto de represión por catabolito en medio LB, incluso en presencia del inductor, STY, fue observado en *P. putida* CA-3 (O'Leary y col., 2001).

En el presente trabajo se ha podido observar una ausencia de expresión de las proteínas Paa1 ni Paa2 en los cultivos de la estirpe *Pseudomonas* sp. Y2 en medio LB con AFA lo que denota represión por catabolito en medio LB. Cuando se creció la estirpe *Pseudomonas* sp. Y2C1, (*crc*::Tc), en el mismo medio LB con AFA, la represión de las proteínas Paa1 y Paa2 se mantuvo. Este hecho hace pensar que la represión catabólica de los genes *paa* en medio LB no está mediada por *crc*, contrariamente a lo detectado con los genes *sty*. Este resultado coincide con el observado en los estudios realizados sobre el mRNA de los genes *paa* con *microarrays* (Bartolomé-Martín, 2006), en el que no se observó diferencia alguna entre los niveles de mRNA de los genes *paa* de las estirpes *Pseudomonas* sp. Y2(*crc*<sup>+</sup>) y *Pseudomonas* sp. Y2C1(*crc*<sup>-</sup>) creciendo en medio LB con AFA. El hecho de que Crc no participe en la represión catabólica ejercida por el medio rico LB sobre los genes *paa* está de acuerdo con los resultados obtenidos previamente en *P. putida* KT2440 (Morales y col., 2004), que demuestran que en el medio LB con AFA los niveles de mRNA de los genes *paa* son igualmente bajos en *P. putida* KT2440 y

en el mutante en *crc* de esta estirpe. Los autores también observan que tanto la estirpe silvestre como el mutante en *crc* no pueden asimilar el AFA en el medio LB+AFA, lo que indica que en la represión catabólica de los genes *paa* por medio rico no interviene el factor Crc. Algo semejante parece suceder en *Pseudomonas* sp. Y2. Por otro lado, cuando la estirpe X1 (*Pseudomonas* sp. Y2T2X1,  $\Delta paa2::Tc$ ,  $\Delta paaX::Km$ ) creció en medio LB con AFA se pudo observar como las proteínas Paa1 fueron fuertemente inducidas y detectadas en los geles 2-DE. Como ya se ha comentado anteriormente, *paaX* codifica la proteína represora de los genes *paa* catabólicos, los cuales solamente se expresan cuando en el medio existe FA-CoA, inductor que permite la desrepresión de estos genes, permitiendo la liberación de PaaX de las regiones operadoras de los promotores de los operones *paa* (Ferrández y col., 2000; García y col., 2000). Este hecho nos sugiere que la represión catabólica sobre los genes *paa* en medio LB está mediada directamente por la proteína PaaX, sin que exista ningún factor intermediario de la regulación global que intervenga de forma directa sobre la represión observada. Aunque también podríamos pensar que PaaX no es sólo un regulador local de la ruta *paa*, sino quizá una proteína con función de regulador global. Con el fin de realizar una previa aproximación a esta posibilidad, se utilizaron un mutante para el gen *paaX*, la estirpe *Pseudomonas* sp. Y2T2X1 ( $\Delta paa2::Tc$ ,  $\Delta paaX::Km$ ) y estirpes con el *paaX* hiperexpresado en *trans* (en el plásmido pVLTX1), estirpes *Pseudomonas* sp. Y2 [pVLTX1] sin IPTG en el medio y con IPTG en el medio. Estas estirpes se crecieron tanto en medio mínimo M9 con AFA como en medio LB con AFA (ver Tabla III del Apéndice). Se pudieron observar diferentes efectos de la presencia/ausencia de *paaX* sobre la expresión de diferentes proteínas, mostrando la importancia de la dosis de *paaX* y del medio en el que crecen las bacterias. Las proteínas sobre las que se observó efecto de *paaX* están implicadas en procesos metabólicos de producción de energía, metabolismo de aminoácidos, metabolismo de nucleótidos y ácidos nucleicos, metabolismo de lípidos y en el proceso de elongación. Las proteínas FlxR, FumA, PrpC y FabH son reprimidas en presencia de altos niveles de *paaX*, mientras que la proteína Pnp es reprimida por la ausencia de *paaX*. Otras como GlnA y Tuf1 muestran represión tanto por exceso como por defecto de *paaX*, lo cual indica que su expresión depende de la dosis idónea de PaaX. Por último, proteínas como FbaA, TufA, CarB, AccB, BraC y Sdh se comportan de diferente manera en ausencia/presencia de *paaX* dependiendo del medio en el que crezcan. Todo esto permite sugerir que PaaX podría tener un papel importante en la regulación global e intervenir en el control de la expresión génica, asegurando una jerárquica asimilación de las fuentes de carbono existentes en el medio.

En estudios anteriores se ha observado que la delección del gen *crc* produce un aumento de expresión de la proteína periplásmica BraC (proteína de unión de alta afinidad a aminoácidos de cadena ramificada como alanina y treonina (Hoshino y Kose, 1990), de esta forma Crc controla

el sistema de transporte de aminoácidos. Además Crc parece controlar la represión de numerosos genes implicados en la oxidación de azúcares en *P. aeruginosa* y *P. putida*, además de reprimir enzimas del tipo CoA-transferasas. También se ha observado que Crc controla la estimulación de CysS y de la malato-quinona oxidoreductasa2 (Morales y col., 2004). En este trabajo se observa diferentes efectos de la proteína Crc de *Pseudomonas* sp. Y2 sobre algunas proteínas. En el caso de BraC, al contrario con lo que ocurre en *P. putida* KT2440, la ausencia de *crc* coincide con una disminución de la expresión de esa proteína. Crc parece controlar de forma negativa la expresión de las proteínas ArgG, GlnA, IlvC, FabH, SucB, GroES, PurM y GlyS, mientras que la ausencia de *crc* impide la expresión de las proteínas IscS, GroEL, AtpA, LpdA, FbaA, BraC y SucC. De esta forma la acción de Crc, bien sea de forma directa o indirecta, parece ser dual, controlando de forma positiva unas proteínas y reprimiendo otras. Este mismo papel dual parece presentar PaaX en las condiciones ensayadas en este estudio, lo que permite insistir en el papel de PaaX como regulador global.

#### 6.4. Estudio de la funcionalidad de PaaY.

La localización del gen *paaY* en el *cluster paa* muestra ciertas diferencias entre las bacterias en las que se ha definido. En *E. coli*, *paaY* se sitúa detrás de *paaX*. En *Pseudomonas* el orden es el inverso. En *Pseudomonas* sp. Y2, este orden se mantiene (*paaY2* delante de *paaX2*) en el *cluster paa2*, y se complica en el *cluster paa1*, donde *paaY* está asociado a los genes *paaX* y *paaN2* en el operón *paaN2YX*. En el presente estudio nos hemos centrado en el análisis del gen *paaY*. Debido a su localización, formando parte del mismo operón que *paaX* en la mayoría de microorganismos en los que se ha detectado, se pensó desde un principio que su función podría estar relacionada con la regulación de la ruta catabólica.

A pesar de eso, PaaY no muestra ninguna similitud con proteínas reguladoras ni tampoco con proteínas de unión a DNA. Su estructura primaria, compuesta por 197 aa, muestra varias repeticiones del motivo hexapéptido, cuya secuencia consenso es [LIV]-[GAED]-X-X-[STAV]-X (PS00101, PROSITE) (Bairoch, 1993). Este dominio fue inicialmente identificado en aciltransferasas de bacterias (Vaara, 1992). La comparación de las secuencias de la base de datos con la proteína PaaY relaciona a ésta última con anhidrasas carbónicas de la familia  $\gamma$  y con acetiltransferasas. Las  $\gamma$ -anhidrasas carbónicas pertenecen a una superfamilia de proteínas que tienen repeticiones del motivo hexapéptido anteriormente referido, motivo que también presentan aciltransferasas con aquellas que están evolutivamente relacionadas como ocurre con la tetrahidrodipicolinato N-succiniltransferasa (Beaman y col., 1998a; Parisi y col., 2000; Fernández, 2005)

La estructura cristalina de algunas proteínas con repetición de hexapéptidos ya ha sido resuelta, por ejemplo, la UDP-Nacetil O-aciltransferasa de *E. coli* (Raetz y Roderick, 1995), la anhidrasa carbónica de *M. thermophila* (Kisker y col., 1995), la tetra hidrodipicolinato (THDP) N-succiniltransferasa de *Mycobacterium bovis* (Beaman y col., 1997), la PaXAT acetiltransferasa xenobiótica de *P. aeruginosa* PA103 (Beaman y col., 1998b), la VatD acetiltransferasa de *Enterococcus faecium* (Sugantino y Roderick, 2002) y una serina acetiltransferasa de *Haemophilus influenzae* (Olsen y col., 2004). A pesar de las diferencias de secuencia entre estas proteínas, las repeticiones del motivo hexapéptido están totalmente conservadas en todos los casos. Estas repeticiones parecen ser claves en la conformación de estas proteínas en una hélice levógira formada por láminas  $\beta$  paralelas, denominado dominio L $\beta$ H (left-handed parallel  $\beta$ -helix). Algunos giros entre las láminas  $\beta$  de estas proteínas no cumplen la regla, son de mayor longitud y se alejan de la forma de prisma regular. Esta diferenciación entre cada una de las proteínas indica posiblemente su diversidad funcional (Parisi y col., 2000). El motivo repetido hexapéptido está caracterizado por una frecuente presencia de residuos alifáticos (Leu, Ile o Val) en la posición  $n$ , Gly en la posición  $n+1$  y un residuo pequeño (Ser, Thr, Ala o Val) en la posición  $n+4$  (Dicker y Seetharam, 1992; Vaara, 1992).

Las proteínas con motivos hexapéptidos, normalmente, desempeñan una función catalítica como aciltransferasas y participan en una gran variedad de procesos enzimáticos, tales como la biosíntesis de pared celular, el metabolismo de aminoácidos y la detoxificación (Weinberger y Gilvarg, 1970; Anderson y Raetz, 1987; Downie, 1989; Kelly y col., 1993; Murray y Shaw, 1997). Estas aciltransferasas con motivo hexapéptido, predominantemente encontradas en microorganismo y plantas superiores, utilizan la fracción fosfopantotenil del acil-CoA (Downie, 1989) o el resto acilo de proteínas transportadoras de estos grupos, para transferirlos atacando el enlace tioester. Los grupos acil transferidos suelen ser acetilo (Downie, 1989), succinilo (Weinberger y Gilvarg, 1970), o R-3-hidroxiacilo de ácidos grasos (Anderson y Raetz, 1987; Kelly y col., 1993). Los sustratos aceptores son aminoácidos, azúcares, intermediarios metabólicos o productos naturales relacionados con grupos amino o hidroxilo libres (Beaman y col., 1998b).

La función del producto de *paaY* ha sido poco estudiada, aunque existen datos acerca de la misma en *E. coli* W. Inicialmente se concluyó que *paaY* no era imprescindible para el crecimiento en AFA (Ferrández y col., 1998), pero un estudio posterior (Fernández, 2005) que su ausencia (por mutación del gen) provoca una disminución en la velocidad de crecimiento de *E. coli* W en medio líquido y la incapacidad de crecer en medio sólido cuando se utiliza AFA como única fuente de carbono y energía. La causa de esta aparente contradicción es que el primer estudio se realizó mediante crecimientos a saturación, en los que no se observó la baja

velocidad de crecimiento en ausencia de *paaY*. En estos estudios, también se observó una estrecha relación de *paaY* con *paaX*, por lo que se sugirió para PaaY una función auxiliar en la desrepresión de la ruta interaccionando directa o indirectamente con PaaX. Además se demostró que PaaY de *E. coli* W carecía de actividad anhidrasa carbónica y presentaba cierta actividad tioesterasa, capaz de hidrolizar diferentes compuestos derivados de CoA y liberar CoA (acetoacetil-CoA, lauril-CoA, miristoil-CoA y fenilacetil-CoA). Esta actividad no es incompatible con una posible aciltransferasa, que aún no ha sido puesta de manifiesto al no encontrarse un aceptor apropiado.

En el presente trabajo se ha intentado un acercamiento al papel que desempeña el producto del gen *paaY* en el crecimiento de *Pseudomonas* sp. Y2en AFA, a través de una serie de estudios genéticos. Como se ha descrito en el apartado de Resultados, se construyeron mutantes defectivos en el gen *paaY*, con la finalidad de estudiar su crecimiento en AFA. Los mutantes se realizaron a partir la estirpe *Pseudomonas* sp. Y2T2, que únicamente posee el *cluster paa1* y, por consiguiente, solamente un gen *paaY*. Este gen fue deletado y sustituido por el casete de resistencia a kanamicina, consiguiendo una estirpe que recibió el nombre de *Pseudomonas* sp. Y2T2Y1. En primer lugar, se observó que la ausencia de *paaY* provoca un gran retraso en el crecimiento en medio mínimo con AFA como única fuente de carbono y energía. Debido a la posición que ocupa el gen *paaY* en el *cluster paa1*, situado delante de *paaX*, podría pensarse que la delección de *paaY* y la inserción del casete de resistencia a kanamicina, afectara a la expresión del gen *paaX*, y que el comportamiento del mutante *Pseudomonas* sp. Y2T2Y1 fuera debido tanto a la ausencia de PaaY como a la de PaaX. Esta posibilidad se investigó por diferentes vías. Los ensayos de actividad  $\beta$ -galactosidasa indican que *paaX* posee un promotor particular para su expresión. Además, los ensayos de RT-PCR han mostrado que el gen *paaX* se expresa cuando el mutante *Pseudomonas* sp. Y2T2Y1 crece en AFA. Finalmente se construyó un nuevo mutante que, además de la delección de *paaY*, y de su sustitución por el casete de resistencia a kanamicina, incorpora una copia de la región promotora de *paaN2* delante de *paaX*. Esta estirpe, denominada *Pseudomonas* sp. Y2T2Y1Pn2, se comporta de igual forma que *Pseudomonas* sp. Y2T2Y1 cuando crece en M9 con AFA, mostrando el mismo retraso en el crecimiento. Ambos mutantes, *Pseudomonas* sp. Y2T2Y1 y *Pseudomonas* sp. Y2T2Y1Pn2 recuperan la velocidad de crecimiento de la estirpe parental *Pseudomonas* sp. Y2T2 cuando expresan el gen *paaY* clonado en un vector plasmídico. Por todo ello, se pudo concluir que el lento crecimiento en AFA del mutante en *paaY* es debido sólo y exclusivamente a la ausencia de este gen. También se construyó el mutante *Pseudomonas* sp. Y2T2R1 ( $\Delta paa2::Tc \Delta paaN2YX::Km$ ) defectivo en los genes *paaN2*, *paaY* y *paaX*. Este mutante mostró un ligero retraso en el crecimiento en AFA, pero sin llegar a ser tan exagerado como en *Pseudomonas* sp. Y2T2Y1 (Figura 5.73 del apartado 5.4.2.3.2 de Resultados). Sólo

cuando se introdujo en multicopia y el gen *paaY*, la estirpe *Pseudomonas* sp. Y2T2R1 llegó a alcanzar la velocidad de crecimiento observada en la estirpe parental *Pseudomonas* sp. Y2T2. Cuando se introdujo en multicopia el gen *paaN2*, se observó una aceleración leve en el crecimiento sin llegar a alcanzar la velocidad de crecimiento normal de *Pseudomonas* sp. Y2T2; la presencia en *trans* de *paaX* produjo una ralentización del crecimiento muy notable, incluso superior a la observada en la estirpe *Pseudomonas* sp. Y2T2R1 (Figura 5.74 del apartado 5.4.2.3.2 de Resultados). Esto muestra que el factor responsable en mayor medida de la ralentización del crecimiento en AFA es la ausencia de *paaY*. Estos resultados coinciden con los obtenidos de la estirpe *Pseudomonas* sp. Y2T2N2 transformada con el gen *paaY* en multicopia creciendo en AFA.

Con el fin de explorar la posibilidad de que PaaY intervenga en procesos de regulación de la expresión de los genes *paa*, se analizó la expresión de estos genes en el mutante *Pseudomonas* sp. Y2T2Y1 creciendo en AFA (Figura 5.51). Aunque parecen existir algunas diferencias cuantitativas en los niveles, el patrón de expresión de los genes estudiados es muy similar en la cepa *Pseudomonas* sp. Y2T2 y en el mutante *Pseudomonas* sp. Y2T2Y1. Sin embargo, cuando se determinó la actividad  $\beta$ -galactosidasa dirigida por las regiones promotoras del *cluster paa1* en las estirpes *Pseudomonas* sp. Y2T2 y *Pseudomonas* sp. Y2T2Y1 (apartado 5.4.2.1.6 de Resultados, Figuras 5.52 a 5.58) se detectaron grandes diferencias en su patrón de activación por AFA.

Dejando a un lado el caso del promotor *Pg*, que ya se ha comentado anteriormente en el apartado 6.2.2, el efecto del AFA sobre los promotores de la estirpe *Pseudomonas* sp. Y2T2 marca una diferencia clara entre ellos: *Pa* y *Pp* se inducen, *Px* y *Pn2* no se alteran y *Py* resulta inhibido. La ausencia del gen *paaY* en el mutante *Pseudomonas* sp. Y2T2Y1 convierte a todas las regiones promotoras en inducibles por AFA, si bien *Pa*, aún respondiendo a la presencia de AFA, lo hace de una manera muy inferior a la que refleja en la cepa *Pseudomonas* sp. Y2T2. El gran exceso de expresión de *paaX*, cuyo producto es la proteína represora de los genes *paa* (Ferrández y col., 2000; García y col., 2000), unido a la baja expresión de genes *paaABCDEF*, operón que codifica a PaaF, la enzima clave para la desrepresión del sistema, (Martínez-Blanco y col., 1990; Ferrández y col., 1998; Olivera y col., 1998), son, muy probablemente, responsables del retraso en el crecimiento experimentado por *Pseudomonas* sp. Y2T2Y1 en cultivos con AFA. Esta hipótesis viene apoyada por el hecho de que la hiperexpresión del gen *paaX* sobre *Pseudomonas* sp. Y2T2 conduce a un retraso en su crecimiento en AFA (Figura 5.41 del apartado 5.4.2.1.2 de Resultados). *Pseudomonas* sp. Y2T2 posee una sola copia cromosómica de *paaX*; la expresión de *paaX* en multicopia retrasa significativamente la activación del sistema catabólico. La hiperexpresión del gen *paaX* en el mutante *Pseudomonas* sp. Y2T2Y1 produce un retraso exagerado en el crecimiento.

Todo lo anterior induce a pensar que la ausencia de PaaY afecta al catabolismo del AFA a través del mayor nivel de expresión de PaaX.

La diferencia observada en la expresión de los genes *paa*, en función de la técnica analítica utilizada (RT-PCR o Actividad  $\beta$ -galactosidasa) puede relacionarse con el hecho de los ensayos de expresión basados en la RT-PCR se realizaron sobre medio M9 suplementado con AFA y glicerol, mientras que los ensayos de actividad  $\beta$ -galactosidasa se realizaron en medio M9 suplementados solamente con AFA. De esta forma, los resultados de RT-PCR pueden estar influenciados por la presencia en el medio de las dos fuentes de carbono y energía y enmascarar el verdadero efecto de la ausencia de *paaY*. También hay que tener en cuenta que la técnica de RT-PCR no es cuantitativa, aunque se puso a punto para obtener resultados semicuantitativos.

Cuando células del mutante *Pseudomonas* sp. Y2T2Y1, crecidas en medio M9 con AFA, se sedimentaron, lavaron y usaron para inocular un volumen del mismo medio, se observó una significativa aceleración en el crecimiento de este segundo cultivo que, a pesar de ello, no alcanzó la velocidad de crecimiento del cultivo de la estirpe parental *Pseudomonas* sp. Y2T2 (Figura 5.43 del apartado 5.4.2.1.2 de Resultados). Parece existir una adaptación fisiológica debida al precrecimiento, que además no parece ser consecuencia de ninguna señal externa que pudiera ser excretada a modo de señal *quorum sensing* en la que pudiera intervenir la proteína PaaY, ya que no se observó ninguna aceleración en el crecimiento de la estirpe *Pseudomonas* sp. Y2T2Y1 cuando crece en medios gastados (Figura 5.44). Esto indica que la célula sufre una adaptación fisiológica interna que le permite reactivar el crecimiento más rápido después de haber crecido previamente en AFA, y esta adaptación no tiene nada que ver con ningún cambio genético de gran entidad en torno a la arquitectura del mutante ya que esta construcción permanece estable tras el crecimiento del mutante en *paaY* en M9 con AFA (Figura 5.47). Tampoco podría tratarse de una mutación espontánea que le permitiera crecer en AFA, ya que si fuera así, el mutante crecería en el segundo cultivo con una velocidad normal. Al añadir otro nutriente, por ejemplo glicerol, al medio en cantidad insuficiente para mantener el crecimiento celular pero suficiente para activar la maquinaria metabólica (Figuras 5.45 y 46 del apartado 5.4.2.1.2 de Resultados), no se observa aceleración en el crecimiento del mutante *Pseudomonas* sp. Y2T2Y1, por lo que la adaptación fisiológica interna de éste, no se debe a la activación energética del metabolismo que se produce por la adición de una fuente de energía alternativa.

Sorprendentemente, cuando las células de *Pseudomonas* sp. Y2T2Y1 se transforman con un plásmido portador del gen *paaN2* la velocidad de crecimiento del cultivo se acelera significativamente, aunque sin alcanzar el ritmo de crecimiento de la estirpe parental *Pseudomonas* sp. Y2T2 en M9 con AFA (Figuras 5.40 y 5.42 del apartado 5.4.2.1.2 de Resultados). Tras esta observación, se comprobó el efecto de dosis extras de *paaN*

(*Pseudomonas* sp. Y2T2Y1 posee en el cromosoma el gen *paaN* intacto) y de la hiperexpresión de *paaN3* en el crecimiento del mutante en *paaY* (Figuras 5.42 del apartado 5.4.2.1.2 de Resultados). Las dosis extras de *paaN* tuvieron el mismo efecto que la hiperexpresión de *paaN2*, es decir, consiguieron acelerar el crecimiento de *Pseudomonas* sp. Y2T2Y1 en AFA de forma semejante. La hiperexpresión de *paaN3* logra una aceleración del crecimiento de *Pseudomonas* sp. Y2T2Y1, pero sin llegar a alcanzar el ritmo observado con la hiperexpresión independiente de *paaN* o de *paaN2*. Este hecho hace pensar que puede existir una relación entre los productos de los genes *paaY*, *paaN*, *paaN2* y *paaN3* durante el catabolismo de AFA en *Pseudomonas* sp. Y2. En esta línea se investigó si una dosis extra del gen *paaY* permite suplantar la función de *paaN*, *paaN2* y *paaN3* en los mutantes *Pseudomonas* sp. Y2T2N1 ( $\Delta paa2::Tc$ ,  $paaN::Km$ ), *Pseudomonas* sp. Y2T2N2 ( $\Delta paa2::Tc$ ,  $paaN2::Km$ ) y *Pseudomonas* sp. Y2K1N3 ( $\Delta paa1::Km$ ,  $paaN3::Tc$ ), respectivamente. Los resultados mostraron que la hiperexpresión de *paaY* solo fue capaz de complementar la ausencia de *paaN2* pero no la de *paaN* o *paaN3* (Figura 5.35 del apartado 5.4.2.1.1 de Resultados). Debe recordarse aquí que el mutante *Pseudomonas* sp. Y2T2N2 presenta el mismo patrón de crecimiento ralentizado que el mutante en *paaY* cuando crece en M9 con AFA (Mascaraque-Martín, 2009).

Esto marca la diferencia en las relaciones que *paaY* tiene con los distintos genes *paaN*, más directa con *paaN2* y menos con *paaN* y *paaN3*.

Las proteínas PaaN y PaaN3 de *Pseudomonas* sp. Y2 poseen un dominio tipo aldehído deshidrogenasa en el extremo N-terminal y un dominio MaoC deshidratasa en el C-terminal. En el dominio N-terminal de estas proteínas se han detectado los motivos que constituyen el centro activo de la enzima, donde se encuentra el residuo de ácido glutámico potencialmente catalítico y la región de unión al NAD(P)<sup>+</sup> (Bartolomé-Martín, 2006). Además se ha demostrado que el dominio MaoC deshidratasa presenta actividad enoil-CoA hidratasa/isomerasa (Park y Lee, 2003). La mayoría de los genes *paaN* codifican proteínas con estos dos módulos funcionales, aunque en algunos microorganismos dichos genes se encuentran truncados e incluyen solamente el módulo aldehído deshidrogenasa. *Pseudomonas* sp. Y2, además de tener los genes *paaN* y *paaN3* (en los *cluster paa1* y *paa2*, respectivamente), también posee el gen *paaN2* (en el *cluster paa1*), que correspondería a la clase de *paaNs* truncados y que codifica una proteína que solamente presenta el dominio N-terminal aldehído deshidrogenasa. En dicho dominio se ha localizado el motivo que constituye el centro activo de la enzima, lugar de unión del NAD(P)<sup>+</sup> (Bartolomé-Martín, 2006).

Se ha propuesto que las proteínas del tipo PaaN tienen un papel esencial, junto con las proteínas del tipo PaaB, en la etapa de apertura del anillo aromático (Ismail y col., 2003). Estudios recientes acerca de las proteínas del tipo PaaN de *Pseudomonas* sp. Y2 han establecido

que son esenciales para el catabolismo de AFA y que PaaN y PaaN3, concretamente, intervienen en la apertura del anillo aromático del *cis*-dihidrodiol, derivado del FA-CoA (Mascaraque-Martín, 2009). Por otro lado, ciertos ensayos llevados a cabo con el gen *paaN2* no permitieron confirmar la implicación de PaaN2 en las reacciones de apertura del anillo aromático (Mascaraque-Martín, 2009). En este mismo trabajo se demostró que PaaN y PaaN3 no tienen ni actividad aldehído deshidrogenasa ni actividad enoil-CoA hidratasa *in vitro*. La ausencia de ambas actividades hizo pensar en la existencia de una elevada especificidad de estas enzimas por su propio sustrato. También se demostró que PaaN2 era incapaz de suplir el papel funcional de PaaN o el de PaaN3. Corroborando la diferencia funcional de PaaN2 y las otras dos proteínas, como ya se ha comentado anteriormente.

Una primera hipótesis para explicar la relación entre *paaY* y *paaN* propondría que PaaY tuviera un papel regulador sobre la expresión de *paaN*. En ausencia de *paaY*, no habría expresión de *paaN*, pero una presencia en *trans* de este gen en el mutante *Pseudomonas* sp. Y2T2Y1 aceleraría su crecimiento en AFA. En contra de esta propuesta están los datos del estudio de la expresión de los genes *paa1* llevado a cabo sobre *Pseudomonas* sp. Y2T2Y1 en presencia de AFA, que muestra que *paaN* se expresa en estas condiciones (Figura 5.51 del apartado 5.4.2.1.5 de Resultados). Es necesario matizar aquí, que estos datos provienen de una amplificación RT-PCR, con sus posibles desviaciones cuantitativas.

La hipótesis alternativa enfocaría la posibilidad de que PaaY y PaaN estén relacionados por su actividad catalítica semejante o complementaria.

La posible relación de PaaY con las proteínas PaaN y PaaN3 se estudió analizando la acumulación de 2-HPA en el mutante en *paaY*, ya que se ha demostrado que la ausencia de la proteína PaaN en *E. coli* (Ferrández y col., 1998) y PaaN o PaaN3 en *Pseudomonas* sp. Y2 (Mascaraque-Martín, 2009) provoca su incapacidad para degradar AFA y, simultáneamente la acumulación de 2-HPA en el medio de cultivo. El 2-HPA no es un verdadero intermediario de la ruta de degradación del AFA, pero su formación se explica a partir de la deshidratación del derivado *cis*-dihidrodiol del FA-CoA, propuesto como verdadero intermediario (Ferrández y col., 1998; Ismail y col., 2003). La expresión de los genes *paaN* y *paaN3* en *trans*, tanto en células de *E. coli* como en células de *Pseudomonas* sp. Y2 carentes de estas actividades, permite a estos microorganismos recuperar la capacidad de crecer en AFA y reducir considerablemente los niveles de 2-HPA (Mascaraque-Martín, 2009). Los valores de acumulación de 2-HPA en *Pseudomonas* sp. Y2T2Y1 no son significativos comparados con los observados en los mutantes *Pseudomonas* sp. Y2T2N1 y *Pseudomonas* sp. Y2T2N3, en los cuales se sugiere que la ruta de degradación de AFA está interrumpida en la etapa de apertura del anillo aromático (Mascaraque-Martín, 2009). La deficiencia del gen *paaY* en la estirpe *Pseudomonas* sp.

Y2T2Y1, al igual que ocurre con el mutante *Pseudomonas* sp. Y2T2N2, deficiente en *paaN2*, no produce un aumento significativo en los niveles de acumulación de 2-HPA. De esta forma no se puede confirmar que PaaY tenga una actividad semejante a PaaN e intervenga de forma directa en esta etapa del catabolismo del AFA. Una explicación alternativa a la imposibilidad de detectar cantidades significativas de 2-HPA en el medio de cultivo del mutante *Pseudomonas* sp. Y2T2Y1 tendría en cuenta que los compuestos derivados de CoA no son capaces de atravesar la membrana por sí solos, al ser ésta una molécula muy preciada para el metabolismo de la célula (Berg y col., 2006). El transporte y la detección de 2-HPA en el medio de cultivo exigirían la separación del CoA desde el intermediario en el que la ruta se bloquea mediante una reacción de tioesterificación. Se ha demostrado que la proteína PaaY de *E. coli* W tiene actividad tioesterasa y se ha probado su actividad sobre algunos derivados de CoA (Fernández, 2005). La ausencia de PaaY y de su posible actividad tioesterasa específica podría explicar la ausencia de acumulación de 2-HPA en el medio de cultivo del mutante *Pseudomonas* sp. Y2T2Y1.

Al eliminar todos los genes del operón *paaN2YX* en el mutante *Pseudomonas* sp. Y2T2R1, eliminamos el efecto represor de PaaX y la velocidad de crecimiento observado en ésta estirpe es debida bien a la ausencia de la actividad catalítica implicada en la degradación del AFA que pudiera tener PaaY, que es parcialmente complementada por elevados niveles de PaaN, PaaN2 y PaaN3 o bien al efecto de PaaY sobre la regulación de las dosis de PaaN.

Los estudios realizados para esclarecer la implicación de *paaY* en el catabolismo del AFA en *Pseudomonas* sp. Y2, han permitido demostrar que PaaY está implicado en la regulación de la expresión de determinados promotores del *cluster paaI*, de forma directa o indirecta. De esta forma PaaY intervendría en la regulación de las dosis de determinados genes, reguladores (*paaX*) y catabólicos (*paaABCDEF*, *paaPLN*), además de su función en la desrepresión de genes *paa* catabólicos (Fernández, 2005). Como se ha observado PaaY controla los niveles expresión de *paaX* la ausencia de PaaY provoca un exceso de *paaX*. Este efecto se ha comprobado que es el responsable, en parte, del retraso en el crecimiento de *Pseudomonas* sp. Y2T2Y1 en AFA. Además, PaaY también actúa en la desrepresión de los genes *paaABCDEF*, y también podría actuar regulando los niveles específicos de proteínas del tipo PaaN.

De los resultados obtenidos en este trabajo se deduce una posible implicación de PaaY en alguna etapa del catabolismo del AFA, siendo la más probable en la apertura del anillo, donde se ha establecido que actúan PaaN y PaaB (Ismail y col., 2003). Así se observó una estrecha relación entre PaaY y las proteínas PaaN, PaaN2 y PaaN3. Como se ha comentado anteriormente, esta relación puede ser sobre la regulación de las dosis de estas proteínas o bien ejerciendo un papel catalítico auxiliar en la etapa de apertura del anillo.

Por lo tanto sugerimos un papel dual de PaaY en el catabolismo del AFA en *Pseudomonas* sp. Y2. Una primera función en la regulación de la expresión de los genes *paa* y una segunda función catalítica que podría ejercer su papel a nivel de la etapa de apertura del anillo. Serán necesarios nuevos estudios para intentar esclarecer la implicación de PaaY en la degradación de AFA en *Pseudomonas* sp. Y2 y aclarar la relación de esta proteína con las del resto de la ruta.



*Conclusiones*

---

---



## 7. CONCLUSIONES

1. El *cluster* génico *paa1* de *Pseudomonas* sp. Y2 está organizado en tres operones: *paaN2YX*, *paaABCDEF* y *paaGHIJKPLN*.
2. Los operones *paaN2YX* y *paaGHIJKPLN* presentan transcritos parciales, *paaX* en el primero y *paaGHIJKP*, *paaPLN* y *paaN* el segundo.
3. La transcripción de los genes del *cluster paa1* está dirigida por los promotores *Px*, *Py*, *Pn2*, *Pa*, *Pg* y *Pp*. Los promotores *Px*, *Py* y *Pp* conducen una transcripción alternativa de ciertos genes de los operones en los que se ubican.
4. Los promotores *Px* y *Pn2* son constitutivos; *Pa* y *Pp* son inducibles por AFA; *Py* se reprime en presencia de AFA.
5. En ausencia de AFA en el medio, existe una transcripción basal mínima de los genes *paa*.
6. Mediante electroforesis bidimensional se ha comprobado la expresión de las proteínas PaaB, PaaC, PaaF, PaaI, PaaK, PaaN y PaaN2 del *cluster paa1* y PaaC2, PaaE2, PaaF3 y PaaN3 del *paa2*. De cada una de ellas se han definido experimentalmente su peso molecular y su punto isoeléctrico.
7. El AFA induce las proteínas Paa de *Pseudomonas* sp. Y2. Las proteínas del *cluster paa1* y *paa2* se expresan simultáneamente en presencia de este compuesto.
8. El AFA induce la expresión de proteínas de respuesta a estrés. También induce proteínas del metabolismo central de la célula, en especial las implicadas en el ciclo de Krebs y el glioxilato, ciclos en los que se terminan de metabolizar los intermediarios de la degradación del AFA.
9. La proteína Crc no está implicada en la represión catabólica sobre los genes *paa* en medio LB.
10. La proteína PaaX está implicada tanto en la regulación específica de los genes *paa* como en la regulación sobreimpuesta de esta ruta. PaaX es la encargada de la represión de los genes *paa* en medio LB. Su ausencia afecta a la expresión de otras proteínas diferentes.
11. La ausencia de la proteína PaaY provoca un crecimiento anómalo en *Pseudomonas* sp. Y2, resultado de un nivel alto de PaaX y niveles bajos de PaaA, PaaB, PaaC, PaaD, PaaE y PaaF.
12. La función de la proteína PaaY está íntimamente relacionada con el papel de las proteínas PaaN, PaaN2 y PaaN3.



*Apéndice*





## **8. APÉNDICE**

### **8.1. Tablas de proteínas.**



**Tabla I. Proteínas identificadas.** Proteínas identificadas recortadas de los geles 2D de extractos proteicos de *Pseudomonas* sp. Y2 y sus mutantes crecidos en diferentes medios. Datos obtenidos del análisis mediante MALDI-TOF y MALDI-TOF-TOF.

Spot	Proteína	Nombre gen	Especie donde se identificó	Probabilidad / probabilidad limite*	Cobertura de proteína (%)	Péptidos identificados	PM teorico (kDa.)	pI teorico (pH)	PM experimental (kDa.)	pI experimental (pH)	Análisis para identificación **
PT2	Enzima de apertura del anillo putativa	<i>paaN</i>	<i>Pseudomonas</i> sp. Y2	302/76	50	34	73,1	6,37	68,169	6,6	a
PT3	Enzima de apertura del anillo putativa	<i>paaN2</i>	<i>Pseudomonas</i> sp. Y2	297/76	65	31	<b>61,796</b>	5,27	57,738	5,6	a
PT4	3-hidroxiacil-CoA deshidrogenasa putativa	<i>paaC</i>	<i>Pseudomonas</i> sp. Y2	130/76	47	18	<b>54,171</b>	5,45	57,37	5,7	a
PT5	Fenilacetato-CoA ligasa	<i>paaF</i>	<i>Pseudomonas</i> sp. Y2	176/76	52	25	<b>49,214</b>	5,81	48,903	6,4	a
PT6	Enoil-CoA hidratasa II putativa	<i>paaB</i>	<i>Pseudomonas</i> sp. Y2	168/76	55	17	<b>28,787</b>	6,01	27,553	6,5	a
PT11	Fosforibosil - formilglicinamida sintasa	<i>purL</i>	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i>	76/67	9	9	<b>141,357</b>	4,98	145,633	5,6	c
PT12	Carbamoil-fosfato sintasa, subunidad grande glutamina dependiente	<i>carB</i>	<i>Pseudomonas putida</i> F1	97/79	16	13	<b>118,646</b>	5,17	110,098	5,75	c
PT13a	Proteína de choque térmico, Hsp90	<i>htpG</i>	<i>Pseudomonas putida</i> W619	169/79	24	12	<b>71,68</b>	5,19	66,729	5,6	c
PT13b	Proteína de choque térmico, Hsp90	<i>htpG</i>	<i>Pseudomonas putida</i> W619	173/79	22	12	<b>71,68</b>	5,19	66,729	5,6	c
PT14	Argininosuccinato sintasa	<i>argG</i>	<i>Pseudomonas putida</i> KT2440	102/79	35	14	<b>45,25</b>	5,31	51,372	5,75	a
PT15	Cisteína desulfurasa	<i>iscS</i>	<i>Pseudomonas viridiflava</i>	103/79	30	16	<b>44,554</b>	5,85	47,718	6,37	a
PT16	Oxidoreductasa vinculada a FAD/NAD(P)	<i>fpr/flxR</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i> Pf0-1	118/79	28	8	<b>29,759</b>	5,31	30,652	5,75	c
PT18	Succinil-CoA sintasa, subunidad alfa	<i>sucD</i>	<i>Pseudomonas entomophila</i> L48	223/79	28	8	<b>30,496</b>	5,78	31,91	6,37	c
PT19	N-acetil-gamma-glutamil-fosfato reductasa	<i>argC1</i>	<i>Pseudomonas putida</i> F1	188/79	20	6	<b>36,512</b>	6,3	40,184	6,66	c

**Tabla I. Proteínas identificadas. (continuación).**

Spot	Proteína	Nombre gen	Especie donde se identificó	Probabilidad / probabilidad limite	Cobertura de proteína (%)	Péptidos identificados	PM teorico (kDa.)	pI teorico (pH)	PM experimental (kDa.)	pI experimental (pH)	Análisis para identificación **
PK1	Enzima de apertura del anillo putativa	<i>paaN3</i>	<i>Pseudomonas</i> sp. Y2	109/76	39	17	<b>73,334</b>	6,13	81,112	6,6	a
PK3	Chaperonina Chp60	<i>groL/groEL</i>	<i>Pseudomonas putida</i> KT2440	139/76	45	22	<b>56,765</b>	4,97	69,466	5,2	a
PK4	Chaperonina Chp60	<i>groL/groEL</i>	<i>Pseudomonas putida</i> KT2440	146/76	40	23	<b>56,765</b>	4,97	70,825	5,3	a
PK5	Piruvato deshidrogenasa, componente E1	<i>aceE</i>	<i>Pseudomonas putida</i> KT2440	150/76	26	30	<b>99,669</b>	5,56	102,342	5,8	a
PK6a	ATP sintasa F1, subunidad alfa	<i>atpA</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i> PF-5 / ATCC BAA-477	157/76	37	20	<b>55,494</b>	5,38	53,668	5,7	a
PK6b	Isocitrato liasa	<i>aceA</i>	<i>Pseudomonas putida</i> KT2440	118/76	31	15	<b>48,888</b>	5,38	53,042	5,7	a
PK7	Hidroxiacil-CoA deshidrogenasa putativa	<i>paaC2</i>	<i>Pseudomonas</i> sp. Y2	229/76	52	29	<b>53,544</b>	5,54	60,657	6	a
PK8	Fenilacetato-CoA ligasa putativa	<i>paaF3</i>	<i>Pseudomonas</i> sp. Y2	152/76	45	24	<b>49,583</b>	5,99	59,493	6,5	a
PK10	Acetolactato sintasa, subunidad grande	<i>ilvB</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i> PF-5 / ATCC BAA-477	109/76	36	19	<b>63,02</b>	6,48	70,825	6,6	a
PK11	Succinil-CoA sintasa, subunidad Beta	<i>sucC</i>	<i>Pseudomonas putida</i> KT2440	98/76	39	12	<b>41,499</b>	5,83	45,359	6,5	a
PK12	Glutamina sintasa, tipo I	<i>glnA</i>	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>phaseolicola</i> 1448A	118/76	32	14	<b>51,936</b>	5,21	75,064	5,5	a

**Tabla I. Proteínas identificadas. (continuación).**

Spot	Proteína	Nombre gen	Especie donde se identificó	Probabilidad / probabilidad limite	Cobertura de proteína (%)	Péptidos identificados	PM teorico (kDa.)	pI teorico (pH)	PM experimental (kDa.)	pI experimental (pH)	Análisis para identificación **
PK13	RNA polimerasa dirigida por DNA, subunidad alfa	<i>rpoA</i>	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i>	148/79	45	17	<b>36,765</b>	4,91	46,62	5,2	a
PK14	Chaperonina Cpn60	<i>groL/groEL</i>	<i>Pseudomonas entomophila</i> L48	140/79	40	19	<b>56,679</b>	4,97	56,459	5,2	a
PK16	Factor de elongación Ts (EF-Ts)	<i>tsf</i>	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i>	67/67	20	6	<b>30,62</b>	5,41	34,099	5,6	c
PK17	Ketotiolasa putativa	<i>paaE2</i>	<i>Pseudomonas</i> sp. Y2	133/79	29	10	<b>42,793</b>	5,35	43,737	5,9	c
PK18	Reductoisomerasa ácido-ketol	<i>ilvC</i>	<i>Pseudomonas putida</i> W619	108/79	29	18	<b>36,561</b>	5,48	38,495	6	a
PK19	Succinil-CoA sintetasa, subunidad alfa	<i>sucD</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PA01	90/79	54	11	30,646	5,95	32,195	6,37	a
PY1	Lisil-tRNA transferasa (clase II)	<i>lysS</i>	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i> B728a	100/76	29	13	<b>57,112</b>	5,07	62,048	5,4	a
PY2	3-Oxoacil sintasa III	<i>fabH</i>	<i>Pseudomonas putida</i> KT2440	81/76	14	4	<b>42,585</b>	5,62	42,672	5,6	c
PpXI3	Citrato sintasa I	<i>gltA</i>	<i>Pseudomonas putida</i> F1	387/79	35	13	<b>47,97</b>	6,36	52,352	6,44	c
PpXI5	Hidroxiacil-CoA deshidrogenasa putativa	<i>paaC</i>	<i>Pseudomonas</i> sp. Y2	145/79	41	17	<b>54,171</b>	5,45	62,71	5,98	a
PdX2	Hidrolasa, tipo Fe-S, subfamilia tartrato/fumarato, región alfa	<i>fumA</i>	<i>Pseudomonas putida</i> W619	150/79	27	10	<b>54,957</b>	5,2	63,962	5,3	a
PdX3	2-Isopropilmalato sintasa	<i>leuA</i>	<i>Pseudomonas putida</i> F1	108/79	12	7	<b>62,015</b>	5,31	70,113	5,52	c
PdX4	ATP sintasa F1, subunidad alfa	<i>atpA</i>	<i>Pseudomonas putida</i> W619	117/79	46	15	55,461	5,24	59,902	5,52	a

**Tabla I. Proteínas identificadas. (continuación).**

Spot	Proteína	Nombre gen	Especie donde se identificó	Probabilidad / probabilidad limite	Cobertura de proteína (%)	Péptidos identificados	PM teorico (kDa.)	pI teorico (pH)	PM experimental (kDa.)	pI experimental (pH)	Análisis para identificación **
PdX5	Dihidrolipoamida deshidrogenasa	<i>lpdA</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i> Pf0-1	89/79	17	6	<b>49,995</b>	5,93	62,306	5,98	c
PdX6	Precursor de Chaperona surA, (Peptidil-prolil cis-trans isomerasa surA)	<i>surA</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i> Pf-5 / ATCC BAA-477	74/67	26	11	<b>47,375</b>	5,3	49,204	5,52	a
PdX8	Fructosa-bisfosfato aldolasa de clase II	<i>fbaA</i>	<i>Azotobacter vinelandii</i> AvOP	91/79	25	7	<b>38,814</b>	5,58	44,887	5,7	c
PdX13	Proteína 3 putativa del complejo de oxidación del anillo	<i>paaI</i>	<i>Pseudomonas</i> sp. Y2	83/79	34	11	<b>28,549</b>	5,04	27,993	5,12	a
PdX14	Proteína 3 putativa del complejo de oxidación del anillo	<i>paaI</i>	<i>Pseudomonas</i> sp. Y2	175/79	74	18	<b>28,549</b>	5,1	27,993	5,3	a
PdX15	2-Oxoglutarato dehidrogenasa / Dihidrolipoamida succiniltransferasa	<i>sucB</i>	<i>Pseudomonas entomophila</i> L48	102/79	31	8	<b>42,164</b>	5,19	57,591	5,52	c
PdX18	3-hidroxiacil-CoA deshidrogenasa putativa	<i>paaC</i>	<i>Pseudomonas</i> sp. Y2	160/79	43	18	<b>54,171</b>	5,45	62,306	5,7	a
PdX19	3-hidroxiacil-CoA deshidrogenasa putativa	<i>paaC</i>	<i>Pseudomonas</i> sp. Y2	94/79	32	13	<b>54,171</b>	5,45	61,092	5,7	a
LPY3	Factor de elongación de la traducción Tu (EF-Tu)	<i>tufI</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i> Pf-5 / ATCC BAA-477	98/79	21	9	<b>44,027</b>	5,24	51,354	6,4	c
LPY5	Hidro-liasa tartrato/fumarato tipo Fe-S, región alfa	<i>fumA</i>	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i> B728a	115/79	27	11	<b>55,172</b>	5,42	37,941	6,4	c
LPdX1	RNA polimerasa dirigida por DNA, subunidad Beta	<i>rpoB</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i> Pf0-1	100/76	10	12	<b>148,648</b>	5,43	140,991	5,45	a

**Tabla I. Proteínas identificadas. (continuación).**

Spot	Proteína	Nombre gen	Especie donde se identificó	Probabilidad / probabilidad limite	Cobertura de proteína (%)	Péptidos identificados	PM teórico (kDa.)	pI teórico (pH)	PM experimental (kDa.)	pI experimental (pH)	Análisis para identificación **
LPdX4	Poliribonucleotido nucleotidiltransferasa / Polinucleótido fosforilasa / PNPasa.	<i>pnp</i>	<i>Pseudomonas putida</i>	127/66	30	18	<b>75,166</b>	5,12	77,134	5,1	a
LPdX8	Enzima putativa de apertura del anillo	<i>paaN</i>	<i>Pseudomonas</i> sp. Y2	261/76	35	20	<b>73,1</b>	6,37	71,839	6,4	a
LPdX10	Enzima putativa de apertura del anillo	<i>paaN2</i>	<i>Pseudomonas</i> sp. Y2	184/76	40	18	<b>61,796</b>	5,27	63,205	5,1	a
LPdX11	IMP dehidrogenasa / GMP reductasa	<i>guaB/guaC</i>	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i> B728a	125/76	15	6	<b>52,082</b>	6,41	56,406	5,9	c
LPdX12	Homoserina dehidrogenasa	<i>hom</i>	<i>Pseudomonas putida</i> KT2440	65/47	5	1	<b>46,336</b>	5,26	53,286	5,45	b
LPdX13	S-adenosilmetionina sintetasa	<i>metK</i>	<i>Pseudomonas putida</i> KT2440	159/76	33	12	<b>43,152</b>	5,27	48,236	5,1	a
LPdX14	Proteína 5 putativa del complejo de oxidación del anillo	<i>paaK</i>	<i>Pseudomonas</i> sp. Y2	233/76	61	23	<b>39,824</b>	5,33	44,289	5,3	a
LPdX15	Factor de elongación de la traducción Tu (EF-Tu)	<i>tufA</i>	<i>Pseudomonas putida</i> KT2440	86/76	26	12	<b>43,81</b>	5,22	47,554	5,45	a
LPdX16	Citrato sintasa, tipo II	<i>gltA</i>	<i>Pseudomonas putida</i> KT2440	126/76	36	12	<b>47,933</b>	6,5	46,883	5,9	a
LPdX18	Metilcitrato sintasa	<i>prpC</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i> Pf0-1	112/76	18	5	<b>42,074</b>	6,47	41,249	6,4	c
LPdX19	Proteína 3 putativa del complejo de oxidación del anillo	<i>paal</i>	<i>Pseudomonas</i> sp. Y2	262/76	78	25	<b>28,549</b>	5,04	28,495	4,94	a
LPdX20	Enoil-CoA hidratasa II putativa	<i>paaB</i>	<i>Pseudomonas</i> sp. Y2	128/76	49	13	<b>28,787</b>	6,01	26,164	5,9	a

**Tabla I. Proteínas identificadas. (continuación).**

Spot	Proteína	Nombre gen	Especie donde se identificó	Probabilidad / probabilidad límite	Cobertura de proteína (%)	Péptidos identificados	PM teórico (kDa.)	pI teórico (pH)	PM experimental (kDa.)	pI experimental (pH)	Análisis para identificación **
LPdX23	Isocitrato liasa	<i>aceA</i>	<i>Pseudomonas putida</i>	90/76	20	11	<b>48,94</b>	5,65	54,824	5,45	a
LPdX24	3-hidroxiacil-CoA deshidrogenasa putativa	<i>paaC</i>	<i>Pseudomonas</i> sp. Y2	167/76	34	17	<b>54,171</b>	5,45	57,215	5,45	a
LPdX25	Proteína TypA de unión a GTP	<i>typA / bipA</i>	<i>Pseudomonas putida</i> KT2440	104/76	19	13	<b>67,344</b>	5,4	77,134	5,3	a
LPdX26	Carbamoil-fosfato sintasa, subunidad grande	<i>carB</i>	<i>Pseudomonas putida</i> KT2440	186/76	27	31	<b>118,633</b>	5,17	116,237	5,3	a
LPdX27	Sacaropina dehidrogenasa	<i>sdh</i>	<i>Pseudomonas putida</i> KT2440	111/76	32	11	<b>45,677</b>	5,17	52,534	5,1	a
LPC8	2-Fosfoglicerato deshidratasa / Enolasa	<i>eno</i>	<i>Pseudomonas putida</i> KT2440	185/79	26	9	<b>45,633</b>	4,92	67,616	5,1	c
LPC9	Chaperonina Cpn10	<i>groS/groES</i>	<i>Pseudomonas putida</i> KT2440	71/67	51	6	<b>10,217</b>	5,4	13,442	5,45	a
LPC10	Proteína de choque térmico CapB	<i>capB</i>	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i> str. DC3000	192/79	55	4	<b>7,722</b>	6,54	8,899	6,6	c
LPC11	Fosfoenolpirvato carboxiquinasa	<i>pckA</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PA01	95/79	8	3	<b>56,153</b>	5,27	69,543	5,45	c
LPpX10	Fosforibosilformilglicinamida ciclo-ligasa / Fosforibosil-aminoimidazol sintasa	<i>purM</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i> Pf0-1	37/36	6	1	<b>37,293</b>	4,9	41,891	5,1	b
LPpX13	Precursor de azurin	<i>azu</i>	<i>Pseudomonas putida</i>	60/49	9	1	<b>16,087</b>	6,06	17,115	5,9	b
LPpX17	Factor trigger (factor de activación)	<i>tig</i>	<i>Pseudomonas entomophila</i> L48	101/79	23	13	<b>48,359</b>	4,84	56,193	4,7	a

**Tabla I. Proteínas identificadas. (continuación).**

Spot	Proteína	Nombre gen	Especie donde se identificó	Probabilidad / probabilidad límite	Cobertura de proteína (%)	Péptidos identificados	PM teórico (kDa.)	pI teórico (pH)	PM experimental (kDa.)	pI experimental (pH)	Análisis para identificación **
LPpX18	Fumarato hidratasa putativa, clase I	<i>fumA</i>	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>phaseolicola</i> 1448A	96/79	27	15	<b>55,148</b>	5,35	61,112	5,3	a
LPpX19	Lisil-tRNA sintetasa / Lisina-tRNA ligasa	<i>lysS</i>	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i>	79/67	29	16	<b>57,024</b>	5,02	65,539	5,3	a
LPpX20	Glicil-tRNA sintetasa, cadena beta	<i>glyS</i>	<i>Pseudomonas entomophila</i> L48	116/79	23	17	<b>75,174</b>	5,22	76,439	5,3	a
LPpX21	Transportador de aminoácidos de cadena ramificada tipo ABC	<i>braC</i>	<i>Pseudomonas putida</i> F1	238/79	38	9	<b>39,546</b>	6,2	48,858	5,7	c
LPpX15	ATP sintasa F1, subunidad Beta	<i>atpD</i>	<i>Pseudomonas putida</i> W619	132/79	47	20	<b>49,447</b>	4,86	54,363	5,3	a
LPpX18	RNA polimerasa dirigida por DNA, subunidad alfa	<i>rpoA</i>	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i> str. DC3000	145/79	38	17	<b>36,765</b>	4,91	47,835	5,3	a
LPpX19	Chaperonina Cpn60	<i>groL/groEL</i>	<i>Pseudomonas putida</i> F1	96/79	17	7	<b>56,751</b>	4,97	55,063	6,29	c
LPpX12	Citrato sintasa I	<i>gltA</i>	<i>Pseudomonas putida</i> F1	106/79	19	7	<b>47,977</b>	6,36	50,994	6,44	c
LPpX13	Flavoproteína, transferencia de electrones, subunidad alfa.	<i>etfA</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i> Pf-5 / ATCC BAA-477	114/79	14	3	<b>31,238</b>	5,15	33,863	5,52	c
LPpX14	Carboxil Acetil-CoA portadora de biotina	<i>accB</i>	<i>Pseudomonas putida</i> F1	274/79	32	5	<b>16,232</b>	4,95	19,041	5,12	c

\*\*→ Tipo de análisis para la identificación de las proteínas. **a**: mediante huella peptídica, **b**: mediante fragmentación peptídica. **c**: identificación mediante búsqueda combinada, por huella peptídica y fragmentación peptídica. \*→ **Probabilidad** asociada a cada coincidencia: Valores expresados como  $-10 \times \text{Log}(P)$ , donde P es la probabilidad de que la coincidencia observada sea un hecho al azar. Valor calculado por el programa Mascot (<http://www.matrixscience.com/>, Perkins y cols., 1999). **Probabilidad límite** asociada a cada búsqueda: valor límite para un nivel de significancia del 5%,  $p < 0,05$ . Calculado por el programa Mascot (<http://www.matrixscience.com/>, Perkins y cols., 1999). El valor de probabilidad debe ser superior a la probabilidad límite para considerar la coincidencia como válida y no debida al azar. n.d.: no determinado.

