

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I



TESIS DOCTORAL

**Nuevos aspectos del control del metabolismo en *Pseudomonas putida*
KT2440:
metabolismo del ácido fenilacético y papel del gen *apaH***

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA

PRESENTADA POR

Loreine Agulló Carvajal

Directores

Eduardo Díaz Fernández
Juan Nogales Enrique

Madrid, 2014

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR I



**Nuevos aspectos del control del metabolismo en
Pseudomonas putida KT2440: metabolismo del
ácido fenilacético y papel del gen *apaH***

TESIS DOCTORAL

LOREINE AGULLÓ CARVAJAL

Madrid, 2014

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR



TESIS DOCTORAL

**Nuevos aspectos del control del metabolismo en
Pseudomonas putida KT2440: metabolismo del
ácido fenilacético y papel del gen *apaH***

LOREINE AGULLÓ CARVAJAL

DIRECTORES

Dr. EDUARDO DÍAZ FERNÁNDEZ Dr. JUAN NOGALES ENRIQUE



CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS
CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS

Madrid, 2014

El trabajo descrito en esta Tesis Doctoral se ha llevado a cabo en el Departamento de Biología Medioambiental, del Centro de Investigaciones Biológicas del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CIB-CSIC) (Madrid, España). La investigación ha sido financiada por una beca predoctoral “Becas de Doctorado en el Extranjero BECAS CHILE-Convocatoria 2009” gestionada por la Comisión Nacional de Investigación Científica y Tecnológica de Chile CONICYT.

*En el pensamiento científico siempre están presentes elementos de poesía.
La ciencia y la música actual exigen de un proceso de pensamiento
homogéneo.*

Albert Einstein

*Nunca desistas de un sueño,
sólo trata de ver las señales que te lleven a él*

Paulo Coelho

A mis Padres y mis Hermanas

A mi familia

A Ignacio

Con cariño

Agradecimientos

Cuando inicié éste sueño/aventura no pensé más que en lo mucho que extrañaría a mi familia y las cosas importantes que me perdería y fue así, pero a cambio de ello conocí a muchas personas valiosas que hicieron que me sintiera como en casa y con las cuales he compartido parte de este sueño que comenzó hace ya 4 años y que me llevaré a donde vaya.

Primero quiero agradecer al Dr. Michael Seeger, al que considero primero que todo un amigo y mi mentor, me abrió el camino a la ciencia y me incentivó a soñar, gracias por tú apoyo incondicional y dejarme volar y valorar mi trabajo.

También, quiero agradecer al profesor Eduardo Díaz por haberme dado la oportunidad de desarrollar mi Tesis Doctoral en su laboratorio, por guiarla y por poder aprender de él y de su pasión por los compuestos aromáticos. A mi otro director, el Dr. Juan Nogales Salvador darle las gracias por aportar con su conocimiento a esta tesis y con sus reflexiones.

Agradecer de manera especial a todo el grupo de los “Rubenes”, han sido un apoyo en todo momento y una inyección de energía a diario, con lo difícil que se hace algunos días hacer ciencia. Dentro de este grupo maravilloso de científicos he encontrado más que compañeros de trabajo y por ello agradezco a cada uno.

Anita la novia fugitiva, sin ti sabemos que nada sucedería igual en el laboratorio, gracias por permitirme abrazarte, por todo el apoyo y las sonrisas diarias. Mi pequeña Julia, si tú, que agradecida estoy de ti, de nuestros andares y nuestras conversaciones, formas parte de mi familia sin duda, gracias por abrirme una espacio en tú corazón. Carlitos e Isa, la pareja más linda sin duda, gracias por acogerme y quererme tanto, los espero en Chile. Andrés y Miri, gracias por las sonrisas que me regalaron en estos 4 años, sois los mejores y les voy a extrañar. Esther, que bien lo hemos pasado juntas, créeme que sin esos momentos no hubiese llegado hasta acá. Quiero agradecer de manera especial, a Tere y Bea por su apoyo en todo, sois la oreja del grupo de biodegradación preocupadas siempre de en que podéis ayudar, mil gracias chicas por su cariño y apoyo. Nina, como ya lo dijiste antes mi compañera de NIE, que difícil ha sido estar legal pero que a gusto nos hemos quedado gritando ambas por ello, éxito en el futuro con los papeles. Ely y Robert, gracias por el cariño y la preocupación, se les extrañará. Ernesto el pilar de los Neumo y jefazo, que agradecida estoy de que preguntaras siempre como estaba y me hicieses sonreír, gracias por el apoyo y las conversaciones de siempre, te extrañaré. Quiero agradecer también a Auxi Prieto, Pedro García y Jose Luis García por el apoyo en los seminarios de grupo y por hacer mi estancia más simpática aún. Laura, gracias por tú humor diferente, creo que sin duda me lo he pasado genial contigo. A Carmen, Zaira, y Fer les estoy muy agradecida por las conversaciones en el laboratorio y el apoyo cuando nadie entiende que pasa. A los Rubenes de siempre Vir, Ife y Javi con los que compartí a mi llegada mil gracias por dedicarme tiempo y preocupación! Agradezco su apoyo y les deseo lo mejor a Helga, Olga, Cristina, Natalia, Lorena, Igor, Gonzalo y Manuel. Seguro hay nombres que se me olvidan pero que sepáis que no necesitan estar en un papel si realmente me llevo recuerdos increíbles y el cariño de muchos de ustedes.

Por otra parte, quiero agradecer a mis amigos Vero y Dani por ayudarme, escucharme y apoyarme en todo momento en esta aventura, han sido parte de mi familia en Madrid. Agradezco también a la familia Martín-Cortés por su apoyo y por quererme tanto. A Charly y a Nacho un especial agradecimiento por aguantarme en su casa en estos momentos difíciles cuando estaba en la recta final de la tesis.

No puedo olvidar de agradecer el apoyo desde Chile de mis amigos Myriam, Caro, Loreto, Olga, Seba, Colomita y tantos otros que se encargaron de estar presentes a cada momento.

Agradezco por sobre todo el apoyo de mis padres Ruth Carvajal y Sergio Agulló, quienes no han dejado en ningún momento de decirme que soy buena y que puedo conseguir mi sueño, por ello y por todo su amor les agradezco mucho y los saben. A mis hermanas Caro y Paula y sus familias que siempre me alentaron a seguir adelante frente a los momentos difíciles y disfrutaron junto a mí los más geniales. Gracias a mi abuela Dube y a mi familia entera, que sin duda son el pilar fundamental de mi vida, sin vosotros esta tesis no habría sido posible.

Agradezco a Nacho con todo mi corazón, el cariño, el apoyo y el soportarme en todos estos últimos meses, me has enseñado la manera simpática de vivir la vida, olvidarme en ocasiones de la ciencia y a disfrutar día a día de las cosas y personas.

ÍNDICE

ABREVIATURAS	V
I. RESUMEN	1
II. INTRODUCCIÓN	11
1. El catabolismo de los compuestos aromáticos en bacterias	11
1.1 El catabolismo anaeróbico de compuestos aromáticos.	13
1.2 El catabolismo aeróbico de los compuestos aromáticos.	14
1.2.1 Rutas aeróbicas clásicas.	14
1.2.2 Rutas aeróbicas híbridas.	17
2. Regulación de las rutas catabólicas de compuestos aromáticos.	18
2.1 Regulación específica.	19
2.2 Regulación global o sobreimpuesta.	19
3. La respuesta celular global a los compuestos aromáticos en bacterias.	23
3.1. El papel de los nucleótidos en el control de los programas metabólico, morfológico y de estrés.	24
4. La bacteria modelo <i>P. putida</i> KT2440.	27
4.1 Ruta paa de degradación de AFA en <i>P. putida</i> KT2440.	30
4.2 Ruta pca de degradación de 4HBA en <i>P. putida</i> KT2440.	32
4.3 Ruta gal de degradación de galato en <i>P. putida</i> KT2440.	33
III. OBJETIVOS	36
IV. MATERIALES Y MÉTODOS	38
1. Cepas bacterianas.	38
2. Plásmidos.	38
3. Medios y condiciones de cultivo.	39
3.1 Medios de Cultivo empleados para <i>E. coli</i> y <i>Pseudomonas putida</i> .	39
3.2 Antibióticos.	41
3.3 Conservación de las cepas bacterianas.	41
4. Técnicas de manipulación del DNA.	42
4.1 Purificación de DNA.	42
4.2 Aislamiento de DNA.	42
4.3 Reacción de amplificación en cadena con DNA polimerasa termorresistente (PCR).	43
4.4 Secuenciación de DNA.	44
4.5 Extracción de RNA	45
4.6 Ensayos de Retrotranscripción-PCR (RT-PCR) y RT-PCR en tiempo real	45
5. Procedimientos de transferencia génica	46
5.1 Transformación y electroporación.	46
5.2 Transferencia de plásmidos por conjugación	47
6. Construcción de cepas mutantes en <i>Pseudomonas putida</i>.	47
6.1 Construcción de mutantes de inserción por recombinación homóloga.	47
6.2 Construcción de mutantes por delección en <i>P. putida</i> KT2440.	49
7. Ensayos de actividad enzimática.	51
7.1. Obtención de los extractos proteicos.	51
7.2 Ensayo de actividad protocatecuato 3,4-dioxigenasa.	51
7.3 Ensayo de actividad 4-hidroxibenzoato-3-monooxigenasa.	52
7.4 Ensayo de actividad fumarasa	52
7.5 Ensayo de actividad β -galactosidasa.	53
8. Mutagénesis insercional con el mini transposón Tn5.	53
9. Formación de biofilmes en placas de multipocillo.	54

10. Analítica de 4HBA, AFA y protocatecuato.	54
11. Medida del consumo de oxígeno en <i>P. putida</i> KT2440 y <i>P. putida</i> KT2440Δ<i>apaH</i>.	55
12. Medida del consumo de ATP	56
13. Detección y cuantificación de sideróforo pioverdina en <i>P. putida</i> KT2440.	57
14. Determinación del efecto de Estrés oxidativo en el crecimiento de <i>P. putida</i> KT2440 y <i>P. putida</i> KT2440Δ<i>apaH</i>.	57
15. Determinación del efecto de Estrés osmótico en <i>P. putida</i> KT2440 y <i>P. putida</i> KT2440Δ<i>apaH</i>.	58
16. Movilidad tipo Swimming y Swarming.	58
17. Técnicas de manipulación de proteínas.	58
17.1 Electroforesis bidimensional en geles de poliacrilamida-SDS.	58
17.1.1 Preparación de las muestras de proteínas	58
17.1.2 Electroforesis en geles bidimensionales	59
17.1.3 Tinción y Obtención de imágenes de los geles teñidos	60
17.2 Análisis del proteoma de <i>P. putida</i> KT2440 por NanoLC-MS/MS	60
17.2.1 Preparación de las muestras	60
17.2.2 Análisis NanoLC-MS/MS del proteoma de <i>P. putida</i> KT2440 y <i>P. putida</i> KT2440Δ <i>apaH</i> .	60
18. Análisis basados en modelos metabólicos.	61
19. Análisis de los datos de secuencia.	63
V. RESULTADOS	65
1. Estudio del efecto del catabolismo del AFA sobre la degradación de otros compuestos aromáticos en <i>P. putida</i> KT2440.	65
1.1 Crecimiento de <i>P. putida</i> KT2440 en AFA, 4HBA, o en la mezcla de ambos compuestos.	66
1.2 Análisis del consumo de 4HBA y/o AFA en <i>P. putida</i> KT2440.	69
1.3 Estudio de la expresión diferencial de las rutas de degradación de 4HBA y/o AFA en <i>P. putida</i> KT2440.	69
1.3.1 Análisis de la actividad 4-hidroxibenzoato-3-monooxigenasa (PobA).	70
1.3.2 Análisis de la actividad protocatecuato 3,4-dioxigenasa (PcaGH)	71
1.3.3. Efecto del AFA sobre la transcripción de los genes <i>pobA</i> y <i>pcaH</i>	73
1.3.4 Efecto del AFA sobre la transcripción del gen <i>pcaK</i>	74
1.3.5 Efecto del 4HBA sobre la transcripción de los genes <i>paa</i>	74
1.4. Estudio del mecanismo regulador del AFA sobre la expresión de la ruta de degradación de 4HBA.	75
1.4.1 Efecto de la sobre-expresión del gen <i>pcaK</i> en la expresión de la ruta de degradación de 4HBA en presencia de AFA.	75
1.4.2. Efecto del AFA sobre la expresión del gen regulador <i>pobR</i> .	76
1.4.3 Efecto del AFA sobre la ruta del 4HBA en una cepa mutante incapaz de metabolizar AFA.	77
1.5. Efecto del AFA sobre la expresión de otras rutas aeróbicas clásicas en <i>P. putida</i> KT2440.	79
1.6. Estudio de mutantes de <i>P. putida</i> que no muestran el efecto inhibitor del AFA sobre la ruta de degradación de galato.	80
1.6.1 Construcción y selección de mutantes de <i>P. putida</i> KTGAL que no responden al efecto inhibitor del AFA sobre la ruta gal.	81
1.6.2. Identificación de los genes interrumpidos en las cepas mutantes.	82
1.6.3. Análisis genético del fenotipo observado en <i>P. putida</i> KTGAL-14.	83
2. Estudio de fenotipos celulares asociados a la mutación del gen <i>apaH</i> en <i>P. putida</i> KT2440.	86
2.1 Efecto de la mutación <i>apaH</i> en la morfología de <i>P. putida</i> KT2440Δ <i>apaH</i> .	86
2.2 Producción de sideróforos en <i>P. putida</i> KT2440 y <i>P. putida</i> KT2440Δ <i>apaH</i>	87

2.3 Análisis de la movilidad de <i>P. putida</i> KT2440 y <i>P. putida</i> KT2440 Δ <i>apaH</i> .	88
2.4 Formación de biofilm en <i>P. putida</i> KT2440 y <i>P. putida</i> KT2440 Δ <i>apaH</i>	89
2.5 Resistencia a estrés oxidativo de <i>P. putida</i> KT2440 y <i>P. putida</i> KT2440 Δ <i>apaH</i> .	91
2.6 Crecimiento de <i>P. putida</i> KT2440 Δ <i>apaH</i> en diferentes fuentes de carbono.	92
3. Caracterización del proteoma asociado a la inactivación del gen <i>apaH</i> en <i>P. putida</i> KT2440.	96
3.1 Comparación del proteoma de <i>P. putida</i> KT2440 y <i>P. putida</i> KT2440 Δ <i>apaH</i> mediante electroforesis bidimensional en geles de poliacrilamida-SDS.	96
3.2. Comparación del proteoma de <i>P. putida</i> KT2440 y <i>P. putida</i> KT2440 Δ <i>apaH</i> mediante NanoLC-MS/MS.	98
3.2.1 Identificación de las proteínas inducidas o reprimidas en <i>P. putida</i> KT2440 Δ <i>apaH</i> .	98
3.2.2 Subsistemas metabólicos inducidos en <i>P. putida</i> KT2440 Δ <i>apaH</i> .	105
3.2.3. Subsistemas metabólicos reprimidos en <i>P. putida</i> KT2440 Δ <i>apaH</i> .	108
4. Estudio del programa metabólico asociado a la mutación del gen <i>apaH</i>.	111
4.1 Construcción de modelos metabólicos específicos de condición para las cepas <i>P. putida</i> KT2440 y <i>P. putida</i> KT2440 Δ <i>apaH</i> .	111
4.2 Analisis in silico de la distribución de los flujos de carbono y energía en <i>P. putida</i> KT2440 y <i>P. putida</i> KT2440 Δ <i>apaH</i> .	115
4.3. Estudio de la influencia de la expresión constitutiva de los genes <i>paa</i> sobre la fase de latencia de <i>P. putida</i> KT2440 Δ <i>apaH</i> cultivada en AFA.	121
4.4 Análisis del estado energético de las cepas <i>P. putida</i> KT2440 y <i>P. putida</i> KT2440 Δ <i>apaH</i> .	123
4.5. Análisis del consumo de oxígeno en las cepas <i>P. putida</i> KT2440 y <i>P. putida</i> KT2440 Δ <i>apaH</i> .	124
4.6 Efecto de distintos metabolitos en la energización de <i>P. putida</i> KT2440 Δ <i>apaH</i> creciendo en AFA.	125
4.7 Identificación de la etapa clave del TCA involucrada en el bloqueo metabólico de la cepa <i>P. putida</i> KT2440 Δ <i>apaH</i> .	128
5. Estudio del circuito regulador que responde a la inactivación del gen <i>apaH</i> en <i>P. putida</i>.	132
5.1 Expresión de factores sigma en <i>P. putida</i> KT2440 y KT2440 Δ <i>apaH</i> .	132
5.2 Estudio del mecanismo de activación de la expresión del gen <i>rpoS</i> en <i>P. putida</i> KT2440 Δ <i>apaH</i> .	133
5.2.1. Estudio de la expresión del gen <i>psrA</i> en <i>P. putida</i> KT2440 Δ <i>apaH</i> .	133
5.2.2. Estudio de la expresión de los genes <i>crc</i> , <i>crcZ</i> y <i>crcY</i> en <i>P. putida</i> KT2440 Δ <i>apaH</i> .	134
5.2.3. Estudio de la expresión de los genes <i>rsm</i> en <i>P. putida</i> KT2440 Δ <i>apaH</i> .	135
5.3. La cepa doble mutante <i>P. putida</i> KT2440 Δ <i>apaH</i> Δ <i>gacA</i> restaura la fase de latencia de la cepa parental <i>P. putida</i> KT2440.	137
VI. DISCUSIÓN	140
I. Metabolismo del AFA versus catabolismo aeróbico clásico en <i>P. putida</i> KT2440.	141
I.1. Efecto del AFA sobre la ruta de degradación de 4HBA.	141
I.2. Efecto del AFA sobre la ruta de degradación de galato: implicación del gen <i>apaH</i> .	144
I.3. Utilización del modelo iJN1411 para el estudio del crecimiento de <i>P. putida</i> KT2440 en distintos compuestos aromáticos	147
II. Caracterización molecular de los efectos de la inactivación del gen <i>apaH</i> en <i>P. putida</i> KT2440.	149
II.1 Efecto de la mutación en el gen <i>apaH</i> sobre el programa morfológico de <i>P. putida</i> KT2440: movilidad y producción de biofilm.	150
II.2 Efecto de la inactivación del gen <i>apaH</i> en el programa metabólico de <i>P. putida</i> KT2440.	153
II.3 Efecto de la inactivación del gen <i>apaH</i> en el programa de estrés de <i>P. putida</i> KT2440.	161
III. Estudio de la cascada de señalización/regulación asociada a la inactivación del gen <i>apaH</i> en <i>P. putida</i> KT2440.	168

III.1 El sistema regulador de dos componentes GacS/GacA controla la respuesta a altos niveles de Ap ₄ A en <i>P. putida</i> .	168
III.2 Integración y coordinación de los programas celulares vía GacS/GacA	173
III.3 Mecanismo de activación del sistema GacS/GacA mediado por altos niveles de Ap ₄ A.	179
III.4 Implicación del sistema Gac/Rsm en el control catabólico de la ruta gal de <i>P. putida</i> .	181
VII. CONCLUSIONES	186
VIII. BIBLIOGRAFÍA	189
IX. MATERIAL SUPLEMENTARIO	218

ABREVIATURAS

A₆₀₀	absorbancia medida a 600 nm
ADP	adenosina difosfato
Ap^r	resistencia a ampicilina
ATP	adenosina 5'-trifosfato
4HBA	4-hidroxibenzoato
AFA	Ácido fenilacético
CCR	<i>Carbon Catabolite Represion</i>
cDNA	DNA complementario
Cm^r	resistencia a cloranfenicol
CoA	coenzima A
COG	cluster of orthologous groups
CRP	proteína receptora de AMPc
Da	Dalton
dATP	desoxiadenosina 5'-trifosfato
dCTP	desoxicitidina 5'-trifosfato
DEPC	dietilpirocarbonato
dGTP	desoxiguanosina 5'-trifosfato
DMSO	dimetilsulfóxido
DNA	ácido desoxirribonucleico
dNTP	desoxinucleósido trifosfato
DTT	ditiotreitól
dTTP	desoxitimidina 5'-trifosfato
EDTA	Ácido etilendiaminotetracético
FBA	Análisis de balance de flujos
FCCP	Carbonilcianuro-p-trifluorometoxi-hidrazona
GA	galato
GTP	guanosina 5'-trifosfato
Gm^r	resistencia a gentamicina
h	hora
HTH	motivo hélice-giro-hélice
HPLC	Cromatografía líquida de alta presión
IPTG	isopropil-β-D-tiogalatopiranósido
kb	1000 pares de bases
μ	Velocidad específica de crecimiento
kDa	1000 Dalton
Km^r	resistencia a kanamicina
LB	medio Lysogeny Broth
l	litro
m/v	relación masa/volumen
M63	medio mínimo M63
MA	medio basal MA
MC	medio MA complementado
min	minuto
ml	mililitro
mM	milimolar
NAD	nicotinamida-adenina-dinucleótido
NADH(+H⁺)	nicotinamida-adenina-dinucleótido reducido
NADP	fosfato de nicotinamida-adenina-dinucleótido
NADPH(+H⁺)	fosfato de nicotinamida-adenina-dinucleótido reducido
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
nm	nanómetro
nt	nucleótido(s)
orf	<i>open reading frame</i>
PAGE	electroforesis en gel de poliacrilamida
pb	pares de bases
PCR	reacción de amplificación en cadena con DNA polimerasa termorresistente
PHA	Polihidrixialcanoato
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
RBS	secuencia de unión al ribosoma
RNA	ácido ribonucleico
RNAP	RNA polimerasa
mRNA	RNA mensajero

sRNA	RNA no codificante
tRNA	RNA de transferencia
ROS	especies reactivas de Oxígeno
rpm	revoluciones por minuto
RR	regulador de respuesta
RT-PCR	reacción de retrotranscripción acoplada a PCR
σ	factor sigma de la RNA polimerasa
TAE	tampón Tris-Acetato-EDTA
TBE	tampón Tris-Borato-EDTA
TCA	Ciclo de los ácidos tricarbónicos
TE	tampón Tris-EDTA
SDS	dodecilsulfato sódico
Tris	tri(hidroximetil)aminometano
u.a.	unidades arbitrarias
UV	ultravioleta
v/v	relación volumen-volumen
X-gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosido

I. Summary

SUMMARY

INTRODUCTION

Aromatic compounds are widely distributed in the environment and they represent a common carbon source for many microorganisms. The metabolic pathways for microbial degradation of aromatic compounds and the regulatory circuits that control their expression have been widely studied in the last years. Although most of the studies on the regulation of aromatic degradation pathways have focused on the transcriptional control of the cognate catabolic genes (transcriptional regulation), the post-transcriptional control of these genes is also a major regulatory checkpoint (Díaz y Prieto, 2000; Prieto *et al.*, 2004; Rojo y Dinamarca, 2004; Tropel y van der Meer, 2004).

When faced with a mixture of alternative carbon sources, bacteria usually strategically utilize the substrate that yields the highest energy return. The utilization of preferred carbon sources is controlled by global regulatory mechanisms, termed carbon catabolite repression, which depend on the energy status of the cell. This enables bacteria to optimize their growth rates in natural environments that provide complex mixtures of nutrients. The mechanisms that undertake catabolite repression are diverse and they have been well characterized in bacteria such as *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis* (Deutscher *et al.*, 2006; Park *et al.*, 2006), but they are less well characterized in other bacteria of great environmental relevance as those of the *Pseudomonas* genus (Rojo, 2010).

The repression that some aromatic compounds exert on the catabolism of other aromatic compounds that use different peripheral routes is a topic of great interest that has not been deeply studied so far. Bacteria use two basic strategies, that generally coexist in the same cell, for the aerobic degradation of aromatic compounds, i) diverse aerobic classic pathways, e.g., the β -keto adipate pathway, which involve catecholic intermediates, and ii) some aerobic hybrid pathways, e.g., the phenylacetic acid (AFA) and the benzoyl-CoA pathways, that involve CoA-derived aromatic epoxydes as intermediates. Although there has been argued that classic and hybrid aerobic degradation routes might be profitable when bacteria drive in habitats with high and low oxygen availability, respectively, the biological significance of these two basic types of catabolism and the possible preference of one type over the other is unknown so far.

The few studies on the bacterial utilization of mixtures of aromatic compounds have focused on compounds that are degraded through aerobic classic pathways. Thus, in *Acinetobacter baylyi* (Bleichrodt *et al.* 2010), *Cupriavidus necator* JMP134 (Donoso *et al.*, 2011), and in the model bacterium *Pseudomonas putida* (Nichols y Harwood, 1995), benzoate was shown to be a preferred carbon source over 4-hydroxybenzoate, although both compounds are degraded via the same β -ketoacid central pathway. However, the possible cross-regulation between an aerobic hybrid route and an aerobic classic route had not been reported. Getting some light on this issue could contribute to understand why the specific hybrid routes co-exist with the more diverse and extended classic routes.

In this thesis, we approach for the first time a study on the effect of the AFA pathway, a paradigm of hybrid pathway, over the metabolism of other aromatic carbon sources that use classic routes, such as the widely distributed β -ketoacid intradiolic route (Harwood y Parales, 1996) or the gallic acid (GA) extradiolic route (Nogales, 2009). These studies, which constitute the first thematic chapter of this thesis, have been fundamental to reveal for the first time the key role of the *apaH* gene (that encodes the major hydrolase of the Ap₄A allarmone) in the control of the bacterial metabolism, which constitutes the topic of the second thematic chapter of this thesis. All these studies have been carried out in *P. putida* KT2440 because this bacterium is considered to be a model of metabolic versatility and robustness, especially regarding to the catabolism of aromatic compounds, its physiology, biochemistry and genetics is well known, and a genome scale metabolic model (iJN1411) is available to integrate and understand omic-based studies. Taken these assumptions into account, the major objectives of this work were the following:

OBJECTIVES

- I. To study the cross-regulation between a hybrid aerobic pathway, i.e., the phenylacetate (AFA) pathway, and classical aerobic pathways for the degradation of other aromatic compounds, e.g. 4-hydroxybenzoate (4HBA) and gallate (GA) in *P. putida* KT2440.
- II. To explore the physiological effects of the inactivation of the *apaH* gene, which encodes the major Ap₄A hydrolase, in *P. putida* KT2440 Δ *apaH*.
- III. To determine the molecular basis that accounts for the perturbations at the morphological, metabolic and stress programmes in *P. putida* KT2440 Δ *apaH*.

IV. To study the signalling/regulatory network that controls the atypical behaviour of *P. putida* KT2440 Δ *apaH*.

RESULTS AND DISCUSSION

To check the possible cross-regulation between a hybrid pathway and a classical aerobic pathway for degradation of aromatic compounds, we selected the AFA pathway and the highly distributed β -ketoacid pathway, respectively. When *P. putida* KT2440 grows in the presence of AFA and 4HBA, both aromatics are co-metabolized. Although 4HBA becomes metabolized first, this degradation accelerates the initial consumption of AFA. Furthermore, the metabolism of AFA affects negatively the 4HBA consumption. The repressor effect of AFA was confirmed by showing the inhibition of the two key enzymes of the peripheral and central 4HBA degradation pathway, i.e. the 4-hydroxybenzoate-3-monooxygenase (PobA) and the protocatechuate 3,4-dioxygenase (PcaGH), respectively. The AFA effect was carried out at the transcriptional level since the expression of the *pob* and *pca* operons involved in 4HBA degradation was reduced when *P. putida* KT2440 grew in the AFA/4HBA mixture. Interestingly, neither the 4HBA transporter (PcaK) nor the transcriptional activator of the *pob* genes (PobR), which were shown previously to mediate benzoate-mediated repression of 4HBA, were involved in the AFA effect. Blockage of the AFA pathway by disruption of the gene encoding the first enzymatic step alleviates the repression effect on the 4HBA pathway, suggesting that the latter requires the efficient metabolism of AFA.

The repressor effect of AFA was also tested with other aerobic classic pathways such as the extradiolic route for GA degradation. Again, the presence of AFA repressed the expression of the *gal* genes involved in GA degradation. All these results taken together confirm for the first time that the AFA hybrid pathway causes repression of other classical aerobic degradation pathways in *P. putida*. The iJN1411 metabolic model confirmed *in silico* that AFA and other aromatics degraded via phenylacetyl-CoA are indeed carbon sources preferred to aromatics degraded via aerobic classic pathways, which agrees with the previous observation that *P. putida* KT2440 is highly adapted to the efficient metabolism of compounds that use β -oxidation like mechanisms, as is the case of AFA.

Random mini-Tn5 transposon mutagenesis was used to isolate five mutant strains that do not present repression of *gal* genes in the presence of AFA. One of these

mutants, *P. putida* KTGAL-14, contained the mini-Tn5 transposon inserted within a putative operon containing the *apaH* gene. *ApaH* is the major hydrolase of the allarmone diadenosine tetraphosphate (Ap₄A) and it catalyzes the symmetric cleavage of this molecule into two ADP molecules. This result constituted the first report showing the involvement of the *apaH* gene controlling the metabolism of aromatic compounds in bacteria. Since the lack of the *apaH* gene had not been described so far in *P. putida*, a *P. putida*Δ*apaH* strain was constructed. Several *apaH*-related phenotypes that had been previously described in other bacteria were tested in *P. putida* KT2440Δ*apaH*. Although the inactivation of the *apaH* gene did not cause a significant change in the cellular morphology of *P. putida* KT2440, this mutant strain showed a reduced motility, decreased production of the siderophore pyoverdine, increased biofilm formation, and increased sensitivity to oxidative stress. However, the most remarkable and novel property of the *P. putida* KT2440Δ*apaH* strain was its increased lag phase when growing in different carbon sources, especially when using aromatic compounds such as AFA.

To explore for the first time at the molecular level the global effect of the lack of a functional *apaH* gene in bacteria, we compare the total proteome of the wild-type *P. putida* KT2440 strain with that of the *P. putida* KT2440Δ*apaH* mutant strain growing in AFA. Remarkably, the *apaH* mutant strain showed a significant number of proteins whose expression was induced or repressed, and that are potentially involved in all three major cellular programs, i.e., in the morphological, metabolic and stress programs. Therefore, these results highlight a previously unnoticed essential role of the Ap₄A molecule controlling many diverse functions in the bacterial cell.

Among the most induced proteins in the *P. putida* KT2440Δ*apaH* mutant, there is a group of proteins, such as catalases and alkylhydroperoxydases, usually present in bacteria under oxidative stress conditions, strongly suggesting that inactivation of the *apaH* gene and, consequently, an increase in the Ap₄A levels, triggers an oxidative stress-like cellular response. Some c-diGMP synthases and cell envelope proteins, such as adhesins, are also induced in the *apaH* mutant, which is in agreement with the observed increase in biofilm formation and may reflect the low fitness state of the mutant. However, the most abundant set of proteins whose expression changes in the *apaH* mutant are those related to the metabolic program. Thus, some TCA cycle isoenzymes become induced in the *apaH* mutant, revealing an unprecedented role of

Ap₄A remodeling the central metabolism in bacteria. Oxidative phosphorylation, iron uptake systems, amino acids metabolism, PHA and protein synthesis, and several signal transduction systems and RNA regulators, as the Hfq protein, are also likely altered in the mutant strain. An interesting observation is that a proposed trealose (and glycogen) metabolism was induced in *apaH* mutant, which suggests the activation of an osmotic stress response. Accordingly, the *apaH* mutant strain showed a higher resistance to a NaCl-dependent osmotic stress than the wild-type strain, which represents an *apaH* related phenotype that had not been described before in any bacteria.

By using the iJN1411 model and the proteomic data obtained from the *P. putida* wild-type and *apaH* mutant strains growing in AFA, we constructed the cognate condition specific genome scale metabolic models that were then used to predict carbon fluxes throughout the different metabolic modules. This in silico analysis predicted that the flux throughout the TCA cycle was significantly reduced in the *apaH* mutant strain, especially regarding the enzymatic steps catalyzed by aconitase, citrate synthase, succinate dehydrogenase and fumarase, which is in an agreement with the observed induction of unusual TCA isoenzymes in the proteome. Flux through the electron transport chain and oxidative phosphorylation was also significantly reduced in the *apaH* mutant strain, a prediction that matches the observed repression of the NADH dehydrogenase I complex in the proteome. All these analyses of the distribution of carbon fluxes pointed to a compromised energetic state in the *P. putida* KT2440Δ*apaH* strain. This hypothesis was confirmed experimentally by showing that the mutant strain had a lower oxygen consumption and ATP levels than the wild-type strain. Moreover, by using a respiratory uncoupling agent (FCCP) we could conclude that the respiratory flux was limited by reduced NAD(P)H levels in the *P. putida* KT2440Δ*apaH* strain, which in turn would explain the extended lag phase of the mutant in most carbon sources. This was confirmed later on by showing that the long lag phase of *P. putida* KT2440Δ*apaH* grown in AFA was significantly reduced by adding to the medium some minor amounts of compounds, e.g., octanoate, glucose, that do not need the TCA cycle for generating some reducing power. By using the iJN1411 metabolic model and the measured lag phase of the *apaH* mutant in different carbon sources, we could predict in silico that fumarase was the limiting step that caused blockage of the TCA cycle. By measuring the FumA and FumC activity in crude extracts of the wild-type and *apaH* mutant strains, we were able to confirm the proteomic data that revealed the

replacement of the standard FumA activity by the stress-induced FumC activity in *P. putida* KT2440 Δ *apaH*. Gene expression studies also confirmed the induction of *fumC2* and the repression of *fumA* in the *apaH* mutant strain. Taken together, all these data suggest that the increased levels of Ap₄A in *P. putida* KT2440 Δ *apaH* caused an inhibition of the standard fumarase activity which led to a certain blockage of the TCA cycle and, in turn, to a compromised energetic state that explains the extended lag phase observed as well as the relevant changes detected at the morphological and stress programs.

To gain some insights on the regulatory circuit(s) that was altered in *P. putida* KT2440 Δ *apaH*, we analyzed the expression of some RNA polymerase sigma factors that usually control the stress response in bacteria. These studies revealed that *rpoS* expression was significantly increased in the *apaH* mutant strain. Moreover, the overexpression of *rpoS* in *P. putida* KT2440 led to the characteristic extended lag phase of this strain. Therefore, it was concluded that RpoS was a central player in the regulatory cascade that senses and respond to the Ap₄A cellular levels. To study further this regulatory circuit, we monitored the expression of different regulatory elements, i.e., *psrA*, *crc*, and *rsm* genes, that have been reported to control the expression of *rpoS* in bacteria. Interestingly, in the *apaH* mutant we only found a significant change in the expression levels of the *rsmX* and *rsmY* sRNAs, which have been shown to activate the expression of *rpoS* by sequestering the RsmA repressor through a post-transcriptional regulation mechanism (Kojic y Venturi, 2001; Dong *et al.*, 2013; Heeb *et al.*, 2005; Whistler *et al.*, 1998; Sonnleitner y Haas, 2011). Since the *rsm* sRNAs are controlled by the global GacS/GacA two-component regulatory system in some *Pseudomonas* strains, we checked whether this regulatory cascade was also controlling the *P. putida* KT2440 Δ *apaH* behaviour. To this end, we constructed a double *gacA/apaH* *P. putida* KT2440 strain, and we could confirm that this strain lacked the extended lag growth phase that characterizes the *apaH* mutant. In summary, all these results suggest a new mechanism of action of Ap₄A acting as a signal of the pleiotropic GacS/GacA transduction system.

CONCLUSIONS

1. The AFA hybrid pathway causes repression of other classical aerobic degradation pathways, e.g. the 4HBA and GA pathways, suggesting that AFA, and other aromatics degraded via phenylacetyl-CoA, are preferred aromatic carbon sources in *P. putida* KT2440.
2. The *apaH* gene, encoding the major hydrolase of the Ap₄A allarmone, was shown to be involved in the AFA-mediated repression of the gal genes for GA degradation in *P. putida* KT2440.
3. The inactivation of the *apaH* gene in *P. putida* causes a reduction in cellular motility and pyoverdine production, increased biofilm formation, osmotic resistance, and oxidative stress response, and a significant extension of the lag phase when the mutant cells grow at the expense of many different carbon sources.
4. By using a systems biology approach, e.g., proteomics and metabolic modeling (iJN1411), we have shown that inactivation of the *apaH* gene affects to the stress, morphological and metabolic programs of *P. putida*.
5. A major consequence of the *apaH* mutation in *P. putida* is the re-modeling of the central metabolism of the cell, which leads to a compromised energetic state that may cause the extended lag phase as well as the relevant changes detected at the morphological and stress programs.
6. The *rpoS* gene is a central player in the regulatory cascade that senses and responds to the Ap₄A cellular levels and that involves also the rsm sRNA and the global GacS/GacA two-component regulatory circuit of *P. putida* KT2440.
7. The results presented in this work pay the way for future research on the key role of Ap₄A as a signal that controls the metabolic and regulatory networks in bacteria, and as a target for engineering more efficient biocatalysts in different industrial and environmental applications.

REFERENCES

- **Bleichrodt FS, Fischer R and Gerischer UC.** (2010) The beta-ketoadipate pathway of *Acinetobacter baylyi* undergoes carbon catabolite repression,

cross-regulation and vertical regulation, and is affected by Crc. *Microbiology* **156**:1313-22.

- **Díaz E and Prieto M.** (2000) Bacterial promoters triggering biodegradation of aromatic pollutants. *Curr Opin Biotechnol* **11**: 467-475.
- **Deutscher J, Francke C and Postma PW.** (2006) How phosphotransferase system-related protein phosphorylation regulates carbohydrate metabolism in bacteria. *Microbiol Mol Biol R* **70**: 939–1031.
- **Dong YH, Zhang XF and Zhang LH.** (2013) The global regulator Crc plays a multifaceted role in modulation of type III secretion system in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiologyopen*. **2**(1):161-72.
- **Donoso R, Pérez-Pantoja D and González B.** (2011) Strict and direct transcriptional repression of the *pobA* gene by benzoate avoids 4-hydroxybenzoate degradation in the pollutant degrader bacterium *Cupriavidus necator* JMP134. *Environ Microbiol.* **13** (6):1590-600.
- **Harwood CS and Parales RE.** (1996) The β -keto adipate pathway and the biology of self-identity. *Annual Review of Microbiology* **50**: 553-590.
- **Heeb S, Valverde C, Gigot-Bonnefoy C and Haas D.** (2005) Role of the stress sigma factor RpoS in GacA/RsmA-controlled secondary metabolism and resistance to oxidative stress in *Pseudomonas fluorescens* CHA0. *FEMS Microbiol Lett.* **243**(1):251-8.
- **Kojic M and Venturi V.** (2001) Regulation of *rpoS* gene expression in *Pseudomonas*: involvement of a TetR family regulator. *J Bacteriol.* **183**(12):3712-20.
- **Nichols NN and Harwood CS.** (1995) Repression of 4-hydroxybenzoate transport and degradation by benzoate: a new layer of regulatory control in the *Pseudomonas putida* beta- keto adipate pathway. *J Bacteriol* **177**: 7033-7040.
- **Nogales Enrique Juan.** (2009). Caracterización de la ruta de degradación de ácido gálico en *Pseudomonas putida*. *Tesis Doctoral Universidad Complutense de Madrid*.
- **Park YH, Lee BR, Seok YJ and Peterkofsky A.** (2006) In vitro reconstitution of catabolite repression in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **281**: 6448–6454.

- **Prieto MA, Galán B, Torres B, Ferrández A, Fernández C, Miñambres B, García J and Díaz E.** (2004) Aromatic metabolism versus carbon availability: the regulatory network that controls catabolism of less-preferred carbon sources in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Rev* **28**: 503-518.
- **Rojo F and Dinamarca A.** (2004) Catabolite repression and physiological control. In *Pseudomonas*. Ramos, J.L. (ed). New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers.
- **Rojo Fernando.** (2010) Carbon catabolite repression in *Pseudomonas*: optimizing metabolic versatility and interactions with the environment. *FEMS Microbiol Rev* **34**(5):658-84.
- **Sonnleitner E, Hagens S, Rosenau F, Wilhelm S, Habel A, Jäger KE and Bläsi U.** (2003) Reduced virulence of a hfq mutant of *Pseudomonas aeruginosa* O1. *Microb Pathog.* **35**(5):217-28.
- **Tropel D and van der Meer JR.** (2004) Bacterial Transcriptional Regulators for Degradation Pathways of Aromatic Compounds. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **68**: 474-500.
- **Whistler CA, Corbell NA, Sarniguet A, Ream W and Loper JE.** (1998) The two-component regulators GacS and GacA influence accumulation of the stationary-phase sigma factor sigma_S and the stress response in *Pseudomonas fluorescens* Pf-5. *J Bacteriol.* **180**(24):6635-41.

II. Introducción

II. Introducción

La contaminación de la biosfera es un problema de creciente preocupación en el mundo. La industrialización ha permitido alcanzar un elevado desarrollo socioeconómico en diferentes regiones geográficas del mundo, pero al mismo tiempo, ha ocasionado la liberación, deliberada o accidental, al entorno de diferentes compuestos químicos tóxicos. Esto ha conllevado un dramático impacto en los ecosistemas y la calidad de vida del hombre en toda la biosfera (Philp *et al.*, 2005). Una estrategia que presenta varias ventajas para paliar la contaminación ambiental es la biorremediación, que emplea las capacidades catabólicas de los microorganismos para la eliminación de compuestos tóxicos contaminantes (Ramos *et al.*, 1994; Díaz, 2004).

Los compuestos aromáticos se encuentran ampliamente distribuidos en el medio ambiente y muchos de ellos son importantes contaminantes. La toxicidad de algunos compuestos aromáticos puede provenir también de los metabolitos generados durante su metabolismo por los microorganismos capaces de utilizarlos como fuente de carbono y energía (Denef *et al.*, 2005, Yamada *et al.*, 2006, Agulló *et al.*, 2007). Existe una amplia variedad estructural de compuestos aromáticos, los cuales presentan uno o más anillos bencénicos que pueden estar sustituidos en diferentes posiciones por una gran diversidad de grupos funcionales distintos, tales como hidroxilos, aminas, halógenos, entre otros. Un gran número de estos compuestos aromáticos se encuentran ampliamente distribuidos en el medio ambiente formando parte de los procesos biogeoquímicos naturales y no poseen carácter recalcitrante. Las plantas son la principal fuente de compuestos aromáticos en la naturaleza. La lignina es un polímero aromático complejo que constituye el 25% de la biomasa de la Tierra (Cesarino *et al.*, 2012). La superficie de las raíces de las plantas y su área circundante, denominada rizosfera, es un ambiente complejo en el que está presente una gran diversidad de compuestos aromáticos como resultado del metabolismo de los vegetales y microorganismos (Matilla *et al.*, 2007). Los compuestos aromáticos también se pueden encontrar en el tracto intestinal de los animales, formando parte del metabolismo de los aminoácidos aromáticos (Díaz *et al.*, 2001; Gibson y Harwood, 2002). Los compuestos aromáticos se encuentran presentes también como componentes de los taninos, de pigmentos, de cofactores, de los combustibles fósiles y de las propias estructuras de las proteínas, del DNA y del RNA (Gibson y Harwood, 2002). Por tanto, la degradación de estos

compuestos es crítica para mantener el ciclo global del carbono. Por otra parte, existe una amplia gama de compuestos aromáticos de origen antropogénico (xenobióticos), debido al desarrollo creciente de la actividad industrial, que son difíciles de degradar. Los compuestos orgánicos sintéticos persisten en el ambiente por largos períodos provocando la acumulación en cadenas tróficas y causando efectos adversos en la salud humana y los ecosistemas naturales (Timmis y Pieper, 1999; Navia y Seeger, 2006). Esto ha derivado en un creciente interés en la búsqueda y desarrollo de métodos biológicos para la eliminación de los compuestos xenobióticos (Pieper y Reineke, 2000; Luengo *et al.*, 2001; Martínková *et al.*, 2009; Robles-González *et al.*, 2008).

1. El catabolismo de los compuestos aromáticos en bacterias.

El estudio del catabolismo de los compuestos aromáticos constituye un sistema modelo interesante tanto desde un punto de vista de ciencia básica como aplicada. Así, los compuestos aromáticos son una fuente de carbono abundante para las bacterias y su degradación revela la existencia de reacciones enzimáticas y mecanismos de regulación de la expresión génica nuevos que son de gran interés biotecnológico (Rojo, 2010). Las bacterias han desarrollado mecanismos adaptativos que les permiten mineralizar una gran variedad de compuestos aromáticos pese a la gran estabilidad termodinámica de estas moléculas y su carácter tóxico para las células (Harayama y Timmis, 1992; Furukawa 2000; Gibson y Harwood, 2002; Díaz, 2004; Vaillancourt *et al.*, 2004; Fuchs, 2008). Por otro lado, el conocimiento detallado de estas capacidades catabólicas y su regulación permite el diseño de biocatalizadores más robustos y eficaces para su utilización en distintos procesos de interés biotecnológico tales como biorremediación, biotransformación, biosensores, etc. (Carmona *et al.*, 2008, 2009).

La mineralización de los compuestos aromáticos supone un reto importante para los microorganismos dada la estabilidad que les proporciona a estos compuestos la resonancia del anillo. La estrategia común que rige los procesos de degradación de los compuestos aromáticos en bacterias se basa en la aplicación secuencial de dos etapas enzimáticas: i) la modificación de la densidad electrónica del anillo aromático, y ii) la ruptura del mismo. Esta estrategia permite distinguir entre “rutas periféricas”, que son aquellas que transforman y activan diferentes sustratos aromáticos en unos pocos intermediarios centrales, y “rutas centrales”, que catalizan la ruptura del anillo aromático activado de estos últimos canalizándolo al metabolismo central (Heider y

Fuchs, 1997; Díaz, 2004; Díaz *et al.*, 2013). La diversidad de rutas periféricas responde a la gran variedad de compuestos aromáticos existentes, y las enzimas que las integran suelen ser bastante específicas e inducidas por los compuestos a degradar (Harwood *et al.*, 1998; Heider *et al.*, 1998; Díaz *et al.*, 2013). Por el contrario, sólo existen unas pocas rutas centrales, y la convergencia de todas aquellas rutas periféricas en un número reducido de rutas centrales se ha denominado “embudo catabólico” (Harayama y Timmis, 1989). Dependiendo del aceptor final de los electrones en la bacteria, los compuestos aromáticos están sometidos a dos tipos básicos de catabolismo. Si el aceptor es una molécula de oxígeno, se trata de una degradación aeróbica. Si el aceptor final de los electrones es otra molécula distinta al oxígeno (NO_3^- , Fe^{3+} , SO_4^{2-} , entre otras), la degradación es de tipo anaeróbica. Ambos tipos de catabolismo poseen características muy diferentes (Carmona *et al.*, 2009; Fuchs *et al.*, 2011; Díaz *et al.*, 2013).

1.1 El catabolismo anaeróbico de compuestos aromáticos.

Existen numerosos ecosistemas en los que el aporte de oxígeno se encuentra limitado, como ocurre en los suelos con difícil drenaje, las aguas estancadas y subterráneas, las que tienen una elevada actividad bacteriana, los sedimentos marinos, el tracto digestivo de animales, etc. (Widdel y Rabus, 2001). En ausencia de oxígeno, el metabolismo bacteriano requiere de otros aceptores finales de electrones. En la degradación anaeróbica de compuestos aromáticos las bacterias emplean como aceptores finales de electrones moléculas inorgánicas tales como el NO_3^- , que es reducido a NO_2^- o N_2 (desnitrificación) (Spormann y Widdel, 2000), el Fe^{3+} que es reducido a Fe^{2+} (Coates *et al.*, 2001), o el SO_4^{2-} que es reducido a SO_2^{2-} o S_2 (Morasch *et al.*, 2004; Peters *et al.*, 2004), así como moléculas orgánicas tales como el fumarato (Gibson y Harwood, 2002), entre otros. Dentro del catabolismo anaeróbico de compuestos aromáticos cabe destacar dos tipos de rutas de biodegradación:

i) Las rutas catabólicas que generan como intermediarios centrales compuestos hidroxilados, tales como el resorcinol, floroglucinol, hidroxihidroquinona y 6-hidroxinicotinato, y que posteriormente sufren la reducción directa del anillo mediante el aporte de poder reductor en forma de NADPH, en el caso del floroglucinol y la hidroxiquinona (Haddock y Ferry, 1989; Schink y Friedrich, 2000), o por una

ferredoxina, en el caso del resorcinol (Kluge et al, 1990) o del 6-hidroxinicotinato (Alhapel et al, 2006).

ii) Las rutas catabólicas que conducen a la formación de benzoil-coenzima A (CoA) u otros aril-CoA derivados (Schink y Friedrich, 2000). A través de estos metabolitos son canalizados la gran mayoría de los compuestos aromáticos en el metabolismo anaeróbico (Heider y Fuchs, 1997; Schink y Friedrich, 2000; Gibson y Harwood, 2002; Carmona *et al.*, 2009; Fuchs *et al.*, 2011). La activación del anillo se logra mediante la formación de tioésteres de CoA catalizada por diferentes CoA-ligasas. La reducción posterior del anillo y la pérdida de aromaticidad se produce por la acción de benzoil-CoA reductasas multicomponentes que requieren poder reductor y energía (Heider y Fuchs, 1997, Carmona *et al.*, 2009; Fuchs *et al.*, 2011; Boll *et al.*, 2013).

1.2 El catabolismo aeróbico de los compuestos aromáticos.

La degradación aeróbica de compuestos aromáticos es el mecanismo de mineralización mejor estudiado. En las rutas aeróbicas clásicas los diferentes sustratos son convertidos a derivados mono-, di-, o tri-hidroxilados mediante la incorporación de átomos de oxígeno por distintos tipos de oxigenasas, lo que permite la activación termodinámica del anillo aromático. En una siguiente etapa, estos intermediarios hidroxilados sufren la apertura de la molécula, catalizada por dioxigenasas de apertura del anillo, y la consiguiente pérdida de aromaticidad. Finalmente, los productos de apertura son fácilmente oxidados hasta intermediarios del metabolismo central de la célula (Fig. 1). Una variante de las rutas clásicas de degradación aeróbica la constituyen las rutas aeróbicas híbridas (Fig. 1) (Díaz *et al.*, 2001; Jiménez *et al.*, 2004; Phale *et al.*, 2007; Díaz *et al.*, 2013).

1.2.1 Rutas aeróbicas clásicas.

Como se ha indicado anteriormente, en las rutas aeróbicas clásicas el compuesto sufre una activación del anillo aromático mediante la incorporación de átomos de oxígeno con la ayuda de mono- o di-oxigenasas que muestran una gran diversidad estructural (Gibson y Parales, 2000). Una vez activado el anillo aromático, la siguiente etapa en las rutas de degradación aeróbica de compuestos aromáticos consiste en la ruptura del anillo y su conversión en un compuesto intermediario no aromático. Este

tipo de reacciones está catalizado por dioxigenasas de ruptura, que son metalo-enzimas que rompen un enlace C-C mediante la adición de los dos átomos del oxígeno molecular a los intermediarios hidroxilados centrales. Estas enzimas se clasifican en intradiol y extradiol dioxigenasas en función de la posición que ocupe el enlace de la ruptura con respecto a los hidroxilos. Las intradiol dioxigenasas requieren de la presencia de Fe (III) no unido a un grupo hemo, y catalizan la ruptura del núcleo aromático en posición *orto*-respecto a los hidroxilos, mientras que las extradiol dioxigenasas requieren de Fe (II), o en algunos casos de Mg (II) o Mn (II), que tampoco se encuentra unido a un grupo hemo, y catalizan la ruptura en posición *meta*-, en un enlace adyacente a uno de los grupos hidroxilo (Fig. 1) (Gibson y Parales, 2000) Las intradiol y extradiol dioxigenasas no comparten similitud de secuencia o de estructura, lo que indica que pertenecen a familias de proteínas con un origen evolutivo diferente y también son distintos sus mecanismos de reacción. Los sustratos descritos para las intradiol dioxigenasas son, entre otros, el catecol, el protocatecuato y el hidroxiquinol, y todos ellos poseen dos grupos hidroxilos contiguos. Por el contrario, las extradiol dioxigenasas catalizan la ruptura de compuestos catecólicos (e.g., catecol, protocatecuato, homoprotocatecuato), y de otros que presentan dos hidroxilos no contiguos, como el gentisato, el homogentisato, y la hidroquinona (Vaillancourt et al., 2004, Vaillancourt et al., 2006). También existen extradiol dioxigenasas que actúan sobre compuestos monohidroxilados, como el 2-aminofenol (Takenaka et al., 1997), el salicilato (2-hidroxibenzoato) (Hintner et al., 2001) y el 1-hidroxi-2-naftoato implicado en el metabolismo del fenantreno (Iwabuchi y Harayama, 1998).

Al contrario de lo que sucede con las intradiol dioxigenasas, las extradiol dioxigenasas muestran una gran diversidad evolutiva, que permite clasificarlas en, al menos, tres familias distintas (Vaillancourt et al., 2004; Vaillancourt et al., 2006). Una cuarta familia de extradiol dioxigenasas que no poseen similitud de secuencia con las anteriores y que, muy probablemente, derivan de las metaloproteasas, es la que tiene como prototipo a la enzima NicX implicada en la ruptura *meta* de la 2,5-dihidroxipiridina en *P. putida* (Jiménez et al., 2008). A pesar de la diversidad filogenética de las extradiol dioxigenasas, todas ellas contienen un motivo estructural (tríada facial) de dos histidinas y un grupo carboxilato que ligan el ión Fe (II) (Vaillancourt et al., 2004; Vaillancourt et al., 2006).

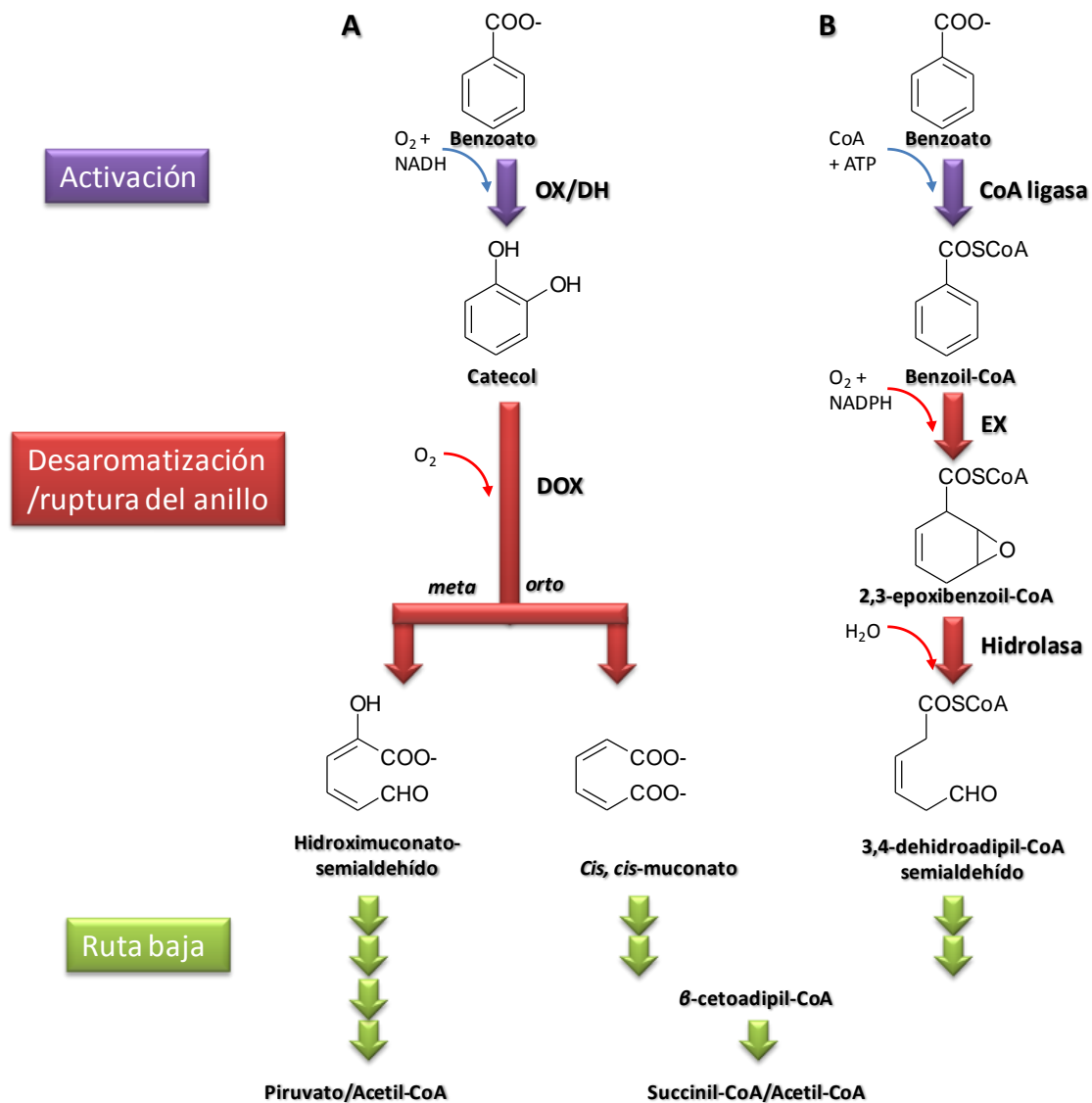


Figura 1. Esquema de las dos estrategias bioquímicas para degradación aeróbica de los compuestos aromáticos en bacterias. Se ha utilizado el benzoato como compuesto modelo. El benzoato puede ser degradado por la vía aeróbica clásica (A) o por la vía aeróbica híbrida (B). En ambas estrategias pueden ser identificados un primer paso de activación del anillo (flecha morada), un segundo paso que involucra la desaromatización/ruptura del anillo (flechas rojas) con una posterior degradación hacia metabolitos centrales mediante las rutas bajas (flechas verdes). La ruptura *orto* del anillo catecólico (vía central del β -cetoadipato) y la vía híbrida del benzoil-CoA convergen en el intermediario común β -cetoadipil-CoA. Las abreviaturas representan: OX, oxigenasa hidroxilante de anillo; DH, dihidrodiol deshidrogenasa; DOX, dioxigenasa de ruptura de anillo (intradiol o extradiol dioxigenasas); EX, aril-CoA epoxidasa. (Adaptado de Díaz *et al.*, 2013).

En el catabolismo de compuestos que contienen un anillo de benceno fusionado a uno de piridina, se ha identificado una nueva familia de dioxigenasas de ruptura que no muestran similitud de secuencia con otras extradiol dioxigenasas y que no requieren

cofactores orgánicos ni iones metálicos para la catálisis. El análisis de la estructura primaria de las 2,4-dioxigenasas permite englobarlas en la superfamilia de las α/β hidrolasas (Fetzner, 2002, Fetzner y Steiner, 2010). Estas dioxigenasas han adaptado el centro activo de las α/β hidrolasas (tríada catalítica) para realizar la reacción dioxigenolítica (Frerichs-Deeken y Fetzner, 2005).

1.2.2 Rutas aeróbicas híbridas.

A diferencia de las rutas aeróbicas clásicas, las rutas híbridas de degradación aeróbica de compuestos aromáticos combinan características del catabolismo aeróbico y del anaeróbico. En una primera etapa, los sustratos degradados mediante las rutas híbridas son transformados en derivados de CoA mediante CoA-ligasas, una característica típica de las rutas anaeróbicas de degradación de compuestos aromáticos, lo que facilita la desestabilización del anillo aromático aumentando su densidad electrónica (Fig. 1) (Heider y Fuchs, 1997; Díaz *et al.*, 2013). Para su actividad, las CoA-ligasas requieren CoA, Mg^{2+} y ATP (Boll y Fuchs, 1995; Fuchs *et al.*, 2011). A continuación, se produce la pérdida del carácter aromático del derivado de CoA mediante una reacción de oxigenación que genera un derivado epoxiaril-CoA, el cual sufre posteriormente la apertura del anillo alicíclico por la acción de una hidrolasa (Fig. 1) (Fuchs *et al.*, 2011; Díaz *et al.* 2013). Una de las dos rutas aeróbicas híbridas mejor estudiadas es la ruta box de degradación de benzoato vía benzoil-CoA en *Azoarcus evansii* (Zaar *et al.*, 2004; Gescher *et al.*, 2005; 2006; Rather *et al.*, 2011a; 2011b). La degradación de benzoato a través de la ruta aeróbica híbrida box también se ha descrito en otras bacterias tales como otras cepas del género *Azoarcus* (Valderrama *et al.*, 2013), *Thauera aromatica* (Schuhle *et al.*, 2001), *Bacillus stearothermophilus* (Zaar *et al.*, 2001) y *Burkholderia xenovorans* LB400 (Denef *et al.*, 2006). La otra ruta aeróbica híbrida más estudiada es la ruta paa involucrada en la degradación del ácido fenilacético (AFA). A diferencia del benzoato, que puede ser degradado por rutas aeróbicas clásicas o por la ruta híbrida del benzoil-CoA, hasta la fecha sólo se conoce la ruta híbrida paa para la degradación aeróbica del AFA. Los genes paa se han identificado en una gran variedad de bacterias, e incluso en arqueas (Teufel *et al.*, 2010). La ruta paa se ha estudiado en detalle en *E. coli* (Ferrández *et al.*, 1997; Díaz *et al.*, 2001; Ismail *et al.*, 2003; Fernández *et al.*, 2006; Nogales *et al.*, 2007; Teufel *et al.*, 2010; 2011; 2012), *P. putida* U (Olivera *et al.*, 1998), *Pseudomonas* sp. Y2 (Alonso *et al.*, 2003; Bartolomé-

Martín et al, 2004; Teufel *et al.*, 2012), *A. evansii* (Mohamed et al, 2002), *Burkholderia cenocepaci*. (Law y Boulanger, 2003.) *Rhodococcus* sp. RHA1 (Navarro-Llorens et al, 2005), *Arthrobacter oxydans* CECT386 (Navarro-Llorens et al, 2008) y en bacterias del género *Thermus* (Kunishima et al, 2005; Song et al, 2006; Erb *et al.*, 2008; Sakamoto *et al.*, 2011).

También se ha caracterizado una ruta aeróbica híbrida para la degradación del 2-aminobenzoato (antranilato) en *A. evansii*, que implica una aminobenzoil-CoA oxigenasa/reductasa como enzima clave para la pérdida de aromaticidad (Schuhle et al, 2001). La degradación de salicilato en algunas bacterias gram-positivas, tales como *Streptomyces* sp. WA46 y *Rhodococcus* sp. B4, también implica la formación e hidroxilación de derivados de CoA (gentisil-CoA), si bien posteriormente se libera CoA y se regenera gentisato (Grund et al, 1992; Ishiyama et al, 2004).

2. Regulación de las rutas catabólicas de compuestos aromáticos.

Dado que los compuestos aromáticos no suelen ser una fuente de carbono preferencial para las bacterias, la expresión de las rutas de degradación de dichos compuestos suele estar sometida a un estricto control transcripcional. Dicho control se ejerce a dos niveles: i) una regulación específica de cada ruta y mediada por reguladores generalmente codificados en el propio *cluster* catabólico, y ii) una regulación sobreimpuesta a la anterior y que responde a mecanismos de regulación globales que operan en función del estado energético de la célula y de las condiciones ambientales concretas (Fig. 2) (Prieto et al, 2004; Tropel y van der Meer, 2004, Cases y de Lorenzo, 2005; Carmona *et al.*, 2008; Díaz *et al.*, 2013). A pesar de que el control transcripcional ha sido el más estudiado, también existe un control post-transcripcional que modula los niveles de mRNA, y la eficacia de su traducción (Aranda-Olmedo et al, 2006; Cases y de Lorenzo, 1998; Laurie et al, 2003; Moreno *et al.*, 2007; Moreno y Rojo, 2008; Moreno *et al.*, 2010). Por último, las rutas catabólicas también se regulan a nivel post-traduccionales mediante la inhibición de las enzimas correspondientes, e.g., en presencia de distintos análogos de sustrato no metabolizables o cuando la ruta sufre algún bloqueo (retroinhibición), o mediante el control de los transportadores específicos encargados de la entrada del compuesto aromático (Brzostowicz et al, 2003).

2.1 Regulación específica.

Dentro del catabolismo de compuestos aromáticos en bacterias existe una gran variedad de reguladores transcripcionales específicos que pertenecen a distintas familias de proteínas reguladoras. Estas proteínas pueden actuar como represores o activadores, y su diversidad sugiere que han evolucionado independientemente de los elementos catabólicos. El mecanismo de control se basa en la interacción de la proteína, a través de un dominio hélice-giro-hélice (HTH) de interacción con el DNA, con la región operadora del promotor regulado. La interacción/liberación del regulador con el promotor correspondiente depende de la presencia del inductor apropiado. Las moléculas inductoras suelen ser los propios sustratos de la ruta, o bien alguno de los metabolitos (aromáticos o no aromáticos) que se generan en la degradación (Díaz y Prieto, 2000; Tropel y van der Meer, 2004, Carmona *et al.*, 2008; Kamimura *et al.*, 2010). Los promotores catabólicos, por su parte, poseen un cierto nivel de inespecificidad con respecto a las señales a las que responden, lo que les permite evolucionar y ser reclutados para controlar nuevas rutas (Cases y de Lorenzo, 2001; Cases y de Lorenzo, 2005). Otra característica de la regulación transcripcional del catabolismo de compuestos aromáticos es la existencia de cascadas de regulación con diferentes puntos de control, de manera que los genes se inducen selectivamente y se evita el gasto energético que supone la expresión de rutas periféricas innecesarias (Cases y de Lorenzo, 2001; Cases y de Lorenzo, 2005; Díaz y Prieto, 2000; Prieto *et al.*, 2004).

2.2 Regulación global o sobreimpuesta.

Las bacterias poseen un metabolismo versátil que les permite utilizar muchos y diferentes compuestos como fuente de carbono y energía, facilitándoles su supervivencia en diferentes nichos ecológicos y permitiéndoles su rápida adaptación a los cambios ambientales. Esta versatilidad metabólica está estrechamente ligada a una regulación flexible de la expresión de las vías metabólicas, regulación que está dirigida a optimizar la eficiencia del metabolismo y su adaptación ecológica. Existen varios sistemas descritos de regulación global que participan en programas coordinados de la expresión génica y que responden a diversas situaciones ambientales tales como limitación de nutrientes, oxígeno, o cambios de pH, entre otras. Muchas bacterias poseen también sistemas de regulación global que coordinan el metabolismo de varias

fuentes de carbono que están disponibles simultáneamente y a concentraciones que no limitan el crecimiento bacteriano. En estas condiciones, las bacterias pueden co-metabolizar las diferentes fuentes de carbono o, por el contrario, asimilar preferentemente unos compuestos específicos, que son los que generalmente permiten un crecimiento más eficiente, inhibiendo al mismo tiempo el consumo y/o la expresión de los genes requeridos para el metabolismo de compuestos no preferentes. El proceso de regulación que permite esta selección de fuentes de carbono preferentes se denomina represión catabólica de carbono (CCR) (Müller *et al.*, 1996; Görke y Stülke, 2008; Rojo, 2010; Donoso *et al.*, 2011).

Generalmente, los compuestos aromáticos no suelen ser una fuente de carbono preferente para las bacterias y su metabolismo está sujeto a procesos de CCR. Así por ejemplo, si la bacteria se encuentra en presencia de un compuesto aromático y de una fuente de carbono más fácil de asimilar (e.g., glucosa, citrato, succinato, etc.) que el compuesto aromático en cuestión, la ruta de degradación del compuesto aromático puede sufrir un fenómeno de represión catabólica mediado por el metabolito no aromático. Sin embargo, la naturaleza del compuesto preferido varía dependiendo del organismo en concreto. Así, en *E. coli* los azúcares (glucosa) son la fuente de carbono preferente. El mecanismo de represión por catabolito ha sido descrito para los operones catabólicos de degradación de compuestos aromáticos en *E. coli* cuando existe glucosa en el medio, y está mediado por la proteína CRP receptora de AMPc (Prieto *et al.*, 2004). En otras bacterias, e.g., cepas del género *Pseudomonas*, la glucosa no es una fuente de carbono preferente y son los aminoácidos y ciertos ácidos orgánicos (e.g., citrato, succinato) los que causan una significativa represión catabólica de los operones de catabolismo de compuestos aromáticos (Collier *et al.*, 1996; Müller *et al.*, 1996; O'Leary *et al.*, 2001). No obstante, en *P. fluorescens* ST y *P. putida* KT2440 (pWW0) la glucosa tiene un efecto represor sobre los genes requeridos para la degradación de compuestos como estireno y tolueno, respectivamente (Santos *et al.*, 2000; del Castillo y Ramos 2007; Rampioni *et al.*, 2008). En *P. putida* también se ha descrito un catabolismo preferencial de la glucosa sobre la asimilación de metilfenol y AFA (Müller *et al.*, 1996; Schleissner *et al.*, 1994; Kim *et al.* 2009). En contraste, existe un metabolismo preferente de compuestos aromáticos, como el naftaleno, sobre la glucosa en *P. putida* CSV86 (Basu *et al.*, 2006, 2007b), debido probablemente a la formación de ciertos intermediarios producidos durante la asimilación del compuesto aromático (Basu

et al., 2007a). En algún otro organismo especializado en la degradación de compuestos aromáticos, e.g., *Azoarcus* sp. EbN1, también se ha descrito un metabolismo preferente del benzoato sobre el succinato (Trautwein *et al.*, 2012).

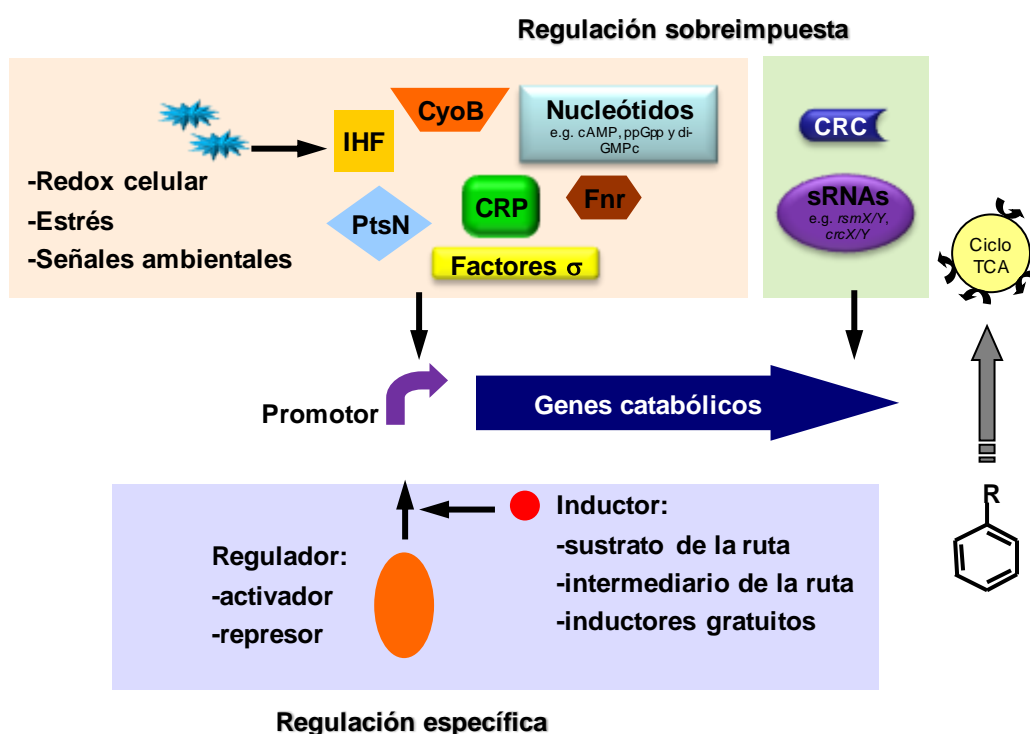


Figura 2. Esquema de la regulación de las rutas catabólicas de compuestos aromáticos. El control de la expresión de las rutas de degradación combina i) la regulación específica (recuadro azul claro), mediada por los reguladores transcripcionales específicos (activadores o represores) que responden a inductores de la ruta concreta, y ii) una regulación sobreimpuesta transcripcional (recuadro naranja) o post-transcripcional (recuadro verde) mediada por reguladores globales que implican proteínas (e.g. CyoB, CRP, PtsN, IHF, Fnr, factores sigma, etc.), sRNAs y ciertos nucleótidos (e.g. cAMP, ppGpp, di-GMPc) que responden a señales ambientales (O_2 , pH, temperatura, etc.) y al estado fisiológico de la célula (estado redox, condiciones de estrés, etc.).

Proteínas como CyoB, PtsN, IHF, BphQ, y AccR se han visto implicadas en procesos de represión catabólica de las rutas de degradación de compuestos aromáticos en bacterias de los géneros *Pseudomonas*, *Acidovorax* y *Azoarcus* (Petruschka *et al.*, 2001; Ohtsubo *et al.*, 2006; Pfluger y de Lorenzo, 2008; Valderrama *et al.*, 2013). Se ha descrito también la influencia de la proteína CRP de *P. putida* en el catabolismo de

algunos compuestos aromáticos (Daniels *et al.*, 2010; Herrera *et al.*, 1012). Ciertos factores sigma de la RNA polimerasa (RNAP) alternativos son también importantes elementos de control de la expresión transcripcional de los genes responsables de la degradación de compuestos aromáticos. Así por ejemplo, el nucleótido (p)ppGpp actúa como una alarmona y es necesario para favorecer la interacción del factor sigma 54 alternativo (RpoN) con la RNAP, y permitir la actividad de ciertos promotores catabólicos dependientes de RpoN, como el promotor *Po* que controla los genes *dmp* para la degradación de (metil)fenol (Österberg *et al.*, 2011).

Además de la regulación transcripcional, cada vez es más evidente que el control post-transcripcional de la expresión génica es muy importante y juega un papel esencial en los mecanismos de regulación sobreimpuesta de las rutas de degradación de compuestos aromáticos. El ejemplo más paradigmático de este tipo de control lo representa, la proteína Crc de *Pseudomonas*. Crc está implicada, mediante un mecanismo de control post-transcripcional que también implica a ciertos sRNAs y a la proteína Hfq (Milojevic *et al.*, 2013), en la represión que ejercen los aminoácidos sobre la expresión de rutas catabólicas de compuestos aromáticos (Moreno y Rojo, 2008; Rojo 2010; Hernández-Arranz *et al.*, 2013).

Los microorganismos en su medio ambiente natural se encuentran normalmente en presencia de una mezcla compleja de compuestos aromáticos. La represión catabólica que ejercen algunos compuestos aromáticos sobre el catabolismo de otros aromáticos que utilizan rutas periféricas distintas ha sido poco estudiada hasta la fecha. En este sentido, la mayor parte de los estudios se han centrado en caracterizar la base molecular de la preferencia del compuesto benzoato sobre el 4-hidroxibenzoato (4HBA) en *P. putida* PRS2000, *Acinetobacter baylyi* ADP1 y en *Cupriavidus necator* JMP134 (Nichols y Harwood, 1995; Cowles *et al.*, 2000; Brzostowicz *et al.*, 2003, Bleichrodt *et al.*, 2010; Donoso *et al.*, 2011). La represión descrita en *P. putida* PRS2000 se debe principalmente a la disminución de la expresión del gen *pcaK* que codifica el transportador específico de 4HBA (Nichols y Harwood, 1995). Por el contrario, en *C. necator* JMP134 se ha demostrado que el benzoato regula la expresión del gen regulador *pobR* necesario para la inducción del gen *pobA* que codifica la oxigenasa que inicia la degradación del 4HBA (Donoso *et al.*, 2011).

3. La respuesta celular global a los compuestos aromáticos en bacterias.

Los compuestos aromáticos no sólo son una fuente de carbono y energía para algunas bacterias capaces de metabolizarlos, sino que también son un importante factor de estrés para las bacterias debido a que muchos de estos compuestos, por sus propiedades físico-químicas concretas, producen daño a nivel de la membrana celular, de los ácidos nucleicos y de ciertas proteínas citoplásmicas y pueden ocasionar la muerte celular (Sikkema *et al.*, 1995; Jiménez *et al.*, 2010; Díaz *et al.* 2013). Este efecto antagónico de los compuestos aromáticos, i.e., compuesto tóxico y al mismo tiempo nutriente, determina que las bacterias degradadoras de compuestos aromáticos respondan a la presencia de estos compuestos ajustando sus programas vitales básicos, i.e., el programa metabólico, el programa de estrés; y el programa morfológico (Jiménez *et al.*, 2010).



Figura 3. Esquema de la respuesta global de las bacterias a los compuestos aromáticos Las estrellas representan cada uno de los programas activados por la presencia del compuesto aromático, y el número en su interior el orden secuencial de activación. Esquema modificado de Jiménez *et al.*, 2010

El programa metabólico incluye el conjunto de reacciones directamente implicadas en el catabolismo de los compuestos aromáticos, y todas aquellas reacciones accesorias que son necesarias para el correcto funcionamiento de las primeras, e.g., síntesis de cofactores, reciclaje del poder reductor, metabolitos esenciales, etc. El programa de respuesta a estrés incluye la inducción de un conjunto de genes/proteínas que permitan la adaptación a las condiciones subóptimas de crecimiento, mecanismos de defensa frente a la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS), chaperonas moleculares que en otras bacterias se han visto inducidas por señales de estrés térmico, etc. El programa morfológico incluye aspectos de movilidad celular, e.g., quimiotaxis, secreción y organización de la envuelta celular. Estos tres programas se encuentran estrechamente interconectados y se influyen entre sí (Fig. 3) (Domínguez-Cuevas *et al.*, 2006, Velázquez *et al.*, 2006; Jiménez *et al.*, 2010; Díaz *et al.*, 2013).

3.1. El papel de los nucleótidos en el control de los programas metabólico, morfológico y de estrés.

El carácter dual de los compuestos aromáticos, i.e., fuente de carbono y compuesto tóxico, los hace un sistema modelo muy interesante para estudiar cómo se interconectan los programas metabólico, morfológico y de estrés en bacterias. Ciertos nucleótidos, tales como el AMPc, ppGpp, di-GMPc, y AppppA (Ap₄A) (Fig. 4), actúan como alarmonas y juegan un papel esencial en el control de estos tres programas celulares induciendo cambios globales en la expresión del genoma de las bacterias (Farr *et al.*, 1989; Cashel y Kalbacher, 1970; Ismail *et al.*, 2003; Jiménez *et al.*, 2012;

El AMPc (Fig. 4) es una de las primeras moléculas señalizadoras descritas y posee un papel crucial en el control de la regulación de la fisiología en bacterias (Jiménez *et al.*, 2012). El AMPc es sintetizado por adenilato ciclasas y se une y activa a factores de transcripción de la familia CRP controlando una gran variedad de procesos metabólicos (Jiménez *et al.*, 2012). El AMPc controla directamente la virulencia en *P. aeruginosa* a través de la unión al factor Vfr (factor regulador de virulencia). Por otro lado, el AMPc controla de manera indirecta la producción de otros múltiples factores de virulencia, regula positivamente la activación de la exotoxina A, del pili tipo IV (TFP), el T3SS y el sistema Las de *quorum sensing*, y regula negativamente la expresión de los genes flagelares (Jiménez *et al.*, 2012). Como ya hemos mencionado anteriormente (apartado 2.2), se ha descrito que el AMPc se une a la proteína receptora CRP siendo el

principal responsable del mecanismo de represión catabólica de la glucosa sobre los operones de la degradación de compuestos aromáticos en *E. coli* (Fig. 2) (Prieto et al., 2004).

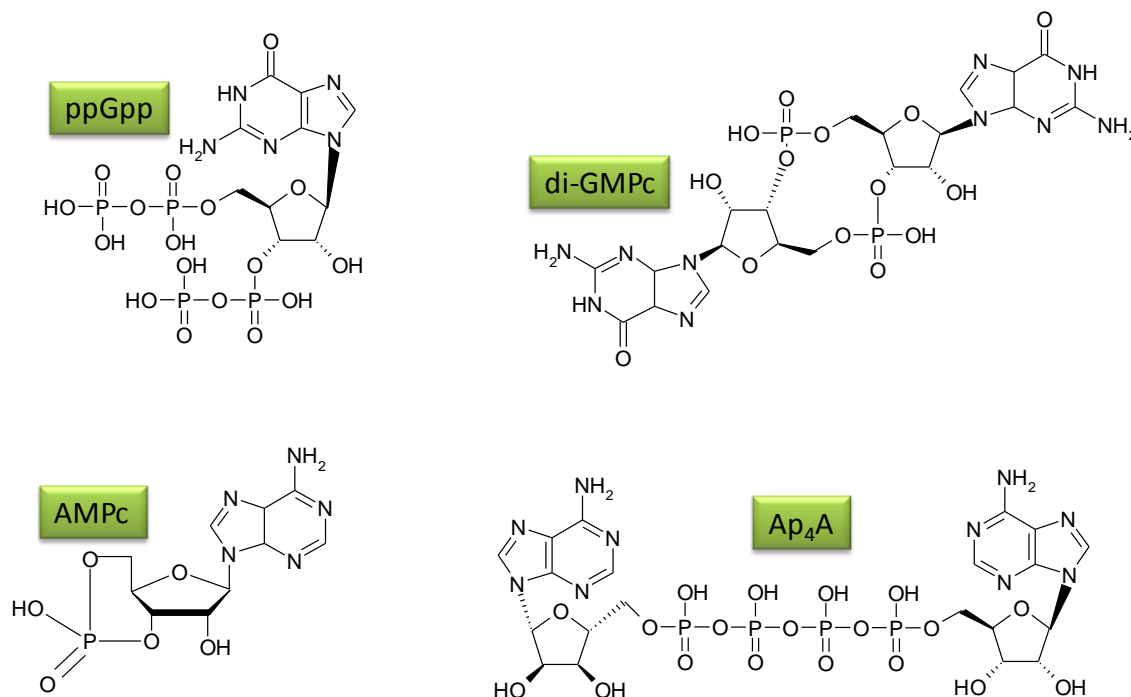


Figura 4. Algunos nucleótidos implicados en mecanismos de regulación en bacterias. Las moléculas corresponden a: ppGpp, 3'-difosfato,5'-difosfato de guanosina; AMPc, monofosfato de adenosina cíclico; di-GMPc, di-guanosina monofosfato cíclico; Ap₄A, P1,P4-Bis(5'-adenosil) tetrafosfato.

Un segundo grupo de nucleótidos considerados como alarmas celulares son el ppGpp y pppGpp (Fig. 4) que ven aumentados sus niveles intracelulares de manera rápida bajo condiciones de limitación de nutrientes (respuesta estricta). La respuesta estricta es un mecanismo de adaptación rápida de las actividades celulares cuando las bacterias sufren hambre de nutrientes, por ejemplo cuando cambian bruscamente de un medio rico a otro pobre en aminoácidos, o cuando se agota la fuente de carbono. Consiste en un mecanismo de ahorro para sobrevivir a las condiciones adversas hasta que éstas mejoren (Cashel y Kalbacher, 1970; Jiménez *et al.*, 2012). Las proteínas RelA y SpoT son la encargadas de sintetizar (p)ppGpp provocando el aumento de estos nucleótidos que se unen directamente a la RNAP reprimiendo la transcripción de los genes dependientes del factor sigma 70 y que codifican rRNAs, tRNAs y proteínas

ribosomales y activando la de algunos genes metabólicos, especialmente los de biosíntesis de aminoácidos e hidrólisis de proteínas. El factor sigma S alternativo (RpoS) se une a la apoenzima RNAP disponible e induce la expresión de genes específicos de la fase estacionaria y de respuesta a estrés (Dabrowska *et al.*, 2006). Como se ha comentado en el apartado 2.2, el incremento de los niveles de ppGpp también facilita la interacción del factor sigma 54 (RpoN) alternativo con la RNAP disponible, y permite la actividad de ciertos promotores catabólicos dependientes de RpoN, como el promotor *Po* que controla los genes *dmp* para la degradación de (metil)fenol (Fig. 2) (del Peso Santos *et al.*, 2011).

El dinucleótido cíclico di-GMPc (Fig. 4) es otro de los nucleótidos que posee una importante función señalizadora en bacterias. Este nucleótido es sintetizado por diguanilato ciclasas (DGC) que presentan un dominio GGDEF, y es degradado principalmente por fosfodiesterasas (PDEs) con dominios EAL (Jiménez *et al.*, 2012). Los niveles de di-GMPc en la célula bacteriana constituyen una señal esencial en el control del estilo de vida planctónico o sedentario (biofilm). Así, los niveles de di-GMPc están regulando la biosíntesis de adhesinas y exopolisacáridos, la movilidad, la adaptación a estreses ambientales y largos períodos de supervivencia, la síntesis de metabolitos secundarios, la progresión del ciclo celular y regulación de la proteólisis, etc. En bacterias patógenas, los niveles de di-GMPc controlan aspectos esenciales de virulencia, persistencia, etc. (Starkey *et al.*, 2009; Jiménez *et al.*, 2012; Krasteva *et al.*, 2012; Römling *et al.*, 2013).

El dinucleótido lineal AppppA (Ap₄A) (Fig. 4) es otra alarmona cuya función y mecanismo de acción está mucho menos estudiada en bacterias que la de los nucleótidos anteriormente mencionados. Este tetranucleótido de adenosina es sintetizado principalmente por aminoacil-tRNA sintetasas cuando los aminoácidos sustrato son poco abundantes, e.g., fase estacionaria de crecimiento (Plateau y Blanquet, 1994). Un aumento en la expresión de ciertas aminoacil-tRNA sintetasas, e.g., LysU, provoca un aumento entre 10-100 veces en la concentración de Ap₄A intracelular (Brevet *et al.*, 1989). Por otra parte, la degradación del Ap₄A está realizada principalmente por la hidrolasa ApaH, generándose dos moléculas de ADP (Mechulam *et al.*, 1985), aunque otras hidrolasas que también contribuyen en menor medida a regular los niveles de Ap₄A son las hidrolasas tipo Nudix, como YgdP o NudH de *E. coli*, generándose AMP y ADP (Ismail *et al.*, 2003). El aumento transitorio de los niveles de Ap₄A en la célula conlleva

cambios fisiológicos importantes, fundamentalmente orientados a la defensa ante condiciones de estrés (Johnstone y Farr, 1991; Bochner *et al.*, 1984; Fuge y Spencer, 1993). La inactivación del gen *apaH* en bacterias causa un incremento permanente de los niveles de Ap₄A. Así, en una fase temprana del crecimiento de una cepa de *E. coli* mutante en el gen *apaH*, los niveles de Ap₄A (16 μM) fueron significativamente superiores a los detectados en la cepa parental (1 μM), llegándose a alcanzar 100μM de Ap₄A en la fase estacionaria de crecimiento del mutante *apaH*. Esta diferencia no se traduce en un efecto a nivel de concentración de ATP, ya que los niveles totales de ATP no se ven alterados respecto a los de la cepa parental (Farr *et al.*, 1989). La inactivación del gen *apaH* en distintas bacterias causa efectos pleiotrópicos tales como la pérdida de movilidad y quimiotaxis, incremento en la formación de biofilm, menor resistencia al choque térmico, estrés oxidativo o exposición a luz ultravioleta, alteraciones de algunas actividades metabólicas, menor resistencia a los antibióticos, menor invasión y adhesión a células eucariotas, etc. (Johnstone y Farr, 1991; Monds *et al.*, 2010). El aumento en los niveles de Ap₄A afecta, entre otros, a chaperonas moleculares tales como DnaK, GroEL, y ClpB implicadas en las respuestas de estrés oxidativo y térmico (Bochner *et al.*, 1984; Johnstone y Farr, 1991; Fuge y Spencer, 1993). Un estudio más detallado en *E. coli* muestra que la chaperona molecular GroEL se une al Ap₄A utilizando centros de unión distintos a los ya descritos para la interacción con otros nucleótidos como el ADP/ATP (Tanner *et al.*, 2006). Por otra parte, se ha determinado que Ap₄A es capaz de inhibir *in vitro* la actividad 5'-nucleotidasa de la proteína DnaK en células de *E. coli* (Bochner *et al.*, 1986).

4. La bacteria modelo *P. putida* KT2440.

Las bacterias del género *Pseudomonas*, bacilos Gram-negativos pertenecientes a la clase de las γ proteobacterias, conforman un importante grupo de microorganismos ubicuos caracterizados por su amplia versatilidad metabólica (Clarke, 1982). Las bacterias pertenecientes a este género se distinguen por su gran adaptabilidad a diversos ambientes, de hecho han sido aisladas de suelos, aguas, alimentos, así como asociadas a distintas especies de animales y plantas. Asimismo, son de gran importancia desde el punto de vista ecológico al participar en los ciclos ambientales de los principales elementos y en la degradación de contaminantes biogénicos y de origen antropogénico (Timmis, 2002). Los bacterias del género *Pseudomonas* han sido ampliamente

estudiadas debido a su gran potencial biotecnológico en áreas como la biodegradación/biotransformación (Carmona *et al.*, 2009, Jiménez *et al.*, 2002), bioaumentación (Dejonghe *et al.*, 2001), biocatálisis (Schmid *et al.*, 2001), biocontrol (Walsh *et al.*, 2001) y producción de bioplásticos (Luengo *et al.*, 2003, Prieto *et al.*, 2007), entre otras. Entre las bacterias del género *Pseudomonas* de importancia biotecnológica y medioambiental destaca *P. putida*, un microorganismo no patógeno capaz de vivir en suelos, rizosfera y aguas dulces, que es un paradigma de versatilidad metabólica (Silby *et al.*, 2011; Wu *et al.*, 2011). La cepa *P. putida* KT2440 ha sido ampliamente caracterizada a nivel fisiológico, genético y bioquímico. Se trata de una bacteria aislada del suelo y certificada por el “*National Institutes of Health*” (NIH) de los Estados Unidos como segura para la clonación y expresión de genes heterólogos (Federal Register (1982)). Gracias a esta acreditación, *P. putida* KT2440 se ha convertido en un organismo modelo para estudios de biodegradación y biotransformación de compuestos aromáticos, resistencia a metales, expresión génica heteróloga e interacción con plantas (Martins dos Santos *et al.*, 2004, Scott *et al.*, 2013; Graf y Altenbuchner, 2014). *P. putida* KT2440 posee un genoma de 6,18 Mb en el cual, a pesar de presentar un 85% de similitud con el de la especie patógena *P. aeruginosa*, no están presentes factores de virulencia como la exotoxina A, ciertas enzimas hidrolíticas y los sistemas de secreción tipo III (Nelson *et al.*, 2002). Por el contrario, su genoma codifica información para un elevado número de enzimas relacionadas con la protección frente a sustancias tóxicas (dioxigenasas, monooxigenasas, óxido-reductasas, ferredoxinas, citocromos, deshidrogenasas, bombas de protones, glutatión transferasas, etc.), así como rutas para la degradación de compuestos aromáticos (Jiménez *et al.*, 2002). Su gran versatilidad metabólica está en consonancia con la identificación de al menos 350 sistemas de transporte en la membrana citoplasmática (un 12% de su secuencia genómica), muchos de ellos implicados en el transporte de compuestos aromáticos (Nelson *et al.*, 2002). Recientemente se han reconstruido *in silico* las redes metabólicas de esta cepa bacteriana a escala genómica (Nogales *et al.*, 2008, Puchalka *et al.*, 2008; van Duuren *et al.*, 2013). Estos modelos bioinformáticos, junto con el uso de abordajes de biología de sistemas (transcriptómica, proteómica, metabolómica, fluxómica, etc.), son herramientas muy útiles para el estudio de la fisiología y adaptabilidad a los distintos ambientes de *P. putida* KT2440, así como para la explotación del gran potencial de este microorganismo en numerosas aplicaciones biotecnológicas.

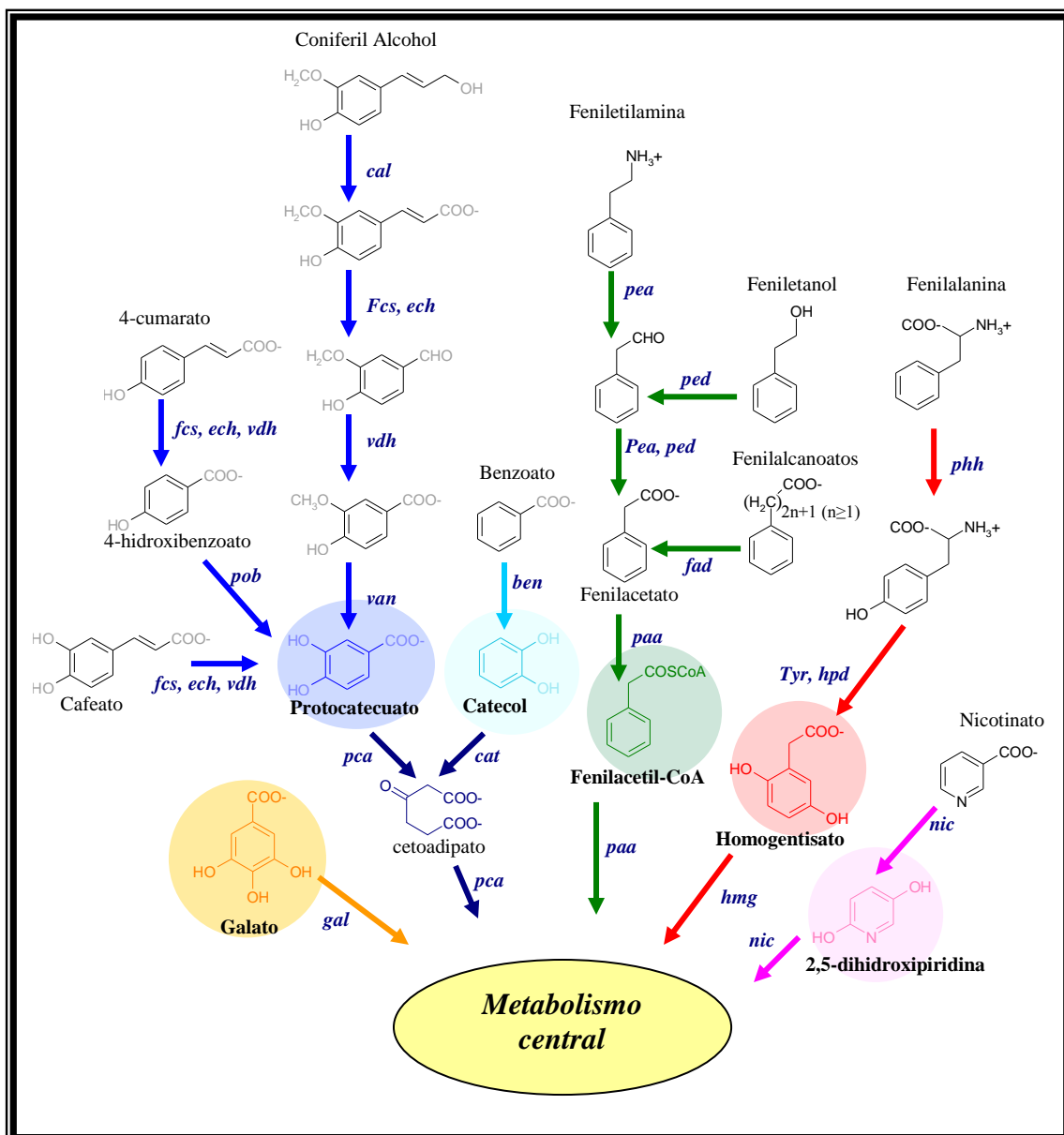


Figura 5. Rutas catabólicas de compuestos aromáticos y sus determinantes genéticos en *P. putida* KT2440. Las diferentes rutas periféricas (flechas de colores) que convergen en el mismo intermediario central (círculos) se indican con el mismo código de colores. Los nombres de los genes que codifican las rutas periféricas y centrales se indican igualmente.

Los estudios sobre las rutas de degradación de compuestos aromáticos en *P. putida* KT2440 han revelado la existencia de 5 diferentes rutas centrales, i.e., las ramas del protocatecuato y catecol de la ruta del β -cetoadipato, fenilacetato, homogentisato, nicotinato y galato, y numerosas rutas periféricas para la conversión de más de 15 compuestos aromáticos diferentes en los sustratos de las rutas centrales (Fig. 5) (Jiménez *et al.*, 2010). Mediante distintas tecnologías ómicas, como la transcriptómica y la proteómica, se han realizado estudios sobre cómo afecta el metabolismo de los

compuestos aromáticos a los distintos programas metabólico, morfológico y de estrés en *P. putida* KT2440 (Dominguez-Cuevas *et al.*, 2006; Kim *et al.* 2006).

Muchas de las rutas de degradación de compuestos aromáticos caracterizadas tienen gran interés biotecnológico ya que generan intermediarios de valor comercial, y/o son rutas a las que finalmente converge el catabolismo de compuestos aromáticos contaminantes (Jiménez *et al.*, 2002; Jiménez *et al.*, 2008; Nogales J., 2009). Las rutas de degradación de AFA (ruta aeróbica híbrida), 4HBA (ruta aeróbica clásica intradiólica) y galato (rutas aeróbica clásica extradiólica) son ejemplos de tres estrategias diferentes de metabolismo aeróbico que se detallan a continuación.

4.1 Ruta paa de degradación de AFA en *P. putida* KT2440.

La degradación de AFA sigue una ruta aeróbica híbrida que, como se ha indicado en el apartado 1.2.2, combina propiedades del catabolismo aeróbico y anaeróbico de compuestos aromáticos. La molécula de AFA es activada a través de la adición de CoA por una fenilacetato-CoA ligasa codificada por el gen *paaF* (Fig. 6). El fenilacetil-CoA formado sufre la oxigenación por una epoxidasa multicomponente, codificada por los genes *paaGHIJK*, para formar epoxifenilacetil-CoA, un compuesto no aromático. El epoxifenilacetil-CoA no es reoxidado a un compuesto aromático dihidroxilado, sino que sufre hidratación/isomerización y posterior ruptura no-oxigenolítica del anillo por el producto de los genes *paaB*, *paaN* y *paaE*, formando el producto hidroxidipil-CoA (Fig. 6) (Teufel *et al.*, 2010, 2012). Este compuesto es oxidado a β -ceto adipil-CoA y converge en la vía central del β -ceto adipato siendo convertido en succinil-CoA y acetil-CoA por los productos de los genes *paaAC* y *paaE*, respectivamente (Fig. 6) (Olivera *et al.*, 1998; Nogales *et al.*, 2007; Teufel *et al.*, 2010, 2012). La ruta aeróbica híbrida del AFA constituye un catabolón en el que converge la degradación de muchos otros compuestos estructuralmente relacionados, e.g. feniletilamina, feniletanol, estireno, tropato y *n*-fenilalcanoatos con un número par de carbonos (Fig. 5) (Luengo *et al.*, 2001).

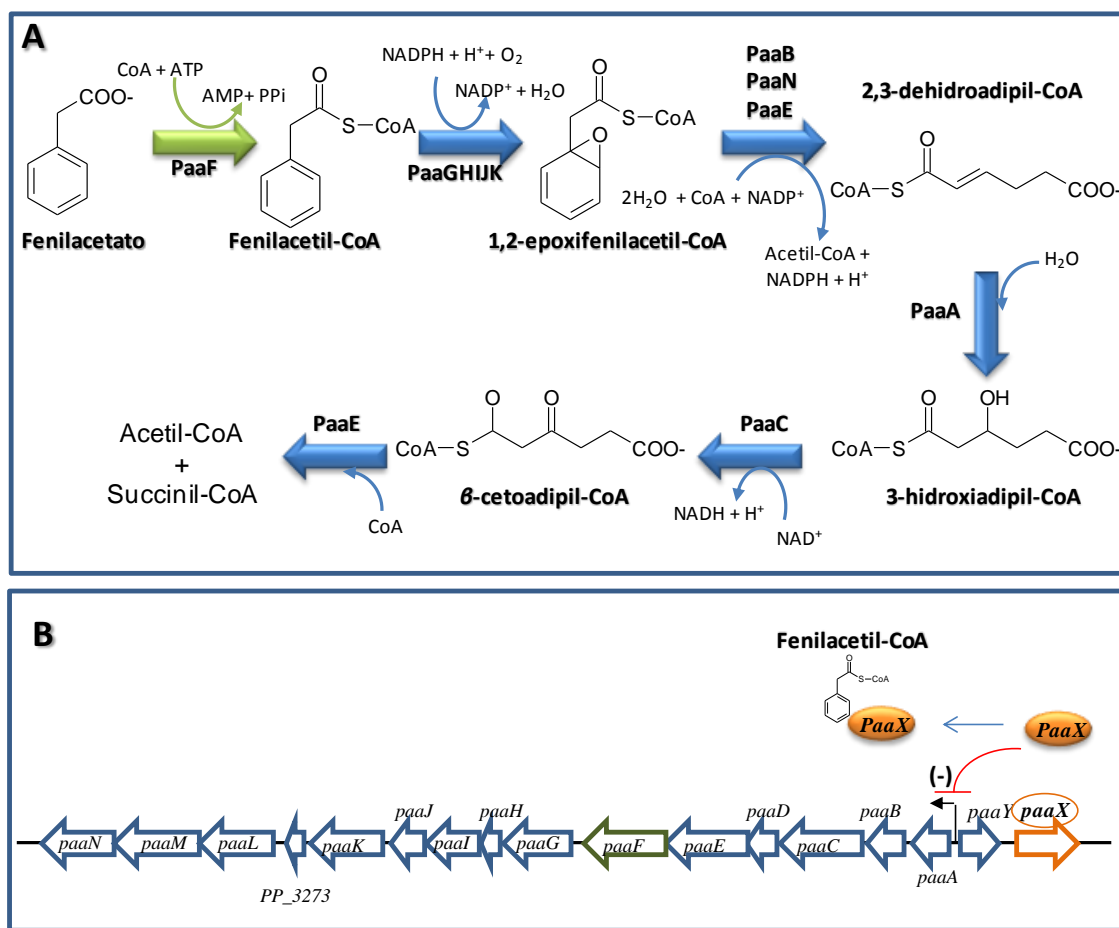


Figura 6. Ruta bioquímica, organización transcripcional y regulación específica de los genes *paa* involucrados en la degradación de AFA en *P. putida* KT2440. A, muestra la ruta bioquímica del AFA, la flecha verde representa la enzima fenilacetato-CoA ligasa (*PaaF*) que cataliza la ruta periférica con la formación del intermediario central fenilacetil-CoA. Las flechas azules representan las enzimas que catalizan la transformación del fenilacetil-CoA (ruta central) hasta intermediarios del ciclo TCA. B, representa la organización transcripcional de los genes *paa* en el genoma de *P. putida* KT2440. El gen regulador *paaX* (naranja) codifica el regulador transcripcional PaaX que reprime (-) la expresión de los genes catabólicos *paa*. La activación de la ruta por el inductor fenilacetil-CoA (estructura química) implica la interacción de este último con el represor PaaX que ya no se puede unir a los promotores catabólicos.

En *P. putida* la expresión de los genes catabólicos *paa* está controlada negativamente por el gen regulador *paaX*, el cual codifica un regulador transcripcional perteneciente a la familia de reguladores GntR. Por otra parte, se ha determinado que el fenilacetil-CoA es la verdadera molécula inductora de la ruta de degradación ya que evita que el regulador PaaX se una a su secuencia diana impidiendo la transcripción de los genes *paa* (Luengo *et al.*, 2001; del Peso-Santos *et al.*, 2006). Recientemente se ha descrito en *E. coli* que el gen *paaY* también participa en la regulación de los genes *paa*,

muy probablemente impidiendo la acumulación de antagonistas del represor PaaX (Fernández *et al.*, 2013). Se ha descrito que el cluster *paa* está sujeto a represión catabólica por glucosa en *P. putida* U (Olivera *et al.* 1998) y por el medio LB (Morales *et al.* 2004). El efecto represor de la glucosa sobre el metabolismo del AFA parece estar mediado por el intermediario KDPG (2-ceto-3-deoxi-6-fosfogluconato) del metabolismo de la glucosa en *P. putida* KT2440 (Kim *et al.*, 2009). La represión por LB no parece depender del regulador Crc (Morales *et al.* 2004). Además, se ha descrito el efecto represor del AFA sobre la expresión de los genes *sty* que convierten el estireno en AFA (O'Leary *et al.*, 2001, del Peso-Santos *et al.*, 2006).

4.2 Ruta *pca* de degradación de 4HBA en *P. putida* KT2440.

Distintos compuestos aromáticos, tales como el quinato (hidroaromático), 4HBA y los fenilpropenoides (cafeato, cumarato, coniferil-alcohol) son degradados a través de la ruta central del β -cetoadipato en *P. putida* KT2440 (Fig. 5). Los genes *pca* de la ruta del β -cetoadipato se encuentran distribuidos en el genoma de la cepa KT2440 en tres agrupamientos génicos, *pcaRKF*, *pcaBDC*, *pcaIJ* y *pcaHG* (Fig. 7). En el primer *cluster* catabólico se localiza el gen regulador *pcaR* y el gen *pcaK*, que codifica un transportador específico de 4HBA/protocatecuato de la superfamilia de transportadores MFS (Harwood *et al.*, 1994; Nichols y Harwood, 1997). La expresión de las unidades transcripcionales *pcaRKF**BDC* y *pcaIJ* es inducida por el intermediario β -cetoadipato y el activador transcripcional PcaR (perteneciente a la familia de reguladores transcripcionales IclR) (Romero-Steiner *et al.*, 1994; Harwood y Parales, 1996; Bertani *et al.*, 2001).

La ruta periférica que convierte 4HBA en protocatecuato está codificada por el *cluster* *pob* que contiene a los genes divergentes *pobA*, responsable de la enzima 4-hidroxibenzoato-3-monooxigenasa que genera protocatecuato, y *pobR*, codifica el activador transcripcional que, en presencia de 4HBA, controla la expresión del gen *pobA* (Fig. 7). (Bertani *et al.*, 2001; Jiménez *et al.*, 2002).

Como se ha indicado en el apartado 2.2, los genes *pca* sufren represión catabólica cuando *P. putida* se cultiva en presencia de 4HBA y benzoato. La base molecular de dicha represión catabólica es la inhibición, muy probablemente mediada por el regulador BenR, del gen transportador *pcaK* (Nichols y Harwood, 1995; Cowles

et al., 2000). Por otra parte, se ha descrito que algunos ácidos orgánicos, como el succinato, reprimen la expresión de los genes *pca* (Nichols y Harwood, 1995). Los genes *pob* y *pca* también se reprimen cuando *P. putida* se cultiva en medio LB con 4HBA y dicha regulación es dependiente de Crc (Morales *et al.* 2004). Recientemente se han predicho dianas de interacción con Crc en los genes *pobA* y *pcaK* (Hernández-Arranz *et al.*, 2013)

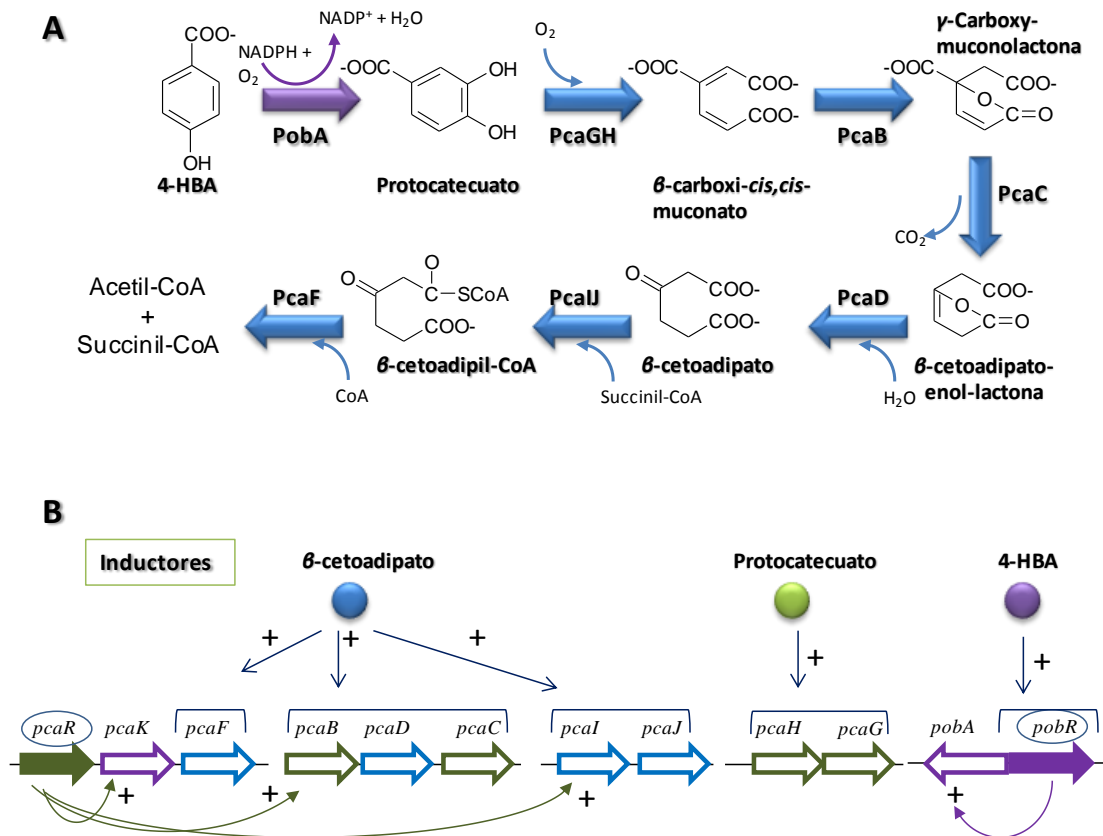


Figura 7. Ruta bioquímica, organización transcripcional y regulación específica de los genes *pob* y *pca* responsables de la degradación de 4HBA en *P. putida* KT2440. A, muestra la ruta bioquímica del 4HBA. La flecha morada representa la enzima 4-hidroxibenzoato-3-monooxigenasa (PobA) que cataliza la ruta periférica con la formación del intermediario central protocatecuato. Las flechas azules representan las enzimas que catalizan la ruta central del β -cetoadipato. B, representa la organización transcripcional de los genes *pca* responsables de la ruta central y de los genes *pob* implicados en la ruta periférica. Los genes reguladores *pcaR* y *pobR* que codifican los correspondientes activadores transcripcionales se indican con flechas rellenas. Los inductores se indican como círculos rellenos.

4.3 Ruta gal de degradación de galato en *P. putida* KT2440.

El cluster génico *gal* es responsable de la ruta de degradación aeróbica de galato en *P. putida* KTGAL, una cepa derivada de *P. putida* KT2440 y adaptada a la

utilización de galato como única fuente de carbono y energía (Fig. 8) (Nogales *et al.* 2011). Los genes *gal* se encuentran organizados en dos operones catabólicos, *galTAP* y *galBCD* y un operón regulador, *galR*, controlados por los promotores P_T , P_B y P_R , respectivamente (Fig. 6). Los promotores catabólicos P_T y P_B son inducibles en presencia del regulador GalR, un activador transcripcional de la familia LysR, siendo constitutiva la expresión a partir del promotor P_R . El oxalmesaconato (OMA) es el primer intermediario de la ruta y el metabolito inductor (Fig. 8) (Nogales, 2009).

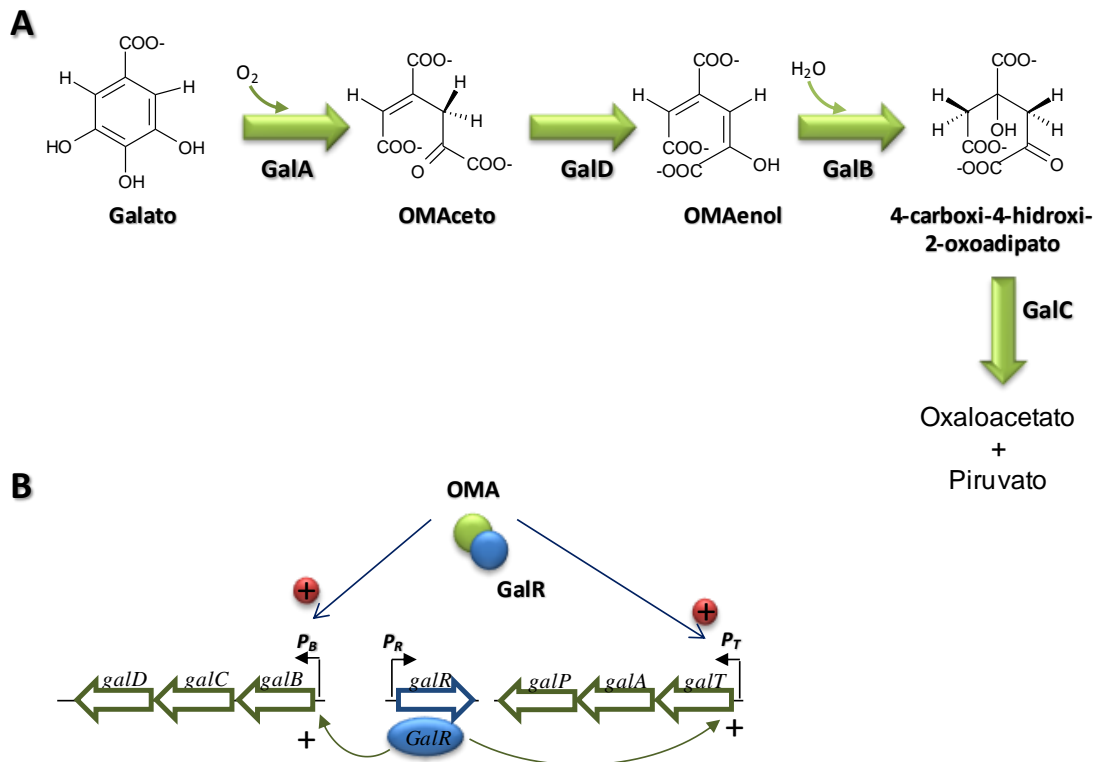


Figura 8. Bioquímica, organización transcripcional y regulación específica de los genes *gal* responsables de la degradación de galato en *P. putida* KTGAL. A, Ruta de degradación de ácido gálico. Las enzimas de la ruta son: GalA, galato dioxigenasa; GalD, oxalmesaconato (OMA) ceto-enol tautomerasa; GalB, OMA enol-hidratasa; GalC, 4-carboxi-4-hidroxi-2-oxoadipato aldolasa. B, Organización transcripcional de los genes *gal*. Los operones catabólicos *galBCD* y *galTAP* así como el gen regulador *galR* están controlados por los correspondientes promotores P_B , P_T y P_R . El oxalmesaconato (OMA), inductor, y el activador transcripcional (GalR) se indican con círculos verde y azul, respectivamente.

Además de esta regulación específica, estudios preliminares indican que existe una regulación sobreimpuesta de los genes *gal*. Así, cuando *P. putida* KTGAL se cultiva en presencia de galato y otra fuente de carbono adicional (e.g., acetato, AFA),

los promotores P_T y P_B reducen significativamente su actividad, sugiriendo la existencia de fenómenos de represión catabólica (Nogales, 2009).

III. OBJETIVOS

III. Objetivos:

De los antecedentes presentados en la Introducción se deduce que el control que ejercen algunos compuestos aromáticos sobre el catabolismo de otros aromáticos que utilizan rutas periféricas distintas es un tema poco estudiado en bacterias, y en ningún caso se ha abordado la posible regulación cruzada entre una ruta aeróbica híbrida, e.g., la ruta del AFA, y una ruta aeróbica clásica que involucra intermediarios catecólicos, siendo éste el primer objetivo temático de esta tesis. Por otro lado, el metabolismo de los compuestos aromáticos en bacterias supone cambios en los programas metabólico, morfológico y de estrés. Cómo se remodelan e integran estos programas celulares cuando se alteran los niveles de la alarmona Ap_4A en la célula y la compleja red de regulación asociada ha sido el segundo objetivo temático de esta tesis. Todos estos estudios se han realizado utilizando la bacteria *P. putida* KT2440 ya que este organismo se considera un modelo de versatilidad y robusteza metabólica, especialmente en lo que hace referencia a los compuestos aromáticos, y se dispone de amplios conocimientos de su fisiología, bioquímica, y genética, así como de un modelo metabólico a escala genómica (iJN1411) que es de gran utilidad a la hora de interpretar los resultados generados con tecnologías ómicas.

Así, los objetivos específicos de la tesis han sido:

- Estudiar la regulación cruzada entre la ruta aeróbica híbrida del AFA y las rutas aeróbicas clásicas del 4HBA y galato en *P. putida* KT2440.
- Estudiar los efectos fisiológicos asociados a la inactivación del gen *apaH*, el cual codifica la principal hidrolasa de la alarmona Ap_4A en bacterias, en *P. putida* KT2440 Δ *apaH*.
- Determinar las bases moleculares que determinan el remodelado de los programas morfológico, metabólico y de estrés en *P. putida* KT2440 Δ *apaH*.
- Caracterizar el sistema de señalización/regulación que responde a la inactivación del gen *apaH* en *P. putida* KT2440 Δ *apaH*.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

IV. Materiales y Métodos

1. Cepas bacterianas.

Las cepas de bacterias que se han utilizado en este trabajo se detallan a continuación en la Tabla 1 junto con sus genotipos y características más relevantes.

Tabla 1. Cepas bacterianas empleadas en este trabajo.

Cepa	Genotipo/fenotipo relevante	Referencia
<i>E. coli</i>		
DH10B	F ⁺ , <i>mcrA</i> Δ(<i>mrr hsdRMS-mcrBC</i>) φ80 <i>dlac</i> ΔM15 Δ <i>lacX74 deoR recA1 araD139</i> Δ(<i>ara-leu</i>)7697 <i>galU galK rpsL</i> (Sm ^r) <i>endA1 nupG</i>	Life Technologies
HB101	<i>supE44 ara14 galK2 leuB lacY1</i> Δ(<i>gpt-proA</i>)62 <i>rpsL20 xyl-5 mtl-1 recA13</i> Δ(<i>mcrC-mrr</i>) <i>hsdS20</i> (<i>r_B⁻ m_B⁻</i>) Sm ^r	(Sambrook y Russell, 2001)
S17-1λ <i>pir</i>	Tp ^r Sm ^r <i>recA thi hsdRM</i> ⁺ RP4::2-Tc::Mu::Km Tn7 λ <i>pir</i> lisogénico	(de Lorenzo y Timmis, 1994)
<i>Pseudomonas</i>		
<i>P. putida</i> KT2440	<i>P. putida</i> mt-2 curada del plásmido TOL	(Franklin <i>et al.</i> , 1981)
<i>P. putida</i> KTGAL	Cepa derivada de <i>P. putida</i> KT2440 adaptada al crecimiento en GA como fuente de carbono	(Nogales, 2009)
<i>P. putida</i> KTGAL-4	Cepa KTGAL mutante por inserción del mini-Tn5 en el gen PP_0988 (<i>gvp-1</i>), Km ^r , Gm ^r	Este trabajo
<i>P. putida</i> KTGAL-6	Cepa KTGAL mutante por inserción mini-Tn5 en el gen PP_2434, Km ^r , Gm ^r	Este trabajo
<i>P. putida</i> KTGAL-8	Cepa KTGAL mutante por inserción mini-Tn5 en el gen PP_3816, Km ^r , Gm ^r	Este trabajo
<i>P. putida</i> KTGAL-14	Cepa KTGAL mutante por inserción mini-Tn5 en el gen PP_0400 (<i>apaG</i>), Km ^r , Gm ^r	Este trabajo
<i>P. putida</i> KTGAL <i>dapaH</i>	Cepa KTGAL mutante de interrupción del gen <i>apaH</i> , Km ^r	Este trabajo
<i>P. putida</i> KT2440Δ <i>apaH</i>	Cepa KT2440 mutante por delección completa del gen <i>apaH</i>	Este trabajo
<i>P. putida</i> KT2440 <i>dapaH</i> pIZ <i>apaH</i>	Cepa KT2440 <i>dapaH</i> complementada con el plásmido pIZ <i>apaH</i> , Km ^r , Gm ^r	Este trabajo
<i>P. putida</i> KT2440 <i>dpaaF</i>	Cepa KT2440 mutante por inserción mini-Tn5 en el gen PP_3279, Km ^r	Colección PRCC (Duque <i>et al.</i> , 2007)
<i>P. putida</i> KT2440Δ <i>apaH</i> <i>dpaaX</i>	Cepa KT2440Δ <i>apaH</i> mutante por inserción del gen <i>paaX</i> , Km ^r	Este trabajo
<i>P. putida</i> KT2440Δ <i>apaH</i> <i>dgacA</i>	Cepa KT2440Δ <i>apaH</i> mutante por inserción del gen <i>gacA</i> , Km ^r	Este trabajo
<i>P. putida</i> KT2440pIZ <i>pcaK</i>	Cepa KT2440 complementada con el plásmido pIZ <i>pcaK</i> , Km ^r , Gm ^r	Este trabajo

2. Plásmidos.

Los plásmidos empleados en este trabajo y sus características más relevantes se muestran a continuación en la Tabla 2.

Tabla 2. Plásmidos empleados en este trabajo.

Plásmido	Descripción	Referencia
pKR600	Vector helper para las conjugaciones tri-parentales. <i>oriColE1</i> RK2-Mob ⁺ RK2-Tra ⁺ ; Cm ^r	(de Lorenzo y Timmis, 1994)
pBBR1MCS-5	Vector de clonación de amplio espectro de huésped, Gm ^r <i>ori</i> pBBR1MCS, Mob ⁺ , <i>lacZa</i>	(Kovach <i>et al.</i> , 1995)
pIZ1016	Vector de clonación de amplio espectro de huésped, Gm ^r <i>ori</i> pBBR1MCS Mob ⁺ , <i>lacZa Ptac/lacI^f</i>	(Moreno-Ruiz <i>et al.</i> , 2003)
pIZP _B	Vector pIZ1016 que contiene la fusión traduccional P _B :: <i>lacZ</i> . Gm ^r	(Nogales, 2009)
pIZP _T	Vector pIZ1016 que contiene la fusión traduccional P _T :: <i>lacZ</i> . Gm ^r	(Nogales, 2009)
pGEM-T easy	Vector de clonación de productos de PCR, Ap ^r , <i>oriColE1</i> , <i>lacZa</i>	(Promega)
pUT-miniTn5 Km2	Vector suicida que contiene un mini-Tn5 para la generación de mutantes por transposición. Ap ^r ; Km ^r	(de Lorenzo <i>et al.</i> , 1990)
pUC19-Km4	Vector pUC19 que contiene fragmento cromosómico del gen PP_0988 con inserción del mini-Tn5, Ap ^r , Km ^r	Este trabajo
pUC19-Km6	Vector pUC19 que contiene fragmento cromosómico del gen PP_2434 con inserción del mini-Tn5, Ap ^r , Km ^r	Este trabajo
pUC19-Km8	Vector pUC19 que contiene fragmento cromosómico del gen PP_3816 con inserción del mini-Tn5, Ap ^r , Km ^r	Este trabajo
pUC19-Km14	Vector pUC19 que contiene fragmento cromosómico del gen PP_0400 con inserción del mini-Tn5, Ap ^r , Km ^r	Este trabajo
pUC19	Vector de clonación. Ap ^r ; <i>lacZa</i>	(Yanisch-Perron, <i>et al.</i> , 1985)
pIZapaH	Vector pIZ1016 que contiene el gen <i>apaH</i> como un fragmento de 867 pb <i>HindIII/XbaI</i> bajo el control de promotor <i>Ptac</i> , Gm ^r	Este trabajo
pIZpcaK	Vector pIZ1016 que contiene el gen <i>pcaK</i> como un fragmento de 1347 pb <i>HindIII/XbaI</i> bajo el control de promotor <i>Ptac</i> . Gm ^r	Este trabajo
pK18mob	Km ^r , <i>oriColE1</i> , Mob ⁺ , <i>lacZa</i> , vector suicida para la construcción de mutantes por inserción mediante recombinación homóloga	(Schäfer <i>et al.</i> , 1994)
pK18mobapaH	Derivado de pK18mob que incluye un fragmento <i>HindIII/EcoRI</i> de 479 pb (fragmento interno del gen <i>apaH</i>) Km ^r	Este trabajo
pK18mobgacA	Derivado de pK18mob que incluye un fragmento <i>HindIII/EcoRI</i> de 415 pb (fragmento interno del gen <i>gacA</i>) Km ^r	Este trabajo
pK18mobpaaX	Derivado de pK18mob que incluye un fragmento <i>HindIII/EcoRI</i> de 460 pb (fragmento interno del gen regulador <i>paaX</i>) Km ^r	Este trabajo
pK18mobsacB	Derivado de pK18mob que contiene el gen <i>sacB</i> . Utilizado para la construcción de mutantes por delección mediante doble recombinación homóloga.	(Schäfer <i>et al.</i> , 1994)
pK18mobsacBapaH	Derivado de pK18mobsacB que contiene un fragmento <i>XbaI/HindIII</i> de 1660 pb de dos regiones flanqueantes al gen <i>apaH</i>	Este trabajo

3. Medios y condiciones de cultivo.

3.1 Medios de Cultivo empleados para *E. coli* y *Pseudomonas putida*.

El medio rico utilizado para cultivar las células de *E. coli* y *Pseudomonas* fue el medio Luria-Bertani (LB) (Sambrook y Russell, 2001). Los cultivos en medio sólido se realizaron con medio LB suplementado con Bacto Agar (Pronadisa) al 1.5% (p/v). Cuando fue necesario, se añadió 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosido (X-Gal) a una concentración de 1 a 0.01 mM. Los medios mínimos empleados para cultivar las cepas de *Pseudomonas* fueron el medio M63 (Miller, 1972) y el medio MC

(Barragan *et al.*, 2004). El medio mínimo M63 fue suplementado con vitaminas y elementos traza a las concentraciones recomendadas previamente (Bauchop y Elsdén, 1960; Gerhardt *et al.*, 1994) y su pH fue ajustado a 6.7.

El medio MC se basa en un medio basal, MA (pH 7,5), cuya composición se detalla a continuación:

KH ₂ PO ₄	0.33 g
Na ₂ HPO ₄	1.2 g
NH ₄ Cl	0.11 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.1 g
CaCl ₂	0.04 g
H ₂ O destilada	Hasta 1 l

El medio MA fue completado con la adición de una solución de elementos traza (pH 6.5), cuya composición (1000x) se detalla a continuación:

Ácido nitrilotriacético (NTA)	1.5 g	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0.18 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	3.0 g	CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.01 g
MnSO ₄ ·2H ₂ O	0.5 g	KAl(SO ₄) ₂ ·12H ₂ O	0.02 g
NaCl	1.0 g	H ₃ BO ₃	0.01 g
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.1 g	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.01 g
CoSO ₄ ·7H ₂ O	0.18 g	NiCl ₂ ·6H ₂ O	0.025 g
NaSeO ₃ ·5H ₂ O	0.3 g	H ₂ O destilada	Hasta 1 l

Y con una solución de vitaminas cuya composición (1000x) es la siguiente:

Biotina	20 mg	Ácido fólico	20 mg
Piridoxina-HCl	10 mg	Tiamina.HCl·2H ₂ O	50 mg
Riboflavina	50 mg	Ácido nicotínico	50 mg
D-Pantotenato cálcico	50 mg	Vitamina B12	50 mg
Ácido <i>p</i> -aminobenzoico	50 mg	H ₂ O destilada	Hasta 1 l

El medio MA completado con elementos trazas y vitaminas para el crecimiento de *P. putida* KTGAL fue denominado medio MC. Al medio MC y al M63, se le incorporaron las diferentes fuentes de carbono requeridas en cada experimento. Las soluciones concentradas de las diferentes fuentes de carbono fueron esterilizadas por filtración y añadidas al medio de cultivo de forma aséptica. El fenilacetato (AFA), se preparó a una concentración 1 M disolviéndose en isopropanol. El 4-hidroxibenzoato

(4-HBA), benzoato (BA), catecol y protocatecuato se prepararon a una concentración de 1 M y se disolvieron en agua. El galato (GA) se añadió directamente al medio de cultivo. El citrato, succinato, acetato, piruvato, glucosa y casaminoácidos se utilizaron a una concentración del 0.2% (p/v).

Cuando las células fueron cultivadas en GA el medio de cultivo fue suplementado con L-cisteína 2 mM, y el pH ajustado a 6.5 para evitar la oxidación de este compuesto.

Las células de *E. coli* y *Pseudomonas* se incubaron a 37°C y 30°C, respectivamente, en un agitador orbital a 250 rpm. El crecimiento en medio líquido fue seguido por turbidimetría a 600nm (A_{600}) empleando un espectrofotómetro Beckman DU-520. Algunos crecimientos fueron seguidos utilizando microplacas y la turbidez fue seguida a 603nm (A_{603}). Y las UFC/ml fueron determinadas mediante diluciones seriadas y sembradas en placas de LB-agar o el medio mínimo correspondiente.

Para la determinación de sideróforos el medio de cultivo utilizado para *P. putida* KT2440 fue el medio mínimo M9 (Sambrook *et al.*, 1989) que se suplementa con hierro a nivel de elementos trazas, para garantizar su crecimiento y la producción de sideróforos por escasez de hierro.