**Tabla II. Proteínas identificadas.** Proteínas identificadas recortadas de los geles 2D de extractos proteicos de *Pseudomonas* sp. Y2 y sus mutantes crecidos en diferentes medios. Datos obtenidos en la búsqueda de bases de datos de proteínas.

Spot	Proteína	Código de enzima (E.C.)	Código acceso UniProt/NCBI*	Clasificación funcional	Nombre gen	Nombre proteína	Función molecular	Proceso biológico	Localización
PT2	Enzima de apertura del anillo putativa	n.d.	<b>Q845J0</b>	Metabolismo AFA	<i>paaN</i>	Putative ring-opening enzyme	Actividad oxidorreductasa	Procesos metabólicos	n.d.
PT3	Enzima de apertura del anillo putativa	n.d.	<b>Q845K3</b>	Metabolismo AFA	<i>paaN2</i>	Putative ring-opening enzyme	Actividad oxidorreductasa	Procesos metabólicos	n.d.
PT4	3-hidroxiacil-CoA deshidrogenasa putativa	1.1.1.-	<b>Q845K0</b>	Metabolismo AFA	<i>paaC</i>	Putative 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase	Actividad oxidorreductasa / unión a coenzima	Oxidación reducción / metabolismo de ácidos grasos	n.d.
PT5	Fenilacetato-CoA ligasa	6.2.1.30	<b>Q845J7</b>	Metabolismo AFA	<i>paaF</i>	Phenylacetate-CoA ligase	Actividad ligasa	Procesos metabólicos	n.d.
PT6	Enoil-CoA hidratasa II putativa	4.2.1.17	<b>Q845K1</b>	Metabolismo AFA	<i>paaB</i>	Putative enoyl-CoA hydratase II	Actividad catalítica	Procesos metabólicos	n.d.
PT11	Fosforibosil - formilglicinamida sintasa	6.3.5.3	<b>Q886W6</b>	Metabolismo de aminoácidos y nucleótidos	<i>purL</i>	Phosphoribosylformylglycinamide synthase (FGAM synthase) / Formylglycinamide ribotide amidotransferase (FGARAT) / Formylglycinamide ribotide synthetase	Actividad sintasa / unión a ATP	Metabolismo de glutamina / Biosíntesis de "novo IMP" / Biosíntesis de purina	Citoplasma
PT12	Carbamoil-fosfato sintasa, subunidad grande	6.3.5.5	<b>Q88DU6</b>	Metabolismo de aminoácidos / Metabolismo de nucleótidos	<i>carB</i>	Carbamoyl-phosphate synthase large chain / Carbamoyl-phosphate synthetase ammonia chain	Actividad carbamoil fosfato sintasa / unión a ATP / unión a Mg / unión a Mn	Biosíntesis de arginina / biosíntesis de pirimidina	n.d.
PT13a	Proteína de choque térmico, Hsp90	n.d.	ZP_01638836	Plegamiento de proteínas	<i>htpG</i>	Chaperone protein htpG / Heat shock protein htpG / High temperature protein G	Proteína de unión a proteínas desplegadas / unión a ATP	Plegamiento de proteínas / respuesta a estrés	Citoplasma
PT13b	Proteína de choque térmico, Hsp90	n.d.	ZP_01638836	Plegamiento de proteínas	<i>htpG</i>	Chaperone protein htpG / Heat shock protein htpG / High temperature protein G	Proteína de unión a proteínas desplegadas / unión a ATP	Plegamiento de proteínas / respuesta a estrés	Citoplasma
PT14	Argininosuccinato sintasa	6.3.4.5	<b>P59604</b>	Metabolismo de aminoácidos	<i>argG</i>	Argininosuccinate synthase / Citrulline-aspartate ligase	Actividad sintasa / unión a ATP	Biosíntesis de arginina, prolina, alanina y aspartato / ciclo de la urea	Citoplasma

Tabla II. Proteínas identificadas. (Continuación).

Spot	Proteína	Código de enzima (E.C.)	Código acceso UniProt/NCBI*	Clasificación funcional	Nombre gen	Nombre proteína	Función molecular	Proceso biológico	Localización
PT15	Cisteína desulfurasa	2.8.1.7	AAT96060	Metabolismo de aminoácidos	<i>iscS</i>	Cysteine desulfurase	Actividad cisteína desulfurasa / unión a fosfato piroxidial	Metabolismo de cisteína / modificaciones postraduccionales	n.d.
PT18	Succinil-CoA sintetasa, subunidad alfa	6.2.1.5	<b>Q117L4</b>	Producción y conversión de energía	<i>sucD</i>	Succinyl-CoA ligase [ADP-forming], subunit alpha	Actividad Succinato CoA ligasa / actividad citrato sintasa ATP / unión ATP	Ciclo de ácidos tricarbóxicos / metabolismo energético y de carbohidratos	n.d.
PT19	N-acetil-gamma-glutamil-fosfato reductasa	1.2.1.38	ZP_00902278	Metabolismo de aminoácidos	<i>argC1</i>	N-acetyl-gamma-glutamyl-phosphate reductase 1 (AGPR 1) / N-acetyl-glutamate semialdehyde dehydrogenase 1 (NAGSA dehydrogenase 1)	Actividad de dimerización de proteínas / actividad N-acetil-gamma-glutamil-fosfato reductasa / unión a NAD	Oxidación reducción / biosíntesis de arginina	Citoplasma
PK1	Enzima de apertura del anillo putativa	n.d.	<b>Q701L3</b>	Metabolismo AFA	<i>paan3</i>	Putative ring-opening enzyme	Actividad oxidorreductasa	Procesos metabólicos	n.d.
PK3	Chaperonina Chp60	n.d.	<b>Q88N55</b>	Plegamiento de proteínas	<i>groL/groEL</i>	60 kDa chaperonin / Protein Cpn60 / groEL protein	Proteína de unión a proteínas desplegadas / unión a ATP / chaperona	Plegamiento de proteínas	Citoplasma
PK4	Chaperonina Chp60	n.d.	<b>Q88N55</b>	Plegamiento de proteínas	<i>groL/groEL</i>	60 kDa chaperonin / Protein Cpn60 / groEL protein	Proteína de unión a proteínas desplegadas / unión a ATP / chaperona	Plegamiento de proteínas	Citoplasma
PK5	Piruvato deshidrogenasa, componente E1	1.2.4.1	<b>Q88QZ5</b>	Producción y conversión de energía	<i>aceE</i>	Pyruvate dehydrogenase, E1 component	Actividad oxidorreductasa	Glicólisis / gluconeogénesis / metabolismo de piruvato / ciclo de ácidos tricarbóxicos	n.d.
PK6a	ATP sintasa F1, subunidad alfa	3.6.3.14	<b>Q4K3A7</b>	Producción y conversión de energía	<i>atpA</i>	ATP synthase subunit alpha / F-ATPase subunit alpha / ATP synthase F1 sector subunit alpha	Actividad ATP sintasa por transporte de ión H, mecanismo rotacional / Actividad ATPasa por transporte de ión H, mecanismo rotacional / unión a ATP / unión a metales iónicos	Síntesis de ATP acoplado a transporte de protones	Membrana plasmática, integrado en la membrana / centro catalítico F1 (complejo ATP sintasa transporte de electrones)

**Tabla II. Proteínas identificadas. (Continuación).**

Spot	Proteína	Código de enzima (E.C.)	Código acceso UniProt/NCBI*	Clasificación funcional	Nombre gen	Nombre proteína	Función molecular	Proceso biológico	Localización
PK6b	Isocitrato liasa	4.1.3.1	<b>Q88F10</b>	Producción y conversión de energía	<i>aceA</i>	Isocitrate lyase	actividad isocitrato liasa	Metabolismo de glioxilato y dicarboxilato / ciclo de ácidos tricarbóxicos	n.d.
PK7	Hidroxiacil-CoA deshidrogenasa putativa	1.1.1.-	<b>Q70IM7</b>	Metabolismo AFA	<i>paaC2</i>	Putative hydroxyacyl-CoA dehydrogenase	Actividad oxidorreductasa / unión a coenzima	Oxidación reducción/ metabolismo de ácidos grasos	n.d.
PK8	Fenilacetato-CoA ligasa putativa	6.2.1.30	<b>Q70IM4</b>	Metabolismo AFA	<i>paaF3</i>	Putative phenylacetate-CoA ligase	Actividad ligasa	Procesos metabólicos	n.d.
PK10	Acetolactato sintasa, subunidad grande	2.2.1.6	<b>Q4K606</b>	Metabolismo de aminoácidos / Metabolismo de carbohidratos	<i>ilvB</i>	Acetolactate synthase, large subunit, biosynthetic type	Actividad acetolactato sintasa / unión a FAD / unión a Mg / unión a pirofosfato tiamina	Biosíntesis de aminoácidos de cadena ramificada (valina, leucina, isoleucina) / biosíntesis de CoA / metabolismo de ácidos dibásicos de 5C	n.d.
PK11	Succinil-CoA sintetasa, subunidad Beta	6.2.1.5	<b>Q88FB2</b>	Producción y conversión de energía	<i>sucC</i>	Succinyl-CoA synthetase, beta subunit	Actividad ligasa / unión a ATP / unión a Mg / unión a Mn	Ciclo de ácidos tricarbóxicos	n.d.
PK12	Glutamina sintasa, tipo I	6.3.1.2	<b>Q48CF3</b>	Metabolismo energético / Metabolismo de aminoácidos	<i>glnA</i>	Glutamine synthetase	Actividad glutamano-amonio ligasa	Biosíntesis de glutamina / fijación de Nitrógeno	Citoplasma
PK13	RNA polimerasa dirigida por DNA, subunidad alfa	2.7.7.6	<b>Q889U6</b>	Transcripción	<i>rpoA</i>	DNA-directed RNA polymerase subunit alpha (RNAP subunit alpha) / Transcriptase subunit alpha / RNA polymerase subunit alpha	Actividad RNA polimerasa dirigida por DNA / proteína con actividad de dimerización / unión a DNA	Transcripción dependiente de DNA	n.d.
PK14	Chaperonina Cpn60	n.d.	<b>Q115E2</b>	Plegamiento de proteínas	<i>groL/groEL</i>	60 kDa chaperonin / Protein Cpn60 / groEL protein	Unión a ATP / unión a proteína desplegada / chaperona	Plegamiento de proteínas / respuesta a estrés	Citoplasma
PK16	Factor de elongación Ts (EF-Ts)	3.6.5.3	<b>Q886P2</b>	Síntesis de proteínas	<i>tsf</i>	Elongation factor Ts (EF-Ts)	Factor de elongación de la traducción	Elongación de la traducción	Citoplasma
PK17	Ketotiolasa putativa	2.3.1.-	<b>Q70IM5</b>	Metabolismo AFA	<i>paaE2</i>	Putative ketothiolase	Actividad transferasa / transferencia de grupos acil y aminoacil	Metabolismo del protocatecuato	n.d.

Tabla II. Proteínas identificadas. (Continuación).

Spot	Proteína	Código de enzima (E.C.)	Código acceso UniProt/NCBI*	Clasificación funcional	Nombre gen	Nombre proteína	Función molecular	Proceso biológico	Localización
PK18	Reductoisomerasa ácido-ketol	1.1.1.86	ZP_01642049	Metabolismo de aminoácidos	<i>ilvC</i>	Ketol-acid reductoisomerase / Acetohydroxy-acid isomeroreductase / Alpha-keto-beta-hydroxylacil reductoisomerase	Actividad ketol-acido reductoisomerasa / unión a receptor	Biosíntesis de aminoácidos de cadena ramificada (isoleucina, valina) / oxidación reducción	n.d.
PK19	Succinil-CoA sintetasa, subunidad alfa	6.2.1.5	<b>Q51567</b>	Producción y conversión de energía	<i>sucD</i>	Succinyl-CoA ligase [ADP-forming] subunit alpha / Succinyl-CoA synthetase subunit alpha (SCS-alpha)	Actividad ATP citrato sintasa / actividad succinato CoA ligasa / unión a ATP	Ciclo de ácidos tricarbóxicos	n.d.
PY1	Lisil-tRNA transferasa (clase II)	6.1.1.6	ZP_00125807	Síntesis de proteínas	<i>lysS</i>	Lysyl-tRNA synthetase / Lysine-tRNA ligase (LysRS)	Actividad lisina tRNA ligasa / unión a ATP / unión a Mg / unión a ácidos nucleicos	Aminoacilación lisil tRNA	Citoplasma
PY2	3-Oxoacil sintasa III	2.3.1.180	<b>Q88EC1</b>	Metabolismo de lípidos	<i>fabH</i>	3-oxoacyl-(Acyl-carrier-protein) synthase III, putative	Actívada 3-oxoacil sintasa / proteína transportadora de grupos acil	Biosíntesis de ácidos grasos	n.d.
PpXI3	Citrato sintasa I	2.3.3.1	ZP_00899699	Producción y conversión de energía / Metabolismo de carbohidratos	<i>gltA</i>	Citrate synthase	Actividad citrato sintasa	Ciclo de ácidos tricarbóxicos	Citoplasma
PpXI5	Hidroxiacil-CoA deshidrogenasa putativa	1.1.1.-	<b>Q845K0</b>	Metabolismo AFA	<i>paaC</i>	Putative 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase	Actividad oxidorreductasa / unión a coenzima	Oxidación reducción / metabolismo de ácidos grasos	n.d.
PdX2	Hidrolíasa, tipo Fe-S, subfamilia tartrato/fumarato, región alfa	4.2.1.2	ZP_01638282	Producción y conversión de energía	<i>fumA</i>	Putative fumarate hydratase, class I	Actividad fumarato hidratasa	Ciclo de ácidos tricarbóxicos / fijación de CO <sub>2</sub>	n.d.
PdX3	2-Isopropilmalato sintasa	2.3.3.13	ZP_00902599	Metabolismo de aminoácidos	<i>leuA</i>	2-isopropylmalate synthase / Alpha-isopropylmalate synthase / Alpha-IPM synthetase	Actividad 2-isopropilmalato sintasa	Biosíntesis de leucina	n.d.

Tabla II. Proteínas identificadas. (Continuación).

Spot	Proteína	Código de enzima (E.C.)	Código acceso UniProt/NCBI*	Clasificación funcional	Nombre gen	Nombre proteína	Función molecular	Proceso biológico	Localización
PdX4	ATP sintasa F1, subunidad alfa	3.6.3.14	ZP_01639166	Producción y conversión de energía	<i>atpA</i>	ATP synthase subunit alpha / F-ATPase subunit alpha / ATP synthase F1 sector subunit alpha	Actividad ATP sintasa por transporte de iones H, mecanismo rotacional / actividad ATPasa por transporte de iones H, mecanismo rotacional / unión a ATP / unión a metales iónicos	Síntesis de ATP en la membrana acoplado a transporte de protones	Membrana plasmática / Centro catalítico F1 (complejo de síntesis de ATP por transporte de protones)
PdX5	Dihidrolipoamida deshidrogenasa	1.8.1.4	<b>Q3KFU7</b>	Producción y conversión de energía / Metabolismo de aminoácidos	<i>lpdA</i>	Dihydrolipoyl dehydrogenase	Actividad dihidroilpoil deshidrogenasa / unión a FAD / transportador de electrones	Glicólisis / gluconeogénesis / ciclo de ácidos tricarbóxicos / metabolismo de glicina, serina, treonina, valina y leucina	Citoplasma
PdX6	Precursor de Chaperona surA, (Peptidil-prolil cis-trans isomerasa surA)	5.2.1.8	<b>Q4K4X7</b>	Plegamiento de proteínas	<i>surA</i>	Chaperone surA [Precursor] / Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase surA (PPIase surA) / Rotamase surA	Actividad Peptidil-prolil cis-trans isomerasa / unión a proteínas desplegadas / chaperona	Plegamiento de proteínas	Espacio periplásmico
PdX8	Fructosa-bisfosfato aldolasa de clase II	4.1.2.13	ZP_00418722	Metabolismo de carbohidratos	<i>fbaA</i>	fructose-bisphosphate aldolase / aldolase / ketose 1-phosphate aldolase	Actividad fructosa bifosfato aldolasa / unión a Zn	Glicólisis	n.d.
PdX13	Proteína 3 putativa del complejo de oxidación del anillo	n.d.	<b>Q845J4</b>	Metabolismo AFA	<i>paal</i>	Putative ring-oxydation complex protein 3	Actividad oxidorreductasa / unión a metales iónicos de transición	Oxidación Reducción	n.d.
PdX14	Proteína 3 putativa del complejo de oxidación del anillo	n.d.	<b>Q845J4</b>	Metabolismo AFA	<i>paal</i>	Putative ring-oxydation complex protein 3	Actividad oxidorreductasa / unión a metales iónicos de transición	Oxidación Reducción	n.d.
PdX15	2-Oxoglutarato dehidrogenasa / Dihidrolipoamida succiniltransferasa	2.3.1.61	<b>Q117L1</b>	Producción y conversión de energía	<i>sucB</i>	2-oxoglutarate dehydrogenase / dihydrolipoamide succinyltransferase	Actividad 2-Oxoglutarato dehidrogenasa / actividad dihidrolipoamida succiniltransferasa / unión a ácido lipoico / unión a proteína	Ciclo de ácidos tricarbóxicos	Complejo oxoglutarato dehidrogenasa

Tabla II. Proteínas identificadas. (Continuación).

Spot	Proteína	Código de enzima (E.C.)	Código acceso UniProt/NCBI*	Clasificación funcional	Nombre gen	Nombre proteína	Función molecular	Proceso biológico	Localización
PdX18	3-hidroxiacil-CoA deshidrogenasa putativa	1.1.1.-	<b>Q845K0</b>	Metabolismo AFA	<i>paaC</i>	Putative 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase	Actividad oxidorreductasa / unión a coenzima	Oxidación reducción / metabolismo de ácidos grasos	n.d.
PdX19	3-hidroxiacil-CoA deshidrogenasa putativa	1.1.1.-	<b>Q845K0</b>	Metabolismo AFA	<i>paaC</i>	Putative 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase	Actividad oxidorreductasa / unión a coenzima	Oxidación reducción / metabolismo de ácidos grasos	n.d.
LPY3	Factor de elongación de la traducción Tu (EF-Tu)	3.6.5.3	<b>Q4K519</b>	Síntesis de proteínas	<i>tuf1</i>	Elongation factor Tu (EF-Tu)	Actividad GTPasa / unión a GTP	Elongación de la traducción	Citoplasma
LPY5	Hidro-liasa tartrato/fumarato tipo Fe-S, región alfa	4.2.1.2	<b>Q4ZP61</b>	Producción y conversión de energía	<i>fumA</i>	Fe-S type hydro-lyases tartrate / fumarate alpha region:Fe-S type hydro-lyases tartrate / fumarate beta region	Actividad fumarato hidratasa	Ciclo de ácidos tricarbóxicos / fijación de CO <sub>2</sub>	n.d.
LPdX1	RNA polimerasa dirigida porDNA, subunidad Beta	2.7.7.6	ZP_00262276	Transcripción	<i>rpoB</i>	DNA-directed RNA polymerase subunit beta (RNAP subunit beta) / Transcriptase subunit beta / RNA polymerase subunit beta	Actividad RNA polimerasa dirigida por DNA / unión a DNA	Transcripción dependiente de DNA	Citoplasma
LPdX4	Poliribonucleotido nucleotidiltransferasa / Polinucleótido fosforilasa / PNPasa.	2.7.7.8	<b>O87792</b>	Metabolismo de ácidos nucleicos	<i>pnp</i>	Polyribonucleotide nucleotidyltransferase / Polynucleotide phosphorylase (PNPase)	Actividad exoribonucleasa 3'-5' / actividad poliribonucleótido nucleotidiltransferasa / unión a RNA	Procesamiento de RNA / Degradación de mRNA	Citoplasma
LPdX8	Enzima putativa de apertura del anillo	n.d.	<b>Q845J0</b>	Metabolismo AFA	<i>paaN</i>	Putative ring-opening enzyme	Actividad oxidorreductasa	Procesos metabólicos	n.d.
LPdX10	Enzima putativa de apertura del anillo	n.d.	<b>Q845K3</b>	Metabolismo AFA	<i>paaN2</i>	Putative ring-opening enzyme	Actividad oxidorreductasa	Procesos metabólicos	n.d.
LPdX11	IMP dehidrogenasa / GMP reductasa	1.1.1.205 / 1.7.1.7	ZP_00125761	Metabolismo de nucleótidos	<i>guaB/guaC</i>	Inosine-5'-monophosphate dehydrogenase / guanosine-5'-monophosphate reductase	Actividad oxidorreductosa / unión a metal / unión a NADP / unión a potasio	Procesos metabólicos	n.d.

**Tabla II. Proteínas identificadas. (continuación).**

Spot	Proteína	Código de enzima (E.C.)	Código acceso UniProt/NCBI*	Clasificación funcional	Nombre gen	Nombre proteína	Función molecular	Proceso biológico	Localización
LPdX12	Homoserina dehidrogenasa	1.1.1.3	<b>Q88MU8</b>	Metabolismo de aminoácidos	<i>hom</i>	Homoserine dehydrogenase	Actividad homoserina dehidrogenasa / actividad hidroximetilglutaril CoA reductasa (NADPH) / unión a aminoácidos / unión a coenzima	Procesos metabólicos de CoA / biosíntesis de isoleucina, metionina y treonina	n.d.
LPdX13	S-adenosilmetionina sintetasa	2.5.1.6	<b>Q88D60</b>	Metabolismo de aminoácidos	<i>metK</i>	S-adenosylmethionine synthetase / Methionine adenosyltransferase (MAT) / AdoMet synthetase	Actividad metionina adenosil transferasa / unión a ATP / unión a Co / unión a K	Biosíntesis de metionina	Citoplasma
LPdX14	Proteína 5 putativa del complejo de oxidación del anillo	n.d.	<b>Q845J2</b>	Metabolismo AFA	<i>paaK</i>	Putative ring-oxydation complex protein 5	Actividad oxidorreductasa / Cluster de unión a 2Fe y a 2S	Oxidación reducción	n.d.
LPdX15	Factor de elongación de la traducción Tu (EF-Tu)	3.6.5.3	<b>Q88QP8</b>	Síntesis de proteínas	<i>tufA</i>	Elongation factor Tu-A (EF-Tu-A)	Actividad GTPasa / actividad factor de elongación de la traducción / unión a GTP	Elongación de la traducción	Citoplasma
LPdX16	Citrato sintasa, tipo II	2.3.3.1	<b>Q88FA4</b>	Producción y conversión de energía / Metabolismo de carbohidratos	<i>gltA</i>	Citrate synthase	Actividad citrato sintasa	Ciclo de los ácidos tricarbóxicos	Citoplasma
LPdX18	Metilcitrato sintasa	2.3.3.5	ZP_00265711	Producción y conversión de energía / Metabolismo de carbohidratos	<i>prpC</i>	Methylcitrate synthase, putative	Actividad transferasa / transferencia de grupos acil	Ciclo de los ácidos tricarbóxicos	Citoplasma
LPdX19	Proteína 3 putativa del complejo de oxidación del anillo	n.d.	<b>Q845J4</b>	Metabolismo AFA	<i>paaI</i>	Putative ring-oxydation complex protein 3	Actividad oxidorreductasa / unión a metales iónicos de transición	Oxidación reducción	n.d.
LPdX20	Enoil-CoA hidratasa II putativa	4.2.1.17	<b>Q845K1</b>	Metabolismo AFA	<i>paaB</i>	Putative enoyl-CoA hydratase II	Actividad catalítica	Proceso metabólico	n.d.

Tabla II. Proteínas identificadas. (continuación).

Spot	Proteína	Código de enzima (E.C.)	Código acceso UniProt/NCBI*	Clasificación funcional	Nombre gen	Nombre proteína	Función molecular	Proceso biológico	Localización
LPdX23	Isocitrato liasa	4.1.3.1	<b>Q9R9W1</b>	Producción y conversión de energía	<i>aceA</i>	Isocitrate lyase	Actividad isocitrato liasa	Metabolismo de glioxilato y dicarboxilato / ciclo de ácidos tricarbóxicos	n.d.
LPdX24	3-hidroxiacil-CoA deshidrogenasa putativa	1.1.1.-	<b>Q845K0</b>	Metabolismo AFA	<i>paaC</i>	Putative 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase	Actividad oxidorreductasa / unión a coenzima	Metabolismo de ácidos grasos / oxidación reducción	n.d.
LPdX25	Proteína TypA de unión a GTP	3.6.5.3	<b>Q88CY5</b>	Síntesis de proteínas	<i>typA / bipA</i>	GTP-binding protein TypA/BipA	Actividad GTPasa / unión a GTP	Factor de elongación de la traducción / respuesta a estrés	Intracelular
LPdX26	Carbamoil-fosfato sintasa, subunidad grande	6.3.5.5	<b>Q88DU6</b>	Metabolismo de aminoácidos / Metabolismo de nucleótidos	<i>carB</i>	Carbamoyl-phosphate synthase large chain / Carbamoyl-phosphate synthetase ammonia chain	Actividad carbamoil fosfato sintasa / unión a ATP / unión a Mg / unión a Mn	Biosíntesis de arginina / biosíntesis de pirimidina	n.d.
LPdX27	Sacaropina deshidrogenasa	1.5.1.10	<b>Q88IS1</b>	Metabolismo de aminoácidos	<i>sdh</i>	Saccharopine dehydrogenase	Actividad oxidorreductasa / unión a NADP	Biosíntesis de lisina	n.d.
LPC8	2-Fosfoglicerato deshidratasa / Enolasa	4.2.1.11	<b>Q88MF9</b>	Metabolismo de carbohidratos	<i>eno</i>	Enolase / 2-phosphoglycerate dehydratase / 2-phospho-D-glycerate hydro-lyase	Actividad fosfopiruvato hidratasa / unión a Mg	Glicólisis / gluconeogénesis	Superficie celular / región extracelular / complejo fosfopiruvato hidratasa
LPC9	Chaperonina Cpn10	n.d.	<b>Q88N56</b>	Plegamiento de proteínas	<i>groS/groES</i>	10 kDa chaperonin / Protein Cpn10 / groES protein	Unión a ATP / chaperona	Plegamiento de proteínas	Citoplasma
LPC10	Proteína de choque térmico CapB	n.d.	<b>P0A105</b>	Transcripción (regulación de la transcripción)	<i>capB</i>	Cold shock protein capB / Cold acclimation protein B	Unión a DNA	Regulación de la transcripción / adaptación a condiciones atípicas	Citoplasma
LPC11	Fosfoenolpirvato carboxiquinasa	4.1.1.49	<b>Q9HTZ7</b>	Metabolismo de carbohidratos	<i>pckA</i>	Phosphoenolpyruvate carboxykinase [ATP] (PEPCK) / PEP carboxykinase / Phosphoenolpyruvate carboxylase	Actividad fosfoenol piruvato carboxiquinasa (ATP) / unión a ATP	Glicólisis / gluconeogénesis / ciclo de ácidos tricarbóxicos	Citoplasma

**Tabla II. Proteínas identificadas. (continuación).**

Spot	Proteína	Código de enzima (E.C.)	Código acceso UniProt/NCBI*	Clasificación funcional	Nombre gen	Nombre proteína	Función molecular	Proceso biológico	Localización
LPpX10	Fosforibosilformilglicinamida ciclo-ligasa / Fosforibosil-aminoimidazol sintasa	6.3.3.1	<b>Q3KFT0</b>	Metabolismo de nucleótidos	<i>purM</i>	Phosphoribosylformylglycinamide cyclo-ligase (AIRS) / Phosphoribosyl-aminoimidazole synthetase / AIR synthase	Actividad fosforibosilformilglicinamida ciclo-ligasa	Biosíntesis de novo de IMP / biosíntesis de purina	Citoplasma
LPpX13	Precursor de azurin	n.d.	<b>Q9F646</b>	Producción y conversión de energía	<i>azu</i>	Azurin [Precursor]	Unión a ión Cu / transporte de electrones	Oxidación reducción	n.d.
LPpX17	Factor trigger (factor de activación)	5.2.1.8	<b>Q1ICA9</b>	Transporte de aminoácidos y proteínas / plegamiento de proteínas	<i>tig</i>	Trigger factor (TF)	Actividad peptidil-propil cis-trans isomerasa / chaperona	Ciclo celular / división celular / transporte de proteínas / plegamiento de proteínas	n.d.
LPpX18	Fumarato hidratasa putativa, clase I	4.2.1.2	<b>Q48EL9</b>	Producción y conversión de energía	<i>fumA</i>	Fumarate hydratase, class I, putative	Actividad fumarato hidratasa	Ciclo de ácidos tricarbóxicos / fijación de CO <sub>2</sub>	n.d.
LPpX19	Lisil-tRNA sintetasa / Lisina-tRNA ligasa	6.1.1.6	<b>Q886S6</b>	Síntesis de proteínas	<i>lysS</i>	Lysyl-tRNA synthetase (LysRS) / Lysine--tRNA ligase	Actividad lisina tRNA ligasa / unión a ATP / unión a Mg / unión a ácidos nucleicos	Aminoacilación lisil tRNA	Citoplasma
LPpX20	Glicil-tRNA sintetasa, cadena beta	6.1.1.14	<b>Q1IH28</b>	Síntesis de proteínas	<i>glyS</i>	Glycyl-tRNA synthetase beta subunit (GlyRS) / Glycine--tRNA ligase beta subunit	Actividad arginina tRNA ligasa / actividad glicina tRNA ligasa / unión a ATP	Aminoacilación arginil tRNA / aminoacilación glicil tRNA	Citoplasma
LPpX21	Transportador de aminoácidos de cadena ramificada tipo ABC	n.d.	ZP_00900351	Transporte de proteínas y aminoácidos	<i>braC</i>	Branched-chain amino acid ABC transporter, periplasmic amino acid-binding protein	Transporte de aminoácidos	Transporte de aminoácidos	Membrana externa, unión al espacio periplásmico

Tabla II. Proteínas identificadas. (continuación).

Spot	Proteína	Código de enzima (E.C.)	Código acceso UniProt/NCBI*	Clasificación funcional	Nombre gen	Nombre proteína	Función molecular	Proceso biológico	Localización
LPpXI5	ATP sintasa F1, subunidad Beta	3.6.3.14	ZP_01639168	Producción y conversión de energía	<i>atpD</i>	ATP synthase subunit beta / F-ATPase subunit beta / ATP synthase F1 sector subunit beta	Actividad ATP sintasa por transporte de ión H, mecanismo rotacional / actividad ATPasa por transporte de ión H, mecanismo rotacional/ actividad ATPasa exportando iones H, mecanismo fosforilativo / unión a ATP / unión a metales ionicos	Síntesis de ATP en la membrana acoplado a transporte de protones	Membrana plasmática, integrado en la membrana / Centro catalítico F1 (complejo de síntesis de ATP por transporte de protones)
LPpXI8	RNA polimerasa dirigida por DNA, subunidad alfa	2.7.7.6	<b>Q889U6</b>	Transcripción	<i>rpoA</i>	DNA-directed RNA polymerase subunit alpha / RNAP subunit alpha / Transcriptase subunit alpha / RNA polymerase subunit alpha	Actividad RNA polimerasa dirigida por DNA / proteína con actividad de dimerización / unión a DNA	Transcripción dependiente de DNA	Citoplasma
LPpXI9	Chaperonina Cpn60	n.d.	ZP_00902778	Plegamiento de proteínas	<i>groL/groEL</i>	60 kDa chaperonin / Protein Cpn60 / groEL protein	Unión a ATP / unión a proteínas desplegadas / chaperona	Plegamiento de proteínas	Citoplasma
LPpXI12	Citrato sintasa I	2.3.3.1	ZP_00899699	Producción y conversión de energía / Metabolismo de carbohidratos	<i>gltA</i>	Citrate synthase	Actividad citrato sintasa	Ciclo de ácidos tricarboxílicos	Citoplasma
LPpXI13	Flavoproteína, transferencia de electrones, subunidad alfa.	n.d.	<b>Q4KFP3</b>	Producción y conversión de energía	<i>etfA</i>	Electron transfer flavoprotein, alpha subunit	Transporte de electrones / unión a FAD	Oxidación reducción	n.d.
LPpXI14	Carboxil Acetil-CoA portadora de biotina	6.4.1.2	ZP_00899825	Metabolismo de lípidos	<i>accB</i>	Acetyl-CoA carboxylase, biotin carboxyl carrier protein	Actividad acetil CoA carboxilasa / unión a Biotina	Biosíntesis de ácidos grasos	Complejo acetil CoA carboxilasa

\*→ código de acceso de la base de datos UniProt en negrita y del NCBI normal. E. C.: Enzyme Classification, código de clasificación enzimática. n.d.: no determinado.

**Tabla III. Comparaciones de proteínas identificadas en diferentes medios de cultivo y estirpes.** Se muestra la comparación de proteínas identificadas para comprobar la presencia o ausencia.

Spot	Proteína	Nombre gen	M9+GLI			M9+AFA					LB+AFA				
			Y2 <sup>a</sup>	K1 <sup>b</sup>	T2 <sup>c</sup>	Y2 <sup>a</sup>	K1 <sup>b</sup>	T2 <sup>c</sup>	X1 <sup>d</sup>	h X1+I <sup>e</sup>	Y2 <sup>a</sup>	C1 <sup>f</sup>	X1 <sup>d</sup>	h X1+I <sup>e</sup>	h X1 <sup>g</sup>
PT2	Enzima de apertura del anillo putativa	<i>paaN</i>	-	-	-	++	-	+++	+++	++	-	-	+++	-	-
PT3	Enzima de apertura del anillo putativa	<i>paaN2</i>	-	-	-	++	-	+++	+++	++	-	-	+++	-	-
PT4	3-hidroxiacil-CoA deshidrogenasa putativa	<i>paaC</i>	-	-	-	++	-	+++	+++	++	-	-	+++	-	-
PT5	Fenilacetato-CoA ligasa	<i>paaF</i>	-	-	-	+++	-	+++	+++	++	-	-	++	-	-
PT6	Enoil-CoA hidratasa II putativa	<i>paaB</i>	-	-	-	++	-	+++	+++	++	-	-	++	-	-
PT11	Fosforibosil - formilglicinamida sintasa	<i>purL</i>	+++	+++	+++	+++	++	+++	++	++	+	+	++	+++	++
PT12	Carbamoil-fosfato sintasa, subunidad grande glutamina dependiente	<i>carB</i>	+	+	+++	+++	+	+++	-	-	+	+	+++	-	+++
PT13a	Proteína de choque térmico, Hsp90	<i>htpG</i>	+++	-	-	-	+++	+++	-	-	+++	++	+++	-	+++
PT13b	Proteína de choque térmico, Hsp90	<i>htpG</i>	++	+++	+++	+++	-	+++	+++	+++	-	-	+	+++	-
PT14	Argininosuccinato sintasa	<i>argG</i>	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	++	++	++	++
PT15	Cisteina desulfurasa	<i>iscS</i>	+	+	++	+++	+++	+++	++	++	+	-	+	+	++
PT16	Oxidoreductasa vinculada a FAD/NAD(P)	<i>fpr/flxR</i>	+	+	+	+++	+	+++	++	-	+	+	+	+	+
PT18	Succinil-CoA sintasa, subunidad alfa	<i>sucD</i>	+++	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
PT19	N-acetil-gamma-glutamil-fosfato reductasa	<i>argC1</i>	+++	++	+	+++	+++	+++	+++	++	n.d.	n.d.	+	+	+
PK1	Enzima de apertura del anillo putativa	<i>paaN3</i>	-	-	-	+	+++	-	-	+	-	-	-	-	-
PK3	Chaperonina Chp60	<i>groL/groEL</i>	+++	+++	+++	+	++	+	+++	+++	+	-	+++	+++	-
PK4	Chaperonina Chp60	<i>groL/groEL</i>	+++	-	++	-	+++	+	++	+++	+	-	-	-	+++
PK5	Piruvato deshidrogenasa, componente E1	<i>aceE</i>	-	+++	+	-	+++	+	-	+	-	-	+	-	-
PK6a	ATP sintasa F1, subunidad alfa	<i>atpA</i>	+++	++	++	+++	++	+++	+++	+++	++	+	++	+++	+++
PK6b	Isocitrato liasa	<i>aceA</i>	-	++	-	+++	+++	+++	+++	+++	-	-	-	-	-

Tabla III. Comparaciones de proteínas identificaciones en diferentes medios de cultivo y estirpes. (Continuación).

Spot	Proteína	Nombre gen	M9+GLI			M9+AFA					LB+AFA				
			Y2 <sup>a</sup>	K1 <sup>b</sup>	T2 <sup>c</sup>	Y2 <sup>a</sup>	K1 <sup>b</sup>	T2 <sup>c</sup>	X1 <sup>d</sup>	h X1+I <sup>e</sup>	Y2 <sup>a</sup>	C1 <sup>f</sup>	X1 <sup>d</sup>	h X1+I <sup>e</sup>	h X1 <sup>g</sup>
PK7	Hidroxiacil-CoA deshidrogenasa putativa	<i>paaC2</i>	-	-	-	+	+++	-	-	-	-	-	-	-	-
PK8	Fenilacetato-CoA ligasa putativa	<i>paaF3</i>	-	-	-	+	+++	-	-	+	-	-	-	-	-
PK10	Acetolactato sintasa, subunidad grande	<i>ilvB</i>	-	++	-	-	+++	-	-	-	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
PK11	Succinil-CoA sintasa, subunidad Beta	<i>sucC</i>	+++	+++	+++	+++	+	+++	++	+++	++	-	+	+++	+
PK12	Glutamina sintasa, tipo I	<i>glnA</i>	+++	++	+	+	+++	+	-	-	+	++	++	-	++
PK13	RNA polimerasa dirigida por DNA, subunidad alfa	<i>rpoA</i>	+++	+++	+++	+++	+	+	+++	+	+	+	+	+++	+
PK14	Chaperonina Cpn60	<i>groL/groEL</i>	+++	+++	+++	+	++	+	+++	+++	+	-	+++	+++	-
PK16	Factor de elongación Ts (EF-Ts)	<i>tsf</i>	+++	+++	+++	+++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
PK17	Ketotiolasa putativa	<i>paaE2</i>	-	-	-	++	+++	-	-	+	-	-	-	-	-
PK18	Reductoisomerasa ácido-ketol	<i>ilvC</i>	+++	+++	+++	+	++	+++	+++	+++	+	++	++	+++	++
PK19	Succinil-CoA sintetasa, subunidad alfa	<i>sucD</i>	+++	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
PY1	Lisil-tRNA transferasa (clase II)	<i>lysS</i>	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	+	+++	+++	+++	+	+++
PY2	3-Oxoacil sintasa III	<i>fabH</i>	++	++	++	+++	+	++	++	+	+	++	++	+	+++
PpXI3	Citrato sintasa I	<i>gltA</i>	+++	+++	+++	n.d.	+	++	+++	+++	+++	n.d.	+++	+++	++
PpXI5	Hidroxiacil-CoA deshidrogenasa putativa	<i>paaC</i>	-	-	-	++	-	+++	+++	+++	-	-	+++	-	-
PdX2	Hidrolasa, tipo Fe-S, subfamilia tartrato/fumarato, región alfa	<i>fumA</i>	+++	+++	+++	++	+++	+++	+++	+	+++	+++	++	+++	+++
PdX3	2-Isopropilmalato sintasa	<i>leuA</i>	++	+++	+++	++	+++	+++	+++	+	-	-	+	+	+
PdX4	ATP sintasa F1, subunidad alfa	<i>atpA</i>	+++	+++	++	++	-	+++	+++	++	-	-	+++	+	+++
PdX5	Dihidrolipoamida deshidrogenasa	<i>lpdA</i>	+++	+++	++	++	+++	++	+++	+++	+++	+	+	+++	++
PdX6	Precursor de Chaperona surA, (Peptidil-prolil cis-trans isomerasa surA)	<i>surA</i>	++	+	++	+++	++	+++	+++	+	+++	+++	+++	+	++

Tabla III. Comparaciones de proteínas identificaciones en diferentes medios de cultivo y estirpes. (Continuación).

Spot	Proteína	Nombre gen	M9+GLI			M9+AFA					LB+AFA				
			Y2 <sup>a</sup>	K1 <sup>b</sup>	T2 <sup>c</sup>	Y2 <sup>a</sup>	K1 <sup>b</sup>	T2 <sup>c</sup>	X1 <sup>d</sup>	h X1+I <sup>e</sup>	Y2 <sup>a</sup>	C1 <sup>f</sup>	X1 <sup>d</sup>	h X1+I <sup>e</sup>	h X1 <sup>g</sup>
PdX8	Fructosa-bisfosfato aldolasa de clase II	<i>fbxA</i>	+++	+++	+++	++	+++	+++	+++	+	+++	++	-	++	++
PdX13	Proteína 3 putativa del complejo de oxidación del anillo	<i>paal</i>	-	-	-	+	-	++	+++	+	-	-	+++	-	-
PdX14	Proteína 3 putativa del complejo de oxidación del anillo	<i>paal</i>	-	-	-	+	-	++	+++	+	-	-	+	-	-
PdX15	2-Oxoglutarato dehidrogenasa / Dihidrolipoamida succiniltransferasa	<i>sucB</i>	+++	+++	+++	+++	+++	-	+++	++	-	+	+	+++	+
PdX18	3-hidroxiacil-CoA deshidrogenasa putativa	<i>paac</i>	-	-	-	++	-	+++	+++	++	-	-	+++	-	-
PdX19	3-hidroxiacil-CoA deshidrogenasa putativa	<i>paac</i>	-	-	-	++	-	+++	+++	++	-	-	+++	-	-
LPY3	Factor de elongación de la traducción Tu (EF-Tu)	<i>tufI</i>	+++	+++	+++	n.d.	+++	+++	-	-	+++	n.d.	-	-	-
LPY5	Hidro-liasa tartrato/fumarato tipo Fe-S, región alfa	<i>fumA</i>	++	-	+	n.d.	+	+	+	+	+++	n.d.	+	+	+
LPdX1	RNA polimerasa dirigida por DNA, subunidad Beta	<i>rpoB</i>	-	+	+++	-	-	+++	+	+	+	+	+++	++	++
LPdX4	Poliribonucleotido nucleotidiltransferasa / Polinucleótido fosforilasa / PNPasa.	<i>pnp</i>	+++	++	+++	+++	+	+	-	++	+++	+++	+++	+++	+++
LPdX8	Enzima putativa de apertura del anillo	<i>paaN</i>	-	-	-	++	-	+++	++	++	-	-	+++	-	-
LPdX10	Enzima putativa de apertura del anillo	<i>paaN2</i>	-	-	-	++	-	+++	+++	++	-	-	+++	-	-
LPdX11	IMP dehidrogenasa / GMP reductasa	<i>guaB / guaC</i>	++	+++	-	n.d.	-	+	+++	++	+	+	+++	+++	+++
LPdX12	Homoserina dehidrogenasa	<i>hom</i>	+	+	+++	+	++	++	++	+	+	+	+++	+++	+++
LPdX13	S-adenosilmetionina sintetasa	<i>metK</i>	+++	++	++	+++	-	-	++	-	+	+	+++	+++	++
LPdX4	Poliribonucleotido nucleotidiltransferasa / Polinucleótido fosforilasa / PNPasa.	<i>pnp</i>	+++	++	+++	+++	+	+	-	++	+++	+++	+++	+++	+++

Tabla III. Comparaciones de proteínas identificaciones en diferentes medios de cultivo y estirpes. (Continuación).

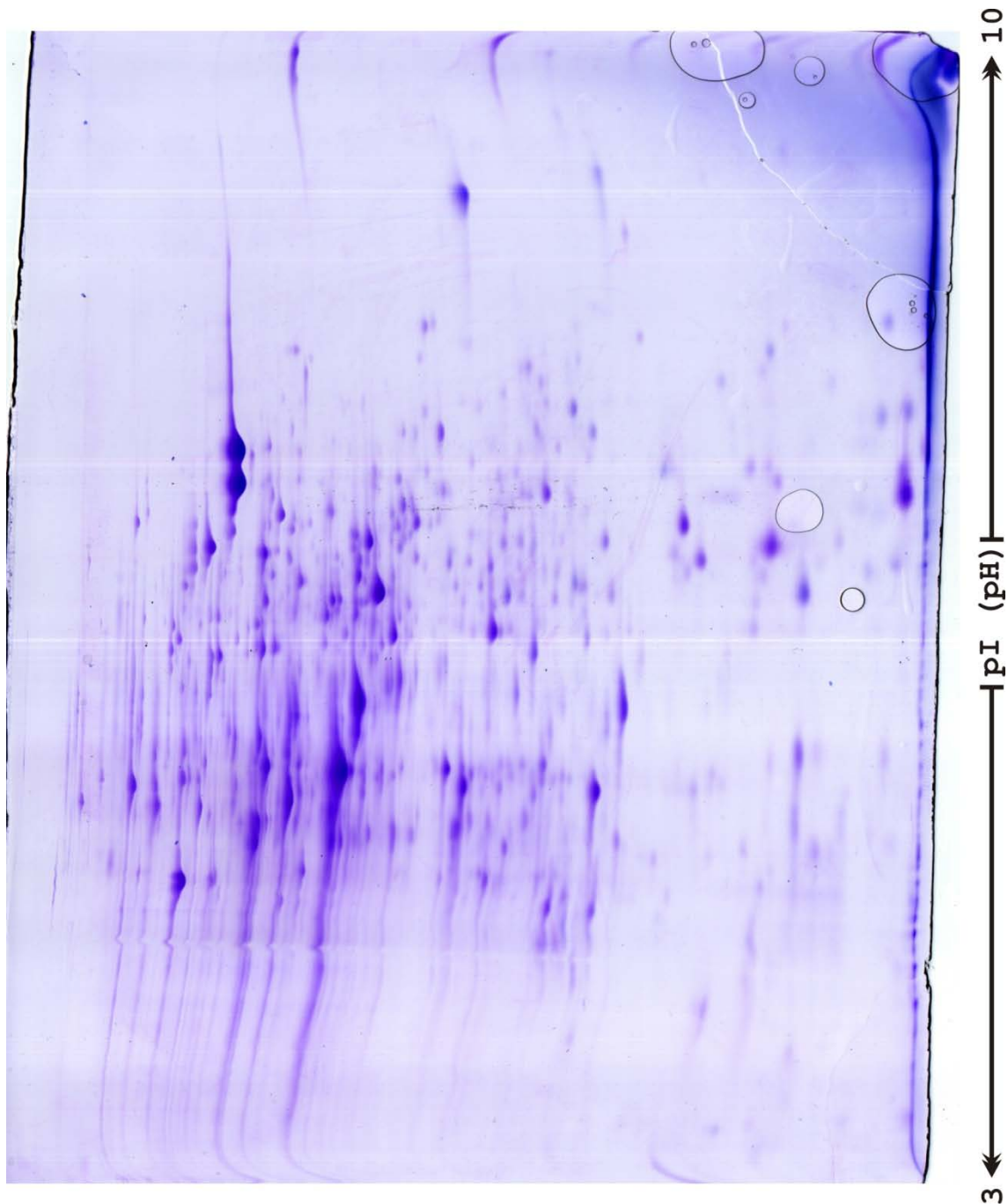
Spot	Proteína	Nombre gen	M9+GLI			M9+AFA					LB+AFA				
			Y2 <sup>a</sup>	K1 <sup>b</sup>	T2 <sup>c</sup>	Y2 <sup>a</sup>	K1 <sup>b</sup>	T2 <sup>c</sup>	X1 <sup>d</sup>	h X1+I <sup>e</sup>	Y2 <sup>a</sup>	C1 <sup>f</sup>	X1 <sup>d</sup>	h X1+I <sup>e</sup>	h X1 <sup>g</sup>
LPdX8	Enzima putativa de apertura del anillo	<i>paaN</i>	-	-	-	++	-	+++	++	++	-	-	+++	-	-
LPdX10	Enzima putativa de apertura del anillo	<i>paaN2</i>	-	-	-	++	-	+++	+++	++	-	-	+++	-	-
LPdX11	IMP dehidrogenasa / GMP reductasa	<i>guaB / guaC</i>	++	+++	-	n.d.	-	+	+++	++	+	+	+++	+++	+++
LPdX12	Homoserina dehidrogenasa	<i>hom</i>	+	+	+++	+	++	++	++	+	+	+	+++	+++	+++
LPdX13	S-adenosilmetionina sintetasa	<i>metK</i>	+++	++	++	+++	-	-	++	-	+	+	+++	+++	++
LPdX14	Proteína 5 putativa del complejo de oxidación del anillo	<i>paaK</i>	-	-	-	++	-	+++	+++	++	-	-	+++	-	-
LPdX15	Factor de elongación de la traducción Tu (EF-Tu)	<i>tufA</i>	+	++	++	+	+++	+++	+	+	+	+	+++	-	-
LPdX16	Citrato sintasa, tipo II	<i>gltA</i>	+++	+++	+++	n.d.	+	++	+++	+++	+++	n.d.	+++	+++	++
LPdX18	Metilcitrato sintasa	<i>prpC</i>	+	+	++	n.d.	+	++	+++	+	+	+	+++	-	-
LPdX19	Proteína 3 putativa del complejo de oxidación del anillo	<i>paaI</i>	-	-	-	+	-	++	+++	+	-	-	+++	-	-
LPdX20	Enoil-CoA hidratasa II putativa	<i>paaB</i>	-	-	-	++	-	+++	+++	++	-	-	+++	-	-
LPdX23	Isocitrato liasa	<i>aceA</i>	+++	+++	+	+++	+++	++	+++	+	++	++	+++	+++	+++
LPdX24	3-hidroxiacil-CoA deshidrogenasa putativa	<i>paaC</i>	-	-	-	++	-	+++	+++	++	-	-	+++	-	-
LPdX25	Proteína TypA de unión a GTP	<i>typA / bipA</i>	+++	+++	++	+++	+	+++	++	++	+++	+++	+++	+++	+++
LPdX26	Carbamoil-fosfato sintasa, subunidad grande	<i>carB</i>	+	+	+++	+++	+	+++	-	-	+	+	+++	-	+++
LPdX27	Sacaropina dehidrogenasa	<i>sdh</i>	+++	++	+++	+++	++	+	-	+	+++	+++	+++	+	+++
LPC8	2-Fosfoglicerato dehidratasa / Enolasa	<i>eno</i>	+++	+	+++	+++	+++	+++	+++	++	+++	+++	+++	+++	+++
LPC9	Chaperonina Cpn10	<i>groS/groES</i>	+++	+++	+++	+++	+++	+++	n.d.	n.d.	+	+++	+	n.d.	+++
LPC10	Proteína de choque térmico CapB	<i>capB</i>	++	++	+++	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	+++	n.d.	n.d.	+++
LPC11	Fosfoenolpiruvato carboxiquinasa	<i>pckA</i>	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+++	+++	+++	+++	+++

**Tabla III. Comparaciones de proteínas identificaciones en diferentes medios de cultivo y estirpes. (Continuación).**

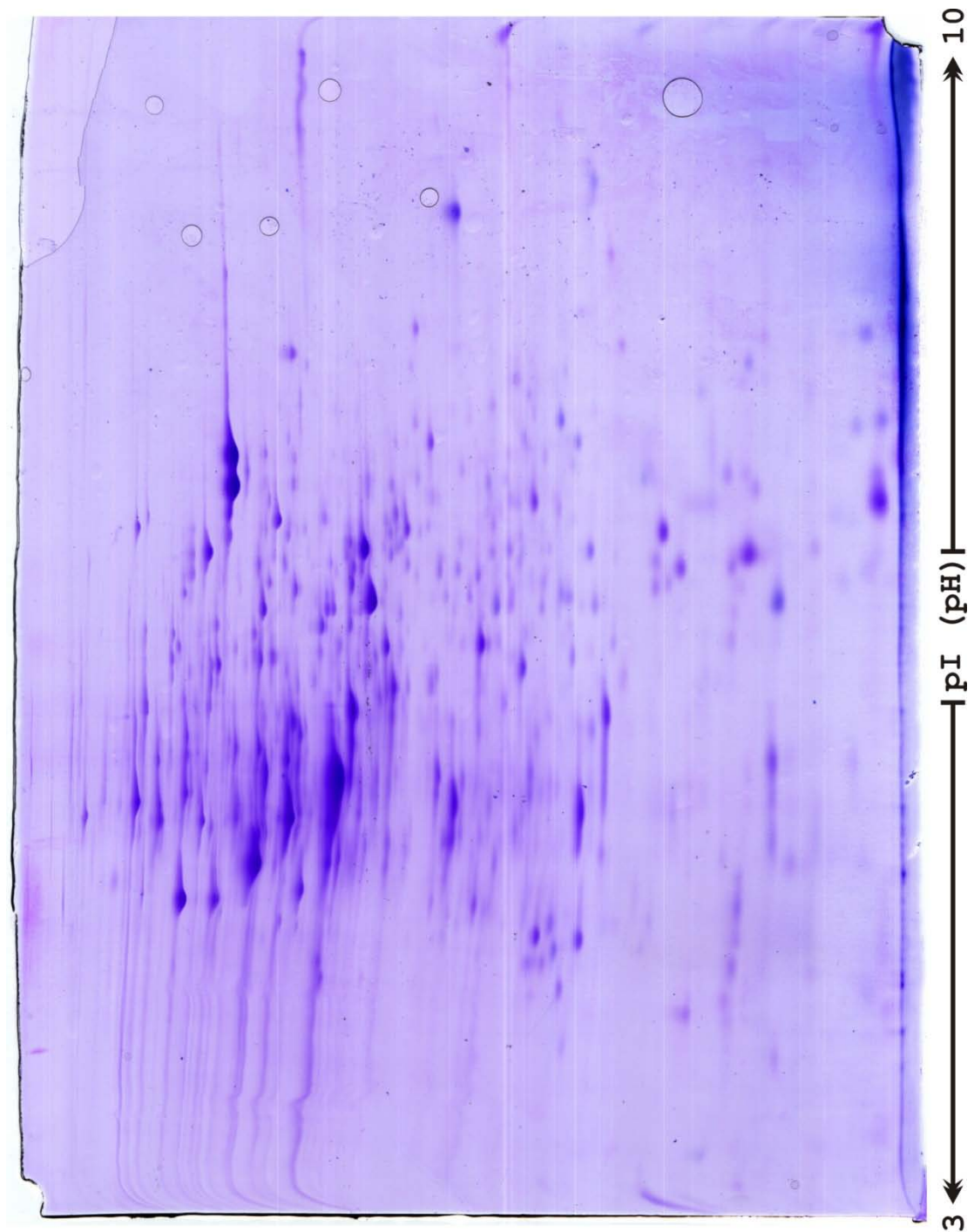
Spot	Proteína	Nombre gen	M9+GLI			M9+AFA					LB+AFA				
			Y2 <sup>a</sup>	K1 <sup>b</sup>	T2 <sup>c</sup>	Y2 <sup>a</sup>	K1 <sup>b</sup>	T2 <sup>c</sup>	X1 <sup>d</sup>	h X1+I <sup>e</sup>	Y2 <sup>a</sup>	C1 <sup>f</sup>	X1 <sup>d</sup>	h X1+I <sup>e</sup>	h X1 <sup>g</sup>
LPpX10	Fosforibosilformilglicinamida ciclo-ligasa / Fosforibosil-aminoimidazol sintasa	<i>purM</i>	+++	+	++	++	+	++	+	+	++	+++	++	+++	+++
LPpX13	Precursor de azurin	<i>azu</i>	+++	+++	+++	n.d.	+++	+++	n.d.	n.d.	++	++	+	+	+++
LPpX17	Factor trigger (factor de activación)	<i>tig</i>	+	+++	+++	+++	+++	++	++	++	+++	+++	+++	++	+++
LPpX18	Fumarato hidratasa putativa, clase I	<i>fumA</i>	+++	+++	+++	++	+++	+++	+++	+	+++	+++	++	+++	+++
LPpX19	Lisil-tRNA sintetasa / Lisina-tRNA ligasa	<i>lysS</i>	+++	+++	+	+++	+++	+	+	+	+++	+++	+++	+	+++
LPpX20	Glicil-tRNA sintetasa, cadena beta	<i>glyS</i>	+	+	+	+	+++	+++	+	+	+	++	+++	+++	+++
LPpX21	Transportador de aminoácidos de cadena ramificada tipo ABC	<i>braC</i>	++	+++	++	+++	+++	+++	+	+	+++	+	+++	++	+++
LPpXI4	Chaperonina Cpn60	<i>groL/groEL</i>	+++	+++	+++	+	++	+	+++	+++	+	-	+++	+++	-
LPpXI5	ATP sintasa F1, subunidad Beta	<i>atpD</i>	+++	+++	+++	++	+++	+++	+++	++	++	++	+	+++	++
LPpXI8	RNA polimerasa dirigida por DNA, subunidad alfa	<i>rpoA</i>	+++	+++	+++	+++	+	++	+++	+	+	+	+	+++	+
LPpXI2	Citrato sintasa I	<i>glT</i>	+++	+++	+++	n.d.	+	++	+++	+++	+++	n.d.	+++	+++	++
LPpXI3	Flavoproteína, transferencia de electrones, subunidad alfa.	<i>etfA</i>	++	+++	++	++	+++	++	+++	+	+++	+++	+++	+++	+++
LPpXI4	Carboxil Acetil-CoA portadora de biotina	<i>accB</i>	-	-	++	+	+	+	+	-	+	+	-	+++	+

**a:** *Pseudomonas* sp. Y2. **b:** *Pseudomonas* sp. Y2K1( $\Delta$ *paal*::Km). **c:** *Pseudomonas* sp. Y2T2 ( $\Delta$ *pa2*::Tc). **d:** *Pseudomonas* sp. Y2T2X1 ( $\Delta$ *pa2*::Tc  $\Delta$ *paax*::Km<sup>R</sup>). **e:** *Pseudomonas* sp. Y2[pVLTX1]+IPTG. **f:** *Pseudomonas* sp. Y2C1 (*crc*::Tc). **g:** *Pseudomonas* sp. Y2[pVLTX1]. **1:** glicerol. **2:** ácido fenilacético. Color verde oscuro: estirpe en la que se recogió la mancha del gel 2-DE correspondiente a la proteína identificada. Color verde claro: presencia de la proteína determinada. Color rojo: ausencia de la proteína determinada. Para determinar la cantidad de proteína expresada se utilizaron los símbolos arbitrarios (+): presencia y (-): ausencia. La cantidad relativa y arbitraria se fijó como (+++): máxima expresión observada y (+): mínima expresión observada. **M9+GLI:** medio mínimo M9 suplementado con glicerol como única fuente de carbono y energía. **M9+AFA:** medio mínimo M9 suplementado con ácido fenilacético como única fuente de carbono y energía. **LB+AFA:** medio rico LB suplementado con ácido fenilacético.

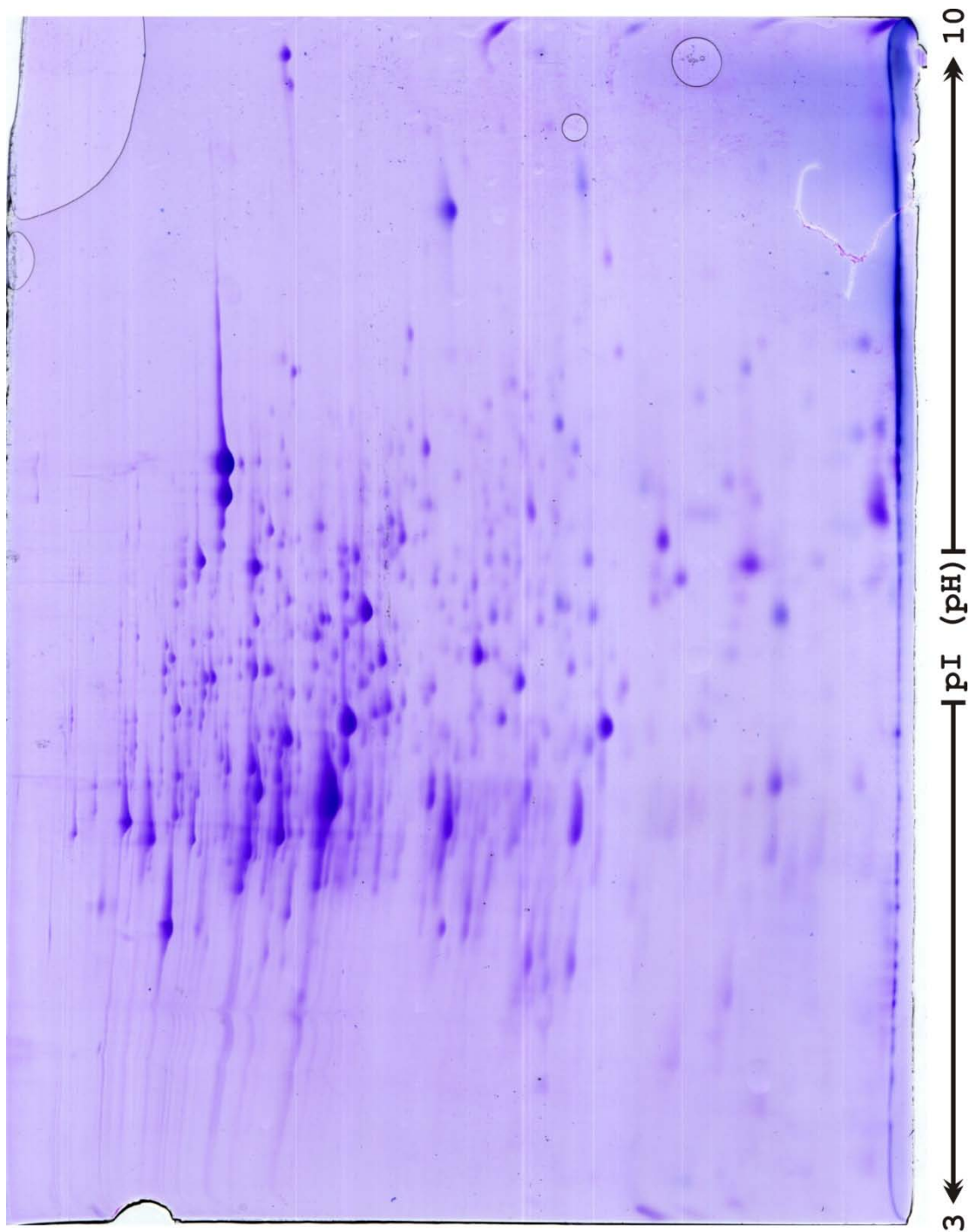
## 8.2. Figuras de geles 2-DE.



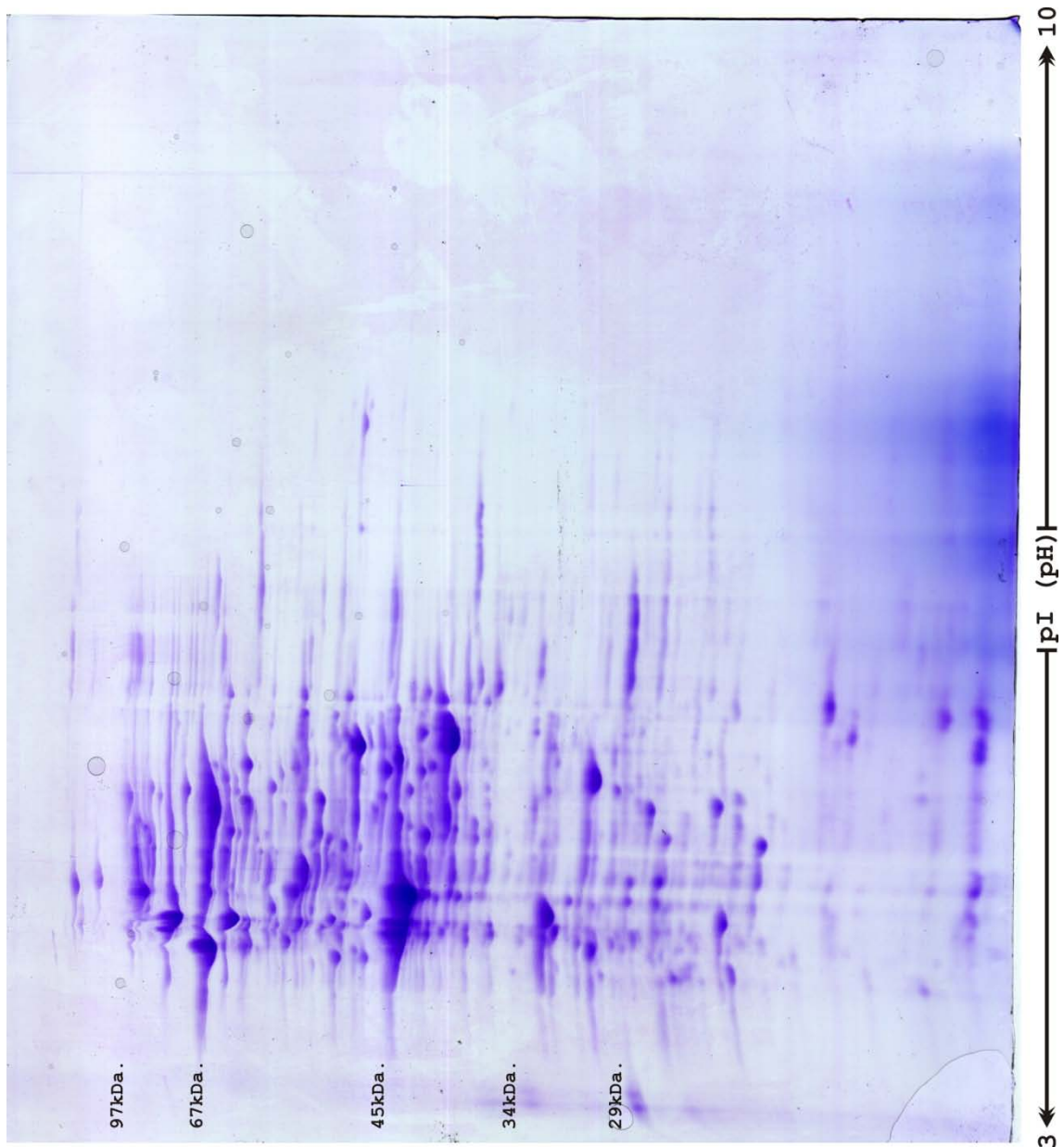
**Figura 8.1. (S310-Y2-G-13).** Imagen de gel 2-DE de 180 x 160 x 0,5 mm y 11% (p/v) de poliacrilamida obtenido a partir de extractos de proteínas de *Pseudomonas* sp. Y2 crecida en medio mínimo M9 + glicerol. El IEE se realizó en *Immobiline™ DryStrip* (Amersham Biosciences) de 18 cm de largo y un gradiente de pH de 3 a 10. Se cargó 100 µg. de extracto total de proteínas. Sin patrón de pesos moleculares. Teñido con azul de Coomassie.



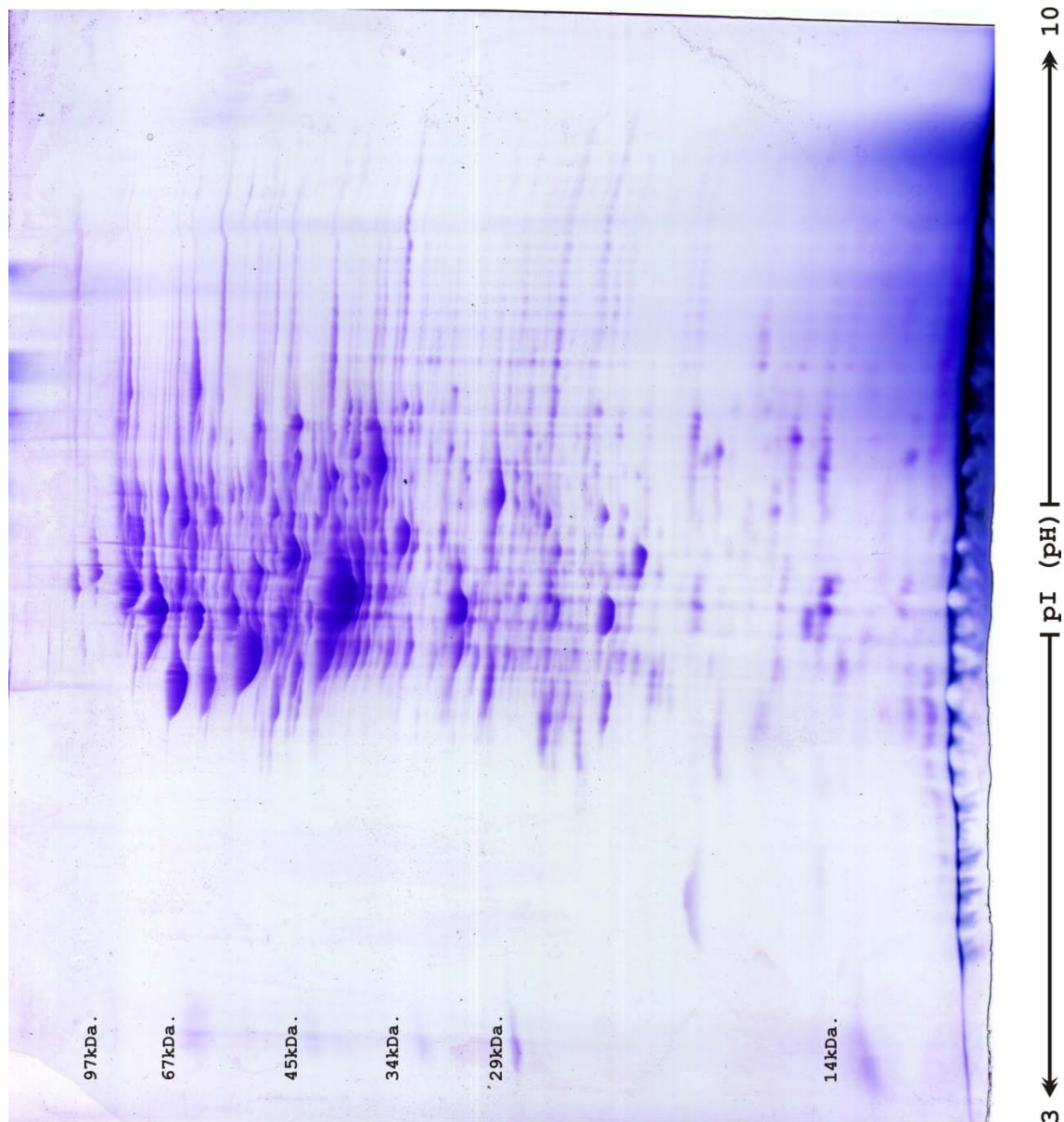
**Figura 8.2. (S310-K1-G-11).** Imagen de gel 2-DE de 180 x 160 x 0,5 mm y 11% (p/v) de poliacrilamida obtenido a partir de extractos de proteínas de *Pseudomonas* sp. Y2K1 crecida en medio mínimo M9 + glicerol. El IEE se realizó en *Immobiline™ DryStrip* (Amersham Biosciences) de 18 cm de largo y un gradiente de pH de 3 a 10. Se cargó 100 µg. de extracto total de proteínas. Sin patrón de pesos moleculares. Teñido con azul de Coomassie.



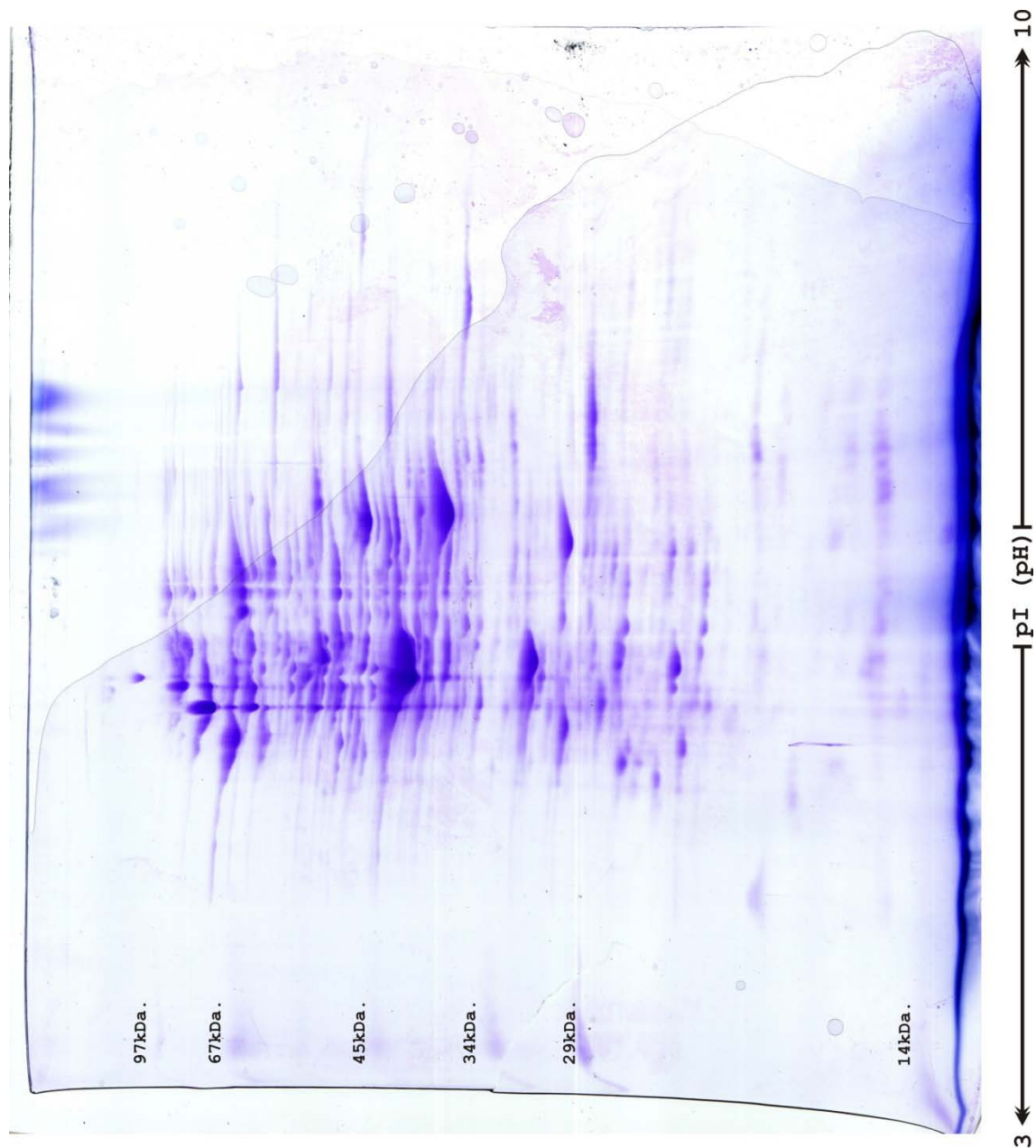
**Figura 8.3. (S310-T2-G-11).** Imagen de gel 2-DE de 180 x 160 x 0,5 mm y 11% (p/v) de poliacrilamida obtenido a partir de extractos de proteínas de *Pseudomonas* sp. Y2T2 crecida en medio mínimo M9 + glicerol. El IEE se realizó en *Immobiline™ DryStrip* (Amersham Biosciences) de 18 cm de largo y un gradiente de pH de 3 a 10. Se cargó 100 µg. de extracto total de proteínas. Sin patrón de pesos moleculares. Teñido con azul de Coomassie.



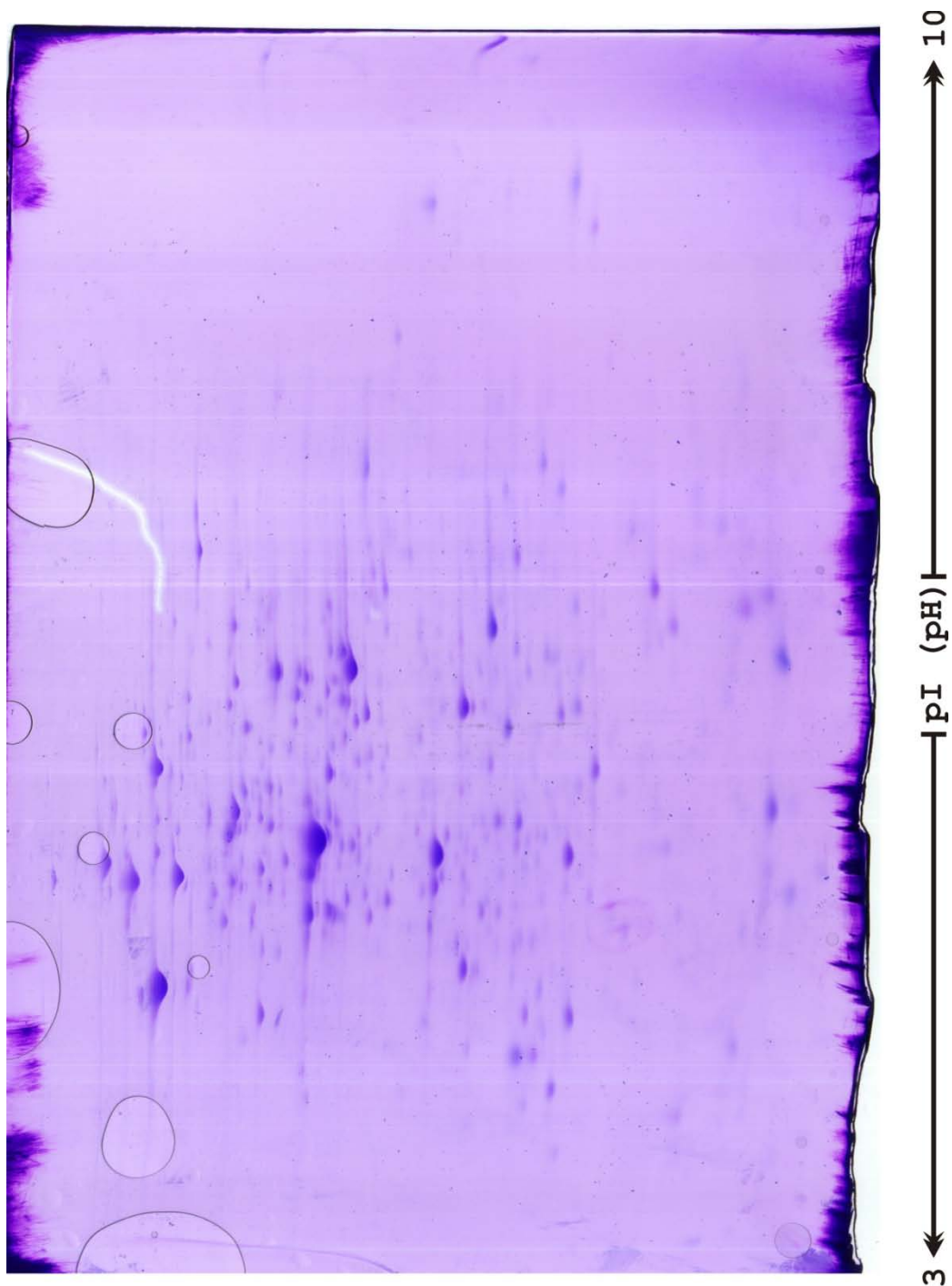
**Figura 8.4. (310-Y2-20,10).** Imagen de gel 2-DE de 200 x 200 x 0,5 mm y 11% (p/v) de poliacrilamida obtenido a partir de extractos de proteínas de *Pseudomonas* sp. Y2 crecida en medio mínimo M9 + AFA. El IEE se realizó en geles en tubo con un gradiente de pH de 3 a 10. Se cargó 350 µg. de extracto total de proteínas. Teñido con azul de Coomassie. Con marcador de pesos moleculares (kDa.) en el margen izquierdo.



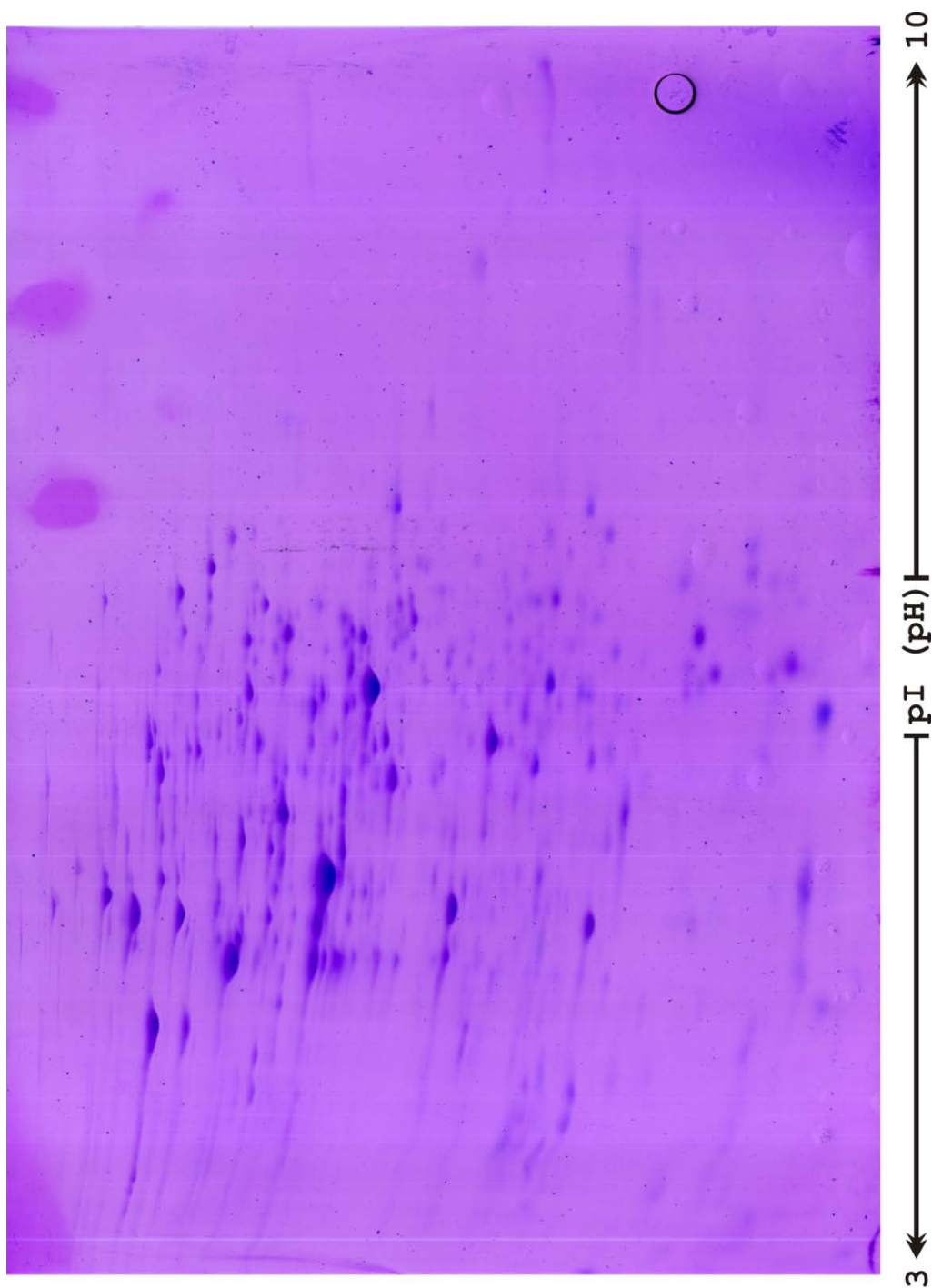
**Figura 8.5. (310-K1-18,10).** Imagen de gel 2-DE de 200 x 200 x 0,5 mm y 11% (p/v) de poliacrilamida obtenido a partir de extractos de proteínas de *Pseudomonas* sp. Y2K1 crecida en medio mínimo M9 + AFA. El IEE se realizó en geles en tubo con un gradiente de pH de 3 a 10. Se cargó 350 µg. de extracto total de proteínas. Teñido con azul de Coomassie. Con marcador de pesos moleculares (kDa.) en el margen izquierdo.



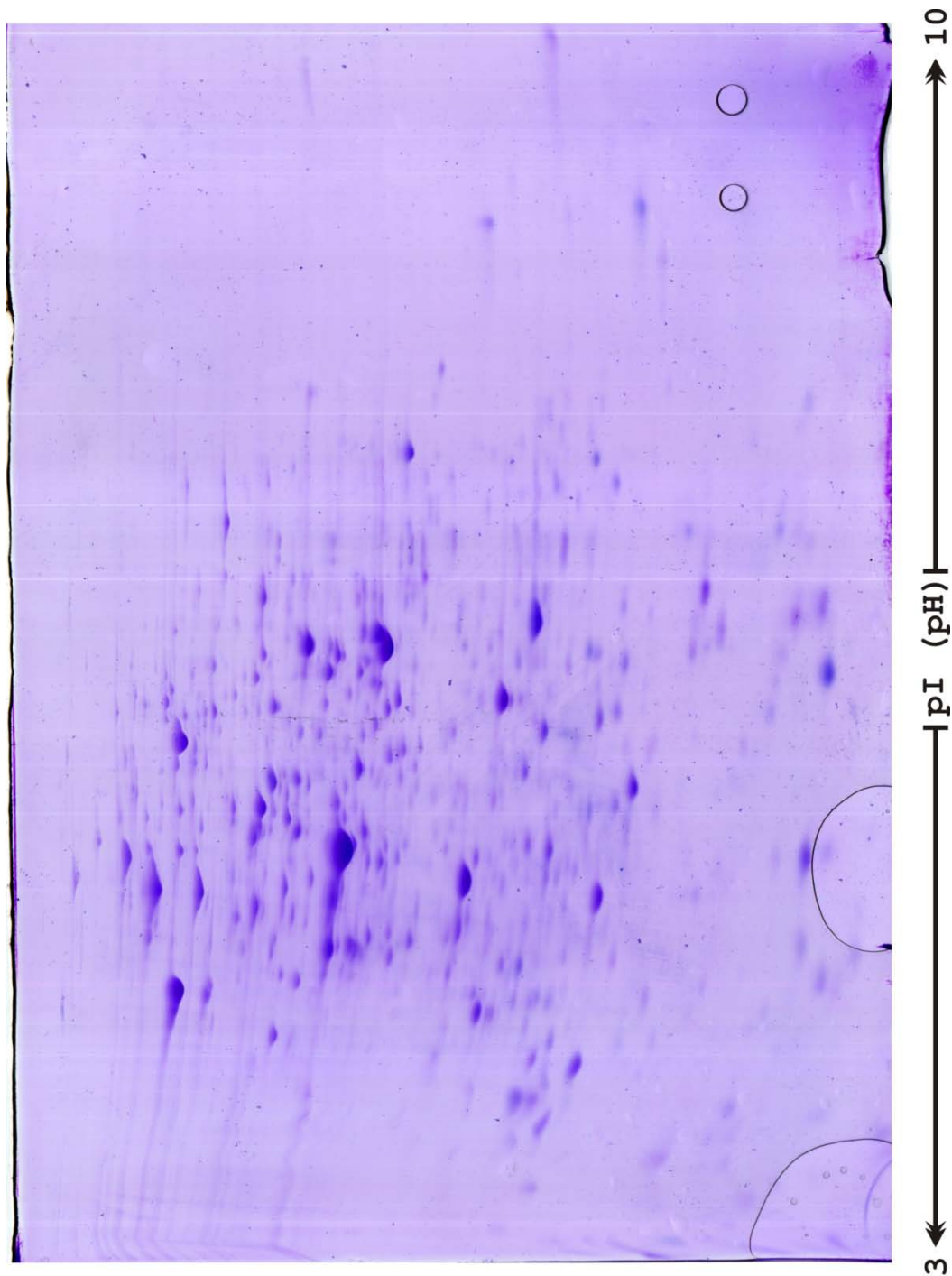
**Figura 8.6. (310-T2-20,10).** Imagen de gel 2-DE de 200 x 200 x 0,5 mm y 11% (p/v) de poliacrilamida obtenido a partir de extractos totales de proteínas de *Pseudomonas* sp. Y2T2 crecida en medio mínimo M9 + AFA. El IEE se realizó en geles en tubo con un gradiente de pH de 3 a 10. Se cargó 350 µg. de extracto total de proteínas. Teñido con azul de Coomassie. Con marcador de pesos moleculares (kDa.) en el margen izquierdo.



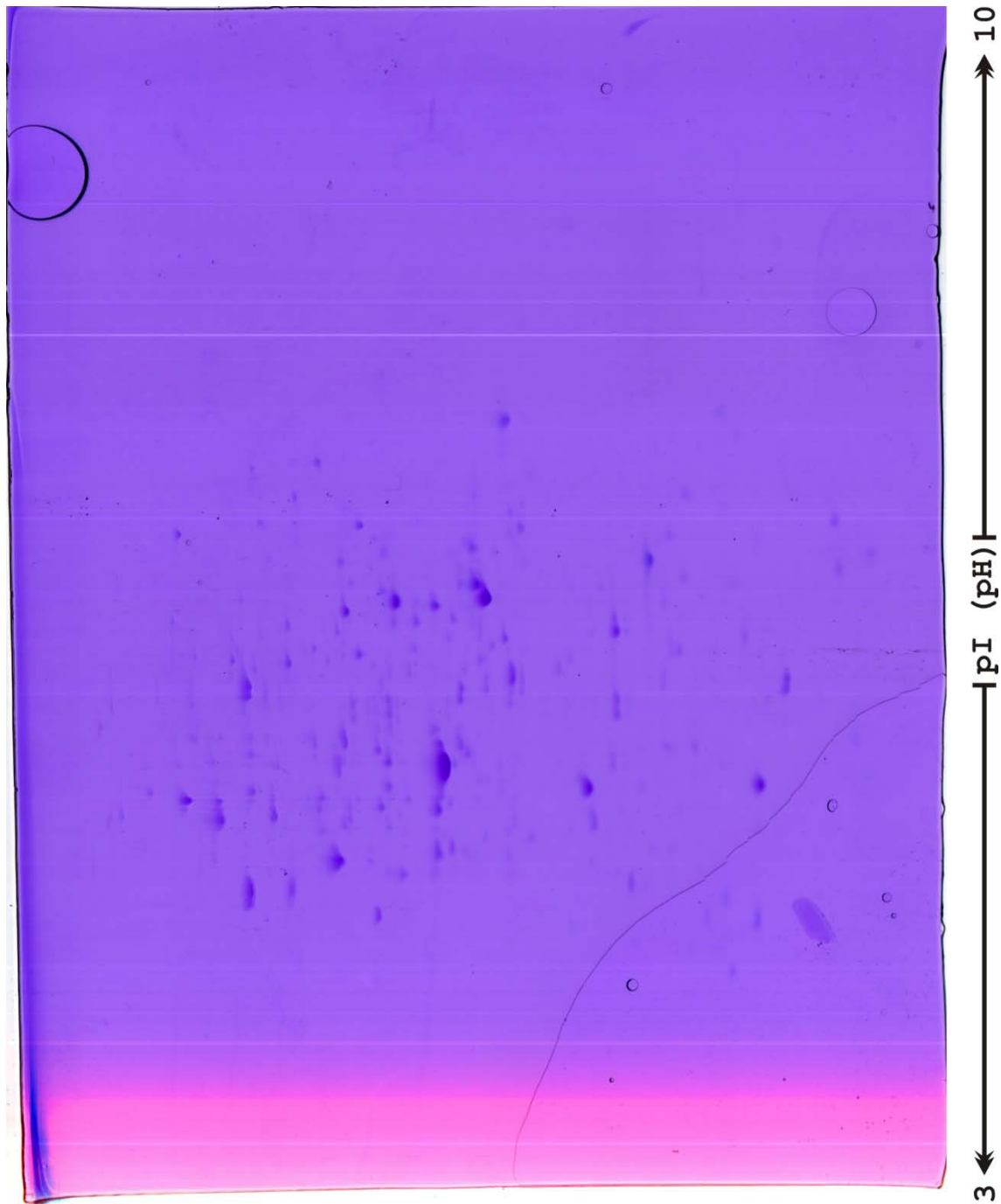
**Figura 8.7. (S310-Y2-P-11).** Imagen de gel 2-DE de 180 x 160 x 0,5 mm y 11% (p/v) de poliacrilamida obtenido a partir de extractos de proteínas de *Pseudomonas* sp. Y2 crecida en medio mínimo M9 + AFA. El IEE se realizó en *Immobiline™ DryStrip* (Amersham Biosciences) de 18 cm de largo y un gradiente de pH de 3 a 10. Se cargó 100 µg. de extracto total de proteínas. Sin patrón de pesos moleculares. Teñido con azul de Coomassie.



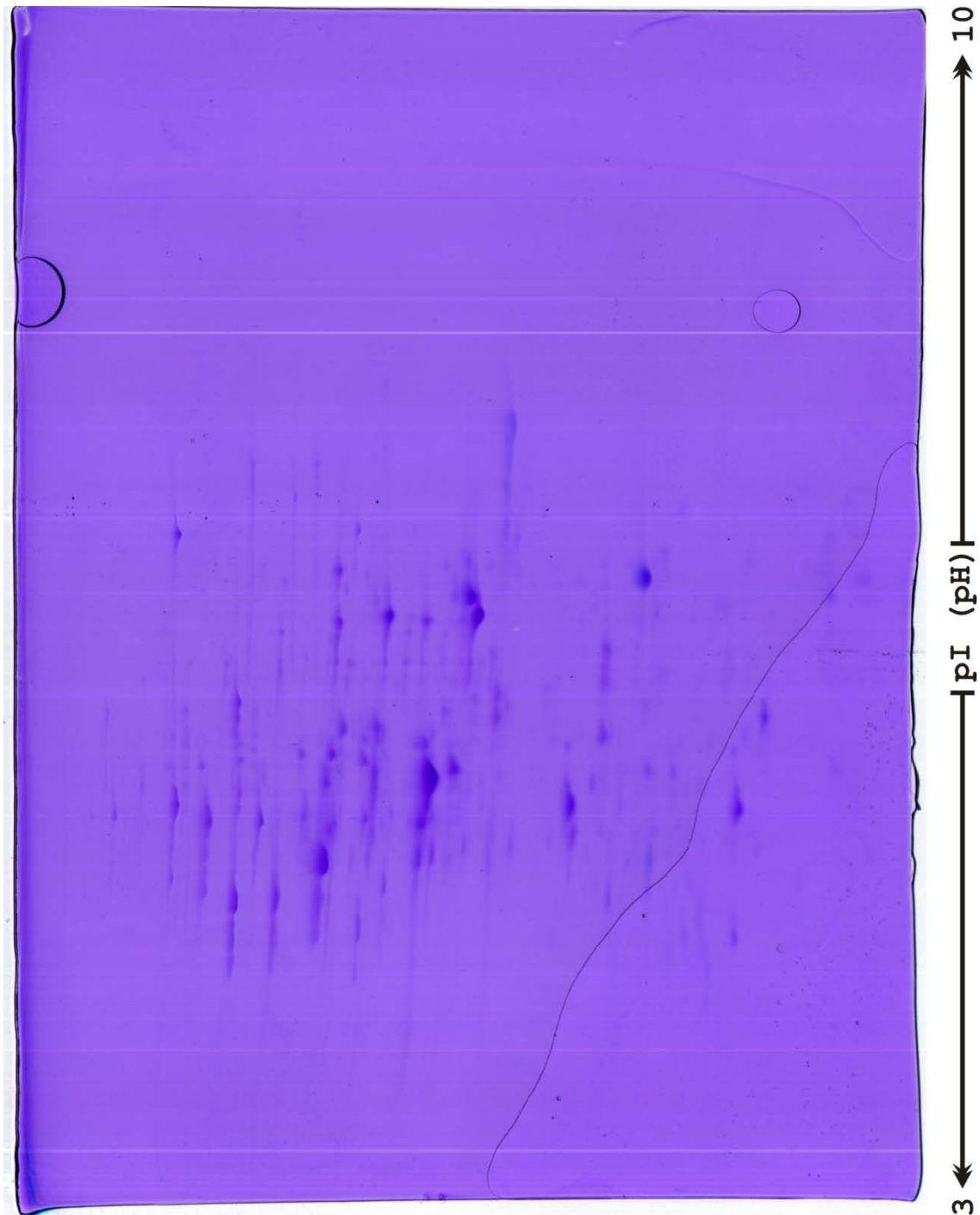
**Figura 8.8. (S310-K1-P-11).** Imagen de gel 2-DE de 180 x 160 x 0,5 mm y 11% (p/v) de poliacrilamida obtenido a partir de extractos de proteínas de *Pseudomonas* sp. Y2K1 crecida en medio mínimo M9 + AFA. El IEE se realizó en *Immobiline™ DryStrip* (Amersham Biosciences) de 18 cm de largo y un gradiente de pH de 3 a 10. Se cargó 100 µg. de extracto total de proteínas. Sin patrón de pesos moleculares. Teñido con azul de Coomassie.



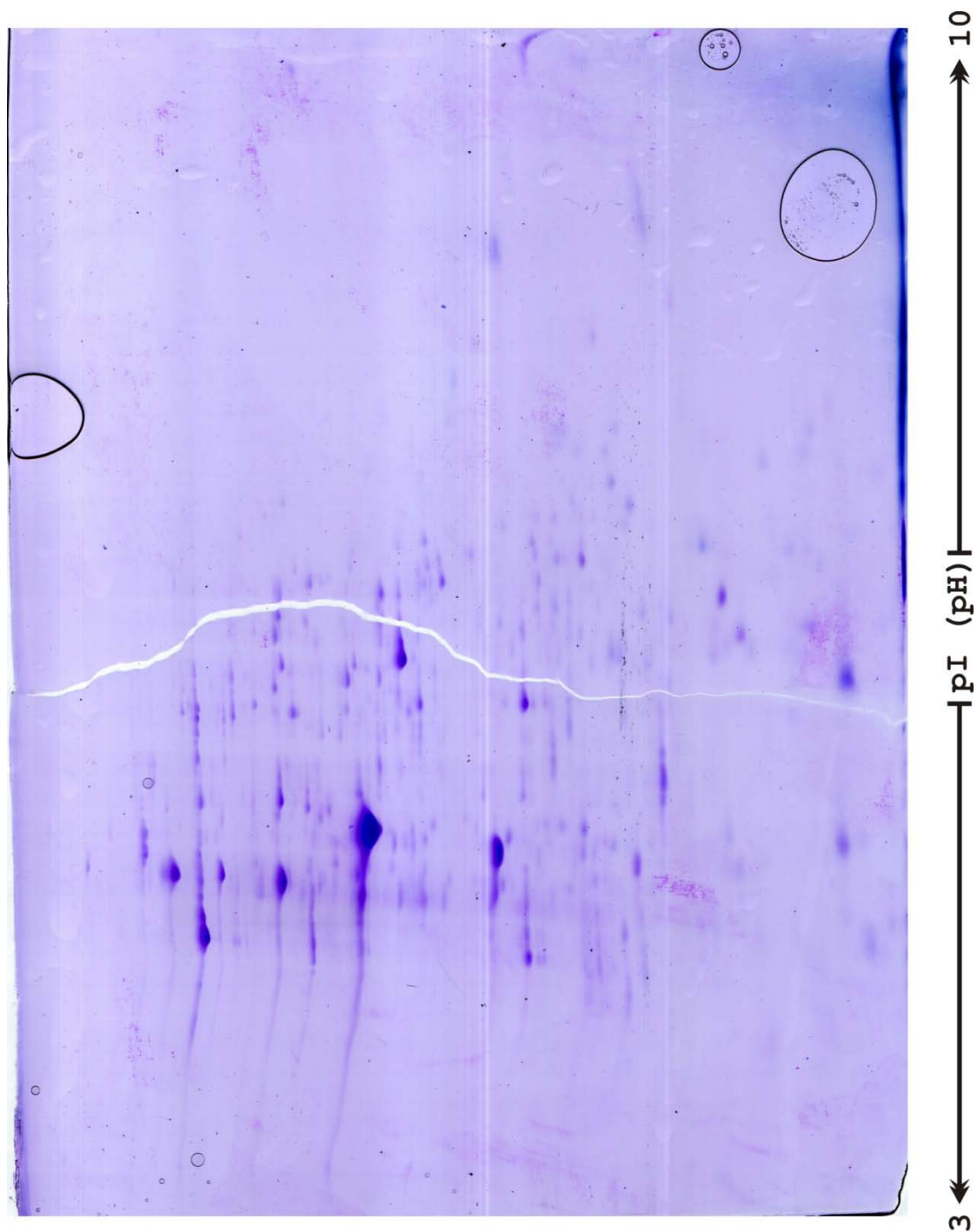
**Figura 8.9. (S310-T2-P-11).** Imagen de gel 2-DE de 180 x 160 x 0,5 mm y 11% (p/v) de poliacrilamida obtenido a partir de extractos de proteínas de *Pseudomonas* sp. Y2T2 crecida en medio mínimo M9 + AFA. El IEE se realizó en *Immobiline™ DryStrip* (Amersham Biosciences) de 18 cm de largo y un gradiente de pH de 3 a 10. Se cargó 100 µg. de extracto total de proteínas. Sin patrón de pesos moleculares. Teñido con azul de Coomassie.



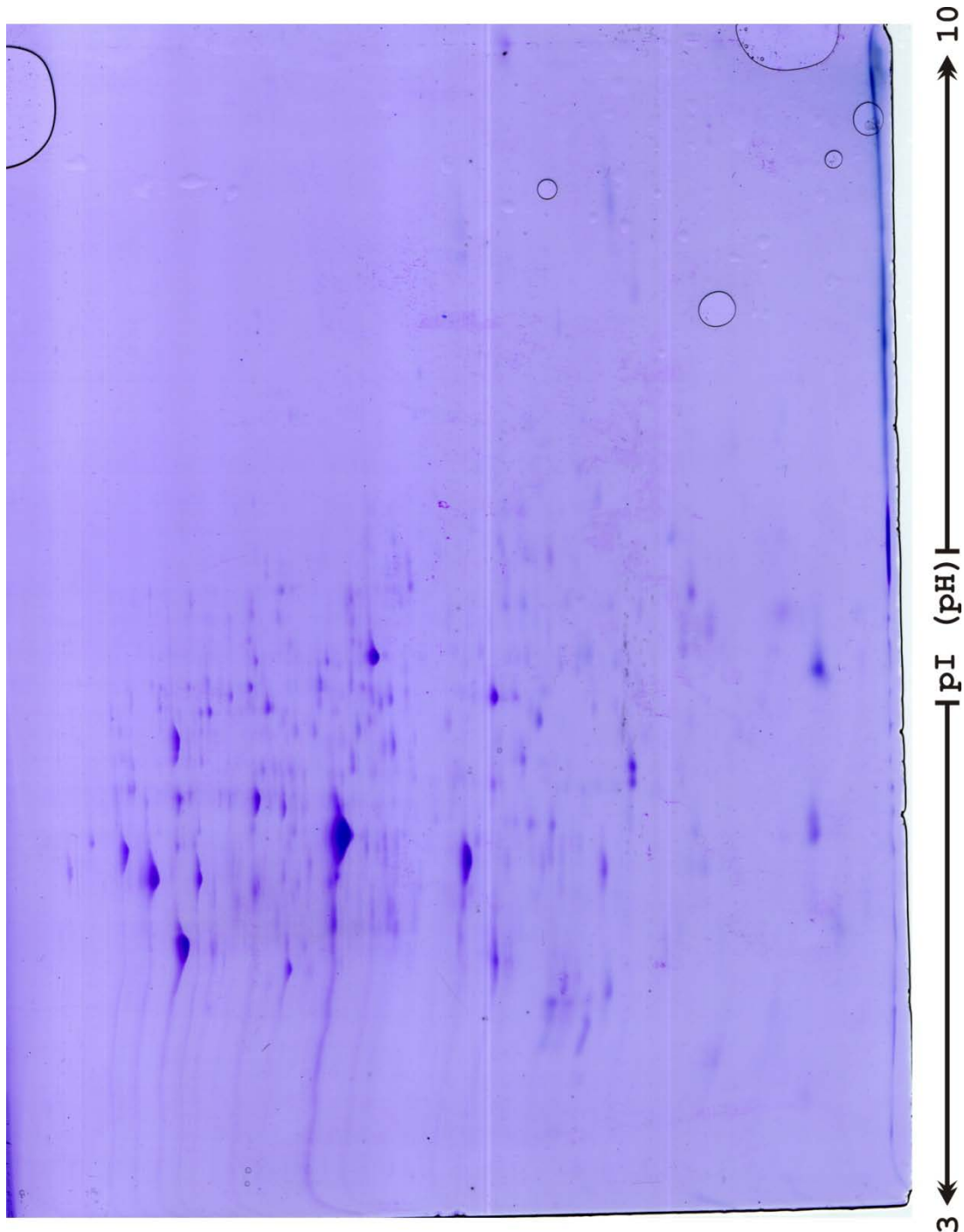
**Figura 8.10. (S310-deltaX-PA-13,12).** Imagen de gel 2-DE de 180 x 160 x 0,5 mm y 11% (p/v) de poliacrilamida obtenido a partir de extractos de proteínas de *Pseudomonas* sp. Y2T2X1 crecida en medio mínimo M9 + AFA. El IEE se realizó en *Immobiline™ DryStrip* (Amersham Biosciences) de 18 cm de largo y un gradiente de pH de 3 a 10. Se cargó 100  $\mu$ g. de extracto total de proteínas. Sin patrón de pesos moleculares. Teñido con azul de Coomassie.