3.2 Antibióticos.

Los antibióticos se prepararon en soluciones (1000x) en agua, a excepción del cloranfenicol, que se preparó en etanol al 100%. Las soluciones preparadas se esterilizaron por filtración y se conservaron a -20°C. Los antibióticos se utilizaron a las concentraciones finales que se indican a continuación:

- Ampicilina (Amp) 100 µg/ml
- Cloranfenicol (Cm) 34 µg/ml
- Kanamicina (Km) 50 µg/ml
- Gentamicina (Gm) 10 µg/ml

3.3 Conservación de las cepas bacterianas.

Durante cortos periodos de tiempo (inferiores a un mes) las cepas de *E. coli* y *Pseudomonas putida* se conservaron a 4°C en placas de LB o medio mínimo. Para su

conservación a largo plazo, las bacterias se congelaron en el medio de cultivo correspondiente con glicerol al 15% (v/v) y se mantuvieron a -80°C .

4. Técnicas de manipulación del DNA.

La manipulación del DNA así como la mayor parte de las técnicas de biología molecular utilizadas en este trabajo fueron aplicadas esencialmente tal y como describen Sambrook y Russell, 2001. Las endonucleasas de restricción fueron suministradas por New England Biolabs. La enzima DNA ligasa T4 fue proporcionada por USB (Amersham). La DNA polimerasa I y la *Pfu* polimerasa fueron suministradas por Biotools B. M. Labs. Todas las enzimas se utilizaron siguiendo las indicaciones técnicas de las respectivas casas comerciales.

4.1 Purificación de DNA.

Los fragmentos de DNA se purificaron empleando geles de agarosa, mediante el kit GeneClean (BIO 101) siguiendo las indicaciones del fabricante.

4.2 Aislamiento de DNA.

La extracción y purificación de DNA plasmídico se realizó mediante el uso del sistema High Pure Plasmid Purification Kit (Roche), de acuerdo con el protocolo del fabricante. El DNA cromosómico se extrajo empleando el procedimiento descrito por Wilson (1997).

4.3 Reacción de amplificación en cadena con DNA polimerasa termorresistente (PCR).

La amplificación del DNA se realizó en un equipo *Mastercycler Gradient* de Eppendorf. Las enzimas que se emplearon fueron la DNA polimerasa I y la polimerasa *Pfu*, ambas proporcionadas por Biotools B. M. Labs. Las mezclas de reacción contenían MgCl_2 1.5 mM, oligonucleótidos 0.5 μM y dNTPs 0.25 mM. Los productos amplificados se purificaron con el sistema *High Pure PCR Product Purification Kit* (Roche). Los oligonucleótidos fueron proporcionados por Sigma-Genosys.

Los distintos oligonucleótidos empleados en las reacciones de PCR se indican en la Tabla 3, en la que se detalla la secuencia y ubicación de cada uno de ellos, así como las dianas de restricción correspondientes en cada caso.

Tabla 3. Oligonucleótidos empleados en este trabajo.

Nombre	Secuencia (5'-3')/(Diana de restricción)	Descripción
F24	CGCCAGGGTTTCCCAGTCACGAC	Empleado para analizar las interrupciones génicas generadas mediante el plásmido pK18 <i>mob</i>
R24	AGCGGATAACAATTTACACAGGA	Empleado para analizar las interrupciones génicas generadas mediante el plásmido pK18 <i>mob</i> .
3' <i>ApaH</i> _Ext	GCTTGAATTCGCTCATGGG	Amplificación del gen <i>apaH</i> (910 pb), chequeo de mutantes.
5' <i>ApaH</i> _Ext	GAGCGCTGCACTGATGGCCACC	Amplificación del gen <i>apaH</i> (910 pb), chequeo de mutantes.
3' <i>ApaH</i> int	GGCCTTAAGATGATCTTCACGTGGCGTG (<i>EcoRI</i>)	Amplificación y clonación de un fragmento interno del gen <i>apaH</i> (479 pb), para generar el plásmido pK18 <i>mobapaH</i>
5' <i>ApaH</i> int	CCC <u>AAGCTT</u> CATGACCTGCACCTGCTGG (<i>HindIII</i>)	Amplificación y clonación de un fragmento interno del gen <i>apaH</i> (479 pb), para generar el plásmido pK18 <i>mobapaH</i>
F- <i>fliAq</i> (RpoF)	AACGCCAGCGGCTTCAAGA	Extremo 5' de un fragmento interno de 98 pb del gen <i>fliA</i> para ensayos de RT-PCR
R- <i>fliAq</i> (RpoF)	TGGTAGGCGATGCGCTTGAC	Extremo 3' de un fragmento interno de 98 pb del gen <i>fliA</i> para ensayos de RT-PCR
F- <i>apaH</i> _HindIII	CCC <u>AAGCTT</u> TGACCTAAGGAGGTAAT AATGCCACCTACGCCGTCGG (<i>HindIII</i>)	Extremo 5' del gen <i>apaH</i> (867pb) para generar el plásmido p <i>ZapaH</i>
R- <i>apaH</i> _XbaI	GCTCTAGATCAGGTGTGGTCGTTGAGTG TAGTGG (<i>XbaI</i>)	Extremo 3' del gen <i>apaH</i> (867pb) para generar el plásmido p <i>ZapaH</i>
F- <i>paaGq</i>	AAACCGGAGTCAAGCGCATCA	Extremo 5' de un fragmento interno de 118 pb del gen <i>paaA</i> para ensayos de RT-PCR
R- <i>paaGq</i>	TAGGCCTCGGGCATCCAGTT	Extremo 3' de un fragmento interno de 118 pb del gen <i>paaA</i> para ensayos de RT-PCR
F- <i>pcaHq</i>	AATCGAACTGCTGCCGAAAC	Extremo 5' de un fragmento interno de 160 pb del gen <i>pcaH</i> para ensayos de RT-PCR
R- <i>pcaHq</i>	GTGGCCGATCAGCAGAATGTG	Extremo 3' de un fragmento interno de 160 pb del gen <i>pcaH</i> para ensayos de RT-PCR
F- <i>pcaKq</i>	CTGCTGTGCTTCTGATCGTCT	Extremo 5' de un fragmento interno de 131 pb del gen <i>pcaK</i> para ensayos de RT-PCR
R- <i>pcaKq</i>	ATCAACGCGGCACTCATGAC	Extremo 3' de un fragmento interno de 131 pb del gen <i>pcaK</i> para ensayos de RT-PCR
F- <i>pobAq</i>	CGTCTGGATCTCAAAGCCCTGA	Extremo 5' de un fragmento interno de 113 pb del gen <i>pobA</i> para ensayos de RT-PCR
R- <i>pobAq</i>	TAAATGATCGGCGCACCCTG	Extremo 3' de un fragmento interno de 113 pb del gen <i>pobA</i> para ensayos de RT-PCR
F- <i>paaX</i>	CACAGGTATAGTCGGTGCTTATCC	Amplificación del gen <i>paaX</i> (902pb), chequeo de mutantes.
R- <i>paaX</i>	CTGTTCCAGCGCTGCATTC	Amplificación del gen <i>paaX</i> (902pb), chequeo de mutantes.
5'- <i>paaXint</i>	CCC <u>AAGCTT</u> CGACGCAGTTATTACAGCC TGAC (<i>HindIII</i>)	Amplificación y clonación de un fragmento interno del gen <i>paaX</i> (460pb) para generar el plásmido pK18 <i>mobpaaX</i>
3'- <i>paaXint</i>	CG <u>GAAATTC</u> CAATCTTGGGCATCCAGCA A (<i>EcoRI</i>)	Amplificación y clonación de un fragmento interno del gen <i>paaX</i> (460pb) para generar el plásmido pK18 <i>mobpaaX</i>
F- <i>pobRq</i>	GTTGTTCAAGCTGTATGGCGAG	Extremo 5' de un fragmento interno de 109 pb del gen <i>pobR</i> para ensayos de RT-PCR
R- <i>pobRq</i>	GTGCGGCTTGATCTCCCAG	Extremo 3' de un fragmento interno de 109 pb del gen <i>pobR</i> para ensayos de RT-PCR
F- <i>rpoSq</i>	GTGCCGGAGTTGACATCG	Extremo 5' de un fragmento interno de 105 pb del gen <i>rpoS</i> para ensayos de RT-PCR
R- <i>rpoSq</i>	CGTCCGAACCGAAGATACAG	Extremo 3' de un fragmento interno de 105 pb del gen <i>rpoS</i> para ensayos de RT-PCR
F- <i>rpoN</i> HK	AAAATGGGCCAGCAACTGAC	Extremo 5' de un fragmento interno de 131 pb del gen <i>rpoN</i> (RNA polimerasa (Factor sigma 54)), utilizado como control interno en ensayos de RT-PCR
R- <i>rpoN</i> HK	TCCTGACGTTGAGCATCG	Extremo 3' de un fragmento interno de 131 pb del gen <i>rpoN</i> (RNA polimerasa (Factor sigma 54)), utilizado como control interno en ensayos de RT-PCR
F- <i>rpoHq</i>	AAGCCTATGTGCACACGGTCA	Extremo 5' de un fragmento interno de 144 pb del gen <i>rpoH</i> para ensayos de RT-PCR
R- <i>rpoHq</i>	CGATATGTACGACGAAACGCAG	Extremo 3' de un fragmento interno de 144 pb del gen <i>rpoH</i> para ensayos de RT-PCR
F- <i>rpoDq</i>	ATGTCCGAAAAGCGCAACA	Extremo 5' de un fragmento interno de 92 pb del gen <i>rpoD</i> para ensayos de RT-PCR
R- <i>rpoDq</i>	TCGTTGACCTCCGCGTAAGTC	Extremo 3' de un fragmento interno de 92 pb del gen <i>rpoD</i> para ensayos de RT-PCR

F-pcaK_HindIII	CCCAAGCTTTGACCTAAGGAGGTAAAT AATGAACCAAGCGCAAACCAACG (HindIII)	Extremo 5' del gen <i>pcaK</i> para generar el plásmido pIZ <i>pcaK</i> (1347 pb)
R-pcaK_XbaI	GCTCTAGATCAGGTTGCGTCGGCGTGG (XbaI)	Extremo 3' del gen <i>pcaK</i> para generar el plásmido pIZ <i>pcaK</i> (1347 pb)
F-Z1apaH_XbaI	GCTCTAGAGAAAAGTGGATTCGGCAATC GTC (XbaI)	Amplificación de un fragmento anterior al gen <i>apaH</i> (838pb) para generar el plásmido pK18 <i>obsacBapaH</i>
R-Z1apaH_BamHI	CGGGATCCATCAGTGCAGCGCTCCGG (BamHI)	Amplificación de un fragmento anterior al gen <i>apaH</i> (838pb) para generar el plásmido pK18 <i>obsacBapaH</i>
F-Z3apaH_BamHI	CGGGATCCCTGAAGGAAGTAGTACCCA TGAGCG (BamHI)	Amplificación de un fragmento posterior al gen <i>apaH</i> (822pb) para generar el plásmido pK18 <i>obsacBapaH</i>
R-Z3apaH_HindIII	CCCAAGCTTGATGCGCGACAGCCTGGA G (HindIII)	Amplificación de un fragmento anterior al gen <i>apaH</i> (822pb) para generar el plásmido pK18 <i>obsacBapaH</i>
F-rsmAq	GTGCGCCGAGAGCCTGATC	Extremo 5' de un fragmento interno de 87 pb del gen <i>rsmA</i> para ensayos de RT-PCR
R-rsmAq	CTCACGCCAATACGCACCTG	Extremo 3' de un fragmento interno de 87 pb del gen <i>rsmA</i> para ensayos de RT-PCR
F-rsmEq	GTCACCATTTCTGGGCGTC	Extremo 5' de un fragmento interno de 131 pb del gen <i>rsmE</i> para ensayos de RT-PCR
R-rsmEq	TCTTCGTGTTTCTCCGGAG	Extremo 3' de un fragmento interno de 131 pb del gen <i>rsmE</i> para ensayos de RT-PCR
F-rsmLq	CCGGATCATGGTGGTAGAG	Extremo 5' de un fragmento interno de 88 pb del gen <i>rsmL</i> para ensayos de RT-PCR
R-rsmLq	AACTTCGGCTCGATGCAC	Extremo 3' de un fragmento interno de 88 pb del gen <i>rsmL</i> para ensayos de RT-PCR
F-rsmXq	GGACAAGGATTTTCGGATTGC	Extremo 5' de un fragmento interno de 134 pb del gen <i>rsmX</i> para ensayos de RT-PCR
R-rsmXq	CTATTCCTATAGCCCGGCGAG	Extremo 3' de un fragmento interno de 134 pb del gen <i>rsmX</i> para ensayos de RT-PCR
F-rsmYq	CAGGAAGCGCAAAGGACAGATC	Extremo 5' de un fragmento interno de 86 pb del gen <i>rsmY</i> para ensayos de RT-PCR
R-rsmYq	CTGTTTCCCTGTGACATCCGTATC	Extremo 3' de un fragmento interno de 86 pb del gen <i>rsmY</i> para ensayos de RT-PCR
F-rsmZq	ACATGCACAGGCTTTCAGGATG	Extremo 5' de un fragmento interno de 90 pb del gen <i>rsmZ</i> para ensayos de RT-PCR
R-rsmZq	TTTCCGTAGTCCCTGCTTGTC	Extremo 3' de un fragmento interno de 90 pb del gen <i>rsmZ</i> para ensayos de RT-PCR
F-CRCq	AAGCCCAGAATGCCGACGTC	Extremo 5' de un fragmento interno de 108 pb del gen <i>crc</i> para ensayos de RT-PCR
R-CRCq	CGTCGGCATAAAGGAAATAG	Extremo 3' de un fragmento interno de 108 pb del gen <i>crc</i> para ensayos de RT-PCR
F-crcYq	AAAGCAGGTCAGCGTCAAA	Extremo 5' de un fragmento interno de 78 pb del gen <i>crcY</i> para ensayos de RT-PCR Moreno <i>et al.</i> , 2012
R-crcYq	TCGGCTTGCTCTGGTGTG	Extremo 3' de un fragmento interno de 78 pb del gen <i>crcY</i> para ensayos de RT-PCR Moreno <i>et al.</i> , 2012
F-crcZq	ACAACCAGGCAGAGAACAACAA	Extremo 5' de un fragmento interno de 73 pb del gen <i>crcX</i> para ensayos de RT-PCR Moreno <i>et al.</i> , 2012
R-crcZq	CACGTTGATCTGTGATCCAA	Extremo 3' de un fragmento interno de 73 pb del gen <i>crcX</i> para ensayos de RT-PCR Moreno <i>et al.</i> , 2012
F-psrAq	TGAACGCATTCTCGACGCTG	Extremo 5' de un fragmento interno de 143 pb del gen <i>psrA</i> para ensayos de RT-PCR
R-psrAq	CCTGGATCAGCGCCTTCTTG	Extremo 3' de un fragmento interno de 143 pb del gen <i>psrA</i> para ensayos de RT-PCR
F-fumC2q	AGCATTGCGTGCGGGTATC	Extremo 5' de un fragmento interno de 185 pb del gen <i>fumC2</i> para ensayos de RT-PCR
R-fumC2q	GGTCAGGTACTIONCAACGCCAATG	Extremo 3' de un fragmento interno de 185 pb del gen <i>fumC2</i> para ensayos de RT-PCR
F-GacA	CCAAGCCCCGGCAAATAGT	Amplificación de zona anterior a gen <i>gacA</i> (930pb), chequeo de mutantes.
R-GacA	CGGTCCTGCGGAAATAGCTG	Amplificación de zona posterior a gen <i>gacA</i> (930pb), chequeo de mutantes.
F-gacAint	CGGAATTCAGGTGGTGGGTGAGGGAG AT (<i>EcoRI</i>)	Amplificación y clonación de un fragmento interno del gen <i>gacA</i> (414pb) para generar el plásmido pK18 <i>mobgacA</i>
R-gacAint	CCCAAGCTTCACTTTCTGGCAGCCGACG (HindIII)	Amplificación y clonación de un fragmento interno del gen <i>gacA</i> (414pb) para generar el plásmido pK18 <i>mobgacA</i>

4.4 Secuenciación de DNA.

La secuenciación de DNA se llevó a cabo utilizando el secuenciador automático modelo *ABI Prism 37 automated DNA sequencer* (Applied Biosystems Inc), en el

Servicio de Secuenciación Automática de DNA gestionado por la empresa Secugen S. L. en el Centro de Investigaciones Biológicas. Para la reacción de secuenciación se utilizó el *Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit* de Applied Biosystems, y la DNA polimerasa AmpliTaq FS, siguiendo las recomendaciones del proveedor. Las reacciones de amplificación se llevaron a cabo mediante la técnica de PCR con un termociclador *Gene Amp PCR System 2400* de Perkin-Elmer.

4.5 Extracción de RNA

La extracción de RNA para los ensayos de RT-PCR y RT-PCR en tiempo real fue realizada desde cultivos de *Pseudomonas putida* creciendo en medio mínimo M63 en las distintas fuentes de carbono hasta alcanzar la mitad de la fase exponencial de crecimiento. Las células fueron lavadas, resuspendidas en tampón TE (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA), e incubadas con lisozima (50 mg/ml; Sigma). A continuación, se aisló el RNA total del cultivo mediante el *RNeasy Mini Kit* (Qiagen), siguiendo las indicaciones del proveedor.

4.6 Ensayos de Retrotranscripción-PCR (RT-PCR) y RT-PCR en tiempo real

El RNA total purificado se trató con *DNase and Removal treatment kit* (Ambion), siguiendo las especificaciones del fabricante para eliminar el DNA contaminante. El DNA complementario (cDNA) se obtuvo mediante una reacción de retrotranscripción mediada por la transcriptasa reversa SuperScript II (Invitrogen). Cada reacción de retrotranscripción (20 µl) contenía 1 µg de RNA, 200 U de transcriptasa reversa, ditioneitol (DTT) 10 mM, dNTPs 0.5 mM y 5 mM de pd(N)₆ *random hexamer 5' phosphate* (Amersham Biosciences). Los hexámeros se emplearon como cebadores para poder utilizar las mismas alícuotas de cDNA como molde para reacciones de PCR en las que se emplean diversos pares de oligonucleótidos. El RNA y los hexámeros se incubaron a 65 °C durante 5 minutos para la hibridación, y tras enfriar en hielo se añadieron los restantes componentes de la reacción, que se incubó a 42 °C durante 2 horas. La reacción finalizó con una incubación de 15 minutos a 70 °C. Se empleó 1 µl de cDNA así obtenido como molde para la PCR posterior. El cDNA se amplificó utilizando los oligonucleótidos requeridos en cada caso a una concentración final de 0.5 µM, y 1 U de DNA polimerasa I (Biotools). En cada una de las reacciones de PCR se incluyó un control con 1 µl de la reacción de RT en la que no se empleó la transcriptasa reversa. Con este control se comprobó que no existía ninguna banda de amplificación

indicativa de que la preparación de RNA contuviera DNA contaminante. El volumen total de la reacción de PCR fue de 50 μ l y 30 fueron los ciclos de amplificación.

Cuando se llevaron a cabo los experimentos de PCR en tiempo real, el cDNA fue purificado usando el *Gene Clean Turbo kit* (MP Biomedicals) y la concentración del cDNA se midió usando un ND100 Spectrophotometer (Nanodrop Technologies). Para la PCR a tiempo real, se utilizó un termociclador LightCycler 480 II (Roche). El volumen de cada reacción fue de 25 μ l, que contenían 10 μ l de cDNA diluido (5ng en cada reacción), 0.2 μ M de los oligonucleótidos 5' y 3' y 12.5 μ l de Light Cyler 480 SyBR Green I Master Mix (Roche). Las parejas de oligonucleótidos utilizadas para amplificar los mRNAs de los sRNAs y los genes analizados en esta tesis se encuentran detalladas en la Tabla 3.

El gen *rpoN*, que codifica para la RNA polimerasa (Factor sigma 54, σ^{54}), cuya expresión se ha demostrado permanece constante a lo largo de la curva de crecimiento (Cases *et al.*, 1996; Yuste *et al.*, 2006), fue utilizado como control interno en las reacciones de PCR a tiempo real, empleando la pareja de oligonucleótidos 5' *rpoN* / 3' *rpoN* HK (Tabla 3). Las amplificaciones por PCR se llevaron a cabo de la siguiente forma: 1 ciclo inicial de desnaturalización (95°C, 4 minutos), seguido de 40 ciclos de amplificación (desnaturalización, 95°C, 1 minuto; hibridación, 60°C, 1 minuto; elongación y medida de la señal, 72°C, 30 segundos). Para la cuantificación relativa de los valores de fluorescencia obtenidos, se realizó una curva de calibrado con las mismas parejas de oligonucleótidos y con diluciones seriadas de DNA genómico de *Pseudomonas putida* KT2440. De esta misma manera, para la cuantificación absoluta de los valores de fluorescencia obtenidos, se amplificó cada gen a analizar desde el DNA genómico de la cepa KT2440, el producto de PCR fue purificado y cuantificado en cada caso, posteriormente se realizó una curva estandar con diluciones seriadas del gen específico en donde se interpolaron los valores de fluorescencia de cada cDNA amplificado y se calculó la expresión absoluta de cada gen en ng/ μ l.

5. Procedimientos de transferencia génica

5.1 Transformación y electroporación.

Las células de *E. coli* y *P. putida* fueron modificadas genéticamente por transformación tras hacerlas competentes mediante el método de RbCl (Sambrook y

Russell, 2001), o bien mediante electroporación (Wirth *et al.*, 1989). Esta técnica también se utilizó con las cepas de *Pseudomonas* empleando un equipo Gene Pulser/Pulse Controller (Bio-Rad) utilizando las siguientes condiciones: 2.5 kV, 25 μ F, 200 Ω .

5.2 Transferencia de plásmidos por conjugación

Los plásmidos se movilizaron a *P. putida* y sus derivados por conjugación biparental utilizando las cepas *E. coli* S17-1 λ pir como donadora, siguiendo el protocolo establecido por de Lorenzo y Timmis (1994) con algunas modificaciones. Se utilizó una cantidad de células de la cepa donadora correspondiente a una A_{600} de 5; y de la cepa receptora (*P. putida*) cultivada en medio mínimo M63 con citrato 0.3% se empleó una cantidad de células correspondiente a una A_{600} de 0.35. Los exconjugantes fueron seleccionados aeróbicamente en placas de medio mínimo M63 con citrato 0.3% (contraselección de la cepa donadora) y el correspondiente antibiótico cuyo gen de resistencia se encuentra en el plásmido y, en su caso, el de la cepa receptora (cuando se emplearon derivados de *P. putida*). Este protocolo de conjugación se empleó tanto para la transferencia de plásmidos replicativos como de plásmidos suicidas.

6. Construcción de cepas mutantes en *Pseudomonas putida*.

6.1 Construcción de mutantes de inserción por recombinación homóloga.

Para la construcción de las cepas mutantes, *P. putida* KTGALdapaH, *P. putida* KT2440 Δ apaHd λ paaX y *P. putida* KT2440 Δ apaHdgacA, se procedió a la interrupción insercional de los genes *apaH*, *paaX* y *gacA* respectivamente, por recombinación homóloga (Fig. 9). Para la interrupción insercional de los genes *apaH*, *paaX* y *gacA*, se amplificaron fragmentos internos de los mismos (479 pb, 460 pb y 414 pb, respectivamente), utilizando las parejas de oligonucleótidos F-*apaHint*/R-*apaHint*, F-*paaXint*/R-*paaXint* y F-*gacAint*/R-*gacAint* (Tabla 3), respectivamente, y se clonaron en las dianas de restricción *EcoRI/HindIII* (*apaH*, *paaX* y *gacA*), del *polylinker* del plásmido pK18mob, (plásmido suicida que no replican en *P. putida*).

Las construcciones resultantes pK18mobapaH, pK18mobpaaX y pK18mobgacA (Tabla 2) fueron transferidas a la cepas donadora, *E. coli* S17-1 λ pir (para derivados del vector pK18mob), a la cepa receptora *Pseudomonas putida*, mediante conjugación biparental tal y como se indica en el apartado 5.2 de esta sección. Los transconjugantes derivados de los plásmidos suicidas pK18mobapaH, pK18mobpaaX y pK18mobgacA

fueron seleccionados en medio mínimo M63 suplementado con kanamicina, y con citrato a 0.3% como fuente de carbono para la contraselección de la cepa donadora. Los mutantes *P. putida* *KTGALdapaH*, *P. putida* *KT2440ΔapaHdpaax* y *P. putida* *KT2440ΔapaHdgacA* fueron analizados por PCR para confirmar la interrupción de los respectivos genes truncados.

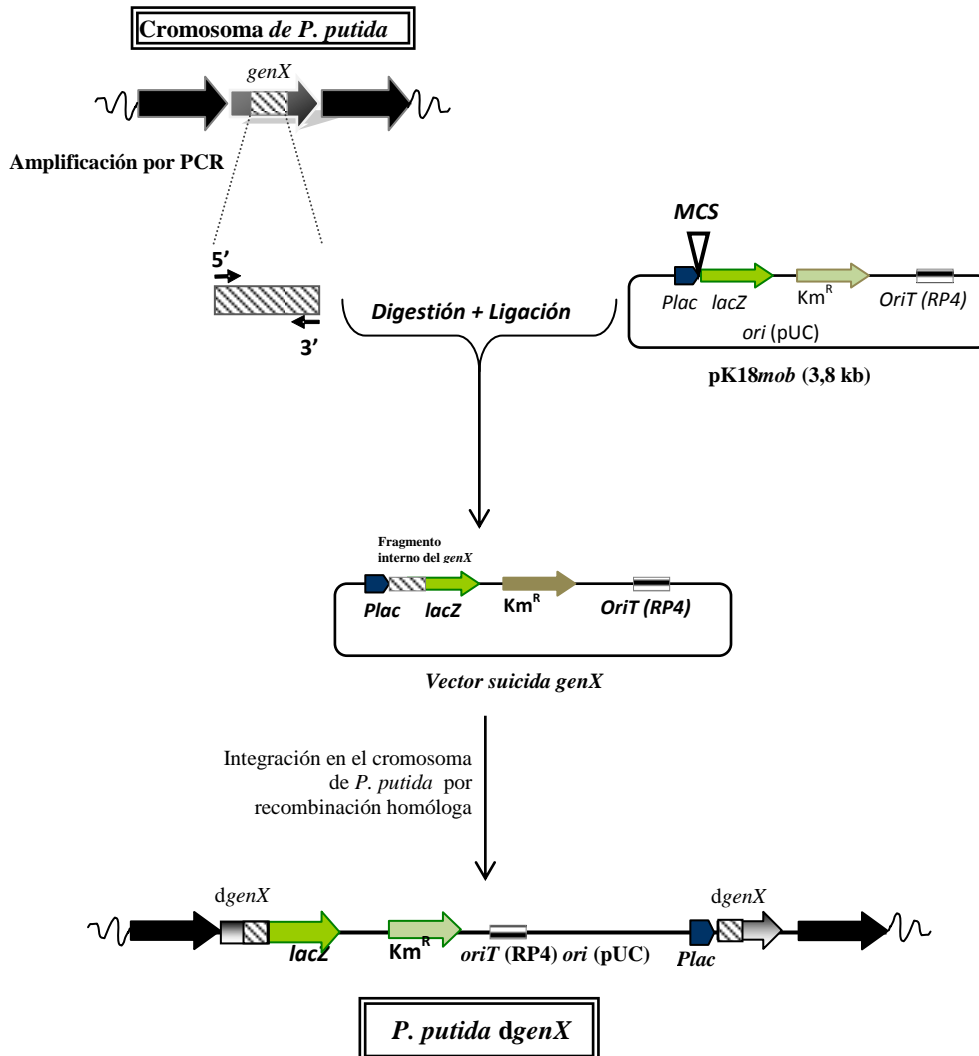


Figura 9. Estrategia seguida para la construcción de los mutantes de inserción por recombinación homóloga en *P. putida* *KT2440* y *KTGAL*. En la parte superior de la figura se esquematiza el cromosoma de *P. putida*, incluyendo al gen que va a ser interrumpido (*genX*) (representado en gris). Las flechas negras representan las parejas de oligonucleótidos utilizados para la amplificación por PCR del fragmento interno del *genX*. Los plásmidos suicidas que contienen el fragmento interno del *genX* son transferidos a *P. putida* mediante conjugación triparental tal y como se indica en el apartado 5.2 de esta sección. La recombinación homóloga subsiguiente origina la interrupción de los genes correspondientes y la cepa mutante *P. putida* *dgenX*. Se representan el origen de replicación (*ori*), *Km^R* representa el gene que codifica la resistencia a kanamicina, contenido en el vector suicida utilizado en este trabajo *pK18mob*. *MCS* (*Multiple Cloning Site* del vector suicida); *d*, indica gen interrumpido, *Plac*, promotor *lac*, *lacZa*, fragmento que codifica la subunidad α de la β -galactosidasa.

6.2 Construcción de mutantes por deleción en *P. putida* KT2440.

Para la construcción del mutante *P. putida* KT2440 Δ *apaH* que contienen el gen *apaH* delecionado, se utilizó la estrategia que se esquematiza en la Figura 10.

Para generar el mutante *P. putida* KT2440 Δ *apaH*, se clonó una región de DNA en posición 5' al gen *apaH* (fragmento de 838 pb), utilizando los oligonucleótidos F-Z1*apaH*_XbaI (XbaI) y R-Z1*apaH*_BamHI (BamHI) (Tabla 3), y otra región en posición 3' al gen *apaH* (fragmento de 822 pb), utilizando los oligonucleótidos F-Z3*apaH*_BamHI (BamHI) y R-Z3*apaH*_HindIII (HindIII) (Tabla 3), dando lugar al plásmido pK18*mobsacBapaH* (Tabla 2).

La construcción resultante pK18*mobsacBapaH* fue transferida de la cepa donadora *E. coli* S17-1 λ *pir* (Tabla 1), a la cepa receptora *P. putida* KT2440, mediante conjugación biparental tal y como se indica en el apartado 5.2 de esta sección. La integración en el genoma de la cepa receptora del derivado del plásmido suicida pK18*mobsacB*, fue seleccionado en medio M63 suplementado con kanamicina, y con citrato 0.3% como fuente de carbono para la contra-selección de la cepa donadora. Las colonias así obtenidas mediante recombinación homóloga simple que integra los plásmidos suicidas en del cromosoma de *P. putida* KT2440, fueron posteriormente cultivadas en medio líquido LB+Km, y seleccionadas en placas de medio M63 con citrato 0.3% y sacarosa 5%. Los exconjugantes que crecieron en sacarosa se replicaron en placas de medio M63 con citrato 0.3% y sacarosa 5%. Aquellos que fueron sensibles a los correspondientes antibióticos de los plásmidos suicidas y que eran resistentes a sacarosa eran mutantes de deleción mediante doble recombinación homóloga. Los mutantes obtenidos de esta manera, fueron analizados por PCR para confirmar la deleción en el gen *apaH*.

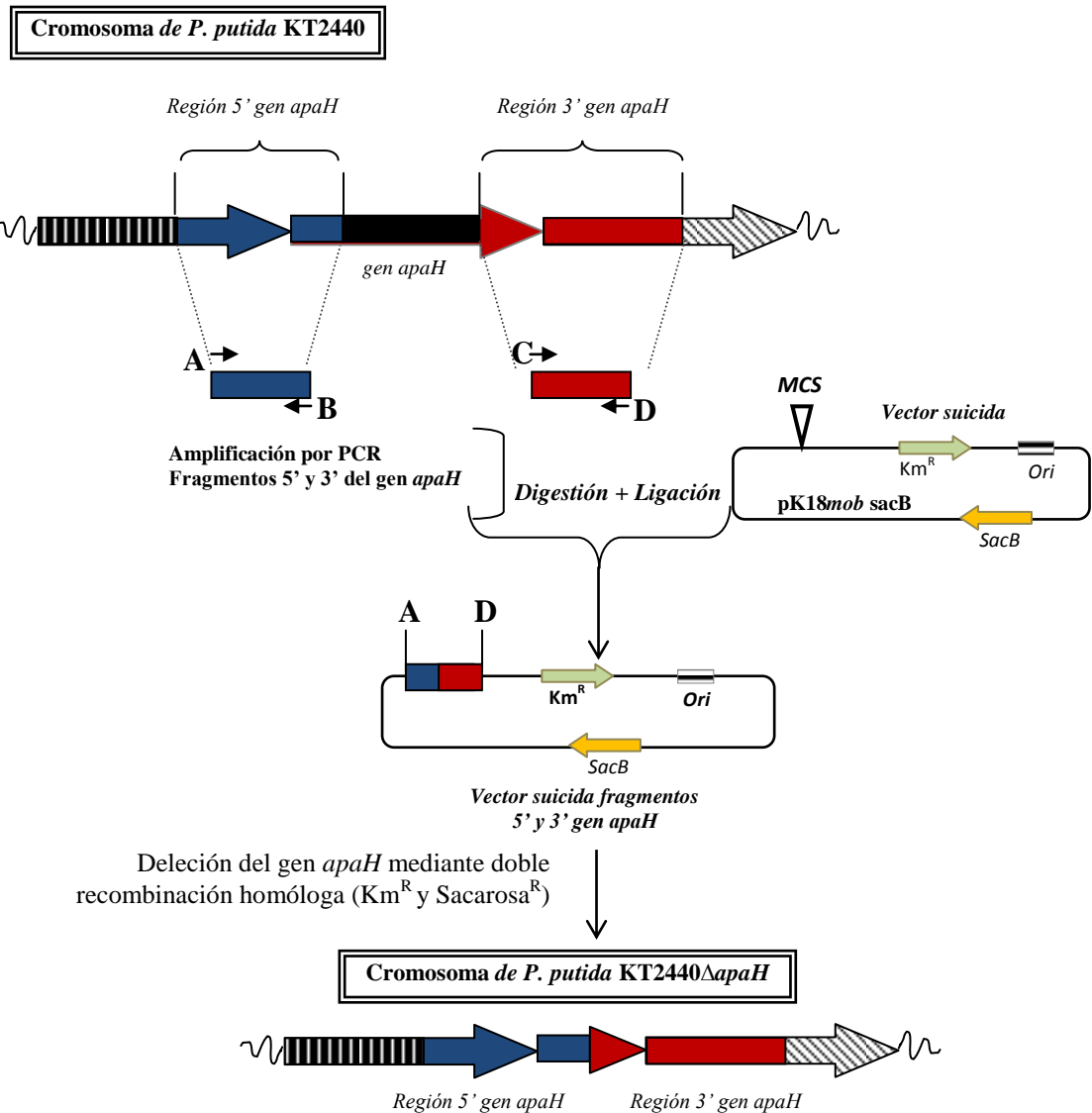


Figura 10. Estrategia seguida para la construcción de mutantes de delección en *P. putida* KT2440. En la parte superior de la figura se representa el cromosoma de *P. putida* KT2440. Se toma como ejemplo para mutar el *gen apaH* (Negro). En azul y en rojo se representan las regiones localizadas en posición 5' y 3', respectivamente, al *gen apaH* que se quiere deleccionar. Tras amplificar por PCR dichas regiones con las parejas de oligonucleótidos A/B y C/D, se clonan en el vector suicida (pK18mob sacB). Tras dos sucesos de recombinación homóloga, se seleccionan los exconjugantes resistentes (R) a sacarosa y sensibles (S) al antibiótico correspondiente del plásmido suicida utilizado (Km) y son analizadas por PCR para confirmar que la cepa mutante (*P. putida* KT2440 Δ *gen apaH*) porta una delección del *gen apaH* en su cromosoma. Las abreviaturas usadas en esta figura son: MCS, *Multi Cloning Site*; Km^R, gene que codifica la resistencia a kanamicina.; *ori*, origen de replicación del vector suicida; *sacB*, gen que codifica la sacarosa.

7. Ensayos de actividad enzimática.

7.1. Obtención de los extractos proteicos.

Para la obtención de extractos crudos de *P. putida* KT2440 y sus cepas derivadas, las células se cultivaron en medio mínimo con la fuente de carbono apropiada en cada caso hasta alcanzar la fase exponencial media de crecimiento según cada fuente de carbono. Los cultivos se concentraron 20 veces, tras centrifugar y resuspender en el tampón apropiado, y se lisaron empleando la prensa de French (Aminco Corp.) operada a una presión de 20000 psi. Las células rotas se centrifugaron a 4°C en un rotor SS34 (Sorvall) a 11.000 x g durante 15 min, recogiendo el sobrenadante (extracto crudo). Para la determinación de la proteína en los extractos se utilizó el reactivo de Bradford (Bradford, 1976).

7.2 Ensayo de actividad protocatecuato 3,4-dioxigenasa.

Los ensayos de actividad protocatecuato 3,4-dioxigenasa se llevaron a cabo de forma rutinaria espectrofotométricamente valorando la cinética de desaparición de protocatecuato como se muestra en la Figura 11 (Stainer y Ingraham, 1954). El ensayo enzimático se realizó en tampón Tris-HCl 100 mM pH 7.0. Se utilizaron 790 µl del mismo a los que se añadió 40 µl de un extracto proteico (10-13 µg de proteína), utilizándose esta mezcla para realizar el blanco. El ensayo se inició con la adición de 8 µl de protocatecuato 20 mM (disuelto en isopropanol) y se monitorizó la desaparición de absorbancia a 290 nm (ϵ_{290} 3.800 M⁻¹ cm⁻¹). La Unidad de actividad fue expresada como nanomoles de protocatecuato oxidados por minuto por miligramos de proteína.

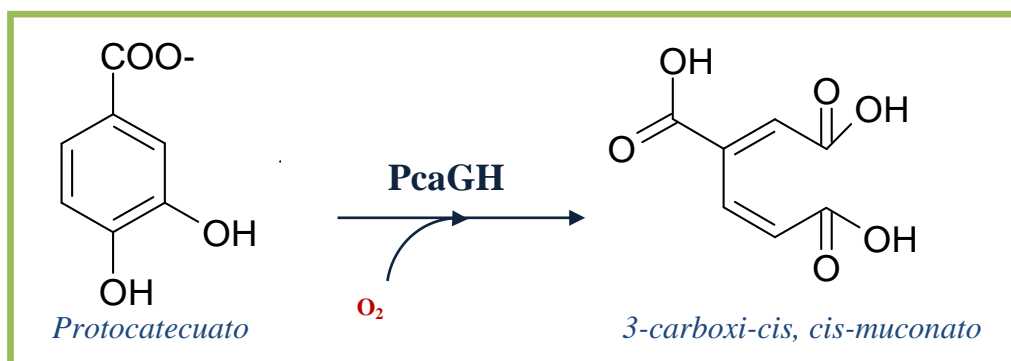


Figura 11. Reacción catalizada por protocatecuato 3,4-dioxigenasa.

7.3 Ensayo de actividad 4-hidroxibenzoato-3-monooxigenasa.

La actividad 4-hidroxibenzoato-3-monooxigenasa (intradiol dioxigenasa, Poba) (figura 12), fue determinada valorando espectrofotométricamente la oxidación de NADPH, detectada como la disminución de absorbancia a 340 nm (Entsch, 1990). El ensayo enzimático se realizó en tampón Tris-HCl 100 mM pH 7.0. La mezcla de reacción contenía 4-HBA (0.2 mM, disuelto en agua), NADPH (0.23 mM), FAD (3.3 μ M), EDTA (0.33 mM) y el tampón Tris-HCL pH 7.0. Se utilizaron 750 μ l de esta mezcla del mismo a los que se añadió 40 μ l de un extracto proteico (10-13 μ g proteína) y se monitorizó la desaparición de absorbancia a 340 nm (ϵ_{340} 6.220 $M^{-1} cm^{-1}$). La Unidad de actividad se definió como nanomoles de NADPH reducidos por minuto por miligramos de proteína (U/mg prot).

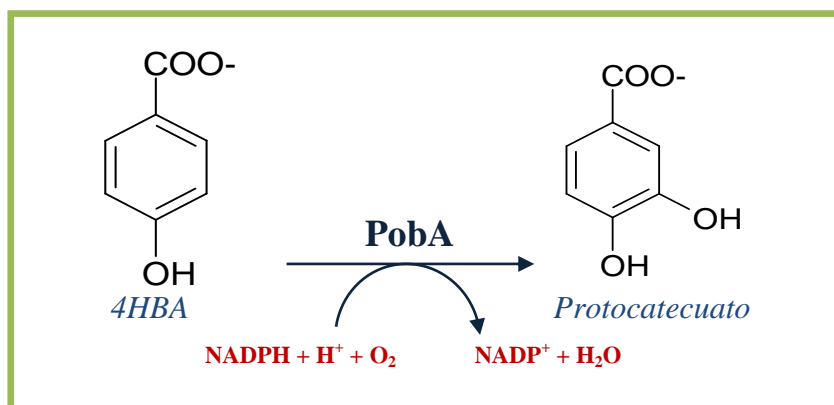


Figura 12. Reacción catalizada por 4-hidroxibenzoato-3-monooxigenasa.

7.4 Ensayo de actividad fumarasa

La actividad fumarasa total en extractos crudos de las cepas KT2440 y KT2440 Δ *apaH* se ensayó midiendo la formación de fumarato espectrofotométricamente a 250 nm en 10 mM de tampón HEPES-KOH (pH 8.0) ($\epsilon_{250} = 1.479 \times 10^3 M^{-1} cm^{-1}$), conteniendo 50 mM de L-malato a 30°C. La cantidad de extracto protéico añadido varió desde 5 a 20 μ g dependiendo del ensayo y la reacción se iniciaba con la adición de L-malato. Dado que la actividad fumarasa dependiente de la enzima FumA es inhibida por incubación del extracto en presencia de persulfato amónico (Ueda *et al*, 1991), la actividad fumarasa dependiente de las enzimas FumC se determinó tras incubar los

extractos protéicos en 1 mM de persulfato amónico durante 30 minutos. La actividad fumarasa dependiente de la enzima FumA se calculó posteriormente sustrayendo la actividad fumarasa en presencia de persulfato amónico de la actividad fumarasa total (Ueda *et al.*, 1991).

7.5 Ensayo de actividad β -galactosidasa.

Se ensayó la actividad β -galactosidasa en *P. putida* KTGAL que contiene las fusiones traduccionales $P_B::lacZ$ o $P_T::lacZ$ en los plásmidos pIZP_B y pIZP_T, respectivamente. Los cultivos fueron recogidos cuando alcanzaron una A_{600nm} de 0.5. La actividad β -galactosidasa se analizó permeabilizando las células, y las unidades de actividad enzimática (Unidades Miller) se determinaron según el método descrito por Miller (1972).

8. Mutagénesis insercional con el mini-transposón Tn5.

La mutagénesis al azar de *P. putida* se realizó utilizando el sistema del mini-transposón Tn5 para mutaciones insercionales (de Lorenzo *et al.*, 1990). La integración del mini-transposón Tn5 en el genoma de *P. putida* KTGAL se realizó mediante conjugación bi-parental entre la cepa donadora *E. coli* S17-1 λ pir conteniendo el plásmido suicida pUT-miniTn5 Km2, y *P. putida* KTGAL (pIZpT, plásmido resistente a Gm) como cepa receptora. Los transconjugantes se seleccionaron en placas de medio mínimo MC con GA (2.5 mM) más AFA (2.5 mM) como fuente de carbono conteniendo Km/Gm y X-GAL. La cepa receptora tenía el plásmido pIZP_T resistente a Gm, con lo cual, las que crecían en medio conteniendo GA/AFA y Km/Gm sólo podían ser *Pseudomonas putida* KTGAL en las que se les había insertado el mini-Tn5 en el genoma de la célula receptora. Las placas también tenían X-GAL para poder seleccionar directamente las que habían perdido la represión catabólica (colonia azul).

La localización de la inserción del mini-Tn5 se identificó en algunos mutantes. Para ello, se digirió el genoma de dichos mutantes con la enzima de restricción *EcoRI* o *BamHI* y se seleccionó en *E. coli* el fragmento que confería resistencia a Km y, por tanto, contenía al gen interrumpido por el mini-Tn5, mediante su clonación en el vector pUC19 digerido también con *EcoRI* o *BamHI*. Los plásmidos pUC19-Km (Tabla 2) conteniendo el fragmento de cromosoma que confiere resistencia a Km fueron secuenciados con los oligonucleótidos F24 y R24 (Tabla 3) para determinar el gen interrumpido.

9. Formación de biofilmes en placas de multipocillo.

Para la formación de biofilm se usaron placas multipocillo de poliestireno de 96 pocillos con fondo plano (*Costar 3595; Corning Incorporated*). La cuantificación del biofilm se llevó a cabo usando un protocolo modificado del descrito previamente por O'Toole y Kolter (1998). Primero, los cultivos de *Pseudomonas putida* cepa KT2440 y cepa KT2440 Δ *apaH* se incubaron en medio LB toda la noche (A_{600} de 3.5). Posteriormente, las células se refrescaron en medio LB diluyéndolas 5 veces, se incubaron alrededor de 2 horas con agitación a 30 °C y cuando alcanzaron una A_{600} de 0.7-0.8 se colectaron y diluyeron 10 y 100 veces en medio LB. A continuación, se inocularon las placas con 200 μ l por pocillo (1×10^7 UFC/ml en el caso de la dilución 1/10) y por triplicado, y se incubaron durante 6 horas a 30 °C para ambas cepas empleadas. El crecimiento bacteriano se determinó midiendo la A_{595} utilizando un lector de placas (*Microplate Absorbance Reader 2020; Anthos Labtec Instruments GmbH*). Se retiró el cultivo planctónico y se añadió 200 μ l de PBS, posteriormente, se procesó el biofilm tiñendo cada pocillo con 50 μ l de una solución de cristal violeta al 1% (CV; *Sigma*) y se incubó 15 minutos a temperatura ambiente. Después, se lavó cada pocillo 3 veces con 200 μ l de agua destilada y se dejó secar al aire. La formación de biofilm teñido con CV se cuantificó solubilizando éste con 200 μ l de etanol al 96% y midiendo la A_{595} .

10. Análítica de 4HBA, AFA y protocatecuato.

La concentración de AFA, 4HBA y protocatecuato se determinó utilizando la técnica de Cromatografía Líquida de Alta Eficacia (HPLC). Se cuantificaron empleando estándares comerciales (*Sigma*). En la Figura 13 se ilustra el espectro de absorción de 4-HBA, AFA y protocatecuato. Se utilizó un equipo *Gilson* con detector de Diodo Array *Beckman Coulter* modelo *System Gold 168*. Se empleó una columna *Mediterranea Sea* RP-C18 de 5 micras de espesor de fase, 150 mm de largo y 4.6 mm de diámetro (*Teknokroma*). Para analizar estos compuestos se utilizó como fase móvil una mezcla que contiene 40% metanol, 60% de agua y 0.1% de ácido trifluoroacético, la elución se realizó de forma isocrática a un flujo constante de 1 ml/min y la detección se realizó a 210 nm. Las muestras fueron colectadas (1ml) a lo largo de toda la curva de crecimiento de *P. putida* KT2440 creciendo en medio mínimo con 4HBA 2.5 mM o AFA 2.5 mM o la mezcla de ambos 4HBA 2.5 mM/ AFA 2.5 mM como fuentes de carbono. Cada

muestra fue centrifugada a 5000 rpm y los sobrenadantes fueron almacenados a -20 °C para su inyección posterior en el HPLC (20 ul). Los tiempos de retención fueron determinados utilizando los estándares correspondientes y el cálculo de la concentración de cada uno de los compuestos en las muestras fue calculada en base a la interpolación del área bajo la curva obtenida de cada pico en una curva patrón de cada estándar.

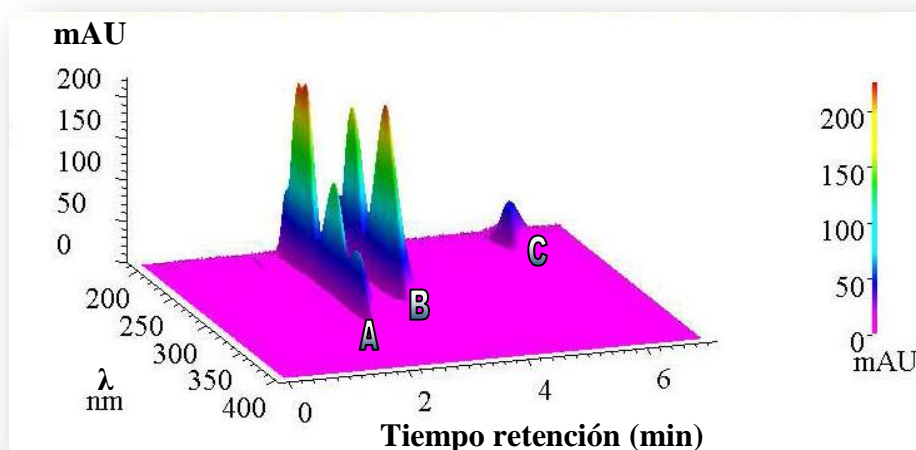


Figura 13. Espectros de absorción UV de estándares 4HBA, AFA y PCA. Espectros UV de PCA (A), 4HBA (B) y AFA (C). Los tiempos de retención de cada compuesto fueron: $tr_{PCA}=2.5$ min; $tr_{4HBA}=3.4$ min y $tr_{AFA}= 6.2$ min.

11. Medida del consumo de oxígeno en *P. putida* KT2440 y *P. putida* KT2440 Δ *apaH*.

Para la determinación del consumo de oxígeno se crecieron ambas cepas en medio mínimo M63 con AFA 2.5 mM como única fuente de carbono. Se recolectó por centrifugación a (5000 rpm por 2 min) 5 ml de cultivo en fase exponencial temprana ($A_{600}= 0.1$), 1 ml de cultivo en fase exponencial media ($A_{600}= 0.3$) y exponencial tardía ($A_{600}= 0.6$) de cada una de las cepas y se realizó la cuantificación del consumo de oxígeno en nmoles/min relativo a las UFC/ml que hay en cada punto de la curva analizado (1ml). En cada caso la células se resuspendieron en medio mínimo fresco con AFA (2.5 mM) y oxigenado a 30 °C.

El consumo de Oxígeno se midió en un electrodo de oxígeno de tipo “Clark” (*HansaTech Instruments*) como el que se observa en la figura 14. La cámara del

electrodo se rellenó con un volumen de 1 ml de medio mínimo M63 de respiración con AFA (2.5 mM) como fuente de carbono. El medio de respiración se preparaba fresco cada día y se mantenía a 30 °C con agitación constante para mantener una concentración de Oxígeno saturante disponible para las células a analizar. Cuando se analizó el efecto del desacoplante carbonilcianuro-*p*-trifluorometoxi-hidrazona (FCCP) sobre el consumo de oxígeno de la cepa mutante *apaH*, se adicionó 10 µl de FCCP (1 mM) a tres tiempos. El consumo de oxígeno se determinó calculando la pendiente de la recta señalada en un papel milimetrado (registro de consumo de Oxígeno en cm/min), se utilizó como referencia el Oxígeno disuelto a 30 °C (2.6 nmoles/mm).



Figura 14. Electrodo de oxígeno tipo Clark (Hansatech) empleado en los experimentos de respiración. La figura muestra el electrodo de Clark. El sensor (disco del electrodo) está localizado en la parte inferior de una cámara de reacción termostatzada por agua circulante. Un pequeño imán que agita la mezcla de reacción, rota directamente sobre el electrodo de platino cubierto con una membrana. La cámara de reacción se cierra con un émbolo que se puede ajustar a cualquier volumen entre 0.2 y 2.5 ml. Con una microjeringa se pueden añadir o eliminar soluciones desde la mezcla de reacción sin producir perturbaciones en el trazo del registrador.

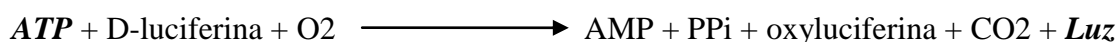
12. Medida del consumo de ATP

Para la determinación de ATP se crecieron ambas cepas (KT2440 y KT2440Δ*apaH*) en medio mínimo M63 con AFA 2.5 mM como única fuente de carbono. Se recolectó cultivo en fase exponencial temprana ($A_{600} = 0.1$), 1 ml de cultivo en fase exponencial media ($A_{600} = 0.3$) y exponencial tardía ($A_{600} = 0.6$) de cada una de las cepas. Los niveles de ATP fueron determinados utilizando el kit comercial *ATP Biomass kit HS* (BioTherma), este es un ensayo bioluminiscente para la determinación

cuantitativa de pequeñas cantidades de ATP (hasta 10×10^{-18} mol ATP), como se presenta en la reacción más abajo. Se cuantificó la intensidad de luz que es proporcional a la cantidad de ATP utilizando un luminómetro modelo TD-20/20 (*TURNER BioSystems Luminometer*), las medidas de ATP se determinaron en relación a las UFC/ml que hay en cada punto de la curva analizado.

EC:

Luciferasa



13. Detección y cuantificación de sideróforo pioverdina en *P. putida* KT2440.

Las cepas KT2440, KT2440 Δ *apaH* y KT2440 Δ *apaHpIZapaH* fueron crecidas 24 horas en medio mínimo M9 con citrato 0.3% como única fuente de carbono, la fluorescencia debida a los sideróforos (pioverdina) fue visualizada por transiluminación con Ultravioleta (UV) en un *Molecular Imager® Gel Doc™ XR* (BioRad). La cuantificación relativa de los niveles de pioverdina fue realizada como describe Ackerley y colaboradores (2004). Los cultivos fueron crecidos como mencionamos anteriormente y teniendo en consideración que poseen una $A_{600}=1,2$ igual cada una de ellos se centrifugó 1 ml de cada uno a 13.000 rpm por 3 minutos y se determinó la A_{400} (Monds *et al.*, 2006).

14. Determinación del efecto de Estrés oxidativo en el crecimiento de *P. putida* KT2440 y *P. putida* KT2440 Δ *apaH*.

Para determinar el efecto del estrés oxidativo, se cultivó *P. putida* KT2440 y *P. putida* KT2440 Δ *apaH* en medio mínimo M63 con citrato 0.3% como fuente de carbono en presencia o ausencia del compuesto menadiona a una concentración de 0.2 mM. Se siguió el crecimiento de ambas cepas mediante la determinación de la A_{600} durante 18 horas. Cada experimento se repitió 3 veces de forma independiente y los datos enseñados son el promedio de estos.

15. Determinación del efecto de Estrés osmótico en *P. putida* KT2440 y *P. putida* KT2440 Δ *apaH*.

Para determinar el efecto del estrés osmótico, se cultivó *P. putida* KT2440 y *P. putida* KT2440 Δ *apaH* en medio LB durante toda la noche. Se recolectaron las células mediante centrifugación a 5000 rpm por 3 minutos y se resuspendió cada cultivo en medio LB fresco o en LB + NaCl 3M, después de 15 minutos se sembró cada cultivo realizando diluciones seriadas en placas de LB-agar que se incubaron 24 horas a 30 °C. Se determinó las UFC/ml de cada condición probada. Cada experimento se repitió 3 veces de forma independiente y los datos enseñados son el promedio de estos.

16. Movilidad tipo Swimming y Swarming.

Las cepas KT2440, KT2440 Δ *apaH* y KT2440 Δ *apaH* Δ *ZapaH* fueron crecidas 24 horas en medio mínimo M63 con citrato 0.3% como única fuente de carbono y energía. Se utilizó 10 μ l de cada cultivo para poner en medio de cada placa para los ensayos de movilidad. Estos experimentos se realizaron al menos 4 veces y se enseña solo uno que representa los resultados de las replicas realizadas. Los ensayos de movilidad Swimming fueron realizados en placas de agar al 0.3% de Medio mínimo M63+ citrato (0.3%) incubadas a 30 °C por 24 horas (Matilla *et al.*, 2011). Por otra parte, la movilidad Swarming fue determinada utilizando placas de agar al 0.5% de Medio mínimo M63+ citrato (0.3%) incubadas a 25 °C por 24 horas (Matilla *et al.*, 2007).

17. Técnicas de manipulación de proteínas.

17.1 Electroforesis bidimensional en geles de poliacrilamida-SDS.

17.1.1 Preparación de las muestras de proteínas

Para la obtención de extractos crudos de *P. putida* KT2440 y *P. putida* KT2440 Δ *apaH*, las células se cultivaron en medio mínimo con AFA como única fuente de carbono hasta alcanzar las fases de crecimiento exponencial temprana, exponencial media y estacionaria. Los cultivos se concentraron 20 veces, tras centrifugar y resuspender en el tampón apropiado, y se lisaron empleando la prensa de French (Aminco Corp.) operada a una presión de 20000 psi. Las células rotas se centrifugaron a 4°C en un rotor SS34 (Sorvall) a 11.000 x g durante 15 min, recogándose el sobrenadante (extracto crudo). Las proteínas de los extractos crudos fueron precipitadas

acorde al método metanol-cloroformo (Wessel y Flügge, 1984). Los pellets fueron resuspendidos en tampón de muestra 2X (7 M urea, 2 M tiourea, 4 % (w/v) CHAPS, 3 µg/ml azul de bromofenol). La concentración de proteínas fue estimada usando el RC DC Protein Assay Kit (Bio-Rad, Hercules, CA, USA).

17.1.2 Electroforesis en geles bidimensionales

Las proteínas se separaron en la 1ª dimensión utilizando el sistema PROTEAN® IEF System (BIO-RAD) y las tiras de gel de isoelectroenfoque “ReadyStrip IPG” (BIO-RAD) de 7 cm, pH 4-7, siguiendo las indicaciones de la firma comercial. Cada tira de gel se sometió a una rehidratación activa con 50 µg de muestra diluida hasta 140 µl en solución de muestra 2X (urea 7 M, tiourea 2 M, 1-propanosulfonato de 3-(3-colamidopropil)-dimetilamonio [CHAPS] al 4 % [p/v], azul de bromofenol al 0.0003 % [p/v]) que contenía ditioneitol (DTT) 18.2 mM y solución de anfólitos “100x Bio-Lyte 3-10 Ampholyte” (BIO-RAD) al 0.5 %, cubierto todo ello con aceite mineral, a 50 V / 20 °C / 12 h. Posteriormente se aplicaron secuencialmente los siguientes pasos de isoelectroenfoque: 250 V/1 h., 500 V/1 h., 1.000 V/1 h., 2.000 V/1 h., todos ellos con pendiente rápida, 8.000 V/1 h. con pendiente lineal, 8.000 V con pendiente rápida hasta alcanzar en ese paso 3.500 V·h., y 200 V hasta hasta superar como mínimo los 12.000 V·h. totales en todos los casos. La temperatura se mantuvo siempre en 20 °C, y el límite de intensidad máxima fue de 50 µA/gel.

Para el equilibrado de las tiras se incubó cada una en 2 ml de tampón de equilibrado (Tris·HCl 50 mM pH=8.8, urea 6 M, dodecilsulfato sódico [SDS] al 2% [p/v] y glicerol al 30% [v/v]) que contenía DTT 52 mM durante 15 min y posteriormente en 2 ml del mismo tampón que contenía IAA 130 mM otros 15 min., todo ello a temperatura ambiente. Finalmente se lavó unos minutos cada tira con 2 ml de tampón de electroforesis Tris-glicina (Tris·HCl 25 mM, glicina 192 mM, SDS al 0.1% [p/v]).

Las proteínas se separaron en la 2ª dimensión sometiénolas a SDS-PAGE con una concentración constante de acrilamida del 12 % (p/v). Los geles se prepararon el día anterior y se conservaron a 4 °C antes de usarlos. Como marcadores de masa molecular se empleó la mezcla “Precision Plus Protein™ Standards Unstained” (BIO-RAD). Las tiras equilibradas se incluyeron sobre los geles y se realizaron electroforesis con tampón Tris-glicina a una potencia de 0.5 W/gel 30 min y 1.5 W/gel hasta que el frente de azul de bromofenol llegaba al borde inferior.

17.1.3 Tinción y Obtención de imágenes de los geles teñidos

La tinción utilizada fue SYPRO[®] Ruby protein gel stain (BIO-RAD). El proceso de obtención de las imágenes se realizo utilizando el equipo EXQuest[™] Spot Cutter, aplicando el programa PDQuest[™] Advanced-8.0.1 (BIO-RAD).

17.2 Análisis del proteoma de *P. putida* KT2440 por NanoLC-MS/MS

17.2.1 Preparación de las muestras

Para la obtención de extractos crudos de *P. putida* KT2440 y *P. putida* KT2440 Δ *apaH*, las células se cultivaron en medio mínimo con AFA 2.5 mM como única fuente de carbono hasta alcanzar las fase exponencial media (A_{600} 0.35). Esta metodología fue realizada en el laboratorio del Dr. Jean Armengaud del Laboratorio Biochim System Perturb, Instituto de Biología medioambiental y biotecnología (Francia). Los pellets obtenidos desde 100 ml de cultivo fueron resuspendidos en tampón de muestra *LDS 1X* (Invitrogen) con una relación de 200 μ l por 25 mg de pellets. Las células fueron posteriormente rotas por sonicación por 10 minutos utilizando un sonicador *UP50H ultrasonic processor sonicator* (hielscher), luego fueron diluídas con 6 volúmenes de tampón *LDS1X*, calentadas por 5 min a 95 °C. Posteriormente, estas muestras fueron directamente cargadas en un gel *NuPAGE* (Invitrogen) con un gradiente de 4–12%. El gel fué corrido en tampón *MES* (Invitrogen), a 200 V por un periodo corto de migración (sobre 0.8 mm), y luego fue teñido con *Coomassie SeaBlue Safe* (Invitrogen) por 45 min. Después, los geles fueron desteñidos con agua destilada, cada carril del gel fue cortado en 4 fragmentos igualitarios en volumen desde la parte superior hasta el final del gel. Las bandas resultantes ya desteñidas conteniendo las proteínas fueron tratadas ditiotreitól y iodoacetamida, y luego sometidas a proteólisis con *proteasMAX* (Promega) tal y como describe Clair y colaboradores (2010).

17.2.2 Análisis NanoLC-MS/MS del proteoma de *P. putida* KT2440 y *P. putida* KT2440 Δ *apaH*.

Un volume de 9 μ l de las mezclas peptícas resultants (50 μ l) fueron analizadas en un espectrómetro de masas híbrido *LTQ-Orbitrap XL* (ThermoFisher) acoplado a un sistema de cromatografía líquida *UltiMate 3000 LC system* (Dionex-LC Packings) operado modo dependiente de datos como previamente describe Clair y colaboradores

(2010). Los espectros de MS/MS sobre un gradiente de 120 minutos obtenidos fueron analizados con el programa MASCOT versión 2.2.04 (Matrix Science) con la herramienta Refseq de la base de datos de polypeptide sequence database NCBI para *P. putida* KT2440 comprometiéndose 5350 entradas. Los péptidos fueron determinados utilizando los siguientes parámetros: especificidad completa a tripsina, hasta dos fragmentos “miss cleavages” posibles (fragmentos originados en la proteómica después de la tripsinación), una tolerancia de 5ppm en la masa de los iones, 0.5 Da en tolerancia de masa sobre el MS/MS, cisteínas carboxiamidometiladas (+57.0215) como modificación estática, y metioninas oxidadas (+15.9949) como modificación variable. Los péptidos (P value < 0.05) fueron filtrados por el programa IRMa. Una proteína fue identificada cuando al menos 2 diferentes péptidos fueron identificados.

18. Análisis basados en modelos metabólicos.

El modelo metabólico a escala genómica de *P. putida* KT2440, i.e., iJN1411, fue utilizado para todos los análisis *in silico* realizados en esta tesis. iJN1411 es un modelo metabólico que incluye un total de 1411 genes (26% del genoma de *P. putida* KT2440), 2754 reacciones y 2057 metabolitos localizados en el citoplasma, periplasma y espacio extracelular (J. Nogales, sin publicar).

El modelo fue analizado mediante análisis de balance de flujo (FBA, de sus siglas en inglés *Flux Balance Analysis*) (Varma y Palsson, 1994). Al contrario del tradicional abordaje para modelado metabólico utilizando ecuaciones diferenciales ordinarias acopladas, FBA no requiere de información referente a parámetros cinéticos enzimáticos ni de concentración de metabolitos en el sistema para predecir flujos metabólicos. Esta característica lo convierte en un abordaje aplicable a modelos metabólicos a escala genómica. La distribución de flujos se consigue asumiendo la existencia de un estado estacionario biológico en el cual la concentración de los metabolitos no varía con el tiempo (un estado metabólico que se consigue en cultivo continuo o bien en fase exponencial de crecimiento). La asunción del estado estacionario reduce el sistema a un conjunto de ecuaciones lineales (problema de optimización lineal) el cual se resuelve posteriormente supeditado a restricciones estequiometrias mediante la maximización de una función objetivo con objeto de encontrar una distribución de flujos que satisface la condición de estado estacionario. Por tanto la resolución del problema de optimización lineal resultante de aplicar FBA requiere de la definición de una función objetivo a maximizar por lo que la predicción

de flujos depende intrínsecamente de la función objetivo tenida en cuenta. Dado que tradicionalmente se ha considerado que las bacterias optimizan su tasa de crecimiento en estado estacionario (fase exponencial del crecimiento), la predicción de flujos *in silico* se computa maximizando la reacción de biomasa, (BOF de sus siglas en inglés, Biomass Objective Funtion). La BOF es específica de cada especie y describe la velocidad a la que todos los precursores de la biomasa celular se sintetizan en las proporciones correctas. Por tanto, la BOF simula el crecimiento celular (Feist y Palsson, 2010).