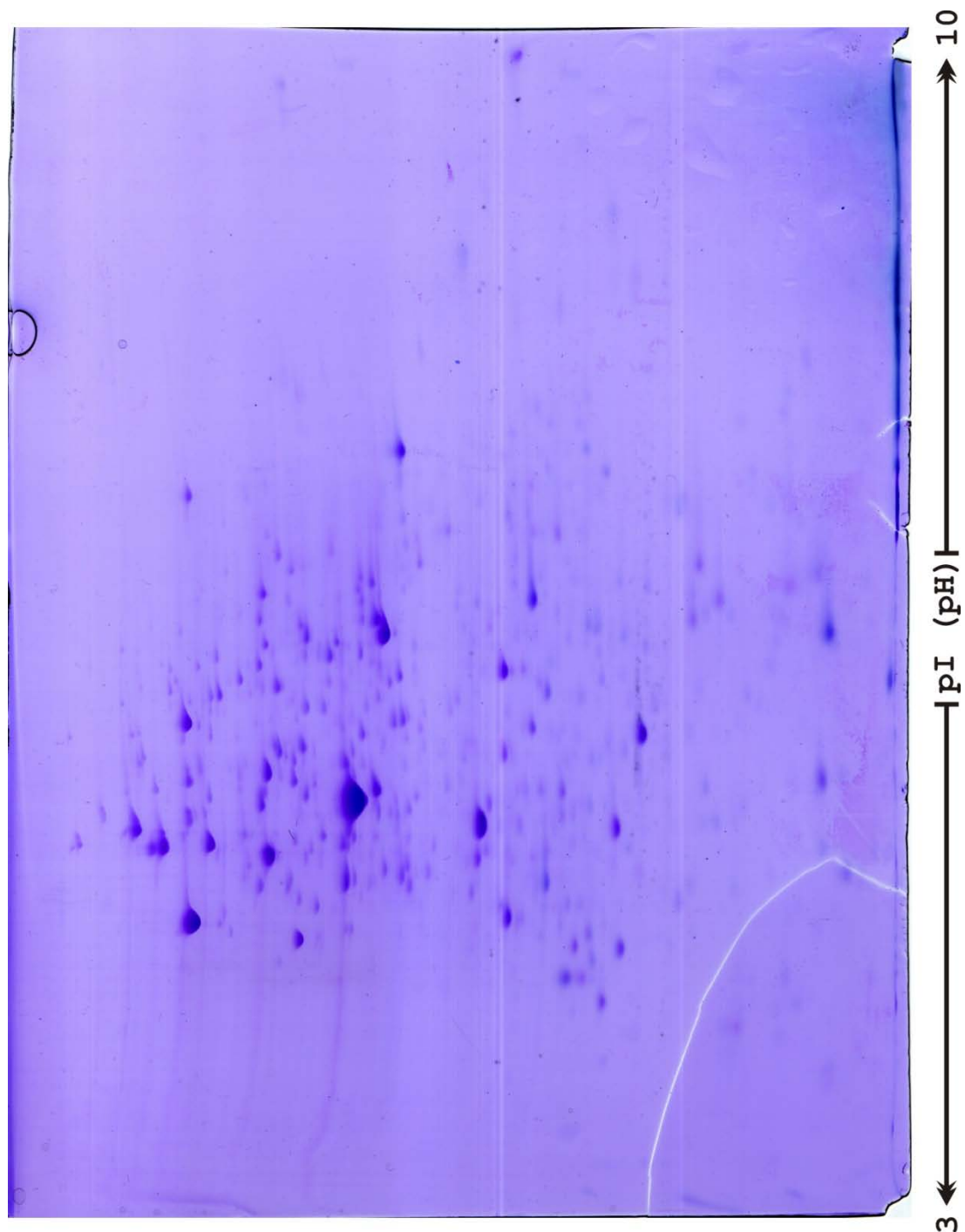
**Figura 8.11. (S310-pVLTX1+IPTG-PA-13,12).** Imagen de gel 2-DE de 180 x 160 x 0,5 mm y 11% (p/v) de poliacrilamida obtenido a partir de extractos de proteínas de *Pseudomonas* sp. Y2 + pVLTX1 crecida en medio mínimo M9 + AFA + IPTG. El IEE se realizó en *Immobiline*<sup>TM</sup> *DryStrip* (Amersham Biosciences) de 18 cm de largo y un gradiente de pH de 3 a 10. Se cargó 100 µg. de extracto total de proteínas. Sin patrón de pesos moleculares. Teñido con azul de Coomassie.



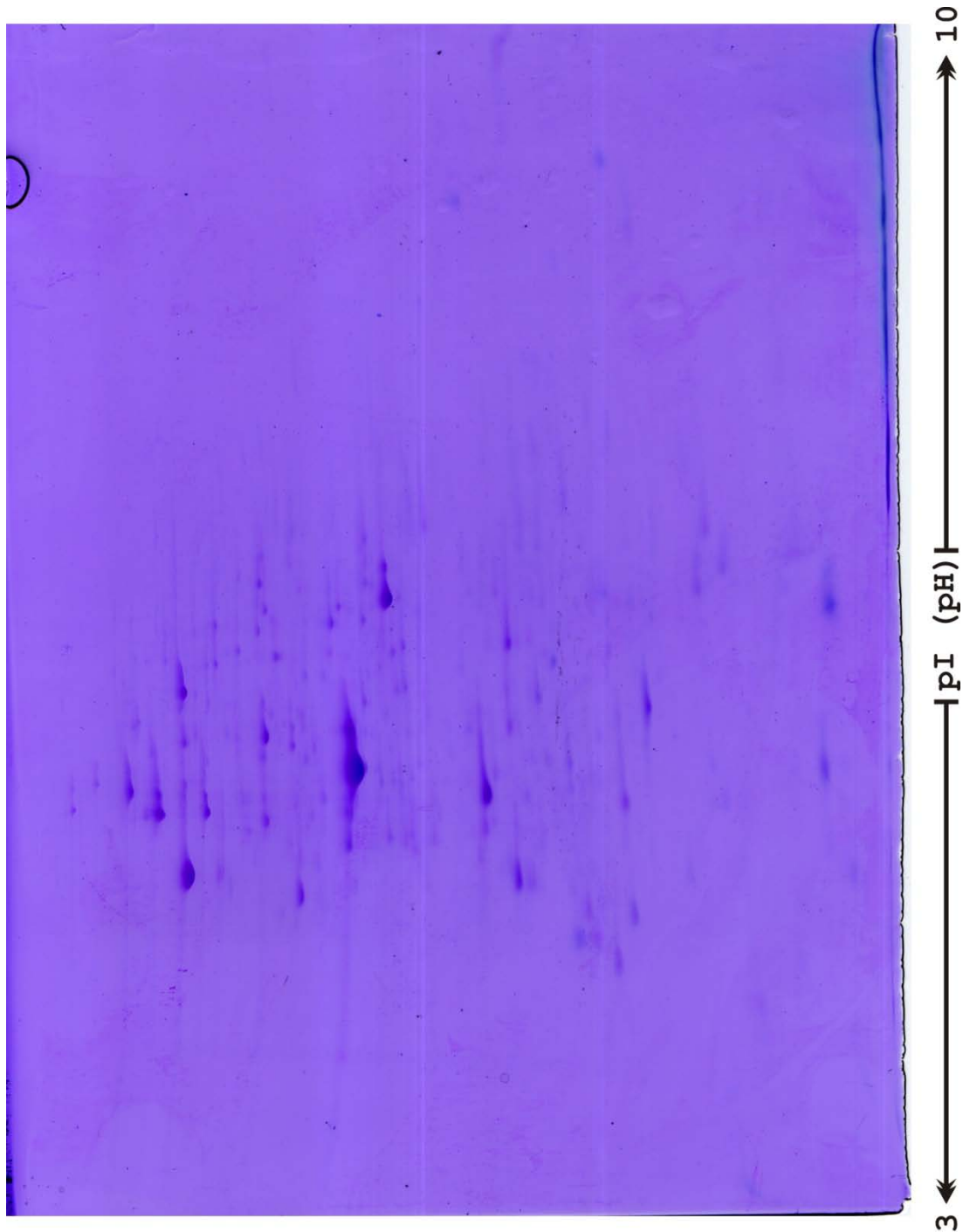
**Figura 8.12. (S310-Y2-LB+PA-16,11).** Imagen de gel 2-DE de 180 x 160 x 0,5 mm y 11% (p/v) de poliacrilamida obtenido a partir de extractos de proteínas de *Pseudomonas* sp. Y2 crecida en medio LB + AFA. El IEE se realizó en *Immobiline™ DryStrip* (Amersham Biosciences) de 18 cm de largo y un gradiente de pH de 3 a 10. Se cargó 100 µg. de extracto total de proteínas. Sin patrón de pesos moleculares. Teñido con azul de Coomassie.



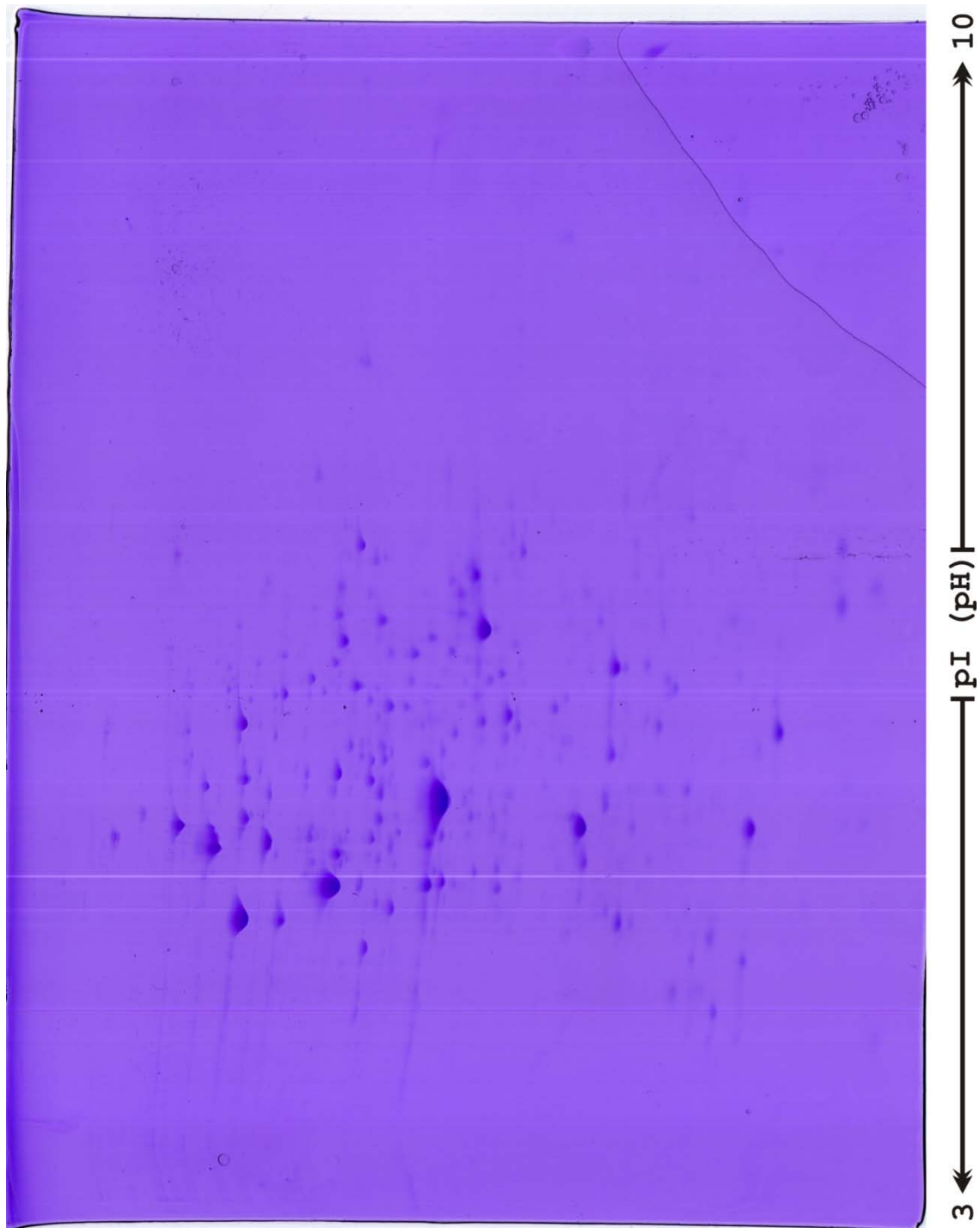
**Figura 8.13. (S310-C1-LB+PA-16,11).** Imagen de gel 2-DE de 180 x 160 x 0,5 mm y 11% (p/v) de poliacrilamida obtenido a partir de extractos de proteínas de *Pseudomonas* sp. Y2C1 crecida en medio LB + AFA. El IEE se realizó en *Immobiline™ DryStrip* (Amersham Biosciences) de 18 cm de largo y un gradiente de pH de 3 a 10. Se cargó 100 µg. de extracto total de proteínas. Sin patrón de pesos moleculares. Teñido con azul de Coomassie.



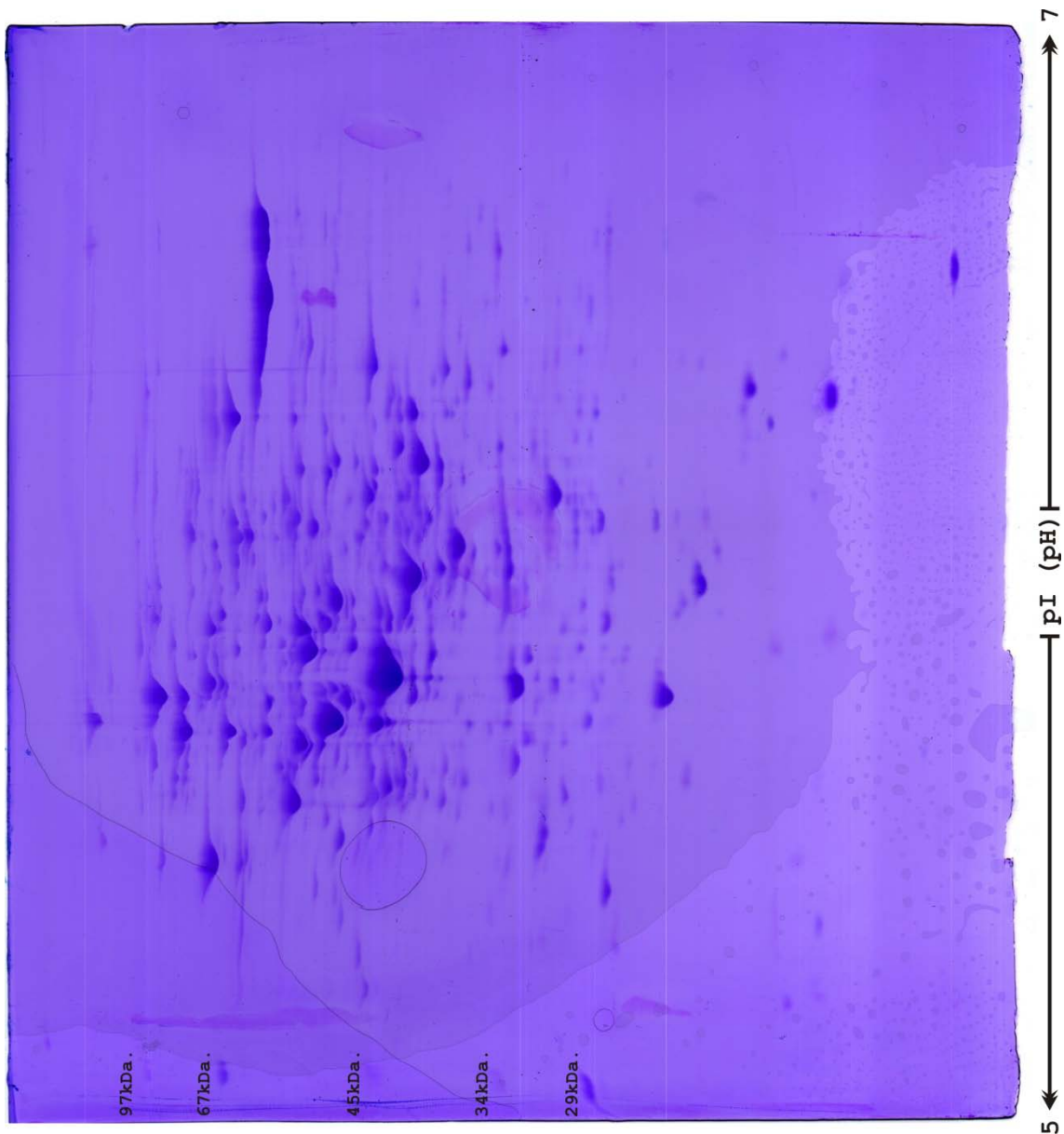
**Figura 8.14. (S310-T2-DEltaX-LB+PA-16,11).** Imagen de gel 2-DE de 180 x 160 x 0,5 mm y 11% (p/v) de poliacrilamida obtenido a partir de extractos de proteínas de *Pseudomonas* sp. Y2T2X1 crecida en medio LB + AFA. El IEE se realizó en *Immobiline™ DryStrip* (Amersham Biosciences) de 18 cm de largo y un gradiente de pH de 3 a 10. Se cargó 100 µg. de extracto total de proteínas. Sin patrón de pesos moleculares. Teñido con azul de Coomassie.



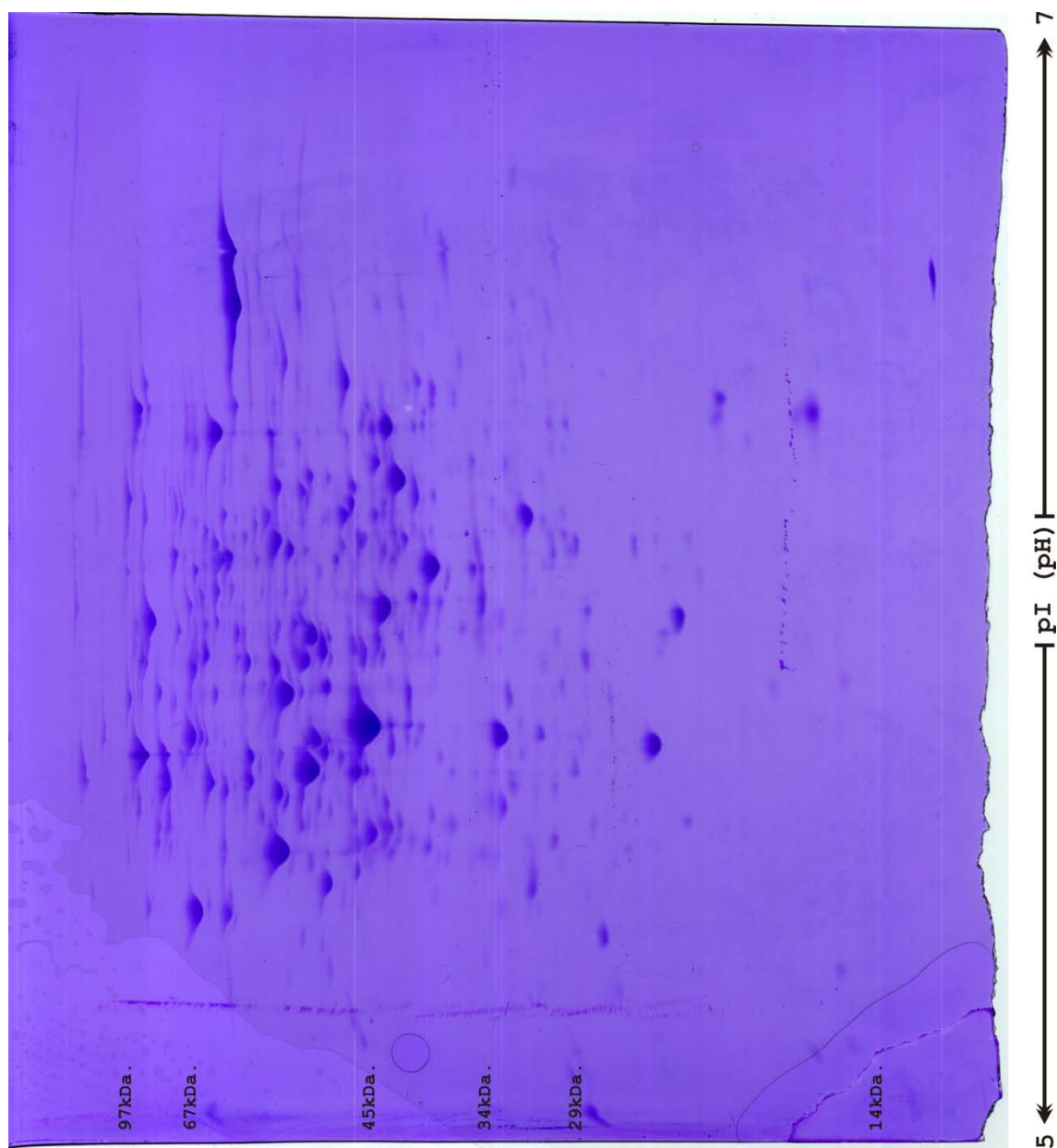
**Figura 8.15. (FiguraS310-Y2+pVLTX1-LB+PA-16,11).** Imagen de gel 2-DE de 180 x 160 x 0,5 mm y 11% (p/v) de poliacrilamida obtenido a partir de extractos de proteínas de *Pseudomonas* sp. Y2 + pVLTX1 crecida en medio LB + AFA. El IEE se realizó en *Immobiline™ DryStrip* (Amersham Biosciences) de 18 cm de largo y un gradiente de pH de 3 a 10. Se cargó 100 µg. de extracto total de proteínas. Sin patrón de pesos moleculares. Teñido con azul de Coomassie.



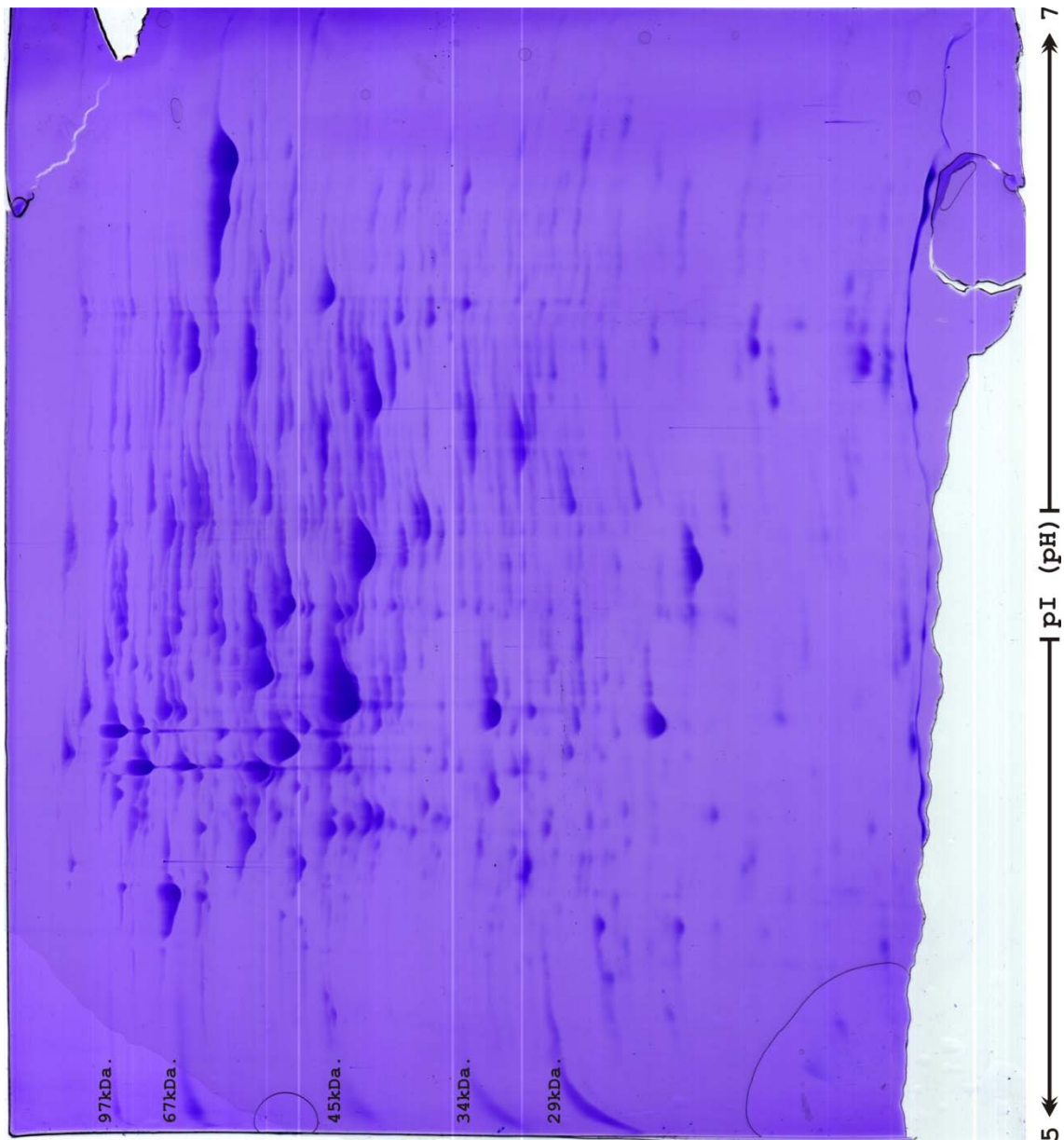
**Figura 8.16. (S310-pVLTX1+IPTG-LB+PA-13,12).** Imagen de gel 2-DE de 180 x 160 x 0,5 mm y 11% (p/v) de poliacrilamida obtenido a partir de extractos de proteínas de *Pseudomonas* sp. Y2 + pVLTX1 crecida en medio LB + AFA + IPTG. El IEE se realizó en *Immobiline™ DryStrip* (Amersham Biosciences) de 18 cm de largo y un gradiente de pH de 3 a 10. Se cargó 100 µg. de extracto total de proteínas. Sin patrón de pesos moleculares. Teñido con azul de Coomassie.



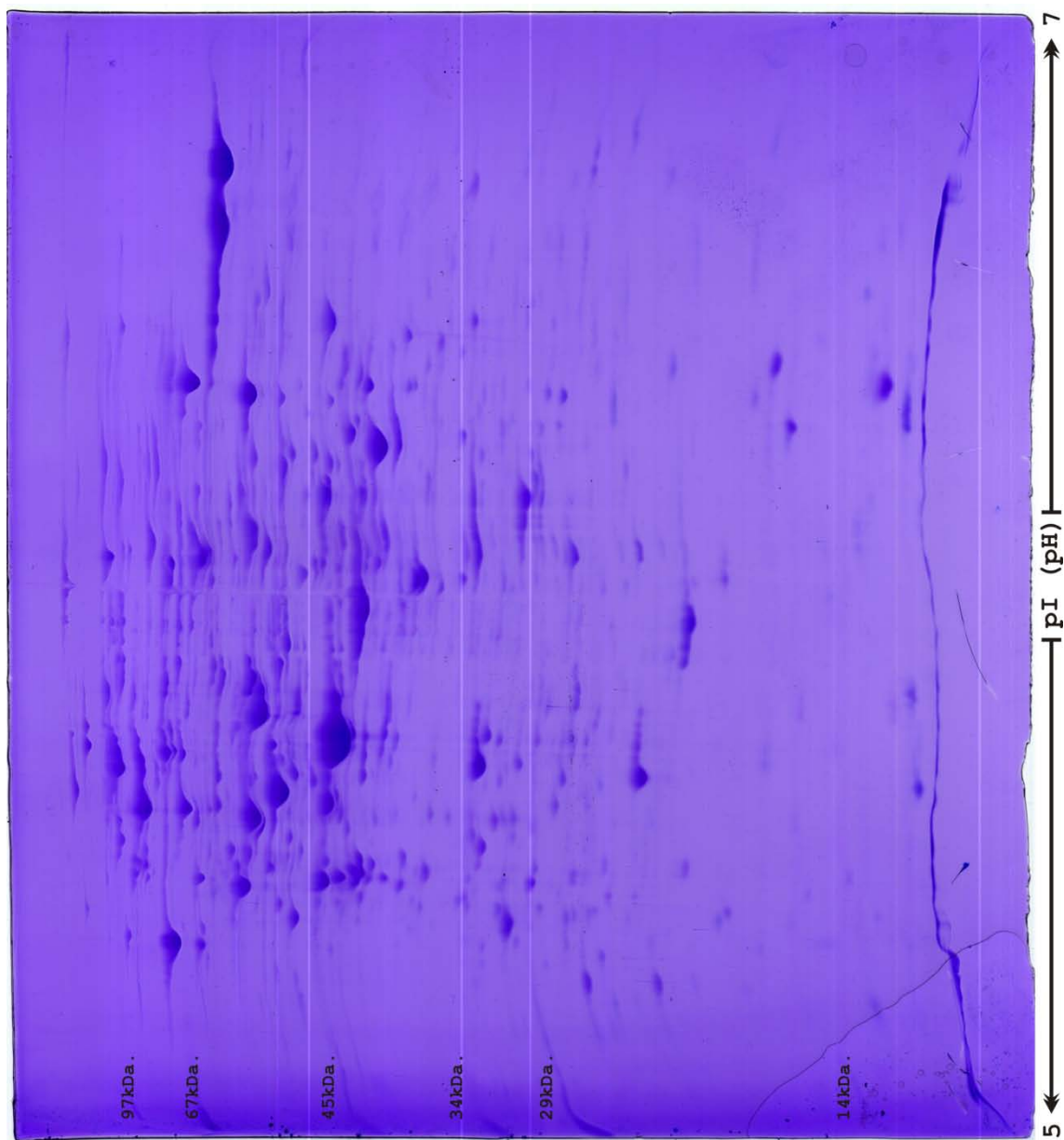
**Figura 8.17. (57-Y2-G-30,11).** Imagen de gel 2-DE de 200 x 200 x 0,5 mm y 11% (p/v) de poliacrilamida obtenido a partir de extractos totales de proteínas de *Pseudomonas* sp. Y2 crecida en medio mínimo M9 + glicerol. El IEE se realizó en geles en tubo con un gradiente de pH de 5 a 7. Se cargó 250  $\mu$ g. de extracto total de proteínas. Teñido con azul de Coomassie. Con marcador de pesos moleculares (kDa.) en el margen izquierdo.



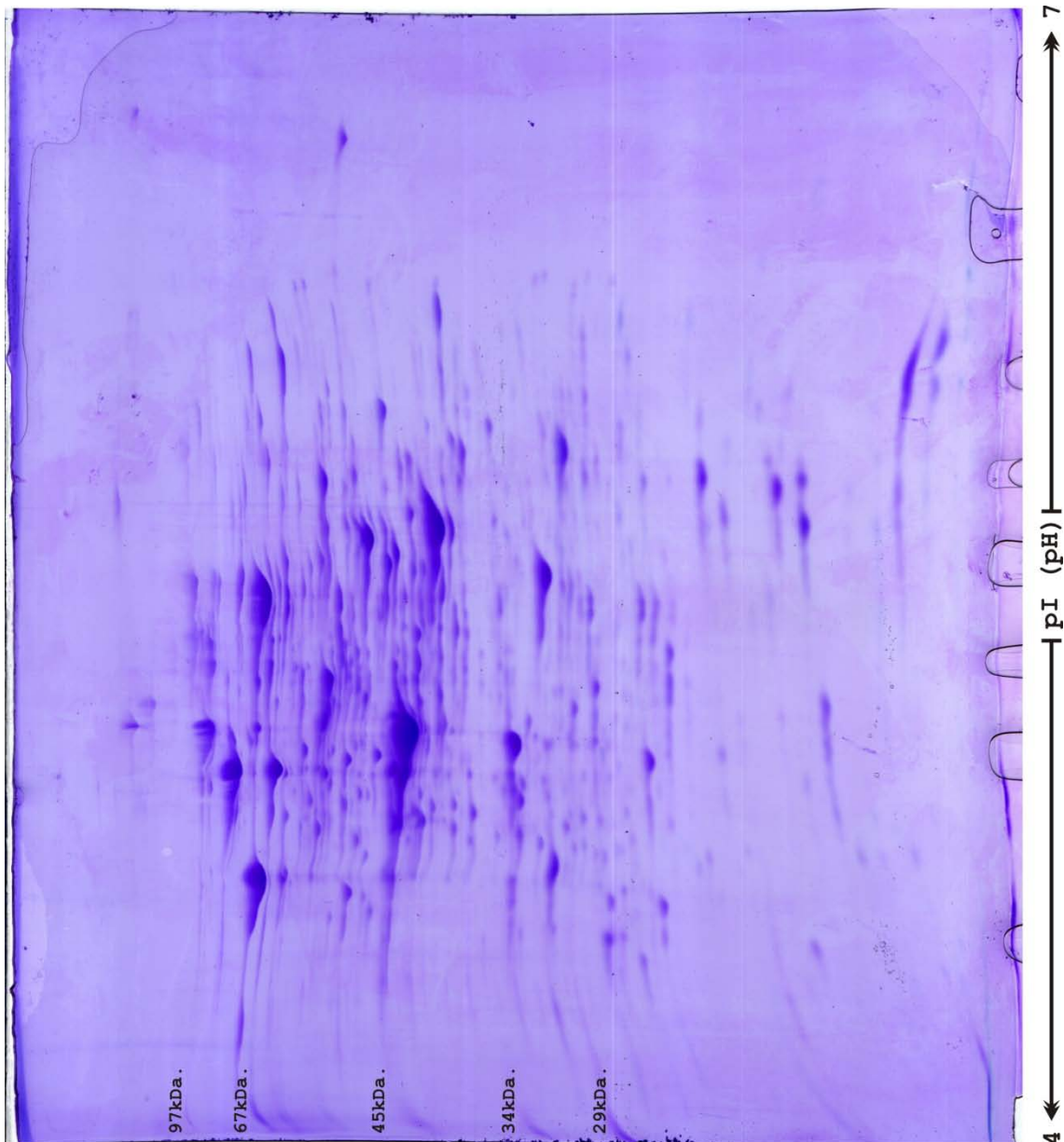
**Figura 8.18. (57-K1-G-30,11).** Imagen de gel 2-DE de 200 x 200 x 0,5 mm y 11% (p/v) de poliacrilamida obtenido a partir de extractos totales de proteínas de *Pseudomonas* sp. Y2K1 crecida en medio mínimo M9 + glicerol. El IEE se realizó en geles en tubo con un gradiente de pH de 5 a 7. Se cargó 220 µg. de extracto total de proteínas. Teñido con azul de Coomassie. Con marcador de pesos moleculares (kDa.) en el margen izquierdo.



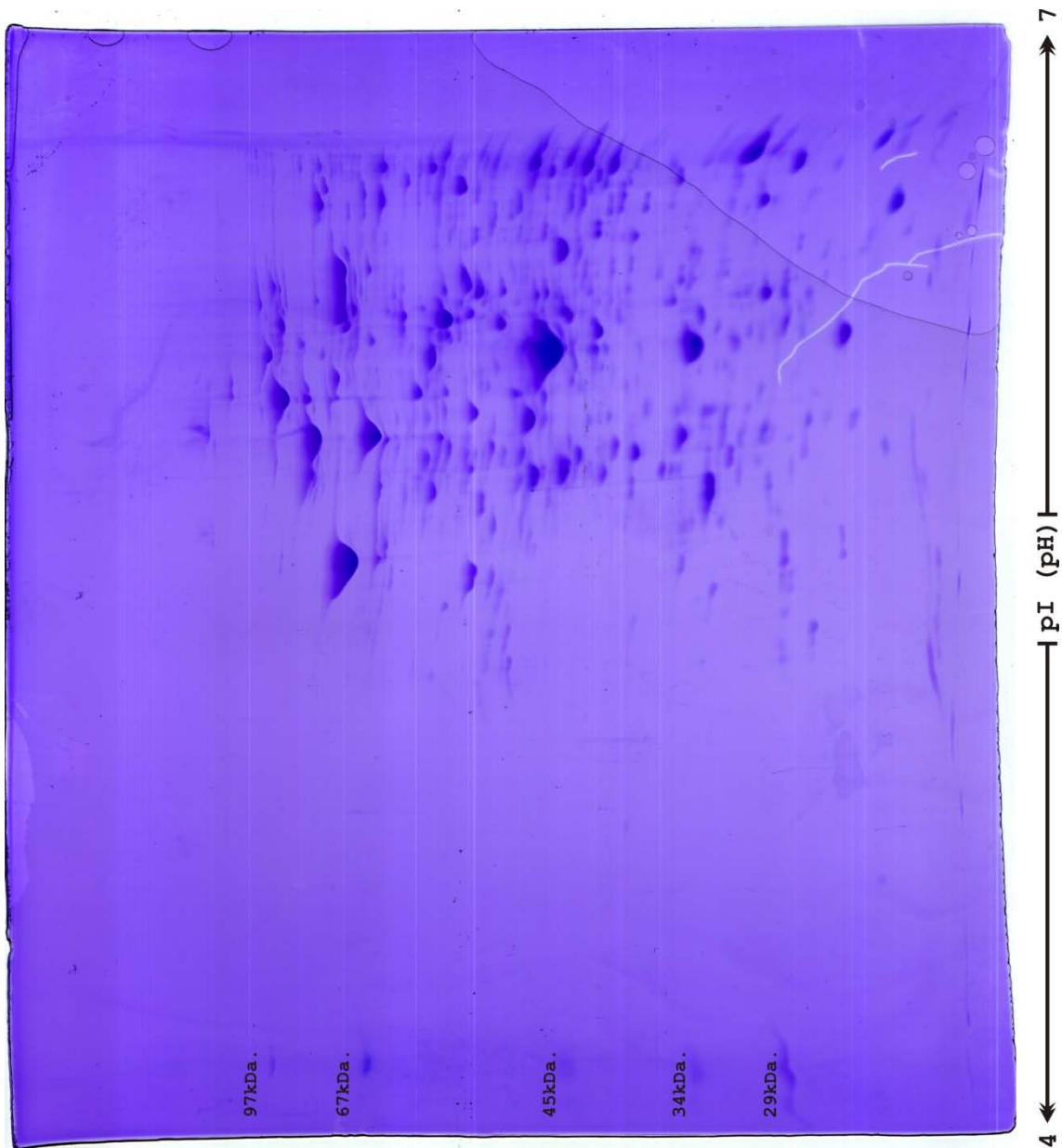
**Figura 8.19. (57-T2-G-12,12-1ht3).** Imagen de gel 2-DE de 200 x 200 x 0,5 mm y 11% (p/v) de poliacrilamida obtenido a partir de extractos totales de proteínas de *Pseudomonas* sp. Y2T2 crecida en medio mínimo M9 + glicerol. El IEE se realizó en geles en tubo con un gradiente de pH de 5 a 7. Se cargó 250  $\mu$ g. de extracto total de proteínas. Teñido con azul de Coomassie. Con marcador de pesos moleculares (kDa.) en el margen izquierdo.



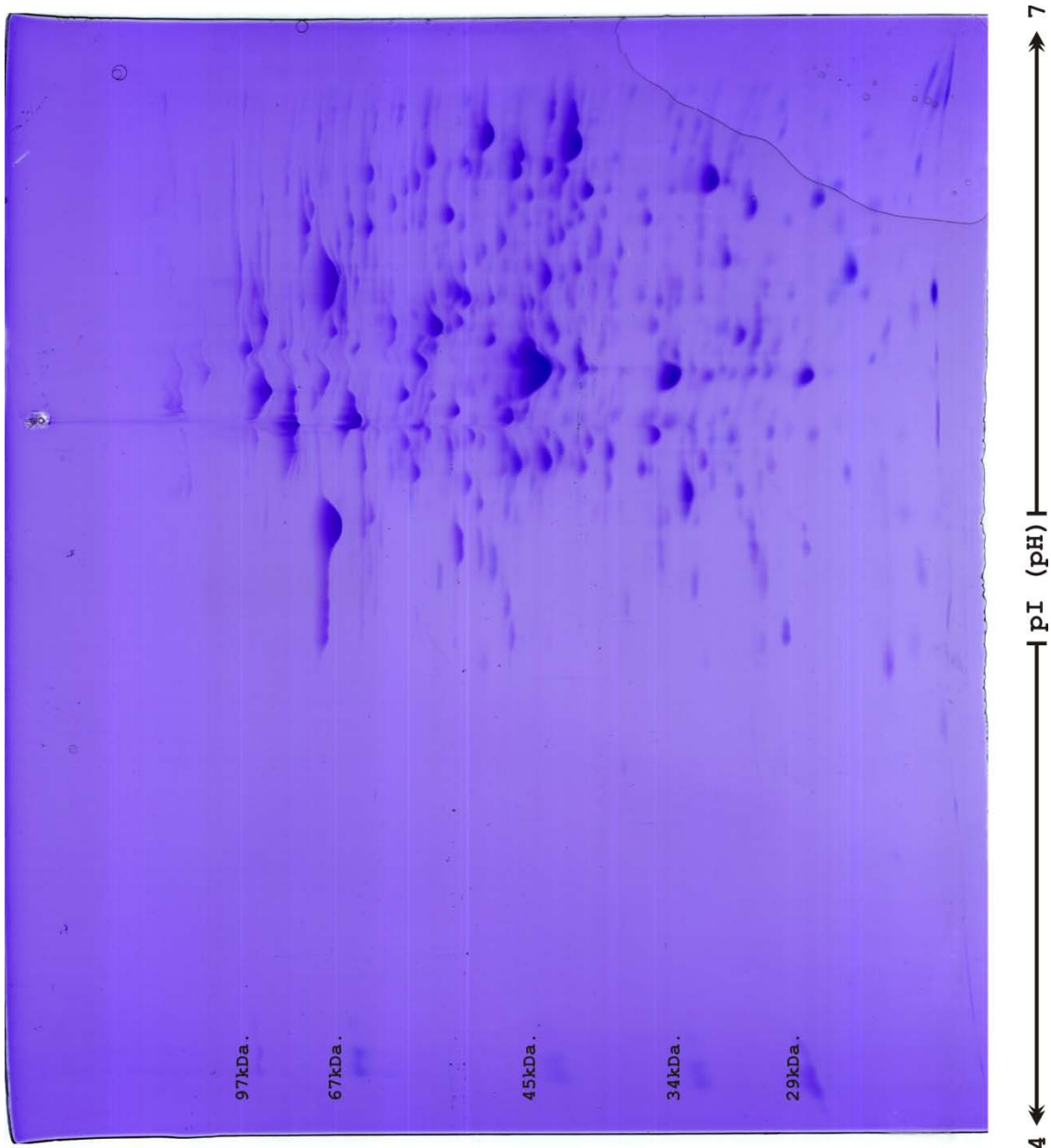
**Figura 8.20. (57-T2-G-12,12-2ht5).** Imagen de gel 2-DE de 200 x 200 x 0,5 mm y 11% (p/v) de poliacrilamida obtenido a partir de extractos totales de proteínas de *Pseudomonas* sp. Y2T2 crecida en medio mínimo M9 + glicerol. El IEE se realizó en geles en tubo con un gradiente de pH de 5 a 7. Se cargó 250 µg. de extracto total de proteínas. Teñido con azul de Coomassie. Con marcador de pesos moleculares (kDa.) en el margen izquierdo.



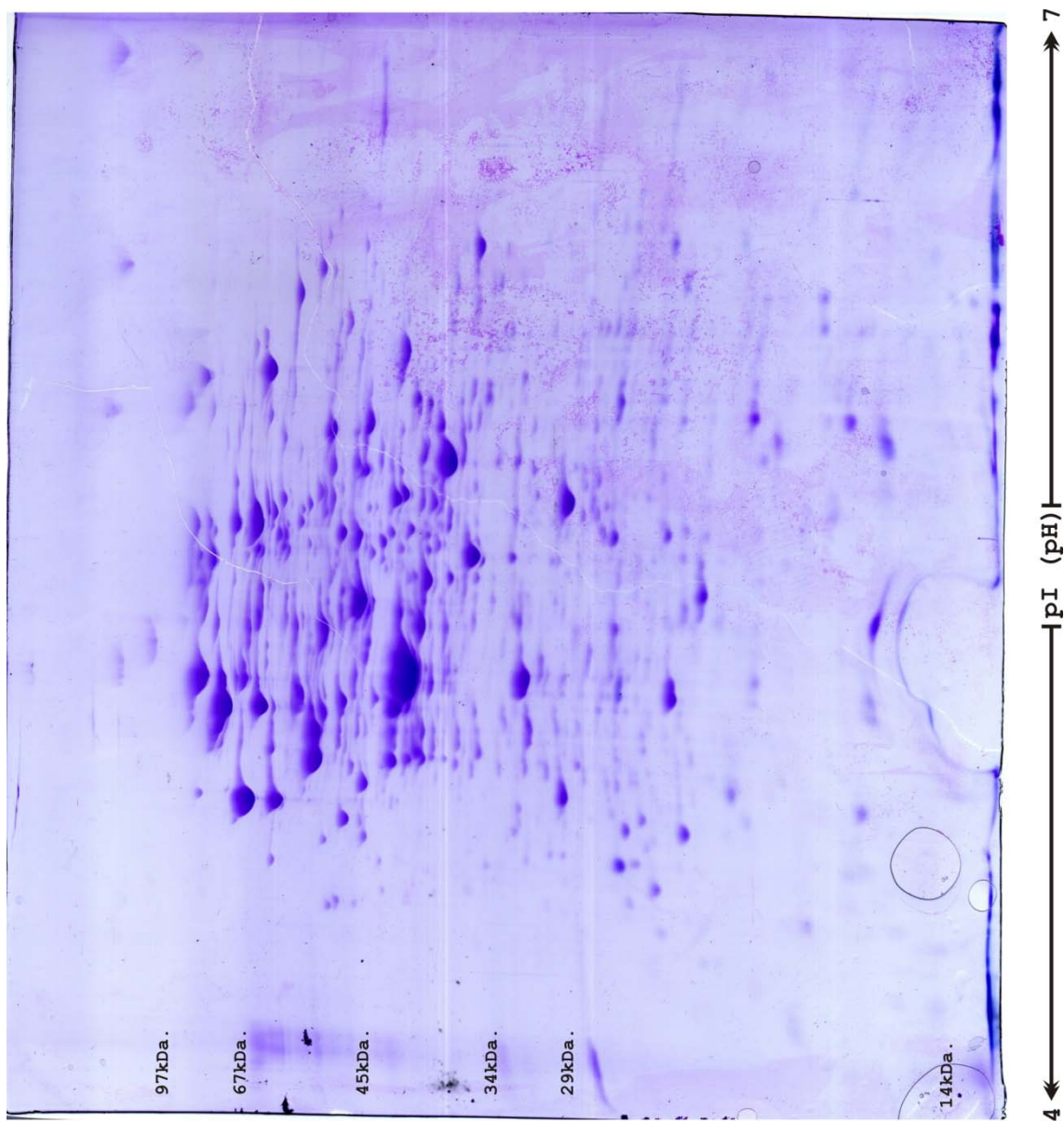
**Figura 8.21. (47-Y2-27,10).** Imagen de gel 2-DE de 200 x 200 x 0,5 mm y 11% (p/v) de poliacrilamida obtenido a partir de extractos totales de proteínas de *Pseudomonas* sp. Y2 crecida en medio mínimo M9 + AFA. El IEE se realizó en geles en tubo con un gradiente de pH de 4 a 7. Se cargó 350  $\mu$ g. de extracto total de proteínas. Teñido con azul de Coomassie. Con marcador de pesos moleculares (kDa.) en el margen izquierdo.



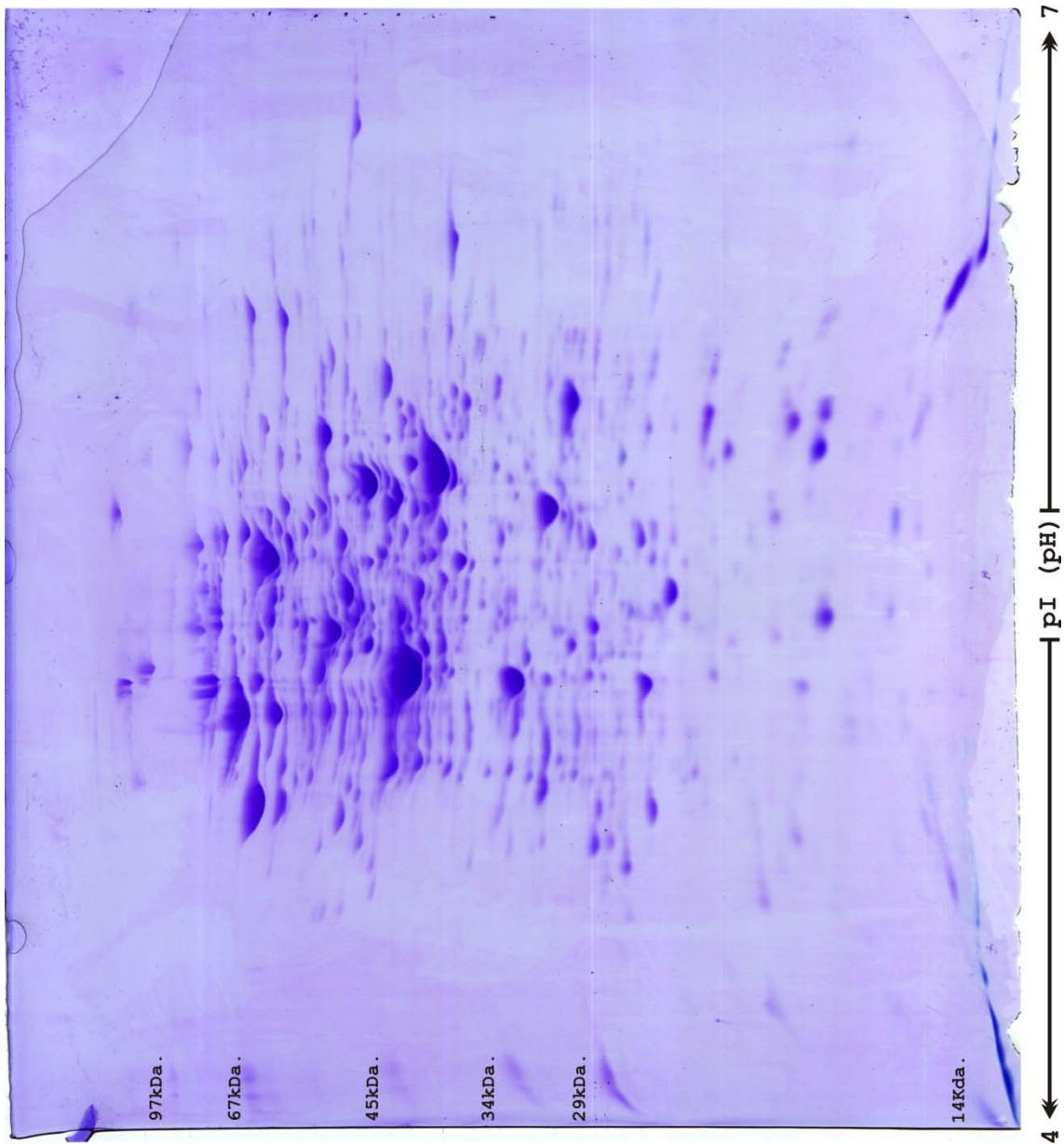
**Figura 8.22. (47-Y2-02,11-1h).** Imagen de gel 2-DE de 200 x 200 x 0,5 mm y 11% (p/v) de poliacrilamida obtenido a partir de extractos totales de proteínas de *Pseudomonas* sp. Y2 crecida en medio mínimo M9 + AFA. El IEE se realizó en geles en tubo con un gradiente de pH de 4 a 7. Se cargó 300  $\mu$ g. de extracto total de proteínas. Teñido con azul de Coomassie. Con marcador de pesos moleculares (kDa.) en el margen izquierdo.



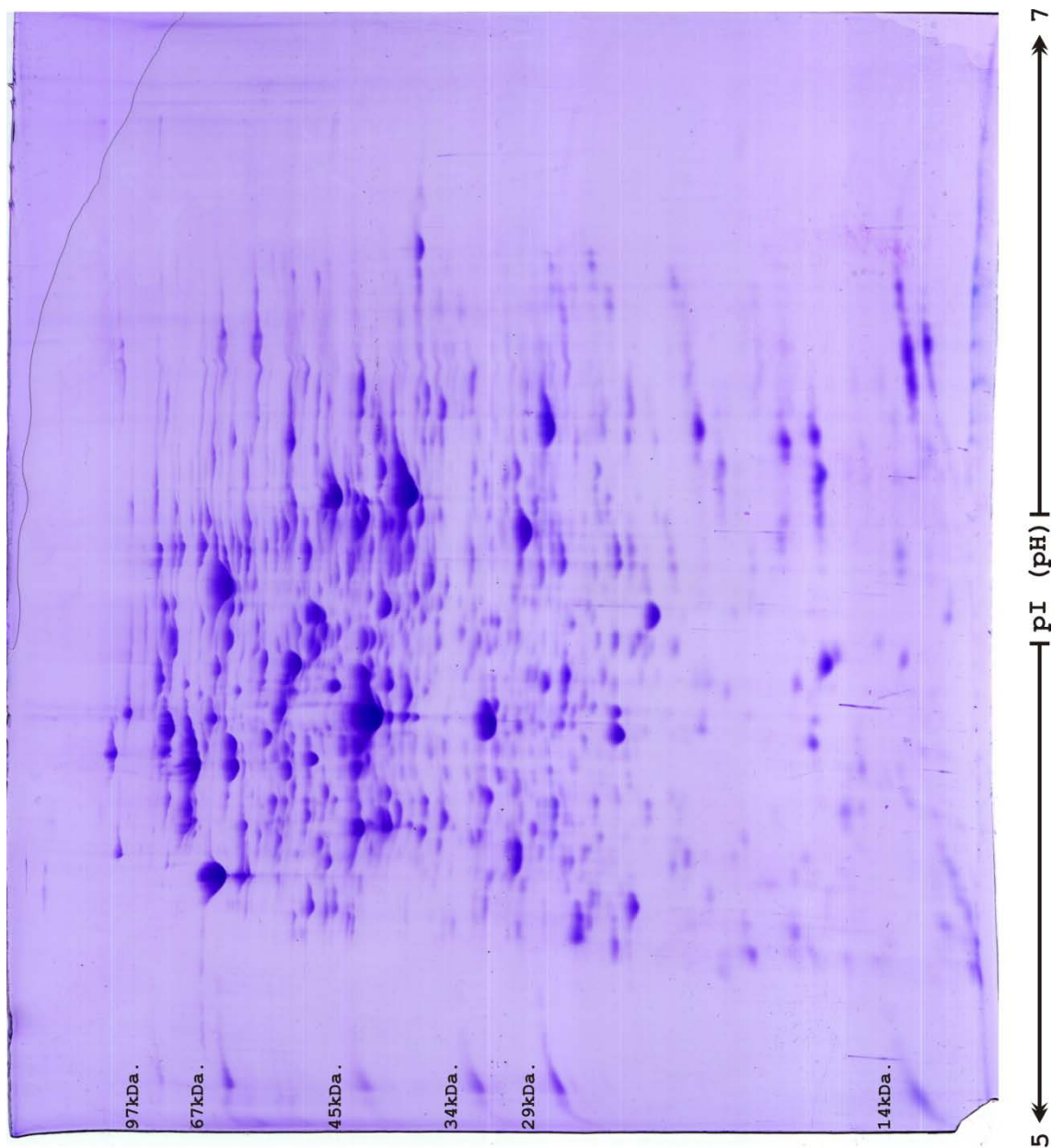
**Figura 8.23. (47-Y2-02,11-3h).** Imagen de gel 2-DE de 200 x 200 x 0,5 mm y 11% (p/v) de poliacrilamida obtenido a partir de extractos totales de proteínas de *Pseudomonas* sp. Y2 crecida en medio mínimo M9 + AFA. El IEE se realizó en geles en tubo con un gradiente de pH de 4 a 7. Se cargó 300 µg. de extracto total de proteínas. Teñido con azul de Coomassie. Con marcador de pesos moleculares (kDa.) en el margen izquierdo.



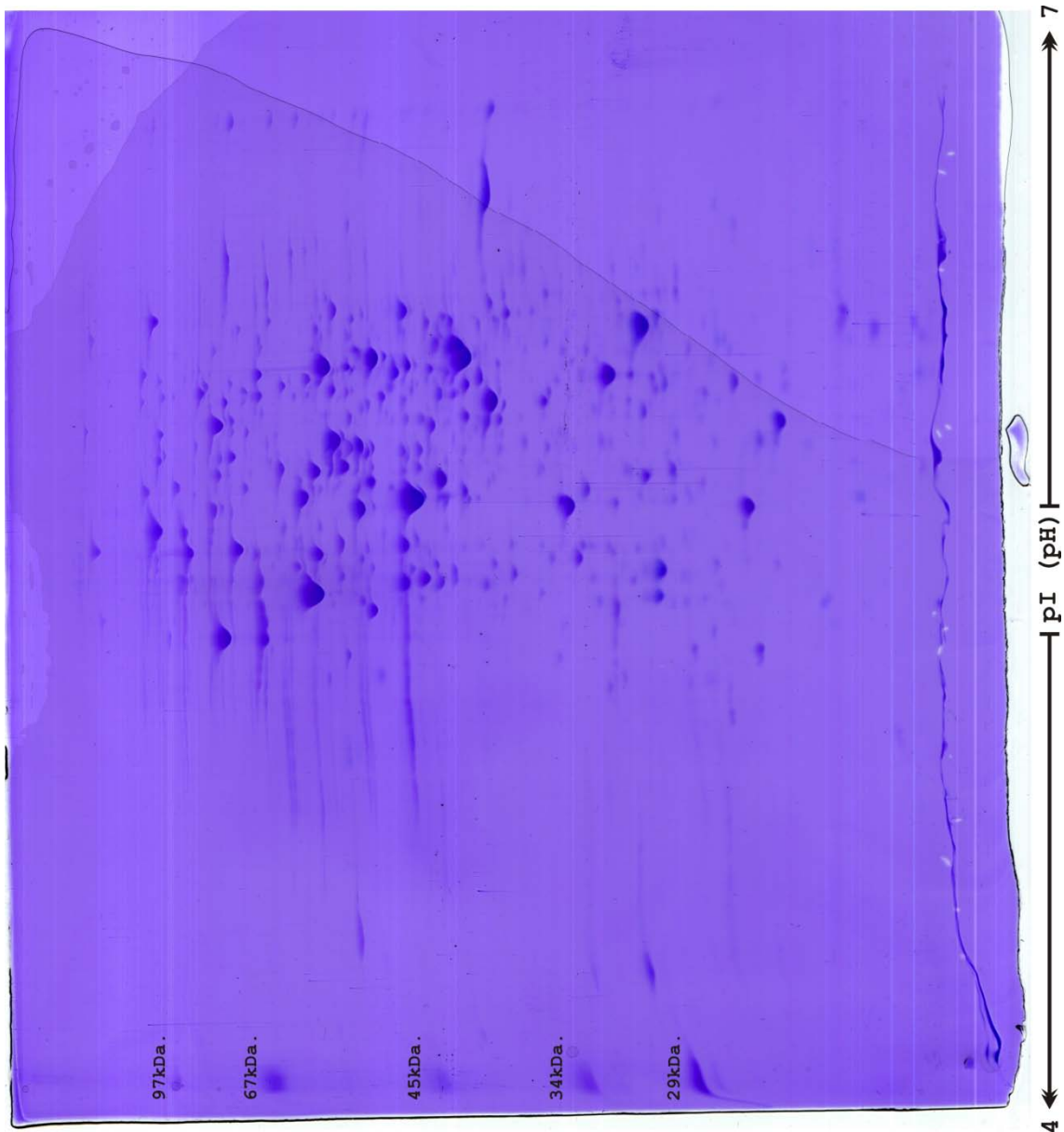
**Figura 8.24. (47-K1-25,10).** Imagen de gel 2-DE de 200 x 200 x 0,5 mm y 11% (p/v) de poliacrilamida obtenido a partir de extractos totales de proteínas de *Pseudomonas* sp. Y2K1 crecida en medio mínimo M9 + AFA. El IEE se realizó en geles en tubo con un gradiente de pH de 4 a 7. Se cargó 320 µg. de extracto total de proteínas. Teñido con azul de Coomassie. Con marcador de pesos moleculares (kDa.) en el margen izquierdo.



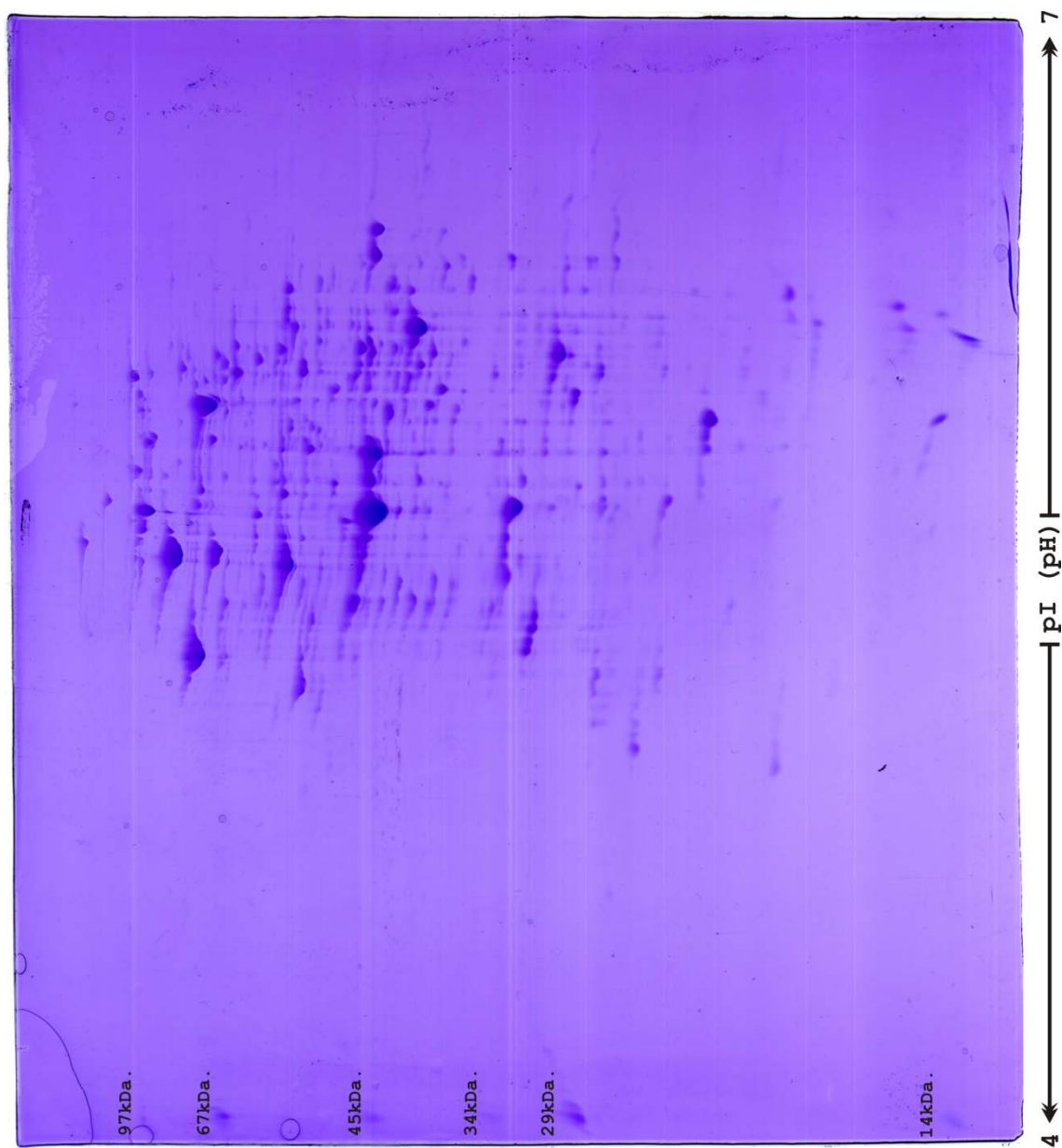
**Figura 8.25. (47-T2-27,10).** Imagen de gel 2-DE de 200 x 200 x 0,5 mm y 11% (p/v) de poliacrilamida obtenido a partir de extractos totales de proteínas de *Pseudomonas* sp. Y2T2 crecida en medio mínimo M9 + AFA. El IEE se realizó en geles en tubo con un gradiente de pH de 4 a 7. Se cargó 350 µg. de extracto total de proteínas. Teñido con azul de Coomassie. Con marcador de pesos moleculares (kDa.) en el margen izquierdo.



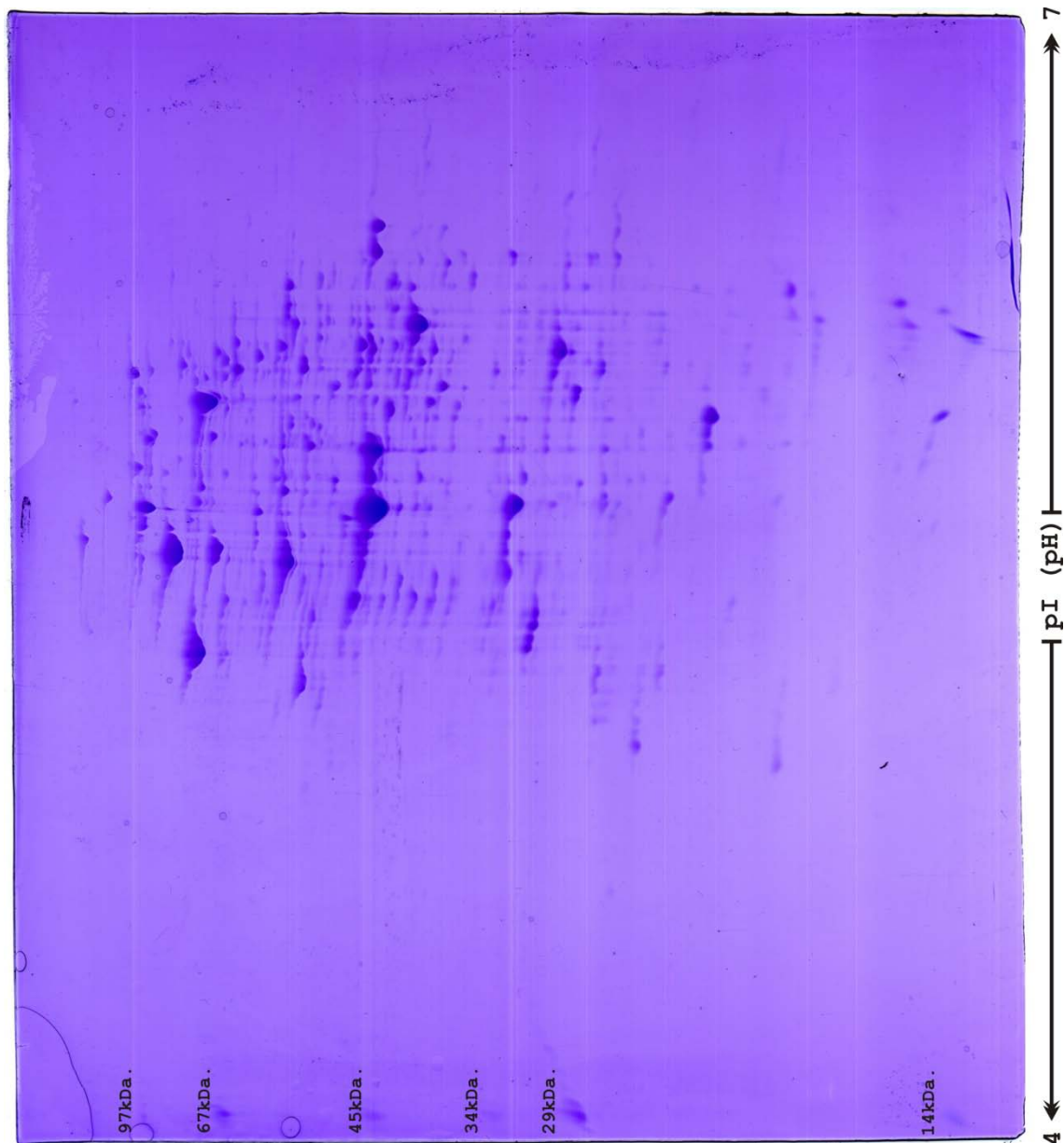
**Figura 8.26. (57-T2-09,11).** Imagen de gel 2-DE de 200 x 200 x 0,5 mm y 11% (p/v) de poliacrilamida obtenido a partir de extractos totales de proteínas de *Pseudomonas* sp. Y2T2 crecida en medio mínimo M9 + AFA. El IEE se realizó en geles en tubo con un gradiente de pH de 5 a 7. Se cargó 300 µg. de extracto total de proteínas. Teñido con azul de Coomassie. Con marcador de pesos moleculares (kDa.) en el margen izquierdo.



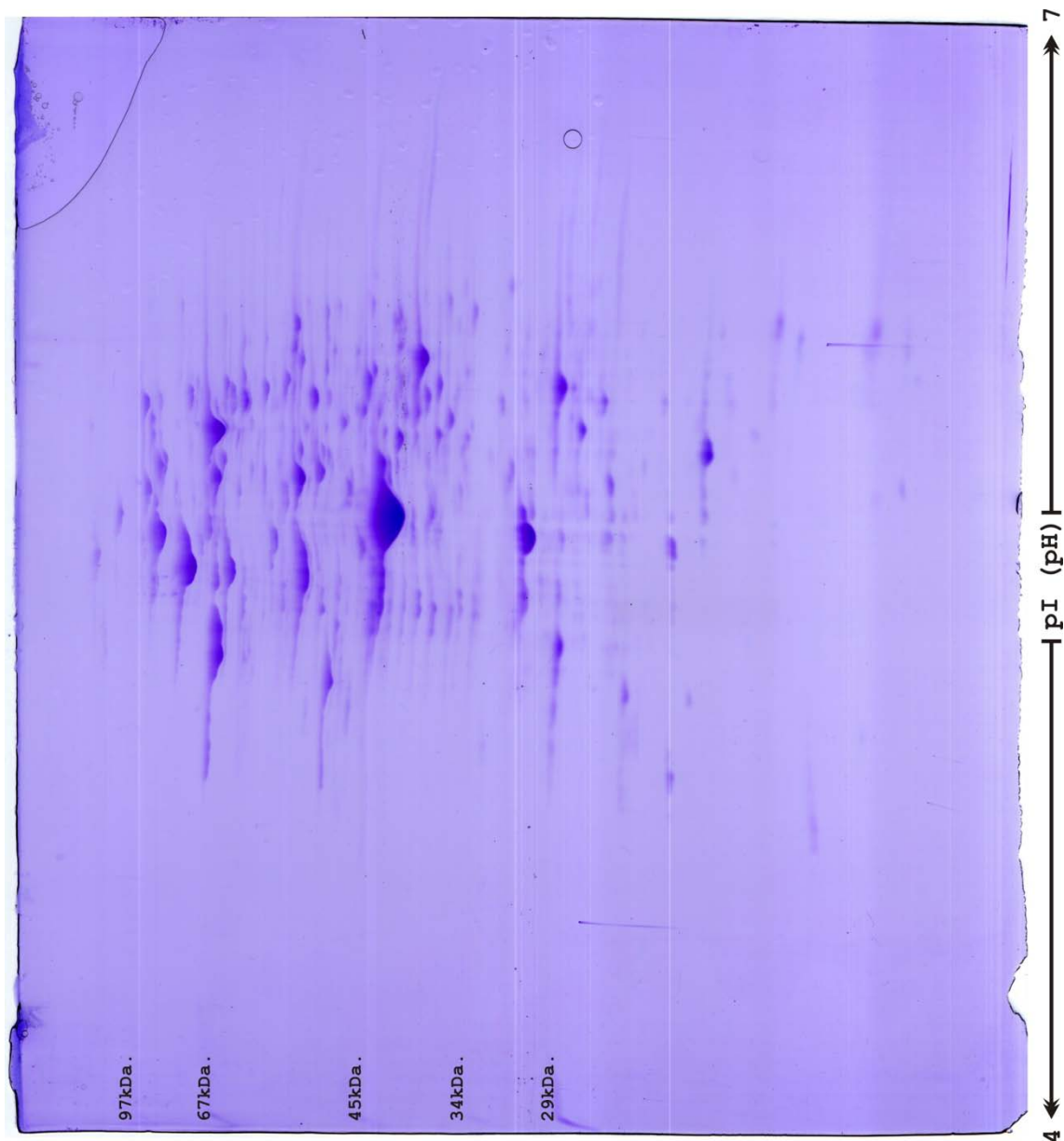
**Figura 8.27. (47-deltaX-PA-15-12t7).** Imagen de gel 2-DE de 200 x 200 x 0,5 mm y 11% (p/v) de poliacrilamida obtenido a partir de extractos totales de proteínas de *Pseudomonas* sp. Y2T2X1 crecida en medio mínimo M9 + AFA. El IEE se realizó en geles en tubo con un gradiente de pH de 4 a 7. Se cargó 330 µg. de extracto total de proteínas. Teñido con azul de Coomassie. Con marcador de pesos moleculares (kDa.) en el margen izquierdo.



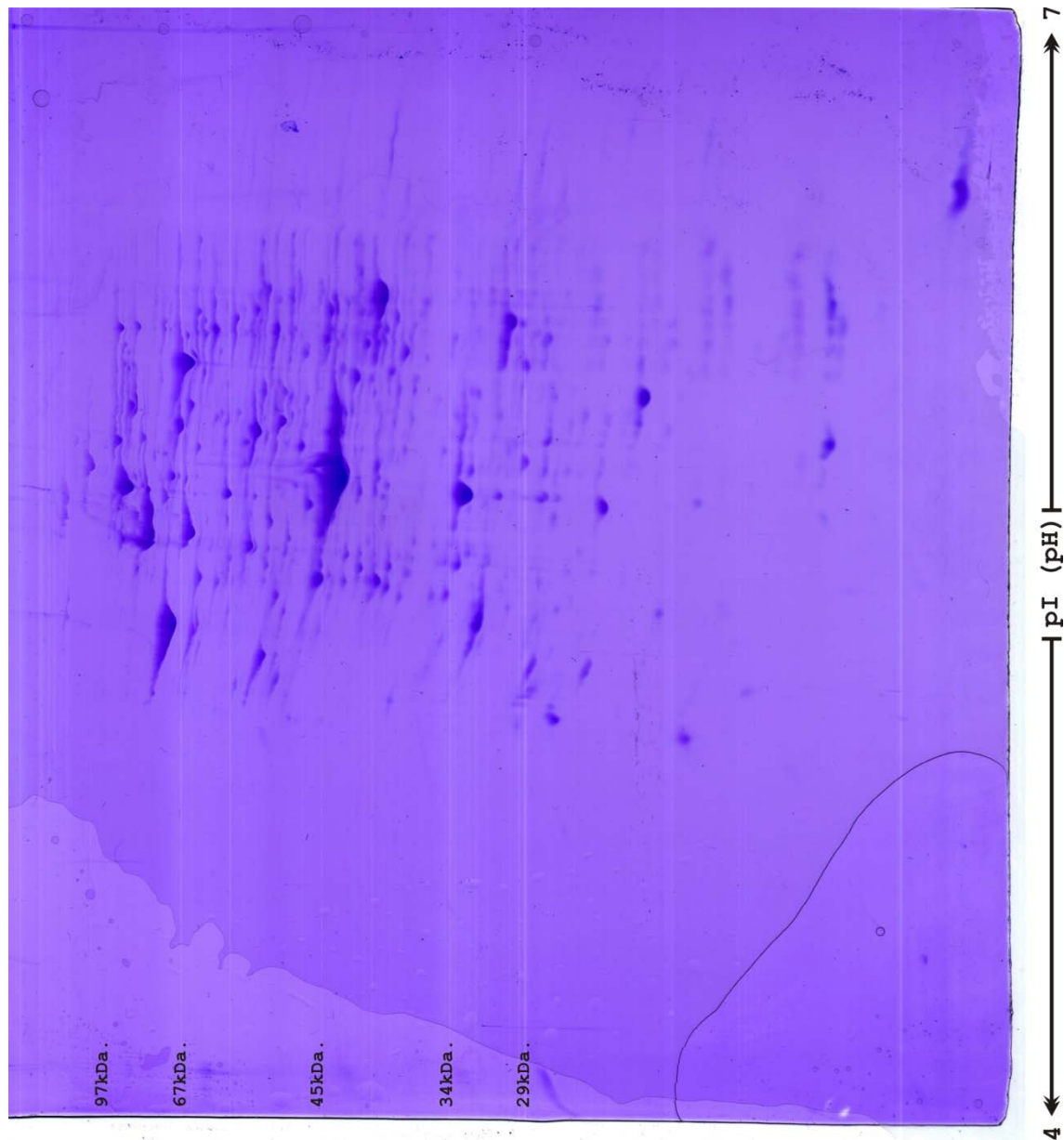
**Figura 8.28. (47-pVLTX1+IPTG-PA15-12t5).** Imagen de gel 2-DE de 200 x 200 x 0,5 mm y 11% (p/v) de poliacrilamida obtenido a partir de extractos totales de proteínas de *Pseudomonas* sp. Y2 + pVLTX1 crecida en medio mínimo M9 + AFA + IPTG. El IEE se realizó en geles en tubo con un gradiente de pH de 4 a 7. Se cargó 330 µg. de extracto total de proteínas. Teñido con azul de Coomassie. Con marcador de pesos moleculares (kDa.) en el margen izquierdo.



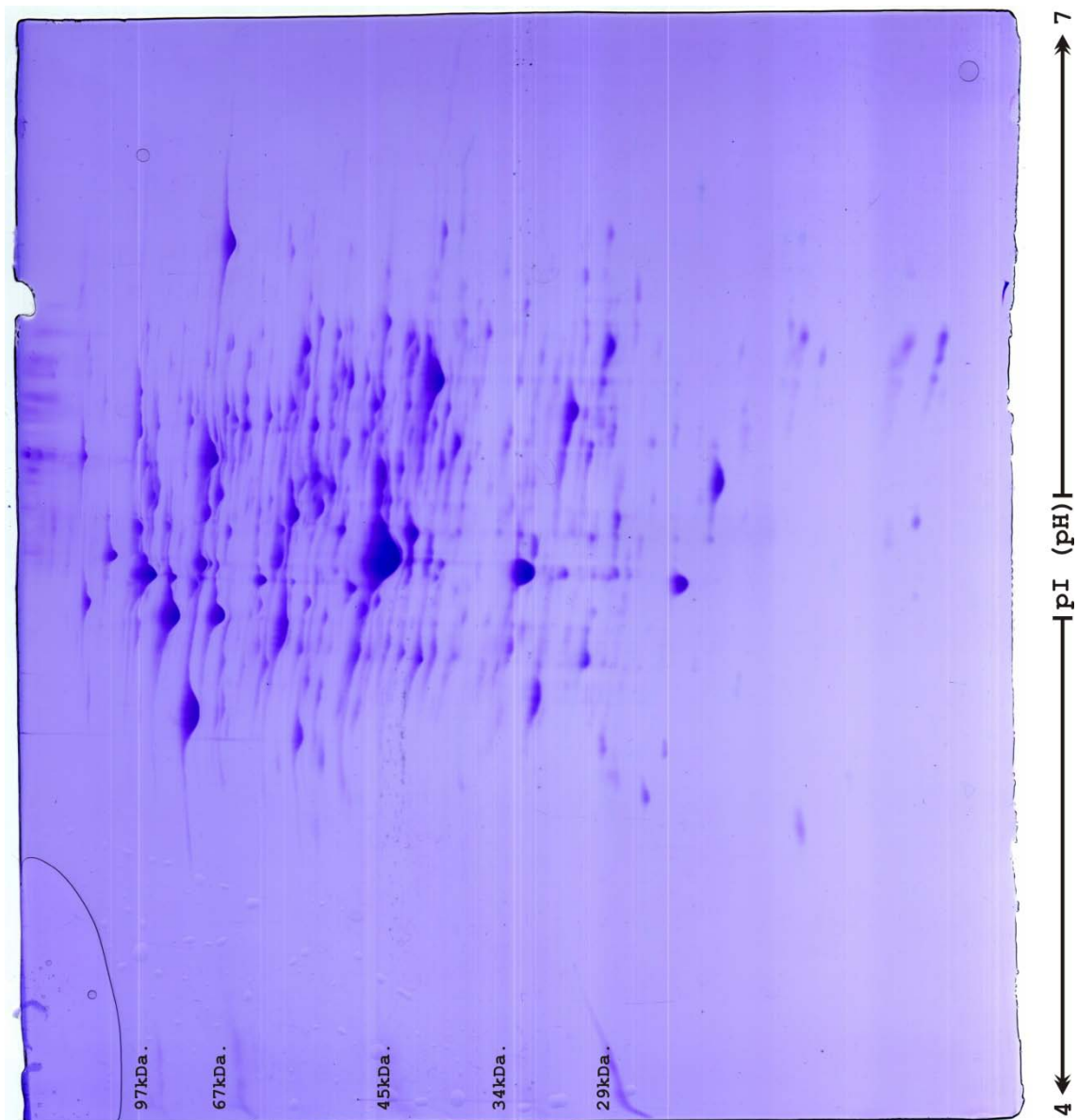
**Figura 8.29. (47-Y2-LB+PA-25,11).** Imagen de gel 2-DE de 200 x 200 x 0,5 mm y 11% (p/v) de poliacrilamida obtenido a partir de extractos totales de proteínas de *Pseudomonas* sp. Y2 crecida en medio LB + AFA. El IEE se realizó en geles en tubo con un gradiente de pH de 4 a 7. Se cargó 300  $\mu$ g. de extracto total de proteínas. Teñido con azul de Coomassie. Con marcador de pesos moleculares (kDa.) en el margen izquierdo.



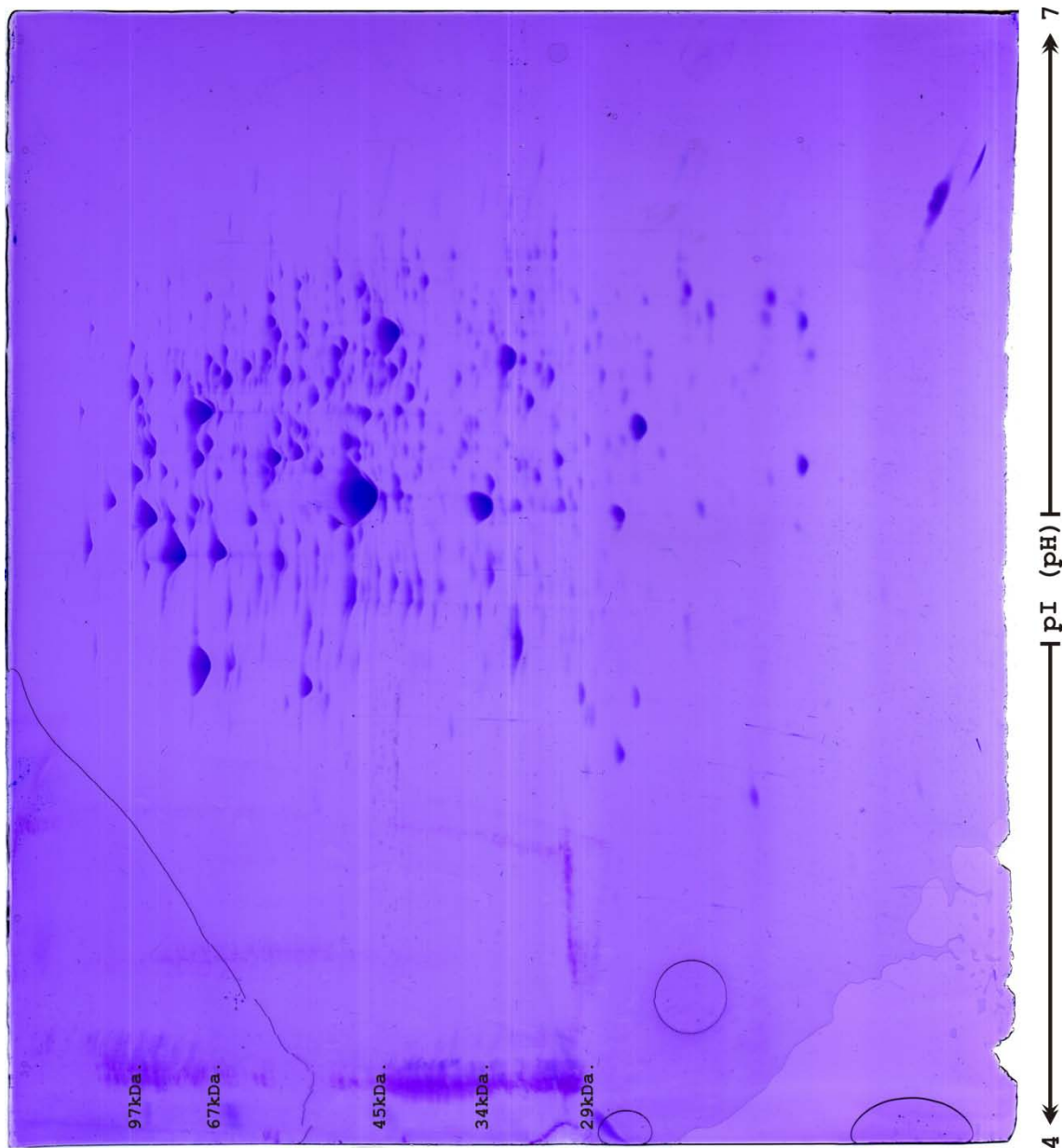
**Figura 8.30. (47-Y2-LB+PA-28,11).** Imagen de gel 2-DE de 200 x 200 x 0,5 mm y 11% (p/v) de poliacrilamida obtenido a partir de extractos totales de proteínas de *Pseudomonas* sp. Y2 crecida en medio LB + AFA. El IEE se realizó en geles en tubo con un gradiente de pH de 4 a 7. Se cargó 300 µg. de extracto total de proteínas. Teñido con azul de Coomassie. Con marcador de pesos moleculares (kDa.) en el margen izquierdo.



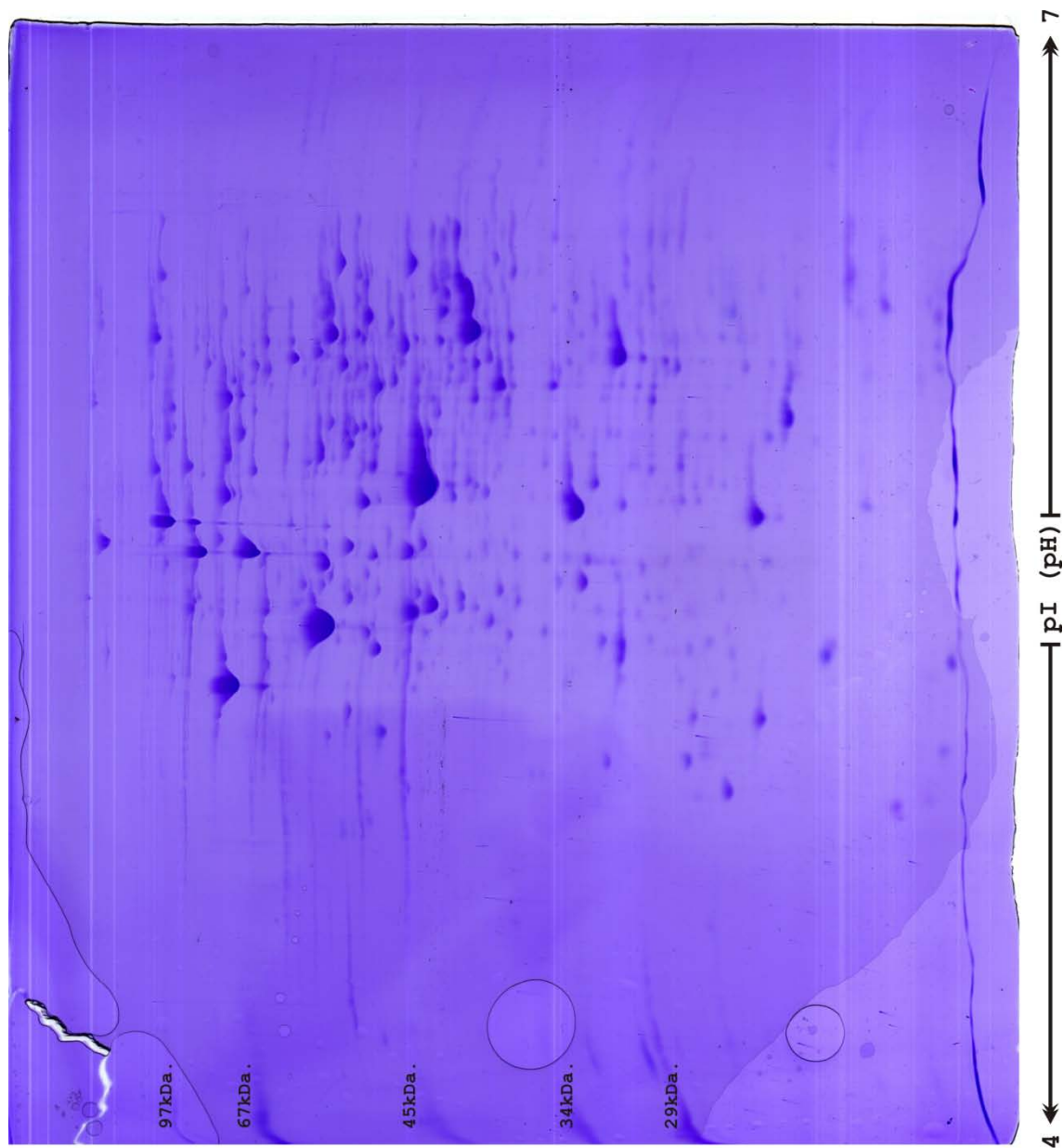
**Figura 8.31. (47-C1-LB+PA-25,11).** Imagen de gel 2-DE de 200 x 200 x 0,5 mm y 11% (p/v) de poliacrilamida obtenido a partir de extractos totales de proteínas de *Pseudomonas* sp. Y2C1 crecida en medio LB + AFA. El IEE se realizó en geles en tubo con un gradiente de pH de 4 a 7. Se cargó 300 µg. de extracto total de proteínas. Teñido con azul de Coomassie. Con marcador de pesos moleculares (kDa.) en el margen izquierdo.



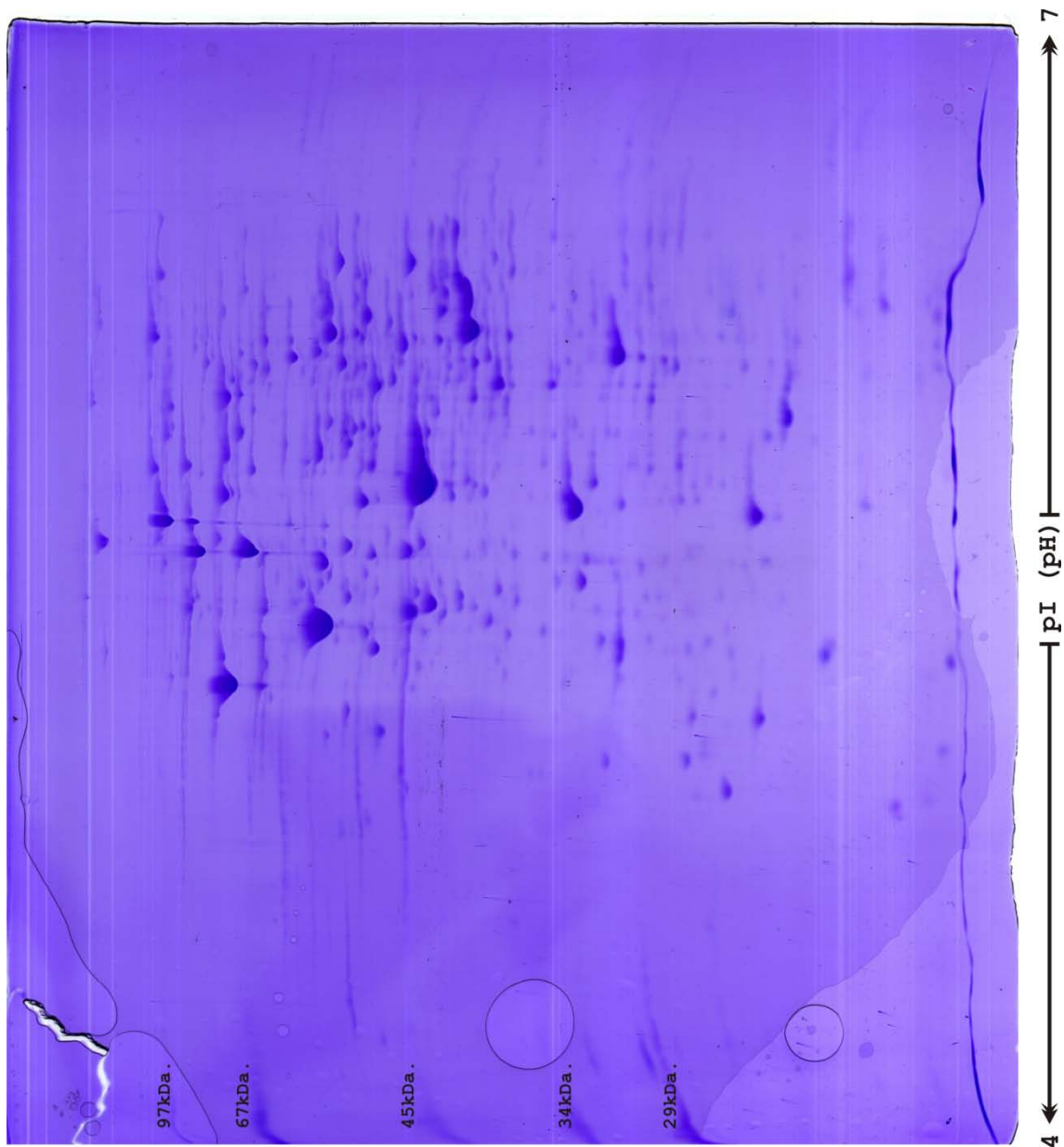
**Figura 8.32. (47-AX-LB+PA-28,11).** Imagen de gel 2-DE de 200 x 200 x 0,5 mm y 11% (p/v) de poliacrilamida obtenido a partir de extractos totales de proteínas de *Pseudomonas* sp. Y2T2X1 crecida en medio LB + AFA. El IEE se realizó en geles en tubo con un gradiente de pH de 4 a 7. Se cargó 300 µg. de extracto total de proteínas. Teñido con azul de Coomassie. Con marcador de pesos moleculares (kDa.) en el margen izquierdo.



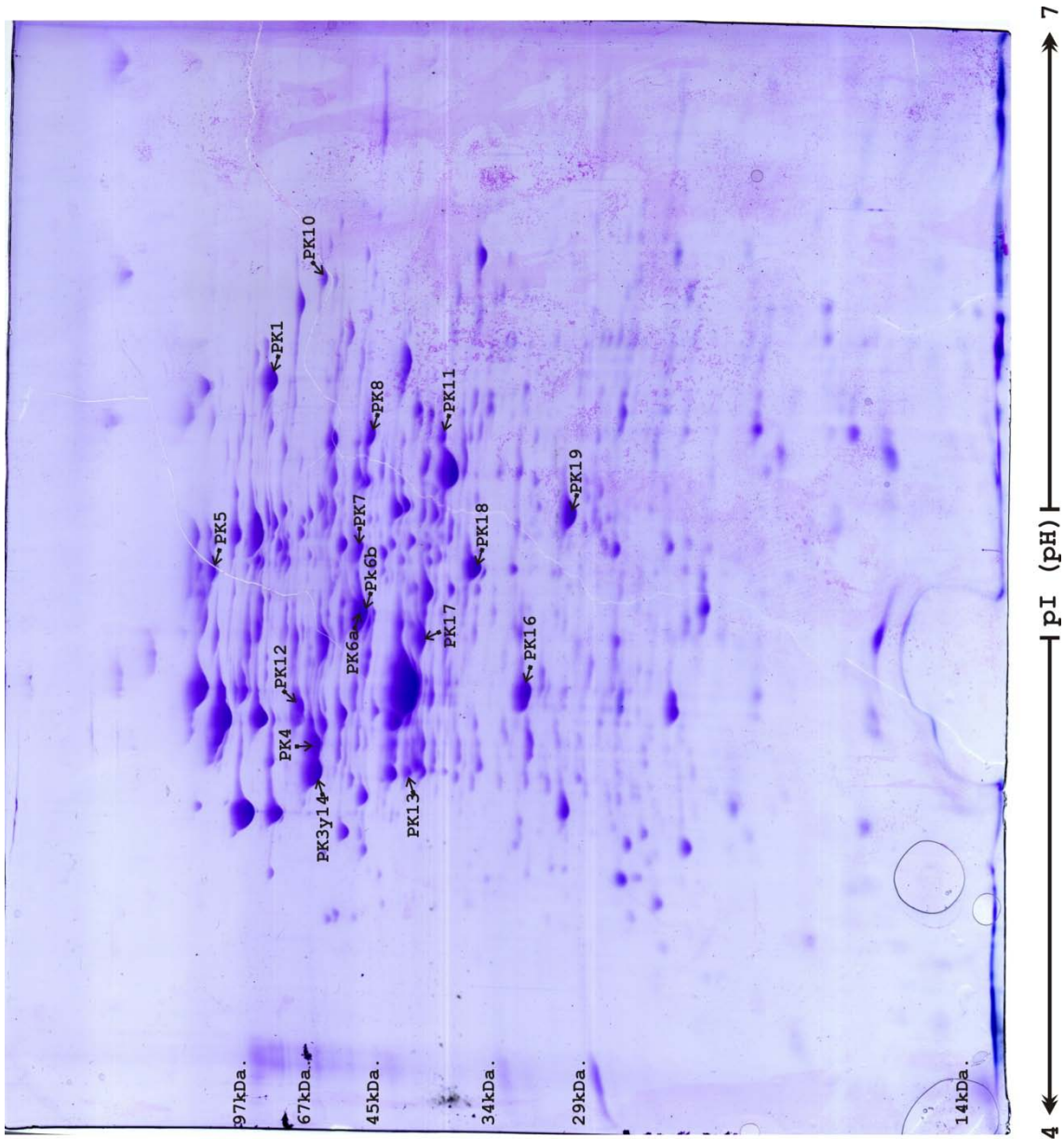
**Figura 8.33.** (47-pVLTX1-LB+PA-25,11). Imagen de gel 2-DE de 200 x 200 x 0,5 mm y 11% (p/v) de poliacrilamida obtenido a partir de extractos totales de proteínas de *Pseudomonas* sp. Y2 + pVLTX1 crecida en medio LB + AFA. El IEE se realizó en geles en tubo con un gradiente de pH de 4 a 7. Se cargó 300 µg. de extracto total de proteínas. Teñido con azul de Coomassie. Con marcador de pesos moleculares (kDa.) en el margen izquierdo.



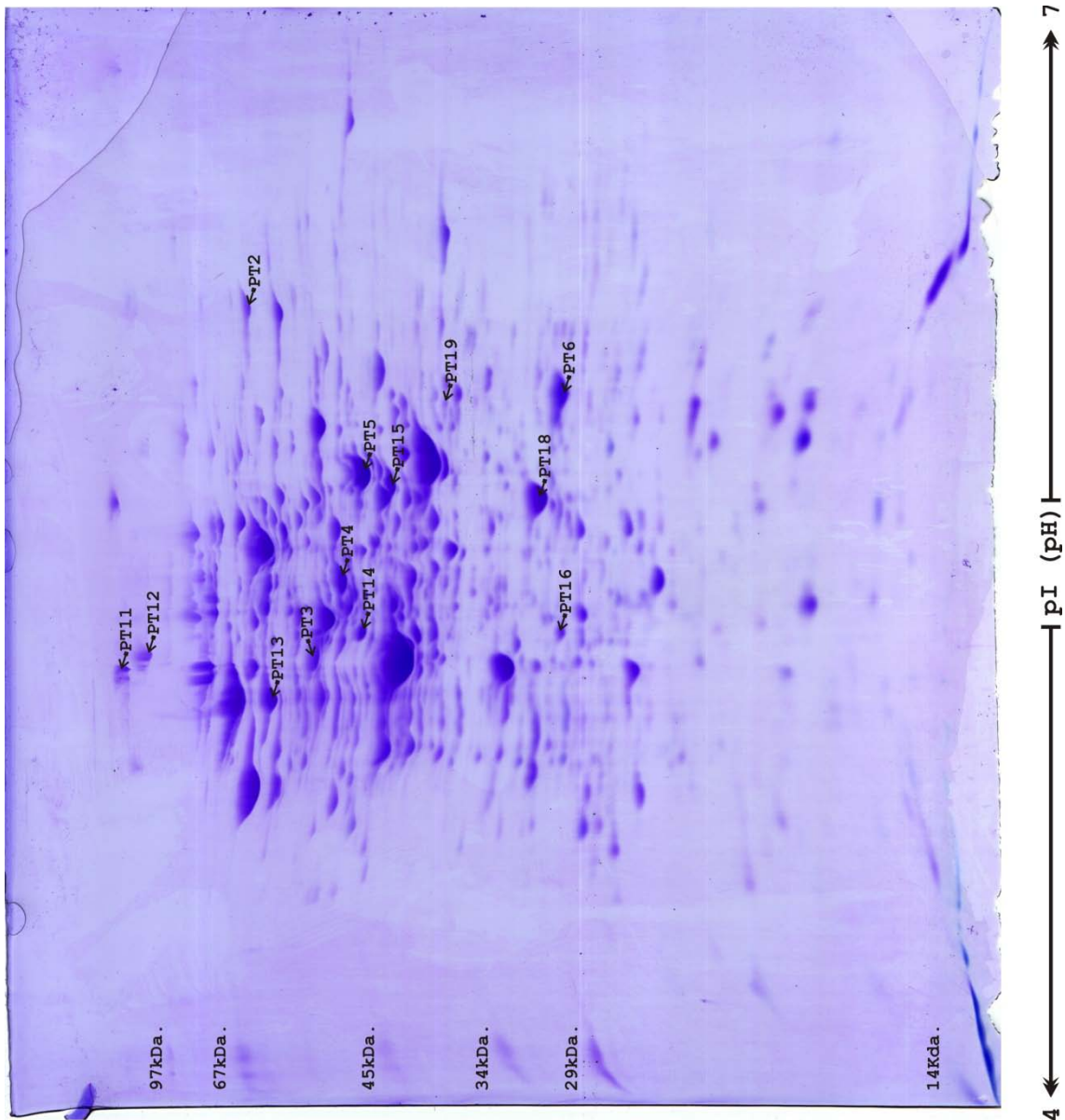
**Figura 8.34. (47pVLTX1+IPTG-LB+PA-14,12-t3).** Imagen de gel 2-DE de 200 x 200 x 0,5 mm y 11% (p/v) de poliacrilamida obtenido a partir de extractos totales de proteínas de *Pseudomonas* sp. Y2 + pVLTX1 crecida en medio LB + AFA + IPTG. El IEE se realizó en geles en tubo con un gradiente de pH de 4 a 7. Se cargó 330 µg. de extracto total de proteínas. Teñido con azul de Coomassie. Con marcador de pesos moleculares (kDa.) en el margen izquierdo.