Matemáticamente, la aplicación de FBA puede representarse como sigue:

$$\begin{array}{ll} \max & \mathbf{c}^T \mathbf{v} \\ \text{sujeto a} & \mathbf{Sv} = \mathbf{0} \end{array}$$

donde S es una matriz de m filas por n columnas que contiene todos los coeficientes estequiométricos de las reacciones del modelo de m metabolitos y n reacciones. El vector v tiene n elementos, los cuales representan el valor de flujo para cada reacción. La restricción $Sv = 0$ corresponde a la asunción del estado estacionario. El vector c representa la función objetivo (BOF) (Orth *et al*, 2010).

Los modelos específicos de condición iJN1411_AFA e iJN1411_AFA_ΔApaH fueron construidos utilizando el algoritmo GIMME (Gene Inactivity Moderated By Metabolism and Expresión) (Becker y Palsson, 2008). GIMME fue utilizado para incorporar al modelo los datos de expresión obtenidos con los experimentos de proteómica y para construir los modelos específicos de condición mediante la eliminación de aquellas reacciones/genes/proteínas no detectadas experimentalmente manteniendo la funcionalidad del modelo. Se consideró como indicativo de la presencia de una proteína en una condición el hecho de haber sido detectada en al menos 2 de las 3 muestras biológicas analizadas. Los experimentos de *sampling* fueron realizados utilizando el método de Montecarlo implementado en el paquete de software Cobra Toolbox 2.0 (Schellenberger *et al.* (2011). El resto de análisis fueron llevados a cabo igualmente con el paquete de software Cobra Toolbox 2.0 en el entorno MATLAB (The MathWorks Inc.). El kit de programación lineal GNU (GLPK) (<http://www.gnu.org/software/glpk>) fue utilizado para resolver los problemas de optimización lineal.

19. Análisis de los datos de secuencia.

El análisis de las secuencias nucleotídicas se realizó con los siguientes programas y servidores: Chromas 2.01 (Technelysium Pty Ltd.), análisis cromatogramas procedentes de reacciones rutinarias de secuenciación; Bioedit *Sequence Alignment Editor* v7.0.3 (Hall, 1999), análisis de cromatogramas procedentes de reacciones rutinarias de secuenciación; Biosupport (<http://bioinfo.hku.hk/>), obtención de secuencias reversas y complementarias de DNA, traducción de secuencias de DNA a proteína; Institut Pasteur (<http://mobylye.pasteur.fr/cgi-bin/portal.py#welcome>), traducción de secuencias de DNA en los seis marcos de lectura simultáneamente; ExPASy (<http://www.expasy.ch/tools/DNA.html>), traducción de secuencias de DNA.

Las secuencias de nucleótidos y las secuencias deducidas de aminoácidos se compararon con las existentes en las bases de datos mediante el uso de los programas BlastN y BlastP, respectivamente (Altschul *et al.*, 1990). El servidor seleccionado para ejecutar estos algoritmos fue el del National Center for Biotechnology Information (NCBI; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/BLAST.cgi>).

La comparación de parejas de secuencias proteicas se realizó con el programa Blast2sequences a través del servidor del NCBI, mientras que para los alineamientos múltiples de secuencias se empleó el programa ClustalW (Thompson *et al.*, 1994) desde el servidor EMBL-EBI (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>).

V. RESULTADOS

V. Resultados

1. Estudio del efecto del catabolismo del AFA sobre la degradación de otros compuestos aromáticos en *P. putida* KT2440.

Como se ha indicado en la Introducción, son escasos los estudios realizados que analicen la utilización de diferentes compuestos aromáticos presentes en mezclas, y no se ha abordado hasta la fecha si las rutas aeróbicas híbridas son preferentes a las rutas clásicas (catecólicas) de degradación de compuestos aromáticos en bacterias. Debido a esto, en el presente trabajo uno de los objetivos principales fue estudiar si una ruta aeróbica híbrida tan extendida e importante como es la de la degradación del AFA (Fig. 6) era preferente o no a las rutas catecólicas clásicas en la bacteria modelo *P. putida* KT2440. Para realizar estos estudios se escogió el 4HBA como fuente de carbono aromática alternativa y modelo de la ruta aeróbica clásica más ampliamente distribuida (ruta del β -cetoadipato).

1.1 Crecimiento de *P. putida* KT2440 en AFA, 4HBA, o en la mezcla de ambos compuestos.

Para iniciar los estudios sobre el metabolismo de AFA y/o 4HBA en *P. putida* KT2440, se realizó un análisis de las curvas de crecimiento correspondientes utilizando dichos compuestos como única fuente de carbono. Como se observa en la figura 15, la cepa KT2440 presenta una fase de latencia en su curva de crecimiento en 4HBA de alrededor de 2 h, mientras que en AFA la fase de latencia es de 4 h. Por otro lado, mientras que la velocidad específica de crecimiento (μ) en 4HBA es de 0.37 h^{-1} , el crecimiento en AFA permite distinguir dos fases exponenciales cuyas μ son claramente diferentes: i) una fase exponencial inicial (5-7.5 h) cuya μ es de 0.29 h^{-1} y ii) una fase exponencial final (7.5-9.5 h) cuya μ es de 0.38 h^{-1} . Estos resultados sugieren que la adaptación de la cepa KT2440 al consumo de AFA es más lenta que la que ocurre para el consumo de 4HBA, aunque finalmente la tasa de crecimiento en AFA y 4HBA es similar. Cuando se analiza el crecimiento de la cepa KT2440 en la mezcla AFA/4HBA, la fase de latencia es similar a la observada con 4HBA sólo, y se distinguen dos fases similares a las observadas con AFA sólo: i) una fase exponencial inicial (3-8 h) cuya μ es 0.29 h^{-1} , ii) una fase exponencial final (8-11 h) cuya μ es 0.31 h^{-1} . Estos resultados sugieren que en las etapas iniciales del crecimiento la cepa KT2440 puede estar

metabolizando de manera preferente 4HBA sobre AFA, pero este último estaría ralentizando el metabolismo de 4HBA con respecto a la situación en la que el 4HBA es la única fuente de carbono.

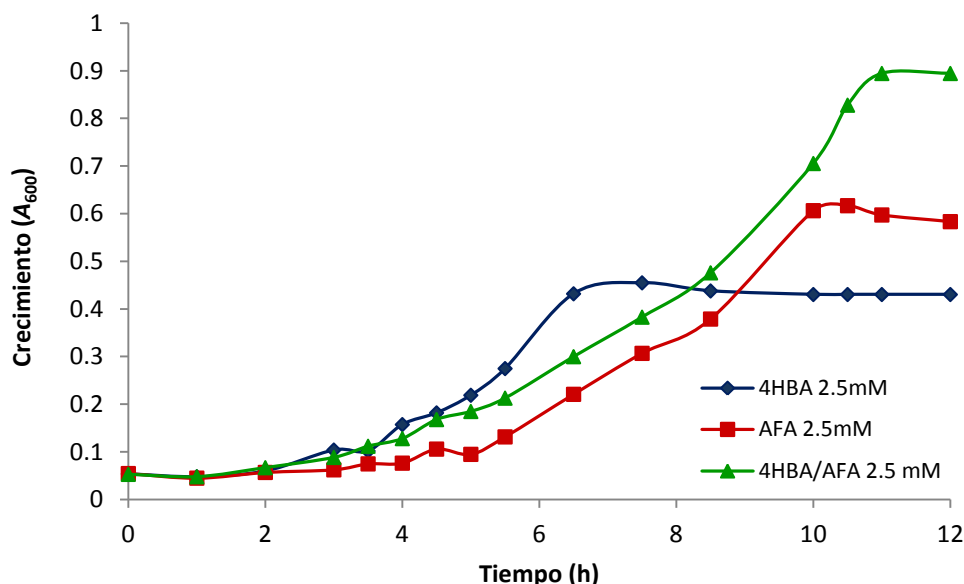


Figura 15. Curvas de crecimiento de *P. putida* KT2440 en 4HBA, AFA y en la mezcla AFA/4HBA. *P. putida* KT2440 se cultivó en medio mínimo M63 suplementado con 4HBA 2.5 mM (línea azul), AFA 2.5 mM (línea roja) o la mezcla 4HBA 2.5 mM/AFA 2.5 mM (línea verde) como fuente de carbono y energía, como se detalla en el apartado 3.1 de Materiales y Métodos. El crecimiento se registró valorando el incremento en $A_{600\text{nm}}$ tomando muestras de los cultivos a los tiempos indicados (símbolos). Se muestran los resultados de un experimento, los cuales fueron reproducibles en tres experimentos independientes.

1.2 Análisis del consumo de 4HBA y/o AFA en *P. putida* KT2440.

Para analizar de forma más directa el consumo de AFA y/o 4HBA a lo largo de la curva de crecimiento de *P. putida* KT2440, se estudió mediante HPLC la desaparición de ambos compuestos de los sobrenadantes de los cultivos.

Cuando *P. putida* KT2440 se cultiva en 4HBA como única fuente de carbono, se observa el consumo de 4HBA desde las primeras horas del crecimiento (2 h), alcanzando un consumo del 50% a las 5 h (fase exponencial media, $A_{600} = 0.25$), y siendo completo a las 7 h del crecimiento (comienzo de la fase estacionaria, $A_{600} = 0.4$) (Fig. 16A). Cuando *P. putida* KT2440 se cultiva en AFA como única fuente de

carbono, el consumo de AFA no comienza hasta las 5.5 h del crecimiento y presenta dos fases claramente diferenciadas separadas por un intervalo (1 h) en la que no se aprecia consumo: i) una primera fase (desde las 5.5 h hasta las 6.5 h de crecimiento) en la que se consume el 50% del AFA, y que contribuye tan sólo a una A_{600} de 0.25, y ii) una segunda fase (desde las 7.5 h hasta las 9.5 h de crecimiento) en la que se consume el otro 50% del AFA y en la que se alcanza la A_{600} máxima de 0.65 (Fig. 16B). Por lo tanto, estos resultados confirman que el 4HBA se empieza a consumir antes que el AFA, y revelan que ambos compuestos desaparecen totalmente del medio de cultivo a las 4h desde que se inicia su consumo.

Cuando la cepa KT2440 se cultiva en presencia de la mezcla 4HBA/AFA, se aprecia el consumo simultáneo de ambas fuentes de carbono (Fig. 16C). Si bien el consumo de 4HBA comienza a las 2 h del crecimiento, como ocurre cuando se utiliza 4HBA como única fuente de carbono (Fig. 16A), este compuesto no desaparece del medio de cultivo hasta las 8.5 h del crecimiento, indicando que el consumo del 4HBA es más lento en presencia de AFA que en ausencia de éste (Fig. 16C). Por otro lado, el consumo de AFA comienza a producirse a las 4 h de crecimiento en presencia de 4HBA y, por lo tanto, se adelanta significativamente respecto a la situación observada con AFA como única fuente de carbono (Fig. 16B). No obstante, la desaparición del AFA en la mezcla no se produce hasta las 11 h del crecimiento (Fig. 16C), sugiriendo que el consumo del AFA es también más lento en presencia de 4HBA que en ausencia de éste. De nuevo, vuelven a observarse las dos fases descritas en el consumo del AFA cuando las células se cultivan en presencia de la mezcla 4HBA/AFA: i) una fase inicial que consume un 50% del AFA pero no se traduce en un incremento importante en biomasa, y ii) una segunda fase que da cuenta del consumo del resto del AFA y que conlleva un incremento significativo de la biomasa hasta alcanzar una A_{600} de 0.9 (Fig. 16C).

Estos resultados revelan que *P. putida* KT2440 co-metaboliza 4HBA y AFA cuando ambos se suministran a concentraciones similares como fuentes de carbono. Si bien la cepa KT2440 cultivada en la mezcla 4HBA/AFA comienza utilizando 4HBA como única fuente de carbono, el consumo inicial de 4HBA favorece la utilización de AFA. Por otro lado, el co-metabolismo del 4HBA y AFA repercute negativamente en la velocidad de consumo de ambas fuentes de carbono ya que dichas velocidades se ven reducidas cuando la cepa KT2440 se cultiva en la mezcla 4HBA/AFA.

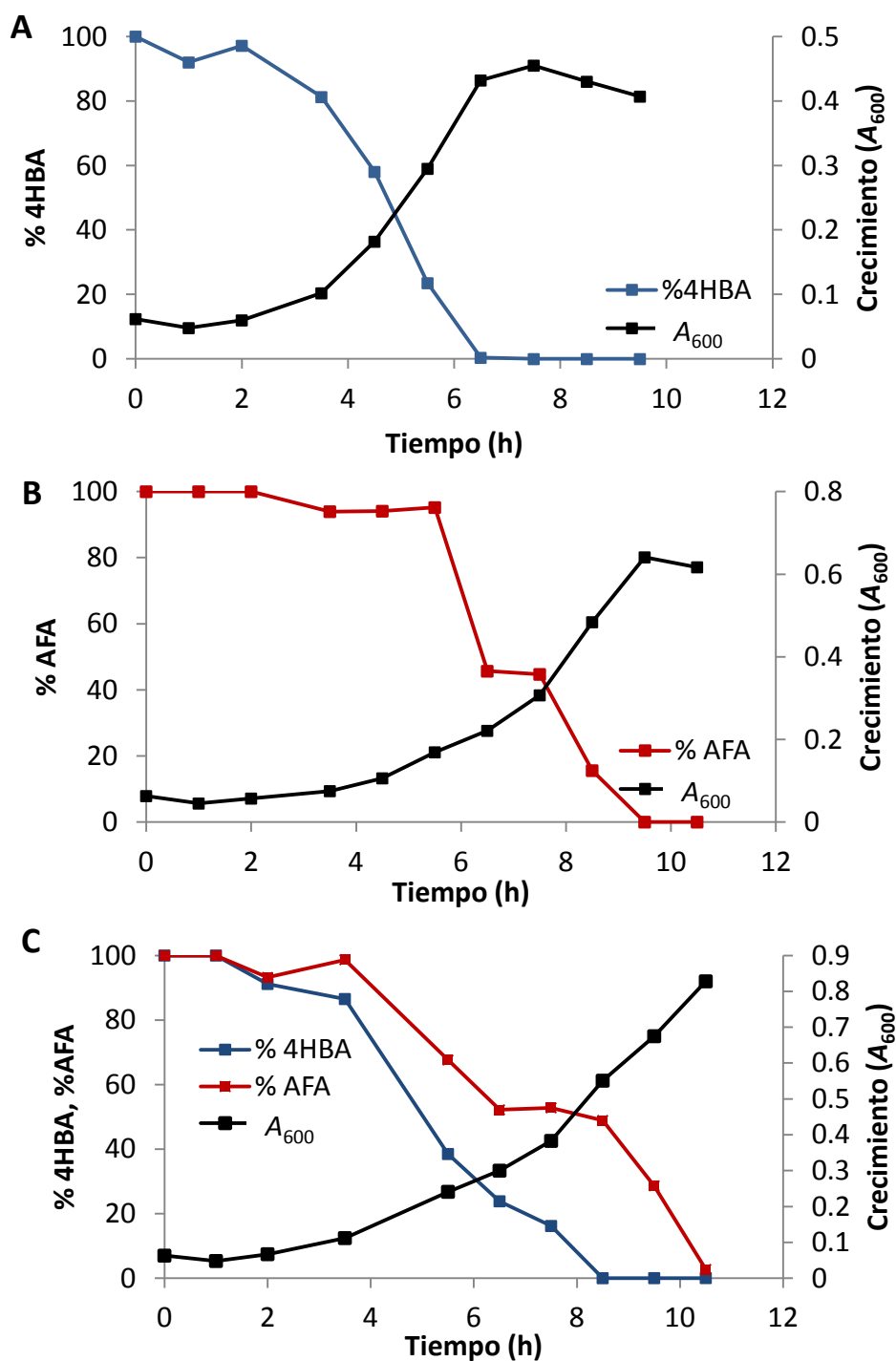


Figura 16. Consumo de 4HBA y/o AFA en cultivos de *P. putida* KT2440. *P. putida* KT2440 se cultivó en medio mínimo M63 suplementado con 4HBA 2,5 mM (panel A), AFA 2,5 mM (panel B) o con la mezcla AFA 2,5 mM/4HBA 2,5 mM (panel C) como fuente de carbono y energía, como se detalla en la sección 3.1 de Materiales y Métodos. El crecimiento (línea negra) se registró valorando el incremento en A_{600nm} a los tiempos indicados (cuadrados negros). La concentración de 4HBA (línea azul) y AFA (línea roja) presente en el sobrenadante de cada cultivo a diferentes tiempos del crecimiento se determinó mediante HPLC, como se detalla en la sección 10 de Materiales y Métodos, y se representa como % de la concentración inicial de compuesto. Se muestran los resultados de un experimento, los cuales fueron reproducibles en tres experimentos independientes.

1.3 Estudio de la expresión diferencial de las rutas de degradación de 4HBA y/o AFA en *P. putida* KT2440.

Para investigar con más detalle el presunto efecto inhibitor del AFA sobre la ruta del 4HBA cuando *P. putida* KT2440 se cultiva en la mezcla de ambos compuestos (Fig. 16C), se procedió a analizar la expresión de dos actividades enzimáticas claves de dicha ruta, i.e., la actividad PobA (4-hidroxibenzoato 3-monooxigenasa) de la ruta periférica que convierte 4HBA en protocatecuato, y la actividad PcaGH (protocatecuato 3,4-dioxigenasa) de la ruta central del β -cetoadipato que transforma el protocatecuato en intermediarios del TCA (Fig 7 apartado 4.2 de la Introducción), en células cultivadas en 4HBA o en la mezcla 4HBA/AFA.

1.3.1 Análisis de la actividad 4-hidroxibenzoato-3-monooxigenasa (PobA).

Se valoró la actividad 4-hidroxibenzoato-3-monooxigenasa (PobA) de los cultivos de *P. putida* KT2440 creciendo en 4HBA y/o AFA, tal y como se detalla en el apartado 7.3 de Materiales y Métodos. La actividad PobA fue máxima en células de *P. putida* KT2440 cultivadas en 4HBA. Por el contrario, la actividad basal PobA en condiciones de no inducción (crecimiento en AFA) fue un 5% de la actividad máxima. Cuando *P. putida* está metabolizando simultáneamente 4HBA/AFA, se detecta una actividad PobA claramente superior a la actividad basal pero que no supera el 40% de la actividad máxima (Fig. 17). Este resultado indica que el metabolismo del AFA conlleva una reducción significativa (60%) de la actividad PobA en células cultivadas en la mezcla 4HBA/AFA respecto a la actividad PobA observada en células que utilizan 4HBA como única fuente de carbono.

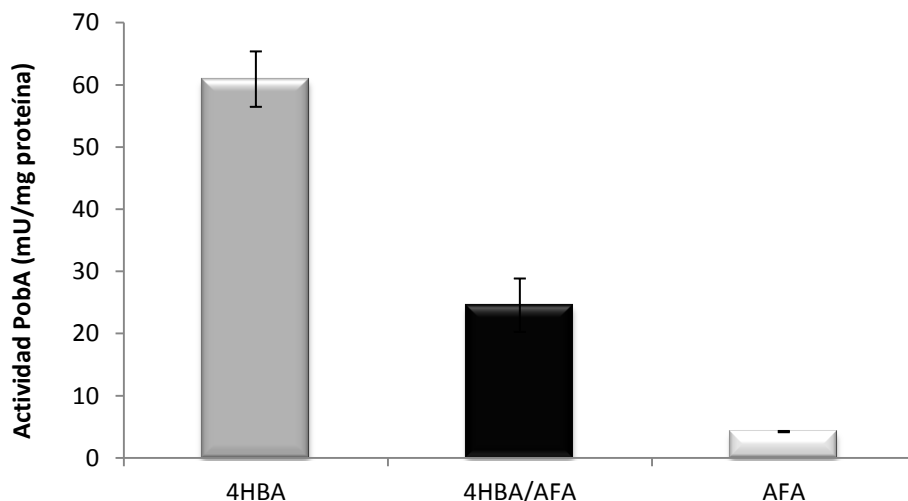


Figura 17. Actividad 4-hidroxibenzoato-3-monooxygenasa (PobA) en *P. putida* KT2440 cultivada en 4HBA y/o AFA. *P. putida* KT2440 fue cultivada en medio mínimo M63 conteniendo 4HBA 2.5 mM (barra gris), AFA 2.5 mM (barra blanca) o la mezcla 4HBA 2.5 mM/AFA 2.5 mM (barra negra). Las células fueron recogidas cuando alcanzaron la fase exponencial media, y la actividad 4-hidroxibenzoato-3-monooxygenasa (PobA) se determinó como se indica en el apartado 7.3 de Materiales y Métodos. Los valores de actividad son el promedio de los obtenidos en tres experimentos independientes. Las barras de error indican la desviación estándar.

1.3.2 Análisis de la actividad protocatecuato 3,4-dioxigenasa (PcaGH)

Por otro lado, para determinar si el metabolismo del AFA ejerce un efecto adicional sobre otras etapas de la ruta de degradación de 4HBA, se determinó la actividad protocatecuato 3,4-dioxigenasa (PcaGH) como se detalla en el apartado 7.2 de Materiales y Métodos. La actividad PcaGH fue máxima en células de *P. putida* KT2440 cultivadas en 4HBA. Por el contrario, la actividad basal en condiciones de no inducción (crecimiento en AFA) fue un 8 % de la actividad máxima. Cuando *P. putida* está metabolizando simultáneamente 4HBA/AFA, se detecta una actividad PcaGH claramente superior a la actividad basal pero que no supera el 34% de la actividad máxima (Fig. 18). Este resultado indica que el metabolismo del AFA conlleva una reducción significativa (66%) de la actividad PcaGH en células cultivadas en la mezcla 4HBA/AFA.

Cogidos en su conjunto, estos resultados demuestran que la actividad de las enzimas 4-hidroxibenzoato monooxygenasa (PobA) y protocatecuato 3,4-dioxigenasa (PcaGH) disminuye 2-3 veces en células de *P. putida* KT2440 cultivadas en la mezcla

AFA/4HBA en comparación con la actividad observada en células cultivadas sólo en 4HBA, lo que está de acuerdo con la menor velocidad en el consumo de 4HBA que se determinó en la mezcla (Fig. 16C). Para conocer si el control que ejerce el AFA sobre las enzimas PcbA y PcaGH es a nivel transcripcional y/o post-transcripcional, se procedió a analizar la expresión de los genes que codifican dichas actividades enzimáticas.

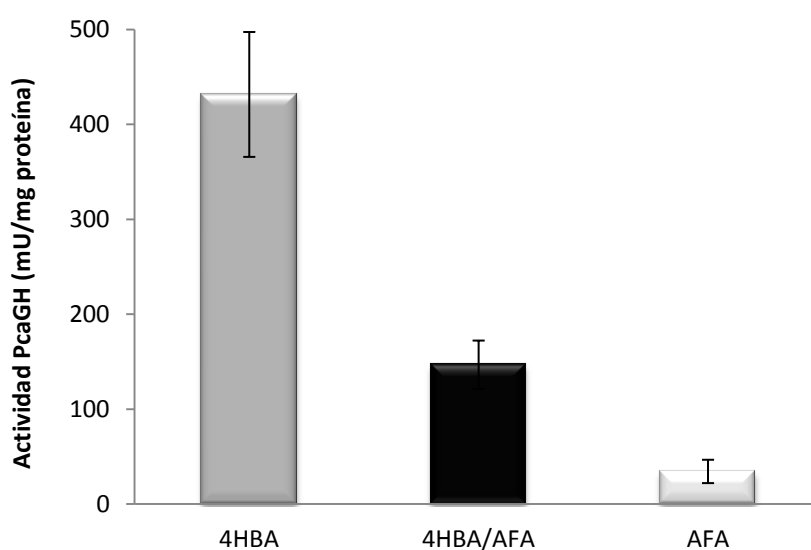


Figura 18. Actividad protocatecuato 3,4-dioxigenasa (PcaGH) en *P. putida* KT2440 cultivada en 4HBA y/o AFA. *P. putida* KT2440 fue cultivada en medio mínimo M63 conteniendo 4-HBA 2.5 mM (barra gris); AFA 2.5mM (barra blanca) o la mezcla 4HBA 2.5 mM/AFA 2.5 mM (barra negra). Las células fueron recogidas cuando alcanzaron la fase exponencial media, y la actividad protocatecuato 3,4-dioxigenasa (PcaGH) se determinó como se indica en el apartado 7.2 de Materiales y Métodos. Los valores de actividad son el promedio de los obtenidos en tres experimentos independientes. Las barras de error indican la desviación estándar.

1.3.3. Efecto del AFA sobre la transcripción de los genes *pobA* y *pcaH*

Se analizó el efecto del AFA sobre la transcripción de los genes *pobA* (PP_3537), codifica la monooxigenasa PcbA, y *pcaH* (PP_4656), codifica la subunidad β (PcaH) de la protocatecuato 3,4-dioxigenasa (Fig.7) (apartado 4.2 de la Introducción),

mediante RT-PCR cuantitativa en células de *P. putida* KT2440 cultivadas en 4HBA o en la mezcla 4HBA/AFA.

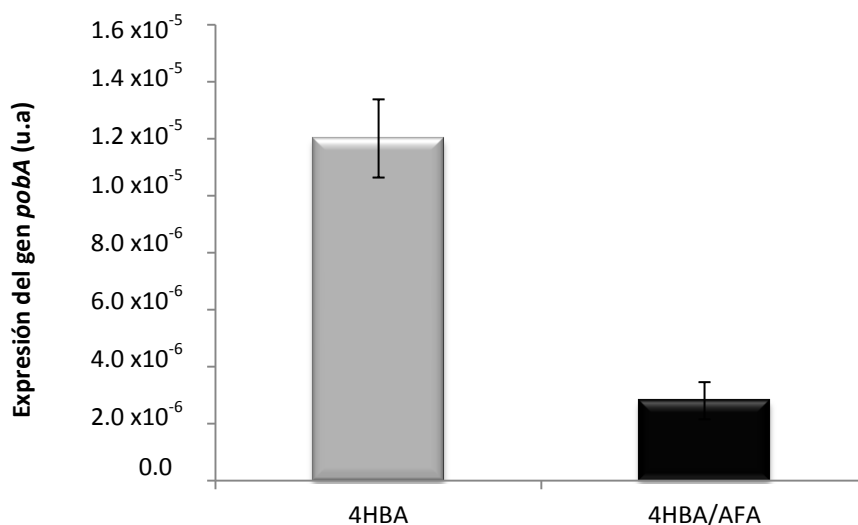


Figura 19. Expresión del gen *pobA* en *P. putida* KT2440 creciendo en 4HBA o en la mezcla 4HBA/AFA. Los niveles de transcripción del gen *pobA* fueron analizados mediante RT-PCR cuantitativa (ver apartado 4.6 de Materiales y Métodos) utilizando células de *P. putida* KT2440 cultivadas hasta fase exponencial media en 4HBA 2.5 mM (barra gris) o en la mezcla 4HBA 2.5 mM /AFA 2.5 mM (barra negra). Los valores representados son el promedio de los obtenidos en tres muestras biológicas independientes. Las barras representan la desviación estándar de cada promedio.

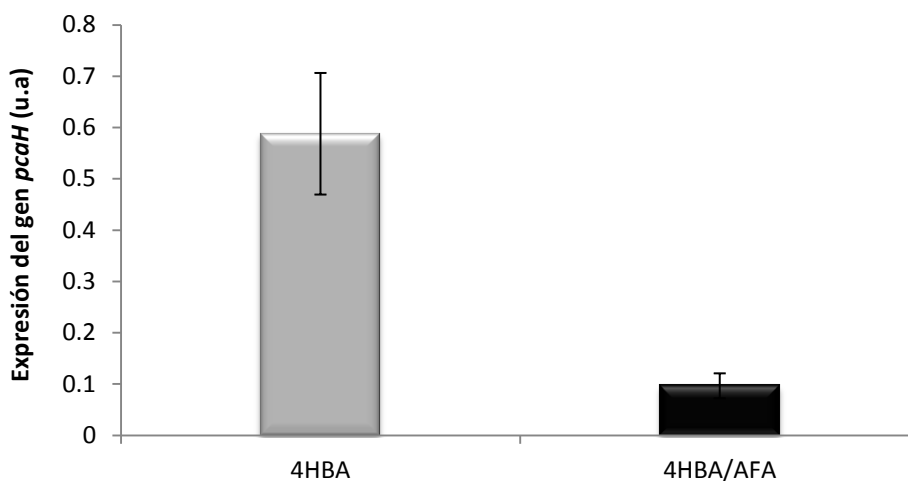


Figura 20. Expresión del gen *pcaH* en *P. putida* KT2440 creciendo en 4HBA o en la mezcla 4HBA/AFA. Los niveles de transcripción del gen *pcaH* fueron analizados mediante RT-PCR (ver apartado 4.6 de Materiales y Métodos). Las células de *P. putida* KT2440 fueron cultivadas hasta fase exponencial media en 4HBA 2.5 mM (barra gris) o en la mezcla 4HBA 2.5 mM /AFA 2.5 mM (barra negra). Los valores representados son el promedio de los obtenidos en tres muestras biológicas independientes. Las barras representan la desviación estándar de cada promedio.

Como se muestra en la figura 19, la expresión del gen *pobA* se reduce al menos 4 veces cuando las células de *P. putida* KT2440 se cultivan en presencia de 4HBA/AFA con respecto a la situación control creciendo en 4HBA como única fuente de carbono. Asimismo, la expresión del gen *pcaH* se reduce también respecto a la situación control al menos 5 veces (Fig. 20).

Estos resultados indican que el efecto inhibitor del metabolismo del AFA sobre la expresión de las actividades PobA y PcaGH de la ruta del 4HBA se ejerce, al menos, a nivel transcripcional.

1.3.4 Efecto del AFA sobre la transcripción del gen *pcaK*

Para confirmar si el efecto del AFA afecta de forma general a la expresión de otros operones *pca* distintos al operón *pcaHG* (Fig. 7), se valoró la expresión del operón *pcaRKFTBDC* analizando la transcripción del gen *pcaK* que codifica el transportador específico de 4HBA (Fig. 7) (apartado 4.2 de Materiales y Métodos). Se analizó el cDNA de los cultivos de *P. putida* KT2440 creciendo hasta fase exponencial media en 4HBA o en la mezcla 4HBA/AFA. Como se observa en la figura 21, la expresión del gen *pcaK* en células cultivadas en la mezcla fue unas 5.5 veces menor que en la condición control de crecimiento con 4HBA como única fuente de carbono. Este resultado indica que el metabolismo del AFA también afecta negativamente la expresión del gen *pcaK*, y por lo tanto, parece ejercer un efecto global sobre el operón *pob* y al menos dos de los operones *pca* que constituyen la ruta de degradación del 4HBA en *P. putida* KT2440.

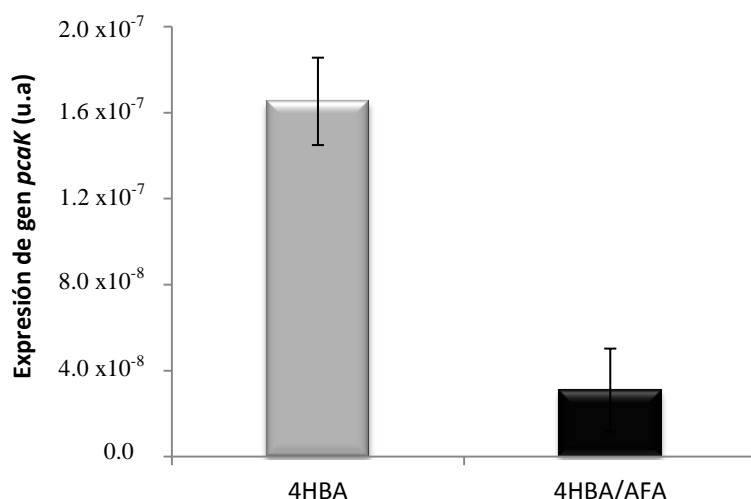


Figura 21. Expresión del gen *pcaK* en *P. putida* KT2440 creciendo en 4HBA o en la mezcla 4HBA/AFA. Los niveles de transcripción del gen *pcaK* fueron analizados mediante RT-PCR cuantitativa (ver apartado 4.6 de Materiales y Métodos) utilizando células de *P. putida* KT2440 cultivadas hasta fase exponencial media en 4HBA 2.5 mM (barra gris) o en la mezcla 4HBA 2.5 mM /AFA 2.5 mM (barra negra). Los valores representados son el promedio de los obtenidos en tres muestras biológicas independientes. Las barras representan la desviación estándar de cada promedio.

1.3.5 Efecto del 4HBA sobre la transcripción de los genes *paa*

Como se ha comentado anteriormente, la velocidad del consumo de AFA también parece reducirse cuando las células de *P. putida* KT2440 se cultivan en la mezcla 4HBA/AFA respecto a la situación control de crecimiento en AFA como única fuente de carbono (Figs. 16B y 16C). Para determinar si el 4HBA afecta a la expresión de los genes *paa* de la ruta del AFA, se analizó la transcripción del gen *paaG* (PP_3278) que codifica la subunidad grande de la enzima fenilacetil-CoA monooxigenasa (epoxidasa) (Fig. 6), cuando la cepa KT2440 se cultiva en AFA o en la mezcla 4HBA/AFA. Los resultados de expresión génica obtenidos revelan que el metabolismo del 4HBA tan sólo ejerce una ligera inhibición de la expresión del gen *paaG* (Fig. 22), sugiriendo que el 4HBA no afecta significativamente la expresión de los genes de la ruta de degradación del AFA.

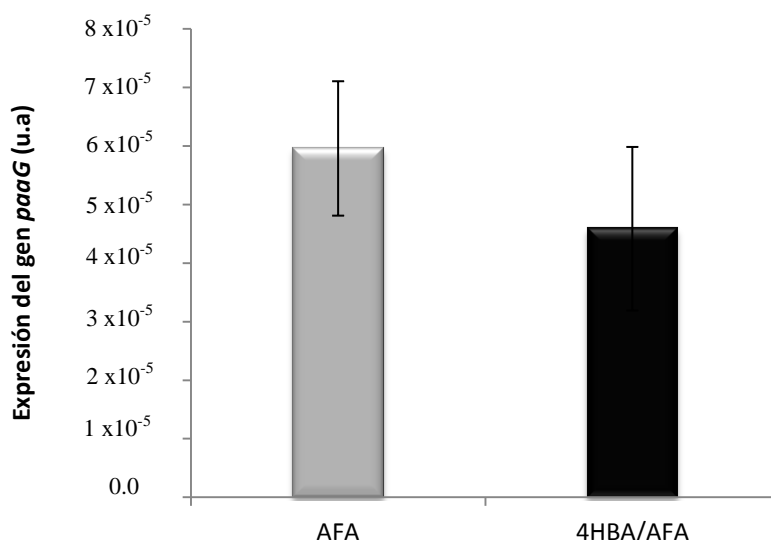


Figura 22. Expresión del gen *paaG* en *P. putida* KT2440 creciendo en 4HBA o en la mezcla 4HBA/AFA. Los niveles de transcripción del gen *paaG* fueron analizados mediante RT-PCR cuantitativa (ver apartado 4.6 de Materiales y Métodos) utilizando células de *P. putida* KT2440 cultivadas hasta fase exponencial media en 4HBA 2.5 mM (barra gris) o en la mezcla 4HBA 2.5 mM /AFA 2.5 mM (barra negra). Los valores representados son el promedio de los obtenidos en tres muestras biológicas independientes. Las barras representan la desviación estándar de cada promedio.

1.4. Estudio del mecanismo regulador del AFA sobre la expresión de la ruta de degradación de 4HBA.

Para tratar de conocer la base molecular del efecto del AFA sobre la disminución en la expresión de los genes de la ruta del 4HBA se realizaron diferentes abordajes. Como se ha mostrado anteriormente (Fig. 21), la expresión del gen *pcaK* se ve reducida cuando la cepa KT2440 se cultiva en la mezcla 4HBA/AFA, lo que podría indicar que el AFA ejerce su efecto represor modulando el transporte de 4HBA y la subsiguiente activación de los genes implicados en su metabolismo mediada por una menor producción de la molécula activadora (Fig. 7). Para confirmar esta hipótesis se procedió a clonar y expresar el gen *pcaK* en multicopia en la cepa KT2440.

1.4.1 Efecto de la sobre-expresión del gen *pcaK* en la expresión de la ruta de degradación de 4HBA en presencia de AFA.

El gen *pcaK* de *P. putida* KT2440 se amplificó por PCR y se clonó bajo el control del promotor *Ptac* en el plásmido pIZ1016, originándose el plásmido pIZpcaK (Tabla 2). Se determinó la actividad P_{obA} de la cepa *P. putida* KT2440 (pIZpcaK) y de

la cepa parental con el plásmido control, *P. putida* KT2440 (pIZ1016), cultivadas en medio mínimo suplementado con 4HBA o con la mezcla 4HBA/AFA. Los resultados obtenidos mostraron que la sobreexpresión del gen *pcaK* no contrarresta los efectos inhibidores del metabolismo del AFA sobre la actividad de la enzima PobA, obteniéndose valores similares de actividad PobA en la mezcla con la cepa que contiene el plásmido pIZpcaK que con la cepa control que contiene el plásmido pIZ1016 (Fig. 23). Estos resultados sugieren que la represión originada por el AFA sobre la ruta del 4HBA no estaría mediada por una inhibición en el transporte de 4HBA.

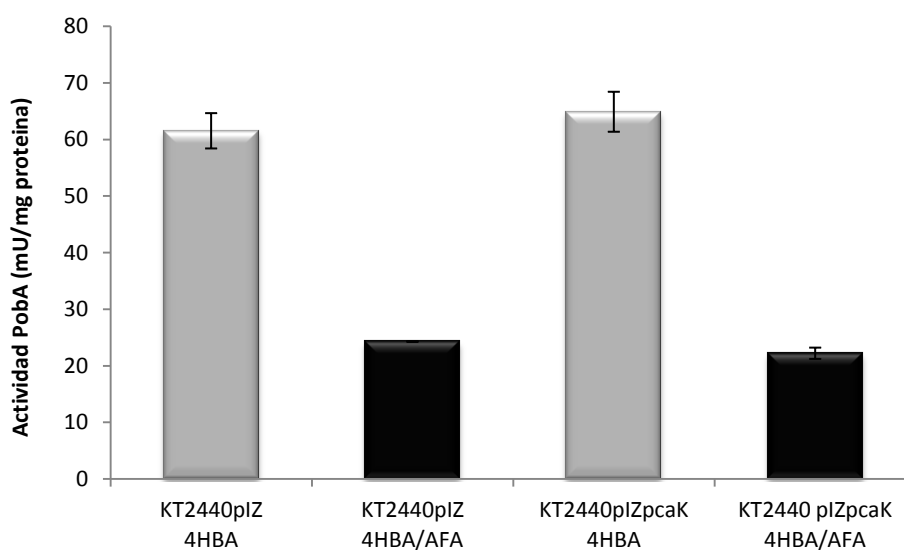


Figura 23. Actividad 4-hidroxibenzoato-3-monooxigenasa (PobA) en células de *P. putida* KT2440 conteniendo el gen *pcaK* sobre-expresado o no, y cultivadas en 4HBA o en la mezcla 4HBA/AFA. *P. putida* KT2440 conteniendo el plásmido control pIZ1016 (KT2440pIZ) o el plásmido que expresa el gen *pcaK* (pIZpcaK) fue cultivada en medio mínimo M63 con 4HBA 2.5 mM (barras grises) o la mezcla 4HBA 2.5 mM/AFA 2.5 mM (barras negras). Las células fueron recogidas cuando alcanzaron la fase exponencial media, y la actividad 4-hidroxibenzoato-3-monooxigenasa (PobA) se determinó como se indica en el apartado 7.3 de Materiales y Métodos. Los valores de actividad son el promedio de los obtenidos en tres experimentos independientes. Las barras indican la desviación estándar.

1.4.2. Efecto del AFA sobre la expresión del gen regulador *pobR*.

Para confirmar si el AFA podría ejercer un efecto inhibitorio de la expresión del gen regulador *pobR* (PP_3538), que codifica el activador transcripcional del gen *pobA* en *P. putida* (Fig. 7), se realizaron estudios de expresión de dicho gen mediante RT-PCR cuantitativa. No se observó una inhibición significativa de la expresión del gen

pobR cuando la cepa KT2440 se cultiva en la mezcla 4HBA/AFA respecto a cuando las células se cultivan en 4HBA como única fuente de carbono (Fig. 7). Estos resultados sugieren que el efecto del AFA sobre la expresión de la ruta del 4HBA tampoco se ejerce mediante el control de la expresión del gen regulador *pobR*.

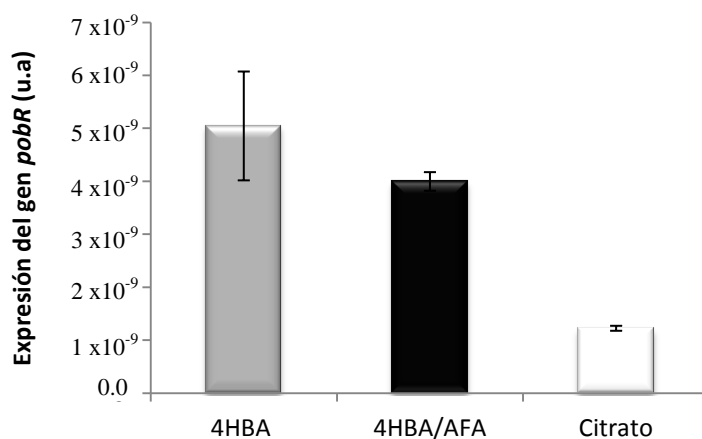


Figura 24. Expresión del gen *pobR* en *P. putida* KT2440 creciendo en 4HBA o en la mezcla 4HBA/AFA. Los niveles de transcripción del gen *pobR* fueron analizados mediante RT-PCR cuantitativa (ver apartado 4.6 de Materiales y Métodos) utilizando células de *P. putida* KT2440 cultivadas hasta fase exponencial media en 4HBA 2.5 mM (barra gris), en la mezcla 4HBA 2.5 mM /AFA 2.5 mM (barra negra) o en citrato 0.3% como condición control (barra blanca). Los valores representados son el promedio de los obtenidos en tres muestras biológicas independientes. Las barras representan la desviación estándar de cada promedio.

1.4.3 Efecto del AFA sobre la ruta del 4HBA en una cepa mutante incapaz de metabolizar AFA.

Para determinar si el efecto de AFA sobre la expresión de la ruta del 4HBA se debe al propio AFA o, por el contrario, requiere el metabolismo de este último, se utilizó una cepa de *P. putida* KT2440 mutante en el gen *paaF* (PP_3279) que codifica la fenilacetato-CoA ligasa encargada de la primera etapa de la degradación de AFA (Fig. 6). Como cabría esperar, la cepa mutante *P. putida* KT2440*dpaaF* (Tabla 1) fue incapaz de utilizar AFA como única fuente de carbono y energía. Se determinó la expresión de la ruta de degradación de 4HBA valorando la actividad PobA en cultivos de *P. putida* KT2440*dpaaF* y de la cepa parental KT2440 creciendo en 4HBA, como condición control, o en la mezcla 4HBA/AFA.

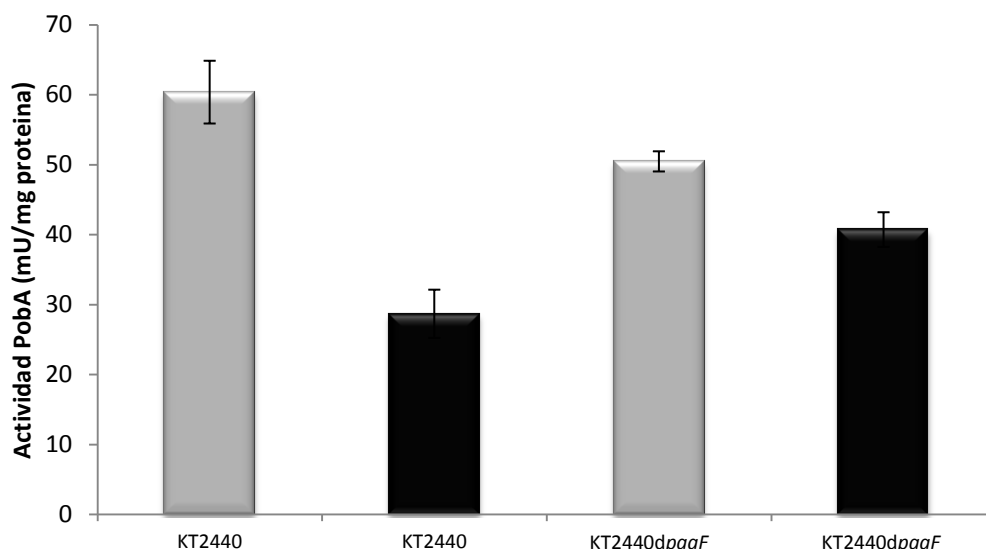


Figura 25. Actividad 4-hidroxibenzoato-3-monooxigenasa (PobA) en *P. putida* KT2440 y en la cepa mutante *P. putida* KT2440dpaaF cultivadas en 4HBA o en la mezcla 4HBA/AFA. *P. putida* KT2440 (KT2440) y *P. putida* KT2440dpaaF (KT2440dpaaF) fueron cultivadas en medio mínimo M63 con 4HBA 2.5 mM (barras grises) o con la mezcla 4HBA 2.5 mM /AFA 2.5 mM (barras negras). Cuando los cultivos alcanzaron la fase exponencial media la actividad 4-hidroxibenzoato-3-monooxigenasa (PobA) se determinó como se indica en el apartado 7.3 de Materiales y Métodos. Los valores de actividad son el promedio de los obtenidos en tres experimentos independientes. Las barras indican la desviación estándar de los valores obtenidos.

Los resultados obtenidos (Fig. 25) revelan que la reducción significativa de la actividad PobA cuando las células se cultivan en la mezcla 4HBA/AFA sólo se consigue si existe un metabolismo activo del AFA (cepa parental) pero no cuando el catabolismo del AFA está impedido (cepa mutante).

Por lo tanto, estos resultados sugieren que la represión de la ruta del 4HBA observada requiere de un metabolismo activo de AFA cuando *P. putida* KT2440 se cultiva en mezclas 4HBA/AFA. No obstante, no se puede descartar que la simple presencia de AFA también pueda ejercer una ligera represión de la ruta del 4HBA.

1.5. Efecto del AFA sobre la expresión de otras rutas aeróbicas clásicas en *P. putida* KT2440.

Para confirmar si el efecto del metabolismo del AFA sobre el catabolismo del 4HBA en *P. putida* KT2440 se extiende a otros compuestos aromáticos que son fuente de carbono para esta bacteria, se analizó el efecto que tiene la presencia de AFA cuando *P. putida* KT2440 se cultiva en otros compuestos aromáticos que se degradan a través de rutas aeróbicas clásicas, e.g., galato. Como se ha mencionado en el apartado 4.3 de la Introducción, el *cluster* génico *gal* es responsable de la ruta de degradación aeróbica de galato en *P. putida* KTGAL, una cepa derivada de *P. putida* KT2440 y adaptada a la utilización de galato como única fuente de carbono y energía. A diferencia de la ruta del β -cetoadipato, la ruta *gal* implica la ruptura extradiólica del anillo aromático (Fig. 8) (Nogales *et al.* 2011).

Para analizar la expresión de los genes *gal*, se analizó la actividad de los promotores catabólicos P_T y P_B (Fig. 8) clonados en los plásmidos pIZP_T (expresa la fusión traduccional $P_T::lacZ$) y pIZP_B (expresa la fusión traduccional $P_B::lacZ$) (Tabla 2), y se valoró la actividad β -galactosidasa de *P. putida* KTGAL conteniendo dichos plásmidos y cultivada en diferentes fuentes de carbono. Como se aprecia en la figura 26, la actividad de los promotores P_B y P_T se induce significativamente respecto a la situación control de crecimiento en AFA cuando las células se cultivan en galato como única fuente de carbono. Sin embargo, el crecimiento en la mezcla galato/AFA reduce significativamente la activación de los promotores mediada por el galato, sugiriendo que el AFA actúa como un claro inhibidor de la expresión de los genes *gal*.

Los resultados presentados revelan que el metabolismo del AFA en *P. putida* KT2440 actúa reprimiendo la expresión de los genes *gal*, un efecto que es todavía más evidente que el observado con la ruta del 4HBA.

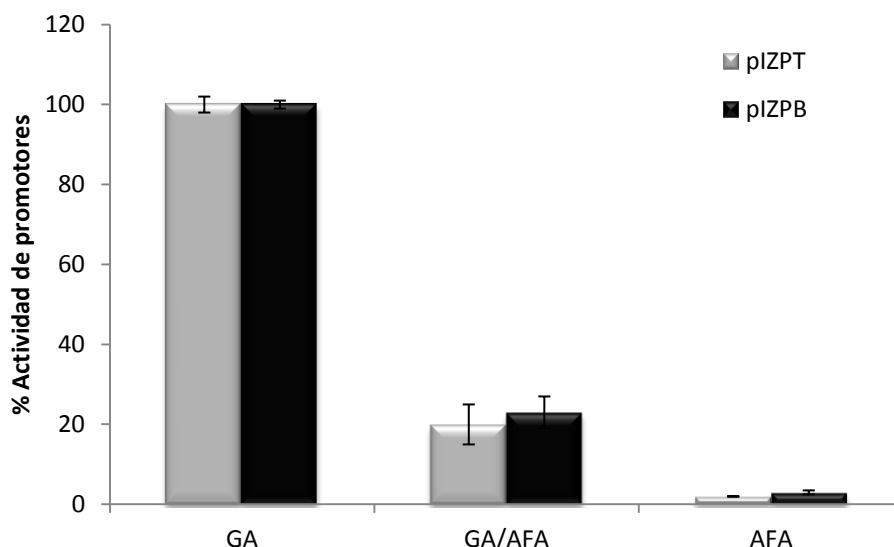


Figura 26. Efecto del AFA sobre la ruta del galato en *P. putida* KTGAL. *P. putida* KTGAL conteniendo los plásmidos pIZP_T (expresa la fusión traduccional $P_T::lacZ$; barras grises) o pIZP_B (expresa la fusión traduccional $P_B::lacZ$; barras negras) fue cultivada en medio mínimo MC con AFA 5 mM, galato (GA) 5 mM, o con la mezcla GA 2.5 mM/AFA 2.5 mM, y los cultivos fueron recogidos cuando alcanzaron una A_{600nm} de 0.5. Los ensayos de actividad β -galactosidasa se realizaron con células permeabilizadas como se indica en el apartado 7.4 de Materiales y Métodos. Los valores representados son la media de los obtenidos en tres réplicas biológicas independientes, y están dados como % de la actividad máxima obtenida en galato (3000 U. Miller para la fusión $P_T::lacZ$ y 12000 U. Miller para la fusión $P_B::lacZ$). Las barras indican la desviación estándar de los valores obtenidos.

1.6. Estudio de mutantes de *P. putida* que no muestran el efecto inhibitor del AFA sobre la ruta de degradación de galato.

Dado que los mecanismos que median la represión catabólica de la ruta gal no se han estudiado hasta la fecha en ningún organismo, y debido a que el efecto represor del metabolismo del AFA sobre la ruta gal era más acusado que el observado sobre la ruta del 4HBA (Fig. 26), se decidió utilizar la fusión $P_T::lacZ$ como elemento reportero para seguir profundizando en el efecto del metabolismo del AFA sobre la expresión de rutas aeróbicas clásicas de degradación de ácidos aromáticos en *P. putida*. Con este objetivo, se realizó una mutagénesis al azar de la cepa *P. putida* KTGAL (pIZP_T) para tratar de seleccionar clones mutantes que no presentasen represión de la fusión reportera $P_T::lacZ$ y, por lo tanto, identificar posibles elementos implicados en dicha regulación.

1.6.1 Construcción y selección de mutantes de *P. putida* KTGAL que no responden al efecto inhibitor del AFA sobre la ruta gal.

Se realizó una mutagénesis insercional al azar utilizando el mini-transposón mini-Tn5 (ver detalles en el apartado 6.1 de Materiales y Métodos) en *P. putida* KTGAL (pIZP_T) con el objetivo de obtener cepas mutantes que no presentasen represión de la fusión $P_T::lacZ$ mediada por el metabolismo del AFA. Los mutantes de *P. putida* KTGAL (pIZP_T) fueron seleccionados en placas de medio mínimo-agar que contenían X-Gal, galato, AFA y el antibiótico de selección (Km). La incorporación de X-Gal a la selección permitió analizar el color de las colonias de los exconjugantes. Mientras que *P. putida* KTGAL (pIZP_T) genera colonias blancas, dado que el metabolismo del AFA reprime la expresión de la fusión $P_T::lacZ$, los mutantes defectivos en dicha represión originarían colonias azules. Así, se obtuvieron alrededor de 50 clones azules, los cuales eran capaces de utilizar AFA como única fuente de carbono, y que probablemente posean la inserción del mini-Tn5 en genes implicados directa o indirectamente en la represión de la fusión $P_T::lacZ$ mediada por el metabolismo del AFA.

De los 50 clones azules, cuatro de ellos presentaban un color azul más intenso, por lo que fueron seleccionados y analizados mediante ensayos de actividad β -galactosidasa para determinar la actividad del promotor P_T . Los 4 mutantes analizados cultivados tanto en galato como única fuente de carbono como en la mezcla galato/AFA presentan una actividad β -galactosidasa similar (Fig. 27), lo que indica que en estos mutantes no existe represión del promotor P_T debida al metabolismo del AFA, a diferencia de lo que ocurre en la cepa parental *P. putida* KTGAL (pIZP_T) (Fig. 27). En conclusión, las cuatro cepas mutantes poseen inserciones del mini-transposón mini-Tn5 en genes presuntamente implicados en la represión mediada por el metabolismo del AFA.

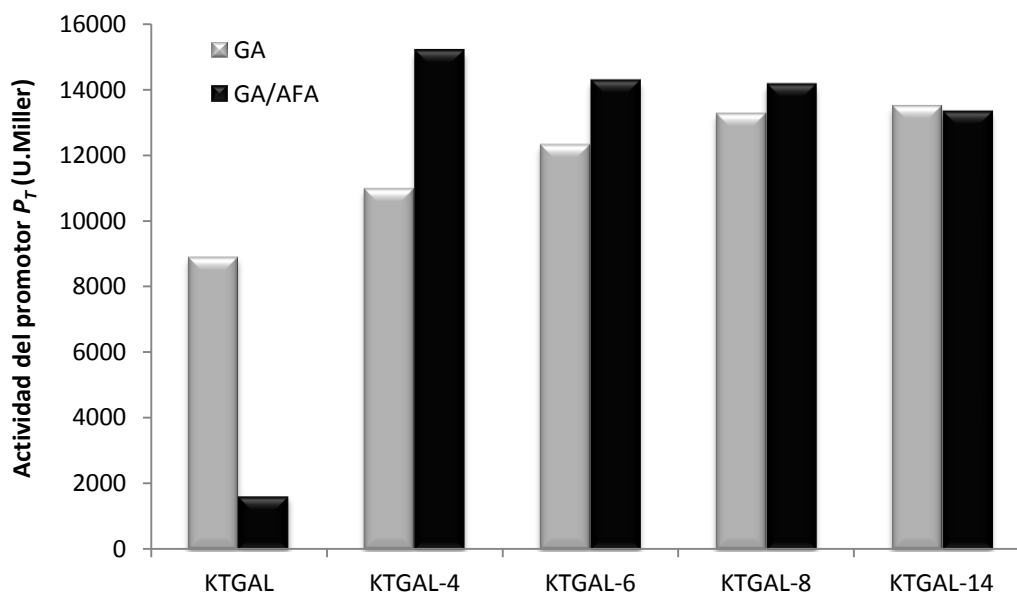


Figura 27. Efecto del AFA sobre la actividad del promotor P_T en *P. putida* KTGAL y en cuatro cepas mutantes. La cepa *P. putida* KTGAL (KTGAL) y las cepas mutantes *P. putida* KTGAL-4, KTGAL-6, KTGAL-8 y KTGAL-14 conteniendo el plásmido pIZP_T(P_T ::lacZ) fueron cultivadas en medio mínimo MC con GA 5 mM (barras grises), o la mezcla GA 2.5 mM/AFA 2.5 mM (barras negras). Los cultivos fueron analizados cuando alcanzaron una A_{600} de 0.5. Los ensayos de actividad β -galactosidasa se realizaron con células permeabilizadas como se indica en el apartado 7.6 de Materiales y Métodos. Se muestran los resultados de un experimento, los cuales fueron reproducibles en tres experimentos independientes.

1.6.2. Identificación de los genes interrumpidos en las cepas mutantes.

Para identificar los genes interrumpidos por el mini-transposón mini-Tn5 en las cuatro cepas mutantes, *P. putida* KTGAL-4, -6, -8, y 14, que no muestran represión del promotor P_T en presencia de AFA, se procedió a clonar un fragmento de DNA cromosómico de cada una de las cepas mutantes conteniendo el mini-Tn5, tal y como se detalla en el apartado 8 de Materiales y Métodos. Los plásmidos obtenidos, e.g., pUC19-Km4, pUC19-Km6, pUC19-Km8 y pUC19-Km14 (Tabla 2), fueron posteriormente secuenciados para identificar el fragmento cromosómico clonado como se detalla en el apartado 8 de Materiales y Métodos. El análisis de la secuencia obtenida permitió identificar los genes interrumpidos (Tabla 4).

Tabla 4: Identificación de los genes interrumpidos por el minitransposón mini-Tn5 en las cuatro cepas mutantes KTGAL.

Cepa	ORF	Longitud (aa)	Nombre del Producto*	Categoría GOG
KTGAL-4	PP_0988	951	Glicina deshidrogenasa (GcvP-1)	Metabolismo y transporte de aminoácidos
KTGAL-6	PP_2434	145	Proteína con dominio RES	-----
KTGAL-8	PP_3816	269	Componente de membrana de transportador tipo ABC	Metabolismo y transporte de iones inorgánicos
KTGAL-14	PP_0400	126	ApaG	Metabolismo y transporte de iones inorgánicos

*Nombre del producto del gen según la base de datos de genomas de *Pseudomonas* (www.Pseudomonas.com).

Dado que de las cuatro cepas analizadas, la que presentaba un gen mutado cuya función predicha podía estar más relacionada con procesos celulares de regulación y señalización (ver apartado 1.6.3) era la cepa KTGAL-14, se seleccionó ésta para posteriores estudios.

1.6.3. Análisis genético del fenotipo observado en *P. putida* KTGAL-14.

Como se ha indicado anteriormente, la cepa *P. putida* KTGAL-14 contiene la inserción del mini-transposón mini-Tn5 en el gen *apaG* (PP_0400) (Tabla 4). ApaG es una proteína de función desconocida que se ha descrito que interacciona con el dinucleótido Ap₄A (Plateau y Blanquet, 1994). En el genoma de *P. putida* KT2440, el gen *apaG* se encuentra agrupado con los genes que codifican las proteínas ApaH (diadenosina tetrafosfatasa) y GlpE (presunta tiosulfato sulfuro transferasa). De acuerdo al programa OperonDB de predicción de operones en procariotas (<http://csbl1.bmb.uga.edu/OperonDB/DOOR.php>), este agrupamiento génico en *P.*

putida KT2440 constituye un operón localizado entre los genes *ksgA* y *prkA* (Fig. 28) en la posición 484720 kb del genoma.

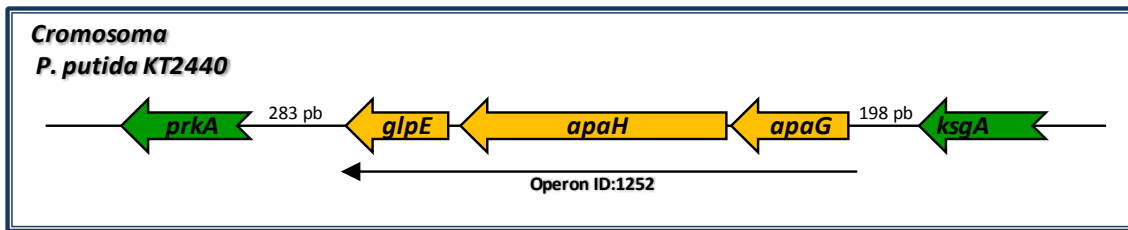


Figura 28. Organización del posible operón *apaG-apaH-glpE* en *P. putida* KT2440.

Como se ha indicado en el apartado 3.1 de la Introducción, la proteína diadenosina tetrafosfatasa (ApaH) cataliza la hidrólisis de una molécula de Ap₄A (Ap₄A) a 2 moléculas de ADP (Fig. 29), por lo que su ausencia aumenta los niveles de Ap₄A en la célula (Leveque *et al.*, 1990). Ap₄A es uno de los dinucleósidos polifosfato más estudiados, y es bien conocido que alteraciones en los niveles de éste afectan a distintos procesos bacterianos tales como las respuestas a estrés, patogénesis, formación de biofilm, tolerancia a antibióticos, y también represión catabólica. (Bochner *et al.*, 1984; Farr *et al.*, 1989; Ismail *et al.*, 2003; Hansen *et al.*, 2008; Monds *et al.*, 2010).

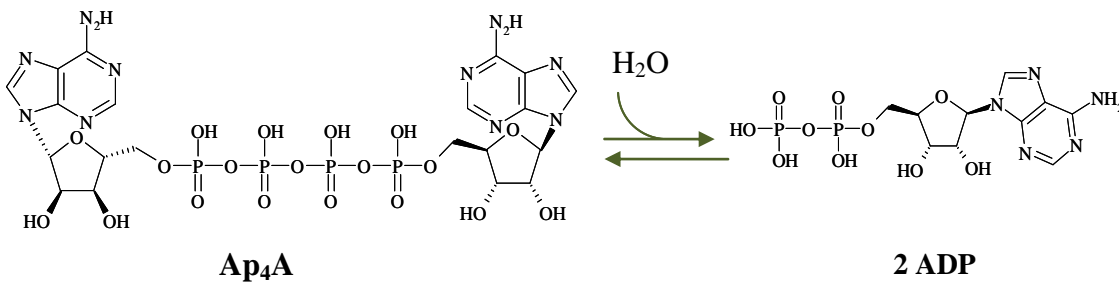


Figura 29. Esquema de la reacción catalizada por la diadenosina tetrafosfatasa ApaH (EC 3.6.1.41). Ap₄A (P₁,P₄-Bis (5'-adenosil) tetrafosfato).

La organización de los genes *apaG-apaH-glpE* en un presunto operón y el hecho de que la proteína ApaH se haya descrito en *E. coli* como la principal responsable del recambio de dinucleótidos derivados del Ap₄A, hacían sospechar que el fenotipo observado en la cepa KTGAL-14 era debido a la inactivación del gen *apaH* como consecuencia de los efectos polares de la inserción del minitransposón mini-Tn5 en el

gen *apaG*. Para confirmar si el fenotipo observado en el mutante *P. putida* KTGAL-14 era debido a la inactivación del gen *apaH*, éste fue interrumpido por recombinación homóloga utilizando el plásmido pK18mobapaH, que contiene un fragmento interno de dicho gen (Tabla 2), tal y como se describe en el apartado 6.1 de Materiales y Métodos, generándose la cepa *P. putida* KTGAL*dapaH* (Tabla 1). El estudio de la expresión de la fusión traduccional $P_T::lacZ$ en el mutante *P. putida* KTGAL*dapaH* reveló que, al igual que ocurría en la cepa *P. putida* KTGAL-14, no se producía represión del promotor P_T cuando las células se cultivaban en presencia de la mezcla GA/AFA (Fig. 30), confirmando que la inactivación del gen *apaH* es la causa de la pérdida del efecto inhibitor del AFA sobre la ruta *gal*.

Los resultados presentados sugieren, por tanto, una implicación del gen *apaH*, y por ende del Ap_4A , en el fenómeno de represión de los genes *gal* por el AFA y en el control del catabolismo de compuestos aromáticos en bacterias. En este sentido, una observación importante es que la cepa mutante KTGAL*dapaH* presenta un crecimiento significativamente más lento en AFA que la cepa parental KTGAL, sugiriendo un metabolismo del AFA alterado lo que explicaría, al menos en parte, la ausencia de represión de la ruta *gal* observada.

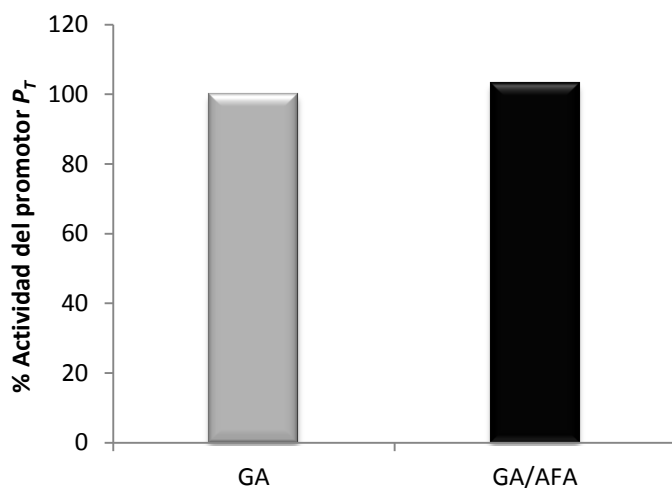


Figura 30. Actividad del promotor P_T en la cepa mutante *P. putida* KTGAL*dapaH*. La cepa mutante *P. putida* KTGAL*dapaH* conteniendo el plásmido pIZP $_T$ ($P_T::lacZ$) fue cultivada en medio mínimo MC conteniendo galato (GA) 5 mM (barra gris), o la mezcla GA 2.5 mM/AFA 2.5 mM (barra negra). Los cultivos fueron analizados cuando alcanzaron una A_{600nm} de 0.5. Los ensayos de actividad β -galactosidasa se realizaron con células permeabilizadas como se indica en el apartado 7.6 de Materiales y Métodos. Se muestran los resultados de un experimento, los cuales fueron reproducibles en tres experimentos independientes.

Dado que el gen *apaH* está implicado, directa o indirectamente, en el metabolismo eficaz del AFA en *P. putida* y hasta la fecha no se había estudiado la función de este gen en esta bacteria, se decidió realizar un estudio molecular más detallado de la inactivación del gen *apaH* en la cepa KT2440.

2. Estudio de fenotipos celulares asociados a la mutación del gen *apaH* en *P. putida* KT2440.

Relativamente pocos estudios han abordado sistemáticamente y a nivel molecular los efectos de la inactivación del gen *apaH* en bacterias. Como se ha indicado en el apartado 3.1 de la Introducción, se ha descrito que un mutante en el gen *apaH*, y por consiguiente con niveles elevados de Ap₄A, presenta una serie de fenotipos bien definidos en bacterias como *E. coli*, *P. fluorescens* y *Salmonella typhimurium*. Algunos de los fenotipos observados son: i) disminución de la movilidad; ii) aumento en la formación de biofilm; iii) disminución de la producción de sideróforos; iv) disminución de la resistencia a distintos tipos de estrés, e.g., estrés oxidativo y térmico (Bochner *et al.*, 1984; Farr *et al.*, 1989; Ismail *et al.*, 2003; Hansen *et al.*, 2008; Monds *et al.*, 2010).

Para analizar el efecto que ejerce la inactivación del gen *apaH* en *P. putida* KT2440, se procedió a construir la cepa *P. putida* KT2440 Δ *apaH* (ver apartado 6.2 de Materiales y Métodos) que contiene una delección del gen *apaH* y no mantiene ninguna resistencia antibiótica. Posteriormente, se realizó un estudio de algunos fenotipos asociados a la cepa mutante *P. putida* KT2440 Δ *apaH*.

2.1 Efecto de la mutación *apaH* en la morfología de *P. putida* KT2440 Δ *apaH*.

Se analizó primero el efecto de la delección del gen *apaH* sobre la morfología de *P. putida* KT2440. Cuando se cultivaron las cepas *P. putida* KT2440 y KT2440 Δ *apaH* y se analizaron muestras al microscopio de contraste de fase a lo largo de la curva de crecimiento, no se observaron diferencias ni en el tamaño de las bacterias ni en la morfología piriforme que caracteriza a la cepa parental KT2440 (Fig. 31), sugiriendo que la inactivación del gen *apaH* no ocasiona un cambio aparente en la morfología de las células de *P. putida*.

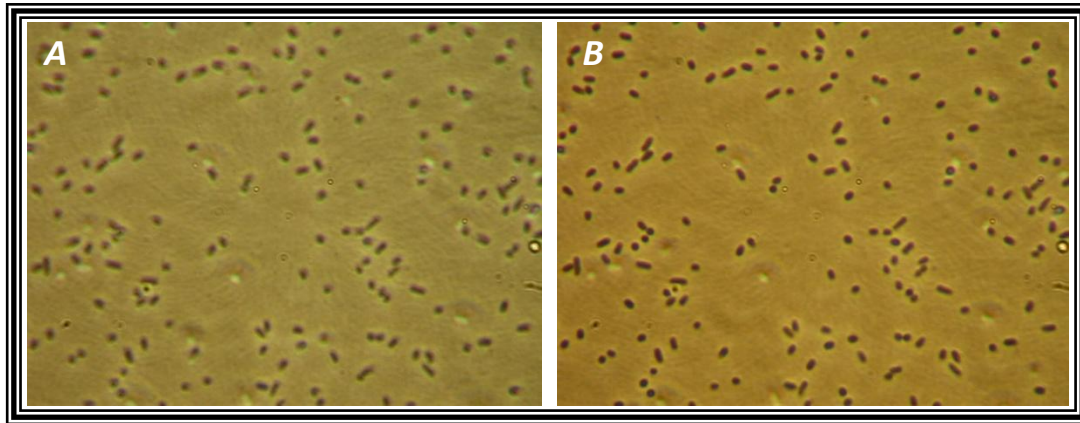


Figura 31. Análisis al microscopio óptico de células de *P. putida* KT2440 y *P. putida* KT2440Δ*apaH*. Las células fueron cultivadas en medio mínimo M63 con citrato 0.3% como única fuente de carbono y energía. Las fotografías de cultivos en fase exponencial tardía de *P. putida* KT2440 (A) y *P. putida* KT2440Δ*apaH* (B) se tomaron al microscopio de contraste de fase (x 1000 aumentos).

2.2 Producción de sideróforos en *P. putida* KT2440 y *P. putida* KT2440Δ*apaH*

Uno de los fenotipos causados por la inactivación del gen *apaH* en *P. fluorescens* es la significativa reducción en la síntesis de sideróforos tales como la pioverdina (Monds *et al.*, 2006). *P. putida* KT2440, al igual que otras cepas del género *Pseudomonas*, sintetiza y excreta este sideróforo al medio de cultivo cuando crece en un medio con baja concentración de hierro (Matthijs *et al.*, 2009).

Para determinar si la mutación del gen *apaH* conlleva una reducción en la síntesis de pioverdina en *P. putida* KT2440, se comparó la producción de este sideróforo en la cepa parental y en el mutante *apaH* creciendo en medio M9 (limitado en hierro) suplementado con citrato como fuente de carbono. Como se muestra en la figura 32, el mutante en el gen *apaH* presenta una disminución en la producción de pioverdina de casi 4 veces con respecto a la cepa parental KT2440.

El gen *apaH* de *P. putida* KT2440 se clonó en el plásmido pIZ1016 bajo el control del sistema regulador *lacI/Ptac*, generándose el plásmido pIZ*apaH* (Tabla 2). Dicho plásmido se utilizó para complementar la cepa mutante KT2440Δ*apaH* y analizar si se restablecía el fenotipo de la cepa parental. La complementación de la cepa mutante KT2440Δ*apaH* con el gen *apaH* revirtió la producción de pioverdina, resultando en niveles de producción 2 veces superiores a los de la cepa KT2440 (Fig. 32). Estos resultados sugieren que la producción de pioverdina en las condiciones de crecimiento utilizadas es inversamente proporcional a los niveles de Ap₄A en la célula, confirmando

que la inactivación del gen *apaH* afecta negativamente a la producción de este sideróforo en *P. putida* KT2440.

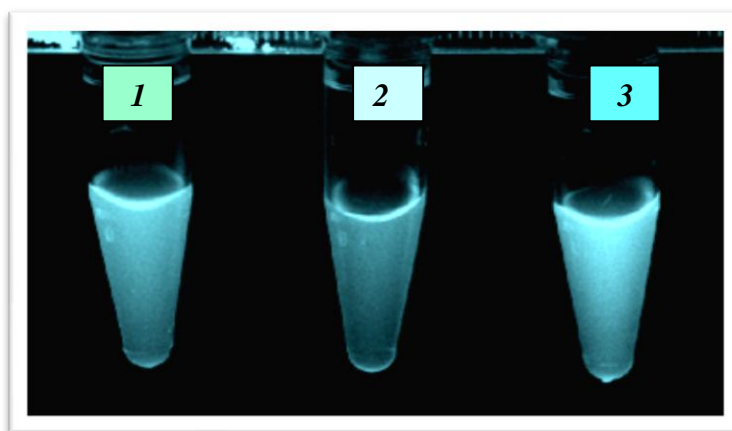


Figura 32. Producción del sideróforo pioverdina en distintas cepas de *P. putida* KT2440. Las cepas *P. putida* KT2440 (1), *P. putida* KT2440 Δ *apaH* (2) y *P. putida* KT2440 Δ *apaH* (pIZapaH) (3) fueron cultivadas en medio M9 utilizando citrato 0.3% como única fuente de carbono y energía, y se muestra la fluorescencia de los cultivos cuando éstos alcanzaron la fase estacionaria de crecimiento. La producción de pioverdina en la fase estacionaria del crecimiento se cuantificó valorando la absorbancia a 400 nm, tal y como se detalla en el apartado 13 de Materiales y Métodos. La $A_{400\text{nm}}$ para las distintas cepas fue: 0.14 (KT2440), 0.04 (KT2440 Δ *apaH*), 0.35 (KT2440 Δ *apaH*(pIZapaH)).

2.3 Análisis de la movilidad de *P. putida* KT2440 y *P. putida* KT2440 Δ *apaH*.

Se ha descrito que la mutación en el gen *apaH* de *E. coli* genera un fenotipo de movilidad reducida (Farr *et al.*, 1989). Dado que *P. putida* KT2440 es también una bacteria móvil, se realizaron estudios de movilidad tipo *swimming* y *swarming* para determinar si la mutación en el gen *apaH* afectaba a estas movilidades. Los resultados obtenidos a las 24 h de incubación confirmaron que el mutante *apaH* presenta una disminución de ambos tipos de movilidad (Fig. 33). No obstante, a tiempos de incubación más largos el halo de crecimiento de la cepa mutante acaba por ser similar al mostrado por la cepa parental (datos no mostrados). El efecto negativo de la delección del gen *apaH* en la movilidad de la cepa KT2440 Δ *apaH* se revierte cuando ésta contiene el plásmido pIZapaH que expresa el gen *apaH* (Fig. 33), evidenciando que la falta de un gen *apaH* funcional es la causa responsable de la movilidad reducida en la cepa mutante.

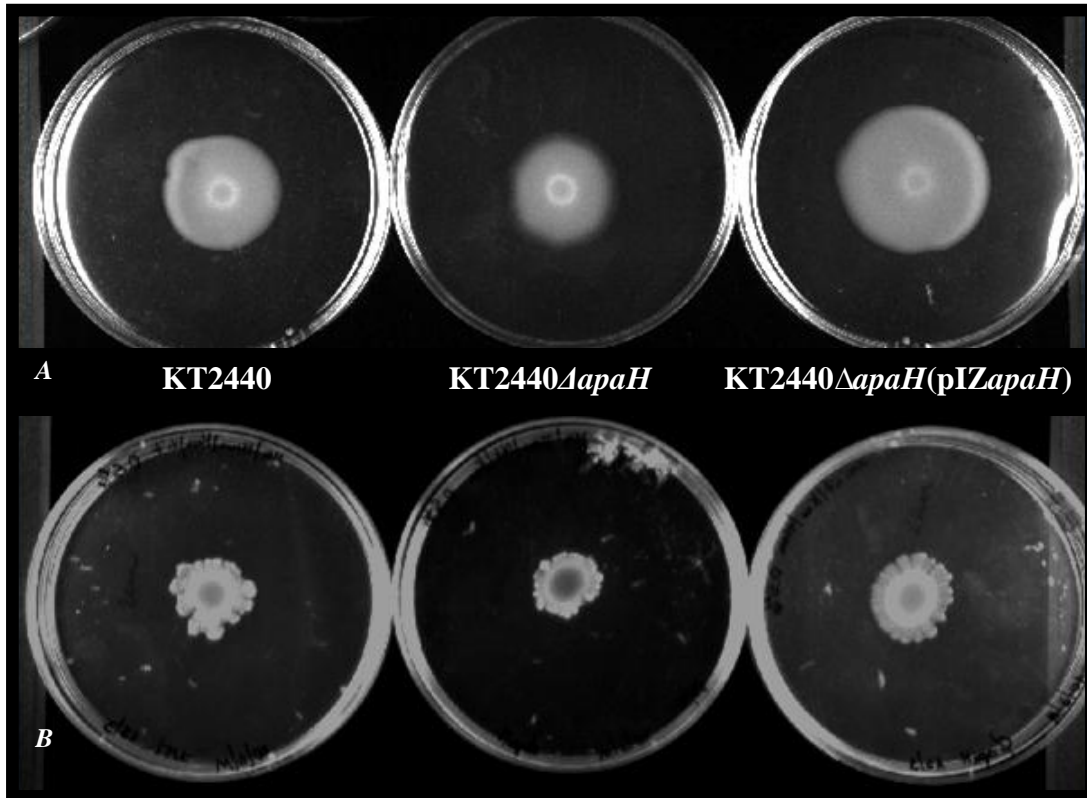


Figura 33. Movilidad de *P. putida* KT2440, KT2440ΔapaH y KT2440ΔapaH (pIZapaH). A. Movilidad tipo "swimming" monitorizada mediante el análisis de la formación de un halo tras 24 h de crecimiento en placas de medio M9-agar (0.3%), con citrato 0.3% como fuente de carbono. B Movilidad tipo "swarming" monitorizada mediante el análisis de la formación de un halo tras 24 h de crecimiento en placas de medio M9-agar (0.5%) conteniendo citrato 0.3% como fuente de carbono.

2.4 Formación de biofilm en *P. putida* KT2440 y *P. putida* KT2440ΔapaH

Se ha descrito que una mutación en el gen *apaH* incrementa la formación de biofilm en *P. fluorescens* (Monds *et al.*, 2010). Dado que *P. putida* KT2440 tiene la capacidad de formar biofilm, se analizó de forma cualitativa y cuantitativa la formación de biofilm en la cepa parental y en el mutante *apaH*. Los resultados obtenidos muestran que la cepa mutante en el gen *apaH* forma un biofilm de mayor espesor que la cepa parental (Fig. 34). Por otra parte, los análisis cuantitativos confirman un 30% más de formación de biofilm en la cepa mutante *apaH* que en la cepa parental KT2440 (Fig. 35). Por lo tanto, todos estos resultados revelan que la pérdida de un gen *apaH*

funcional en *P. putida* genera, al igual que en *P. fluorescens* (Monds *et al.*, 2010), una aumento en la biosíntesis de biofilm.

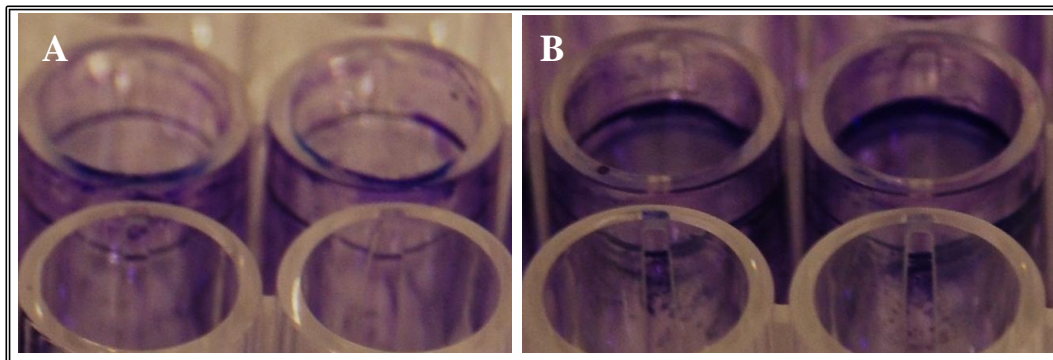


Figura 34. Formación de biofilm en cultivos de *P. putida* KT2440 y *P. putida* KT2440 Δ apaH. Formación de biofilm, evidenciada por tinción con el colorante cristal violeta, en placas multipocillo con medio LB después de 6 h de crecimiento, tal y como se detalla en el apartado 9 de Materiales y Métodos. Las fotografías muestran el biofilm procesado de *P. putida* KT2440 (A) y *P. putida* KT2440 Δ apaH (B)

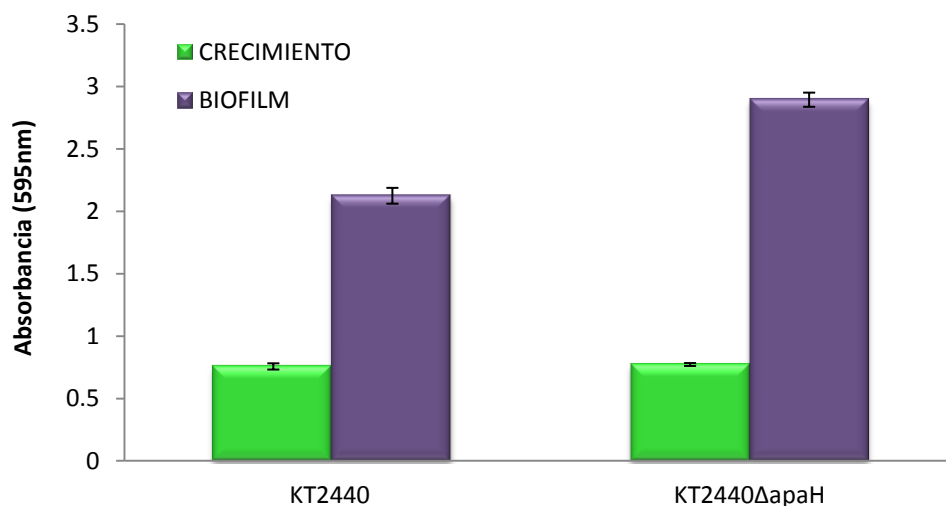


Figura 35. Cuantificación de la formación de biofilm por *P. putida* KT2440 y *P. putida* KT2440 Δ apaH. Las cepas *P. putida* KT2440 y *P. putida* KT2440 Δ apaH fueron cultivadas en medio LB. La formación de biofilm se determinó valorando la absorbancia del cultivo (verde) y del biofilm teñido con cristal violeta (azul) a 595 nm, tal y como se detalla en el apartado 9 de Materiales y Métodos después de 6 horas de crecimiento. Los valores representados son la media de los obtenidos en tres muestras biológicas independientes. Las barras indican la desviación estándar de los valores obtenidos.

2.5 Resistencia a estrés oxidativo de *P. putida* KT2440 y *P. putida* KT2440 Δ *apaH*.

Una mutación en el gen *apaH* de *P. fluorescens* y *E. coli* provoca una disminución de la resistencia a estrés oxidativo (Johnstone y Farr, 1991; Monds *et al.*, 2010). Por ello, se analizó también el efecto del estrés oxidativo en el crecimiento de *P. putida* KT2440 y de la cepa mutante en el gen *apaH*. Para ello, ambas cepas fueron cultivadas en presencia de menadiona, un compuesto generador de estrés oxidativo en bacterias (Cabiscol *et al.*, 1999). Los resultados obtenidos muestran que la cepa parental es capaz de crecer en presencia de menadiona aunque presenta una fase de latencia mayor (6 h), y alcanza una A_{600} menor que si no se expone a este agente de estrés (Fig. 36). Por el contrario, la cepa mutante en el gen *apaH* no es capaz de crecer cuando se expone a menadiona (Fig. 36). Estos resultados están de acuerdo con la hipótesis de que la mutación en el gen *apaH* genera una hipersensibilidad al estrés oxidativo también en *P. putida*.

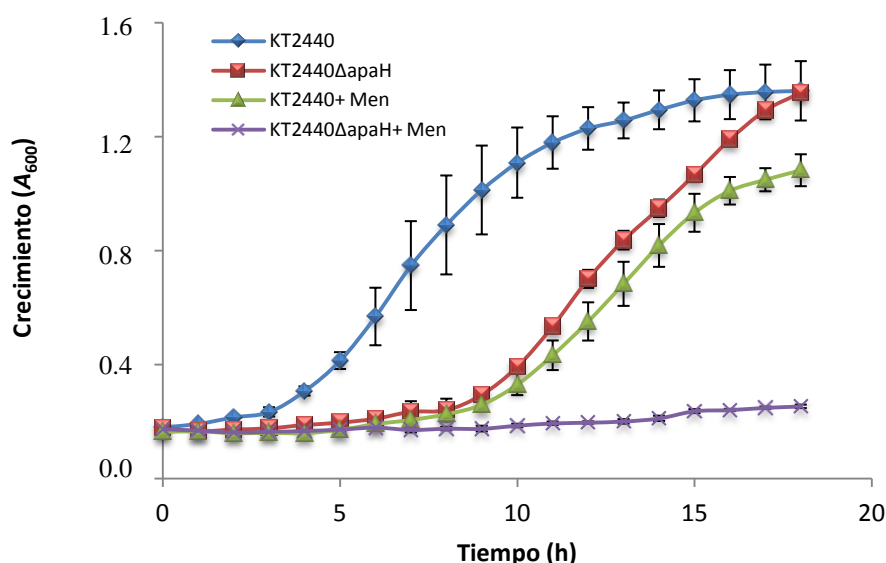


Figura 36. Crecimiento de *P. putida* KT2440 y *P. putida* KT2440 Δ *apaH* en presencia o ausencia del agente de estrés oxidativo menadiona. Ambas cepas fueron cultivadas en medio M63 suplementado con citrato 0.3% en presencia o ausencia de menadiona 0.2 mM. El crecimiento fue determinado por el incremento de A_{600} nm. Los valores representados son la media de los obtenidos en tres muestras biológicas independientes. Las barras indican la desviación estándar de los valores obtenidos.

2.6 Crecimiento de *P. putida* KT2440 Δ *apaH* en diferentes fuentes de carbono.

De los resultados presentados anteriormente se deduce que la inactivación del gen *apaH* en *P. putida* causa alteraciones fenotípicas similares a las ya descritas en otras bacterias. No obstante, también se había observado inicialmente que el mutante *apaH* presentaba un claro retraso en el crecimiento en AFA como fuente de carbono (apartado 1.6.3), un fenotipo asociado a la mutación del gen *apaH* que no se había estudiado con detalle hasta la fecha en ninguna bacteria. Para confirmar el efecto de la mutación *apaH* sobre el crecimiento de *P. putida* KT2440, se analizaron las curvas de crecimiento de la cepa parental y del mutante KT2440 Δ *apaH* en medio rico o en medio mínimo conteniendo distintos compuestos, tanto aromáticos, e.g., 4HBA, AFA, nicotinato, feniletilamina, *p*-cumarato, como no aromáticos, e. g., citrato, glucosa, succinato y octanoato, como única fuente de carbono y energía (Figs. 37 y 38). La característica común a todas las curvas de crecimiento obtenidas fue que la cepa mutante en el gen *apaH* presentó una fase de latencia incrementada respecto a la de la cepa parental en la misma fuente de carbono. En la Tabla 5 se detalla la duración de la fase de latencia de la cepa mutante en el gen *apaH* respecto a la de la cepa parental *P. putida* KT2440. En general, todos los compuestos aromáticos, junto con el succinato, son los que incrementan más significativamente la fase de latencia de la cepa mutante *P. putida* KT2440 Δ *apaH*. Por el contrario, el octanoato y el medio LB son los que menor impacto tienen sobre la fase de latencia de la cepa mutante.

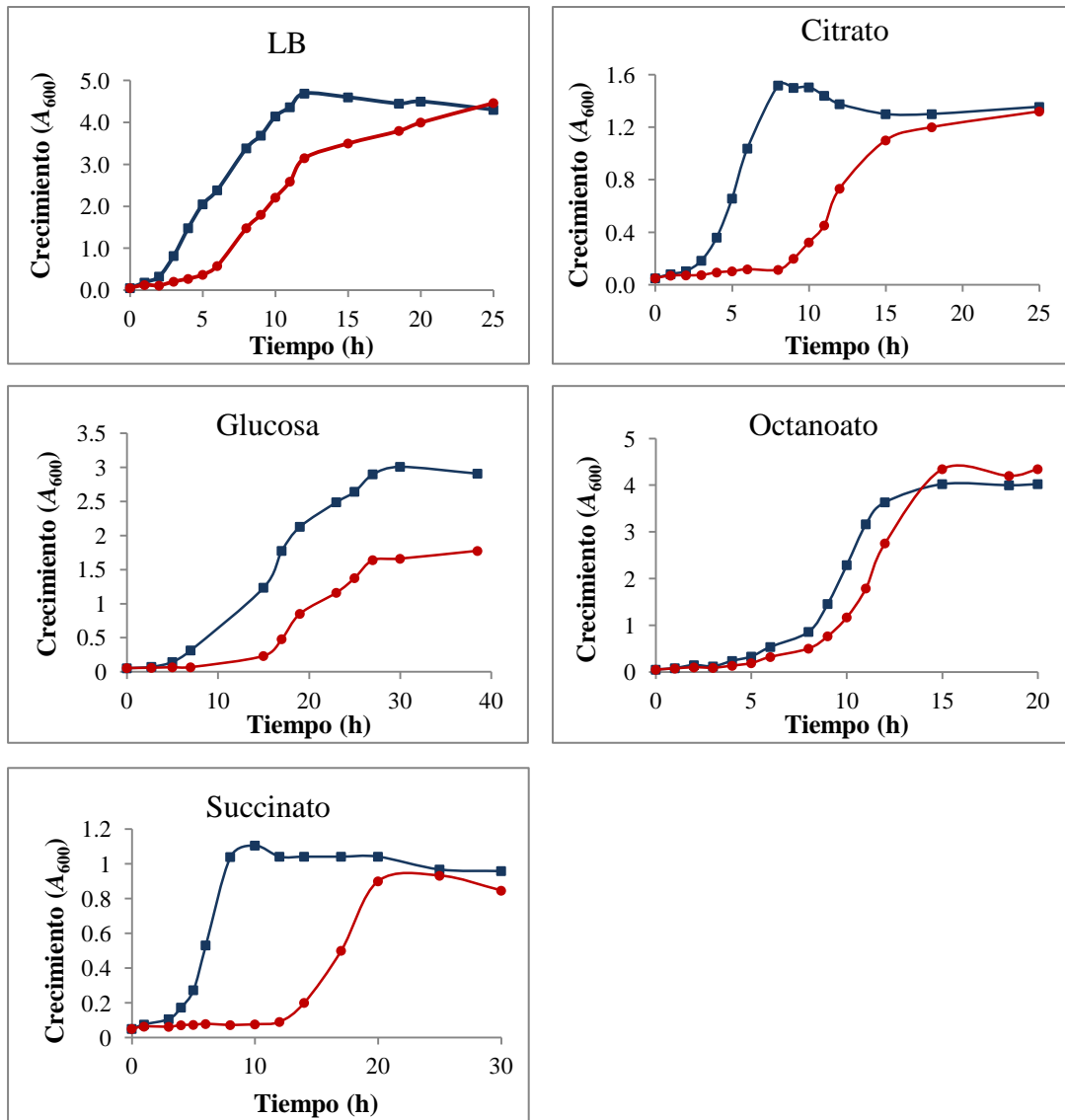


Figura 37. Crecimiento de *P. putida* KT2440 y *P. putida* KT2440 Δ *apaH* en diferentes fuentes de carbono no aromáticas. Tanto la cepa parental *P. putida* KT2440 (línea azul) como la cepa mutante *P. putida* KT2440 Δ *apaH* (línea roja) fueron cultivadas en medio LB o en medio M63 suplementado con diferentes fuentes de carbono (citrato 0.3 %, glucosa 0.3 %, octanoato 15 mM, succinato 0.3 %), y el crecimiento determinado por el incremento de A_{600} . Se muestran los resultados de un experimento. Estos resultados fueron reproducibles en tres experimentos independientes.

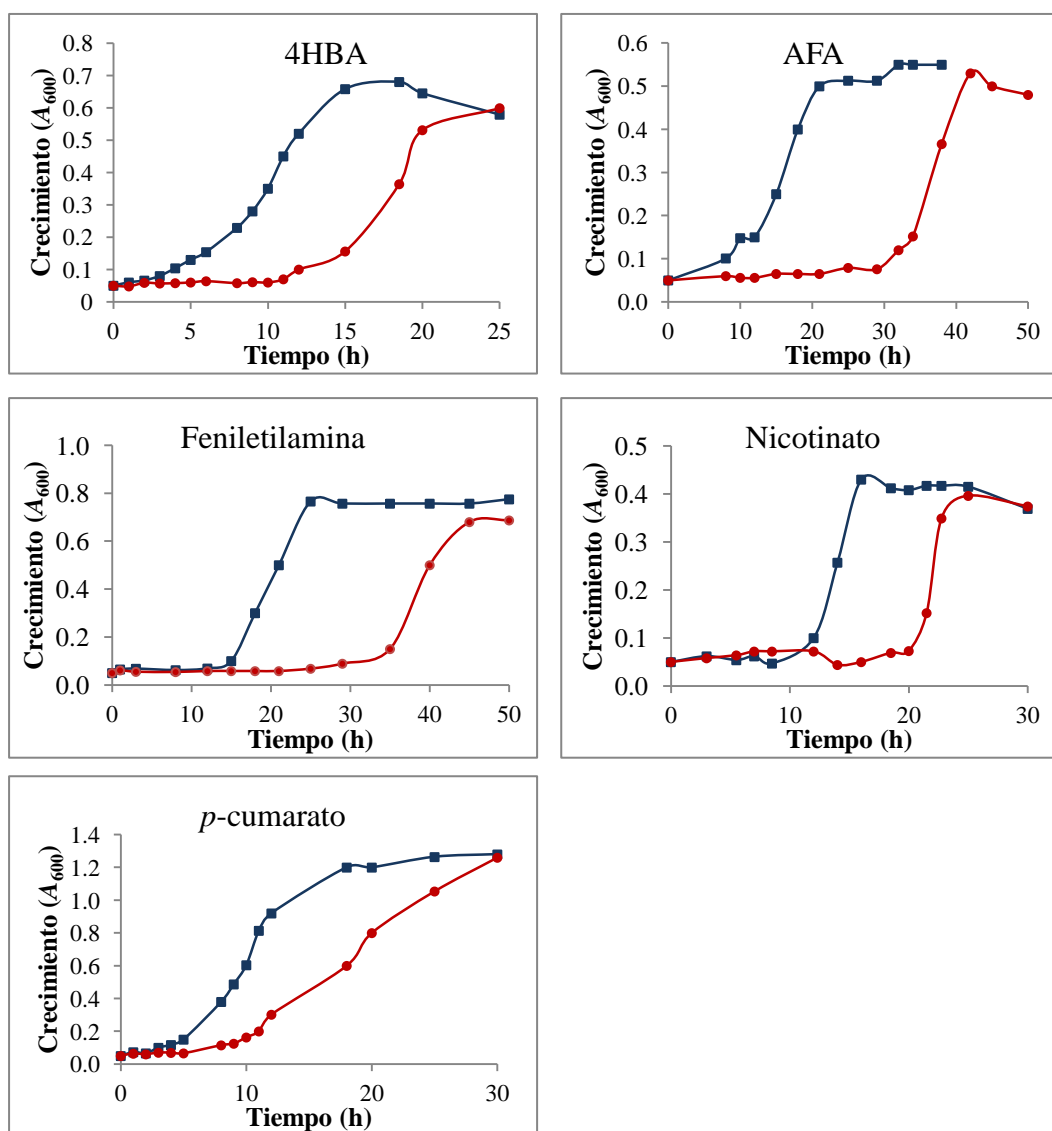


Figura 38. Crecimiento de *P. putida* KT2440 y *P. putida* KT2440 Δ *apaH* en diferentes fuentes de carbono aromáticas. Tanto la cepa parental *P. putida* KT2440 (línea azul) como la cepa mutante *P. putida* KT2440 Δ *apaH* (línea roja) fueron cultivadas en medio M63 suplementado con las diferentes fuentes de carbono (4HBA 5mM, AFA 2.5 mM, feniletilamina 5 mM, nicotinato 5 mM y *p*-cumarato 5 mM) y el crecimiento determinado por el incremento de A_{600} . Se muestran los resultados de un experimento. Estos resultados fueron reproducibles en tres experimentos independientes.

Cuando se complementó la cepa KT2440 Δ *apaH* con el plásmido pIZapaH (Tabla 2), la cepa complementada mostró una fase de latencia significativamente más corta que la de la cepa mutante, si bien no recuperó totalmente la fase de latencia de la cepa parental (Fig. 39). Estos resultados sugieren que si bien el fenotipo de la fase de latencia extendida puede ser achacado a los altos niveles de Ap₄A en la cepa mutante,

una disminución drástica de éstos, situación esperada en la cepa complementada con una dosis multicopia del gen *apaH*, puede también repercutir negativamente en una fase de latencia sensiblemente mayor que la observada en la cepa parental.

Tabla 5. Incremento de la fase de latencia de *P. putida* KT2440 Δ *apaH*.

Fuente de carbono	ΔFase latencia (h)*
Octanoato	1
LB	2
Citrato	4
<i>p</i>-cumarato	6
Glucosa	6
4HBA	8
Succinato	9
Nicotinato	10
Feniletilamina	15
AFA	20

(*) Los valores representan el incremento (en h) de la fase de latencia de la cepa KT2440 Δ *apaH* en relación a la duración de dicha fase en la cepa parental KT2440 cultivada en las mismas condiciones. Los crecimientos fueron realizados en LB, citrato 0.3 %, glucosa 0.3 %, octanoato 15 mM, succinato 0.3 %, 4HBA 5 mM, AFA 2.5 mM, feniletilamina 5 mM, nicotinato 5 mM y *p*-cumarato 5 mM. Se indican los valores obtenidos en un experimento y que fueron reproducibles en tres experimentos independientes. La duración de la fase de latencia fue determinada en horas desde el momento de la inoculación en el medio ($A_{600} = 0.05$) hasta que los cultivos alcanzaron una $A_{600} = 0.1$.

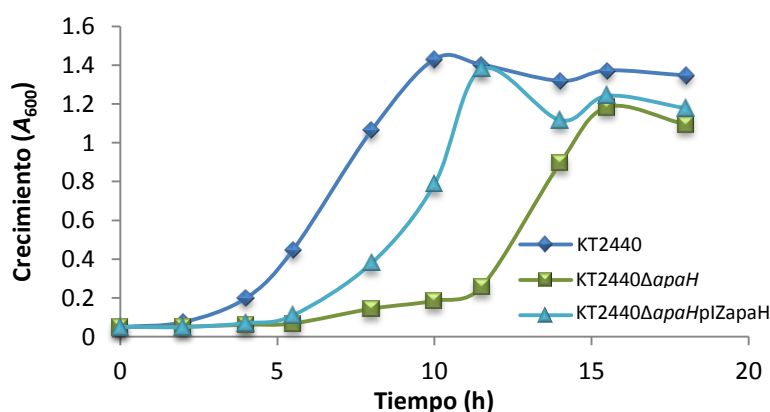


Figura 39. Crecimiento de *P. putida* KT2440, *P. putida* KT2440 Δ *apaH* y *P. putida* KT2440 Δ *apaH* (plZapaH) en citrato. Los cultivos fueron realizados en medio M63 suplementado con citrato 0.3% y el crecimiento determinado por el incremento en A_{600} . Se muestra el resultado de un experimento. Los valores obtenidos fueron reproducibles en tres experimentos independientes.

En conclusión, el análisis de la cepa KT2440 Δ *apaH* mostró que la inactivación del gen *apaH* causa un efecto pleiotrópico sobre la fisiología de esta bacteria, que se refleja en una serie de fenotipos muy característicos, tales como la reducción en la producción de pioverdina, una menor motilidad, una mayor producción de biofilm, una hipersensibilidad al estrés oxidativo, y una fase de latencia extendida cuando se cultiva en diferentes fuentes de carbono.

3. Caracterización del proteoma asociado a la inactivación del gen *apaH* en *P. putida* KT2440.

Para seguir profundizando en el estudio de los efectos inducidos por la inactivación del gen *apaH* en *P. putida* y tratar de caracterizar la base molecular de los fenotipos observados, se planteó como siguiente objetivo la utilización de un abordaje de biología de sistemas, basado en la comparación del proteoma de la cepa que contiene el gen *apaH* inactivado con el proteoma de la cepa parental.

3.1 Comparación del proteoma de *P. putida* KT2440 y *P. putida* KT2440 Δ *apaH* mediante electroforesis bidimensional en geles de poliacrilamida-SDS.

Con objeto de identificar la fase de crecimiento en la que podría haber mayores diferencias entre el proteoma de la cepa parental KT2440 y el de la cepa mutante KT2440 Δ *apaH*, se cultivaron ambas cepas en medio mínimo con AFA como única fuente de carbono y energía, y se recogieron muestras en la fase exponencial temprana (A_{600} 0.1), exponencial media (A_{600} 0.35) y exponencial tardía (A_{600} 0.5). Las muestras fueron tratadas y analizadas posteriormente mediante electroforesis bidimensional tal y como se describe en el apartado 17.1 de Materiales y Métodos. El análisis realizado evidenció que la ausencia del gen *apaH* induce cambios en el proteoma de la cepa KT2440 Δ *apaH* (Fig. 40), siendo estos cambios más evidentes y numerosos en células recolectadas en la fase exponencial media de crecimiento. Así, al menos tres proteínas se encuentran significativamente inducidas mientras que al menos diez están reprimidas en el mutante KT2440 Δ *apaH* (Fig. 40).

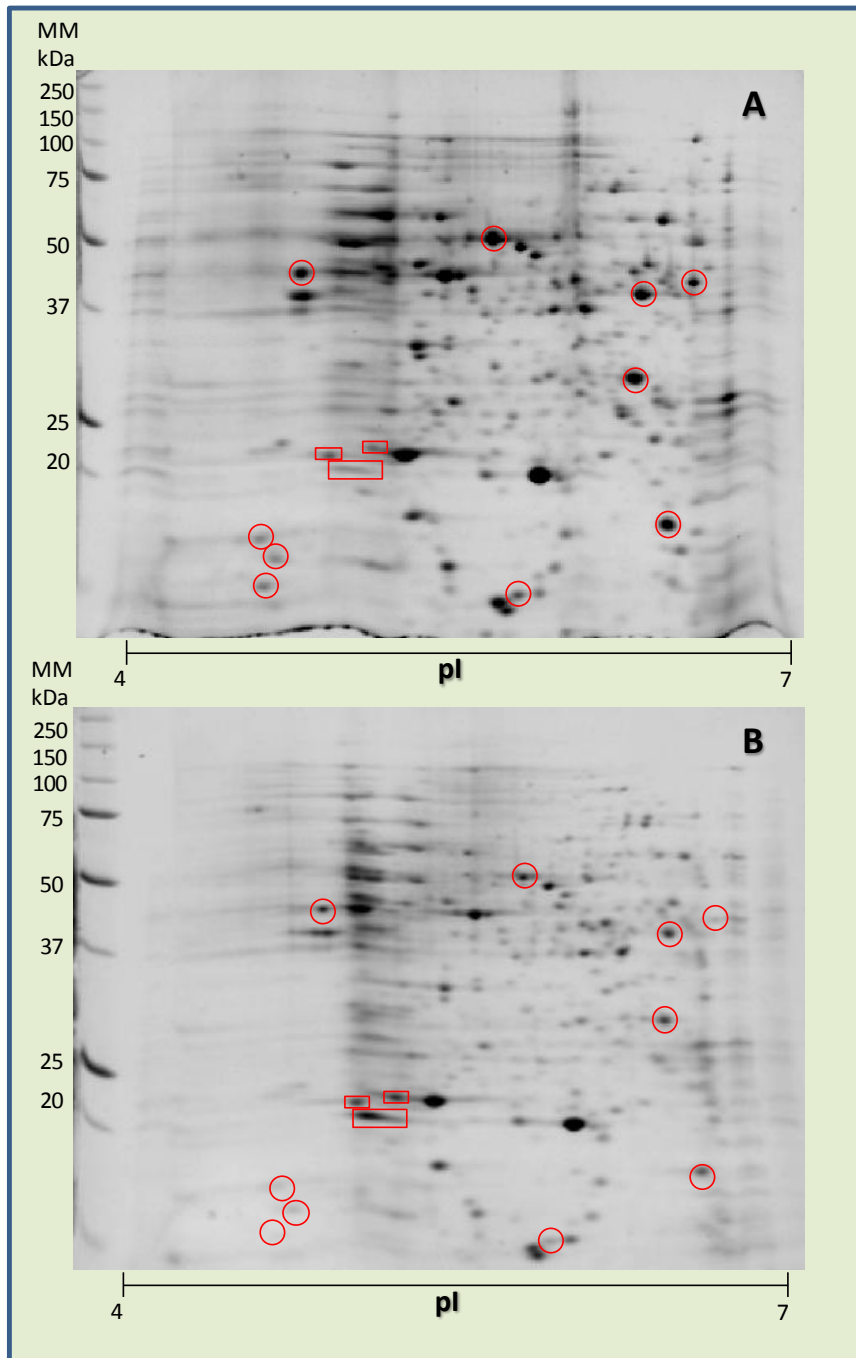


Figura 40. Patrón de proteínas totales de *P. putida* KT2440 y *P. putida* KT2440 Δ *apaH* cultivadas en AFA. *P. putida* KT2440 (panel A) y *P. putida* KT2440 Δ *apaH* (panel B) se cultivaron en medio mínimo M63 con AFA (2.5 mM) hasta alcanzar la fase exponencial media ($A_{600} = 0.35$). Se tomaron muestras de ambos cultivos y se extrajeron las proteínas totales como se detalla en el apartado 17.1 de Materiales y Métodos. Las proteínas se separaron por electroforesis bidimensional (2D-SDS-PAGE) y se tiñeron con SYPRO Ruby como se indica en el apartado 17.1 de Materiales y Métodos. Las figuras muestran los geles 2-D con un gradiente de pH no lineal entre 4-7. Las proteínas inducidas o reprimidas en la cepa mutante KT2440 Δ *apaH* con respecto a la cepa control KT2440 en al menos tres experimentos independientes se muestran con cuadrados y círculos rojos, respectivamente. A la izquierda de los geles se muestra el estándar de masa molecular (en kDa).

3.2. Comparación del proteoma de *P. putida* KT2440 y *P. putida* KT2440 Δ *apaH* mediante NanoLC-MS/MS.

Teniendo en consideración que el patrón de proteínas totales varía entre la cepa *P. putida* KT2440 y el mutante *P. putida* KT2440 Δ *apaH* cuando los cultivos se encuentran en la fase exponencial media de crecimiento, se seleccionó esta condición para realizar un análisis más preciso e identificar los cambios en el proteoma de ambas cepas utilizando la técnica de nanocromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem (NanoLC-MS/MS).

3.2.1 Identificación de las proteínas inducidas o reprimidas en *P. putida* KT2440 Δ *apaH*.

La identificación del proteoma de las cepas *P. putida* KT2440 y *P. putida* KT2440 Δ *apaH* cultivadas en AFA hasta alcanzar la fase exponencial media de crecimiento se determinó como se describe en el apartado 17.2 de Materiales y Métodos. Un total de 775 proteínas distintas (14% del total de marcos de lectura abiertos codificados en el genoma de la bacteria) fueron inequívocamente identificadas y se muestran en la Tabla S1 del Apéndice 1.

Para la comparación de los dos proteomas analizados se analizaron tres muestras biológicas distintas y se consideraron significativamente alteradas aquellas proteínas que su variación (*Fold change*) fue ± 2 , (t-student $P > 0,05$) entre las dos cepas. Un total de 117 proteínas se encontraron inducidas (*Fold Change* > 2) y un total de 55 proteínas estaban reprimidas (*Fold Change* < 2) en la cepa *P. putida* KT2440 Δ *apaH* con respecto a la cepa control *P. putida* KT2440. Para la anotación funcional de las proteínas identificadas se utilizó inicialmente la anotación automática previamente publicada del genoma de *P. putida* KT2440 en el servidor del NCBI (No. acceso PRJNA267), pero se sometió posteriormente a una revisión manual mucho más detallada utilizando una reconstrucción metabólica a escala genómica de *P. putida* KT2440 (*iJN1411*) (Nogales *et al*, pendiente de publicación). Además, las reacciones que participan en un mismo módulo metabólico están asignadas a subsistemas metabólicos específicos en *iJN1411*, lo que facilita la interpretación y constituye la mejor representación disponible actualmente de las capacidades metabólicas de *P. putida*. Aquellas proteínas identificadas y que no se encuentran incluidas en *iJN1411*, bien porque carecen de función metabólica o porque son de función desconocida, se agruparon según su

pertenencia a una determinada categoría COG (del inglés *Clusters of Orthologous Groups*).

Las proteínas inducidas o reprimidas en *P. putida* KT2440 Δ *apaH*, junto a su anotación funcional, subsistema metabólico (o categoría COG) y nivel de inducción/represión (*fold change*) se muestran en las tablas 6 y 7, respectivamente.

TABLA 6. Proteínas inducidas en el proteoma de *P. putida* KT2440 Δ *apaH*.

Subsistema metabólico (proteínas no incluidas en <i>iJN1411</i> en itálicas)	Proteína	Función asignada	Inducción (nº de veces respecto a la cepa control)
Proteínas de respuesta a estrés			
PP_0115	KatE	Catalasa (hidroperoxidasa clase II, HPII)	39,6
<i>PP_4021</i>	<i>Est</i>	<i>Posible peroxidasa</i>	12,6
<i>PP_0089</i>	<i>OsmC</i>	<i>Proteína osmóticamente inducible (reductasa de hidroperóxidos orgánicos)</i>	7
PP_3639	AhpD	Alquil-hidroperoxidasa	4,3
PP_2422	----	Alquil-hidroperoxidasa (familia carboximuconolactona descarboxilasa)	3
PP_3668	KatG	Catalasa/peroxidasa HPI	2,4
<i>PP_1859</i>	<i>Ohr</i>	<i>Proteína de resistencia a hidroperóxidos orgánicos</i>	2,0
Metabolismo de aminoácidos			
PP_2080	GdhB	NAD-glutamato deshidrogenasa	9,2
PP_4947	PutA	1-pirrolino-5-carboxilato deshidrogenasa	7,9
<i>PP_0357</i>	-	<i>Proteína con dominio ACT</i>	4,4
<i>PP_5028</i>	<i>Pip</i>	<i>Prolina iminopeptidasa</i>	4,3
PP_1001	ArcA	Arginina deiminasa	3,8
PP_0999	ArcC	Carbamato quinasa	3,5
PP_2375	MetH	5-metil-tetrahidrofolato-homocisteína metiltransferasa	3,0
PP_3768	AroE	Shiquimato-5-deshidrogenasa	3
PP_4666	MmsB	3-hidroxi-isobutirato deshidrogenasa	2,8
PP_5194	GcvT-2	Proteína T del sistema de degradación de glicina	2,8
PP_1000	ArgI	Ornitina carbamoiltransferasa	2,0
Ciclo Krebs (TCA)			
PP_2112	AcnA	Aconitato hidratasa 1	8,2
PP_1251	Mqo-2	Malato deshidrogenasa	5,6
PP_1755	FumC-2	Fumarato hidratasa, clase II (fumarasa)	4,05
PP_4011	Icd	Isocitrato deshidrogenasa	3,9
PP_2925	Mqo-3	Malato deshidrogenasa	3
PP_4193	SdhC	Subunidad succinato deshidrogenasa	2,3

Gluconeogénesis y glicolisis			
PP_4715	TpiA	Triosafosfato isomerasa	3,5
PP_1444	Gcd	Glucosa deshidrogenasa (pirroloquinolina-quinona)	2,4
PP_0339	AceE	Piruvato deshidrogenasa, componente E1	2,0
Transporte			
PP_5139	CadA2	Transportador ABC de cadmio (comp. periplásmico)	8,5
PP_4707		<i>Proteína periplásmica asociada a transporte.</i>	8
PP_1385	TtgB	Transportador (extrusión) drogas/solventes tipo RND (comp. membrana interna)	4,5
PP_1297	AapJ	Transportador ABC arginina	3,5
PP_1726	-	Transportador ABC (comp. periplásmico)	3,4
PP_0112	MetQ	Transportador ABC de metionina	2,8
PP_1384	TtgC	Transportador (extrusión) drogas/solventes tipo RND (lipoproteína membrana externa)	2,5
PP_4486	AotJ	Transportador ABC de aminoácidos básicos (Lys, Arg, Ornitina) (comp. periplásmico)	2,3
PP_1400	KgtP	Transportador MFS dicarboxilatos	2,2
PP_4935	MsbA	Transportador ABC de lípidos/fosfolípidos	2,1
PP_4867	-	Transportador ABC de Val, Ala, Ile (comp. periplásmico)	2
Metabolismo del glucógeno y disacáridos			
PP_4058	GlgB	1,4-alfa-glucano ramificante	7,5
PP_4060	GlgE	Maltosiltransferasa	7
PP_5041	GlgP	Glicógeno fosforilasa	6,8
PP_4059	TreS2	Maltoquinasa	6,3
PP_4055	GlgX	Isoamilasa	3
Biosíntesis de envoltura celular			
PP_0804		<i>Sistema secreción ABC de adhesinas</i>	8,6
PP_0570		<i>Posible lipoproteína</i>	7,2
PP_1780		<i>Posible manosiltransferasa</i>	7,1
PP_0956	KdsC	3-deoxi-mano-octulosanato-8-fosfatasa	4,2
PP_1333	MurF	UDP-N-acetilmuramoilalanil-D-glutamil-2,6-diaminopimelato--D-alanil-D-alanil ligasa	4
PP_1339	DdlB	D-alanina-D-alanina ligasa B	3,7
PP_3134	-	<i>Posible transferasa</i>	3,6
PP_0806	-	<i>Presunta proteína de adhesión a superficie</i>	3,4
PP_2306	-	<i>Posible lipoproteína</i>	3,3
PP_0168	LapA	<i>Proteína de adhesión a superficie</i>	3,1
PP_4570	LpxO	Proteína biosintética de lipopolisacárido	2,6
PP_2121	-	<i>Posible lipoproteína</i>	2,5
PP_1786	-	<i>Posible glicosil transferasa,</i>	2,4
Fosforilación oxidativa			
PP_0813	CyoB	Citocromo oxidasa bo3, subunidad I	2,5

PP_4651	CioA	Citocromo oxidasa bd, subunidad I	2,1
Degradación de compuestos aromáticos			
PP_3569	QuiA	Quinato deshidrogenasa	19
PP_4620	HmgB	Fumarilacetacetasa	2,3
Metabolismo de PHAs			
PP_5007	PhaF	Fasina asociada al gránulo de PHAs (GA2)	2,9
PP_0763	-	Ácido graso de cadena media- CoA ligasa	2,6
Biosíntesis de biotina			
PP_0366	BioD	Detiobiotina sintetasa	2,1
PP_0364	BioH	Pimeloil-[ACP] metil éster esterasa	2
Metabolismo del hierro			
PP_4856		<i>Bacterioferritina</i>	10
PP_1082	<i>Bfr</i>	<i>Bacterioferritina</i>	2,8
PP_4217	FpvA	Precursor del receptor de ferrioverdina	2,5
Metabolismo de nucleótidos (fuente alternativa de carbono y nitrógeno)			
PP_3099	PuuD	Uricasa	5,4
PP_1037	PurL	Fosforibosilformilglicinamidina sintetasa	2,1
Metabolismo de ácidos grasos			
PP_1893	FadE	Acil-CoA deshidrogenasa	4,3
PP_4975	-	<i>Posible tioesterasa de acil-CoAs de cadena larga</i>	3,2
PP_3638	-	<i>Posible acil-CoA deshidrogenasa</i>	3
Vía de las pentosas fosfato			
PP_4043	Gnd	6-fosfogluconato deshidrogenasa EC-1.1.1.44	2,3
Otras proteínas. no incluidas en iJN1411 /Categoría COG			
Mecanismos de transducción de señales			
PP_4988	-	Proteína de quimiotaxis CheA (histidina quinasa sensora que controla pili tipo IV)	4,3
PP_5020	-	Proteína MCP (acceptora del grupo metilo) implicada en quimiotaxis	4,6
PP_3765	-	Regulador transcripcional MvaT	4,4
PP_3761	-	Histidina quinasa con varios dominios sensores	3,8
PP_3128	-	Posible tirosina quinasa	3,7
PP_2356	-	Proteína de la familia de los fitocromos	3,3
PP_4959	-	Regulador de respuesta con motivos PAS, DGC, EAL	3,3
PP_2947	-	Regulador transcripcional MvaT	2,6
PP_0397	-	Proteína serina quinasa PrkA	2,6
PP_4696	-	Regulador transcripcional de la familia Fis	2,4
Producción y conversión de energía			
PP_1661		Posible óxido-reductasa	13
PP_4760		Alcohol deshidrogenasa dependiente de zinc	6
PP_3443	-	Posible gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa	5

PP_1478	XenE	Posible reductasa de compuestos xenobióticos	4,4
PP_1659	-	Posible citocromo c	4
PP_0592	-	Proteína de la familia de deshidrogenasa/reductasa de cadena corta	3,2
PP_3839	AdIP	Alcohol deshidrogenasa dependiente de zinc	3,1
Replicación, recombinación y reparación de ADN			
PP_4546	HrpA	Helicasa dependiente de ATP	5,3
PP_2148	Mfd	Factor de reparación (posible helicasa)	3,3
PP_3691	-	Posible DNA helicasa	3,2
PP_4448	-	Proteína conservada	2,5
PP_1606	DnaE	DNA polimerasa III, subunidad alfa	2,5
Movilidad celular y secreción			
PP_1993		Proteína de formación de pili	12,2
PP_3100		Posible proteína ImpB de sistema secreción tipo VI	6,3
PP_0836	SecF	Proteína de secreción	4,3
PP_1502	-	Proteína de la familia OmpA	4,3
PP_3437	-	Proteína de membrana con dominio CBS	3,6
PP_4645	MscL	Proteína de canal iónico	3,2
PP_0707	MscS	Proteína canal iónico	2,2
PP_2089	OprF	Porina de la familia OprF	2,0
Biosíntesis, transporte y catabolismo de metabolitos secundarios			
PP_0711	-	Hidrolasa de la superfamilia isocorismatasa	3,3
PP_2652	-	Posible hidratasa/decarboxilasa	2,6
División celular y partición del cromosoma			
PP_4275	ZipA	Proteína de división celular	2,7
Metabolismo de cofactores y vitaminas			
PP_1291	-	Proteína de la familia PhoH (ATPasa)	3,6
PP_3508	CobW	Proteína de biosíntesis de cobalamina	3,3
PP_0541	-	Posible acetiltransferasa	2,1
Función desconocida			
PP_0886		Proteína conservada	5,6
PP_2059	-	Proteína de la familia CsbD	5,1
PP_1503	-	Proteína conservada	4,6
PP_0085	-	Proteína conservada	4,5
PP_0737	-	Proteína conservada	3,2
PP_0258	-	Proteína con dominio LysM	2,5
PP_2105	-	Proteína conservada	2,5
PP_3611	-	Proteína de función desconocida	2,5

TABLA7. Proteínas reprimidas en el proteoma de *P. putida* KT2440 Δ apaH

Subsistema metabólico (proteínas no incluidas en <i>i</i> JN1411 en <i>itálicas</i>)	Proteína	Función asignada	Represión (n° de veces respecto a la cepa control)
Metabolismo de Aminoácidos			
PP_0988	GcvP	Proteína P del sistema de degradación de Gly	-4,67
PP_4725	DapB	Dihidropicolinato reductasa	-4,29
PP_2453	AnsA	L-asparaginasa	-3,91
PP_5075	GltD	Glutamato sintasa, subunidad pequeña	-3,17
PP_1986	LeuD	3-isopropilmalato deshidratasa, subunidad pequeña	-2,7
<i>PP_1987</i>	-	<i>Posible metiltransferasa de la familia UbiE</i>	-2,67
PP_1079	ArgF	Ornitina carbamoiltransferasa	-2,44
PP_0596	BauA	beta-alanina--piruvato transaminasa	-2,33
PP_2928		Posible sacaropina deshidrogenasa (Lys biosíntesis)	-2,33
PP_1588	DapC	Succinildiaminopimelato transaminasa	-2,17
PP_0082	TrpA	Triptófano sintetasa, subunidad alfa	-2,12
Metabolismo de fuentes de carbono y nitrógeno alternativas			
PP_0838	SuhB	Inositol-fosfato fosfatasa	-3,63
PP_3602	KgsD	Cetoglutarato semialdehído deshidrogenasa	-3,17
PP_1842	PauD2	Glutamina amidotransferasa, clase I	-2,75
PP_0722	PrsA	Ribosa-fosfato pirofosfoquinasa	-2,27
<i>PP_3157</i>	-	<i>Proteína de la familia inositol monofosfatasa</i>	-2,09
PP_2334	PrpB	Metil-isocitrato liasa (Metb. propanoato)	-2
Transporte			
PP_1068	AatP	Transportador ABC (comp. unión ATP) de Asp y Glu	-2,44
PP_5179	PotG	Transportador ABC (comp. unión ATP) de putrescina	-2,4
PP_1071	AapJ	Transportador ABC (comp. periplásmico) de Asp y Glu	-2,03
Degradación de AFA			
PP_3279	PaaF	Fenilacetil-CoA ligasa	-2,32
PP_3278	PaaG	Subunidad 1 de la PA-CoA epoxidasa	-2,79
PP_3271	PaaM	Porina del sistema de transporte de AFA	-2,05
Metabolismo del azufre			
PP_1304	CysD	Dulfato adenililtransferasa, sub. 2	-2
Fosforilación oxidativa			
PP_4124	NuoG	NADH deshidrogenasa I (NdhD) subunidad G	-2,11
PP_4120	NuoB	NADH deshidrogenasa I (NdhD), subunidad B	-2

Metabolismo de ácidos grasos			
PP_4203	EtfD	Flavoproteína-ubiquinona óxido-reductasa	-2,2
PP_2137	FadA	3-oxoacil-CoA tiolasa	-2,03
Ciclo del glioxilato			
PP_4116	AceA	Isocitrato liasa	-3,41
PP_0356	GlcB	Malato sintasa	-2,63
Biosíntesis de cofactores y vitaminas			
PP_0362	BioB	Biotina sintetasa	-3,59
PP_5011	UbiE	Metiltransferasa de biosíntesis ubiquinonas	-2,71
Metabolismo del hierro			
PP_4646	FprB	Fe ³⁺ ferredoxina-NADP ⁺ reductasa	-2,56
Gluconeogénesis y Glicolisis			
PP_4487	Acs	Acetil-CoA sintetasa	-3,75
Metabolismo de purinas			
PP_4779	Amn	AMP nucleosidasa	-2
Biosíntesis de envoltura celular			
PP_1792	-	<i>Posible glicosil transferasa</i>	-5,25
PP_1323	GmhA	Fosfoheptosa isomerasa	-3
Metabolismo del glioxilato y dicarboxilatos			
PP_1764	Gph2	Fosfoglicolato fosfatasa	-2
Otras proteínas no incluidas en iJN1411/Categoría COG			
Traducción, estructura y biogénesis ribosomal			
PP_1111	-	Posible t-RNA sintasa	-3,5
PP_5044	-	Proteína unión a GTP (TypA/BipA)	-3,26
PP_0460	RpsC	Proteína ribosomal S3	-2,55
PP_1315	RplM	Proteína ribosomal L13	-2,25
PP_0478	RpsD	Proteína ribosomal S4	-2,15
Transporte y metabolismo de iones inorgánicos			
PP_1758	-	Proteína con dominio rodanasa	-2,5
Producción y conversión de energía			
PP_2426	-	Posible alcohol deshidrogenasa dependiente de zinc	-9,58
PP_3622	-	Posible óxido-reductasa dep. de molibdo-pterina, subunidad beta	-9,38
PP_3623	-	Posible citocromo c	-9,33
PP_3621	-	Posible óxido-reductasa dep. de molibdo-pterina, subunidad alfa	-7,75
PP_5378	-	Posible citocromo c	-3,33
PP_4315	-	Posible proteína de biosíntesis de fenazida	-2,5
Biosíntesis, transporte y catabolismo de metabolitos secundarios			
PP_1826	-	Hidrolasa de la superfamilia de las isocorismatasas	-2,25
Modificación post-traducciona, turnover de proteínas, chaperonas			
PP_0403	SurA	Proteína supervivencia SurA (foldasa)	-3,67

		periplásmica)	
PP_4008	ClpA	Proteasa Clp dependiente de ATP	-2,71
Transcripción			
PP_4722	GreA	Factor de elongación transcripcional GreA	-3,6
PP_4894	Hfq	Proteína Hfq de unión a RNA	-2.3

El análisis detallado de las proteínas que vieron alterada su expresión en la cepa KT2440 Δ *apaH* confirmó que participan tanto en el metabolismo central e.g., TCA, fosforilación oxidativa, metabolismo de aminoácidos, biosíntesis de envoltura celular etc., como en el metabolismo secundario e.g, proteínas de respuesta a estrés, metabolismo del glucógeno, metabolismo de PHAs, sistemas de transporte, etc. (Tablas 6 y 7). A continuación, se detallan algunos de los subsistemas metabólicos que muestran una mayor alteración en *P. putida* KT2440 Δ *apaH*.

3.2.2 Subsistemas metabólicos inducidos en *P. putida* KT2440 Δ *apaH*.

I. Proteínas de respuesta a estrés oxidativo.

La proteína más inducida en *P. putida* KT2440 Δ *apaH* es la catalasa KatE (PP_0115), la cual mostró una inducción de casi 40 veces con respecto a los niveles de expresión en la cepa KT2440 (Tabla 6). Esta proteína es una hidroxidasa de clase II, que descompone el peróxido de hidrógeno (H₂O₂) en agua y oxígeno, protegiendo así a la célula del daño que provocarían al DNA las especies reactivas de oxígeno (ROS). La proteína KatG (PP_3668), que tiene la función catalasa/peroxidasa, también se observa inducida (Tabla 6). Estas dos enzimas se activan como parte de la respuesta de estrés oxidativo mediada por el factor sigma RpoS en diversas bacterias (Keyer y Imlay., 1996; Henle y Linn., 1997; Baharoglu *et al.*, 2013). Adicionalmente, otras posibles peroxidases y proteínas de resistencia a hidroperóxidos orgánicos tales como las alquil-hidroperoxidases (PP_0089, PP_1859, PP_2422, PP_3639) se ven inducidas en la cepa mutante *apaH* (Tabla 6), sugiriendo que la acumulación de Ap₄A provoca la activación de una respuesta a estrés oxidativo en *P. putida*.

II. Ciclo del TCA y gluconeogénesis.

Algunas de las enzimas convencionales del ciclo del TCA, tales como la isocitrato deshidrogenasa (PP_4011) o la subunidad SdhC de la succinato

deshidrogenasa (PP_4193), se encuentran inducidas en el mutante *P. putida* KT2440 Δ *apaH* (Tabla 6). Sin embargo, lo más significativo es que varias isoenzimas de etapas clave del TCA, tales como la aconitato hidratasa A (PP_2112), malato deshidrogenasa dependiente de quinonas (PP_1251 y PP_2925) y la fumarato hidratasa de clase II FumC-2 (PP_1755), que sólo se inducen en condiciones no convencionales de crecimiento bacteriano (Chenier *et al.*, 2008), se mostraron inducidas en el mutante *P. putida* KT2440 Δ *apaH* (Tabla 6). Este resultado sugiere que la inactivación del gen *apaH* conlleva un cambio significativo en la maquinaria enzimática del metabolismo central de *P. putida*.

Igualmente significativo es la inducción de algunas enzimas que participan tanto en glicolisis como en gluconeogénesis, tales como la triosa fosfato isomerasa TpiA (PP_4715) que cataliza la reacción reversible de gliceraldehído-3-fosfato a dihidroxiacetona fosfato. En ausencia de glucosa en las condiciones de estudio, esta inducción podría indicar un incremento en el flujo gluconeogénico en el mutante *apaH* con respecto a la cepa parental.