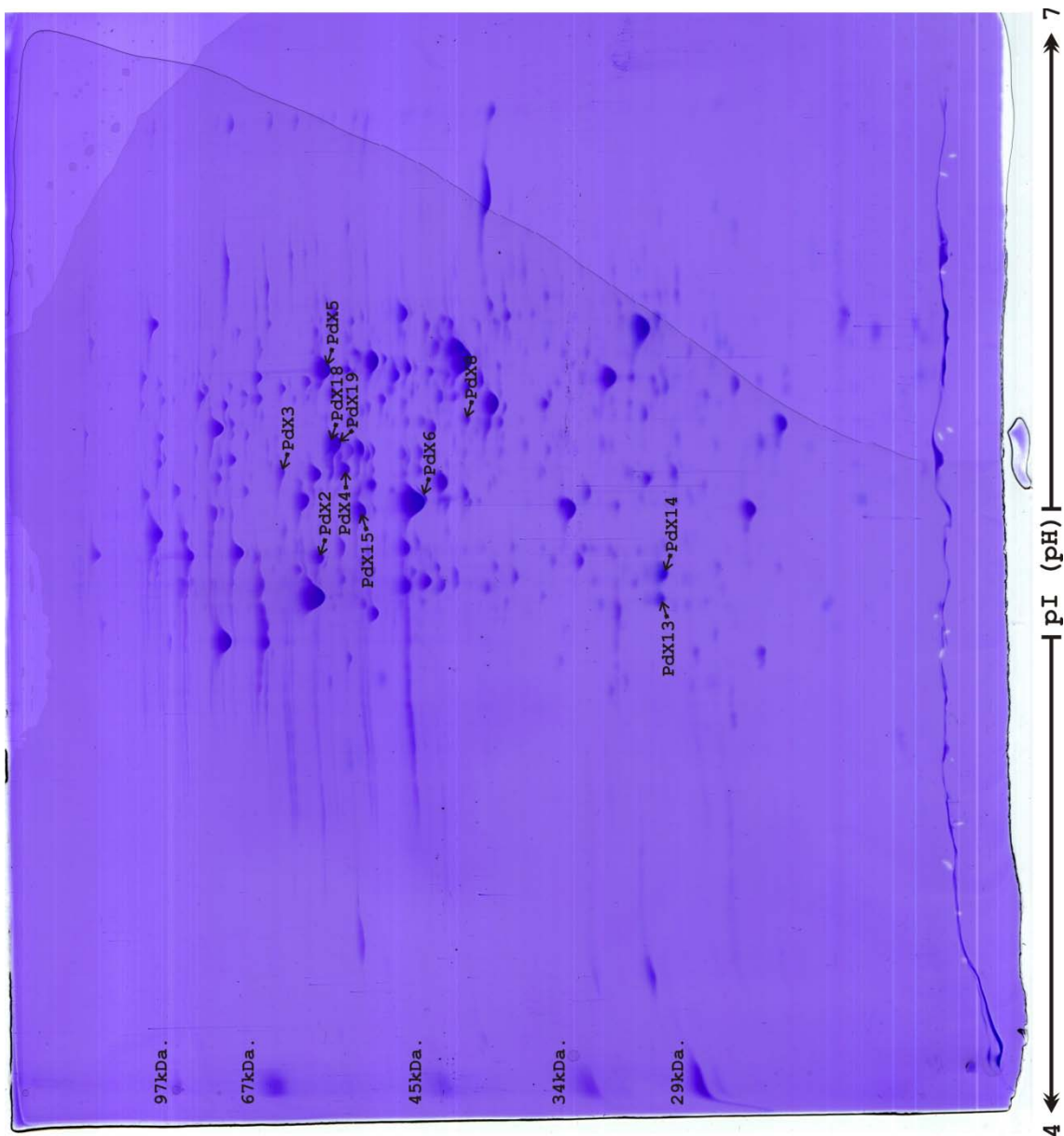
**Figura 8.35. (Gel Y2 AFA flechas\_47-Y2-27.10).** Imagen de gel 2-DE de 200 x 200 x 0,5 mm y 11% (p/v) de poliacrilamida obtenido a partir de extractos totales de proteínas de *Pseudomonas* sp. Y2 crecida en medio mínimo M9 + AFA. El IEE se realizó en geles en tubo con un gradiente de pH de 4 a 7. Se cargó 350 µg. de extracto total de proteínas. Teñido con azul de Coomassie. Con marcador de pesos moleculares (kDa.) en el margen izquierdo. Las flechas indican y localizan las proteínas identificadas en este gel.



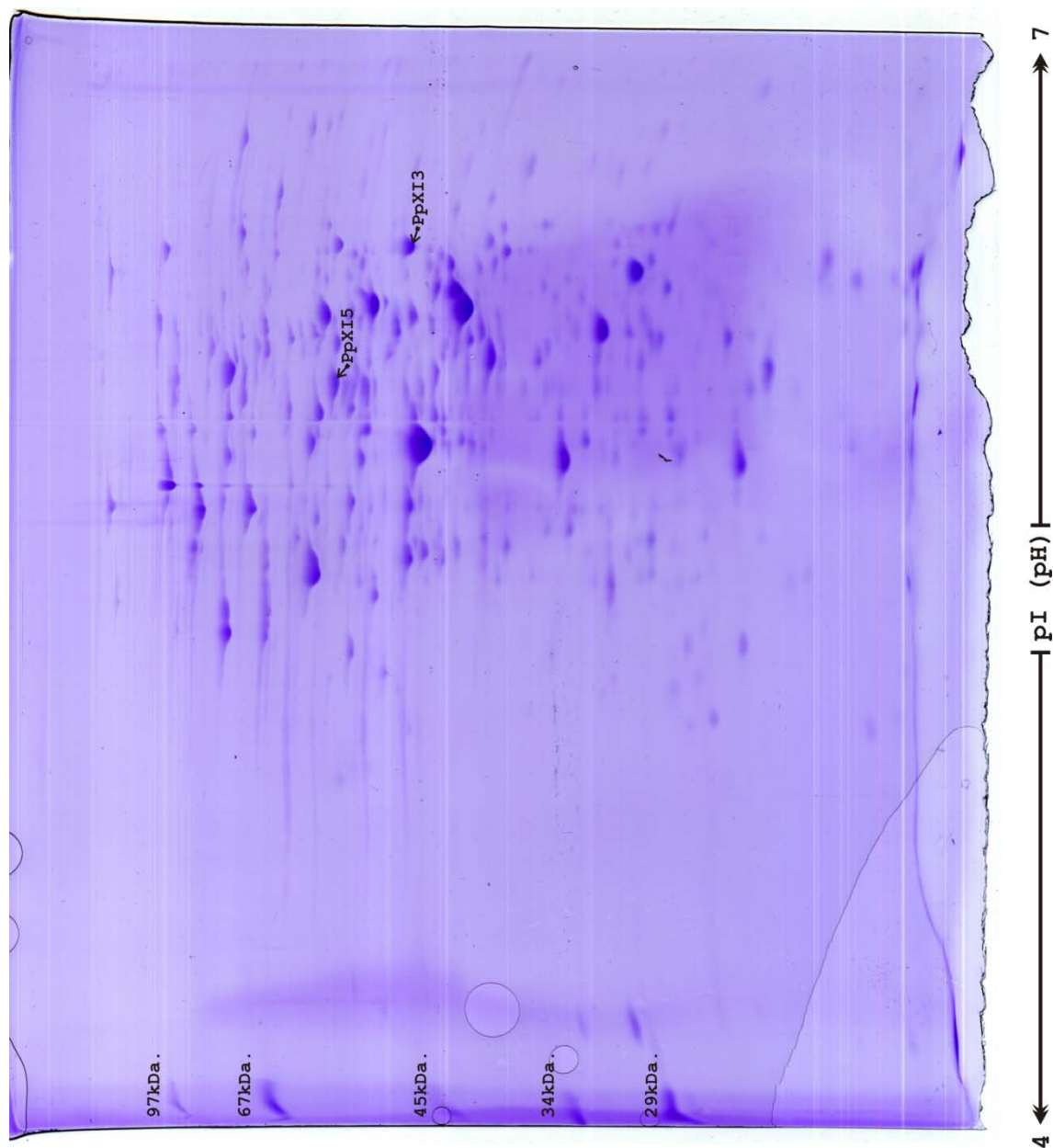
**Figura 8.36. (Gel K1 AFA flechas\_47-K1-25.10).** Imagen de gel 2-DE de 200 x 200 x 0,5 mm y 11% (p/v) de poliacrilamida obtenido a partir de extractos totales de proteínas de *Pseudomonas* sp. Y2K1 crecida en medio mínimo M9 + AFA. El IEE se realizó en gels en tubo con un gradiente de pH de 4 a 7. Se cargó 320 µg. de extracto total de proteínas. Teñido con azul de Coomassie. Con marcador de pesos moleculares (kDa.) en el margen izquierdo. Las flechas indican y localizan las proteínas identificadas en este gel.



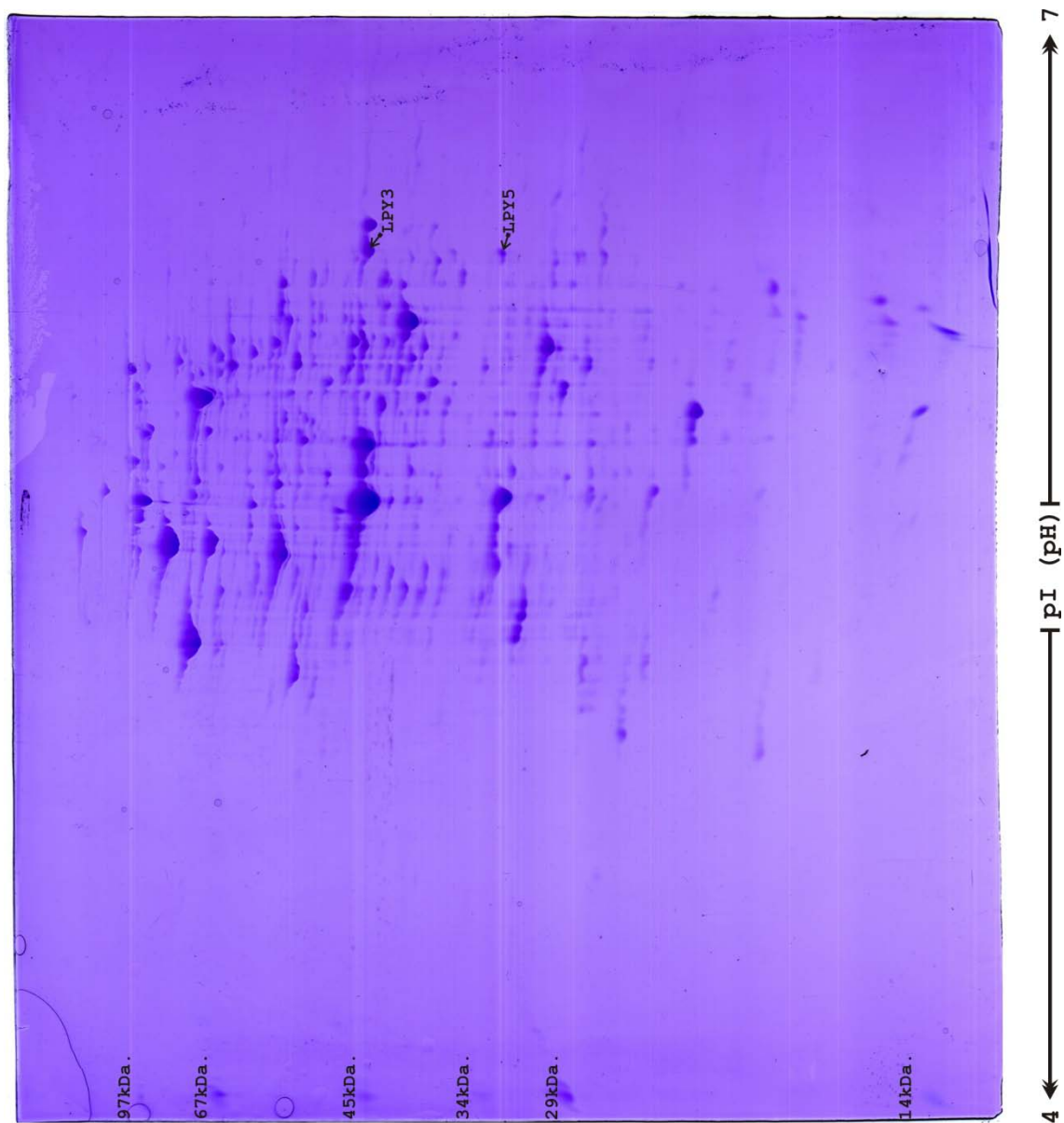
**Figura 8.37. (Gel T2 AFA flechas\_47-T2-26.10).** Imagen de gel 2-DE de 200 x 200 x 0,5 mm y 11% (p/v) de poliacrilamida obtenido a partir de extractos totales de proteínas de *Pseudomonas* sp. Y2T2 crecida en medio mínimo M9 + AFA. El IEE se realizó en geles en tubo con un gradiente de pH de 4 a 7. Se cargó 350 µg. de extracto total de proteínas. Teñido con azul de Coomassie. Con marcador de pesos moleculares (kDa.) en el margen izquierdo. Las flechas indican y localizan las proteínas identificadas en este gel.



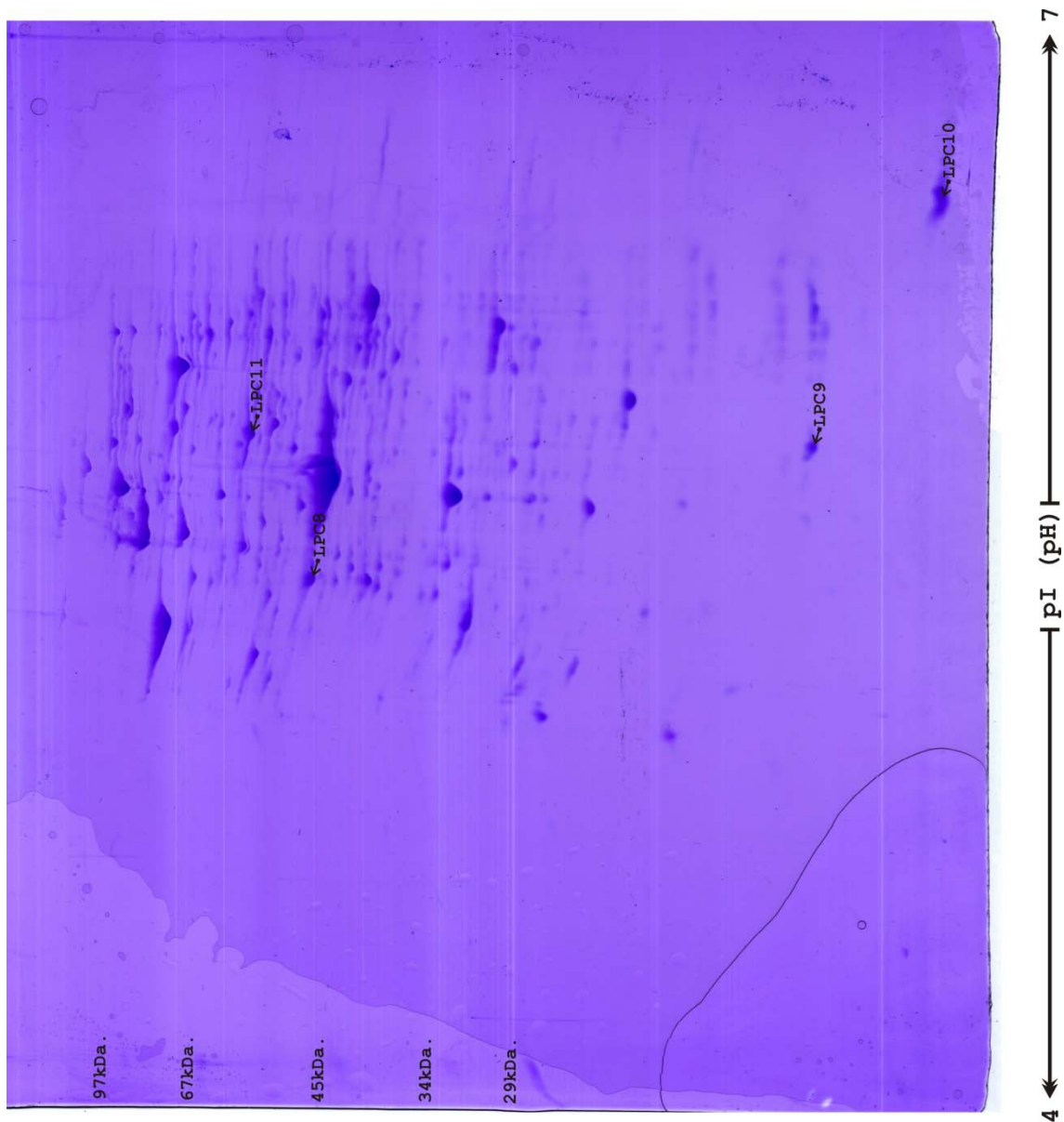
**Figura 8.38. (Gel deltaX AFA flechas\_47-dX-PA-15.12t7).** Imagen de gel 2-DE de 200 x 200 x 0,5 mm y 11% (p/v) de poliacrilamida obtenido a partir de extractos totales de proteínas de *Pseudomonas* sp. Y2T2X1 crecida en medio mínimo M9 + AFA. El IEE se realizó en geles en tubo con un gradiente de pH de 4 a 7. Se cargó 330 µg. de extracto total de proteínas. Teñido con azul de Coomassie. Con marcador de pesos moleculares (kDa.) en el margen izquierdo. Las flechas indican y localizan las proteínas identificadas en este gel.



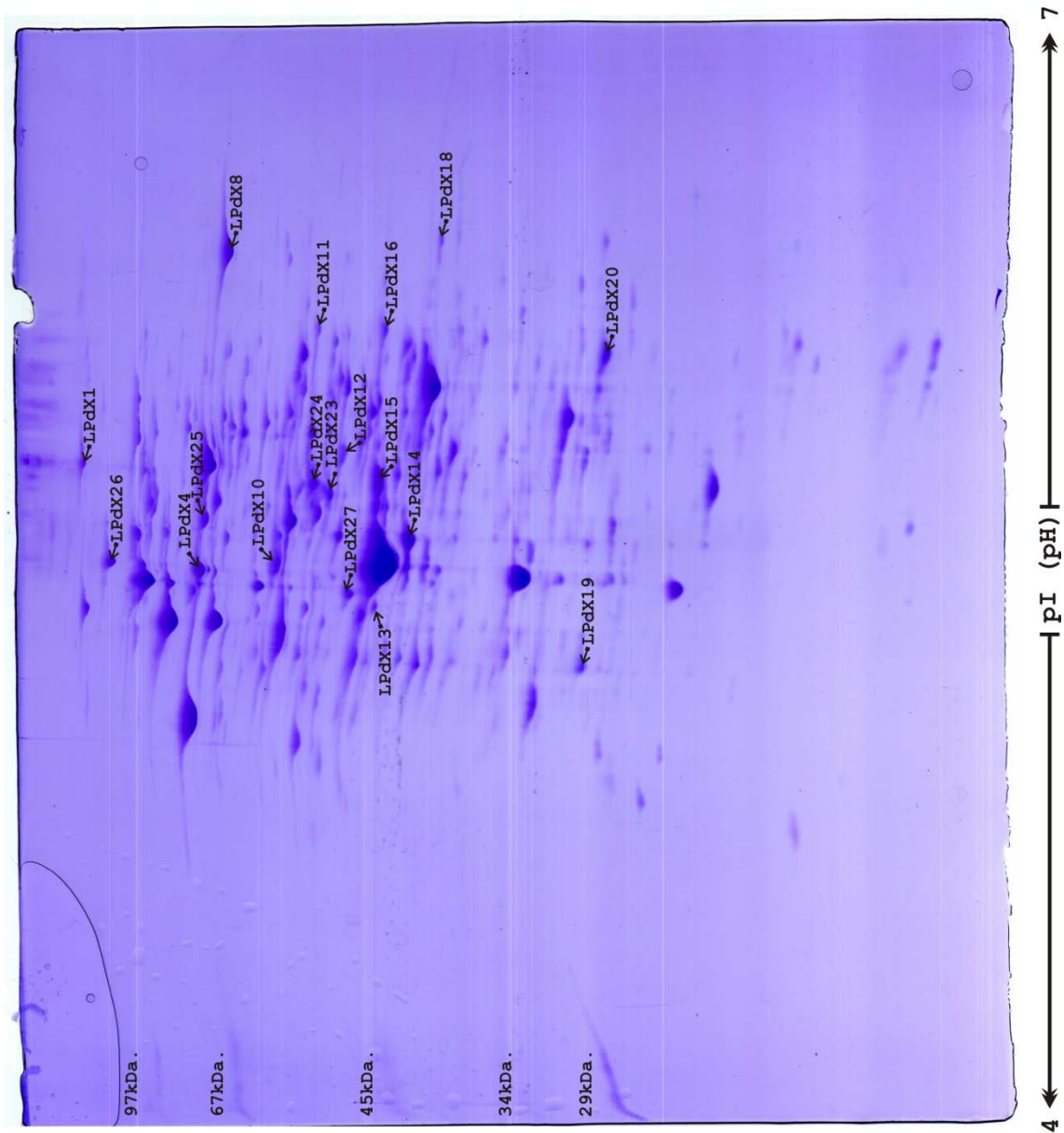
**Figura 8.39. (Gel pVLTX1+iptg AFA flechas\_47-pVLTX1-IPTG-PA-15.12t5).** Imagen de gel 2-DE de 200 x 200 x 0,5 mm y 11% (p/v) de poliacrilamida obtenido a partir de extractos totales de proteínas de *Pseudomonas* sp. Y2 + pVLTX1 crecida en medio mínimo M9 + AFA + IPTG. El IEE se realizó en geles en tubo con un gradiente de pH de 4 a 7. Se cargó 330 µg. de extracto total de proteínas. Teñido con azul de Coomassie. Con marcador de pesos moleculares (kDa.) en el margen izquierdo. Las flechas indican y localizan las proteínas identificadas en este gel.



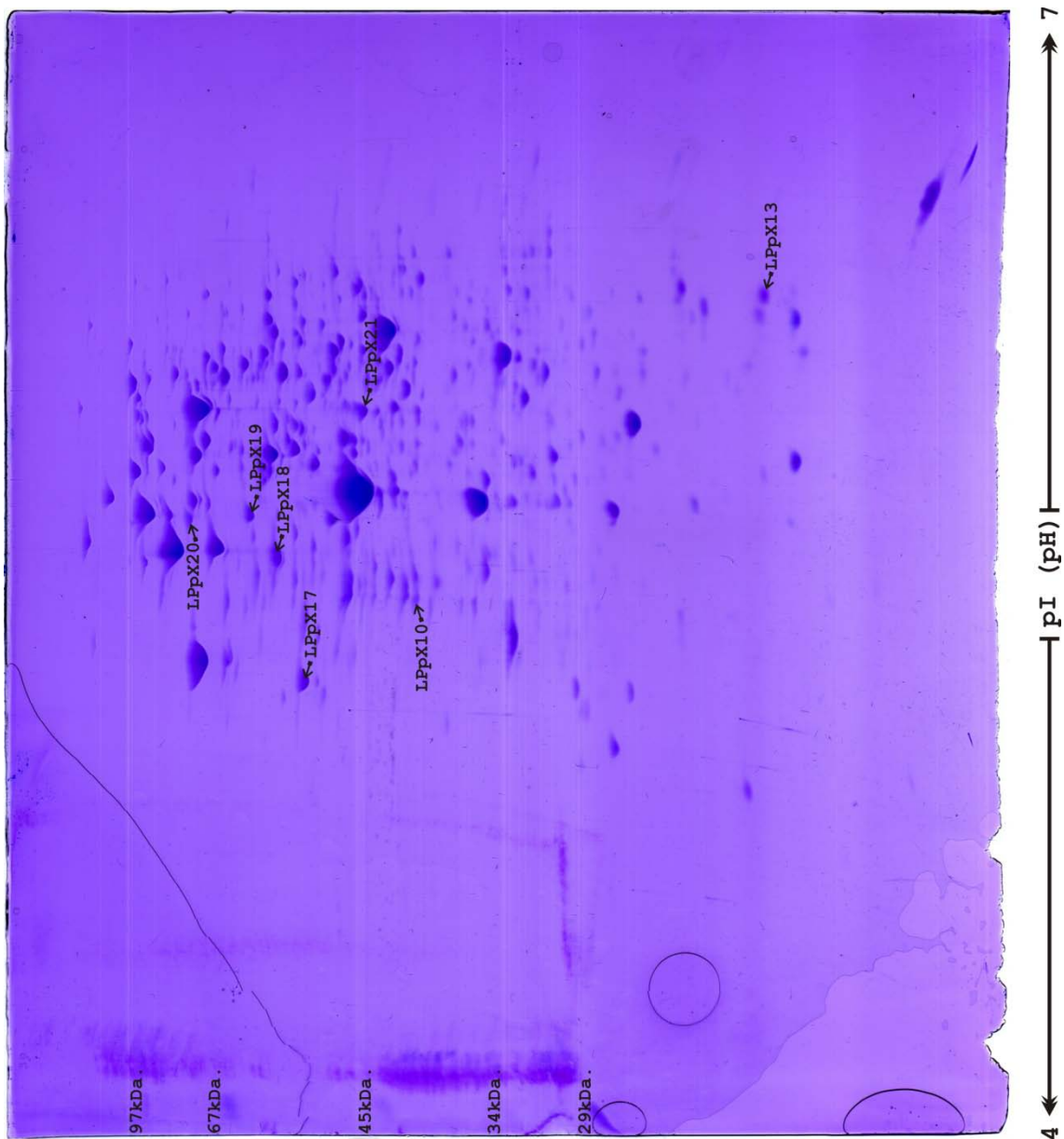
**Figura 8.40. (Gel Y2 LB+AFA flechas\_47-Y2LBPA-24.11t3).** Imagen de gel 2-DE de 200 x 200 x 0,5 mm y 11% (p/v) de poliacrilamida obtenido a partir de extractos totales de proteínas de *Pseudomonas* sp. Y2 crecida en medio LB + AFA. El IEE se realizó en geles en tubo con un gradiente de pH de 4 a 7. Se cargó 300 µg. de extracto total de proteínas. Teñido con azul de Coomassie. Con marcador de pesos moleculares (kDa.) en el margen izquierdo. Las flechas indican y localizan las proteínas identificadas en este gel.



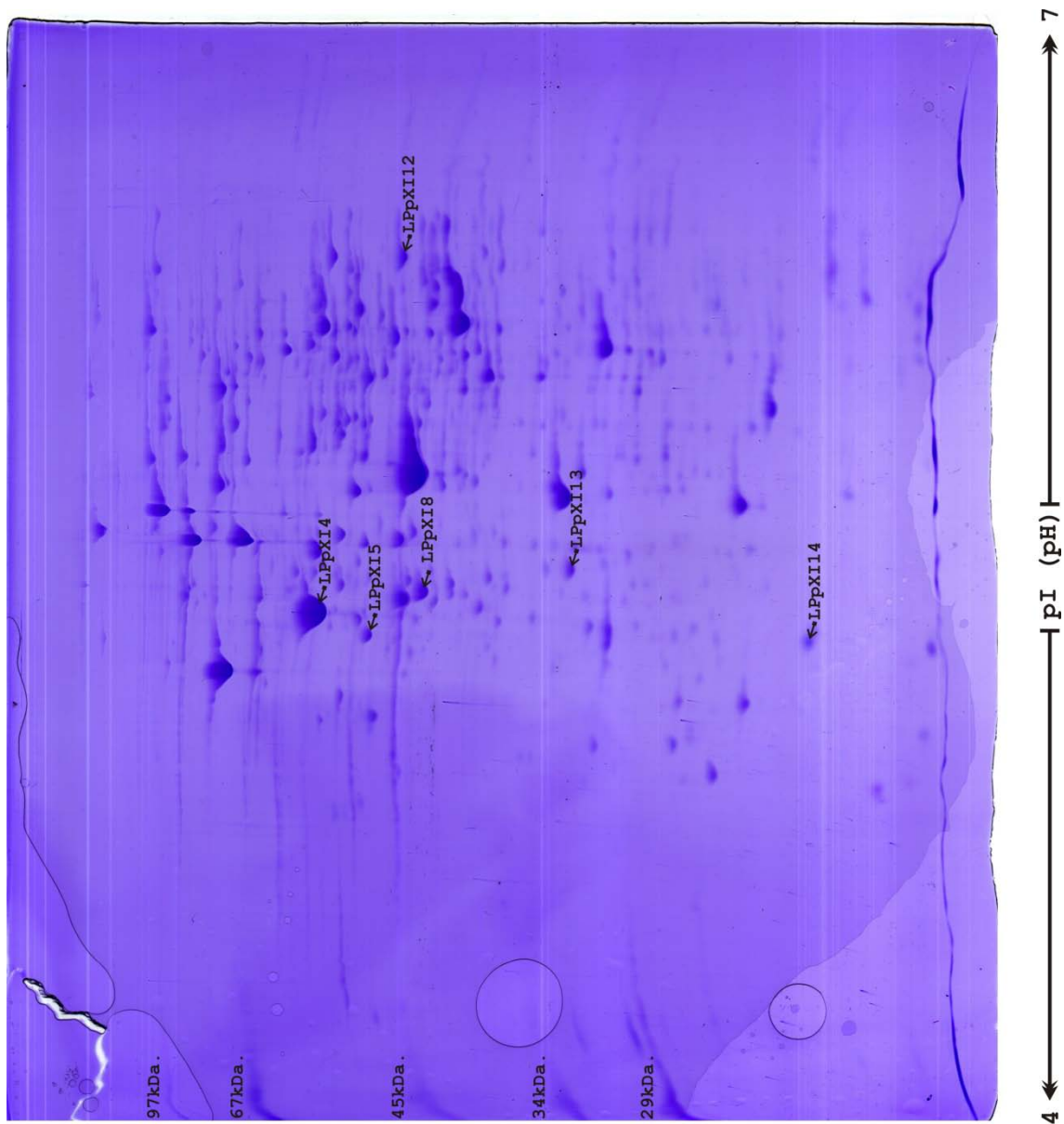
**Figura 8.41. (Gel Y2C1 LB+AFA flechas\_47-Y2C1LBPA-25.11).** Imagen de gel 2-DE de 200 x 200 x 0,5 mm y 11% (p/v) de poliacrilamida obtenido a partir de extractos totales de proteínas de *Pseudomonas* sp. Y2C1 crecida en medio LB + AFA. El IEE se realizó en gels en tubo con un gradiente de pH de 4 a 7. Se cargó 300  $\mu$ g. de extracto total de proteínas. Teñido con azul de Coomassie. Con marcador de pesos moleculares (kDa.) en el margen izquierdo. Las flechas indican y localizan las proteínas identificadas en este gel.



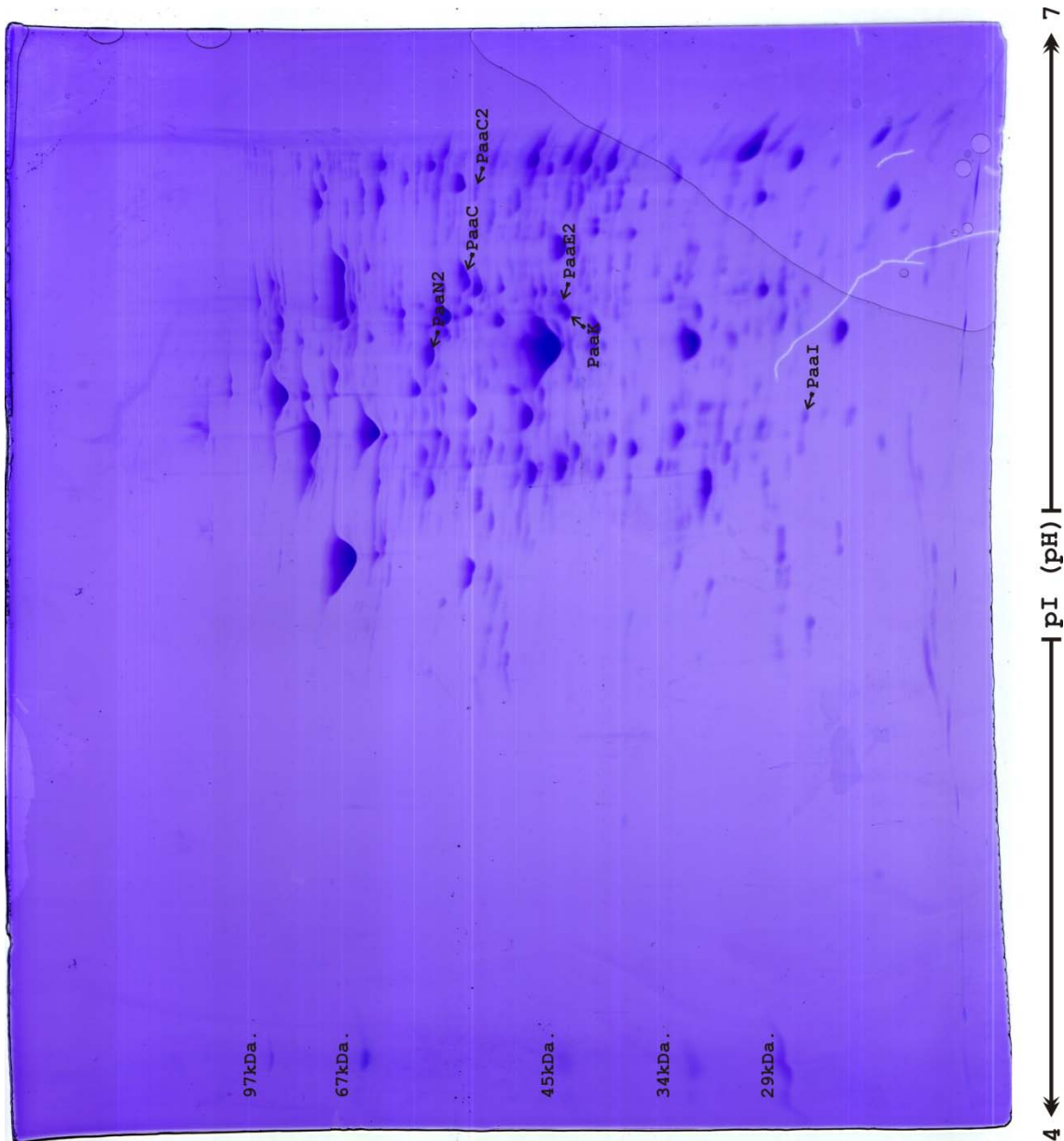
**Figura 8.42. (Gel deltaX-LB+PA flechas\_47deltaX-LB+PA\_28.11).** Imagen de gel 2-DE de 200 x 200 x 0,5 mm y 11% (p/v) de poliacrilamida obtenido a partir de extractos totales de proteínas de *Pseudomonas* sp. Y2T2X1 crecida en medio LB + AFA. El IEE se realizó en geles en tubo con un gradiente de pH de 4 a 7. Se cargó 300 µg. de extracto total de proteínas. Teñido con azul de Coomassie. Con marcador de pesos moleculares (kDa.) en el margen izquierdo. Las flechas indican y localizan las proteínas identificadas en este gel.



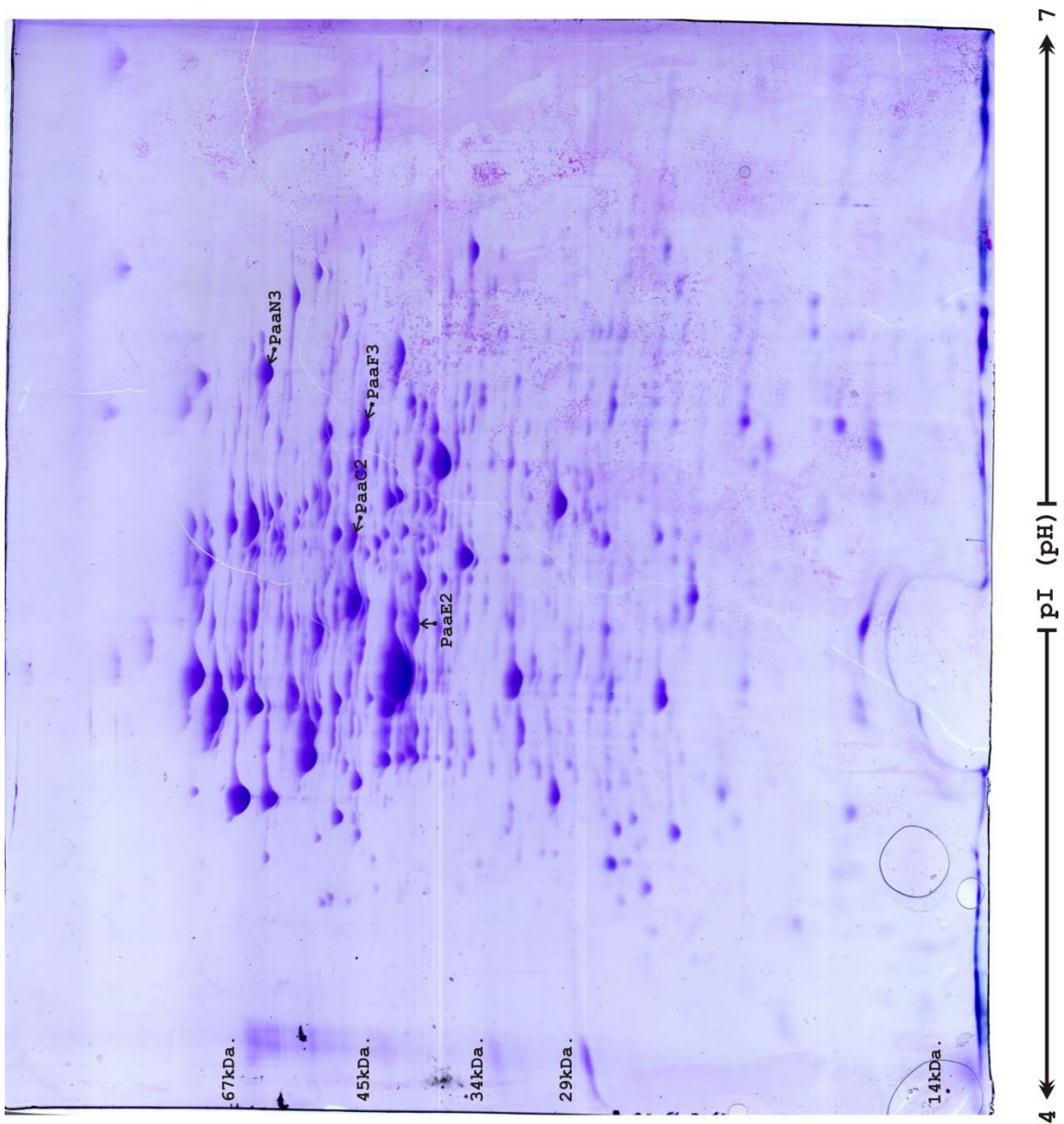
**Figura 8.43. (Gel pVLTX1 LB+PA flechas\_47pVLTX1-LB+PA\_25.11t4).** Imagen de gel 2-DE de 200 x 200 x 0,5 mm y 11% (p/v) de poliacrilamida obtenido a partir de extractos totales de proteínas de *Pseudomonas* sp. Y2 + pVLTX1 crecida en medio LB + AFA. El IEE se realizó en geles en tubo con un gradiente de pH de 4 a 7. Se cargó 300  $\mu$ g. de extracto total de proteínas. Teñido con azul de Coomassie. Con marcador de pesos moleculares (kDa.) en el margen izquierdo. Las flechas indican y localizan las proteínas identificadas en este gel.



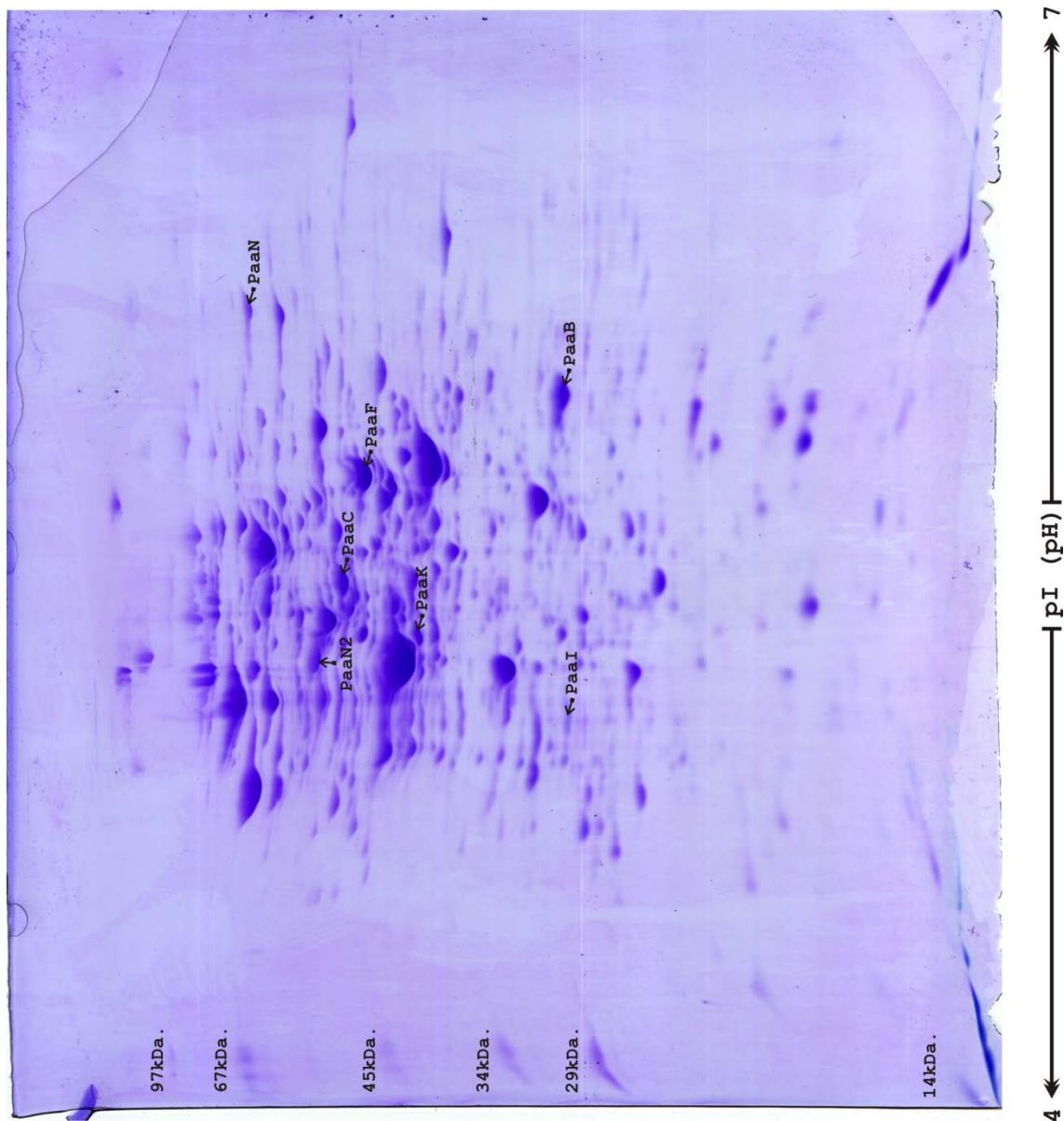
**Figura 8.44. (Gel pVLTX1+IPTG LB+PA flechas\_47pVLTX1+IPTG-LB+PA\_14.12t3).** Imagen de gel 2-DE de 200 x 200 x 0,5 mm y 11% (p/v) de poliacrilamida obtenido a partir de extractos totales de proteínas de *Pseudomonas* sp. Y2 + pVLTX1 crecida en medio LB + AFA + IPTG. El IEE se realizó en geles en tubo con un gradiente de pH de 4 a 7. Se cargó 330 µg. de extracto total de proteínas. Teñido con azul de Coomassie. Con marcador de pesos moleculares (kDa.) en el margen izquierdo. Las flechas indican y localizan las proteínas identificadas en este gel.



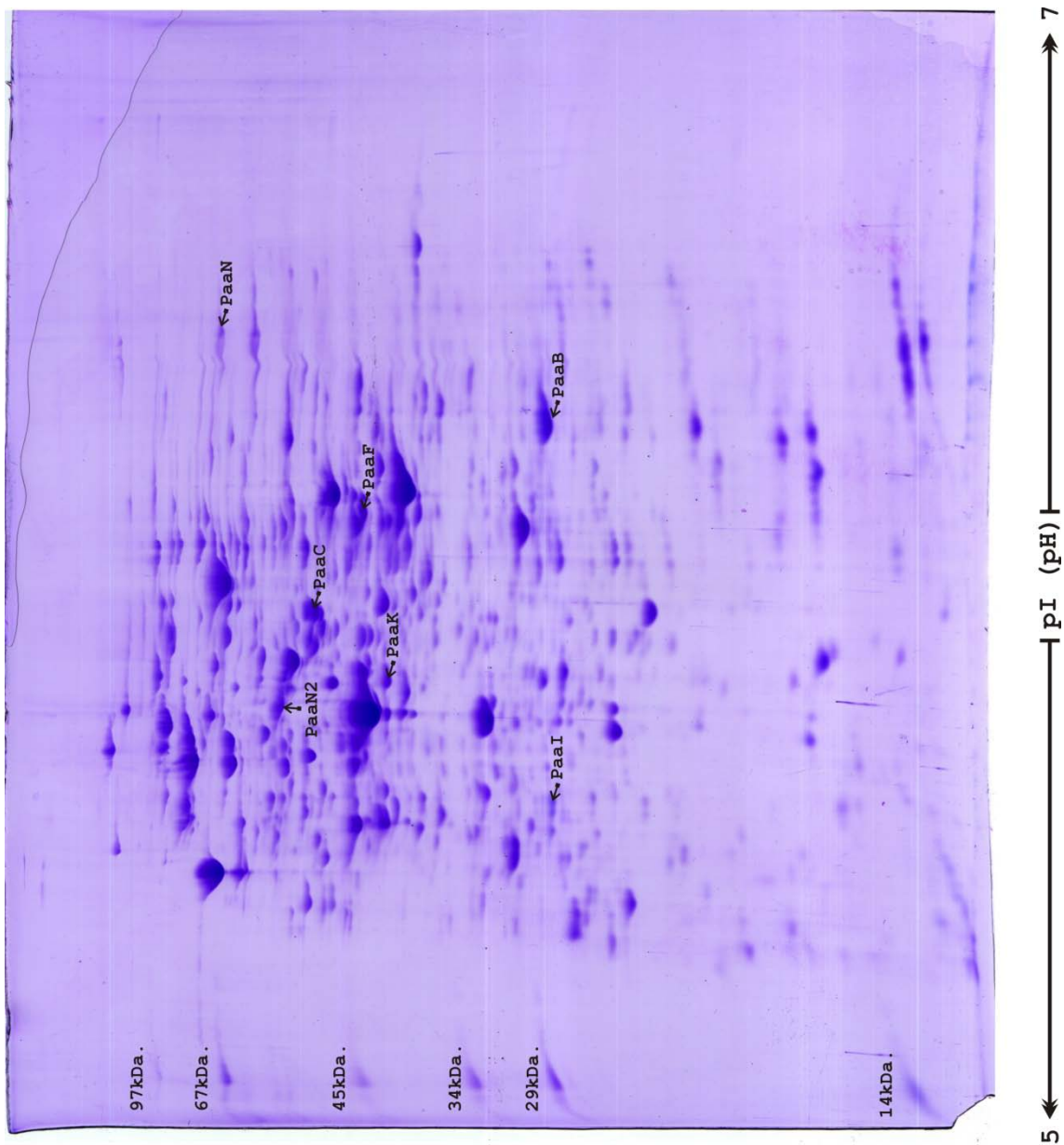
**Figura 8.45. (Y2-AFA\_47-Y2-27,10&47-Y2-02,11-1h&47-Y2-02,11-3h).** Imagen de gel 2-DE de 200 x 200 x 0,5 mm y 11% (p/v) de poliacrilamida obtenido a partir de extractos totales de proteínas de *Pseudomonas* sp. Y2 crecida en medio mínimo M9 + AFA. El IEE se realizó en gels en tubo con un gradiente de pH de 4 a 7. Se cargó 350/300/300 µg. de extracto total de proteínas. Teñido con azul de Coomassie. Con marcador de pesos moleculares (kDa.) en el margen izquierdo. Las flechas indican y localizan las diferentes proteínas PAA que aparecen en este gel.



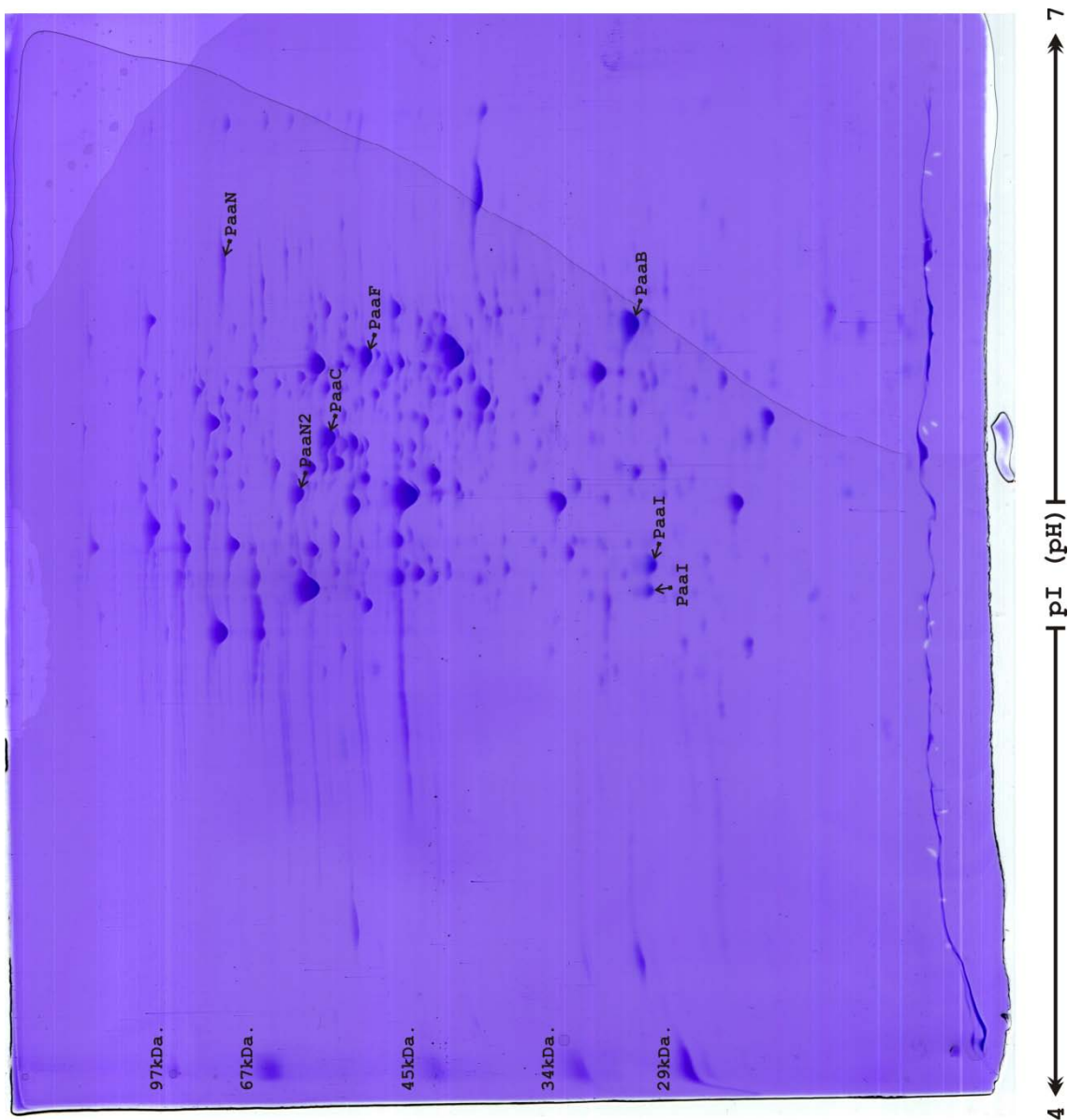
**Figura 8.46. (K1-AFA\_47-K1-25,10).** Imagen de gel 2-DE de 200 x 200 x 0,5 mm y 11% (p/v) de poliacrilamida obtenido a partir de extractos totales de proteínas de *Pseudomonas* sp. Y2K1 crecida en medio mínimo M9 + AFA. El IEE se realizó en geles en tubo con un gradiente de pH de 4 a 7. Se cargó 320 µg. de extracto total de proteínas. Teñido con azul de Coomassie. Con marcador de pesos moleculares (kDa.) en el margen izquierdo. Las flechas indican y localizan las diferentes proteínas PAA que aparecen en este gel.