III. Metabolismo de PHAs.

La cepa *P. putida* KT2440 Δ *apaH* mostró la inducción de algunas proteínas relacionadas con el metabolismo de los polihidroxicanoatos (PHAs) tales como la fosfotransferasa PhaF (PP_5007) y la proteína PP_0763 que podría estar implicada en la activación de *R*-hidroxiácidos. No obstante, la determinación del contenido de PHAs en cultivos de la cepa parental *P. putida* KT2440 y en el mutante *apaH* recolectados en fase exponencial tardía ($A_{600} = 0.6$) no detectó la acumulación significativa de PHAs en ninguna de ellas.

IV. Otras proteínas inducidas.

Entre otras proteínas inducidas en la cepa mutante *P. putida* KT2440 Δ *apaH* cabe destacar a CyoB (PP_0813) y CioA, (PP_4651), dos proteínas que forman parte de citocromo oxidasa terminal. Algún sistema de óxido-reducción posiblemente implicado en la generación de energía y regeneración de poder reductor también se ha visto incrementado en el mutante *apaH* (Tabla 6). Además se detectaron significativamente inducidas un elevado número de proteínas involucradas en la utilización de aminoácidos, fuentes alternativas de carbono, y transportadores tales como PutA (PP_4947), GdhB (PP_2080), QuiA (PP_3569), TgbB (PP_1385) y AroE

(PP_3768). Tanto QuiA (quinato deshidrogenasa) como AroE (siquimato deshidrogenasa) catalizan reacciones involucradas en la biosíntesis de triptófano, fenilalanina y tirosina generando el intermediario corismato.

Como ya hemos determinado en la sección 2.2, la cepa mutante en el gen *apaH* presenta una disminución de su capacidad de producir y/o excretar pioverdina, indicando que el mutante puede estar sufriendo alteraciones en el metabolismo del hierro. Cuando analizamos el proteoma observamos la inducción de proteínas implicadas en la captación del hierro como las bacterioferritinas PP_4856 y PP_1082 (Tabla 6) y el precursor del receptor del complejo ferripioverdina (FpvA). Por otro lado, hay proteínas del metabolismo del hierro reprimidas, como la PP_4646 (FprB), lo que está de acuerdo con la hipótesis de que el metabolismo del hierro está alterado en el mutante *apaH*.

Algunas de las proteínas de la biosíntesis de la envoltura celular se encuentran inducidas en la cepa mutante, tales como KdsC (PP_0956), MurF (PP_1333) y la proteína LapA (PP_0168), esta última involucrada directamente en la formación de biofilm, lo que está de acuerdo con el hecho de que la cepa mutante en el gen *apaH* presente una mayor producción de biofilm que la cepa parental. Otras proteínas involucradas en la biogénesis de la envoltura celular, el metabolismo de lípidos, y la movilidad y secreción, vieron también incrementada su expresión en la cepa mutante (Tabla 6). Estos resultados sugieren cambios significativos en el programa morfológico de *P. putida* KT2440 Δ *apaH*,

V. Metabolismo del glucógeno y la trehalosa.

Uno de los grupos de proteínas que muestra una inducción más significativa en el mutante *apaH* es el que podría estar implicado en el metabolismo del glucógeno y su conversión a trehalosa (Tabla 6). La trehalosa es un disacárido no reductor acumulado por muchos organismos en respuesta a un estrés osmótico (McIntyre *et al.*, 2007). Estos resultados sugieren que los niveles elevados de Ap₄A en *P. putida* están induciendo una respuesta similar a la generada por un estrés osmótico.

La posible acumulación de trehalosa en la cepa *P. putida* KT2440 Δ *apaH* implicaría una mayor resistencia en respuesta a un estrés osmótico. Para confirmar experimentalmente si la cepa mutante en el gen *apaH* presentaba una mayor resistencia al estrés osmótico que la cepa parental, se procedió a realizar un experimento de choque osmótico con ambas cepas. Para ello, se cultivaron ambas cepas en medio LB y se las

sometió a la presencia de una elevada concentración de NaCl durante 15 min. La cepa KT2440 Δ *apaH* presentó un 30% más de supervivencia que la cepa parental KT2440 (Fig. 41). Estos resultados demuestran que la cepa mutante en el gen *apaH* posee una mayor resistencia que la cepa parental al estrés osmótico generado por el NaCl, presumiblemente debida a la acumulación de trehalosa, un fenotipo que hasta hoy no se había descrito en un ningún organismo mutante *apaH*.

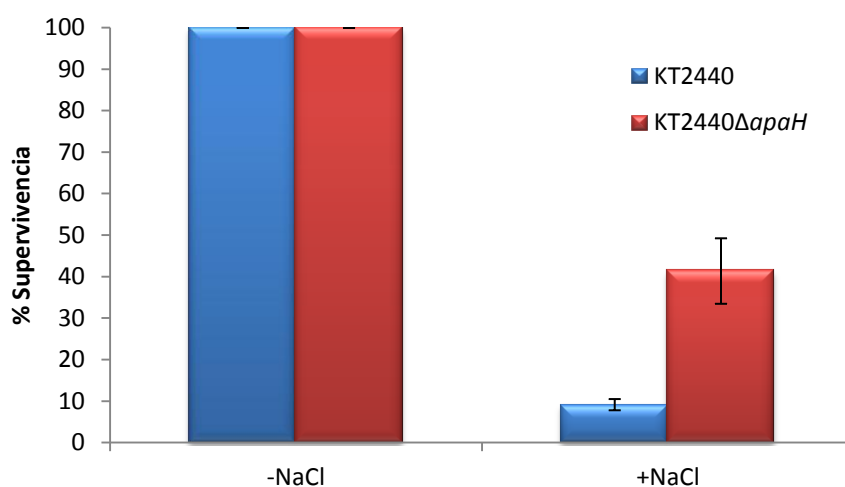


Figura 41. Supervivencia de *P. putida* KT2440 y *P. putida* KT2440 Δ *apaH* al estrés osmótico. Se cultivaron *P. putida* KT2440 (azul) y *P. putida* KT2440 Δ *apaH* (rojo) en medio LB durante toda la noche y se resuspendieron en medio LB fresco en ausencia (-NaCl) o en presencia (+NaCl) de NaCl 3 M. Después de 15 min de incubación, se procedió a realizar un conteo de células viables en placas de agar-LB.

3.2.3. Subsistemas metabólicos reprimidos en *P. putida* KT2440 Δ *apaH*.

Las proteínas que vieron reducida su expresión en la cepa *P. putida* KT2440 Δ *apaH* están implicadas en distintos procesos celulares, y se detallan a continuación.

I. Ruta paa de degradación de AFA.

Algunas proteínas involucradas en la degradación del AFA, como la porina PaaM (PP_3271) o las enzimas PaaF (PP_3279), responsable de la primera etapa de la ruta, y PaaG (PP_3278), subunidad de la monooxigenasa multicomponente (epoxidasa) que cataliza la segunda etapa de la ruta, se encuentran reprimidas en la cepa mutante en el gen *apaH* (Tabla 7).

Otras proteínas de la ruta paa que también se encuentran reprimidas en el mutante *apaH*, aunque menos de dos veces (y por ello no se incluyen en la Tabla 7), son: PaaE (PP_3280), PaaI (PP_3276), PaaK (PP_3274), PaaB (PP_3283) y PaaN (PP_3270) (Tabla S1). Dado que la cepa parental y el mutante *apaH* poseen tasas de crecimiento similares cuando utilizan AFA como única fuente de carbono y energía (Fig. 38), un mayor nivel de expresión de las enzimas de la ruta paa en la cepa parental que en el mutante *apaH* no parece implicar una mayor velocidad de crecimiento de dicha cepa parental en AFA.

II. Ciclo del glioxilato, fosforilación oxidativa y conversión de energía.

Dos enzimas claves del ciclo del glioxilato, i.e., GlcB malato sintasa (PP_0356) y AceA isocitrato liasa (PP_4116), se encuentran reprimidas en el mutante *apaH* (Tabla 7), lo que podría sugerir que la ruta no oxidativa del glioxilato está desfavorecida en dicho mutante.

Se observaron también reprimidas en el mutante *apaH* la subunidad B (PP_4120) y G (PP_4124) del complejo I de la NADH deshidrogenasa (Tabla 7). Estos datos sugieren que en *P. putida* KT2440 Δ *apaH* los niveles de NADH podrían ser inferiores a los que existen en la cepa parental, requiriendo por tanto menores niveles del complejo NADH deshidrogenasa.

Sistemas de óxido-reducción presuntamente implicados en la generación de energía y regeneración de poder reductor (e.g., PP_3621-3623; Tabla 7) también se han visto reprimidos en el mutante *apaH*, soportando la hipótesis de un significativo cambio en los niveles de los diferentes equivalentes de reducción en *P. putida* KT2440 Δ *apaH*.

III. Metabolismo de aminoácidos y síntesis proteica.

Como se ha indicado en el apartado anterior (3.2.2, sección IV), algunas proteínas implicadas en el metabolismo de ciertos aminoácidos se ven inducidas en la cepa mutante *apaH*. Sin embargo, proteínas implicadas en la biosíntesis de la lisina (PP_4725) o la asparagina (PP_2453) están reprimidas en el mutante *apaH*. En el metabolismo de algunos aminoácidos ciertas isoenzimas están inducidas y otras reprimidas. De esta manera, la proteína PP_0988 (GcvP) de la síntesis de glicina está reprimida pero, por el contrario, se induce la proteína PP_5194 la cual es parte

fundamental de otro complejo glicina descarboxilasa que podría compensar la deficiencia del primero. Asimismo, mientras que la proteína GdhB (PP_2080), glutamato deshidrogenasa dependiente de NAD^+ de la ruta de biosíntesis de glutamato, está fuertemente inducida (Tabla 6), la proteína GltD (PP_5075) que desarrolla similar función se encuentra reprimida. La diferencia entre estas dos proteínas es el cofactor que utilizan, y mientras que PP_2080 utiliza NAD^+ , la proteína PP_5075 utiliza NADP^+ . Este intercambio de enzimas puede estar dando cuenta de una limitación de un equivalente reductor particular en la cepa mutante en el gen *apaH*. En conclusión, estos resultados ponen de manifiesto que *P. putida* KT2440 Δ *apaH* está sufriendo un remodelamiento del metabolismo de aminoácidos en respuesta a los niveles alterados de Ap_4A .

Merece la pena destacar que los niveles de algunas de las proteínas ribosomales, e.g., PP_1315, PP_0460, PP_0478 (Tabla 7) y PP_0450-0470 (Tabla S1), t-RNA sintetasas (PP_1111), y chaperonas (PP_4008, PP_0403) están reducidos en el mutante *apaH*, sugiriendo una menor síntesis proteica general en esta bacteria, pese a lo cual puede crecer a una tasa de crecimiento igual a la cepa parental.

IV. Sistemas reguladores.

La ausencia de un gen *apaH* funcional ocasiona una reducción en los niveles de la proteína Hfq (chaperona de RNA). Esta proteína funciona como un regulador global involucrado en multitud de procesos en bacterias tales como la respuesta a estrés mediada por RpoS, procesos de virulencia, biosíntesis de antibióticos, producción de biofilm, represión catabólica mediada por la proteína CRC (Crabbé *et al.*, 2011; Sonnleitner *et al.*, 2003). Por lo tanto, la represión de esta proteína podría estar implicada, al menos en parte, en el efecto pleiotrópico de la mutación *apaH* en *P. putida*. Igualmente se vio reprimido el factor de elongación de la transcripción GreA (PP_4722). GreA se une a la RNAP y desempeña un papel fundamental en la elongación e iniciación de la transcripción. Entre otros, controla positivamente la expresión del promotor *rrnB* P1 responsable de la expresión de operones de rRNA. Por tanto, la represión de GreA podría ser responsable, indirectamente (Potrykus *et al.*, 2006; Vinella *et al.*, 2012), de la disminución en los niveles de ciertas proteínas ribosomales que se observa en la cepa mutante.

En resumen, el análisis proteómico de *P. putida* KT2440 Δ *apaH* revela que la inactivación del gen *apaH* ocasiona una significativa alteración del metabolismo (primario y secundario), afectando también al programa morfológico y de estrés de la bacteria.

4. Estudio del programa metabólico asociado a la mutación del gen *apaH*.

Con objeto de estudiar con más detalle el impacto de la mutación *apaH* en el metabolismo central y en la producción de energía en *P. putida*, nos planteamos la utilización de iJN1411 para estimar *in silico* la distribución del flujo de carbono tanto en la cepa KT2440 Δ *apaH* como en la cepa KT2440 parental utilizando como restricciones adicionales los datos de proteómica de alto rendimiento presentados más arriba.

4.1 Construcción de modelos metabólicos específicos de condición para las cepas *P. putida* KT2440 y *P. putida* KT2440 Δ *apaH*.

Una de las aplicaciones más interesantes de los modelos metabólicos basados en restricciones es la posibilidad no sólo de interpretar sino también de contextualizar datos provenientes de tecnologías ómicas. En este sentido, es posible la construcción de modelos específicos de condición incorporando datos de expresión en una determinada condición de cultivo y aplicándolos como restricciones adicionales (McCloskey *et al.*, 2013). Con objeto de profundizar en el estudio del metabolismo del mutante *P. putida* KT2440 Δ *apaH* y de contextualizar los datos provenientes de la proteómica de alto rendimiento (apartado 3.2), se procedió a la construcción de dos modelos específicos de condición (ver apartado 18 de Materiales y Métodos) que simularan el metabolismo del mutante *apaH* y de la cepa parental en presencia de AFA como fuente de carbono. Para ello, partiendo del modelo metabólico global de *P. putida* KT2440 (iJN1411) se eliminaron aquellas reacciones catalizadas por proteínas que no habían sido detectadas en los experimentos de proteómica. Se tomó como indicativo de la presencia de una determinada proteína el hecho de haber sido detectada en al menos dos de las tres réplicas biológicas analizadas. Aquellas reacciones llevadas a cabo por proteínas no detectadas y que eran esenciales para que el modelo funcionase *in silico* se mantuvieron en los modelos específicos para garantizar la funcionalidad de éstos, tal y como se ha descrito previamente (Becker *et al.*, 2008). De esta forma, y mediante la incorporación

de los datos de proteómica obtenidos de la cepa parental y la cepa mutante, se construyeron los modelos específicos de crecimiento en AFA iJN1411_AFA e iJN1411_AFA_ApaH, respectivamente.

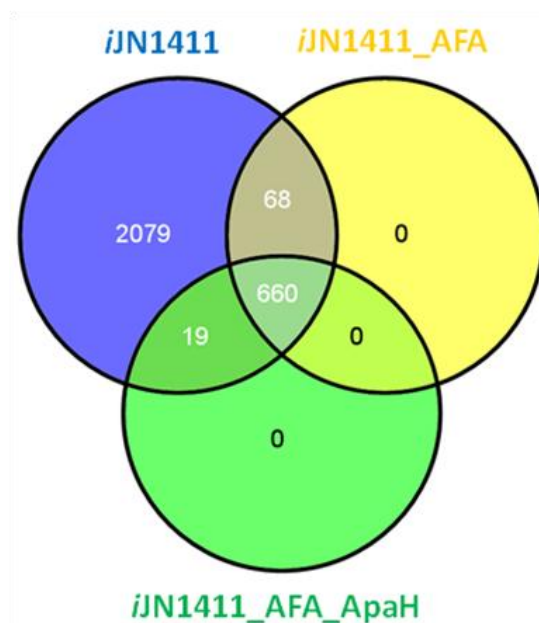


Figura 42. Contenido metabólico de iJN1411, iJN1411_AFA, e iJN1411_AFA_ApaH. Diagrama de Venn representando el contenido metabólico (medido en número de reacciones) tanto del modelo global de *P. putida* iJN1411 (azul) como de los modelos específicos de crecimiento en AFA de la cepa silvestre iJN1411_AFA (amarillo) y de la cepa mutante en el gen *apaH*, iJN1411_AFA_ApaH (verde).

El análisis de los modelos específicos mostró que el contenido metabólico resultante de iJN1411_AFA e iJN1411_AFA_ApaH es muy similar, cubriendo alrededor del 33% del contenido metabólico del modelo global (Fig. 42). Ambos modelos comparten un total de 660 reacciones, poseyendo iJN1411_AFA e iJN1411_AFA_ApaH un total de 68 y 19 reacciones exclusivas, respectivamente (Tablas 8 y 9). Es interesante el hecho de que ambos modelos específicos de crecimiento en AFA, especialmente el de la cepa parental, muestren una gran cantidad de reacciones enzimáticas exclusivas involucradas en el metabolismo de ácidos grasos, lo que sugiere un intenso remodelamiento del metabolismo y la composición de ácidos grasos en ambas cepas. Por otro lado, similar conclusión puede extraerse de la abundancia de reacciones asociadas al metabolismo de PHAs y que son exclusivas de la cepa parental. El modelo de la cepa mutante, sin embargo, presenta reacciones

exclusivas de transporte de metales pesados, lo que podría indicar una mayor capacidad de la cepa mutante de tolerar estos metales. La reacción triosa fosfato isomerasa (TpiA) también está únicamente presente en iJN1411_AFA_ApaH, lo cual permitiría el flujo del carbono a través de la gluconeogénesis, y sugiere que esta vía metabólica está específicamente inducida en la cepa mutante en el gen *apaH*. Esta observación está igualmente soportada por la presencia exclusiva en la cepa mutante de reacciones involucradas en el metabolismo del glucógeno. Por otra parte, varias reacciones implicadas en el metabolismo del piruvato, del glioxilato y glicerol, tales como la acetil-CoA sintetasa, la piruvato carboxilasa, la glioxilato carboxi-quinasa y la D-gliceraldehído deshidrogenasa, están ausentes en el modelo específico de la cepa mutante, sugiriendo un metabolismo reducido del glioxilato y glicerol (para la biosíntesis de glicero-lípidos) en *P. putida* KT2440 Δ *apaH*.

Tabla 8. Reacciones exclusivas del modelo específico de condición de la cepa *P. putida* KT2440 creciendo en AFA como fuente de carbono (iJN1411_AFA). Las reacciones no asociadas a genes fueron eliminadas de la comparación.

Abreviatura	Nombre de la Reacción	Subsistema Metabólico
23CTI1	<i>Cis-trans</i> isomerasa de ácidos grasos	Metabolismo de ácidos grasos
23CTI2	<i>Cis-trans</i> isomerasa de ácidos grasos	Metabolismo de ácidos grasos
ACOAD14f	Acil CoA deshidrogenasa	Metabolismo de ácidos grasos
ACOAD16f	Acil CoA deshidrogenasa	Metabolismo de ácidos grasos
ACOAD18f	Acil CoA deshidrogenasa	Metabolismo de ácidos grasos
ACOAD1f	Acil CoA deshidrogenasa	Metabolismo de ácidos grasos
ACOAD21f	Acil CoA deshidrogenasa	Metabolismo de ácidos grasos
ACOAD24f	Acil CoA deshidrogenasa	Metabolismo de ácidos grasos
ACOAD25f	Acil CoA deshidrogenasa	Metabolismo de ácidos grasos
ACOAD2f	Acil CoA deshidrogenasa	Metabolismo de ácidos grasos
ACOAD3f	Acil CoA deshidrogenasa	Metabolismo de ácidos grasos
ACOAD4f	Acil CoA deshidrogenasa	Metabolismo de ácidos grasos
ACOAD5f	Acil CoA deshidrogenasa	Metabolismo de ácidos grasos
HACD1i	Acil CoA deshidrogenasa	Metabolismo de ácidos grasos
KAT12	Acil CoA aciltransferasa	Metabolismo de ácidos grasos
KAT14	Acil CoA aciltransferasa	Metabolismo de ácidos grasos
KAT16	Acil CoA aciltransferasa	Metabolismo de ácidos grasos
KAT18	Acil CoA aciltransferasa	Metabolismo de ácidos grasos
KAT19	Acil CoA aciltransferasa	Metabolismo de ácidos grasos
KAT2	3 Cetoacil tiolasa	Metabolismo de ácidos grasos
KAT22	Acil CoA aciltransferasa	Metabolismo de ácidos grasos

KAT23	Acil CoA aciltransferasa	Metabolismo de ácidos grasos
KAT26	Acil CoA aciltransferasa	Metabolismo de ácidos grasos
KAT3	3 cetoacil CoA tiolasa	Metabolismo de ácidos grasos
KAT4	3 cetoacil CoA tiolasa	Metabolismo de ácidos grasos
KAT5	3 cetoacil CoA tiolasa	Metabolismo de ácidos grasos
KAT6	3 cetoacil CoA tiolasa	Metabolismo de ácidos grasos
TDECOAI	<i>Cis-trans</i> isomerasa de ácidos grasos	Metabolismo de ácidos grasos
ACS	Acetil CoA sintetasa	Metabolismo del piruvato
ALCD19	Alcohol deshidrogenasa	Metabolismo de glicerofosfolípidos
GLYALDDr	Gliceraldehído deshidrogenasa	Metabolismo de glicerofosfolípidos
GLYK	Glicerol quinasa	Metabolismo de glicerofosfolípidos
GLXCL	Glioxalato carboxiquinasa	Metabolismo de glioxilato
TRSARr	Tartroato semialdehído deshidrogenasa	Metabolismo de glioxilato
PHAP2C100	Polimerasa de polihidroxiacanoatos (PHA)	Metabolismo de PHA
PHAP2C120	Polimerasa de polihidroxiacanoatos (PHA)	Metabolismo de PHA
PHAP2C121	Polimerasa de polihidroxiacanoatos (PHA)	Metabolismo de PHA
PHAP2C140	Polimerasa de polihidroxiacanoatos (PHA)	Metabolismo de PHA
PHAP2C141	Polimerasa de polihidroxiacanoatos (PHA)	Metabolismo de PHA
PHAP2C141d5	Polimerasa de polihidroxiacanoatos (PHA)	Metabolismo de PHA
PHAP2C60	Polimerasa de polihidroxiacanoatos (PHA)	Metabolismo de PHA
PHAP2C80	Polimerasa de polihidroxiacanoatos (PHA)	Metabolismo de PHA
PHAPC40	Polimerasa de polihidroxiacanoatos (PHA)	Metabolismo de PHA
PHAPCP100	Polimerasa de polihidroxiacanoatos (PHA)	Metabolismo de PHA
PHAPCP40	Polimerasa de polihidroxiacanoatos (PHA)	Metabolismo de PHA
PHAPCP60	Polimerasa de polihidroxiacanoatos (PHA)	Metabolismo de PHA
PHAPCP80	Polimerasa de polihidroxiacanoatos (PHA)	Metabolismo de PHA
PHAPCT40	Polimerasa de polihidroxiacanoatos (PHA)	Metabolismo de PHA
PHAPCT60	Polimerasa de polihidroxiacanoatos (PHA)	Metabolismo de PHA
RECOAH20	Acil-CoA deshidratasa	Metabolismo de PHA
PPNDH	Prefenato deshidratasa	Metabolismo de triptófano, fenilalanina y tirosina
AMPN	AMP nucleosidasa	Metabolismo de purinas
PC	Piruvato carboxilasa	Ciclo del TCA

Tabla 9. Reacciones exclusivas del modelo específico de condición de la cepa *P. putida* KT2440 Δ *apaH* creciendo en AFA como fuente de carbono (iJN1411_AFA_ApaH). Las reacciones no asociadas a genes fueron eliminadas de la comparación.

Abreviatura	Nombre de la Reacción	Subsistema Metabólico
23CTI3	<i>Cis-trans</i> isomerasa de ácidos grasos	Metabolismo de ácidos grasos
ACOAD34f	Acil CoA deshidrogenasa	Metabolismo de ácidos grasos
KAT31	Acil CoA aciltransferasa	Metabolismo de ácidos grasos
KAT32	Acil CoA aciltransferasa	Metabolismo de ácidos grasos
TPI	Triosa fosfato isomerasa	Gluconeogénesis
CD2abcpp	Transporte de cadmio	Tolerancia a metales pesados
PB2abcpp	Transporte de plata	Tolerancia a metales pesados
ZN2abcpp	Transporte de zinc	Tolerancia a metales pesados
LYSRC	Lisina racemasa	Metabolismo de lisina
PHAP2C101	Polimerasa de polihidroxicanoatos	Metabolismo de PHA
PHAP2C121d6	Polimerasa de polihidroxicanoatos	Metabolismo de PHA
PHAP2C142	Polimerasa de polihidroxicanoatos	Metabolismo de PHA
SHK3D	Siquimato deshidrogenasa	Metabolismo de triptófano, fenilalanina y tirosina
GLBRAN3	Enzima desramificante glucógeno	Metabolismo del glucógeno
GLDBRAN3	Enzima desramificante glucógeno	Metabolismo del glucógeno
PB2tpp	Transporte de plomo	Tolerancia a metales pesados

En cualquier caso, la simple comparación del contenido metabólico de los modelos específicos no es suficiente para estimar la posible distribución del flujo metabólico, por lo que nos planteamos la estimación de éste mediante la utilización del método de muestreo aleatorio de Monte Carlo (Scheldenberger *et al.*, 2011).

4.2 Analisis *in silico* de la distribución de los flujos de carbono y energía en *P. putida* KT2440 y *P. putida* KT2440 Δ *apaH*.

Construidos los modelos específicos de condición, éstos se utilizaron para estimar la distribución de flujo del carbono utilizando el método de muestreo de Monte Carlo implementado en el paquete COBRA Toolbox 2.0 como se indica en la sección 18 de Materiales y Métodos. Esta aproximación nos permite estimar el flujo más probable para cada una de las reacciones incluidas en los modelos. Por tanto, es una herramienta muy útil cuando se pretende comparar dos estados funcionales distintos al permitirnos identificar las diferencias más significativas, en término de distribución de flujo, entre ambos.

El análisis de la distribución de flujo en iJN1411_AFA y iJN1411_AFA_Δ*apaH* identificó al TCA como uno de los módulos metabólicos donde mayores diferencias se observaron. A pesar de la inducción de algunas de las enzimas participantes en esta ruta observada en los experimentos de proteómica (Tabla 6), la predicción indicó que en la cepa KT2440Δ*apaH* el flujo a través del TCA se veía reducido entre 1 y 2 mmol/g peso seco.h, lo que supone una reducción de un 20-30% aproximadamente con respecto al flujo predicho para la cepa KT2440. Especialmente evidente es la reducción del flujo estimado para las reacciones catalizadas por las enzimas citrato sintasa, aconitasa, succinato deshidrogenasa y fumarasa (Fig. 43). Por otra parte, no se encontraron diferencias significativas en el flujo a través del ciclo del glioxilato (Fig. 43), pese a la represión observada tanto para la isocitrato liasa como para la malato sintasa en los experimentos de proteómica de la cepa mutante *apaH* (Tabla 7).

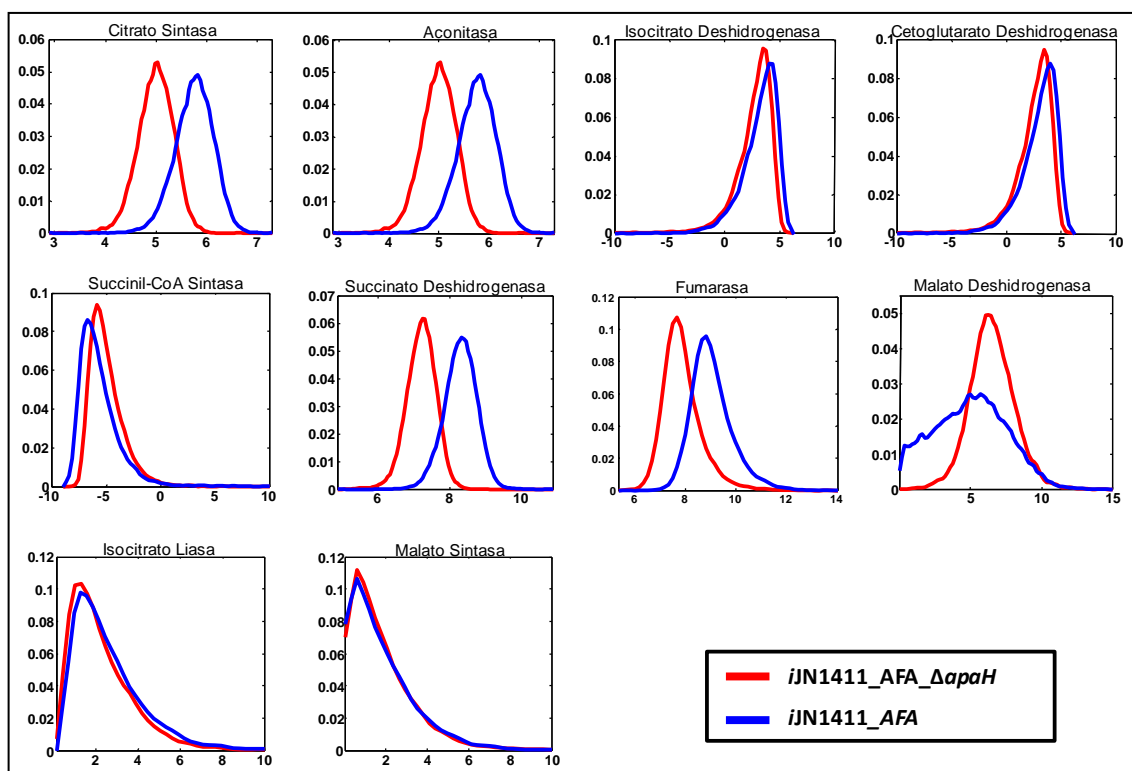


Figura 43. Comparación del flujo de carbono estimado a través del TCA y el ciclo del glioxilato en las cepas *P. putida* KT2440 y KT2440Δ*apaH*. El flujo de carbono fue estimado utilizando los modelos específicos de condición iJN1411_AFA (azul) y iJN1411_AFA_Δ*apaH* (rojo), respectivamente. Se representa la probabilidad (eje Y) de encontrar un determinado flujo (mmol/g peso seco.h) para cada reacción dentro del rango representado (eje X) al maximizar el objetivo (tasa de crecimiento). Las reacciones se encuentran formuladas siguiendo los estándares de la comisión de enzimas EC (de sus siglas en inglés, *Enzyme Commission*). Un flujo negativo indica que la reacción es reversible y el flujo va en la dirección contraria a la formulada en EC.

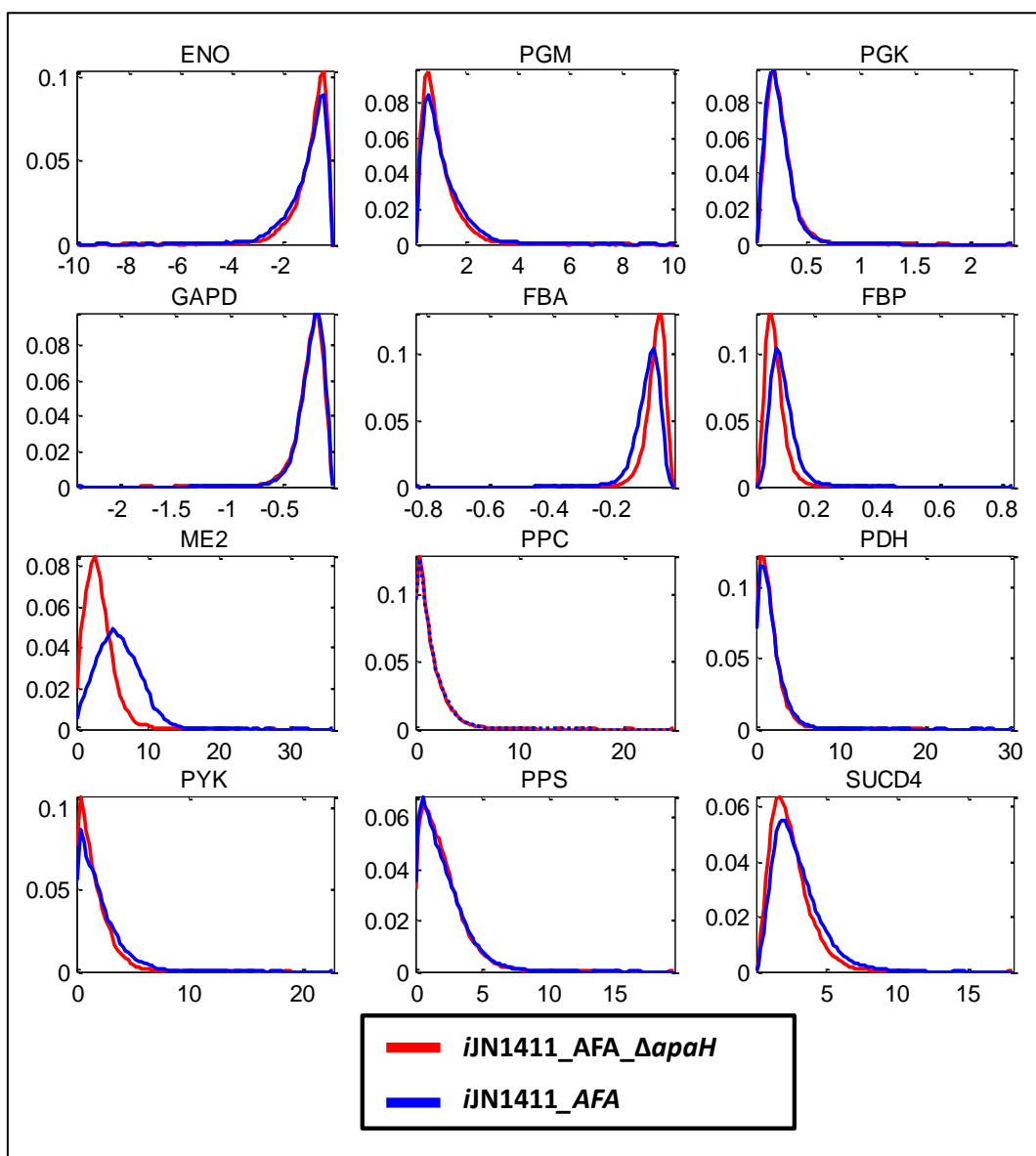


Figura 44. Comparación del flujo de carbono estimado a través de la gluconeogénesis y reacciones anapleróticas en las cepas *P. putida* KT2440 y KT2440 Δ *apaH*. El flujo de carbono fue estimado utilizando los modelos específicos de condición iJN1411_AFA (azul) y iJN1411_AFA_ Δ *apaH* (rojo), respectivamente. Se representa la probabilidad (eje Y) de encontrar un determinado flujo (mmol/g peso seco.h) para cada reacción dentro del rango representado (eje X) al maximizar la tasa de crecimiento. Las abreviaturas utilizadas son: ENO, enolasa; PGM, fosfoglicerato mutasa; PGK, fosfoglicerato quinasa; GAPD, gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa; FBA, fructosa bifosfato aldolasa; FBP, fructosa bifosfatasa; ME2, enzima málica dependiente de NADP⁺; PPC, fosfoenolpiruvato carboxilasa; PDH, piruvato deshidrogenasa; PYK, piruvato quinasa; PPS, fosfoenolpiruvato sintasa; SUCD4, FADH quinona reductasa (flavoproteína de transferencia de electrones). Un flujo negativo indica que la reacción es reversible y se ha considerado en la dirección reversa a como se ha formulado siguiendo los estándares de la comisión de enzimas EC.

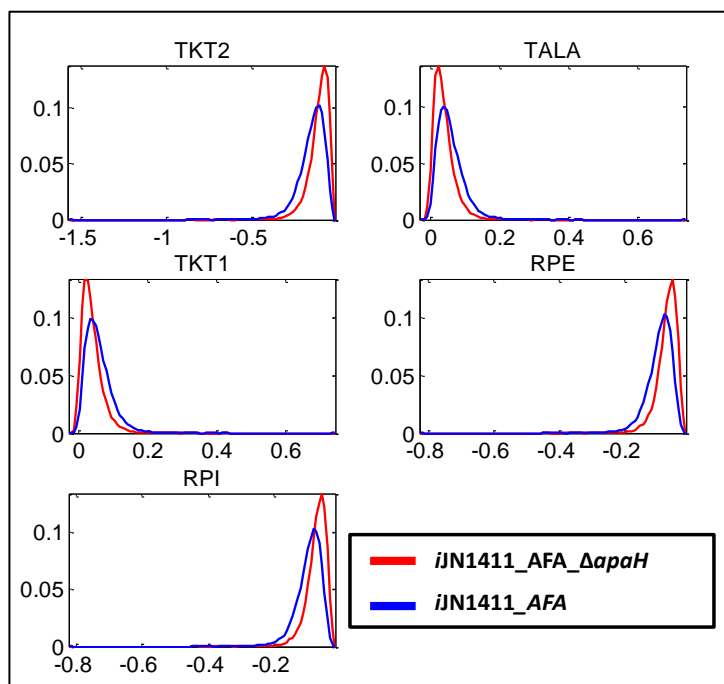


Figura 45. Comparación del flujo de carbono estimado a través de la ruta de las pentosas fosfato en las cepas *P. putida* KT2440 y *KT2440ΔapaH*. El flujo de carbono fue estimado utilizando los modelos específicos de condición iJN1411_AFA (azul) e iJN1411_AFA_ΔapaH (rojo), respectivamente. Se representa la probabilidad (eje Y) de encontrar un determinado flujo (mmol/g peso seco.h) para cada reacción dentro del rango representado (eje X) al maximizar la tasa de crecimiento. Las abreviaturas utilizadas son: TKT2, Transcetolasa 2; TALA, transaldolasa; TKT1, transcetolasa 1; RPE, ribulosa-5-fosfato 3-epimerasa; RPI, ribulosa-5-fosfato isomerasa. Un flujo negativo indica que la reacción es reversible y se ha considerado en la dirección reversa a como se ha formulado siguiendo los estándares de la comisión de enzimas EC.

Por otro lado, no se encontraron diferencias significativas en la distribución de flujo estimado para las cepas *P. putida* KT2440 y *P. putida* *KT2440ΔapaH* en las rutas de gluconeogénesis (Fig. 44) y de las pentosas fosfato (Fig. 45). Sin embargo, cuando se analizaron las reacciones de la fosforilación oxidativa se observó que el flujo a través de la NADH deshidrogenasa I en la cepa *P. putida* *KT2440ΔapaH* se encontraba reducido (Fig. 46). Esta reacción es clave para la re-oxidación del NADH producido durante el catabolismo, siendo igualmente responsable en gran medida de reducir el conjunto de quinonas acoplado a la cadena respiratoria.

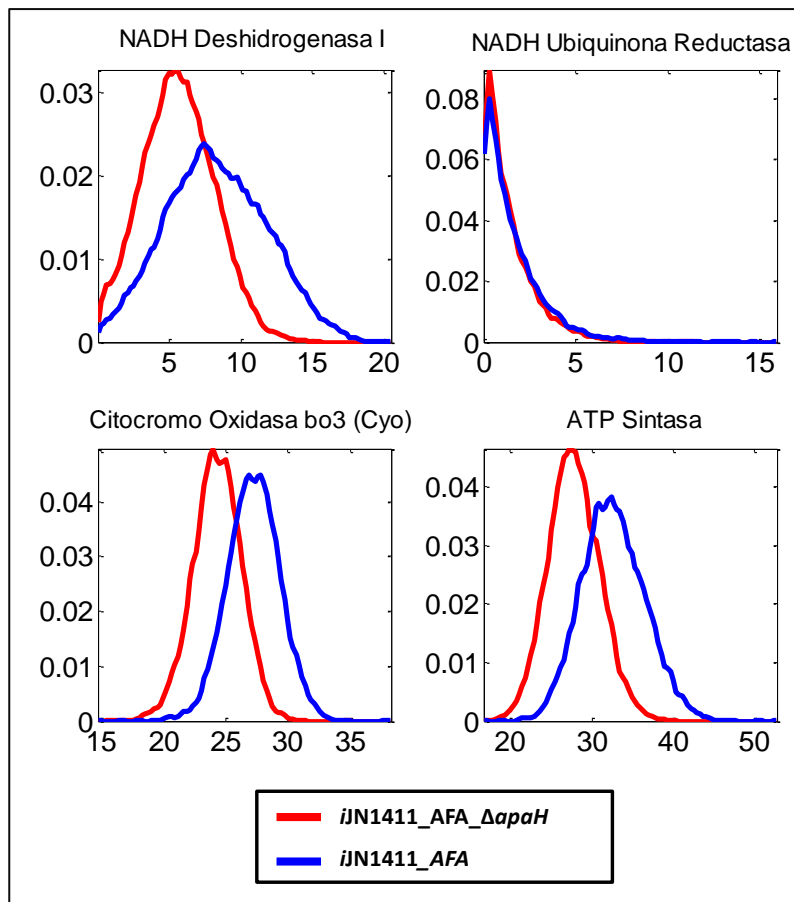


Figura 46. Comparación del flujo de carbono estimado a través de reacciones clave de la cadena de transporte de electrones y fosforilación oxidativa de las cepas *P. putida* KT2440 y KT2440 Δ apaH. El flujo de carbono fue estimado utilizando los modelos específicos de condición iJN1411_AFA (azul) e iJN1411_AFA_ Δ apaH (rojo), respectivamente. Se representa la probabilidad (eje Y) de encontrar un determinado flujo (mmol/g peso seco.h) para cada reacción dentro del rango representado (eje X) al maximizar la tasa de crecimiento. Las reacciones se encuentran formuladas siguiendo los estándares de la comisión de enzimas EC.

Estos resultados están en concordancia con la represión observada en los experimentos de proteómica de dos de las subunidades, PP_4120 y PP_4124 (Tabla 7), del complejo proteico NADH deshidrogenasa I. Igualmente significativa, aunque en este caso no se ve respaldado con los datos obtenidos por proteómica, fue la reducción del flujo a través de la citocromo oxidasa terminal (Cyo) en la cepa *P. putida* KT2440 Δ apaH (Fig. 46). La citocromo oxidasa Cyo es la principal responsable de reoxidar las quinonas utilizando O₂ como aceptor final de electrones, contribuyendo así a la fuerza protón motriz. No obstante, la reducción predicha de flujo a través de Cyo es consistente con la reducción del flujo a través de la NADH deshidrogenasa I, dado que

un conjunto de quinonas más oxidado fuerza inevitablemente un menor flujo a través de Cyto. Finalmente, se estimó un flujo reducido en la cepa KT2440 Δ *apaH* a través de la ATP sintasa, sugiriendo una menor producción de ATP en esta cepa. Este dato es compatible con la menor fuerza protón motriz predicha como consecuencia de la reducción del flujo a través de la NADH deshidrogenasa I y de Cyto.

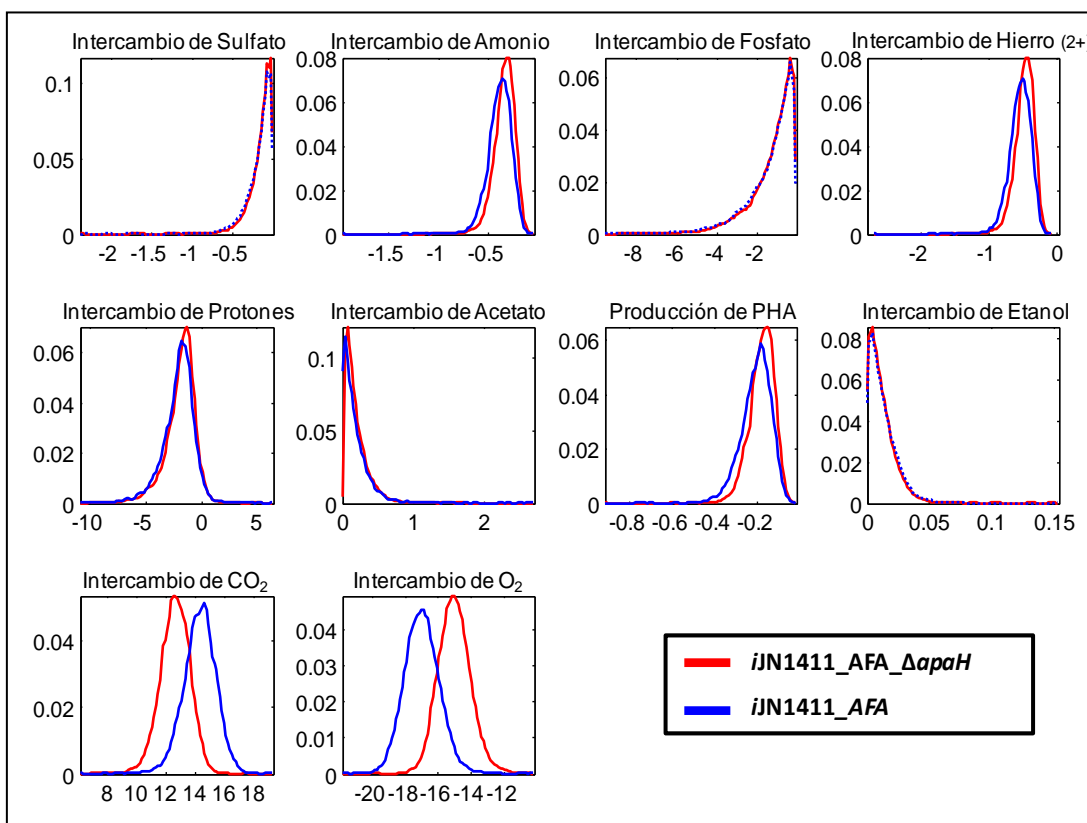


Figura 47. Comparación del flujo estimado a través de reacciones de intercambio con el medio en las cepas *P. putida* KT2440 y KT2440 Δ *apaH*. El flujo fue estimado utilizando los modelos específicos de condición *iJN1411_AFA* (azul) e *iJN1411_AFA_ΔapaH* (rojo), respectivamente. Se representa la probabilidad (eje Y) de encontrar un determinado flujo (mmol/g peso seco.h) para cada reacción dentro del rango representado (eje X) al maximizar la tasa de crecimiento. Un flujo negativo indica que la reacción es reversible y se ha considerado en la dirección reversa a como se ha formulado siguiendo los estándares de la comisión de enzimas EC.

Posteriormente, analizamos si había alguna diferencia significativa en la estimación del flujo de los metabolitos excretados o importados del medio entre las cepas *P. putida* KT2440 y KT2440 Δ *apaH*. Como cabe esperar de la similar tasa de crecimiento de ambas cepas, no encontramos diferencias significativas en el consumo de sulfato, amonio, fosfato inorgánico o hierro (Fig. 47). No obstante, se predijo que la

cepa KT2440 Δ *apaH* excretaba un 25% menos de CO₂ (alrededor de 4 mmoles menos de CO₂ por gramo de peso celular seco y hora) y consumía aproximadamente un 25% menos de oxígeno (Fig. 47). Estos resultados son altamente interesantes ya que, i) la menor secreción de CO₂ es consistente con una menor actividad del TCA en la cepa mutante, y ii) el menor consumo de oxígeno es consistente con una menor tasa respiratoria y reducida producción de ATP en la cepa mutante, lo que en conjunto sugiere un metabolismo más activo en la cepa parental que en *P. putida* KT2440 Δ *apaH*.

Finalmente, cuando se analizó el flujo de productos de secreción, tales como acetato, etanol o lactato, no se encontró un valor de flujo significativo en ninguna de las dos cepas. Este dato sugiere que la probabilidad de secretar estos productos es muy baja en las condiciones de cultivo simuladas. Tampoco se predijo una producción de PHA significativa en ninguna de las dos cepas, lo cual está de acuerdo con el hecho de que no se haya observado la acumulación de PHA en los cultivos de ambas cepas (Sección 3.2.2, apartado III).

En resumen, la construcción y análisis de los modelos específicos de condición y la distribución de flujos para las cepas *P. putida* KT2440 y KT2440 Δ *apaH* predice que la inactivación del gen *apaH* causa un significativo efecto sobre el metabolismo primario de *P. putida*.

4.3. Estudio de la influencia de la expresión constitutiva de los genes *paa* sobre la fase de latencia de *P. putida* KT2440 Δ *apaH* cultivada en AFA.

Los experimentos de análisis de distribución de flujo utilizando modelos metabólicos específicos de condición habían sugerido un estado energético deficiente en *P. putida* KT2440 Δ *apaH* inducido por la inactivación del gen *apaH* (ver apartado 4.2) lo que podría ocasionar la larga fase de latencia observada cuando la cepa mutante crece en AFA como única fuente de carbono (Fig. 38). En este sentido, una forma de tratar de reducir la larga fase de latencia en AFA de la cepa *P. putida* KT2440 Δ *apaH* podría ser reducir el gasto energético necesario para la inducción de todas las proteínas implicadas en la degradación de este compuesto. Como se ha indicado en el apartado 1.3 de la Introducción, las rutas catabólicas de compuestos aromáticos se encuentran estrictamente reguladas y es necesaria la presencia del inductor específico para que se produzca su expresión (Díaz *et al.*, 2001). En *P. putida* KT2440 los genes *paa* que

codifican la ruta de degradación de AFA están regulados por el represor transcripcional *paaX* (PP_3286), que responde al fenilacetil-CoA como molécula inductora (Fig. 6). (Luengo *et al.*, 2001; del Peso-Santos *et al.*, 2006). En este sentido, se podía prever que la expresión constitutiva de los genes *paa* en ausencia del gen *paaX* permitiese la presencia de las proteínas de degradación de AFA cuando las células se transfieran a un medio que contenga AFA como única fuente de carbono sin la necesidad de un gasto energético inicial, lo que finalmente podría reducir la fase de latencia en AFA de una cepa con un estado energético deficiente. Para confirmar experimentalmente esta hipótesis, se construyó la cepa *P. putida* KT2440 Δ *apaHdpaaX*, una cepa portadora de la doble mutación *apaH/paaX* (Tabla 1). Cuando se analizó el crecimiento de *P. putida* KT2440 Δ *apaHdpaaX* utilizando AFA como fuente de carbono y energía, se observó que la cepa recuperó parcialmente el fenotipo de la cepa parental reduciendo significativamente la fase de latencia (Fig. 48). Estos resultados están de acuerdo con la hipótesis de que un mutante en el gen *apaH* presenta un estado energético deficiente, lo que determinaría en gran medida la característica fase de latencia extendida que presenta dicho mutante.

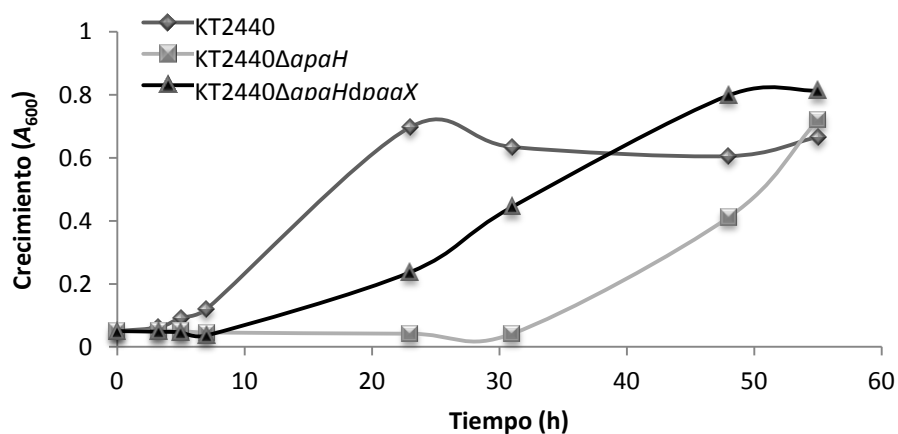


Figura 48. Crecimiento en AFA de las cepas *P. putida* KT2440, KT2440 Δ *apaH* y KT2440 Δ *apaHdpaaX*. Las cepas se cultivaron en medio mínimo M63 suplementado con AFA 5 mM como fuente de carbono, y el crecimiento se monitorizó valorando A₆₀₀. Se muestra el resultado de un experimento. Los valores obtenidos fueron reproducibles en 3 experimentos independientes.

4.4 Análisis del estado energético de las cepas *P. putida* KT2440 y *P. putida* KT2440 Δ *apaH*.

Los distintos resultados presentados anteriormente sugieren un estado energético deficiente para la cepa mutante *P. putida* KT2440 Δ *apaH* cuando se compara con el de la cepa parental. Para confirmar esta hipótesis, se determinaron los niveles de ATP en en distintas fases de la curva de crecimiento de la cepa parental *P. putida* KT2440 y de la cepa mutante *P. putida* KT2440 Δ *apaH* utilizando AFA como fuente de carbono, tal y como se detalla en el apartado 12 de Materiales y Métodos.

Como se desprende de los resultados representados en la figura 49, la cepa mutante *P. putida* KT2440 Δ *apaH* presenta niveles de ATP significativamente menores que los de la cepa parental *P. putida* KT2440 en distintas fases de la curva de crecimiento. No obstante, es durante las fases exponencial temprana y media donde las diferencias se hacen más evidentes, llegando a determinarse en la fase exponencial temprana un 50% menos de ATP en la cepa mutante que en la cepa parental (Fig. 49). Por lo tanto, estos resultados confirman las predicciones de distribución de flujo que indican una reducción de los niveles de ATP en la cepa *P. putida* KT2440 Δ *apaH* (apartado 4.2 de Resultados), y el deficiente estado energético de la cepa mutante sugerido en resultados anteriores.

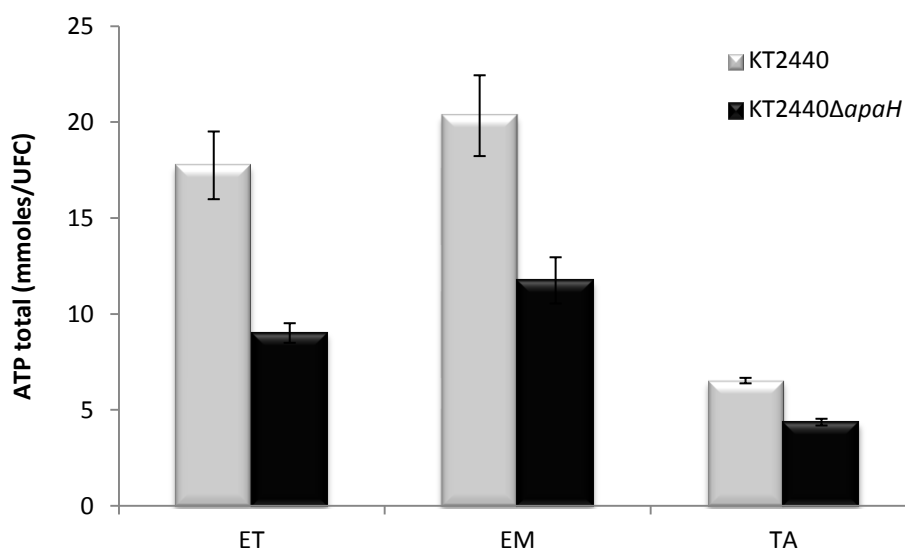


Figura 49. Niveles de ATP presentes en *P. putida* KT2440 y *P. putida* KT2440 Δ *apaH* creciendo en AFA. Las cepas se cultivaron en medio M63 con AFA 2.5 mM como única fuente de carbono. Se tomaron muestras de los cultivos en fase exponencial temprana (ET; A_{600} 0.1), media (EM; A_{600} 0.3) y tardía (TA; A_{600} 0.6), y se determinaron los niveles de ATP total en *P. putida* KT2440 (barras grises) y *P. putida* KT2440 Δ *apaH* (barras negras) como se detalla en el apartado 12 de Materiales y

Métodos. Los valores de actividad son el promedio de los obtenidos en tres muestras biológicas independientes; las barras de error indican la desviación estándar.

4.5. Análisis del consumo de oxígeno en las cepas *P. putida* KT2440 y *P. putida* KT2440 Δ *apaH*.

De los resultados presentados anteriormente (apartado 4.4) no se puede concluir si el estado energético deficiente es consecuencia directa de una menor producción de ATP, o bien es debido a un consumo adicional de ATP en la cepa mutante *P. putida* KT2440 Δ *apaH*. Dado que *P. putida* KT2440 es una bacteria aerobia estricta y el oxígeno es el único aceptor de electrones conocido, la producción de ATP es, en última instancia, directamente proporcional al consumo de oxígeno. Por tanto, se decidió estudiar el consumo de oxígeno a lo largo de la curva de crecimiento en AFA de las cepas *P. putida* KT2440 y *P. putida* KT2440 Δ *apaH* tal y como se detalla en el apartado 11 de Materiales y Métodos. Los resultados obtenidos mostraron un consumo reducido de oxígeno en la cepa KT2440 Δ *apaH* con respecto al observado en la cepa parental en distintas fases de la curva de crecimiento (Fig. 50). No obstante, la reducción en el consumo de oxígeno variaba considerablemente en función de ésta. Así, en cultivos de la cepa mutante analizados en fase exponencial temprana y tardía se observó una reducción moderada del 23% y 16%, respectivamente, con respecto al consumo de oxígeno de cultivos de la cepa parental analizados en las mismas condiciones. Sin embargo, en los cultivos de fase exponencial media, que son los que contienen las células más metabólicamente activas, se detectó una reducción del consumo de oxígeno de más del 50% con respecto al de la cepa parental. Por tanto, estos resultados son consistentes con los niveles de ATP analizados (Fig. 50), y confirman que el estado energético subóptimo en el mutante *P. putida* KT2440 Δ *apaH* es consecuencia directa de su reducida capacidad de consumir oxígeno y, consiguientemente, de producir ATP y no de un gasto adicional de éste.

Para definir si la incapacidad de mantener una producción de ATP óptima en el mutante se debía a un problema en la fosforilación oxidativa o se producía en una etapa anterior del metabolismo, se desacopló la fosforilación oxidativa de la cadena de transporte de electrones utilizando para ello el compuesto ionóforo carbonil-cianida 4-(trifluorometoxi)-fenilhidrazona (FCCP). El compuesto FCCP permite el paso de protones a través de la membrana, disipando el gradiente de protones y desacoplando por tanto la fosforilación oxidativa de la cadena respiratoria. Interesantemente, el FCCP

no fue capaz de provocar una recuperación de los niveles del consumo de oxígeno en la cepa mutante (datos no mostrados), lo que sugiere que el bloqueo metabólico se encuentra en los pasos previos a la fosforilación oxidativa, apuntando nuevamente a la producción de equivalentes de reducción.

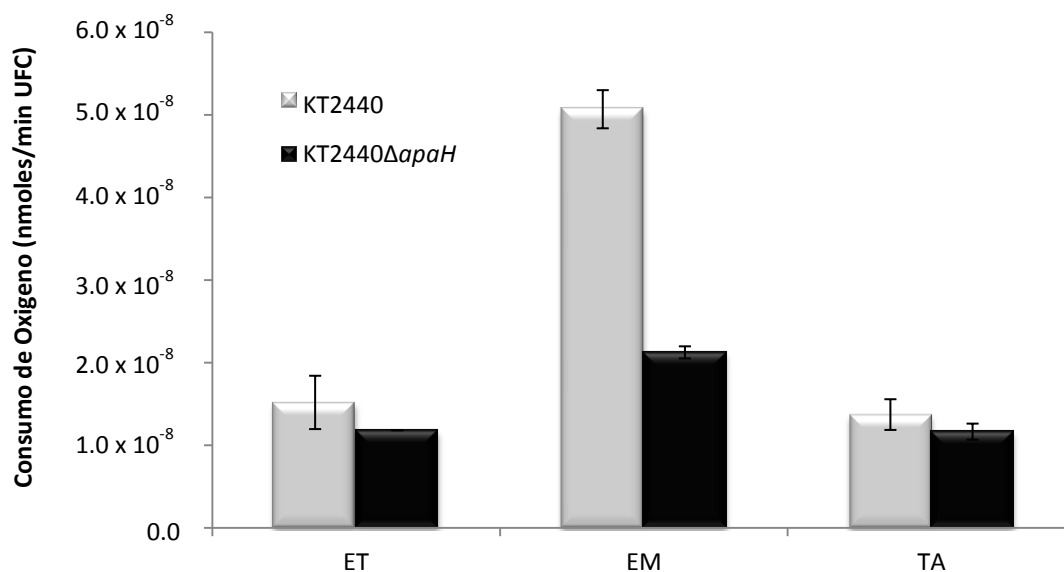


Figura 50. Consumo de oxígeno por *P. putida* KT2440 y *P. putida* KT2440ΔapaH creciendo en AFA. Las cepas se cultivaron en medio M63 con AFA 2.5 mM como única fuente de carbono. Se tomaron muestras de los cultivos en fase exponencial temprana (ET; A_{600} 0.1), media (EM; A_{600} 0.3) y tardía (TA; A_{600} 0.6), y se determinó el consumo de oxígeno en *P. putida* KT2440 (barras grises) y *P. putida* KT2440ΔapaH (barras negras) como se detalla en el apartado 11 de Materiales y Métodos. Los valores de actividad son el promedio de los obtenidos en tres muestras biológicas independientes; las barras de error indican la desviación estándar.

4.6 Efecto de distintos metabolitos en la energización de *P. putida* KT2440ΔapaH creciendo en AFA.

Los resultados sobre la producción de ATP y consumo de oxígeno (apartados 4.4 y 4.5), y la predicción computacional de flujos en base a los modelos específicos de condición (apartado 4.2), sugerían que la reducida actividad del TCA podría ser la responsable de la menor producción de ATP en la cepa mutante *P. putida* KT2440ΔapaH. Una hipótesis razonable sería pensar que este hecho podría afectar negativamente a la adaptación a las nuevas condiciones de crecimiento y, por

consiguiente, podría explicar que la fase de latencia se vea incrementada en la cepa *P. putida* KT2440 Δ *apaH* con respecto a la fase de latencia de la cepa parental. En este sentido, la energización de la cepa mutante con una fuente de carbono alternativa contribuiría a reducir la fase de latencia en AFA. Para probar esta hipótesis, se suplementó el medio de crecimiento en AFA con dos compuestos que generan poder reductor independientemente de la actividad del TCA. Para ello se utilizó octanoato, un ácido graso que genera equivalentes de reducción durante la β -oxidación, y glucosa, la cual se metaboliza en *P. putida* mayoritariamente vía gluconato en el periplasma generando igualmente equivalentes de reducción de forma rápida (del Castillo y Ramos, 2007). A pesar de que ambos compuestos, a la concentración utilizada, no permitieron un crecimiento significativo de las cepas KT2440 y KT2440 Δ *apaH* cuando se añadieron al medio de cultivo como única fuente de carbono, su presencia en un medio de cultivo con AFA redujo significativamente la fase de latencia de *P. putida* KT2440 Δ *apaH* (Figs. 51A y B). El efecto energizante sobre la cepa mutante fue más acusado con el octanoato (Fig. 51A). Sin embargo, los experimentos de energización con metabolitos que durante su catabolismo generan equivalentes de reducción únicamente vía TCA, tales como el succinato (Fig. 51C), citosina, timidina y casaminoácidos (datos no mostrados), a penas consiguieron reducir la fase de latencia extendida de la cepa mutante en AFA. Estos resultados indican que la producción de NADH independientemente del TCA podría aliviar el fenotipo de fase de latencia extendida en un mutante *apaH*, y soportan la hipótesis de que el TCA está parcialmente bloqueado en la cepa *P. putida* KT2440 Δ *apaH*, explicando su estado energético comprometido.

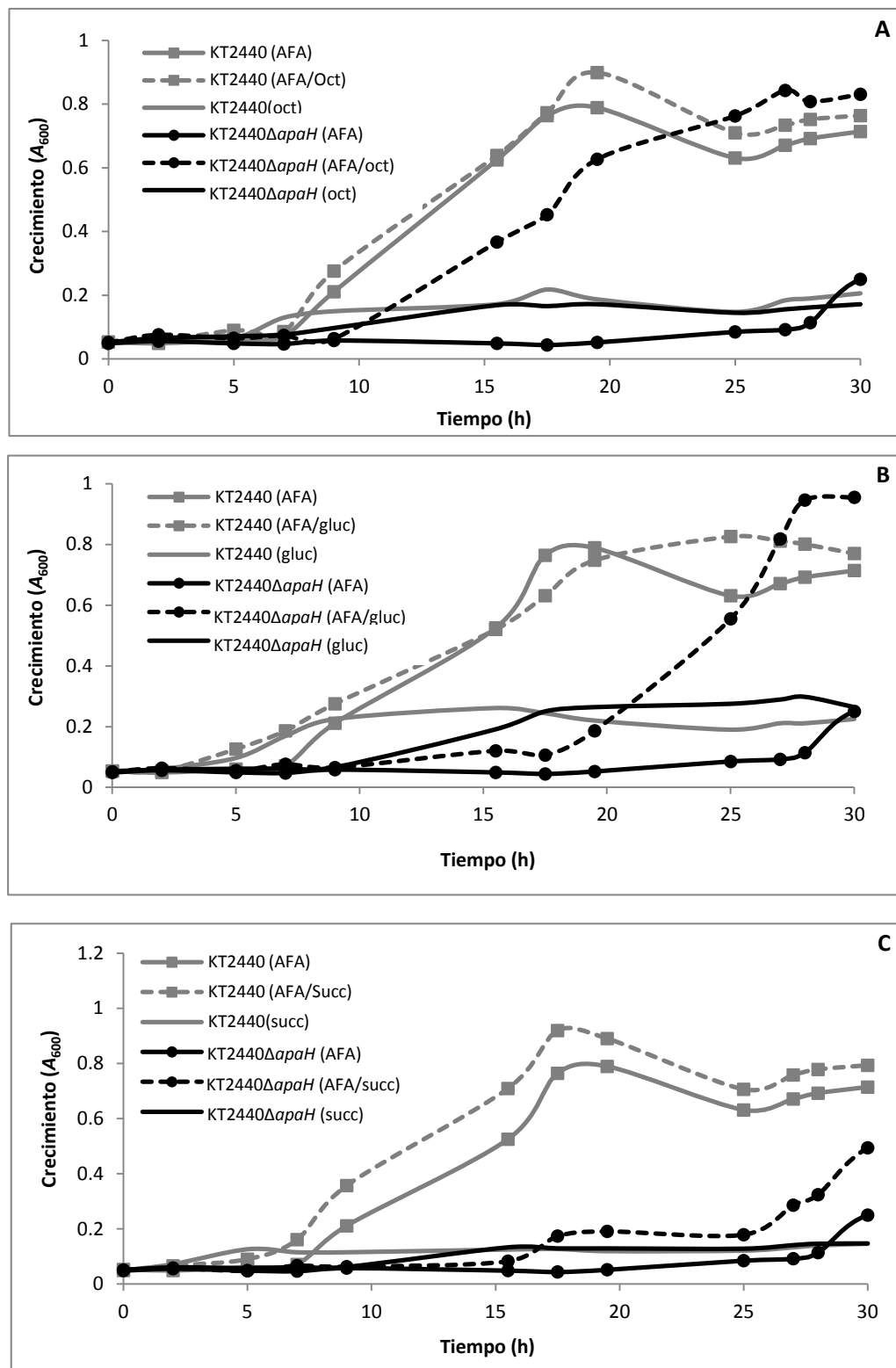


Figura 51. Efecto de diferentes metabolitos en el crecimiento de *P. putida* KT2440 y *P. putida* KT2440ΔapaH en AFA. Los cultivos fueron realizados en medio M63 suplementado con: A, AFA 2.5 mM, octanoato (oct) 0.5 mM o la mezcla de ambos (AFA/oct); B, AFA 2.5 mM, glucosa (gluc) 0.03% o la mezcla de ambos (AFA/gluc); C, AFA 2.5 mM, succinato (succ) 0.03% o la mezcla de ambos (AFA/succ). El crecimiento fue determinado por el incremento en A_{600} . Se muestra el resultado de un experimento. Los valores obtenidos fueron reproducibles en 3 experimentos independientes.

4.7 Identificación de la etapa clave del TCA involucrada en el bloqueo metabólico de la cepa *P. putida* KT2440 Δ *apaH*.

Los modelos metabólicos basados en restricciones se han mostrado muy precisos a la hora de predecir el impacto sobre la tasa de crecimiento de perturbaciones tanto ambientales (e.g., utilización de diferentes fuentes de carbono) como genéticas (e.g., mutaciones). Para tratar de identificar la etapa clave del TCA responsable del bloqueo metabólico presente en la cepa *P. putida* KT2440 Δ *apaH*, se realizó un abordaje computacional utilizando para ello nuevamente el modelo metabólico iJN1411 y los datos experimentales sobre la duración de la fase de latencia de la cepa mutante creciendo en distintas fuentes de carbono (Tabla 5). De esta manera, se computó *in silico* la tasa de crecimiento de mutantes simulados en cada una de las etapas del TCA, ciclo del glioxilato y reacciones anapleróticas, utilizando las mismas fuentes de carbono empleadas en los experimentos de crecimiento. La posterior comparación de la tasa de crecimiento predicha por el modelo para los mutantes simulados *in silico* con la extensión de la fase de latencia determinada *in vivo* para la cepa mutante *P. putida* KT2440 Δ *apaH* podría indicar cuál es la etapa del TCA más susceptible de estar bloqueada en el mutante en el gen *apaH*.

El análisis de los datos obtenidos (Fig. 52) reveló que la mayor parte de las reacciones analizadas tenía un impacto relativamente pequeño en la tasa de crecimiento. Así, la simulación en ausencia de las reacciones catalizadas por la piruvato deshidrogenasa, malato deshidrogenasa, piruvato carboxilasa, oxalacetato descarboxilasa, fosfopiruvato carboxiquinasa, acetil fosfotransferasa, enzima málica, malato sintasa, piruvato quinasa, α -cetoglutarato deshidrogenasa, isocitrato deshidrogenasa o succinil-CoA sintasa, predijo una tasa de crecimiento similar a la obtenida con la cepa parental en todas las fuentes de carbono simuladas (Fig. 52). Estos resultados confirman la gran robustez metabólica característica de las bacterias del género *Pseudomonas*.

No obstante, se detectaron dos grupos de reacciones cuya ausencia sí afectaba significativamente la tasa de crecimiento. Por un lado, la ausencia del grupo de reacciones que engloba a la isocitrato liasa, acetil-CoA sintasa, citrato sintasa y, en menor medida, malato deshidrogenasa dependiente de NADH, se caracterizaba por tener un efecto negativo sobre el crecimiento en octanoato y/o acetato como fuente de carbono, y un pequeño o nulo impacto sobre el crecimiento en citrato o succinato (Fig.

52). Estas características nos hicieron descartar a estas reacciones como responsables del bloqueo metabólico en la cepa KT2440 Δ *apaH* ya que son incompatibles con los datos experimentales de crecimiento que revelaron al octanoato y succinato como una de las fuentes de carbono con menor y mayor fase de latencia extendida en el mutante, respectivamente (Tabla 5).

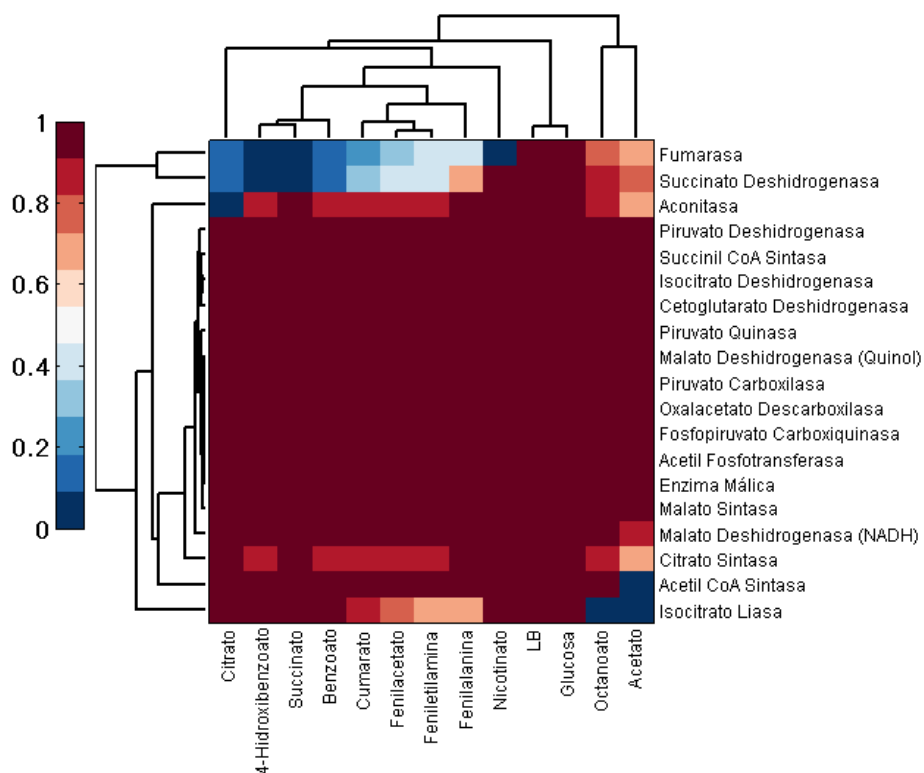


Figura 52. Efecto de la eliminación de reacciones del TCA, ciclo del glioxilato y reacciones anapleróticas en la tasa de crecimiento de iJN1411 en distintas fuentes de carbono. Se muestra el crecimiento predicho para los mutantes en cada una de las reacciones señaladas (en ordenadas) relativo al crecimiento predicho para la cepa parental, al que se le da el valor de 1 (ver detalles experimentales en el apartado 18 de Materiales y Métodos). Las distintas fuentes de carbono ensayadas *in silico* se indican en el eje de abscisas.

Por otro lado, la ausencia del grupo de reacciones que incluye a la aconitasa, succinato deshidrogenasa y fumarasa, se caracterizaba por afectar negativamente el crecimiento predicho para la mayor parte de las fuentes de carbono ensayadas (Fig. 52). Así, y exceptuando la simulación en presencia de glucosa en la que no se observaron diferencias con el modelo de la cepa parental, se comprobó que la ausencia de estas

enzimas, especialmente la fumarasa y succinato deshidrogenasa, tiene un fuerte impacto sobre el crecimiento en la mayoría de las fuentes de carbono. La tasa de crecimiento estimada en ausencia de este grupo de enzimas sí era compatible con los datos de fase de latencia extendida obtenidos de los experimentos de crecimiento en la mayor parte de las fuentes de carbono ensayadas (Tabla 5). No obstante, la reacción catalizada por la succinato deshidrogenasa fue descartada debido a que la simulación de su ausencia no tuvo ningún impacto en el crecimiento predicho utilizando nicotinato como fuente de carbono (Fig. 52), pero sin embargo la cepa *P. putida* KT2440 Δ *apaH* sí presentaba una fase de latencia extendida cuando se cultivaba en esta fuente de carbono (Tabla 5). Por tanto, la conclusión del análisis computacional y los datos de duración de la fase de latencia fue que la reacción catalizada por la fumarasa era una de las etapas del TCA más susceptible de estar bloqueada/alterada en la cepa mutante *P. putida* KT2440 Δ *apaH*.

En el genoma de *P. putida* KT2440 se identifican tres genes, *fumA* (PP_0897), *fumC1* (PP_0944) y *fumC2* (PP_1755), que podrían codificar fumarasas. Curiosamente, en los experimentos de proteómica la proteína FumC2 es una de las del ciclo del TCA que más se induce (4 veces), y FumA está ligeramente reprimida (1.3 veces) en la cepa *P. putida* KT2440 Δ *apaH* (Tablas 6 y S1). Estos resultados sugieren que en el mutante *apaH* la proteína FumA podría estar sustituida, al menos parcialmente, por la fumarasa FumC2, una isoenzima poco habitual en bacterias cultivadas en condiciones convencionales de crecimiento (Chenier et al., 2008). Para tratar de confirmar esta hipótesis, se procedió a valorar la actividad fumarasa de la cepa nativa *P. putida* KT2440 y del mutante *P. putida* KT2440 Δ *apaH*. Aunque en ambas cepas se obtuvieron valores de actividad fumarasa total similares, la actividad FumC fue significativamente mayor en la cepa *P. putida* KT2440 Δ *apaH*, lo que permitía inferir que la actividad FumA es mayor en la cepa parental (Fig. 53).

La mayor actividad FumC en el mutante *apaH* se correlacionaba con unos niveles de expresión del gen *fumC2* unas cuatro veces mayores en dicha cepa que en la cepa parental (Fig. 54). En conclusión, todos estos resultados sugieren que en la cepa *P. putida* KT2440 Δ *apaH* la actividad fumarasa FumA está en gran medida reemplazada por la actividad fumarasa FumC2, y este intercambio de isoenzimas contribuye al bloqueo del TCA, ocasionando finalmente un estado energético comprometido en dicha cepa mutante.

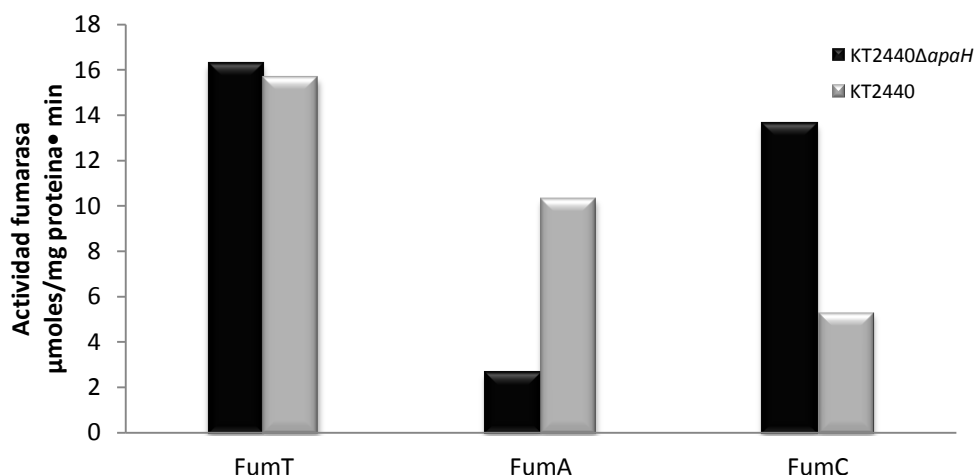


Figura 53. Actividad fumarasa en *P. putida* KT2440 y *P. putida* KT2440ΔapaH. Las dos cepas se cultivaron en medio mínimo M63 con AFA 2.5 mM hasta alcanzar una A_{600} 0.4. Se valoró la actividad fumarasa total (FumT) y la actividad fumarasa FumC (FumC) presente en los extractos de *P. putida* KT2440 (barras blancas) y *P. putida* KT2440ΔapaH (barras negras) como se indica en el apartado 7.4 de Materiales y Métodos. La actividad fumarasa debida a FumA se calculó como la diferencia entre la actividad fumarasa total y la actividad FumC. Se muestra el resultado de un experimento. Los valores obtenidos fueron reproducibles en 3 experimentos independientes.

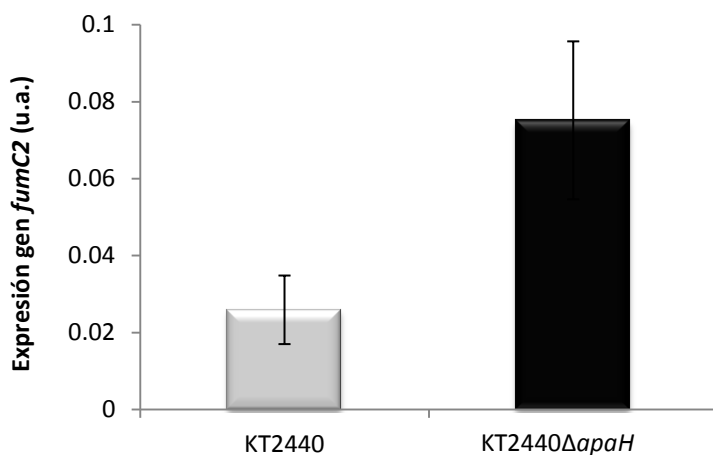


Figura 54. Expresión del gen *fumC2* en *P. putida* KT2440 y *P. putida* KT2440ΔapaH creciendo en AFA. Los niveles de transcripción del gen *fumC2* fueron analizados mediante RT-PCR cuantitativa (ver apartado 7.4 de Materiales y Métodos) utilizando células de *P. putida* KT2440 y *P. putida* KT2440ΔapaH cultivadas hasta fase exponencial media en AFA 2.5 mM. La expresión relativa del gen *fumC2* se muestra en unidades arbitrarias (a.u.). Los valores son el promedio de tres muestras biológicas. Las barras representan la desviación estándar de cada promedio.

5. Estudio del circuito regulador que responde a la inactivación del gen *apaH* en *P. putida*.

Aunque los resultados aportados por los experimentos de proteómica revelaron algunos elementos reguladores, e.g., Hfq y GreA, alterados en el mutante en el gen *apaH* (Tablas 6 y 7), la detección e identificación de reguladores bacterianos mediante proteómica es difícil ya que estas proteínas suelen ser minoritarias en la célula. Por ello, para tratar de profundizar en el estudio del circuito regulador que responde a los niveles alterados de Ap₄A en *P. putida*, se comparó la expresión de distintos factores sigma de la RNAP en la cepa parental KT2440 y en el mutante KT2440Δ*apaH*.

5.1 Expresión de factores sigma en *P. putida* KT2440 y KT2440Δ*apaH*.

Se determinó mediante RT-PCR cuantitativa la expresión de algunos factores sigma de la RNAP, tales como *rpoS* (PP_1623), *rpoH* (PP_5108), *rpoN* (PP_0952), *rpoD* (PP_0387) y *rpoF* (PP_4341), en la cepa parental KT2440 y en la cepa mutante KT2440Δ*apaH* cultivadas en AFA. Aunque no se observó una diferencia de expresión significativa entre las dos cepas sujetas a estudio para la mayoría de los factores sigma analizados, la cepa *P. putida* KT2440Δ*apaH* mostró unos niveles de expresión del gen *rpoS* al menos dos veces superiores a los de la cepa parental KT2440 (Tabla 10). El gen *rpoS* codifica el factor de transcripción RpoS (σ^S), y ha sido identificado en muchos microorganismos como un regulador central de la fase estacionaria. Adicionalmente, tiene un papel fisiológico muy importante como regulador principal de la respuesta general a estrés (Hengge-Aronis, 2002). Los datos obtenidos del proteoma de la cepa mutante *P. putida* KT2440Δ*apaH* mostraron la inducción de proteínas involucradas en regular y ejecutar programas celulares en respuesta a condiciones de estrés general y estrés específico, tales como estrés oxidativo o estrés por falta de nutrientes (ver apartado 3.2.2 sección I). Por lo tanto, el incremento de expresión del gen *rpoS* en *P. putida* KT2440Δ*apaH* sugería que el factor sigma RpoS estaba implicado en el circuito regulador que responde a los niveles elevados de Ap₄A en la célula, y podía ser un factor regulador central responsable en gran medida de algunos de los fenotipos observados en dicho mutante.

TABLA 10. Expresión de genes que codifican factores sigma de transcripción en *P. putida* KT2440 Δ *apaH*.

Locus	Gen	Función	Nivel de expresión*
PP_1623	<i>rpoS</i>	Factor sigma RpoS	2
PP_0387	<i>rpoD</i>	Factor sigma RpoD	1
PP_5108	<i>rpoF</i>	Factor sigma de la biosíntesis flagelar (<i>fliA</i>)	1
PP_5108	<i>rpoH</i>	Factor sigma 32	1
PP_0952	<i>rpoN</i>	Factor sigma 54	1

* Número de veces que el gen en cuestión se induce en *P. putida* KT2440 Δ *apaH* en relación a su expresión en la cepa parental *P. putida* KT2440. El RNA total fue extraído de las cepas KT2440 y KT2440 Δ *apaH* creciendo hasta fase exponencial media en AFA 2.5 mM, y se midió por RT-PCR cuantitativa la expresión de los genes, tal y como se detalla en el apartado 4.6 de Materiales y Métodos. Los valores fueron reproducibles en tres muestras biológicas independientes.

5.2 Estudio del mecanismo de activación de la expresión del gen *rpoS* en *P. putida* KT2440 Δ *apaH*.

Dado que la expresión del gen *rpoS* está incrementada en *P. putida* KT2440 Δ *apaH*, se decidió estudiar cuál podría ser la cascada de señalización que relaciona la alteración de los niveles de Ap₄A con la expresión del gen *rpoS*. En este sentido, se han descrito tres mecanismos que controlan la expresión del gen *rpoS* en bacterias del género *Pseudomonas*: i) activación por la proteína PsaA; ii) represión por la proteína Crc; iii) represión por las proteínas Rsm (Whistler *et al.*, 1998; Kojic y Venturi, 2001; Heeb *et al.*, 2005; Sonnleitner y Haas, 2011; Dong *et al.*, 2013). Para determinar si alguna de estas vías estaba afectada en el mutante *P. putida* KT2440 Δ *apaH*, se comparó la expresión de las proteínas y pequeños RNA no codificantes (sRNA) implicados en cada una de estas vías en la cepa parental y en la mutante.

5.2.1. Estudio de la expresión del gen *psrA* en *P. putida* KT2440 Δ *apaH*.

Se ha descrito tanto en *P. aeruginosa* como en *P. putida* que la expresión del gen *rpoS* está regulada de manera positiva por la proteína reguladora PsaA (Kojic *et al.*,

2001). *PsrA* es un regulador transcripcional perteneciente a la familia TetR que se activa en ausencia de ácidos grasos de cadena larga (LCFA) (Kang *et al.*, 2009). La expresión de *psrA* no es constante a lo largo de la curva de crecimiento sino que el gen se induce cuando los cultivos alcanzan la fase estacionaria de crecimiento (Kojic *et al.*, 2002). Con objeto de determinar si el aumento de expresión del gen *rpoS* estaba mediado por el gen *psrA*, se analizó la expresión de éste mediante RT-PCR cuantitativa en cultivos de *P. putida* KT2440 y *KT2440ΔapaH* crecidos en AFA. Los resultados obtenidos muestran que los niveles transcripcionales del gen *psrA* en el mutante *apaH* son similares a los de la cepa parental (Fig. 55), lo que sugiere que en fase exponencial media el aumento de los niveles de *rpoS* no estaría mediado por el regulador transcripcional *PsrA*.

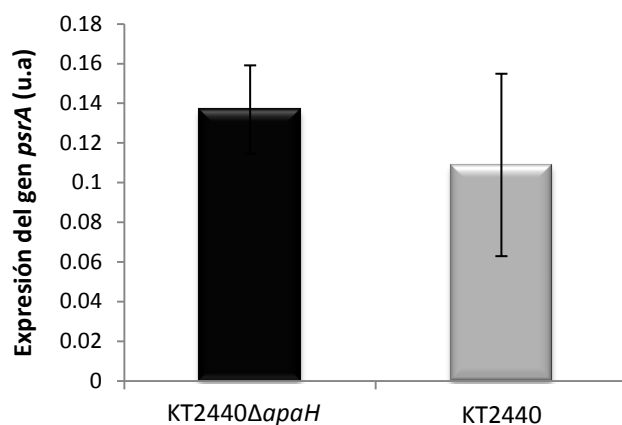


Figura 55. Niveles de expresión del gen *psrA* en *P. putida* KT2440 y *P. putida* KT2440Δ*apaH*. El RNA total fue extraído de las cepas KT2440 y *KT2440ΔapaH* creciendo hasta la fase exponencial media en AFA 2.5 mM, y se midió por RT-PCR cuantitativa la expresión del gen *psrA* tal y como se detalla en el apartado 4.6 de Materiales y Métodos. La expresión relativa del gen *psrA* se muestra en unidades arbitrarias (u.a). Los valores son el promedio de tres muestras biológicas. Las barras representan la desviación estándar de cada promedio.

5.2.2. Estudio de la expresión de los genes *crc*, *crcZ* y *crcY* en *P. putida* *KT2440ΔapaH*.

La proteína Crc es un represor post-transcripcional que coordina el metabolismo del carbono y controla la represión catabólica en *Pseudomonas* (Rojo, 2010). Los niveles de esta proteína se encuentran regulados en *P. putida* por sRNA no codificantes, denominados *crcZ* y *crcY*, que secuestran a la proteína Crc impidiendo así el acceso a sus mRNA dianas. Los niveles de *crcZ* y *crcY* están regulados positivamente en *P.*

putida por el sistema de dos componentes CbrA/CbrB, este sistema es requerido para la asimilación de fuentes de carbono y nitrógeno y para el mantenimiento del balance C/N durante el crecimiento bacteriano (Rojo, 2010). Dado que la expresión del gen *rpoS* en *P. aeruginosa* está regulada negativamente, de forma indirecta, por la proteína Crc (Dong *et al.*, 2013), se analizó si la expresión del gen *crc* y/o de los sRNAs *crcZ* y *crcY* se encontraba alterada en *P. putida* KT2440 Δ *apaH*. Como se observa en la figura 56, no existe una diferencia significativa en los niveles de expresión del gen *crc* y de los genes que codifican los sRNAs (*crcZ*, *crcY*) cuando se compara la cepa parental con la cepa mutante en el gen *apaH*, lo que sugiere que el aumento de los niveles de *rpoS* en la cepa mutante no está mediado por una alteración en los niveles de Crc.

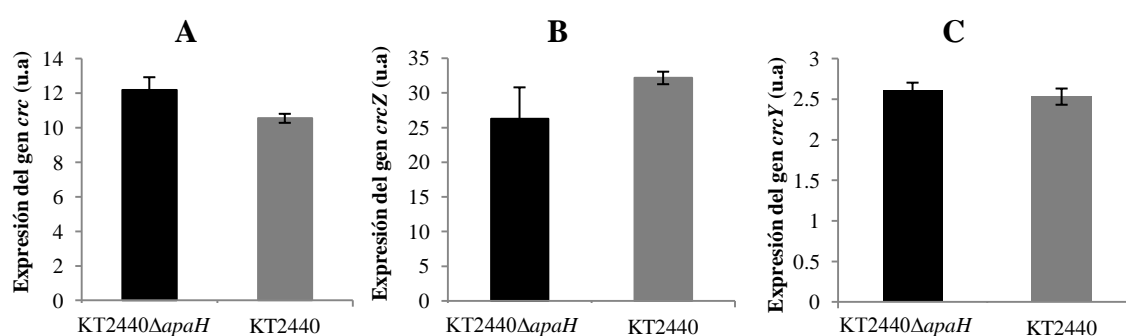


Figura 56. Niveles de expresión de los genes *crc*, *crcY* y *crcZ* en *P. putida* KT2440 y *P. putida* KT2440 Δ *apaH*. El RNA total fue extraído de las cepas KT2440 y KT2440 Δ *apaH* creciendo hasta fase exponencial media en AFA 2.5 mM, y se midió por RT-PCR cuantitativa la expresión de los genes *crc* (A), *crcZ* (B) y *crcY* (C), tal y como se detalla en el apartado 4.6 de Materiales y Métodos. La expresión relativa de cada gen se muestra en unidades arbitrarias (u.a.) Los valores son el promedio de tres muestras biológicas independientes. Las barras representan la desviación estándar de cada promedio.

5.2.3. Estudio de la expresión de los genes *rsm* en *P. putida* KT2440 Δ *apaH*.

Otro sistema que es capaz de activar la expresión del gen *rpoS* es el controlado por el sistema regulador de dos componentes GacS/GacA (Whistler *et al.*, 1998). GacA es un regulador de respuesta que activa la expresión de los sRNAs *rsmX*, *rsmY* y *rsmZ* capaces de secuestrar a las proteínas RsmA, RsmE y RsmL que inhiben la traducción del gen *rpoS* en *Pseudomonas* (Heeb *et al.*, 2005; Sonnleitner y Haas, 2011). Además, se ha descrito que el sistema GacS/GacA es capaz de activar la transcripción del gen *rpoS*, muy probablemente a través de un mecanismo indirecto que implicaría también a

las proteínas Rsm (Whistler *et al.*, 1998). Por tanto, se procedió a investigar si la expresión de los genes *rsm* está alterada en *P. putida* KT2440 Δ *apaH*.

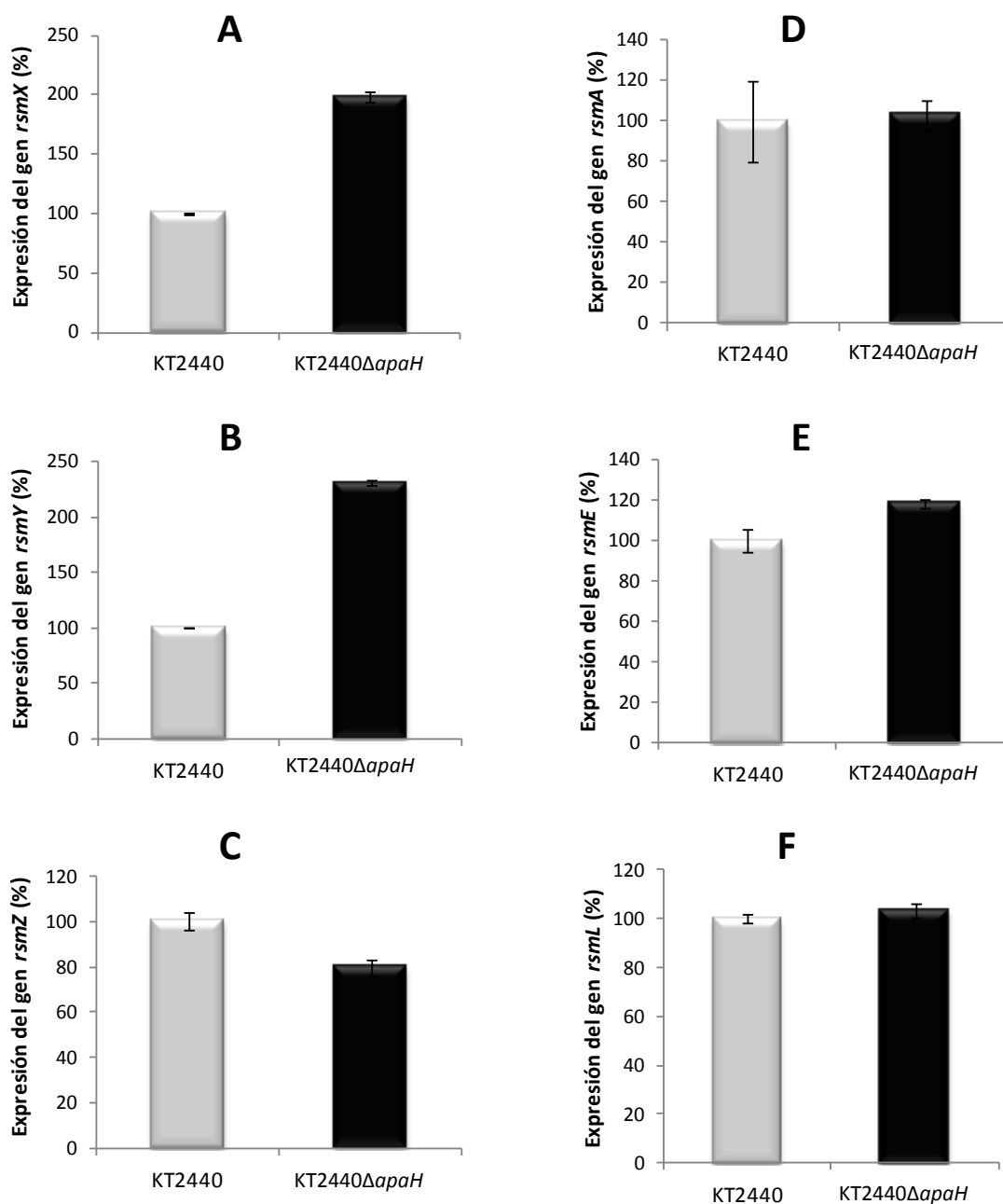


Figura 57. Niveles de expresión de los genes *rsm* en *P. putida* KT2440 y *P. putida* KT2440 Δ *apaH*. El RNA total fue extraído de las cepas KT2440 y KT2440 Δ *apaH* creciendo hasta la fase exponencial media en AFA 2.5 mM, y se midió por RT-PCR cuantitativa la expresión de los genes *rsm* tal y como se detalla en el apartado 4.6 de Materiales y Métodos. La expresión relativa de cada gen en la cepa KT2440 Δ *apaH* se indica como un porcentaje de la expresión de ese mismo gen en la cepa parental KT2440. Los valores son el promedio de tres muestras biológicas independientes. Las barras representan la desviación estándar de cada promedio.

Como se observa en la figura 57, si bien la expresión de los genes *rsmA*, *rsmE* y *rsmL* no está significativamente alterada, la expresión de los sRNAs *rsmY* y *rsmX* está aumentada al menos 2 veces en *P. putida* KT2240 Δ *apaH* con respecto a la cepa parental KT2440. Estos resultados sugieren que el incremento de expresión del gen *rpoS* en la cepa mutante *P. putida* KT2240 Δ *apaH* podría ser debido al incremento de expresión de los sRNAs *rsmY* y *rsmX*, y, por ende, a la inactivación de las proteínas RsmA/E/L, apuntando a que la cascada de señalización que responde a los niveles de Ap₄A en *P. putida* está mediada por el sistema regulador global GacS/GacA.

5.3. La cepa doble mutante *P. putida* KT2440 Δ *apaH**dgacA* restaura la fase de latencia de la cepa parental *P. putida* KT2440.

Los resultados presentados en el anterior apartado sugieren que los niveles de Ap₄A estarían controlando a las proteínas RsmA/E/L presentes en *P. putida* KT2440 a través de los sRNAs *rsmY/X*. Puesto que está descrito que los niveles de los sRNAs *rsm* están controlados por el sistema regulador de dos componentes GacS/GacA, una hipótesis plausible sería que los niveles de Ap₄A controlaran directa o indirectamente a dicho sistema regulador global.

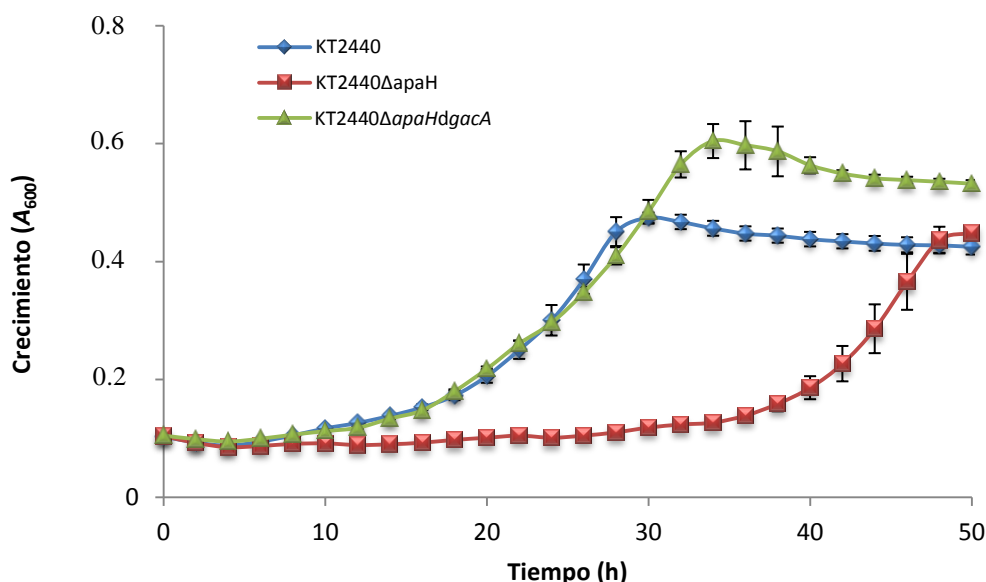


Figura 58. Crecimiento de *P. putida* KT2440, *P. putida* KT2440 Δ *apaH* y *P. putida* KT2440 Δ *apaHdgacA* en AFA.** El crecimiento de las cepas en medio M63 utilizando AFA 2.5 mM como única fuente de carbono fue determinado mediante el seguimiento de la A₆₀₀ en micro placas, tal y como se detalla en el apartado 3 de Materiales y Métodos.

Para profundizar en estos estudios, se construyó una cepa de *P. putida* KT2440 doble mutante *apaH/gacA*. La curva de crecimiento de la cepa doble mutante *P. putida* KT2440 Δ *apaH**gacA* (Tabla 1) en AFA como única fuente de carbono y energía era similar a la de la cepa parental, y no mostraba la fase de latencia extendida que caracteriza a la cepa mutante en el gen *apaH* (Fig. 58). Este resultado está de acuerdo con la hipótesis de que los niveles de Ap₄A regulan al sistema GacS/GacA resultando en la inducción de los sRNAs *rsm* y, por ende, del gen *rpoS*, y en el fenotipo de fase de latencia extendida que caracteriza a la cepa mutante *P. putida* KT2440 Δ *apaH*.

VI. DISCUSIÓN

VI. Discusión

Los compuestos aromáticos se encuentran presentes de manera ubicua en el medio ambiente y son por ello una fuente de carbono frecuente para muchos microorganismos equipados con la maquinaria enzimática necesaria para su degradación. Las rutas metabólicas para la degradación microbiana de los compuestos aromáticos y los mecanismos específicos de regulación de estas vías catabólicas han sido extensamente estudiadas en las últimas décadas (Díaz y Prieto, 2000; Prieto *et al.*, 2004; Rojo y Dinamarca, 2004; Tropel y van der Meer, 2004; Rojo, 2010; Díaz *et al.*, 2013).

Los microorganismos en su medio ambiente natural generalmente se encuentran en presencia de una mezcla compleja de fuentes de carbono. Para optimizar su supervivencia en estas condiciones, los microorganismos regulan la expresión de sus genes de manera que puedan seleccionar la mejor fuente de carbono disponible en cada momento. En las bacterias, el fenómeno de la represión catabólica se cree que es una respuesta de ahorro energético mediante la cual los compuestos fácilmente metabolizables, e.g., ácidos orgánicos, azúcares, son utilizados con preferencia a los sustratos más difíciles de metabolizar o cuyo rendimiento energético es más bajo, e.g., compuestos aromáticos. Los mecanismos por los cuales se produce la represión catabólica son diversos y han sido bien caracterizados en bacterias como *E. coli* y *B. subtilis* (Deutscher *et al.*, 2006; Park *et al.*, 2006), pero están menos caracterizados en otras bacterias de gran relevancia medioambiental como por ejemplo las del género *Pseudomonas* (Rojo, 2010).

La represión catabólica que ejercen algunos compuestos aromáticos sobre el catabolismo de otros compuestos aromáticos que utilizan rutas periféricas distintas es un tema de gran interés y que ha sido poco estudiado hasta la fecha. Como se ha comentado en el capítulo 1.2 de la Introducción, las bacterias utilizan dos estrategias básicas diferentes, y que pueden co-existir en la misma célula, para la degradación aeróbica de compuestos aromáticos, i) las rutas aeróbicas clásicas, e.g., ruta del β -cetoadipato, que involucran intermediarios catecólicos y ii) las rutas aeróbicas híbridas, e.g., ruta del AFA y del benzoil-CoA, que generan intermediarios epóxidos derivados de CoA. Aunque se ha argumentado que las rutas clásicas e híbridas podrían ser ventajosas cuando la bacteria habita ambientes con alta y baja disponibilidad de

oxígeno, respectivamente (Díaz *et al.*, 2013; Law y Boulanger, 2003), la significación biológica de estos dos tipos básicos de catabolismo y la posible preferencia de uno sobre otro se desconoce hasta la fecha. Los escasos estudios realizados sobre la utilización bacteriana de mezclas de compuestos aromáticos se han centrado en compuestos que se degradan vía rutas aeróbicas clásicas. En este sentido, el trabajo realizado en *Acinetobacter baylyi* (Bleichrodt *et al.* 2010), *Cupriavidus necator* JMP134 (Donoso *et al.*, 2011), y en la bacteria modelo *P. putida* (Nichols y Harwood, 1995) revelan que el benzoato es una fuente de carbono preferente al 4HBA, si bien ambos compuestos se catabolizan a través de la misma ruta central del β -cetoadipato.

Hasta la realización de esta tesis no se había explorado la posible regulación cruzada entre una ruta aeróbica híbrida y una ruta aeróbica clásica que involucra intermediarios catecólicos. Estos estudios podrían contribuir sin duda a esclarecer la preferencia de un tipo de catabolismo sobre otro, y aportarían información interesante para tratar de explicar la existencia de rutas híbridas específicas que co-existen con las más extendidas rutas aeróbicas clásicas. Por ello, en el presente trabajo se ha abordado por primera vez el estudio del efecto del AFA, como ejemplo paradigmático de compuesto que se degrada vía ruta aeróbica híbrida, sobre el metabolismo de otras fuentes de carbono aromáticas que utilizan rutas clásicas de degradación aeróbica, tales como la ampliamente distribuida ruta intradiólica del β -cetoadipato (Harwood y Parales, 1996) o la ruta extradiólica del galato (Nogales, 2011).

I. Metabolismo del AFA versus catabolismo aeróbico clásico en *P. putida* KT2440.

Como se ha indicado más arriba, en el presente trabajo uno de los objetivos fue estudiar si una ruta aeróbica híbrida como es la del AFA era preferente o no a las rutas catecólicas clásicas en la bacteria modelo *P. putida* KT2440.

I.1. Efecto del AFA sobre la ruta de degradación de 4HBA.

Se seleccionó inicialmente el 4HBA como fuente de carbono aromática alternativa y modelo de la ruta aeróbica clásica más ampliamente distribuida (ruta del β -cetoadipato) (Figs. 5 y 7). *P. putida* KT2440 creciendo en 4HBA muestra una fase de latencia menor que creciendo en AFA (Fig. 15), lo que indica que en las condiciones probadas la cepa KT2440 comienza el metabolismo del 4HBA más rápidamente que el

del AFA. Este resultado está de acuerdo con los estudios del consumo de ambas fuentes de carbono, que revelan un consumo más rápido del 4HBA que del AFA (Fig. 16). La fase de latencia más larga durante el crecimiento en AFA podría deberse a que la degradación de este compuesto, a diferencia de la del 4HBA, requiere un consumo inicial de ATP para la producción del primer intermediario de la ruta, fenilacetil-CoA (Fig. 6). El diferente sistema de transporte al interior celular del 4HBA, mediado por la proteína PcaK que es un MFS symporter aromático/H⁺ (familia AAHS), y del AFA, mediado por la porina PaaM y el transportador PaaL symporter de sodio (familia SSS), también podría estar implicado en la diferente duración de la fase de latencia en ambas fuentes de carbono. Por otro lado, el crecimiento y consumo de AFA muestra un comportamiento característico en el que se distinguen dos fases separadas por un intervalo en el que no existe consumo de la fuente de carbono. Así, en una primera fase se consume el 50% del AFA pero no se consigue un crecimiento elevado, sin embargo es durante la segunda fase cuando se alcanza una tasa de crecimiento mayor y ligeramente superior a la obtenida con 4HBA (Figs. 15 y 16). Estos resultados sugieren que muy probablemente la primera fase del consumo de AFA no se traduce en un metabolismo eficaz del compuesto, siendo en la segunda fase cuando éste se mineraliza eficazmente y se genera la energía y biomasa necesaria para un crecimiento óptimo. Aunque la base molecular de este comportamiento atípico no se conoce todavía, se ha descrito que en la degradación del AFA se pueden generar intermediarios tóxicos, como por ejemplo el derivado epóxido, que podrían inhibir la ruta catabólica tanto a nivel de las enzimas implicadas en la oxigenación y des-aromatización del epoxifenilacetil-CoA (Teufel *et al.*, 2012), como a nivel del represor transcripcional PaaX actuando a modo de antagonistas que contrarrestan el efecto inductor del fenilacetil-CoA (Fernández *et al.* 2013). Si la acumulación de estos intermediarios tóxicos en *P. putida* es la razón de la existencia de dos fases en el consumo de AFA es una hipótesis que necesita ser validada en el futuro.

Cuando se analiza el crecimiento de *P. putida* KT2440 en la mezcla 4HBA/AFA, se observa que es similar al obtenido con AFA pero con una fase de latencia más corta (Fig. 15). El consumo de AFA y 4HBA (Fig. 16) reveló que ambos están siendo eliminados del medio de cultivo, sugiriendo así que existe un co-metabolismo de ambos compuestos en la cepa KT2440. La utilización de AFA en la mezcla (Fig. 16C) se ve claramente favorecida respecto a la que se observa cuando se

utiliza este compuesto como fuente de carbono única (Fig. 16B), ya que se adelanta en 2h, sugiriendo que el metabolismo del 4HBA favorece el consumo del AFA. Por otro lado, el consumo de 4HBA en la mezcla (Fig. 16C) es más lento que cuando se utiliza como fuente de carbono única (Fig. 16A), sugiriendo que el AFA ralentiza el consumo de 4HBA. Es durante la segunda fase de consumo de AFA, cuando ya se ha consumido la mayor parte del 4HBA, cuando se alcanza la mayor tasa de crecimiento de *P. putida* KT2440 en la mezcla (Fig. 16C).

Todos estos resultados están de acuerdo con la hipótesis de que el AFA y el 4HBA se consumen simultáneamente en *P. putida*, siendo el metabolismo del 4HBA una fuente de energía que acelera el consumo inicial de AFA. No obstante, el co-metabolismo de ambas fuentes de carbono ralentiza el consumo de 4HBA, lo que podría ser un reflejo de que la maquinaria metabólica de *P. putida* está siendo compartida por ambas rutas catabólicas y de que el AFA ejerce un efecto represor sobre la ruta del 4HBA.

Para profundizar en el estudio del efecto del AFA sobre la ruta del 4HBA, se analizó la expresión de dos actividades enzimáticas claves de dicha ruta, i.e., la actividad PobA (4-hidroxibenzoato 3-monooxigenasa) de la ruta periférica que convierte 4HBA en protocatecuato, y la actividad PcaGH (protocatecuato 3,4-dioxigenasa) de la ruta central del β -cetoadipato que transforma el protocatecuato en intermediarios del ciclo del TCA (Fig. 7), cuando *P. putida* KT2440 se cultiva en la mezcla 4HBA/AFA. Se observó que el AFA ejerce un significativo efecto inhibitorio de la actividad PobA y PcaGH (Figs. 17 y 18). Para determinar si el efecto represor del AFA sobre las actividades enzimáticas de la ruta del 4HBA podría implicar un control de los genes *pob* y *pca* específicos de la rama del protocatecuato, se realizaron estudios de expresión génica. Estos estudios revelaron que los niveles de expresión de los genes *pobA*, *pcaH* y *pcaK* disminuyen en presencia de AFA (Figs. 19-21), lo cual indica que el metabolismo del AFA ejerce un efecto a nivel transcripcional sobre la expresión de los operones *pob/pca* implicados en la degradación de 4HBA en *P. putida* KT2440.

Como se ha indicado anteriormente, existen pocos estudios sobre la expresión de rutas catabólicas cuando las bacterias utilizan mezclas de compuestos aromáticos. En *P. putida* KT2440 el benzoato se degrada de manera preferente al 4HBA en la mezcla. Se ha determinado que el benzoato ejerce un efecto represor sobre la expresión del gen *pcaK*, que codifica el transportador específico de 4HBA, lo que explica que se consuma

el benzoato de forma preferente al 4HBA (Nichols y Harwood, 1995). Para confirmar si el efecto represor del AFA sobre la ruta del 4HBA pudiese ser debido también a la represión observada del gen *pcaK* (Fig. 21), se sobreexpresó dicho gen transportador en *P. putida* y se analizó la actividad PobA de la cepa recombinante cultivada en la mezcla AFA/4HBA. Los resultados obtenidos revelaron que la sobre-expresión del gen *pcaK* no impide el efecto represor del AFA sobre la actividad PobA (Fig. 23), sugiriendo que el transporte de 4HBA no está implicado en la represión de la ruta del 4HBA por parte del AFA. En *C. necator* se ha descrito un mecanismo diferente para explicar la represión del benzoato sobre la ruta 4HBA. En esta bacteria, el benzoato es capaz de inhibir la expresión del gen *pobR*, el cual codifica un activador transcripcional de la ruta del 4HBA (Donoso *et al.*, 2011). Cuando se analizó la expresión del gen *pobR* en *P. putida* KT2440 tampoco se observó ninguna diferencia significativa cuando las células se cultivaban en 4HBA o en la mezcla 4HBA/AFA (Fig. 24). Todos estos resultados sugieren que el efecto del metabolismo del AFA sobre la expresión de la ruta del 4HBA no está mediado por ninguno de los dos mecanismos descritos hasta la fecha y que explican el consumo preferente de benzoato sobre 4HBA en *P. putida* y *C. necator*.

Para determinar si el efecto represor del AFA sobre la ruta del 4HBA se debe al propio AFA o requiere el metabolismo de éste, se utilizó un mutante de *P. putida* incapaz de metabolizar AFA. Así, la inactivación del gen *paaF*, que codifica la fenilacetato-CoA ligasa (PP_3279) que inicia la ruta de degradación activando AFA a fenilacetil-CoA (Fig. 6), reveló que es necesario el catabolismo del AFA para que tenga lugar una inhibición significativa de la actividad PobA (Fig. 25). Por su parte, el 4HBA no alteró los niveles de expresión del gen *paaG* (PP_3278), que codifica una de las subunidades de la epoxifenilacetil-CoA monooxigenasa de la ruta de degradación de AFA (Fig. 6), en bacterias cultivadas en la mezcla 4HBA/AFA (Fig. 22).

En resumen, los resultados presentados revelan por primera vez que el AFA y 4HBA se co-metabolizan en *P. putida*, si bien el metabolismo del AFA reprime parcialmente la expresión de los operones *pob/pca* implicados en la degradación de 4HBA (Fig. 59). Por su parte, el metabolismo del 4HBA facilita el consumo de AFA en la mezcla, probablemente aportando la energía necesaria para que se inicie el consumo de AFA.

I.2. Efecto del AFA sobre la ruta de degradación de galato: implicación del gen *apaH*.

Para analizar si el efecto del AFA es más general y causa también represión de otras rutas aeróbicas clásicas en *P. putida* KT2440, se estudió su influencia sobre la ruta gal responsable de la degradación, vía ruptura extradióxica, de galato (Fig. 8). Para ello, se monitorizó la expresión de los genes *gal* mediante el análisis de la actividad de los promotores catabólicos P_T y P_B . Los resultados obtenidos revelaron que cuando *P. putida* KTGAL se cultiva en presencia de la mezcla galato/AFA, existe una significativa represión de los promotores P_T y P_B respecto a la actividad observada cuando las células usan galato como única fuente de carbono (Fig. 26).

En conclusión, los resultados obtenidos en esta tesis cuando *P. putida* se cultiva en mezclas de compuestos aromáticos sugieren que el metabolismo del AFA causa un efecto represor general sobre las rutas aeróbicas clásicas, efecto que se ha demostrado en este trabajo con las rutas centrales del β -cetoadipato y la del galato (Fig. 59).

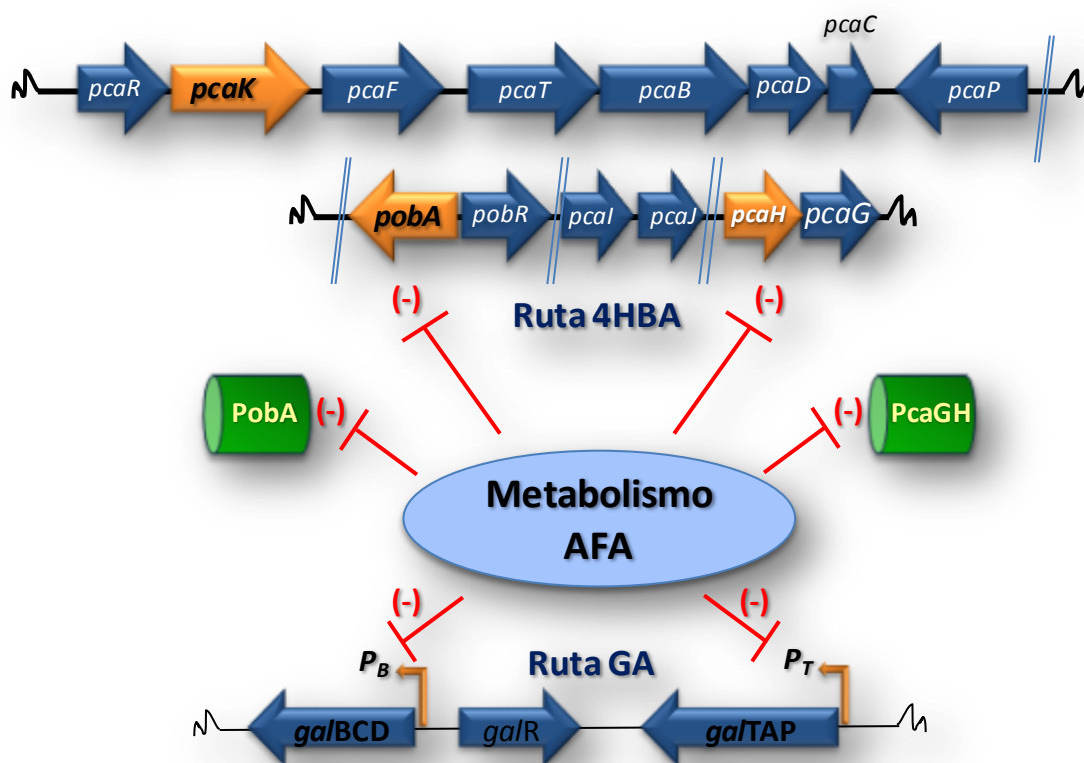


Figura 59. Efecto represor del metabolismo del AFA sobre las rutas aeróbicas clásicas de degradación de 4HBA y galato en *P. putida* KT2440. Los genes *pob/pca* y *gal* de las rutas de degradación de 4HBA y galato (GA), respectivamente, se indican con flechas gruesas azules. En naranja se detallan los genes o promotores en los que se ha demostrado el efecto represor del AFA. Las actividades enzimáticas ensayadas y

reprimidas por el AFA, i.e., 4-hidroxibenzoato-3-monooxigenasa (PobA) y protocatecuato 3,4-dioxigenasa (PcaGH), se indican con cilindros verdes.

Para intentar conocer la base molecular de la represión que ejerce el AFA sobre la expresión de los genes *gal*, se procedió a la búsqueda de mutantes defectivos en dicha represión. Para ello, se utilizó un sistema de selección de mutantes generados mediante integración al azar del mini-transposón Tn5 en *P. putida* KTGAL conteniendo el sistema reportero $P_T::lacZ$. Este sistema de selección ha permitido el aislamiento de cuatro clones mutantes en los que no se observa la represión del AFA sobre el promotor P_T (Fig. 27), y en los que se ha identificado el gen en el que ha tenido lugar la integración del mini-transposón Tn5 (Tabla 4). De los 4 mutantes identificados, el que posee una inserción en el gen *apaG*, *P. putida* KTGAL-14, se ha seleccionado para su posterior estudio. Aunque el gen *apaG* codifica una proteína de función desconocida, se ha descrito que podría interactuar con el Ap₄A (Plateau y Blanquet, 1994), una alarmona que controla distintas funciones celulares y condiciones de estrés (Bochner *et al.*, 1984; Johnstone y Farr, 1991; Monds *et al.*, 2010). La proteína ApaH es la principal hidrolasa que actúa sobre el dinucleótido Ap₄A originando dos moléculas de ADP (Fig. 29) y por lo tanto, es una enzima clave en el control de los niveles de este dinucleótido en la célula (ver apartado 3.1 de la Introducción). Dado que los genes *apaG* y *apaH* parecen co-transcribirse en el genoma de *P. putida* KT2440 (Fig. 28), se consideró probable que el fenotipo de no represión por AFA fuese debido a la inactivación del gen *apaH* debido a los efectos polares causados por la inserción del mini-transposón Tn5 en el gen *apaG*. Para confirmar si la ausencia de represión catabólica de los genes *gal* por AFA en *P. putida* era debida a la inactivación del gen *apaH*, se procedió a la interrupción insercional de éste. Dado que la cepa resultante, *P. putida* KTGAL*dapaH*, no mostraba represión de la fusión $P_T::lacZ$ cuando las células se cultivaban en presencia de AFA y galato (Fig. 30), se pudo concluir que el gen *apaH* está de alguna forma implicado en el fenómeno de represión de los genes *gal* mediado por AFA. Además, cabe mencionar que la cepa mutante *P. putida* KTGAL*dapaH* mostraba un claro retraso en el crecimiento en compuestos aromáticos tales como el AFA, siendo la primera vez que se describe la implicación del gen *apaH* y, por ende, muy posiblemente del Ap₄A, en el control del catabolismo de compuestos aromáticos en bacterias. La base molecular que subyace al control del metabolismo de *P. putida* KT2440 por la alarmona

Ap₄A ha sido el objetivo del segundo capítulo temático de esta tesis y será tratado en el apartado II de esta discusión.

I.3. Utilización del modelo iJN1411 para el estudio del crecimiento de *P. putida* KT2440 en distintos compuestos aromáticos

Hasta la fecha sólo se había descrito una inhibición del AFA sobre la ruta periférica *sty* que convierte el estireno en dicho compuesto aromático (O'Leary *et al.*, 2001; del Peso-Santos *et al.*, 2006). El efecto represor del AFA sobre otras rutas centrales de degradación de compuestos aromáticos es, por ello, un resultado novedoso que permite especular con la ventaja que puede tener la evolución de una ruta aeróbica híbrida, como la del AFA, sobre las rutas aeróbicas clásicas que implican intermediarios catecólicos. Para explorar sobre la posible ventaja que pueda tener la utilización de AFA frente a la de otros compuestos aromáticos que se degradan vía rutas aeróbicas clásicas, se procedió a realizar un estudio teórico sobre el rendimiento energético derivado del metabolismo de todos los compuestos aromáticos que *P. putida* KT2440 puede utilizar como fuente de carbono (Jiménez *et al.*, 2010) (Fig. 60).

Como se observa en la figura 60, el modelo predice que los compuestos que se degradan por la vía aeróbica híbrida, como es el caso del fenildecanoato, feniletilamina, feniletanol, fenilacetaldehído y el propio AFA, son capaces de producir un número mayor de moléculas de ATP por molécula de carbono y, en teoría, generan un crecimiento mayor que el resto de los compuestos aromáticos que se degradan por vías aeróbicas clásicas. Este estudio teórico está de acuerdo con la hipótesis de que el AFA es una buena fuente de carbono para *P. putida*, lo que explicaría la represión que ejerce sobre la ruta del 4HBA y GA demostrada experimentalmente en este trabajo. Igualmente está de acuerdo con el hecho de que el metabolismo del benzoato reprime el catabolismo de 4HBA en *P. putida*. Cabe mencionar el resultado obtenido para la fenilalanina, una fuente de carbono que puede mineralizarse tanto por la vía clásica del homogentisato (Arias-Barrau *et al.*, 2004) como por la vía del AFA (Herrera *et al.*, 2010), y que el modelo predice que genera un significativo mayor rendimiento energético cuando se cataboliza a través de la ruta aeróbica híbrida del AFA (Fig. 60).

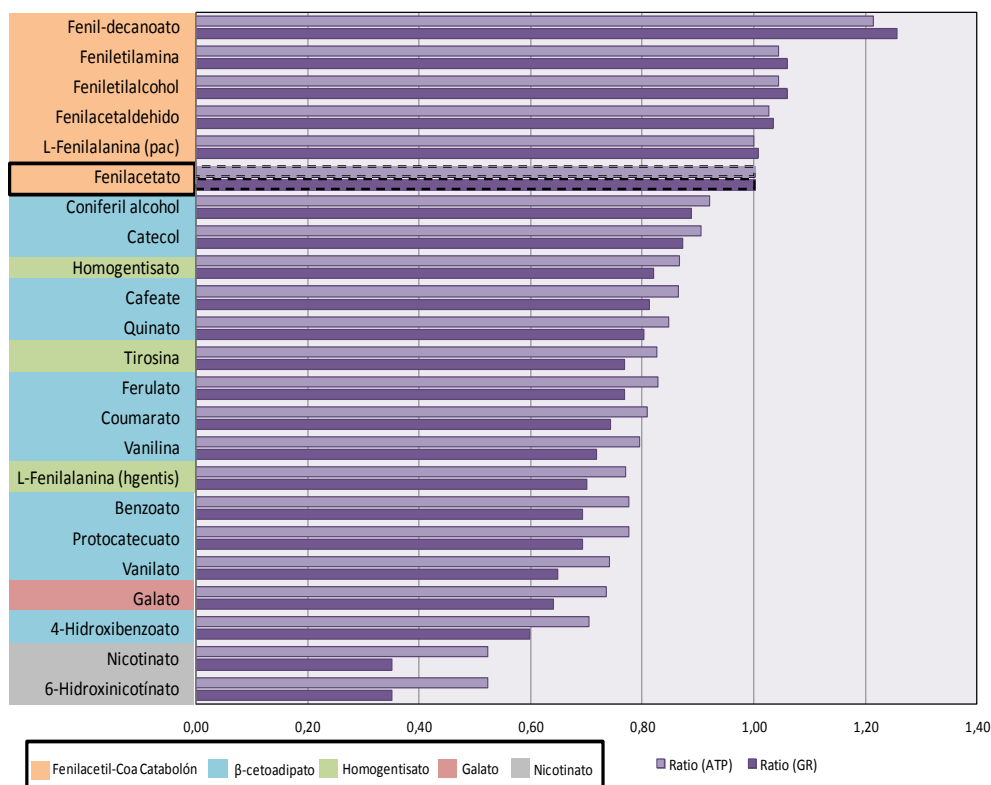


Figura 60: Rendimiento energético del metabolismo de compuestos aromáticos según el modelo iJN1411. Para el análisis teórico se utilizó el modelo iJN1411 el cual fue analizado mediante FBA implementado en la herramienta "COBRA toolbox" como se explica en el apartado 18 de Materiales y Métodos. Tanto la tasa específica de crecimiento (GR) como la producción de ATP fueron maximizados utilizando como única restricción el consumo (1 mmol/g peso seco.h) de la fuente de carbono. Ratio (ATP) y ratio (GR) representan la producción de ATP y la velocidad de crecimiento, respectivamente, por átomo de carbono de cada una de las fuentes de carbono utilizadas. Se considera 1 el valor del ratio utilizando AFA.

Como se ha descrito, la ruta aeróbica híbrida del AFA implica una serie de reacciones similares a las de la β -oxidación de ácidos grasos (Fig. 6) (Olivera *et al.*, 1998, Teufel *et al.*, 2010, 2012), lo que la diferencia claramente de las rutas aeróbicas clásicas utilizadas para la degradación de un gran número de compuestos aromáticos. Por otro lado, en *P. putida* KT2440 se ha determinado que los ácidos grasos son una fuente preferente de carbono (Escapa *et al.* 2012). De hecho, y en buena concordancia con las observaciones experimentales, el ratio ATP (1.3) y el ratio GR (1.6) predichos utilizando octanoato como fuente de carbono fueron significativamente más altos que los predichos con otras fuentes de carbono no aromáticas, tales como la glucosa (ratio ATP, 1; ratio GR, 1.4) o el succinato (ratio ATP, 0.8; ratio GR, 1.0). Estas observaciones apuntan a una posible explicación de por qué el AFA es una fuente de carbono preferente a otros

compuestos aromáticos que se degradan a través de las rutas aeróbicas clásicas en *P. putida* KT2440.

II. Caracterización molecular de los efectos de la inactivación del gen *apaH* en *P. putida* KT2440.

Como se ha comentado en el apartado I.2 de la Discusión, en esta tesis se identificó por primera vez que la inactivación del gen *apaH* alteraba el control del metabolismo de fuentes de carbono aromáticas en *P. putida*. Como se indica en el capítulo 3.1 de la Introducción, el aumento transitorio de los niveles de Ap₄A en la célula conlleva cambios fisiológicos importantes, fundamentalmente orientados a la defensa ante condiciones de estrés (Bochner *et al.*, 1984; Johnstone y Farr, 1991; Fuge y Spencer, 1993). La inactivación del gen *apaH* en distintas bacterias causa efectos pleiotrópicos tales como la pérdida de movilidad y quimiotaxis, incremento en la formación de biofilm, menor resistencia al choque térmico, estrés oxidativo o exposición a luz ultravioleta, alteraciones de algunas actividades metabólicas, menor resistencia a los antibióticos, menor invasión y adhesión a células eucariotas, etc. (Leveque *et al.*, 1990; Johnstone y Farr, 1991; Fuge y Farr, 1993; Ismail *et al.*, 2003; Hansen *et al.*, 2008; Monds *et al.*, 2010).

No obstante, pese a que la relación entre los altos niveles de Ap₄A y la modulación del metabolismo celular son bien conocidos, aún no se conoce la verdadera naturaleza de esta relación ni los mecanismos moleculares que la controlan. Es por esto que en esta tesis nos propusimos descifrar mediante abordajes fenotípicos, moleculares y de biología de sistemas la compleja respuesta celular consecuencia de la inactivación del gen *apaH* en *P. putida*. El estudio de proteómica de *P. putida* cultivada en AFA reveló cambios significativos cuando se comparó el perfil de proteínas de la cepa parental KT2440 con el de la cepa mutante KT2440Δ*apaH* (Tablas 6, 7, y S1). Las 117 proteínas inducidas y 55 reprimidas en la cepa mutante *P. putida* KT2440Δ*apaH* se pueden agrupar en distintas categorías funcionales (Tablas 6 y 7; Fig. 61) que implican a los tres programas celulares básicos, i.e., programa morfológico, metabólico y de estrés, que se han descrito en el apartado 3 de la Introducción. Estos tres programas, complementarios y necesariamente interconectados para ofrecer una respuesta coordinada ante condiciones adversas, se discuten de forma detallada más abajo.