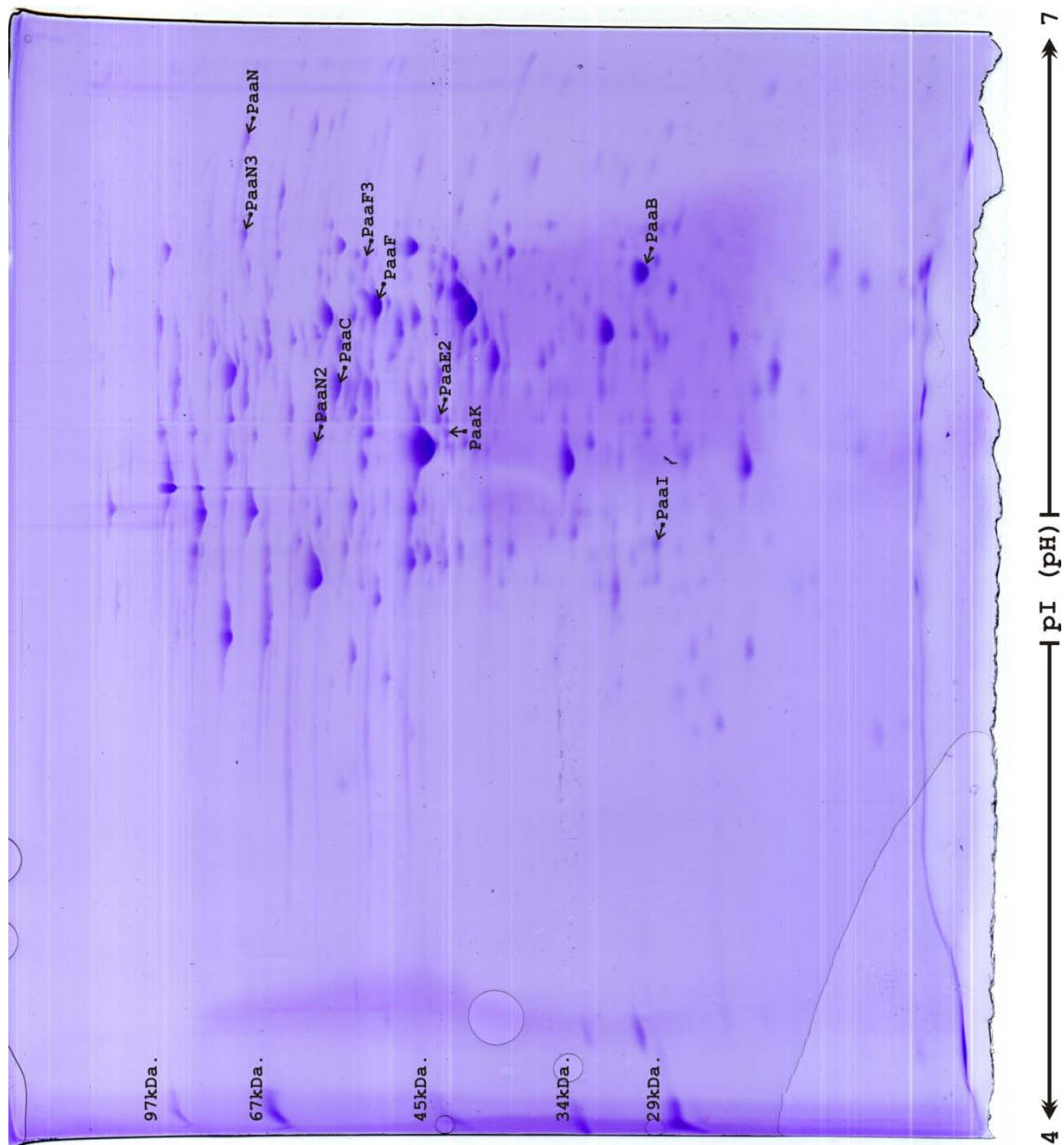
**Figura 8.47. (T2-AFA\_47-T2-27,10).** Imagen de gel 2-DE de 200 x 200 x 0,5 mm y 11% (p/v) de poliacrilamida obtenido a partir de extractos totales de proteínas de *Pseudomonas* sp. Y2 T2 crecida en medio mínimo M9 + AFA. El IEE se realizó en geles en tubo con un gradiente de pH de 4 a 7. Se cargó 350 µg. de extracto total de proteínas. Teñido con azul de Coomassie. Con marcador de pesos moleculares (kDa.) en el margen izquierdo. Las flechas indican y localizan las diferentes proteínas PAA que aparecen en este gel.



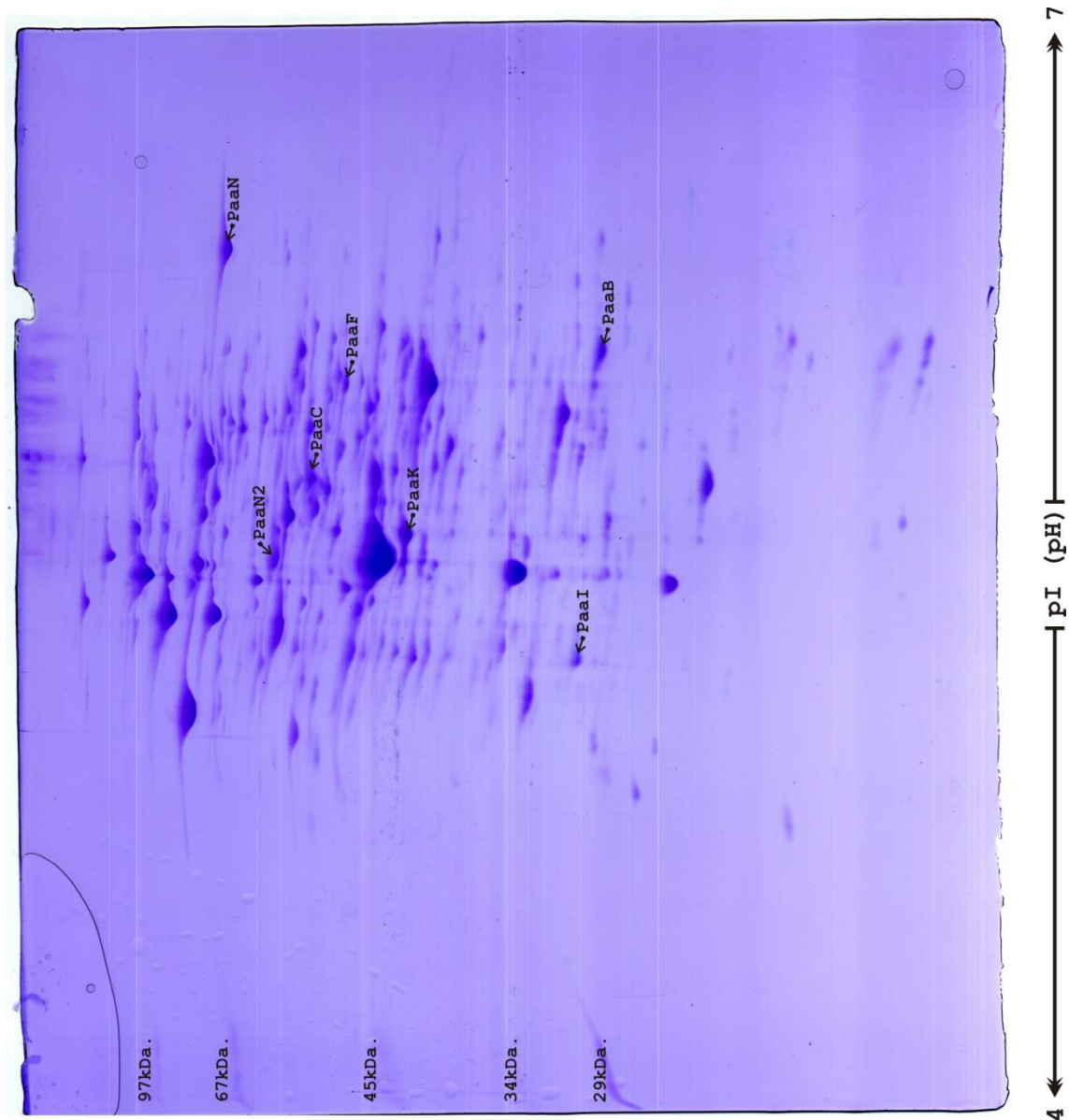
**Figura 8.48. (T2-AFA\_57-T2-09,11).** Imagen de gel 2-DE de 200 x 200 x 0,5 mm y 11% (p/v) de poliacrilamida obtenido a partir de extractos totales de proteínas de *Pseudomonas* sp. Y2T2 crecida en medio mínimo M9 + AFA. El IEE se realizó en geles en tubo con un gradiente de pH de 5 a 7. Se cargó 300 µg. de extracto total de proteínas. Teñido con azul de Coomassie. Con marcador de pesos moleculares (kDa.) en el margen izquierdo. Las flechas indican y localizan las diferentes proteínas PAA que aparecen en este gel.



**Figura 8.49. (T2-DELTA X-AFA\_47-delta X-PA-15,12t7).** Imagen de gel 2-DE de 200 x 200 x 0,5 mm y 11% (p/v) de poliacrilamida obtenido a partir de extractos totales de proteínas de *Pseudomonas* sp. Y2T2X1 crecida en medio mínimo M9 + AFA. El IEE se realizó en geles en tubo con un gradiente de pH de 4 a 7. Se cargó 330 µg. de extracto total de proteínas. Teñido con azul de Coomassie. Con marcador de pesos moleculares (kDa.) en el margen izquierdo. Las flechas indican y localizan las diferentes proteínas PAA que aparecen en este gel.



**Figura 8.50. (Y2-pVLTX1+IPTG-PA\_47pVLTX1+IPTG-PA-15,12t5).** Imagen de gel 2-DE de 200 x 200 x 0,5 mm y 11% (p/v) de poliacrilamida obtenido a partir de extractos totales de proteínas de *Pseudomonas* sp. Y2 + pVLTX1 crecida en medio mínimo M9 + AFA + IPTG. El IEE se realizó en gels en tubo con un gradiente de pH de 4 a 7. Se cargó 330  $\mu$ g. de extracto total de proteínas. Teñido con azul de Coomassie. Con marcador de pesos moleculares (kDa.) en el margen izquierdo. Las flechas indican y localizan las diferentes proteínas PAA que aparecen en este gel.



**Figura 8.51. (T2-DELtaX-LB+AFA\_47-deltaX-LB+PA-28,11).** Imagen de gel 2-DE de 200 x 200 x 0,5 mm y 11% (p/v) de poliacrilamida obtenido a partir de extractos totales de proteínas de *Pseudomonas* sp. Y2T2X1 crecida en medio LB + AFA. El IEE se realizó en gels en tubo con un gradiente de pH de 4 a 7. Se cargó 300 µg. de extracto total de proteínas. Teñido con azul de Coomassie. Con marcador de pesos moleculares (kDa.) en el margen izquierdo. Las flechas indican y localizan las diferentes proteínas PAA que aparecen en este gel.



## *Bibliografía*

---

---



## 9. BIBLIOGRAFÍA

- Abe-Yoshizumi, R., U. Kamei, A. Yamada, M. Kimura y S. Ichihara (2004). "The evolution of the phenylacetic acid degradation pathway in bacteria." Biosci Biotechnol Biochem **68**(3): 746-8.
- Agullo, L., B. Camara, P. Martinez, V. Latorre y M. Seeger (2007). "Response to (chloro)biphenyls of the polychlorobiphenyl-degrader *Burkholderia xenovorans* LB400 involves stress proteins also induced by heat shock and oxidative stress." FEMS Microbiol Lett **267**(2): 167-75.
- Ahmed, N. y G. E. Rice (2005). "Strategies for revealing lower abundance proteins in two-dimensional protein maps." J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci **815**(1-2): 39-50.
- Aiba, H. (2007). "Mechanism of RNA silencing by Hfq-binding small RNAs." Curr Opin Microbiol **10**(2): 134-9.
- Alifano, P., C. Piscitelli, V. Blasi, F. Rivellini, A. G. Nappo, C. B. Bruni y M. S. Carlomagno (1992). "Processing of a polycistronic mRNA requires a 5' cis element and active translation." Mol Microbiol **6**(6): 787-98.
- Alonso, S. (2002). Estudio de la ruta catabólica del estireno de *Pseudomonas* sp. Y2. Madrid, Universidad Complutense de Madrid: 165.
- Alonso, S., D. Bartolomé-Martín, M. del Álamo, E. Díaz, J. L. García y J. Perera (2003). "Genetic characterization of the styrene lower catabolic pathway of *Pseudomonas* sp. strain Y2." Gene **319**: 71-83.
- Altenschmidt, U. y G. Fuchs (1992). "Novel aerobic 2-aminobenzoate metabolism. Purification and characterization of 2-aminobenzoate-CoA ligase, localisation of the gene on a 8-kbp plasmid, and cloning and sequencing of the gene from a denitrifying *Pseudomonas* sp." Eur J Biochem **205**(2): 721-7.
- Altenschmidt, U., B. Oswald, E. Steiner, H. Herrmann y G. Fuchs (1993). "New aerobic benzoate oxidation pathway via benzoyl-coenzyme A and 3-hydroxybenzoyl-coenzyme A in a denitrifying *Pseudomonas* sp." J Bacteriol **175**(15): 4851-8.
- Allenby, N. E., N. O'Connor, Z. Pragai, N. M. Carter, M. Miethke, S. Engelmann, M. Hecker, A. Wipat, A. C. Ward y C. R. Harwood (2004). "Post-transcriptional regulation of the *Bacillus subtilis* pst operon encoding a phosphate-specific ABC transporter." Microbiology **150**(Pt 8): 2619-28.
- Anderson, M. S. y C. R. Raetz (1987). "Biosynthesis of lipid A precursors in *Escherichia coli*. A cytoplasmic acyltransferase that converts UDP-N-acetylglucosamine to UDP-3-O-(R-3-hydroxymyristoyl)-N-acetylglucosamine." J Biol Chem **262**(11): 5159-69.
- Applegate, B. M., S. R. Kehrmeier y G. S. Saylor (1998). "A chromosomally based tod-luxCDABE whole-cell reporter for benzene, toluene, ethylbenzene, and xylene (BTEX) sensing." Appl Environ Microbiol **64**(7): 2730-5.

- Aranda-Olmedo, I., P. Marin, J. L. Ramos y S. Marques (2006). "Role of the ptsN gene product in catabolite repression of the *Pseudomonas putida* TOL toluene degradation pathway in chemostat cultures." *Appl Environ Microbiol* **72**(11): 7418-21.
- Aranda-Olmedo, I., J. L. Ramos y S. Marques (2005). "Integration of signals through Crc and PtsN in catabolite repression of *Pseudomonas putida* TOL plasmid pWW0." *Appl Environ Microbiol* **71**(8): 4191-8.
- Aranda-Olmedo, I., R. Tobes, M. Manzanera, J. L. Ramos y S. Marqués (2002). "Species-specific repetitive extragenic palindromic (REP) sequences in *Pseudomonas putida*." *Nucleic Acids Res* **30**(8): 1826-33.
- Armengaud, J., K. N. Timmis y R. M. Wittich (1999). "A functional 4-hydroxysalicylate/hydroxyquinol degradative pathway gene cluster is linked to the initial dibenzo-p-dioxin pathway genes in *Sphingomonas* sp. strain RW1." *J Bacteriol* **181**(11): 3452-61.
- Austin, G. T. (1984). *Shreeve's Chemical Process Industries*. New York, McGraw-Hill International Editions.
- Bairoch, A. (1993). "The PROSITE dictionary of sites and patterns in proteins, its current status." *Nucleic Acids Res* **21**(13): 3097-103.
- Bardwell, J. C., P. Regnier, S. M. Chen, Y. Nakamura, M. Grunberg-Manago y D. L. Court (1989). "Autoregulation of RNase III operon by mRNA processing." *EMBO J* **8**(11): 3401-7.
- Barnes, W. M. (1994). "PCR amplification of up to 35-kb DNA with high fidelity and high yield from lambda bacteriophage templates." *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**(6): 2216-20.
- Bartolomé-Martín, D. (2006). Estudio de los genes implicados en la degradación del ácido fenilacético en *Pseudomonas* sp. Y2. Madrid, Universidad Complutense de Madrid
- Bartolomé-Martín, D., E. Martínez-García, V. Mascaraque, J. Rubio, J. Perera y S. Alonso (2004). "Characterization of a second functional gene cluster for the catabolism of phenylacetic acid in *Pseudomonas* sp. strain Y2." *Gene* **341**: 167-79.
- Basu, A., R. Shrivastava, B. Basu, S. K. Apte y P. S. Phale (2007). "Modulation of glucose transport causes preferential utilization of aromatic compounds in *Pseudomonas putida* CSV86." *J Bacteriol* **189**(21): 7556-62.
- Beaman, T. W., D. A. Binder, J. S. Blanchard y S. L. Roderick (1997). "Three-dimensional structure of tetrahydrodipicolinate N-succinyltransferase." *Biochemistry* **36**(3): 489-94.
- Beaman, T. W., J. S. Blanchard y S. L. Roderick (1998a). "The conformational change and active site structure of tetrahydrodipicolinate N-succinyltransferase." *Biochemistry* **37**(29): 10363-9.
- Beaman, T. W., M. Sugantino y S. L. Roderick (1998b). "Structure of the hexapeptide xenobiotic acetyltransferase from *Pseudomonas aeruginosa*." *Biochemistry* **37**(19): 6689-96.
- Beaman, T. W., K. W. Vogel, D. G. Drueckhammer, J. S. Blanchard y S. L. Roderick (2002). "Acyl group specificity at the active site of tetrahydrodipicolinate N-succinyltransferase." *Protein Sci* **11**(4): 974-9.

- Belasco, J. G., J. T. Beatty, C. W. Adams, A. von Gabain y S. N. Cohen (1985). "Differential expression of photosynthesis genes in *R. capsulata* results from segmental differences in stability within the polycistronic *rxcA* transcript." Cell **40**(1): 171-81.
- Belasco, J. G. y G. Brawerman (1993). Control of messenger RNA stability. San Diego, Academic Press.
- Belasco, J. G. y C. F. Higgins (1988). "Mechanisms of mRNA decay in bacteria: a perspective." Gene **72**(1-2): 15-23.
- Benndorf, D., N. Loffhagen y W. Babel (1999). "Induction of heat shock proteins in response to primary alcohols in *Acinetobacter calcoaceticus*." Electrophoresis **20**(4-5): 781-9.
- Benndorf, D., N. Loffhagen y W. Babel (2001). "Protein synthesis patterns in *Acinetobacter calcoaceticus* induced by phenol and catechol show specificities of responses to chemostress." FEMS Microbiol Lett **200**(2): 247-52.
- Berg, J. M., J. L. Tymoczko y L. Stryer (2006). Biochemistry. New York.
- Berrier, C., A. Garrigues, G. Richarme y A. Ghazi (2000). "Elongation factor Tu and DnaK are transferred from the cytoplasm to the periplasm of *Escherichia coli* during osmotic downshock presumably via the mechanosensitive channel *mscL*." J Bacteriol **182**(1): 248-51.
- Birboim, H. C. y J. Doly (1979). "A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA." Nucl Acids Res **7**: 1513.
- Blom, A., W. Harder y A. Matin (1992). "Unique and overlapping pollutant stress proteins of *Escherichia coli*." Appl Environ Microbiol **58**(1): 331-4.
- Boccard, F. y P. Prentki (1993). "Specific interaction of IHF with RIBs, a class of bacterial repetitive DNA elements located at the 3' end of transcription units." EMBO J **12**(13): 5019-27.
- Boll, M., G. Fuchs y J. Heider (2002). "Anaerobic oxidation of aromatic compounds and hydrocarbons." Curr Opin Chem Biol **6**(5): 604-11.
- Botsford, J. L. y J. G. Harman (1992). "Cyclic AMP in prokaryotes." Microbiol Rev **56**(1): 100-22.
- 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**(3): 459-72.
- 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**: 248-54.
- Brand, B. y W. Boos (1991). "Maltose transacetylase of *Escherichia coli*. Mapping and cloning of its structural, gene, *mac*, and characterization of the enzyme as a dimer of identical polypeptides with a molecular weight of 20,000." J Biol Chem **266**(21): 14113-8.
- Brot, N. (1977). Translocation. Molecular mechanisms of protein biosynthesis. S. P. y. H. Weissach. New York, Academic Press, Inc.: 375-411.
- Brown, K., F. Pompeo, S. Dixon, D. Mengin-Lecreulx, C. Cambillau y Y. Bourne (1999). "Crystal structure of the bifunctional N-acetylglucosamine 1-phosphate uridylyltransferase from *Escherichia coli*: a paradigm for the related pyrophosphorylase superfamily." EMBO J **18**(15): 4096-107.

- Brusilow, S. W. (1984). "Arginine, an indispensable amino acid for patients with inborn errors of urea synthesis." J Clin Invest **74**(6): 2144-8.
- Brzostowicz, P. C., A. B. Reams, T. J. Clark y E. L. Neidle (2003). "Transcriptional cross-regulation of the catechol and protocatechuate branches of the  $\beta$ -ketoacid pathway contributes to carbon source-dependent expression of the *Acinetobacter* sp. strain ADP1 *pobA* gene." Appl Environ Microbiol **69**(3): 1598-1606.
- Buell, C. R., V. Joardar, M. Lindeberg, J. Selengut, I. T. Paulsen, M. L. Gwinn, R. J. Dodson, R. T. Deboy, A. S. Durkin, J. F. Kolonay, R. Madupu, S. Daugherty, L. Brinkac, M. J. Beanan, D. H. Haft, W. C. Nelson, T. Davidsen, N. Zafar, L. Zhou, J. Liu, Q. Yuan, H. Khouri, N. Fedorova, B. Tran, D. Russell, K. Berry, T. Utterback, S. E. Van Aken, T. V. Feldblyum, M. D'Ascenzo, W. L. Deng, A. R. Ramos, J. R. Alfano, S. Cartinhour, A. K. Chatterjee, T. P. Delaney, S. G. Lazarowitz, G. B. Martin, D. J. Schneider, X. Tang, C. L. Bender, O. White, C. M. Fraser y A. Collmer (2003). "The complete genome sequence of the Arabidopsis and tomato pathogen *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(18): 10181-6.
- Busby, S. y R. H. Ebright (1999). "Transcription activation by catabolite activator protein (CAP)." J Mol Biol **293**(2): 199-213.
- Caldas, T. D., A. El Yaagoubi y G. Richarme (1998). "Chaperone properties of bacterial elongation factor EF-Tu." J Biol Chem **273**(19): 11478-82.
- Callaghan, A. J., M. J. Marcaida, J. A. Stead, K. J. McDowall, W. G. Scott y B. F. Luisi (2005). "Structure of Escherichia coli RNase E catalytic domain and implications for RNA turnover." Nature **437**(7062): 1187-91.
- Cam, K., G. Rome, H. M. Krisch y J. P. Bouche (1996). "RNase E processing of essential cell division genes mRNA in Escherichia coli." Nucleic Acids Res **24**(15): 3065-70.
- Cannistraro, V. J. y D. Kennell (1989). "Purification and characterization of ribonuclease M and mRNA degradation in Escherichia coli." Eur J Biochem **181**(2): 363-70.
- Cannistraro, V. J. y D. Kennell (1993). "The 5' ends of RNA oligonucleotides in Escherichia coli and mRNA degradation." Eur J Biochem **213**(1): 285-93.
- Cannistraro, V. J., M. N. Subbarao y D. Kennell (1986). "Specific endonucleolytic cleavage sites for decay of Escherichia coli mRNA." J Mol Biol **192**(2): 257-74.
- Cao, B. y K. C. Loh (2008). "Catabolic pathways and cellular responses of Pseudomonas putida P8 during growth on benzoate with a proteomics approach." Biotechnol Bioeng **101**(6): 1297-312.
- Carmona, M. y E. Díaz (2005). "Iron-reducing bacterial unravel novel strategies for the anaerobic catabolism of aromatic compounds." Mol Microbiol **58**(5): 1210-1215.
- Carmona, M., M. J. Rodriguez, O. Martinez-Costa y V. De Lorenzo (2000). "In vivo and in vitro effects of (p)ppGpp on the sigma(54) promoter Pu of the TOL plasmid of Pseudomonas putida." J Bacteriol **182**(17): 4711-8.
- Carpousis, A. J., N. F. Vanzo y L. C. Raynal (1999). "mRNA degradation. A tale of poly(A) and multiprotein machines." Trends Genet **15**(1): 24-8.

- Cases, I. y V. de Lorenzo (1998). "Expression systems and physiological control of promoter activity in bacteria." Curr Opin Microbiol **1**(3): 303-10.
- Cases, I. y V. de Lorenzo (2001). "The black cat/white cat principle of signal integration in bacterial promoters." Embo J **20**(1-2): 1-11.
- Cases, I. y V. de Lorenzo (2005). "Promoters in the environment: transcriptional regulation in its natural context." Nat Rev Microbiol **3**(2): 105-18.
- Cases, I., J. Perez-Martin y V. de Lorenzo (1999). "The IANtr (PtsN) protein of *Pseudomonas putida* mediates the C source inhibition of the sigma54-dependent Pu promoter of the TOL plasmid." J Biol Chem **274**(22): 15562-8.
- Cases, I., F. Velazquez y V. de Lorenzo (2001). "Role of ptsO in carbon-mediated inhibition of the Pu promoter belonging to the pWW0 *Pseudomonas putida* plasmid." J Bacteriol **183**(17): 5128-33.
- Celesnik, H., A. Deana y J. G. Belasco (2007). "Initiation of RNA decay in *Escherichia coli* by 5' pyrophosphate removal." Mol Cell **27**(1): 79-90.
- Clement, J. M., C. Wilde, S. Bachellier, P. Lambert y M. Hofnung (1999). "IS1397 is active for transposition into the chromosome of *Escherichia coli* K-12 and inserts specifically into palindromic units of bacterial interspersed mosaic elements." J Bacteriol **181**(22): 6929-36.
- Cohen, S. N. (1995). "Surprises at the 3' end of prokaryotic RNA." Cell **80**(6): 829-32.
- Cohen, S. N. y K. J. McDowall (1997). "RNase E: still a wonderfully mysterious enzyme." Mol Microbiol **23**(6): 1099-106.
- Collier, D. N., P. W. Hager y P. V. Phibbs, Jr. (1996). "Catabolite repression control in the *Pseudomonads*." Res Microbiol **147**(6-7): 551-61.
- Collier, D. N., C. Spence, M. J. Cox y P. V. Phibbs (2001). "Isolation and phenotypic characterization of *Pseudomonas aeruginosa* pseudorevertants containing suppressors of the catabolite repression control-defective *crc-10* allele." FEMS Microbiol Lett **196**(2): 87-92.
- Condon, C. (2003). "RNA processing and degradation in *Bacillus subtilis*." Microbiol Mol Biol Rev **67**(2): 157-74, table of contents.
- Condon, C. (2007). "Maturation and degradation of RNA in bacteria." Curr Opin Microbiol **10**(3): 271-8.
- Cowles, C. E., N. N. Nichols y C. S. Harwood (2000). "BenR, a XylS homologue, regulates three different pathways of aromatic acid degradation in *Pseudomonas putida*." J Bacteriol **182**(22): 6339-46.
- Crooks, G. E., G. Hon, J. M. Chandonia y S. E. Brenner (2004). "Weblogo: A sequence logo generator." Genome Research **14**: 1188-1190
- Crooks, G. P. y S. D. Copley (1994). "Purification and characterization of 4-chlorobenzoyl CoA dehalogenase from *Arthrobacter* sp. strain 4-CB1." Biochemistry **33**(38): 11645-9.

- Chen, C. Y., J. T. Beatty, S. N. Cohen y J. G. Belasco (1988). "An intercistronic stem-loop structure functions as an mRNA decay terminator necessary but insufficient for puf mRNA stability." Cell **52**(4): 609-19.
- Chen, L. H., S. A. Emory, A. L. Bricker, P. Bouvet y J. G. Belasco (1991). "Structure and function of a bacterial mRNA stabilizer: analysis of the 5' untranslated region of ompA mRNA." J Bacteriol **173**(15): 4578-86.
- Choi, S., S. Ohta y E. Ohtsubo (2003). "A novel IS element, IS621, of the IS110/IS492 family transposes to a specific site in repetitive extragenic palindromic sequences in Escherichia coli." J Bacteriol **185**(16): 4891-900.
- Dagley, S. (1986). Biochemistry of aromatic hydrocarbon degradation in Pseudomonads. The Bacteria. J. Sokatch y L. N. Ornston. Orlando, Academic Press. **10**: 527-555.
- Davis, B. D. y E. S. Mingioli (1950). "Mutants of Escherichia coli requiring methionine or vitamin B12." J Bacteriol **60**(1): 17-28.
- De Bruyn, J., K. Soetaert, P. Buysens, I. Calonne, J. L. De Coene, X. Gallet, R. Brasseur, R. Wattiez, P. Falmagne, H. Montrozier, M. A. Laneelle y M. Daffe (2000). "Evidence for specific and non-covalent binding of lipids to natural and recombinant Mycobacterium bovis BCG hsp60 proteins, and to the Escherichia coli homologue GroEL." Microbiology **146** ( Pt 7): 1513-24.
- de Lorenzo, V. (2001). "Cleaning up behind us. The potential of genetically modified bacteria to break down toxic pollutants in the environment." EMBO Rep **2**(5): 357-9.
- de Lorenzo, V., L. Eltis, B. Kessler y K. N. Timmis (1993). "Analysis of Pseudomonas gene products using lacIq/P<sub>trp</sub>-lac plasmids and transposons that confer conditional phenotypes." Gene **123**(1): 17-24.
- de Lorenzo, V., M. Herrero, M. Metzke y K. N. Timmis (1991). "An upstream XylR- and IHF-induced nucleoprotein complex regulates the sigma 54-dependent Pu promoter of TOL plasmid." Embo J **10**(5): 1159-67.
- 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.
- Dejonghe, W., N. Boon, D. Seghers, E. M. Top y W. Verstraete (2001). "Bioaugmentation of soils by increasing microbial richness: missing links." Environ Microbiol **3**(10): 649-57.
- del Castillo Santaella, T. (2008). Análisis genómico, transcripcional y de flujo del metabolismo de la glucosa en *Pseudomonas putida* KT2440. Facultad de Ciencias. Granada, Universidad de Granada.
- del Castillo, T. y J. L. Ramos (2007). "Simultaneous catabolite repression between glucose and toluene metabolism in *Pseudomonas putida* is channeled through different signaling pathways." J Bacteriol **189**(18): 6602-10.
- del Peso-Santos, M. T. (2004). Estudio de la ruta catabólica del 2-feniletanol de *Pseudomonas* sp. Y2. Madrid, Universidad Complutense de Madrid.
- del Peso-Santos, M. T. (2008). Estudio de la regulación de la expresión de los genes catabólicos del estireno en *Pseudomonas* sp. Y2. Madrid, Universidad Complutense de Madrid.

- del Peso-Santos, M. T., D. Bartolomé-Martín, C. Fernández, S. Alonso, J. L. García, E. Díaz, V. Shingler y J. Perera (2006). "Coregulation by phenylacetyl-coenzyme A-responsive PaaX integrates control of the upper and lower pathways for the catabolism of styrene by *Pseudomonas* sp. strain Y2." J Bacteriol **188**(13): 4812-4821.
- del Peso-Santos, T., V. Shingler y J. Perera (2008). "The styrene-responsive StyS/StyR regulation system controls expression of an auxiliary phenylacetyl-coenzyme A ligase: implications for rapid metabolic coupling of the styrene upper- and lower-degradative pathways." Mol Microbiol: pendiente de publicación.
- Denef, V. J., J. Park, T. V. Tsoi, J. M. Rouillard, H. Zhang, J. A. Wibbenmeyer, W. Verstraete, E. Gulari, S. A. Hashsham y J. M. Tiedje (2004). "Biphenyl and benzoate metabolism in a genomic context: outlining genome-wide metabolic networks in *Burkholderia xenovorans* LB400." Appl Environ Microbiol **70**(8): 4961-70.
- Denef, V. J., M. A. Patrauchan, C. Florizone, J. Park, T. V. Tsoi, W. Verstraete, J. M. Tiedje y L. D. Eltis (2005). "Growth substrate- and phase-specific expression of biphenyl, benzoate, and C1 metabolic pathways in *Burkholderia xenovorans* LB400." J Bacteriol **187**(23): 7996-8005.
- Desmond, C., G. F. Fitzgerald, C. Stanton y R. P. Ross (2004). "Improved stress tolerance of GroESL-overproducing *Lactococcus lactis* and probiotic *Lactobacillus paracasei* NFBC 338." Appl Environ Microbiol **70**(10): 5929-36.
- Deuerling, E., H. Patzelt, S. Vorderwulbecke, T. Rauch, G. Kramer, E. Schaffitzel, A. Mogk, A. Schulze-Specking, H. Langen y B. Bukau (2003). "Trigger Factor and DnaK possess overlapping substrate pools and binding specificities." Mol Microbiol **47**(5): 1317-28.
- Deutscher, M. P. (2006). "Degradation of RNA in bacteria: comparison of mRNA and stable RNA." Nucleic Acids Res **34**(2): 659-66.
- di Gennaro, P., S. Ferrara, I. Ronco, E. Galli, G. Sello, M. Papacchini y G. Bestetti (2007). "Styrene lower catabolic pathway in *Pseudomonas fluorescens* ST: identification and characterization of genes for phenylacetic acid degradation." Arch Microbiol **188**(2): 117-25.
- Díaz, E. (2004). "Bacterial degradation of aromatic pollutants: a paradigm of metabolic versatility." Int Microbiol **7**(3): 173-80.
- Díaz, E., A. Ferrández, M. A. Prieto y J. L. García (2001). "Biodegradation of aromatic compounds by *Escherichia coli*." Microbiol Mol Biol Rev **65**(4): 523-69, table of contents.
- Díaz, E. y M. A. Prieto (2000). "Bacterial promoters triggering biodegradation of aromatic pollutants." Curr Opin Biotechnol **11**(5): 467-75.
- Dicker, I. B. y S. Seetharam (1992). "What is known about the structure and function of the *Escherichia coli* protein FirA?" Mol Microbiol **6**(7): 817-23.
- Dominguez-Cuevas, P., J. E. Gonzalez-Pastor, S. Marques, J. L. Ramos y V. de Lorenzo (2006). "Transcriptional tradeoff between metabolic and stress-response programs in *Pseudomonas putida* KT2440 cells exposed to toluene." J Biol Chem **281**(17): 11981-91.
- Domínguez-Cuevas, P., J. E. González-Pastor, S. Marqués, J. L. Ramos y V. de Lorenzo (2006). "Transcriptional tradeoff between metabolic and stress-response programs in *Pseudomonas putida* KT2440 cells exposed to toluene." J Biol Chem **281**(17): 11981-91.

- Dower, W. J., J. F. Miller y C. W. Ragsdale (1988). "High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation." *Nucleic Acids Res* **16**(13): 6127-45.
- Downie, J. A. (1989). "The *nodL* gene from *Rhizobium leguminosarum* is homologous to the acetyl transferases encoded by *lacA* and *cysE*." *Mol Microbiol* **3**(11): 1649-51.
- Drider, D., J. M. Santos, N. Garcia-Quintans, C. M. Arraiano y P. Lopez (1999). "The role of *Escherichia coli* RNase E and RNase III in the processing of the *citQRP* operon mRNA from *Lactococcus lactis* biovar *diacetylactis*." *J Mol Microbiol Biotechnol* **1**(2): 337-46.
- Dua, M., A. Singh, N. Sethunathan y A. K. Johri (2002). "Biotechnology and bioremediation: successes and limitations." *Appl Microbiol Biotechnol* **59**(2-3): 143-152.
- Dunaway-Mariano, D. y P. C. Babbitt (1994). "On the origins and functions of the enzymes of the 4-chlorobenzoate to 4-hydroxybenzoate converting pathway." *Biodegradation* **5**(3-4): 259-76.
- Dunn, J. J. y F. W. Studier (1973). "T7 early RNAs and *Escherichia coli* ribosomal RNAs are cut from large precursor RNAs in vivo by ribonuclease 3." *Proc Natl Acad Sci U S A* **70**(12): 3296-3300.
- Eddy, C. K., K. F. Keshav, H. An, E. A. Utt, J. P. Mejia y L. O. Ingram (1991). "Segmental message stabilization as a mechanism for differential expression from the *Zymomonas mobilis* gap operon." *J Bacteriol* **173**(1): 245-54.
- Ehretsmann, C. P., A. J. Carpousis y H. M. Krisch (1992). "Specificity of *Escherichia coli* endoribonuclease RNase E: in vivo and in vitro analysis of mutants in a bacteriophage T4 mRNA processing site." *Genes Dev* **6**(1): 149-59.
- Eichler, K., F. Bourgis, A. Buchet, H. P. Kleber y M. A. Mandrand-Berthelot (1994). "Molecular characterization of the *cai* operon necessary for carnitine metabolism in *Escherichia coli*." *Mol Microbiol* **13**(5): 775-86.
- Elder, D. J. y D. J. Kelly (1994). "The bacterial degradation of benzoic acid and benzenoid compounds under anaerobic conditions: unifying trends and new perspectives." *FEMS Microbiol Rev* **13**(4): 441-68.
- Ellis, R. J. (2005). "Chaperomics: in vivo GroEL function defined." *Curr Biol* **15**(17): R661-3.
- Engelhorn, M., F. Boccard, C. Murtin, P. Prentki y J. Geiselmann (1995). "In vivo interaction of the *Escherichia coli* integration host factor with its specific binding sites." *Nucleic Acids Res* **23**(15): 2959-65.
- Engler-Blum, G., M. Meier, J. Frank y G. A. Muller (1993). "Reduction of background problems in nonradioactive northern and Southern blot analyses enables higher sensitivity than <sup>32</sup>P-based hybridizations." *Anal Biochem* **210**(2): 235-44.
- Erb, T. J., W. Ismail y G. Fuchs (2008). "Phenylacetate metabolism in thermophiles: characterization of phenylacetate-CoA ligase, the initial enzyme of the hybrid pathway in *Thermus thermophilus*." *Curr Microbiol* **57**(1): 27-32.
- Espeli, O. y F. Boccard (1997). "In vivo cleavage of *Escherichia coli* BIME-2 repeats by DNA gyrase: genetic characterization of the target and identification of the cut site." *Mol Microbiol* **26**(4): 767-77.

- Espeli, O., L. Moulin y F. Bocard (2001). "Transcription attenuation associated with bacterial repetitive extragenic BIME elements." J Mol Biol **314**(3): 375-86.
- Esteve-Núñez, A. (2000). Metabolismo anaerobio del explosivo (TNT) por bacterias del género Pseudomonas. Granada, Universidad de Granada.
- Faubladier, M., K. Cam y J. P. Bouche (1990). "Escherichia coli cell division inhibitor DicF-RNA of the dicB operon. Evidence for its generation in vivo by transcription termination and by RNase III and RNase E-dependent processing." J Mol Biol **212**(3): 461-71.
- Fayet, O., T. Ziegelhoffer y C. Georgopoulos (1989). "The groES and groEL heat shock gene products of Escherichia coli are essential for bacterial growth at all temperatures." J Bacteriol **171**(3): 1379-85.
- Feil, H., W. S. Feil, P. Chain, F. Larimer, G. DiBartolo, A. Copeland, A. Lykidis, S. Trong, M. Nolan, E. Goltsman, J. Thiel, S. Malfatti, J. E. Loper, A. Lapidus, J. C. Detter, M. Land, P. M. Richardson, N. C. Kyrpides, N. Ivanova y S. E. Lindow (2005). "Comparison of the complete genome sequences of Pseudomonas syringae pv. syringae B728a and pv. tomato DC3000." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(31): 11064-9.
- Fernández, C. (2005). Avances en la caracterización del catabolismo del ácido fenilacético en *Escherichia coli*. Madrid, Universidad Complutense de Madrid.
- Ferrández, A. (1998). Catabolismo de los ácidos fenilacético, fenilpropiónico y derivados en *Escherichia coli*. Madrid, Universidad Complutense de Madrid: 177.
- Ferrández, A., J. L. García y E. Díaz (2000). "Transcriptional regulation of the divergent paa catabolic operons for phenylacetic acid degradation in Escherichia coli." J Biol Chem **275**(16): 12214-22.
- Ferrández, A., B. Miñambres, B. García, E. R. Olivera, J. M. Luengo, J. L. García y E. Díaz (1998). "Catabolism of phenylacetic acid in Escherichia coli. Characterization of a new aerobic hybrid pathway." J Biol Chem **273**(40): 25974-86.
- Ferrández, A., M. A. Prieto, J. L. García y E. Díaz (1997). "Molecular characterization of PadA, a phenylacetaldehyde dehydrogenase from Escherichia coli." FEBS Lett **406**(1-2): 23-7.
- Fuchs, G. (2008). "Anaerobic metabolism of aromatic compounds." Ann N Y Acad Sci **1125**: 82-99.
- Galán, B., E. Díaz, M. A. Prieto y J. L. García (2000). "Functional analysis of the small component of the 4-hydroxyphenylacetate 3-monooxygenase of Escherichia coli W: a prototype of a new Flavin:NAD(P)H reductase subfamily." J Bacteriol **182**(3): 627-36.
- Galán, B., J. L. García y M. A. Prieto (2004). "The PaaX repressor, a link between penicillin G acylase and the phenylacetyl-coenzyme A catabolon of Escherichia coli W." J Bacteriol **186**(7): 2215-20.
- Gamper, M., B. Ganter, M. R. Polito y D. Haas (1992). "RNA processing modulates the expression of the arcDABC operon in Pseudomonas aeruginosa." J Mol Biol **226**(4): 943-57.
- Gamper, M. y D. Haas (1993). "Processing of the Pseudomonas arcDABC mRNA requires functional RNase E in Escherichia coli." Gene **129**(1): 119-22.

- García-Gonzalez, V., F. Govantes, O. Porrua y E. Santero (2005). "Regulation of the *Pseudomonas* sp. strain ADP cyanuric acid degradation operon." *J Bacteriol* **187**(1): 155-67.
- García, B., E. R. Olivera, B. Miñambres, D. Carnicero, C. Muniz, G. Naharro y J. M. Luengo (2000). "Phenylacetyl-coenzyme A is the true inducer of the phenylacetic acid catabolism pathway in *Pseudomonas putida* U." *Appl Environ Microbiol* **66**(10): 4575-8.
- García, B., E. R. Olivera, B. Miñambres, M. Fernández-Valverde, L. M. Canedo, M. A. Prieto, J. L. García, M. Martínez y J. M. Luengo (1999). "Novel biodegradable aromatic plastics from a bacterial source. Genetic and biochemical studies on a route of the phenylacetyl-coa catabolon." *J Biol Chem* **274**(41): 29228-41.
- García, J. L., E. Díaz, J. M. Luengo, B. García y E. R. Olivera (2001). Un procedimiento para la biotransformación del ácido fenilacético en ácido 2-hidroxifenilacético. *Patente española*. **2148084**.
- Gasson, M. J., Y. Kitamura, W. R. McLauchlan, A. Narbad, A. J. Parr, E. L. Parsons, J. Payne, M. J. Rhodes y N. J. Walton (1998). "Metabolism of ferulic acid to vanillin. A bacterial gene of the enoyl-SCoA hydratase/isomerase superfamily encodes an enzyme for the hydration and cleavage of a hydroxycinnamic acid SCoA thioester." *J Biol Chem* **273**(7): 4163-70.
- Gattiker, A., W. V. Bienvenut, A. Bairoch y E. Gasteiger (2002a). "FindPept, a tool to identify unmatched masses in peptide mass fingerprinting protein identification." *Proteomics* **2**(10): 1435-44.
- Gattiker, A., E. Gasteiger y A. Bairoch (2002b). "ScanProsite: a reference implementation of a PROSITE scanning tool." *Appl Bioinformatics* **1**(2): 107-8.
- Gay, P., D. Le Coq, M. Steinmetz, T. Berkelman y C. I. Kado (1985). "Positive selection procedure for entrapment of insertion sequence elements in gram-negative bacteria." *J Bacteriol* **164**(2): 918-21.
- Georgellis, D., B. Sohlberg, F. U. Hartl y A. von Gabain (1995). "Identification of GroEL as a constituent of an mRNA-protection complex in *Escherichia coli*." *Mol Microbiol* **16**(6): 1259-68.
- Gibson, J. y C. S. Harwood (2002). "Metabolic diversity in aromatic compound utilization by anaerobic microbes." *Annu Rev Microbiol* **56**: 345-69.
- Gilson, E., D. Perrin y M. Hofnung (1990). "DNA polymerase I and a protein complex bind specifically to *E. coli* palindromic unit highly repetitive DNA: implications for bacterial chromosome organization." *Nucleic Acids Res* **18**(13): 3941-52.
- Gülensoy, N. y P. J. Álvarez (1999). "Diversity and correlation of specific aromatic hydrocarbon biodegradation capabilities." *Biodegradation* **10**(5): 331-40.
- Haddock, J. D. y J. G. Ferry (1989). "Purification and properties of phloroglucinol reductase from *Eubacterium oxidoreducens* G-41." *J Biol Chem* **264**(8): 4423-7.
- Hajnsdorf, E., O. Steier, L. Coscoy, L. Teyssset y P. Regnier (1994). "Roles of RNase E, RNase II and PNPase in the degradation of the rpsO transcripts of *Escherichia coli*: stabilizing function of RNase II and evidence for efficient degradation in an *ams pnp rnb* mutant." *EMBO J* **13**(14): 3368-77.

- Hallsworth, J. E., S. Heim y K. N. Timmis (2003). "Chaotropic solutes cause water stress in *Pseudomonas putida*." Environ Microbiol **5**(12): 1270-80.
- Hanahan, D. (1983). "Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids." J Mol Biol **166**(4): 557-80.
- Harayama, S., M. Kok y E. L. Neidle (1992). "Functional and evolutionary relationships among diverse oxygenases." Annu Rev Microbiol **46**: 565-601.
- Harayama, S. y M. Rekik (1989). "Bacterial aromatic ring-cleavage enzymes are classified into two different gene families." J Biol Chem **264**(26): 15328-33.
- Harayama, S. y K. N. Timmis (1989). Catabolism of aromatic hydrocarbons by *Pseudomonas*. Genetics of bacterial diversity. D. A. Hopwood y K. F. Chater. N.Y., Academic Press, Inc: 151-174.
- Harayama, S. y K. N. Timmis (1992). Aerobic biodegradation of aromatic hydrocarbons by bacteria. Metal ions in biological systems. H. S. A. Sigel. New York: 99-156.
- Harwood, C. S., H. Burchhardt, H. Herrmann y G. Fuchs (1998). "Anaerobic metabolism of aromatic compounds via the benzoyl-CoA pathway." FEMS Microbiol. Rev. **22**(5): 439-458.
- Harwood, C. S. y R. E. Parales (1996). "The beta-ketoadipate pathway and the biology of self-identity." Annu Rev Microbiol **50**: 553-90.
- Haywood, G. W., A. J. Anderson, D. F. Ewing y E. A. Dawes (1990). "Accumulation of a Polyhydroxyalkanoate Containing Primarily 3-Hydroxydecanoate from Simple Carbohydrate Substrates by *Pseudomonas* sp. Strain NCIMB 40135." Appl Environ Microbiol **56**(11): 3354-3359.
- Heider, J., M. Boll, K. Breese, S. Breinig, C. Ebenau-Jehle, U. Feil, N. Gad'on, D. Laempe, B. Leuthner, M. E. Mohamed, S. Schneider, G. Burchhardt y G. Fuchs (1998). "Differential induction of enzymes involved in anaerobic metabolism of aromatic compounds in the denitrifying bacterium *Thauera aromatica*." Arch Microbiol **170**(2): 120-31.
- Heider, J. y G. Fuchs (1997). "Anaerobic metabolism of aromatic compounds." Eur J Biochem **243**(3): 577-96.
- Heim, S., M. Ferrer, H. Heuer, D. Regenhardt, M. Nimtz y K. N. Timmis (2003). "Proteome reference map of *Pseudomonas putida* strain KT2440 for genome expression profiling: distinct responses of KT2440 and *Pseudomonas aeruginosa* strain PAO1 to iron deprivation and a new form of superoxide dismutase." Environ Microbiol **5**(12): 1257-69.
- 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**(11): 6557-67.
- Hester, K. L., J. Lehman, F. Najar, L. Song, B. A. Roe, C. H. MacGregor, P. W. Hager, P. V. Phibbs, Jr. y J. R. Sokatch (2000a). "Crc is involved in catabolite repression control of the bkd operons of *Pseudomonas putida* and *Pseudomonas aeruginosa*." J Bacteriol **182**(4): 1144-9.
- Hester, K. L., K. T. Madhusudhan y J. R. Sokatch (2000b). "Catabolite repression control by crc in 2xYT medium is mediated by posttranscriptional regulation of bkdR expression in *Pseudomonas putida*." J Bacteriol **182**(4): 1150-3.

- Higgins, C. F., G. F. Ames, W. M. Barnes, J. M. Clement y M. Hofnung (1982). "A novel intercistronic regulatory element of prokaryotic operons." *Nature* **298**(5876): 760-2.
- Higgins, C. F., H. C. Causton, G. S. C. Dance y E. A. Mudd (1993). The role of the 3' end in mRNA stability and decay. *Control of messenger RNA stability*. J. B. a. G. Brawerman. San Diego, California, Academic Press: 13-30.
- Higgins, C. F., S. W. Peltz y A. Jacobson (1992). "Turnover of mRNA in prokaryotes and lower eukaryotes." *Curr Opin Genet Dev* **2**(5): 739-47.
- Homuth, G., S. Masuda, A. Mogk, Y. Kobayashi y W. Schumann (1997). "The dnaK operon of *Bacillus subtilis* is heptacistronic." *J Bacteriol* **179**(4): 1153-64.
- Hoopes, B. C. y W. R. McClure (1987). *Strategies in regulation of transcription initiation. In Escherichia coli and Salmonella typhimurium: Cellular and Molecular Biology*. Washington, DC, American Society for Microbiology.
- Hoshino, T. y K. Kose (1990). "Cloning, nucleotide sequences, and identification of products of the *Pseudomonas aeruginosa* PAO bra genes, which encode the high-affinity branched-chain amino acid transport system." *J Bacteriol* **172**(10): 5531-9.
- Huang, G. C., Z. Y. Li, J. M. Zhou y G. Fischer (2000). "Assisted folding of D-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase by trigger factor." *Protein Sci* **9**(6): 1254-61.
- Hwang, B. K., S. W. Lim, B. S. Kim, J. Y. Lee y S. S. Moon (2001). "Isolation and in vivo and in vitro antifungal activity of phenylacetic acid and sodium phenylacetate from *Streptomyces humidus*." *Appl Environ Microbiol* **67**(8): 3739-45.
- Inada, T., K. Kimata y H. Aiba (1996). "Mechanism responsible for glucose-lactose diauxie in *Escherichia coli*: challenge to the cAMP model." *Genes Cells* **1**(3): 293-301.
- Inoue, H., H. Nojima y H. Okayama (1990). "High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids." *Gene* **96**(1): 23-8.
- Ismail, W., M. El-Said Mohamed, B. L. Wanner, K. A. Datsenko, W. Eisenreich, F. Rohdich, A. Bacher y G. Fuchs (2003). "Functional genomics by NMR spectroscopy. Phenylacetate catabolism in *Escherichia coli*." *Eur J Biochem* **270**(14): 3047-54.
- Iwabuchi, T. y S. Harayama (1998). "Biochemical and molecular characterization of 1-hydroxy-2-naphthoate dioxygenase from *Nocardioides* sp. KP7." *J Biol Chem* **273**(14): 8332-6.
- Jiang, X. y J. G. Belasco (2004). "Catalytic activation of multimeric RNase E and RNase G by 5'-monophosphorylated RNA." *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(25): 9211-6.
- Jiménez, J. I., B. Miñambres, J. L. García y E. Díaz (2002). "Genomic analysis of the aromatic catabolic pathways from *Pseudomonas putida* KT2440." *Environ Microbiol* **4**(12): 824-41.
- Joardar, V., M. Lindeberg, R. W. Jackson, J. Selengut, R. Dodson, L. M. Brinkac, S. C. Daugherty, R. Deboy, A. S. Durkin, M. G. Giglio, R. Madupu, W. C. Nelson, M. J. Rosovitz, S. Sullivan, J. Crabtree, T. Creasy, T. Davidsen, D. H. Haft, N. Zafar, L. Zhou, R. Halpin, T. Holley, H. Khouri, T. Feldblyum, O. White, C. M. Fraser, A. K. Chatterjee, S. Cartinhour, D. J. Schneider, J. Mansfield, A. Collmer y C. R. Buell (2005). "Whole-genome sequence analysis

- of *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* 1448A reveals divergence among pathovars in genes involved in virulence and transposition." J Bacteriol **187**(18): 6488-98.
- 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**(1): 137-41.
- Kayser, K. J., B. A. Bielaga-Jones, K. Jackowski, O. Odusan y J. J. Kilbane (1993). "Utilization of organosulphur compounds by axenic and mixed cultures of *Rhodococcus rhodochrous* IGTS8." J. Gen. Microbiol. **139**(12): 3123-3129.
- Kelly, T. M., S. A. Stachula, C. R. Raetz y M. S. Anderson (1993). "The *firA* gene of *Escherichia coli* encodes UDP-3-O-(R-3-hydroxymyristoyl)-glucosamine N-acyltransferase. The third step of endotoxin biosynthesis." J Biol Chem **268**(26): 19866-74.
- Kessler, B., V. de Lorenzo y K. N. Timmis (1992). "A general system to integrate *lacZ* fusions into the chromosomes of gram-negative eubacteria: regulation of the P<sub>m</sub> promoter of the TOL plasmid studied with all controlling elements in monocopy." Mol Gen Genet **233**(1-2): 293-301.
- Khemici, V. y A. J. Carpousis (2004). "The RNA degradosome and poly(A) polymerase of *Escherichia coli* are required in vivo for the degradation of small mRNA decay intermediates containing REP-stabilizers." Mol Microbiol **51**(3): 777-90.
- Kim, E. A., J. Y. Kim, S. J. Kim, K. R. Park, H. J. Chung, S. H. Leem y S. I. Kim (2004a). "Proteomic analysis of *Acinetobacter lwoffii* K24 by 2-D gel electrophoresis and electrospray ionization quadrupole-time of flight mass spectrometry." J Microbiol Methods **57**(3): 337-49.
- Kim, H. S., T. S. Kang, J. S. Hyun y H. S. Kang (2004b). "Regulation of penicillin G acylase gene expression in *Escherichia coli* by repressor PaaX and the cAMP-cAMP receptor protein complex." J Biol Chem **279**(32): 33253-62.
- Kim, Y., J. Y. Cho, J. H. Kuk, J. H. Moon, J. I. Cho, Y. C. Kim y K. H. Park (2004c). "Identification and antimicrobial activity of phenylacetic acid produced by *Bacillus licheniformis* isolated from fermented soybean, Chungkook-Jang." Curr Microbiol **48**(4): 312-7.
- Kim, Y. H., K. Cho, S. H. Yun, J. Y. Kim, K. H. Kwon, J. S. Yoo y S. I. Kim (2006). "Analysis of aromatic catabolic pathways in *Pseudomonas putida* KT 2440 using a combined proteomic approach: 2-DE/MS and cleavable isotope-coded affinity tag analysis." Proteomics **6**(4): 1301-18.
- Kisker, C., W. Hinrichs, K. Tovar, W. Hillen y W. Saenger (1995). "The complex formed between Tet repressor and tetracycline-Mg<sup>2+</sup> reveals mechanism of antibiotic resistance." J Mol Biol **247**(2): 260-80.
- Kiss, E., T. Huguet, V. Poinot y J. Batut (2004). "The *typA* gene is required for stress adaptation as well as for symbiosis of *Sinorhizobium meliloti* 1021 with certain *Medicago truncatula* lines." Mol Plant Microbe Interact **17**(3): 235-44.
- Klein, E., J. B. Klein y V. Thongboonkerd (2004). "Two-dimensional gel electrophoresis: a fundamental tool for expression proteomics studies." Contrib Nephrol **141**: 25-39.
- Klug, G. y S. N. Cohen (1990). "Combined actions of multiple hairpin loop structures and sites of rate-limiting endonucleolytic cleavage determine differential degradation rates of individual segments within polycistronic *puf* operon mRNA." J Bacteriol **172**(9): 5140-6.

- Kluge, C., A. Tschsch y G. Fuchs (1990). "Anaerobic metabolism of resorcylic acids (*m*-dihydroxybenzoic acids) and resorcinol (1,3-benzenediol) in a fermenting and a denitrifying bacterium." Arch Microbiol **155**: 68-74.
- Koenig, K. y J. R. Andreesen (1990). "Xanthine dehydrogenase and 2-furoyl-coenzyme A dehydrogenase from *Pseudomonas putida* Fu1: two molybdenum-containing dehydrogenases of novel structural composition." J Bacteriol **172**(10): 5999-6009.
- Koetsier, M. J., P. A. Jekel, M. A. van den Berg, R. A. Bovenberg y D. B. Janssen (2009). "Characterization of a phenylacetate-CoA ligase from *Penicillium chrysogenum*." Biochem J **417**(2): 467-76.
- Kok, M., R. Oldenhuis, M. P. van der Linden, P. Raatjes, J. Kingma, P. H. van Lelyveld y B. Witholt (1989). "The *Pseudomonas oleovorans* alkane hydroxylase gene. Sequence and expression." J Biol Chem **264**(10): 5435-41.
- Kokoska, R. J. y D. A. Steege (1998). "Appropriate expression of filamentous phage f1 DNA replication genes II and X requires RNase E-dependent processing and separate mRNAs." J Bacteriol **180**(12): 3245-9.
- Kolter, R., M. Inuzuka y D. R. Helinski (1978). "Trans-complementation-dependent replication of a low molecular weight origin fragment from plasmid R6K." Cell **15**(4): 1199-208.
- Kramer, G., H. Patzelt, T. Rauch, T. A. Kurz, S. Vorderwulbecke, B. Bukau y E. Deuerling (2004). "Trigger factor peptidyl-prolyl cis/trans isomerase activity is not essential for the folding of cytosolic proteins in *Escherichia coli*." J Biol Chem **279**(14): 14165-70.
- Kudlicki, W., A. Coffman, G. Kramer y B. Hardesty (1997). "Renaturation of rhodanese by translational elongation factor (EF) Tu. Protein refolding by EF-Tu flexing." J Biol Chem **272**(51): 32206-10.
- Kumagai, M. y H. Ikeda (1991). "Molecular analysis of the recombination junctions of lambda bio transducing phages." Mol Gen Genet **230**(1-2): 60-4.
- Kurbatov, L., D. Albrecht, H. Herrmann y L. Petruschka (2006). "Analysis of the proteome of *Pseudomonas putida* KT2440 grown on different sources of carbon and energy." Environ Microbiol **8**(3): 466-78.
- Kushner, S. R. (2002). "mRNA decay in *Escherichia coli* comes of age." J Bacteriol **184**(17): 4658-65; discussion 4657.
- La Voie, E. J., S. Dolan, P. Little, C. X. Wang, S. Sugie y A. Rivenson (1988). "Carcinogenicity of quinolone, 4- and 8-methylquinoline and benzoquinolines in newborn mice and rats." Food. Chem. Toxicol. **26**: 625-629.
- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." Nature **227**(259): 680-5.
- Lamas-Maceiras, M., I. Vaca, E. Rodriguez, J. Casqueiro y J. F. Martin (2006). "Amplification and disruption of the phenylacetyl-CoA ligase gene of *Penicillium chrysogenum* encoding an aryl-capping enzyme that supplies phenylacetic acid to the isopenicillin N-acyltransferase." Biochem J **395**(1): 147-55.

- Laurie, A. D., L. M. Bernardo, C. C. Sze, E. Skarfstad, A. Szalewska-Palasz, T. Nystrom y V. Shingler (2003). "The role of the alarmone (p)ppGpp in sigma N competition for core RNA polymerase." J Biol Chem **278**(3): 1494-503.
- Law, R. J., J. N. Hamlin, A. Sivro, S. J. McCorrister, G. A. Cardama y S. T. Cardona (2008). "A functional phenylacetic acid catabolic pathway is required for full pathogenicity of *Burkholderia cenocepacia* in the *Caenorhabditis elegans* host model." J Bacteriol **190**(21): 7209-18.
- Lee, B. U., S. C. Park, Y. S. Cho y K. H. Oh (2008). "Exopolymer biosynthesis and proteomic changes of *Pseudomonas* sp. HK-6 under stress of TNT (2,4,6-trinitrotoluene)." Curr Microbiol **57**(5): 477-83.
- Lee, D. G., J. M. Urbach, G. Wu, N. T. Liberati, R. L. Feinbaum, S. Miyata, L. T. Diggins, J. He, M. Saucier, E. Deziel, L. Friedman, L. Li, G. Grills, K. Montgomery, R. Kucherlapati, L. G. Rahme y F. M. Ausubel (2006). "Genomic analysis reveals that *Pseudomonas aeruginosa* virulence is combinatorial." Genome Biol **7**(10): R90.
- Lee, S. E., J. S. Seo, Y. S. Keum, K. J. Lee y Q. X. Li (2007). "Fluoranthene metabolism and associated proteins in *Mycobacterium* sp. JS14." Proteomics **7**(12): 2059-69.
- Lin-Chao, S. y S. N. Cohen (1991). "The rate of processing and degradation of antisense RNAI regulates the replication of ColE1-type plasmids in vivo." Cell **65**(7): 1233-42.
- Lin-Chao, S., T. T. Wong, K. J. McDowall y S. N. Cohen (1994). "Effects of nucleotide sequence on the specificity of rne-dependent and RNase E-mediated cleavages of RNA I encoded by the pBR322 plasmid." J Biol Chem **269**(14): 10797-803.
- Liu, J., W. O. Barnell y T. Conway (1992). "The polycistronic mRNA of the *Zymomonas mobilis* glf-zwf-edd-glk operon is subject to complex transcript processing." J Bacteriol **174**(9): 2824-33.
- Lodato, P. B. y J. B. Kaper (2009). "Post-transcriptional processing of the LEE4 operon in enterohaemorrhagic *Escherichia coli*." Mol Microbiol **71**(2): 273-90.
- López-Barragán, M. J. (2005). Caracterización molecular de la ruta central de degradación anaeróbica de compuestos aromáticos de *Azoarcus* sp. CIB. Madrid, Universidad Complutense de Madrid.
- Ludwig, H., G. Homuth, M. Schmalisch, F. M. Dyka, M. Hecker y J. Stulke (2001). "Transcription of glycolytic genes and operons in *Bacillus subtilis*: evidence for the presence of multiple levels of control of the gapA operon." Mol Microbiol **41**(2): 409-22.
- Luengo, J. M., J. L. García y E. R. Olivera (2001). "The phenylacetyl-CoA catabolon: a complex catabolic unit with broad biotechnological applications." Mol Microbiol **39**(6): 1434-42.
- Lugtenberg, B. J. y L. C. Dekkers (1999). "What makes *Pseudomonas* bacteria rhizosphere competent?" Environ Microbiol **1**(1): 9-13.
- Lundberg, U., A. von Gabain y O. Melefors (1990). "Cleavages in the 5' region of the ompA and bla mRNA control stability: studies with an *E. coli* mutant altering mRNA stability and a novel endoribonuclease." EMBO J **9**(9): 2731-41.
- Lupski, J. R. y G. N. Godson (1984). "The rpsU-dnaG-rpoD macromolecular synthesis operon of *E. coli*." Cell **39**(2 Pt 1): 251-2.

- MacGregor, C. H., S. K. Arora, P. W. Hager, M. B. Dail y P. V. Phibbs, Jr. (1996). "The nucleotide sequence of the *Pseudomonas aeruginosa* pyrE-crc-rph region and the purification of the crc gene product." J Bacteriol **178**(19): 5627-35.
- MacGregor, C. H., J. A. Wolff, S. K. Arora y P. V. Phibbs, Jr. (1991). "Cloning of a catabolite repression control (crc) gene from *Pseudomonas aeruginosa*, expression of the gene in *Escherichia coli*, and identification of the gene product in *Pseudomonas aeruginosa*." J Bacteriol **173**(22): 7204-12.
- MacGregor, C. H., S. Wolff, S. K. Arora, P. B. Hylemon y P. V. Phibbs (1992). Catabolite repression control in *Pseudomonas aeruginosa*. Pseudomonas, molecular biology and biotechnology. E. Galli, S. Silver y B. Witholt. Washington, D.C., American Society for Microbiology: 198-206.
- Mackie, G. A. (1991). "Specific endonucleolytic cleavage of the mRNA for ribosomal protein S20 of *Escherichia coli* requires the product of the ams gene in vivo and in vitro." J Bacteriol **173**(8): 2488-97.
- Magasanik, B. (1970). Glucose effects: inducer exclusion and repression. The lactose operon. J. Beckwith. N. Y., Cold Spring Harbor: 189-220.
- Magasanik, B. y F. C. Neidhardt (1987). Regulation of carbon and nitrogen utilization. Escherichia coli and Salmonella typhimurium: cellular and molecular biology. F. C. Neidhardt, J. L. Ingraham, K. B. Low, B. Magasanik, M. Schaechter y H. E. Umbarger. Washington, D.C., American Society for Microbiology.
- Manzanera, M., I. Aranda-Olmedo, J. L. Ramos y S. Marques (2001). "Molecular characterization of *Pseudomonas putida* KT2440 rpoH gene regulation." Microbiology **147**(Pt 5): 1323-30.
- Mao, S., S.-J. Lee, H. Hwangbo, Y.-W. Kim, K.-H. Park, G.-Y. Cha, R.-D. Park y K.-Y. Kim (2005). "Isolate and characterization of antifungal substances from *Burkholderia* sp. culture broth." Curr. Microbiol. **53**: 358-364.
- Marqués, S., I. Aranda-Olmedo y J. L. Ramos (2006). "Controlling bacterial physiology for optimal expression of gene reporter constructs." Curr Opin Biotechnol **17**(1): 50-56.
- Marqués, S., M. Manzanera, M. M. González-Pérez, M. T. Gallegos y J. L. Ramos (1999). "The XylS-dependent Pm promoter is transcribed in vivo by RNA polymerase with sigma 32 or sigma 38 depending on the growth phase." Mol Microbiol **31**(4): 1105-13.
- Martínez-Blanco, H., A. Reglero, L. B. Rodríguez-Aparicio y J. M. Luengo (1990). "Purification and biochemical characterization of phenylacetyl-CoA ligase from *Pseudomonas putida*. A specific enzyme for the catabolism of phenylacetic acid." J Biol Chem **265**(12): 7084-90.
- Martinez-Perez, O., E. Moreno-Ruiz, B. Floriano y E. Santero (2004). "Regulation of tetralin biodegradation and identification of genes essential for expression of thn operons." J Bacteriol **186**(18): 6101-9.
- Mascaraque-Martín, V. (2009). Metabolismo del ácido fenilacético en *Pseudomonas* sp. Y2: avances en la caracterización genética y bioquímica de algunas etapas de la ruta. Madrid, Universidad Complutense de Madrid.
- Mattheakis, L. C. y M. Nomura (1988). "Feedback regulation of the spc operon in *Escherichia coli*: translational coupling and mRNA processing." J Bacteriol **170**(10): 4484-92.

- McCarthy, J. E., B. Schauder y P. Ziemke (1988). "Post-transcriptional control in Escherichia coli: translation and degradation of the atp operon mRNA." Gene **72**(1-2): 131-9.
- McCormick, J. R., J. M. Zengel y L. Lindahl (1991). "Intermediates in the degradation of mRNA from the lactose operon of Escherichia coli." Nucleic Acids Res **19**(10): 2767-76.
- McDowall, K. J., S. Lin-Chao y S. N. Cohen (1994). "A+U content rather than a particular nucleotide order determines the specificity of RNase E cleavage." J Biol Chem **269**(14): 10790-6.
- McLaren, R. S., S. F. Newbury, G. S. Dance, H. C. Causton y C. F. Higgins (1991). "mRNA degradation by processive 3'-5' exoribonucleases in vitro and the implications for prokaryotic mRNA decay in vivo." J Mol Biol **221**(1): 81-95.
- Meinzel, T. y C. Giglione (2008). "Tools for analyzing and predicting N-terminal protein modifications." Proteomics **8**(4): 626-49.
- Melefors, O. y A. von Gabain (1988). "Site-specific endonucleolytic cleavages and the regulation of stability of E. coli ompA mRNA." Cell **52**(6): 893-901.
- Miller, D. L. y H. Weissbach (1977). Factor involved in the transfer of aminoacyl-tRNA to ribosome. Molecular mechanisms of protein biosynthesis. H. S. Pestka y Weissbach. New York, Academic Press, Inc.: 323-373.
- Miller, J. H. (1972). Experiments in Molecular Genetics. New York, Cold Spring Harbor.
- Miñambres, B., H. Martínez-Blanco, E. R. Olivera, B. Garca, B. Díez, J. L. Barredo, M. A. Moreno, C. Schleissner, F. Salto y J. M. Luengo (1996). "Molecular cloning and expression in different microbes of the DNA encoding Pseudomonas putida U phenylacetyl-CoA ligase. Use of this gene to improve the rate of benzylpenicillin biosynthesis in Penicillium chrysogenum." J Biol Chem **271**(52): 33531-8.
- Mohamed, M. E. (2000). "Biochemical and molecular characterization of phenylacetate-coenzyme A ligase, an enzyme catalyzing the first step in aerobic metabolism of phenylacetic acid in Azoarcus evansii." J Bacteriol **182**(2): 286-94.
- Mohamed, M. E., W. Ismail, J. Heider y G. Fuchs (2002). "Aerobic metabolism of phenylacetic acids in Azoarcus evansii." Arch Microbiol **178**(3): 180-92.
- Mohamed, M. E., B. Seyfried, A. Tschech y G. Fuchs (1993). "Anaerobic oxidation of phenylacetate and 4-hydroxyphenylacetate to benzoyl-coenzyme A and CO<sub>2</sub> in denitrifying Pseudomonas sp. Evidence for an alpha-oxidation mechanism." Arch Microbiol **159**(6): 563-73.
- Morales, G., J. F. Linares, A. Beloso, J. P. Albar, J. L. Martinez y F. Rojo (2004). "The Pseudomonas putida Crc global regulator controls the expression of genes from several chromosomal catabolic pathways for aromatic compounds." J Bacteriol **186**(5): 1337-44.
- Moreno, R. y F. Rojo (2008). "The target for the Pseudomonas putida Crc global regulator in the benzoate degradation pathway is the BenR transcriptional regulator." J Bacteriol **190**(5): 1539-45.
- Moreno, R., A. Ruiz-Manzano, L. Yuste y F. Rojo (2007). "The Pseudomonas putida Crc global regulator is an RNA binding protein that inhibits translation of the AlkS transcriptional regulator." Mol Microbiol **64**(3): 665-75.

- Mudd, E. A., H. M. Krisch y C. F. Higgins (1990). "RNase E, an endoribonuclease, has a general role in the chemical decay of *Escherichia coli* mRNA: evidence that *rne* and *ams* are the same genetic locus." Mol Microbiol **4**(12): 2127-35.
- Münch, R., K. Hiller, A. Grote, M. Scheer, J. Klein, M. Schobert y D. Jahn (2005). "Virtual Footprint and PRODORIC: an integrative framework for regulon prediction in prokaryotes." Bioinformatics **21**(22): 4187-9.
- Mullis, K., F. Faloona, S. Scharf, R. Saiki, R. Horn y H. Erlich (1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology.
- Murakawa, G. J., C. Kwan, J. Yamashita y D. P. Nierlich (1991). "Transcription and decay of the *lac* messenger: role of an intergenic terminator." J Bacteriol **173**(1): 28-36.
- Murray, I. A. y W. V. Shaw (1997). "O-Acetyltransferases for chloramphenicol and other natural products." Antimicrob Agents Chemother **41**(1): 1-6.
- Navarro-Llorens, J. M., O. Drzyzga y J. Perera (2008). "Genetic analysis of phenylacetic acid catabolism in *Arthrobacter oxydans* CECT386." Arch Microbiol.
- Navarro-Llorens, J. M., M. A. Patrauchan, G. R. Stewart, J. E. Davies, L. D. Eltis y W. W. Mohn (2005). "Phenylacetate catabolism in *Rhodococcus* sp. strain RHA1: a central pathway for degradation of aromatic compounds." J Bacteriol **187**(13): 4497-504.
- Navarro, M. F. (2005). Análisis de los proteomas de micoplasmas: *Mycoplasma penetrans* y *Mycoplasma genitalium*. Instituto de Biotecnología y Biomedicina. Barcelona, Universidad Autónoma de Barcelona.
- Nelson, K. E., C. Weinel, I. T. Paulsen, R. J. Dodson, H. Hilbert, V. A. Martins dos Santos, D. E. Fouts, S. R. Gill, M. Pop, M. Holmes, L. Brinkac, M. Beanan, R. T. DeBoy, S. Daugherty, J. Kolonay, R. Madupu, W. Nelson, O. White, J. Peterson, H. Khouri, I. Hance, P. Chris Lee, E. Holtzapple, D. Scanlan, K. Tran, A. Moazzez, T. Utterback, M. Rizzo, K. Lee, D. Kosack, D. Moestl, H. Wedler, J. Lauber, D. Stjepandic, J. Hoheisel, M. Straetz, S. Heim, C. Kiewitz, J. Eisen, K. N. Timmis, A. Dusterhoft, B. Tummeler y C. M. Fraser (2002). "Complete genome sequence and comparative analysis of the metabolically versatile *Pseudomonas putida* KT2440." Environ Microbiol **4**(12): 799-808.
- Neuhoff, V., N. Arold, D. Taube y W. Ehrhardt (1988). "Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250." Electrophoresis **9**(6): 255-62.
- Newbury, S. F., N. H. Smith y C. F. Higgins (1987a). "Differential mRNA stability controls relative gene expression within a polycistronic operon." Cell **51**(6): 1131-43.
- Newbury, S. F., N. H. Smith, E. C. Robinson, I. D. Hiles y C. F. Higgins (1987b). "Stabilization of translationally active mRNA by prokaryotic REP sequences." Cell **48**(2): 297-310.
- Niemetz, R., U. Altenschmidt, S. Brucker y G. Fuchs (1995). "Benzoyl-coenzyme-A 3-monooxygenase, a flavin-dependent hydroxylase. Purification, some properties and its role in aerobic benzoate oxidation via gentisate in a denitrifying bacterium." Eur J Biochem **227**(1-2): 161-8.

- Nilsson, G., J. G. Belasco, S. N. Cohen y A. von Gabain (1984). "Growth-rate dependent regulation of mRNA stability in *Escherichia coli*." Nature **312**(5989): 75-7.
- Nilsson, P., S. Naureckiene y B. E. Uhlin (1996). "Mutations affecting mRNA processing and fimbrial biogenesis in the *Escherichia coli* pap operon." J Bacteriol **178**(3): 683-90.
- Nilsson, P. y B. E. Uhlin (1991). "Differential decay of a polycistronic *Escherichia coli* transcript is initiated by RNaseE-dependent endonucleolytic processing." Mol Microbiol **5**(7): 1791-9.
- Nogales, J., A. Canales, J. Jimenez-Barbero, J. L. Garcia y E. Diaz (2005). "Molecular characterization of the gallate dioxygenase from *Pseudomonas putida* KT2440. The prototype of a new subgroup of extradiol dioxygenases." J Biol Chem **280**(42): 35382-90.
- Nogales, J., R. Macchi, F. Franchi, D. Barzaghi, C. Fernández, G. J.L., G. Bertoni y E. Díaz (2007). "Characterization of the last step of the aerobic phenylacetic acid degradation pathway." Microbiology **153**(2): 357-65.
- O'Farrell, P. H. (1975). "High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins." J Biol Chem **250**(10): 4007-21.
- O'Leary, N. D., K. E. O'Connor, W. Duetz y A. D. Dobson (2001). "Transcriptional regulation of styrene degradation in *Pseudomonas putida* CA-3." Microbiology **147**(Pt 4): 973-9.
- O'Leary, N. D., K. E. O'Connor, P. Ward, M. Goff y A. D. Dobson (2005). "Genetic characterization of accumulation of polyhydroxyalkanoate from styrene in *Pseudomonas putida* CA-3." Appl Environ Microbiol **71**(8): 4380-7.
- O'Toole, G. A., K. A. Gibbs, P. W. Hager, P. V. Phibbs, Jr. y R. Kolter (2000). "The global carbon metabolism regulator Crc is a component of a signal transduction pathway required for biofilm development by *Pseudomonas aeruginosa*." J Bacteriol **182**(2): 425-31.
- OCDE (1994). Biotechnology for a clean environments: prevention, detection and remediation. París, OCDE Press.
- Olivera, E. R., D. Carnicero, B. García, B. Miñambres, M. A. Moreno, L. Canedo, C. C. Dirusso, G. Naharro y J. M. Luengo (2001). "Two different pathways are involved in the beta-oxidation of n-alkanoic and n-phenylalkanoic acids in *Pseudomonas putida* U: genetic studies and biotechnological applications." Mol Microbiol **39**(4): 863-74.
- Olivera, E. R., B. Miñambres, B. García, C. Muniz, M. A. Moreno, A. Ferrández, E. Díaz, J. L. García y J. M. Luengo (1998). "Molecular characterization of the phenylacetic acid catabolic pathway in *Pseudomonas putida* U: the phenylacetyl-CoA catabolon." Proc Natl Acad Sci USA **95**(11): 6419-24.
- Olivera, E. R., A. Reglero, H. Martinez-Blanco, A. Fernandez-Medarde, M. A. Moreno y J. M. Luengo (1994). "Catabolism of aromatics in *Pseudomonas putida* U. Formal evidence that phenylacetic acid and 4-hydroxyphenylacetic acid are catabolized by two unrelated pathways." Eur J Biochem **221**(1): 375-81.
- Olsen, L. R., B. Huang, M. W. Vetting y S. L. Roderick (2004). "Structure of serine acetyltransferase in complexes with CoA and its cysteine feedback inhibitor." Biochemistry **43**(20): 6013-9.

- Oppenheim, A. B., K. E. Rudd, I. Mendelson y D. Teff (1993). "Integration host factor binds to a unique class of complex repetitive extragenic DNA sequences in *Escherichia coli*." Mol Microbiol **10**(1): 113-22.
- Palleroni, N. J. (1993). "Pseudomonas classification. A new case history in the taxonomy of gram-negative bacteria." Antonie Van Leeuwenhoek **64**(3-4): 231-51.
- Pappin, D. J., P. Hojrup y A. J. Bleasby (1993). "Rapid identification of proteins by peptide-mass fingerprinting." Curr Biol **3**(6): 327-32.
- Parent, R. y P. H. Roy (1992). "The chloramphenicol acetyltransferase gene of Tn2424: a new breed of cat." J Bacteriol **174**(9): 2891-7.
- Parisi, G., M. Fornasari y J. Echave (2000). "Evolutionary analysis of gamma-carbonic anhydrase and structurally related proteins." Mol Phylogenet Evol **14**(3): 323-34.
- Park, S. J. y S. Y. Lee (2003). "Identification and characterization of a new enoyl coenzyme A hydratase involved in biosynthesis of medium-chain-length polyhydroxyalkanoates in recombinant *Escherichia coli*." J Bacteriol **185**(18): 5391-7.
- Pastan, I. y S. Adhya (1976). "Cyclic adenosine 5'-monophosphate in *Escherichia coli*." Bacteriol Rev **40**(3): 527-51.
- Patel, A. M. y S. D. Dunn (1995). "Degradation of *Escherichia coli* uncB mRNA by multiple endonucleolytic cleavages." J Bacteriol **177**(14): 3917-22.
- Paulsen, I. T., C. M. Press, J. Ravel, D. Y. Kobayashi, G. S. Myers, D. V. Mavrodi, R. T. DeBoy, R. Seshadri, Q. Ren, R. Madupu, R. J. Dodson, A. S. Durkin, L. M. Brinkac, S. C. Daugherty, S. A. Sullivan, M. J. Rosovitz, M. L. Gwinn, L. Zhou, D. J. Schneider, S. W. Cartinhour, W. C. Nelson, J. Weidman, K. Watkins, K. Tran, H. Khouri, E. A. Pierson, L. S. Pierson, 3rd, L. S. Thomashow y J. E. Loper (2005). "Complete genome sequence of the plant commensal *Pseudomonas fluorescens* Pf-5." Nat Biotechnol **23**(7): 873-8.
- Petersen, C. (1992). "Control of functional mRNA stability in bacteria: multiple mechanisms of nucleolytic and non-nucleolytic inactivation." Mol Microbiol **6**(3): 277-82.
- Petruschka, L., G. Burchhardt, C. Muller, C. Weihe y H. Herrmann (2001). "The cyo operon of *Pseudomonas putida* is involved in carbon catabolite repression of phenol degradation." Mol Genet Genomics **266**(2): 199-206.
- Phillips, A. T. y L. M. Mulfinger (1981). "Cyclic adenosine 3',5'-monophosphate levels in *Pseudomonas putida* and *Pseudomonas aeruginosa* during induction and carbon catabolite repression of histidase synthesis." J Bacteriol **145**(3): 1286-92.
- Pieper, D. H. y W. Reineke (2000). "Engineering bacteria for bioremediation." Curr Opin Biotechnol **11**(3): 262-70.
- Portier, C., L. Dondon, M. Grunberg-Manago y P. Regnier (1987). "The first step in the functional inactivation of the *Escherichia coli* polynucleotide phosphorylase messenger is a ribonuclease III processing at the 5' end." EMBO J **6**(7): 2165-70.
- Postma, P. W., J. W. Lengeler y G. R. Jacobson (1993). "Phosphoenolpyruvate:carbohydrate phosphotransferase systems of bacteria." Microbiol Rev **57**(3): 543-94.

- Prieto, M. A., B. Galán, B. Torres, A. Ferrández, C. Fernández, B. Miñambres, J. L. García y E. Díaz (2004). "Aromatic metabolism versus carbon availability: the regulatory network that controls catabolism of less-preferred carbon sources in *Escherichia coli*." FEMS Microbiol Rev **28**(4): 503-18.
- Py, B., H. Causton, E. A. Mudd y C. F. Higgins (1994). "A protein complex mediating mRNA degradation in *Escherichia coli*." Mol Microbiol **14**(4): 717-29.
- Qi, S. W., M. T. Chaudhry, Y. Zhang, B. Meng, Y. Huang, K. X. Zhao, A. Poetsch, C. Y. Jiang, S. Liu y S. J. Liu (2007). "Comparative proteomes of *Corynebacterium glutamicum* grown on aromatic compounds revealed novel proteins involved in aromatic degradation and a clear link between aromatic catabolism and gluconeogenesis via fructose-1,6-bisphosphatase." Proteomics **7**(20): 3775-87.
- Raetz, C. R. y S. L. Roderick (1995). "A left-handed parallel beta helix in the structure of UDP-N-acetylglucosamine acyltransferase." Science **270**(5238): 997-1000.
- Ramos, J. L., E. Diaz, D. Dowling, V. de Lorenzo, S. Molin, F. O'Gara, C. Ramos y K. N. Timmis (1994). "The behavior of bacteria designed for biodegradation." Biotechnology (N Y) **12**(13): 1349-56.
- Regnier, P. y E. Hajnsdorf (1991). "Decay of mRNA encoding ribosomal protein S15 of *Escherichia coli* is initiated by an RNase E-dependent endonucleolytic cleavage that removes the 3' stabilizing stem and loop structure." J Mol Biol **217**(2): 283-92.
- Richards, J., T. Sundermeier, A. Svetlanov y A. W. Karzai (2008). "Quality control of bacterial mRNA decoding and decay." Biochim Biophys Acta **1779**(9): 574-82.
- Rojas, A., E. Duque, A. Schmid, A. Hurtado, J. L. Ramos y A. Segura (2004). "Biotransformation in double-phase systems: physiological responses of *Pseudomonas putida* DOT-T1E to a double phase made of aliphatic alcohols and biosynthesis of substituted catechols." Appl Environ Microbiol **70**(6): 3637-43.
- Rojo, F. y A. Dinamarca (2004). "Catabolite repression and physiological control in *Pseudomonas*." *Pseudomonas*. Vol. 2. Ramos, J.L. (ed) New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers.
- Romanov, V. y R. P. Hausinger (1996). "NADPH-dependent reductive ortho dehalogenation of 2,4-dichlorobenzoic acid in *Corynebacterium sepeidonicum* KZ-4 and *Coryneform bacterium* strain NTB-1 via 2,4-dichlorobenzoyl coenzyme A." J Bacteriol **178**(9): 2656-61.
- Rost, R., S. Haas, E. Hammer, H. Herrmann y G. Burchhardt (2002). "Molecular analysis of aerobic phenylacetate degradation in *Azoarcus evansii*." Mol Genet Genomics **267**(5): 656-63.
- Ruiz-Manzano, A., L. Yuste y F. Rojo (2005). "Levels and activity of the *Pseudomonas putida* global regulatory protein Crc vary according to growth conditions." J Bacteriol **187**(11): 3678-86.
- Saier, M. H., Jr. (1989). "Protein phosphorylation and allosteric control of inducer exclusion and catabolite repression by the bacterial phosphoenolpyruvate: sugar phosphotransferase system." Microbiol Rev **53**(1): 109-20.
- Saier, M. H., Jr. y T. M. Ramseier (1996). "The catabolite repressor/activator (Cra) protein of enteric bacteria." J Bacteriol **178**(12): 3411-7.

- Saiki, R. K., S. Scharf, F. Faloona, K. B. Mullis, G. T. Horn, H. A. Erlich y N. Arnheim (1985). "Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia." Science **230**(4732): 1350-4.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch y T. Maniatis (1989). Molecular cloning: A Laboratory Manual. N.Y., Cold Spring Harbor.
- Sambrook, J. y D. W. Russell (2001). Molecular cloning: A laboratory manual. . New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Samid, D., S. Shack y L. T. Sherman (1992). "Phenylacetate: a novel nontoxic inducer of tumor cell differentiation." Cancer Res **52**(7): 1988-92.
- Santos, P. M., D. Benndorf y I. Sa-Correia (2004). "Insights into *Pseudomonas putida* KT2440 response to phenol-induced stress by quantitative proteomics." Proteomics **4**(9): 2640-52.
- Santos, P. M., L. Leoni, I. Di Bartolo y E. Zennaro (2002). "Integration host factor is essential for the optimal expression of the styABCD operon in *Pseudomonas fluorescens* ST." Res Microbiol **153**(8): 527-36.
- Sariaslani, F. S., D. B. Harper y I. J. Higgins (1974). "Microbial degradation of hydrocarbons. Catabolism of 1-phenylalkanes by *Nocardia salmonicolor*." Biochem J **140**(1): 31-45.
- Sawatsri, S., D. Samid, S. Malkapuram y N. Sidell (2001). "Inhibition of estrogen-dependent breast cell responses with phenylacetate." Int J Cancer **93**(5): 687-92.
- Scaglia, F., S. Carter, W. E. O'Brien y B. Lee (2004). "Effect of alternative pathway therapy on branched chain amino acid metabolism in urea cycle disorder patients." Mol Genet Metab **81 Suppl 1**: S79-85.
- Schaefer, E. M., D. Hartz, L. Gold y R. D. Simoni (1989). "Ribosome-binding sites and RNA-processing sites in the transcript of the *Escherichia coli* unc operon." J Bacteriol **171**(7): 3901-8.
- Schink, B., B. Philipp y J. Muller (2000). "Anaerobic degradation of phenolic compounds." Naturwissenschaften **87**(1): 12-23.
- Schleissner, C., E. R. Olivera, M. Fernandez-Valverde y J. M. Luengo (1994). "Aerobic catabolism of phenylacetic acid in *Pseudomonas putida* U: biochemical characterization of a specific phenylacetic acid transport system and formal demonstration that phenylacetyl-coenzyme A is a catabolic intermediate." J Bacteriol **176**(24): 7667-76.
- Schmeissner, U., K. McKenney, M. Rosenberg y D. Court (1984). "Removal of a terminator structure by RNA processing regulates int gene expression." J Mol Biol **176**(1): 39-53.
- Schmid, A., J. S. Dordick, B. Hauer, A. Kiener, M. Wubbolts y B. Witholt (2001). "Industrial biocatalysis today and tomorrow." **409**: 258-268.
- Schühle, K., J. Gescher, U. Feil, M. Paul, M. Jahn, H. Schagger y G. Fuchs (2003). "Benzoate-coenzyme A ligase from *Thauera aromatica*: an enzyme acting in anaerobic and aerobic pathways." J Bacteriol **185**(16): 4920-9.
- Schumacher, G. y R. Ehring (1975). "Effect of different conformations of galactose messenger RNA on gene expression and messenger half-life in vitro." Mol Gen Genet **136**(1): 41-54.

- Segura, A., P. Godoy, P. van Dillewijn, A. Hurtado, N. Arroyo, S. Santacruz y J. L. Ramos (2005). "Proteomic analysis reveals the participation of energy- and stress-related proteins in the response of *Pseudomonas putida* DOT-T1E to toluene." J Bacteriol **187**(17): 5937-45.
- Shingler, V. (2003). "Integrated regulation in response to aromatic compounds: from signal sensing to attractive behaviour." Environ Microbiol **5**(12): 1226-41.
- Sidell, N., L. Hao, M. Pasquali y J. D. McDonald (2009). "Carcinogenic effects in a phenylketonuria mouse model." PLoS ONE **4**(1): e4292.
- Siegel, L. S., P. B. Hylemon y P. V. Phibbs, Jr. (1977). "Cyclic adenosine 3',5'-monophosphate levels and activities of adenylate cyclase and cyclic adenosine 3',5'-monophosphate phosphodiesterase in *Pseudomonas* and *Bacteroides*." J Bacteriol **129**(1): 87-96.
- Sikkema, J., J. A. de Bont y B. Poolman (1995). "Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons." Microbiol Rev **59**(2): 201-22.
- Smith, M. R. (1990). "The biodegradation of aromatic hydrocarbons by bacteria." Biodegradation **1**(2-3): 191-206.
- Spickler, C., V. Stronge y G. A. Mackie (2001). "Preferential cleavage of degradative intermediates of rpsT mRNA by the *Escherichia coli* RNA degradosome." J Bacteriol **183**(3): 1106-9.
- Stanier, R. Y., N. J. Palleroni y M. Doudoroff (1966). "The aerobic pseudomonads: a taxonomic study." J Gen Microbiol **43**(2): 159-271.
- Steege, D. A. (2000). "Emerging features of mRNA decay in bacteria." RNA **6**(8): 1079-90.
- Steen, H. y M. Mann (2001). "Similarity between condensed phase and gas phase chemistry: fragmentation of peptides containing oxidized cysteine residues and its implications for proteomics." J Am Soc Mass Spectrom **12**(2): 228-32.
- Stern, M. J., E. Prossnitz y G. F. Ames (1988). "Role of the intercistronic region in post-transcriptional control of gene expression in the histidine transport operon of *Salmonella typhimurium*: involvement of REP sequences." Mol Microbiol **2**(1): 141-52.
- Stover, C. K., X. Q. Pham, A. L. Erwin, S. D. Mizoguchi, P. Warrener, M. J. Hickey, F. S. Brinkman, W. O. Hufnagle, D. J. Kowalik, M. Lagrou, R. L. Garber, L. Goltry, E. Tolentino, S. Westbrook-Wadman, Y. Yuan, L. L. Brody, S. N. Coulter, K. R. Folger, A. Kas, K. Larbig, R. Lim, K. Smith, D. Spencer, G. K. Wong, Z. Wu, I. T. Paulsen, J. Reizer, M. H. Saier, R. E. Hancock, S. Lory y M. V. Olson (2000). "Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PA01, an opportunistic pathogen." Nature **406**(6799): 959-64.
- Sugantino, M. y S. L. Roderick (2002). "Crystal structure of Vat(D): an acetyltransferase that inactivates streptogramin group A antibiotics." Biochemistry **41**(7): 2209-16.
- Surburg, H. y J. Panten (2006). Common fragrance and flavor materials. Preparation, properties and uses. Weinheim, Wiley-VCH.
- Swoboda-Colberg, N. G. (1995). Chemical contamination of the environment: sources, types, and fates of synthetic organic chemicals. Microbial transformations and degradation of toxic organic chemicals. L. Y. Young y C. E. Cerniglia. New York, Wiley-Liss, Inc.: 27-74.

- Sze, C. C., L. M. Bernardo y V. Shingler (2002). "Integration of global regulation of two aromatic-responsive sigma(54)-dependent systems: a common phenotype by different mechanisms." J Bacteriol **184**(3): 760-70.
- Sze, C. C., A. D. Laurie y V. Shingler (2001). "In vivo and in vitro effects of integration host factor at the DmpR-regulated sigma(54)-dependent Po promoter." J Bacteriol **183**(9): 2842-51.
- Takenaka, S., S. Murakami, R. Shinke, K. Hatakeyama, H. Yukawa y K. Aoki (1997). "Novel genes encoding 2-aminophenol 1,6-dioxygenase from Pseudomonas species AP-3 growing on 2-aminophenol and catalytic properties of the purified enzyme." J Biol Chem **272**(23): 14727-32.
- Tam le, T., C. Eymann, D. Albrecht, R. Sietmann, F. Schauer, M. Hecker y H. Antelmann (2006). "Differential gene expression in response to phenol and catechol reveals different metabolic activities for the degradation of aromatic compounds in Bacillus subtilis." Environ Microbiol **8**(8): 1408-27.
- Tamura, M., K. Lee, C. A. Miller, C. J. Moore, Y. Shirako, M. Kobayashi y S. N. Cohen (2006). "RNase E maintenance of proper FtsZ/FtsA ratio required for nonfilamentous growth of Escherichia coli cells but not for colony-forming ability." J Bacteriol **188**(14): 5145-52.
- Taylor, L. A. y R. E. Rose (1988). "A correction in the nucleotide sequence of the Tn903 kanamycin resistance determinant in pUC4K." Nucleic Acids Res **16**(1): 358.
- Timmis, K. N. y D. H. Pieper (1999). "Bacteria designed for bioremediation." Trends Biotechnol **17**(5): 200-2004.
- Timmis, K. N., R. J. Steffan y R. Unterman (1994). "Designing microorganisms for the treatment of toxic wastes." Annu Rev Microbiol **48**: 525-57.
- Tobes, R. y E. Pareja (2005). "Repetitive extragenic palindromic sequences in the Pseudomonas syringae pv. tomato DC3000 genome: extragenic signals for genome reannotation." Res Microbiol **156**(3): 424-33.
- Tomas-Gallardo, L., I. Canosa, E. Santero, E. Camafeita, E. Calvo, J. A. Lopez y B. Floriano (2006). "Proteomic and transcriptional characterization of aromatic degradation pathways in Rhodococcus sp. strain TFB." Proteomics **6 Suppl 1**: S119-32.
- Tomas, C. A., J. Beamish y E. T. Papoutsakis (2004). "Transcriptional analysis of butanol stress and tolerance in Clostridium acetobutylicum." J Bacteriol **186**(7): 2006-18.
- Tomcsanyi, T. y D. Apirion (1985). "Processing enzyme ribonuclease E specifically cleaves RNA I. An inhibitor of primer formation in plasmid DNA synthesis." J Mol Biol **185**(4): 713-20.
- Tropel, D. y J. R. van der Meer (2004). "Bacterial transcriptional regulators for degradation pathways of aromatic compounds." Microbiol Mol Biol Rev **68**(3): 474-500.
- Ullmann, A. (1996). "Catabolite repression: a story without end." Res Microbiol **147**(6-7): 455-8.
- Utkin, I. B., M. M. Yakimov, L. N. Matveeva, E. I. Kozlyak, I. S. Rogozhin, Z. G. Solomon y A. M. Bezborodov (1991). "Degradation of styrene and ethylbenzene by Pseudomonas species Y2." FEMS Microbiology Letters(77): 237-242.

- Vaara, M. (1992). "Eight bacterial proteins, including UDP-N-acetylglucosamine acyltransferase (LpxA) and three other transferases of *Escherichia coli*, consist of a six-residue periodicity theme." FEMS Microbiol Lett **76**(3): 249-54.
- Vaillancourt, F. H., J. T. Bolin y L. D. Eltis (2006). "The ins and outs of ring-cleaving dioxygenases." Crit Rev Biochem Mol Biol **41**(4): 241-67.
- van der Meer, J. R., W. M. de Vos, S. Harayama y A. J. Zehnder (1992). "Molecular mechanisms of genetic adaptation to xenobiotic compounds." Microbiol Rev **56**(4): 677-94.
- Van Dyk, T. K., W. R. Majarian, K. B. Konstantinov, R. M. Young, P. S. Dhurjati y R. A. LaRossa (1994). "Rapid and sensitive pollutant detection by induction of heat shock gene-bioluminescence gene fusions." Appl Environ Microbiol **60**(5): 1414-20.
- Velasco, A., S. Alonso, J. L. García, J. Perera y E. Díaz (1998). "Genetic and functional analysis of the styrene catabolic cluster of *Pseudomonas* sp. strain Y2." J Bacteriol **180**(5): 1063-71.
- 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**(Pt 4): 965-73.
- Villemur, R. (1995). "Coenzyme A ligases involved in anaerobic biodegradation of aromatic compounds." Can J Microbiol **41**(10): 855-61.
- Vodovar, N., D. Vallenet, S. Cruveiller, Z. Rouy, V. Barbe, C. Acosta, L. Cattolico, C. Jubin, A. Lajus, B. Segurens, B. Vacherie, P. Wincker, J. Weissenbach, B. Lemaître, C. Médigue y F. Boccard (2006). "Complete genome sequence of the entomopathogenic and metabolically versatile soil bacterium *Pseudomonas entomophila*." Nat Biotechnol **24**(6): 673-9.
- Volkers, R. J., A. L. de Jong, A. G. Hulst, B. L. van Baar, J. A. de Bont y J. Wery (2006). "Chemostat-based proteomic analysis of toluene-affected *Pseudomonas putida* S12." Environ Microbiol **8**(9): 1674-9.
- Vuorio, R., T. Harkonen, M. Tolvanen y M. Vaara (1994). "The novel hexapeptide motif found in the acyltransferases LpxA and LpxD of lipid A biosynthesis is conserved in various bacteria." FEBS Lett **337**(3): 289-92.
- Wackett, L. P. (2003). "*Pseudomonas putida*--a versatile biocatalyst." Nat Biotechnol **21**(2): 136-8.
- Walsh, U. F., J. P. Morrissey y F. O'Gara (2001). "*Pseudomonas* for biocontrol of phytopathogens: from functional genomics to commercial exploitation." Curr Opin Biotechnol **12**(3): 289-95.
- Wang, F. Q., J. Liu, M. Dai, Z. H. Ren, C. Y. Su y J. G. He (2007). "Molecular cloning and functional identification of a novel phenylacetyl-CoA ligase gene from *Penicillium chrysogenum*." Biochem Biophys Res Commun **360**(2): 453-8.
- Wang, X. G., L. R. Olsen y S. L. Roderick (2002). "Structure of the lac operon galactoside acetyltransferase." Structure **10**(4): 581-8.
- Wasinger, V. C., J. D. Pollack y I. Humphery-Smith (2000). "The proteome of *Mycoplasma genitalium*. Chaps-soluble component." Eur J Biochem **267**(6): 1571-82.
- Weinberger, S. y C. Gilvarg (1970). "Bacterial distribution of the use of succinyl and acetyl blocking groups in diaminopimelic acid biosynthesis." J Bacteriol **101**(1): 323-4.

- Wigley, D. B., J. P. Derrick y W. V. Shaw (1990). "The serine acetyltransferase from *Escherichia coli*. Over-expression, purification and preliminary crystallographic analysis." FEBS Lett **277**(1-2): 267-71.
- Wilde, C., S. Bachellier, M. Hofnung y J. M. Clement (2001). "Transposition of IS1397 in the family Enterobacteriaceae and first characterization of ISKpn1, a new insertion sequence associated with *Klebsiella pneumoniae* palindromic units." J Bacteriol **183**(15): 4395-404.
- Wilde, C., F. Escartin, S. Koikeguchi, P. Latour-Lambert, A. Lectard y J. M. Clement (2003). "Transposases are responsible for the target specificity of IS1397 and ISKpn1 for two different types of palindromic units (PUs)." Nucleic Acids Res **31**(15): 4345-53.
- Willems, M. I., G. Dubois, D. R. Boyd, R. J. Davies, L. Hamilton, J. J. McCullough y P. J. van Bladeren (1992). "Comparison of the mutagenicity of quinoline and all monohydroxyquinolines with a series of arene oxide, trans-dihydrodiol, diol epoxide, N-oxide and arene hydrate derivatives of quinoline in the Ames/Salmonella microsome test." Mutat Res **278**(4): 227-36.
- Willison, J. C., J. Pierrard y P. Hubner (1993). "Sequence and transcript analysis of the nitrogenase structural gene operon (nifHDK) of *Rhodobacter capsulatus*: evidence for intramolecular processing of nifHDK mRNA." Gene **133**(1): 39-46.
- Winstanley, C., M. G. Langille, J. L. Fothergill, I. Kukavica-Ibrulj, C. Paradis-Bleau, F. Sanschagrín, N. R. Thomson, G. L. Winsor, M. A. Quail, N. Lennard, A. Bignell, L. Clarke, K. Seeger, D. Saunders, D. Harris, J. Parkhill, R. E. Hancock, F. S. Brinkman y R. C. Levesque (2009). "Newly introduced genomic prophage islands are critical determinants of in vivo competitiveness in the Liverpool Epidemic Strain of *Pseudomonas aeruginosa*." Genome Res **19**(1): 12-23.
- Winteler, H. V., B. Schneidinger, K. E. Jaeger y D. Haas (1996). "Anaerobically controlled expression system derived from the arcDABC operon of *Pseudomonas aeruginosa*: application to lipase production." Appl Environ Microbiol **62**(9): 3391-8.
- Wolff, J. A., C. H. MacGregor, R. C. Eisenberg y P. V. Phibbs, Jr. (1991). "Isolation and characterization of catabolite repression control mutants of *Pseudomonas aeruginosa* PAO." J Bacteriol **173**(15): 4700-6.
- Wong, H. C. y S. Chang (1986). "Identification of a positive retroregulator that stabilizes mRNAs in bacteria." Proc Natl Acad Sci U S A **83**(10): 3233-7.
- 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**(9): 3469-78.
- Wubbolts, M. G. 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**(2): 569-71.
- Yager, T. D. y P. H. von Hippel (1987). Transcript elongation and termination in *Escherichia coli*. In *Escherichia coli and Salmonella typhimurium: Cellular and Molecular Biology*. Washington, D.C., American Society for Microbiology.

- Yan, Y., J. Yang, Y. Dou, M. Chen, S. Ping, J. Peng, W. Lu, W. Zhang, Z. Yao, H. Li, W. Liu, S. He, L. Geng, X. Zhang, F. Yang, H. Yu, Y. Zhan, D. Li, Z. Lin, Y. Wang, C. Elmerich, M. Lin y Q. Jin (2008). "Nitrogen fixation island and rhizosphere competence traits in the genome of root-associated *Pseudomonas stutzeri* A1501." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(21): 7564-9.
- Yang, Y. y G. F. Ames (1988). "DNA gyrase binds to the family of prokaryotic repetitive extragenic palindromic sequences." Proc Natl Acad Sci U S A **85**(23): 8850-4.
- Yarchuk, O., N. Jacques, J. Guillerez y M. Dreyfus (1992). "Interdependence of translation, transcription and mRNA degradation in the lacZ gene." J Mol Biol **226**(3): 581-96.
- Yoon, H., J. Hong y S. Ryu (2008). "Effects of chaperones on mRNA stability and gene expression in *Escherichia coli*." J Microbiol Biotechnol **18**(2): 228-33.
- Yuste, L., I. Canosa y F. Rojo (1998). "Carbon-source-dependent expression of the PalkB promoter from the *Pseudomonas oleovorans* alkane degradation pathway." J Bacteriol **180**(19): 5218-26.
- Yuste, L. y F. Rojo (2001). "Role of the crc gene in catabolic repression of the *Pseudomonas putida* GPo1 alkane degradation pathway." J Bacteriol **183**(21): 6197-206.
- Zaar, A., W. Eisenreich, A. Bacher y G. Fuchs (2001). "A novel pathway of aerobic benzoate catabolism in the bacteria *Azoarcus evansii* and *Bacillus stearothermophilus*." J Biol Chem **276**(27): 24997-5004.
- Zeyer, J., P. R. Lehrbach y K. N. Timmis (1985). "Use of cloned genes of *Pseudomonas* TOL plasmid to effect biotransformation of benzoates to cis-dihydrodiols and catechols by *Escherichia coli* cells." Appl Environ Microbiol **50**(6): 1409-13.
- Zhuang, Z., K. H. Gartemann, R. Eichenlaub y D. Dunaway-Mariano (2003). "Characterization of the 4-hydroxybenzoyl-coenzyme A thioesterase from *Arthrobacter* sp. strain SU." Appl Environ Microbiol **69**(5): 2707-11.
- Zuker, M., D. H. Mathews y D. H. Turner (1999). Algorithms and Thermodynamics for RNA Secondary Structure Prediction: A Practical Guide. RNA Biochemistry and Biotechnology. J. B. B. F. C. Clark, Kluwer Academic Publishers: 11-43.
- Zumin, Q., H. Yunbing, Z. Dianmo y L. Fufang (2005). "Study on the synthesis of phenylacetic acid by carbonylation of benzyl chloride under normal pressure." J. Nat. Gas Chem. **14**(40-44).