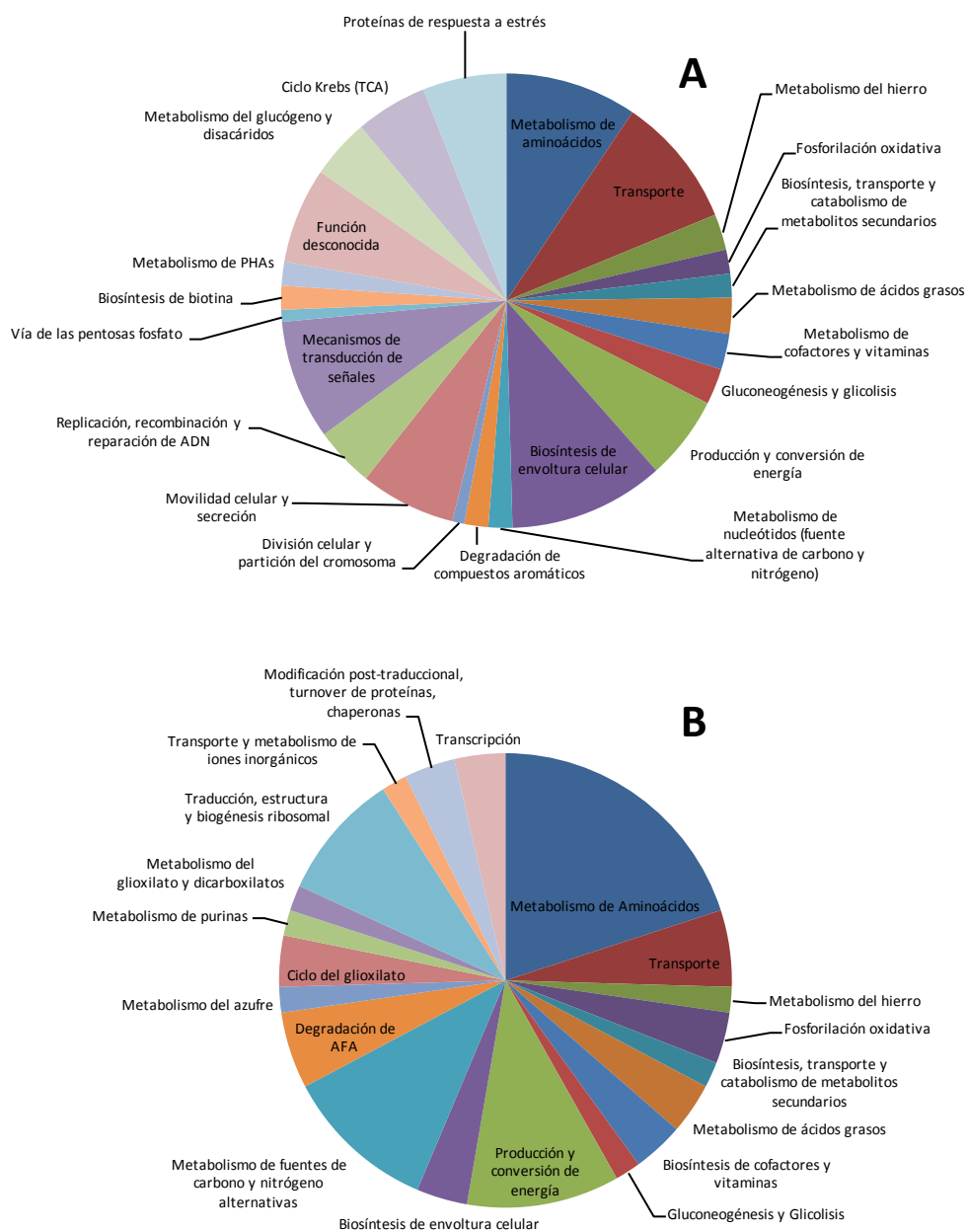


Figura 61. Gráfico representativo de las proteínas alteradas en el proteoma de *P. putida* KT2440 Δ *apaH* respecto a la cepa control *P. putida* KT2440. A, grupos funcionales de proteínas que ven inducida su expresión en el proteoma de *P. putida* KT2440 Δ *apaH*. B, grupos funcionales de proteínas que ven reprimida su expresión en el proteoma de *P. putida* KT2440 Δ *apaH*.

II.1 Efecto de la mutación en el gen *apaH* sobre el programa morfológico de *P. putida* KT2440: movilidad y producción de biofilm.

Los estudios de proteómica indicaban que la cepa mutante *P. putida* KT2440 Δ *apaH* posee alterados los niveles de expresión de un buen número de

proteínas de la envoltura celular (Tablas 6 y 7). Pese a que tanto la morfología como el tamaño de las células carentes de un gen *apaH* funcional es aparentemente similar al de las células parentales (Fig. 31), la alteración en la expresión de gran cantidad de proteínas involucradas en la síntesis/remodelación de lípidos de membrana, peptidoglicano y exopolisacáridos (e.g., PP_1786, PP_1792, PP_3134) (Nilsson *et al.* 2011) sugiere cambios significativos en el programa morfológico del mutante *apaH*. Dos fenotipos directamente relacionados con el programa morfológico, i.e., movilidad y producción de biofilm, fueron analizados en la cepa parental y en la cepa mutante *apaH*.

La movilidad de las cepas *P. putida* KT2440 y *P. putida* KT2440 Δ *apaH* fue analizada mediante experimentos de tipo "swimming" (movilidad mediada por el flagelo polar o movilidad profunda) y "swarming" (movilidad superficial en medios semisólidos) (Matilla *et al.*, 2011). Los resultados obtenidos mostraron que *P. putida* KT2440 Δ *apaH* presenta una disminución de la movilidad tipo *swimming* y *swarming* (Fig. 33). En *P. putida* KT2440 se ha descrito que la pérdida de movilidad, así como el aumento en la formación de biofilm, está relacionada con el aumento de los niveles de di-GMPc mediados por la hiperproducción de la proteína PP_4959, un regulador de respuesta con motivos GGDEF/EAL que está regulado por el factor sigma RpoS (Matilla *et al.*, 2011). Los resultados de proteómica revelan que la proteína PP_4959 está ciertamente incrementada más de tres veces en *P. putida* KT2440 Δ *apaH* con respecto a la cepa parental (Tabla 6), lo cual está de acuerdo con la pérdida de movilidad observada en el mutante *apaH*.

Por otro lado, en un mutante *apaH* de *P. fluorescens* Pf0-1 los altos niveles de Ap₄A se han asociado a un incremento en la biosíntesis *de novo* de purinas (GTP), lo que a su vez se traduciría en un incremento en la biosíntesis de di-GMPc, cuyos niveles alcanzan un valor 10 veces más alto que en la cepa parental (Monds *et al.*, 2010). En este sentido, en la cepa *P. putida* KT2440 Δ *apaH* la proteína PP_1037, anotada como PurL y por lo tanto implicada en las primeras etapas de la biosíntesis de purinas, se encuentra inducida unas dos veces respecto a los valores detectados en la cepa parental (Tabla 6), lo cual sugiere que la síntesis de purinas podría estar incrementada facilitando la formación de di-GMPc a través de ciclasas tales como PP_4959.

Por otra parte, mientras que en *E. coli* la mutación del gen *apaH* causa una disminución de la transcripción del factor sigma F (gen *fliA* o *rpoF*) que controla los genes de movilidad y quimiotaxis (Farr *et al.*, 1989), en *P. putida* KT2440 Δ *apaH* la

expresión del gen *fliA* (PP_5108) no parece estar alterada (Tabla 10), y tampoco se observan cambios apreciables en las proteínas que constituyen la flagelina (datos no mostrados). Estos resultados indican, por tanto, que la pérdida de movilidad observada en la cepa KT2440 Δ *apaH* aparentemente no son debidos a alteraciones en la expresión de los genes que codifican el aparato flagelar sugiriendo, por el contrario, que la movilidad reducida podría estar relacionada con aspectos desconocidos del aparato flagelar en *Pseudomonas* y/o con un estado energético subóptimo.

Como se ha indicado en el apartado 3 de la Introducción, la movilidad y la formación de biofilm son dos procesos vitales que están controlados, de forma inversa, por los niveles de di-GMPc en la célula. Así, niveles elevados de di-GMPc causan una reducción de movilidad y un aumento en la formación de biofilm (Jiménez *et al.*, 2012). El estudio de la formación de biofilm reveló que la cepa mutante KT2440 Δ *apaH* presenta una mayor formación de biofilm que la cepa parental KT2440 (Figs. 34 y 35), lo que está de acuerdo con la menor movilidad del mutante. En *P. fluorescens* Pf0-1 el mutante *apaH* también presenta una mayor formación de biofilm (casi el doble) que la cepa parental. En esta bacteria se ha propuesto que la activación de la formación de biofilm está mediada por el incremento de los niveles de di-GMPc, el cual interaccionaría con la proteína LapD receptora de di-GMPc y promovería la localización de la adhesina LapA en la membrana externa (Monds *et al.*, 2010). En *P. putida* la sobreproducción de la ciclasa PP_4959, que supone un incremento en los niveles celulares de di-GMPc, aumenta los niveles de LapA y por ende la formación de biofilm (Matilla *et al.*, 2011). En esta tesis, los resultados de proteómica revelan que tanto la proteína PP_4959 como la PP_0168 (LapA) ven aumentada su expresión en la cepa KT2440 Δ *apaH* (Tabla 6), sugiriendo un mecanismo de formación de biofilm similar al ya descrito en otras *Pseudomonas* y basado en el incremento en los niveles de di-GMPc y en ciertas adhesinas como LapA.

Estos resultados en su conjunto nos han permitido determinar que la mutación en el gen *apaH* en *P. putida* KT2440 provoca una respuesta morfológica clara que implica una más que probable remodelación de la envoltura celular, así como el cambio de un modo de vida libre a otro sésil mediado por una disminución de movilidad y un aumento de la formación de biofilm, procesos que responden a un aumento en los niveles de di-GMPc en la célula. (Fig. 62).

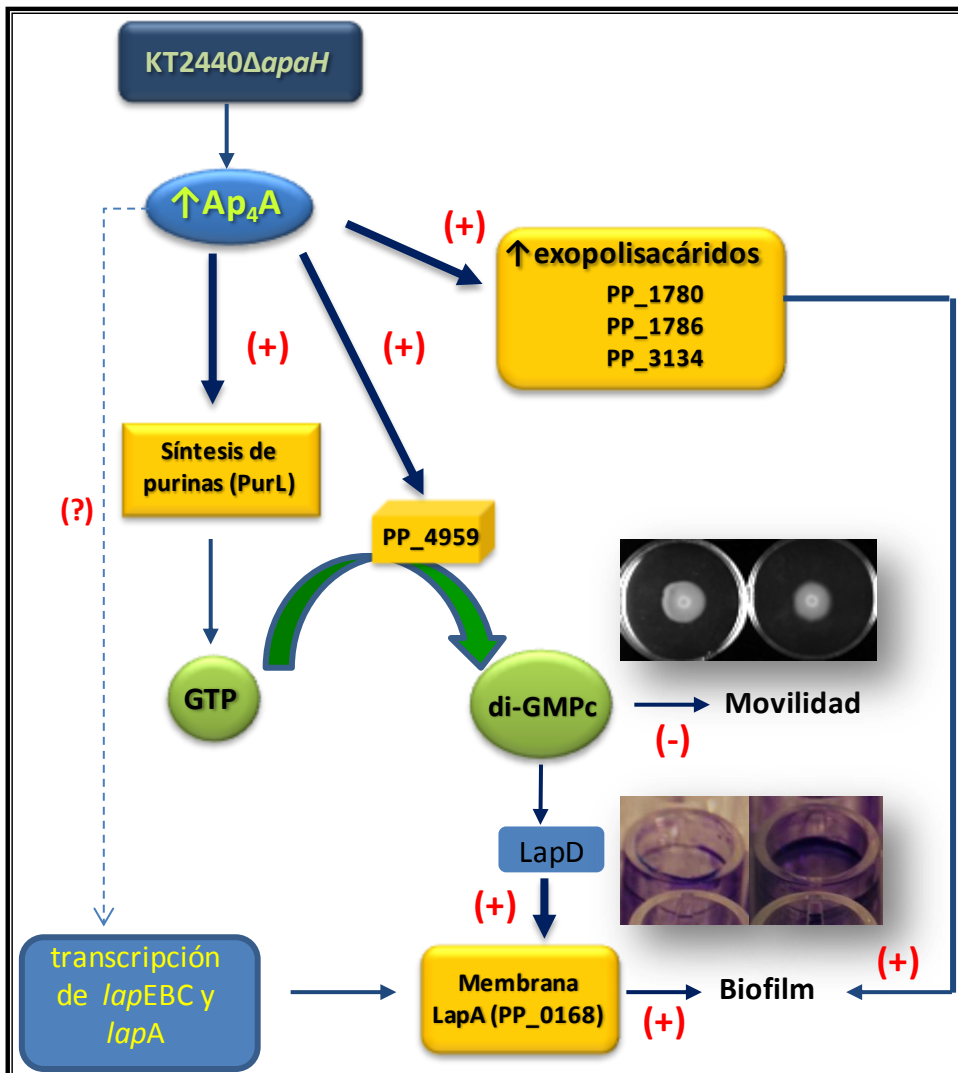


Figura 62. Esquema de la respuesta morfológica propuesta en *P. putida* KT2440ΔapaH. La mutación en el gen *apaH* de *P. putida* KT2440 provoca el aumento de Ap₄A y con ello una respuesta morfológica que está mediada en gran medida por un aumento de la síntesis de di-GMPc (círculo verde) facilitado por la inducción de las proteínas PurL y PP_4959. Por un lado, el aumento de los niveles de di-GMPc provoca una reducción de la movilidad. Por otra parte, el di-GMPc interacciona con la proteína LapD promoviendo la localización de la proteína LapA en la membrana celular, y ocasionando un incremento en la formación de biofilm. Por otro lado, el aumento de Ap₄A provoca la inducción de proteínas implicadas en la síntesis de exopolisacáridos, lo que también facilitan la formación de biofilm. Los símbolos + y - indican un efecto activador o represor, respectivamente. La flecha punteada representa la posible inducción de la transcripción de los genes *lap*, que resultaría en el aumento de LapA. En recuadros amarillos se indican las proteínas cuya inducción se ha confirmado en los experimentos de proteómica.

II.2 Efecto de la inactivación del gen *apaH* en el programa metabólico de *P. putida* KT2440.

Uno de los fenotipos más característicos del mutante *P. putida* KT2440 Δ *apaH* es su retraso en el crecimiento en las diferentes fuentes de carbono y energía utilizadas (Figs. 37 y 38). Si bien se había descrito que los mutantes *apaH* de *S. typhimurium* y *P. fluorescens* tienen una fase de latencia ligeramente incrementada en medios ricos, (Ismail *et al.* 2003; Monds *et al.*, 2010), este fenotipo no se había estudiado en detalle ni validado en medios mínimos con diferentes fuentes de carbono. En esta tesis hemos determinado que la deficiencia en el crecimiento de *P. putida* KT2440 Δ *apaH* no está determinada por la velocidad específica de crecimiento sino por la fase de latencia del cultivo que se incrementa en todas las fuentes de carbono utilizadas, especialmente cuando se utilizan los compuestos aromáticos como única fuente de carbono y energía. La complementación del mutante con el gen *apaH* revierte parcialmente el fenotipo de fase de latencia extendida (Fig. 39), confirmando que se trata de un efecto producido por la inactivación del gen *apaH*.

La fase de latencia es una característica específica de cada microorganismo, y en última instancia refleja la capacidad de éste para reemprender el crecimiento después de superar unas condiciones ambientales adversas. La duración de la fase de latencia, por tanto, es dependiente de diversos factores, tanto externos como internos, tales como la propia fuente de carbono y la capacidad de la bacteria para detectar y responder a las nuevas condiciones. La transición de fase estacionaria a medio fresco y la consiguiente recuperación de la fase de latencia se caracteriza por un incremento rápido en los niveles celulares de ATP y GTP (recuperación energética) que facilita el subsiguiente aumento en la síntesis de rRNA y proteínas (recuperación funcional) (Murray *et al.*, 2003). La fase de latencia se puede acortar cuando se añaden aminoácidos al medio de cultivo, lo que vuelve a indicar la importancia de la respuesta estricta para la recuperación de las células y la salida de la fase de latencia (Flårdh y Kjelleberg. 1994). Los resultados obtenidos con la cepa mutante *P. putida* KT2440 Δ *apaH* sugieren por primera vez que los altos niveles de Ap₄A podrían modular la respuesta estricta dificultando la salida de la fase de latencia.

Para tratar de conocer la base molecular del efecto del Ap₄A sobre el metabolismo de *P. putida*, se realizaron distintos tipos de abordajes experimentales. Los resultados de los experimentos de proteómica revelaron por primera vez que la inactivación del gen *apaH* ocasiona un significativo cambio en los niveles de expresión de enzimas que intervienen en el metabolismo central de *P. putida* así como en la inducción de ciertas isoenzimas que no se expresan en las condiciones habituales de

crecimiento de la cepa parental (Tablas 6 y 7). La utilización del modelo iJN1411 y de los modelos específicos de condición han permitido predecir *in silico* y comparar los flujos metabólicos en reacciones claves para el metabolismo energético de la cepa mutante y la parental (Figs. 43-47). Así, se ha predicho que existe una clara reducción del flujo metabólico a través de la NADH deshidrogenasa I en la cepa *KT2440ΔapaH* (Fig. 46), lo que concuerda con el hecho de que dos de las subunidades de este complejo enzimático (subunidades G y B) se encuentren reprimidas en la cepa mutante (Tabla 7). El flujo reducido a través de la NADH deshidrogenasa podría ser reflejo de un desequilibrio en la disponibilidad de equivalentes reductores necesarios para la producción de ATP durante la fosforilación oxidativa en la cepa mutante *apaH*. La inducción de isoenzimas del TCA que utilizan quinonas en lugar de NAD⁺ como aceptor de electrones, e.g., malato deshidrogenasas dependientes de quinonas (PP_1251 y PP_2925) y la reducida actividad del TCA predicha (Tabla 6), podría ser indicativo de este hecho. Sumado a la reducción del flujo a través de la NADH deshidrogenasa I, se predijo también un flujo reducido en la cepa *KT2440ΔapaH* a través de la citocromo oxidasa terminal (Cyo) y la ATP sintasa (Fig. 46), lo cual sugería una menor producción de ATP en esta cepa debido a la menor fuerza protón motriz predicha como consecuencia de estas alteraciones. La determinación de los niveles de ATP en las cepas *P. putida* *KT2440* y *KT2440ΔapaH* permitió confirmar experimentalmente que la inactivación del gen *apaH* causa una disminución del contenido de ATP total en la célula (Fig. 49). Además, cuando se predijo el consumo de oxígeno (Fig. 47) y se valoró éste experimentalmente (Fig. 50), se confirmó una significativa reducción en la cepa mutante *apaH*, sugiriendo que la disminución en los niveles de ATP se debe a la menor producción, y no a un mayor consumo, de éste en *P. putida* *KT2440ΔapaH*. En conclusión, el conjunto de estos resultados confirma que la cepa *P. putida* *KT2440ΔapaH* posee un estado energético subóptimo. Dado que la predicción del flujo metabólico en cuatro reacciones del TCA (citrato sintasa, aconitasa, succinato deshidrogenasa y fumarasa) estaba reducido un 20-30% en la cepa mutante *apaH* (Fig. 43), y que la utilización del agente FCCP (desacopla la fosforilación oxidativa de la cadena de transporte de electrones) no permitió la recuperación del consumo de oxígeno en la cepa mutante, parecía concluirse que el estado energético comprometido en *P. putida* *KT2440ΔapaH* era consecuencia de un bloqueo metabólico del TCA con la consiguiente disminución en la producción de poder reductor (NAD(P)H).

La reducida capacidad de *P. putida* KT2440 Δ *apaH* para generar poder reductor y energía podría explicar los distintos fenotipos observados. En particular, un estado energético comprometido sin duda afectará negativamente a la adaptación a nuevas condiciones de crecimiento y, por consiguiente, conllevará a una extensión de la fase de latencia de los cultivos. Esta situación podría revertirse, al menos parcialmente, si se aportase al mutante *apaH* una fuente alternativa de energía. Con este fin, se analizó la fase de latencia de *P. putida* KT2440 Δ *apaH* cultivada en AFA y suplementada con fuentes de carbono que generan poder reductor via TCA, e.g., succinato, o de forma rápida e independiente del TCA, e.g., octanoato (vía β -oxidación) y glucosa (vía gluconato en periplasma). Mientras que el succinato fue incapaz de reducir la fase de latencia en AFA, tanto la glucosa y, especialmente, el octanoato redujeron significativamente la fase de latencia del mutante *apaH* (Fig. 51). Estos resultados están de acuerdo con la hipótesis de que el TCA está parcialmente bloqueado en el mutante *apaH*, y que la generación de poder reductor por otras vías metabólicas puede rescatar al mutante de su estado energético subóptimo. Otra forma de compensar el estado energético deficitario de la cepa *P. putida* KT2440 Δ *apaH* sería facilitar la inducción de las rutas metabólicas necesarias para la degradación de la fuente de carbono utilizada. En este sentido, la construcción de la cepa doble mutante *P. putida* KT2440 Δ *apaHdpaaX*, que expresa la ruta de degradación de AFA de forma constitutiva y por ello no requiere del gasto energético inicial para su inducción en presencia de AFA, permitió una reducción significativa de la fase de latencia en AFA (Fig. 48), lo que está de acuerdo, una vez más, con la hipótesis de que la fase de latencia extendida es un reflejo de un estado energético deficiente.

Para tratar de conocer con más detalle la(s) etapa(s) del TCA que podía estar alterada en la cepa mutante *P. putida* KT2440 Δ *apaH*, se computó *in silico* la tasa de crecimiento de mutantes simulados en *iJN1411* en cada una de las reacciones que constituyen el TCA (Fig. 52), y se comparó con la duración de la fase de latencia observada en las diferentes fuentes de carbono probadas (Tabla 5). Con este abordaje se identificó la fumarasa como la etapa del TCA más susceptible de estar bloqueada/alterada en la cepa mutante *apaH*. Las fumarasas son enzimas que catalizan la conversión reversible de fumarato a *L*-malato. Se han descrito dos clases de fumarasas atendiendo a su estructura nativa, estabilidad térmica y requerimiento de metales. Las fumarasas clase I, como FumA y FumB, son homodímeros termolábiles,

sensibles al oxígeno y requieren hierro para su actividad. Las fumarasas clase II, como FumC, son homotetrámeros termoestables, insensibles al oxígeno y que no requieren de ningún cofactor para su actividad. En bacterias, FumA es la fumarasa principal del ciclo del TCA. En *P. fluorescens* y *E. coli*, FumC reemplaza a FumA en condiciones de estrés oxidativo, siendo fundamental para mantener el TCA activo en dichas situaciones (Chenier *et al.*, 2008). En *P. aeruginosa* se han identificado dos genes que codifican fumarasas clase II, *fumC1* y *fumC2*, y un gen que codifica una fumarasa clase I, *fumA*, (Winsor *et al.*, 2009). En el genoma de *P. putida* KT2440 se identifica una fumarasa FumA y dos fumarasas FumC (FumC1 y FumC2). Los datos de proteómica revelan que mientras que los niveles de la proteína FumA (PP_0897) (Tabla S1), se encuentran disminuidos 1,3 veces en la cepa KT2440 Δ *apaH*, los de FumC2 se incrementan 4 veces con respecto a los de la cepa parental (Tabla 6). Los datos de actividad fumarasa (Fig. 53) así como los estudios de la expresión del gen *fumC2* (Fig. 54) también sugerían que FumC2 reemplaza a FumA en la cepa mutante *apaH*. Este reemplazamiento podría ser en última instancia responsable del bloqueo en el TCA observado en la cepa KT2440 Δ *apaH* ya que, pese a no disponer de datos catalíticos de las fumarasas en *P. putida*, es bien conocido que la fumarasa FumA tiene mayor eficiencia catalítica que FumC. Así por ejemplo, en *E. coli* FumA presenta una K_m para el fumarato significativamente menor que FumC (0.15 vs 0.39 mM) y una V_{max} significativamente mayor (6.6 vs 1.0 $\mu\text{mol}_{(\text{fumarato})}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}_{(\text{proteína})}^{-1}$) (Woods *et al.*, 1988). No obstante, serán necesarios estudios futuros bioquímicos y metabolómicos para poder demostrar que en el mutante *P. putida* KT2440 Δ *apaH*: i) FumA está parcialmente inhibida, ii) FumC2 es menos eficaz que FumA, y iii) el flujo a través de la actividad fumarasa está efectivamente disminuido en la célula, lo que conllevaría a un bloqueo del TCA y a una subsecuente acumulación de fumarato intracelular.

Merece la pena destacar el hecho de que el mutante *P. putida* KT2440 Δ *apaH* muestra, en general, una reducción en los niveles de proteínas ribosomales (Tablas 7 y S1), sugiriendo así una menor síntesis proteica. Este hecho es significativo dado que sugiere que unos niveles intracelulares altos de Ap_4A no sólo estarían interfiriendo con la salida de la respuesta estricta dificultando la producción de ATP (recuperación energética) sino también a nivel de la síntesis de proteínas (recuperación funcional). Estos dos factores, un estado energético subóptimo y una deficiente síntesis de proteínas en las etapas iniciales del crecimiento darían por tanto cuenta de la fase de latencia extendida que presenta esta cepa mutante.

Es interesante destacar que aunque el mutante *apaH* posee menores niveles de las proteínas Paa implicadas en el catabolismo del AFA (Tabla 7). La velocidad de crecimiento en AFA del mutante es similar a la de la cepa parental (Fig. 38). Por otro lado, una reducción de los niveles de ciertas proteínas en el mutante *apaH* tampoco implica necesariamente que el flujo metabólico a través de dichas rutas cambie significativamente con respecto a la cepa parental. Así, aunque la cepa *P. putida* KT2440 Δ *apaH* posee una significativa reducción de las dos enzimas clave del ciclo del glioxilato, i.e., las proteínas isocitrato liasa (AceA) y malato sintasa (GlcB) (Tabla 7), la predicción del flujo metabólico a través del ciclo del glioxilato no se vio afectada en el mutante *apaH* (Fig. 43). El ciclo del glioxilato está fuertemente inducido en *P. putida* KT2440 cuando se cultiva en feniletilamina y es clave para metabolizar las unidades de dos carbonos (acetil-CoA) resultantes de la degradación de este compuesto vía AFA (Kim *et al.*, 2006). Por tanto, dado que el óptimo funcionamiento de dicho ciclo es clave para un metabolismo eficaz de la feniletilamina y AFA, el hecho de que el flujo metabólico del ciclo del glioxilato predicho para el mutante *apaH* no se vea afectado (a pesar de que los niveles de proteínas son claramente inferiores) está de acuerdo con el hecho de que la velocidad de crecimiento en AFA de la cepa parental y del mutante *apaH* sea similar (Fig. 38), y sugiere que una menor expresión de estas proteínas no supondría un impedimento para alcanzar tasas de crecimiento óptimas en fase exponencial de crecimiento.

En conclusión, el incremento en los niveles de Ap₄A en el mutante *P. putida* KT2440 Δ *apaH* genera un remodelamiento general del programa metabólico de la célula que afecta al metabolismo de aminoácidos, a diferentes sistemas de óxido-reducción implicados en la regeneración de poder reductor, y también al TCA como principal suministrador del poder reductor de la célula (Tablas 6 y 7) (Fig. 63). Por otro lado, el remodelamiento del metabolismo central en el mutante *apaH* genera un estado energético subóptimo y una más que posible reducción en la síntesis de proteínas, lo que ocasionaría la fase de latencia extendida cuando el mutante inicia su crecimiento en medio de cultivo fresco. Un remodelamiento metabólico similar podría ocurrir de forma transitoria en la cepa parental cuando los niveles de Ap₄A se incrementan en respuesta a condiciones nutricionales adversas y a la disminución de aminoácidos subsiguiente, una respuesta que presenta significativas similitudes con la respuesta estricta mediada por el ppGpp. Una vez salvadas estas condiciones adversas, los niveles de Ap₄A disminuirían

como consecuencia de la actividad ApaH, y las bacterias volverían a desarrollar su metabolismo tradicional que es más energéticamente favorable.

En cualquier caso, una vez que el mutante *apaH* ha iniciado el crecimiento, incluso aunque muestre un menor consumo de oxígeno y producción de ATP, es capaz de alcanzar una tasa de crecimiento similar a la de la cepa parental en las distintas fuentes de carbono probadas (Figs. 37-38). Esta observación sugiere que incluso un estado energético deficiente y una menor síntesis proteica no necesariamente implica una menor tasa de crecimiento específica una vez que la bacteria ha superado la fase de latencia inicial y se encuentra en fase exponencial de crecimiento. Estas observaciones están también de acuerdo con la idea de que una buena parte de la energía que obtienen las bacterias del metabolismo no la dedican al crecimiento sino que la emplean para disponer de los recursos necesarios cuando las condiciones ambientales cambiantes requieran la adaptación a nuevos ambientes/nutrientes. De hecho, la reciente irrupción de estudios de distribución de flujos, tanto *in vivo* como *in silico*, está empezando a cuestionar la tradicional hipótesis que sugería que la maximización de la tasa específica de crecimiento es el principal objetivo biológico de las bacterias en la fase exponencial de crecimiento. Así por ejemplo, Schuetz y colaboradores comparando flujos metabólicos determinados *in vivo* con predicciones *in silico* de 9 bacterias diferentes, descartaron la velocidad de crecimiento como único objetivo biológico bacteriano en fase exponencial de crecimiento en favor de un multiobjetivo biológico (Schuetz *et al*, 2012). De este modo, se pudo concluir que los flujos metabólicos operan cerca de un óptimo de Pareto, el cual estaría definido por 3 objetivos contrapuestos y que compiten entre si: i) producción de ATP, ii) crecimiento celular y iii) suma mínima de flujos absolutos (mínima variación de flujos entre diferentes condiciones). Este multiobjetivo fue sugerido como el óptimo para asegurar una predicción de flujos más cercana a la realidad y para responder apropiadamente al compromiso que suponen dos importantes retos bacterianos como son, i) la optimización metabólica bajo una condición de crecimiento dada y ii) el mínimo ajuste metabólico para la adaptación de una condición de crecimiento a otra diferente. En otras palabras, fue sugerido que el metabolismo bacteriano opera sacrificando una parte de los recursos que se podrían obtener en una condición ambiental bien definida (en forma de una excesiva producción de ATP y/o poder reductor y/o síntesis proteica) en favor de una rápida y menos costosa adaptación a unas nuevas condiciones. Por lo tanto, la alteración metabólica consecuencia de la pérdida de un gen *apaH* funcional en *P. putida* y caracterizada por una menor

producción de ATP, poder reductor y presumiblemente menor síntesis proteica, hace operar el metabolismo de la cepa *P. putida* KT2440 Δ *apaH* lejos del óptimo de Pareto. En consecuencia, aunque el mutante *apaH* puede crecer a la misma velocidad que la cepa parental en fase exponencial, ve extremadamente comprometida su capacidad de adaptación a nuevas condiciones ambientales como refleja su fase de latencia extendida. El peso de cada uno de los objetivos sugeridos por Schuetz y colaboradores en su teoría de optimización multiobjetivo es posible que sea dependiente de la fase de crecimiento con objeto de optimizar el metabolismo en cada una de estas fases. Por ejemplo, parece intuitivo pensar que en fase exponencial la maximización del crecimiento sea el principal componente. Por tanto, uno podría argumentar que los niveles de Ap₄A podrían estar modulando el peso de cada uno de estos objetivos, no sólo modulando el metabolismo ante condiciones ambientales cambiantes, sino también en función de la fase de crecimiento. No obstante, la comprobación de esta hipótesis requiere de futura demostración experimental.

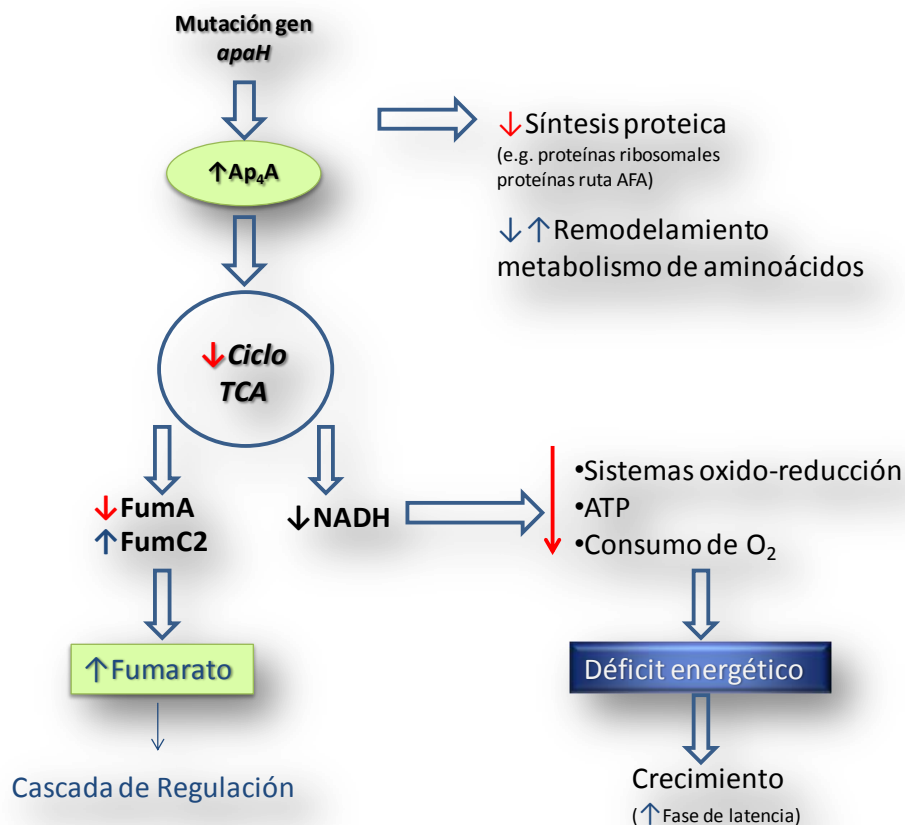


Figura 63. Esquema de los cambios propuestos en el programa metabólico alterado del mutante *P. putida* KT2440 Δ *apaH*. Las flechas finas rojas indican disminución y las azules aumento respecto a la situación observada en la cepa parental. El incremento propuesto en los niveles de fumarato permitiría el disparo de una compleja cascada de regulación (ver apartado III.3)

II.3 Efecto de la inactivación del gen *apaH* en el programa de estrés de *P. putida* KT2440.

Los estudios de proteómica revelaron que entre las proteínas más inducidas en el mutante *P. putida* KT2440 Δ *apaH* se encontraban proteínas de respuesta a estrés oxidativo, tales como las catalasas PP_0115 (KatE) y PP_3668 (KatG), posibles peroxidases, como PP_4021, o alquilhidroperoxidases como PP_0089, PP_3639 (AhpD), y PP_2422 (Tabla 6). Estos resultados sugerían que la inactivación del gen *apaH* induce en la célula una situación similar a la originada por estrés oxidativo. Cabe destacar que incluso la cepa parental muestra un cierto nivel de expresión de proteínas de estrés oxidativo (Tabla S1), lo cual está de acuerdo con resultados previos que indican que el crecimiento en compuestos aromáticos induce una respuesta de estrés oxidativo en las bacterias (apartado 3 de Introducción) (Santos *et al.*, 2004, Kim *et al.*, 2006).

El estrés oxidativo se produce por la exposición de un organismo a oxígeno o a otras moléculas altamente oxidantes, en ocasiones generadas por el propio metabolismo aeróbico (Halliwell y Gutteridge, 1984). El oxígeno es una molécula altamente reactiva que puede ser reducida parcialmente para generar especies reactivas de oxígeno (ROS). Las bacterias han desarrollado diferentes tipos de respuestas a estrés oxidativo y existen evidencias de la conservación funcional y estructural de los componentes implicados en dicha respuesta a lo largo de la evolución (Aruoma y Halliwell, 1998). Algunas sustancias químicas, como la menadiona, pueden atravesar la membrana celular fácilmente y generar el ion superóxido ($O_2^{\cdot-}$). El anión superóxido no es por sí solo un radical muy reactivo, pero da lugar a otras ROS que sí son altamente reactivas y tóxicas. La destrucción del anión superóxido tiene lugar a través de las reacciones en las que intervienen las enzimas superóxido dismutasa y catalasa (Halliwell y Gutteridge, 1984). Cuando se compara el crecimiento de *P. putida* KT2440 y KT2440 Δ *apaH* en presencia de menadiona, se observa que el mutante *apaH* es incapaz de crecer (Fig. 36), indicando que dicha mutación genera hipersensibilidad al estrés oxidativo ocasionado por la menadiona. En este sentido, en *P. fluorescens* también se ha descrito que la mutación *apaH* genera mayor sensibilidad al estrés oxidativo ocasionado por el peróxido de hidrógeno (Monds *et al.*, 2010). La mayor sensibilidad a otros tipos de estrés, como el estrés térmico, también se ha descrito para los mutantes *apaH* de *E. coli*, *S. typhimurium* y *P. fluorescens* (Johnstone y Farr., 1991; Monds *et al.*, 2010).

Es bien conocido que las chaperonas moleculares son inducidas bajo variadas condiciones de estrés, tales como estrés osmótico y térmico (Mason *et al.*, 1999; Cho *et al.*, 2000; Giuffrida *et al.*, 2001; Park *et al.*, 2001; Leichert *et al.*, 2003; Prasad *et al.*, 2003). Específicamente, la respuesta de *E. coli* frente a estrés térmico está regulada por el factor σ^{32} codificado por el gen *rpoH* conservado en bacterias Gram-negativas (Rosen y Ron, 2002). σ^{32} regula la expresión de proteínas involucradas en plegamiento, reparación y degradación de proteínas, entre las cuales se encuentran las chaperonas DnaK y GroEL. En *P. putida* KT2440 Δ *apaH* la expresión del gen *rpoH* no difiere de la observada en la cepa parental *P. putida* KT2440 (Tabla 10). Se ha descrito que la molécula Ap₄A tiene afinidad para unirse a varias chaperonas, tales como DnaK, GroEL, C45, E89 y C40, e influencia el estado de fosforilación de alguna de ellas, e.g., DnaK (Johnstone y Farr, 1991). Así, mientras que en *E. coli* el nivel de fosforilación de DnaK se incrementa tras un choque térmico, en los mutantes *apaH* el alto nivel de fosforilación de DnaK es constitutivo a 30°C (Johnstone y Farr, 1991). La mayor sensibilidad al calor o a la luz ultravioleta en el mutante *apaH* se revierte parcialmente mediante la introducción de un plásmido que expresa el gen *clpB* (codifica la proteína Hsp100), sugiriendo que la dosis multicopia de ClpB es capaz de reducir los niveles de Ap₄A (Farr *et al.* 1989). El hecho de que Ap₄A es sintetizado en la célula cuando ésta se somete a distintos tipos de estrés (oxidativo, térmico o de escasez de nutrientes) coincide con que en esas mismas condiciones se inducen las chaperonas DnaK, GroEL y ClpB. De todas estas chaperonas sólo ClpB (PP_0625) aumenta en el proteoma de la cepa mutante *P. putida* KT2440 Δ *apaH* unas 1.5 veces (Tabla S1). Los mutantes *apaH*, como ya hemos mencionado, son más sensibles que la cepa parental a distintos estreses, lo que coincide con el hecho de que los mutantes en *dnaK* o *groEL* también sean más sensibles a la muerte por esos agentes. Curiosamente, la síntesis de Ap₄A está retardada respecto a la de las chaperonas de estrés, lo que está de acuerdo con que Ap₄A no es una alarma de estas situaciones de estrés pero es capaz de interaccionar y modular la función de las proteínas de estrés (Tanner *et al.*, 2006). En una célula normal, la interacción de Ap₄A con las chaperonas le permitiría a la célula un nivel basal de actividad (estructural y metabólica) en condiciones de estrés, y conllevaría a una inhibición de la actividad de estas últimas una vez desempeñada su función durante la fase de estrés, lo que le facilitaría a la célula volver a su situación normal (Tanner *et al.*, 2006). Sin embargo, cuando los niveles de Ap₄A están elevados de manera constante en la célula, e.g. mutante *apaH*, y se produce una situación de estrés, las chaperonas de

estrés se inhiben desde el momento de su síntesis y no se puede producir la respuesta de defensa adecuada, lo que explica que los mutantes *apaH* sean más sensibles a dichas situaciones de estrés (Fuge y Farr, 1993). Por otro lado, en este trabajo se ha demostrado que el mutante *P. putida* KT2440 Δ *apaH* posee un estado energético comprometido, lo que también dificultaría la recuperación mediada por las enzimas de respuesta al estrés oxidativo (catalasas, peroxidasas).

La mayoría de las enzimas implicadas en la respuesta a estrés oxidativo requieren hierro para su actividad. Por ello, el mantenimiento de los niveles intracelulares de hierro es fundamental para el buen funcionamiento de estas proteínas. Curiosamente, el mutante *P. putida* KT2440 Δ *apaH* mostró una significativa inducción de bacterioferritinas (PP_4856, PP_1082) (Tabla 6) o proteínas de almacenamiento de hierro. Por otro lado, las bacterioferritinas también se han visto implicadas en la respuesta a estrés oxidativo ya que minimizan el efecto tóxico del hierro al impedir su acceso al oxígeno y a otros factores ROS (Carrondo, 2003).

Si bien en la naturaleza el hierro es abundante, en ecosistemas aeróbicos y bajo condiciones medioambientales normales, el hierro típicamente existe en su forma férrica insoluble (Fe^{3+}) dificultando así su accesibilidad a los microorganismos (Moon *et al.*, 2008). Es por ello que numerosas bacterias han evolucionado sistemas de transporte de alta afinidad, e.g, sideróforos, para la captación de hierro (Andrews *et al.*, 2003). Así, las bacterias pertenecientes al género *Pseudomonas* cuando se cultivan bajo condiciones limitantes de hierro son capaces de producir, entre otros, el sideróforo fluorescente amarillo-verdoso denominado pioverdina, el cual posee una elevada afinidad por hierro (Meyer, 2000; Ravel y Cornelis., 2003). Los genes de la producción, internalización y reciclaje de pioverdina se agrupan en tres *clusters* en el genoma de distintas cepas de *Pseudomonas* tales como *P. entomophila* L48, *P. putida* KT2440 (Matthijs *et al.*, 2009) y *P. aeruginosa* (Lamont y Martin, 2003). Se han descrito 26 genes en *P. putida* KT2440 encargados de la producción y reciclaje de pioverdina (genes *pvd*) y del funcionamiento de captura de hierro (genes *fpv*). Uno de los genes de captura de hierro es *fpvA*, el cual codifica un receptor de membrana externa de ferripioverdina (pioverdina- Fe^{3+}) (Beare *et al.*, 2003). FpvA actúa internalizando al periplasma el complejo pioverdina- Fe^{3+} , del cual posteriormente se libera el hierro en su forma Fe^{2+} y se transporta al citoplasma. En la cepa mutante *P. putida* KT2440 Δ *apaH* la proteína FpvA aumenta su producción unas 2,5 veces (Tabla 6), sugiriendo que la captación de

este metal está incrementada en dicho mutante (incluso cuando se cultiva un medio no limitante en hierro), lo que también está de acuerdo con los mayores niveles de bacterioferritina comentados anteriormente. Curiosamente, la cepa mutante *P. putida* KT2440 Δ *apaH* mostró una reducida capacidad de producir pioverdina cuando se cultivó en un medio deficiente en hierro, restaurándose los niveles de producción de este sideróforo cuando se complementó en *trans* con el gen *apaH* clonado en el plásmido pIZapaH (Fig. 32). Este resultado indicaba que la mutación en el gen *apaH* afecta directamente a la producción de este sideróforo en condiciones de escasez de hierro, un resultado similar al previamente descrito para un mutante *apaH* de *P. fluorescens* (Monds *et al.*, 2010). Sin embargo, a pesar de producir menor cantidad de sideróforo en un medio limitante en hierro, la cepa mutante *apaH* era capaz de crecer de forma similar a como lo hacía la cepa parental. Este resultado sugiere que la inactivación del gen *apaH* en *P. putida* conduce a un incremento en la captación y acumulación intracelular de hierro, lo que a su vez inhibe la normal inducción de la síntesis de sideróforos cuando la bacteria se cultiva en medios limitantes en hierro.

Uno de los grupos de proteínas que muestran una mayor inducción en el mutante *P. putida* KT2440 Δ *apaH* es el constituido por presuntas enzimas implicadas en el metabolismo del glucógeno y su probable conversión a trehalosa (Tabla 6). La trehalosa es un disacárido no reductor que protege a la membrana celular y a las proteínas de la inactivación o desnaturalización causada por condiciones que generan estrés, tales como estrés osmótico, por desecación, por calor o frío, u oxidativo (Singer y Lindquist, 1998; Argüelles, 2000). En *Rhizobacterium leguminosarum* la biosíntesis *de novo* de trehalosa es una respuesta de osmoprotección frente a la desecación en las raíces de las leguminosas (McIntyre *et al.*, 2007). En el mutante *apaH* de *P. putida* KT2440 la biosíntesis de trehalosa se activaría como parte del programa de estrés inducido por la acumulación de Ap₄A. La posible acumulación de trehalosa en *P. putida* KT2440 Δ *apaH* está de acuerdo con el hecho de que dicho mutante presente una mayor resistencia al estrés osmótico que la cepa parental (Fig. 41). El fenotipo de mayor resistencia al estrés osmótico asociado a la mutación del gen *apaH* no se había descrito hasta la fecha en ningún organismo, y confirma el papel esencial del Ap₄A en el control de la respuesta a distintas condiciones ambientales que causan estrés celular.

La ruta de la biosíntesis de trehalosa en *P. putida* no se ha estudiado hasta la fecha. En *P. syringae* DC3000 se ha identificado un *cluster* génico inducido por estrés

osmótico y que está implicado en la biosíntesis de trehalosa (Freeman *et al.*, 2010). *P. putida* KT2440 posee en su genoma un *cluster* de genes homólogos a los genes *glg* (A, B y X), *tre* (Y, Z y S) y *malQ* de biosíntesis de trehalosa en *P. syringae* (Fig. 64). Otros genes presuntamente implicados en el metabolismo del glucógeno y la trehalosa se indican también en la figura 64. Como resultado de estos análisis se postula la existencia de una conexión entre el ciclo del glucógeno y el de la trehalosa en *P. putida* (Fig. 65). Muchos de los productos de estos genes se observan inducidos en el mutante *apaH* (Tabla 6), lo que permite sugerir que el metabolismo del glucógeno y su conversión a trehalosa están activados como consecuencia de la inactivación del gen *apaH* en *P. putida*, lo que a su vez explicaría el fenotipo de mayor resistencia al estrés osmótico en el mutante. El incremento de la vía gluconeogénica en el mutante *apaH* es consistente con la inducción de la enzima triosa fosfato isomerasa (TpiA; PP_4715) (Tabla 6). La mayor resistencia al estrés osmótico del mutante *apaH* podría conferirle valor biotecnológico ya que, entre otras cosas, dicho mutante podría tener facilitada la colonización de las raíces de las plantas o la resistencia a condiciones de desecación.

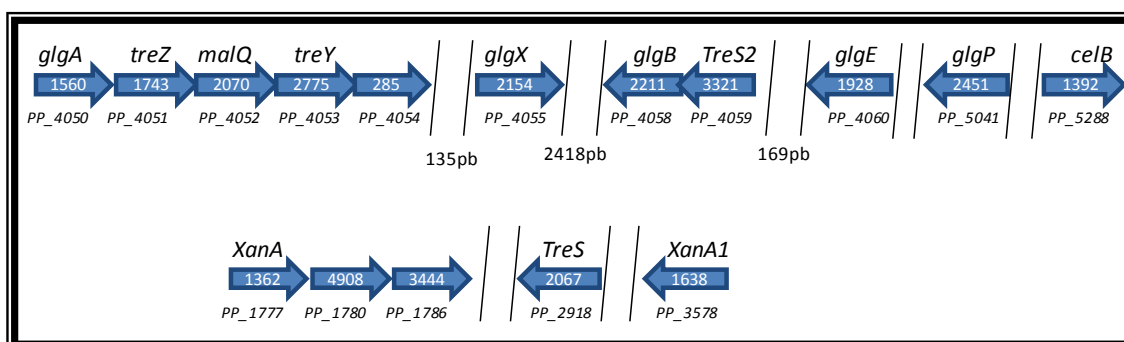


Figura 64. Organización de los genes propuestos para la biosíntesis de la trehalosa en *P. putida* KT2440. Los genes y su función predicha son: *treS2* y *treS*, codifican maltosa-trehalosa isomerasas y maltoquinasas; *xanA*, *xanA1* y *celB*, codifican tres diferentes fosfoglucomutasas; *glgA*, codifica la glucógeno sintasa; *treZ*, codifica una malto-oligosil-trehalosa hidrolasa; *malQ*, codifica una amilomaltasa; *treY*, codifica una malto-oligosil trehalosa sintasa; *glgX* codifica una proteína glucógeno desramificante y/o isoamilasa; *glgB*, codifica una 1,4-alfa-glucano ramificante; *glgE*, codifica una maltosil-transferasa; *glgP*, codifica una glucógeno fosforilasa. Los genes PP_1780 y PP_1786 codifican posibles glicosiltransferasas que también podrían estar implicadas en la biosíntesis de trehalosa. Los números dentro de las flechas representan el número de nucleótidos de cada gen.

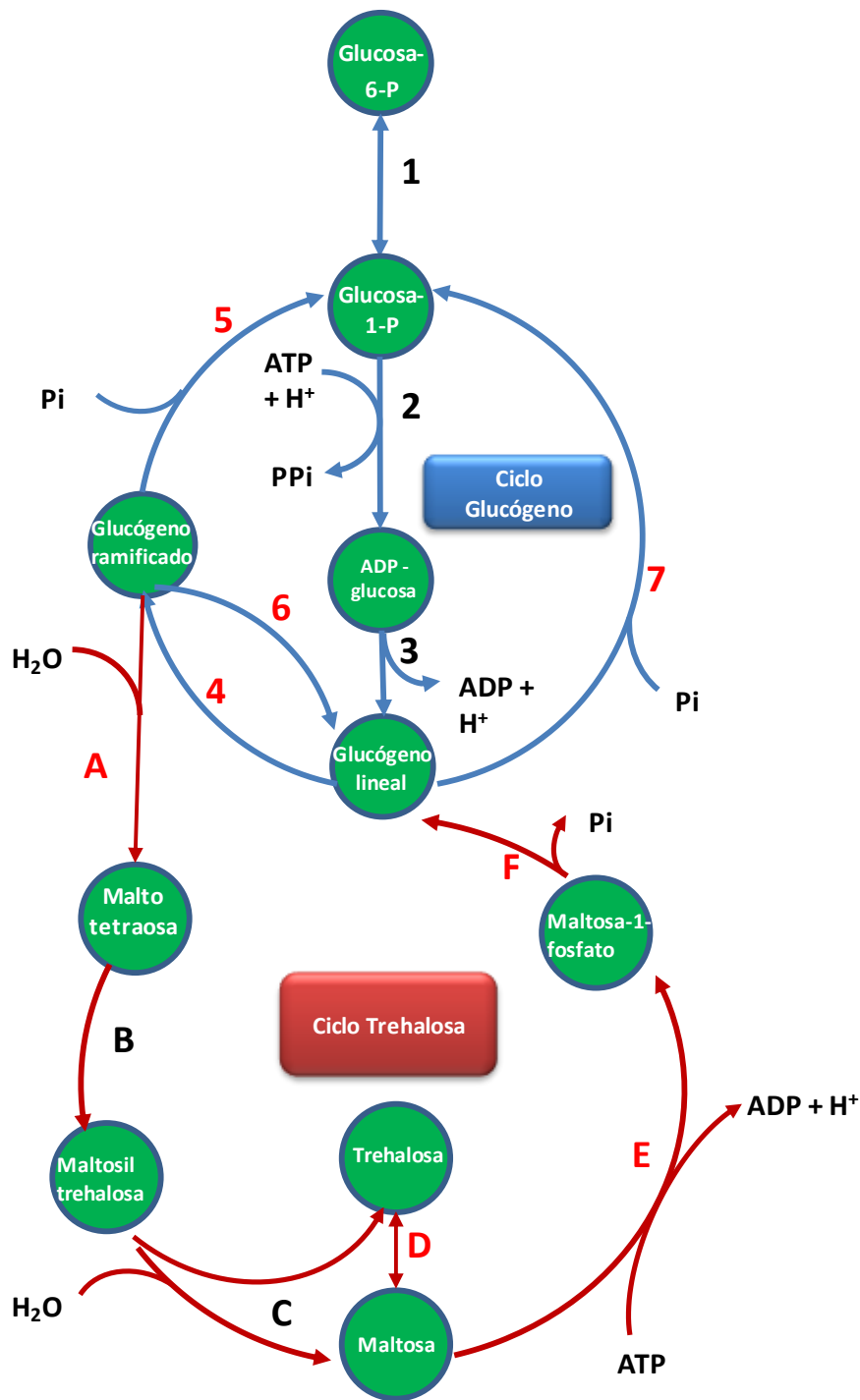


Figura 65. Representación gráfica de la conexión entre el ciclo de la trehalosa y el del glucógeno. Las enzimas pertenecientes al ciclo del glucógeno son: 1, fosfoglucomutasa (PP_3578, PP_1777, PP_5288); 2, glucosa-1-fosfato-adeniltransferasa; 3, glucógeno sintasa GlgA (PP_4050); 4, enzima 1,4-alfa-glucano ramificante GlgB (PP_4058); 5, glucógeno fosforilasa GLCP4 (PP_5041); 6, enzima glucógeno desramificante (PP_4055); 7, glucógeno fosforilasa GLCP3 (PP_4041). Las enzimas del ciclo de la trehalosa son: A, isoamilasa (PP_4055); B, malto-oligosil trehalosa sintasa (PP_4053); C, malto-oligosil-trehalosa hidrolasa (PP_5051); D, maltosa trehalosa isomerasa TreS2 (PP_4059); E, maltoquinasa TreS2 (PP_4059); F, maltosil-transferasa GlgE (PP_4060). En rojo se indican las proteínas inducidas en el mutante *P. putida* KT2440 Δ *apaH*.

Como se ha indicado en el apartado II.1, muchas proteínas involucradas en la biogénesis de la envoltura celular, secreción y el metabolismo de lípidos vieron incrementada su expresión en la cepa mutante *apaH* (Tabla 6), lo que sugiere un intenso remodelamiento y/o biosíntesis de estas estructuras. Algunos de estos cambios en la envoltura celular constituirán una parte importante de la respuesta de la célula al programa de estrés inducido por los elevados niveles de Ap₄A, y tienen una implicación directa también en el programa morfológico.

Un resumen del programa de estrés inducido por los elevados niveles de Ap₄A en el mutante *P. putida* KT2440Δ*apaH* se esquematiza en la figura 66.

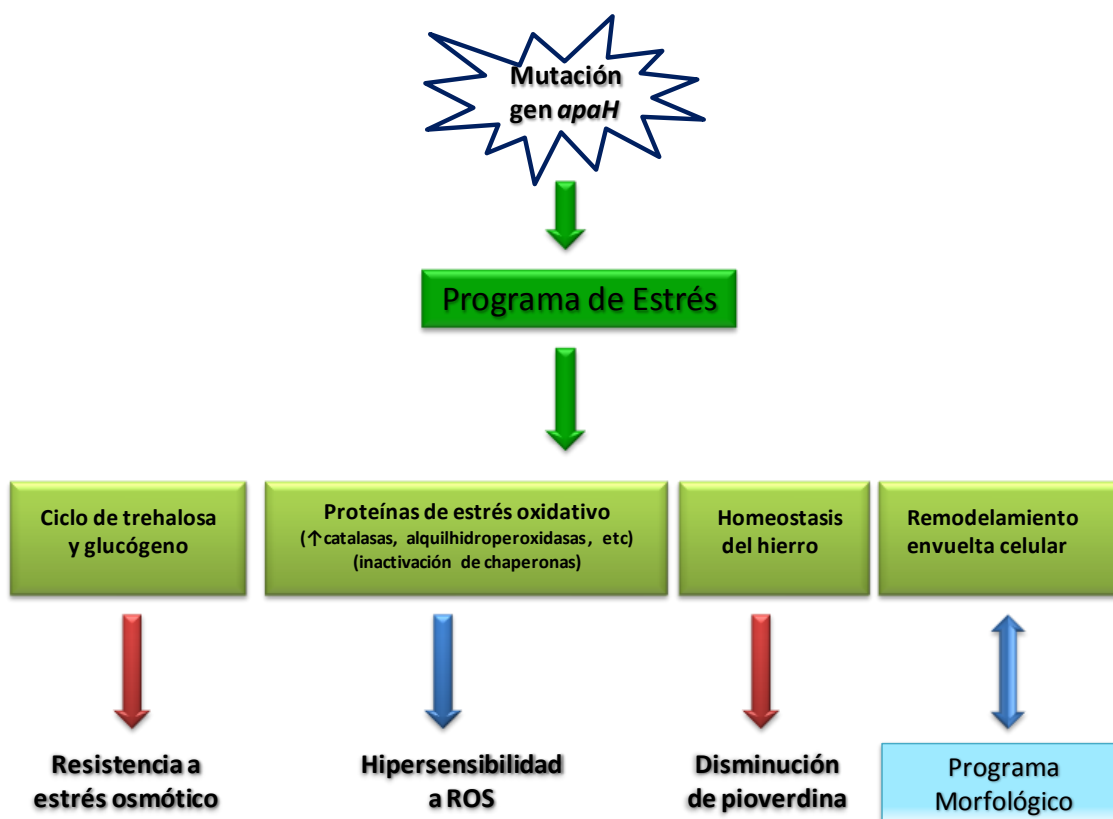


Figura 66. Programa de estrés activado en *P. putida* KT2440 como consecuencia de la inactivación del gen *apaH*. La mutación en el gen *apaH* provoca el aumento en los niveles de Ap₄A, los cuales inducen el programa de estrés en *P. putida* KT2440 (recuadros verdes).

III. Estudio de la cascada de señalización/regulación asociada a la inactivación del gen *apaH* en *P. putida* KT2440.

Como se ha discutido en los apartados anteriores, *P. putida* KT2440 activa tres programas celulares en respuesta al presunto aumento de los niveles de Ap₄A como consecuencia de una mutación en el gen *apaH*. Estos tres programas celulares son: i) un programa de respuesta a estrés que permite a la célula detectar y adaptarse a las nuevas condiciones de crecimiento, ii) un programa morfológico relativo a la forma de vida, transporte de nutrientes y química de la superficie celular que acomoda a la célula a las nuevas condiciones, y iii) un programa de respuesta metabólica que remodela el metabolismo para dar apoyo a los programas de estrés y morfológico mientras optimiza los recursos existentes ante las nuevas condiciones. Es por tanto que el circuito regulador y de señalización que detecta y coordina esta respuesta multidimensional necesariamente tiene que ser complejo y muy probablemente consistente en reguladores globales que, a su vez, interactúan entre sí.

III.1 El sistema regulador de dos componentes GacS/GacA controla la respuesta a altos niveles de Ap₄A en *P. putida*.

El género *Pseudomonas* se caracteriza por su alta versatilidad y robustez metabólica, lo cual le permite, no sólo colonizar múltiples hábitats, sino también desplegar una larga batería de respuestas celulares frente a cambios en su entorno. Un mecanismo simple de coordinar respuestas complejas y altamente interconectadas es el uso de factores sigma alternativos que alteran la especificidad de la RNAP permitiendo una optimización de la expresión génica global para responder apropiadamente a perturbaciones ambientales y/o genéticas (Ishihama, 2000). El hecho de que se hayan descrito hasta 24 factores sigma en especies del género *Pseudomonas*, en lugar de los 7 presentes en *E. coli*, da muestras de esta alta versatilidad y sugiere que la utilización de estos factores sigma en respuesta a alteraciones ambientales específicas es una estrategia general en *Pseudomonas* (Yuste *et al*, 2006). A pesar de que los experimentos de proteómica no habían identificado ningún factor sigma alternativo significativamente alterado en la cepa mutante *P. putida* KT2440 Δ *apaH* (Tablas 6 y 7), el análisis de expresión génica mediante RT-PCR cuantitativa sí evidenció un incremento en los niveles del gen *rpoS*, que codifica el factor de transcripción RpoS (σ^S) (Tabla 10). σ^S es un factor de transcripción ubicuo y que ha sido identificado como principal regulador de

la fase estacionaria en bacterias. Así, en *P. putida* KT2440 la proteína RpoS controla la expresión de al menos 50 péptidos que normalmente son expresados cuando las células se someten a un período transitorio de escasez de nutrientes (Ramos-González y Molin, 1998). Adicionalmente, RpoS ha sido descrito como principal responsable de la respuesta general a estrés en bacterias (Samiguét *et al.*, 1995, Hengge-Aronis, 2002). El análisis de la expresión de otros factores sigma que podrían ser responsables de algunos de los fenotipos observados en *P. putida* KT2440 Δ *apaH*, o de fenotipos descritos en otros mutantes *apaH*, tales como *rpoH* (factor de transcripción responsable de la respuesta a choque térmico), *rpoN* (responsable de la expresión de genes del metabolismo secundario, entre otros), y *rpoF* (responsable de sintetizar el aparato flagelar), no mostraron alteraciones significativas, apuntando a RpoS como principal factor de transcripción implicado en detectar y responder a los altos niveles de Ap₄A predichos como consecuencia de la inactivación del gen *apaH*.

El incremento de expresión del gen *rpoS* en la cepa KT2440 Δ *apaH* explica, en gran medida, algunos de los fenotipos observados en dicha cepa mutante. Así por ejemplo, se sabe que RpoS es responsable de la transcripción del regulador de respuesta codificado por el gen PP_4959 (Matilla *et al.*, 2011), lo que está de acuerdo con el hecho de que esta proteína se encuentre significativamente inducida en el mutante *apaH* (Tabla 6). Como se ha discutido anteriormente (apartado II.1), el producto génico PP_4959 es responsable de incrementar los niveles intracelulares de di-GMPc en *P. putida* promoviendo la formación de biofilm y reduciendo, entre otros, la movilidad de esta bacteria (Fig. 62) (Matilla *et al.*, 2011). Es por tanto razonable pensar que RpoS es un elemento regulador responsable, en gran medida, de los cambios observados en el programa morfológico de la cepa KT2440 Δ *apaH* (apartado II.1) (Fig. 67).

En distintas *Pseudomonas* se ha identificado a RpoS como principal regulador de la respuesta a estrés oxidativo (Stockwell y Loper, 2005). En *P. putida* se ha descrito que una cepa deficiente en *rpoS* está menos protegida frente a situaciones que inducen estrés oxidativo que la correspondiente cepa parental (Tarassova., *et al.*, 2009). Dado que este fenotipo se revierte mediante la sobreexpresión de enzimas tales como la superóxido dismutasa o la catalasa, se concluyó que la expresión de estas enzimas se encuentra bajo el control de *rpoS* en *P. putida*, al igual que ocurre en *E. coli* (Tarassova *et al.*, 2009; Weber *et al.*, 2005). Entre las proteínas que presentan una mayor inducción en la cepa *P. putida* KT2440 Δ *apaH* se encuentran aquellas presuntamente implicadas en procesos de defensa frente a estrés oxidativo, e.g., catalasa KatE (PP_0115) y

peroxidasa PP_4021 (Tabla 6), lo que sugiere que estas enzimas también están controladas por RpoS y que este regulador controla la respuesta a estrés oxidativo en la cepa mutante *apaH* (Fig. 67).

Uno de los fenotipos más característicos de la cepa *P. putida* KT2440 Δ *apaH* es su mayor resistencia al estrés osmótico (Fig. 41), fenotipo que hasta la fecha no había sido asociado a la inactivación del gen *apaH* en bacterias, y que muy probablemente responda a la inducción de la biosíntesis de trehalosa en la cepa KT2440 Δ *apaH* (Fig. 65) (ver apartado II.3 de la Discusión). Dado que RpoS se ha visto implicado en la protección frente a estrés osmótico en *Pseudomonas* (Suh., *et al.*, 1999), parece razonable asumir que la inducción del presunto ciclo de la trehalosa y la consiguiente resistencia a estrés osmótico en la cepa KT2440 Δ *apaH* podría deberse al aumento de los niveles intracelulares de RpoS (Fig. 67).

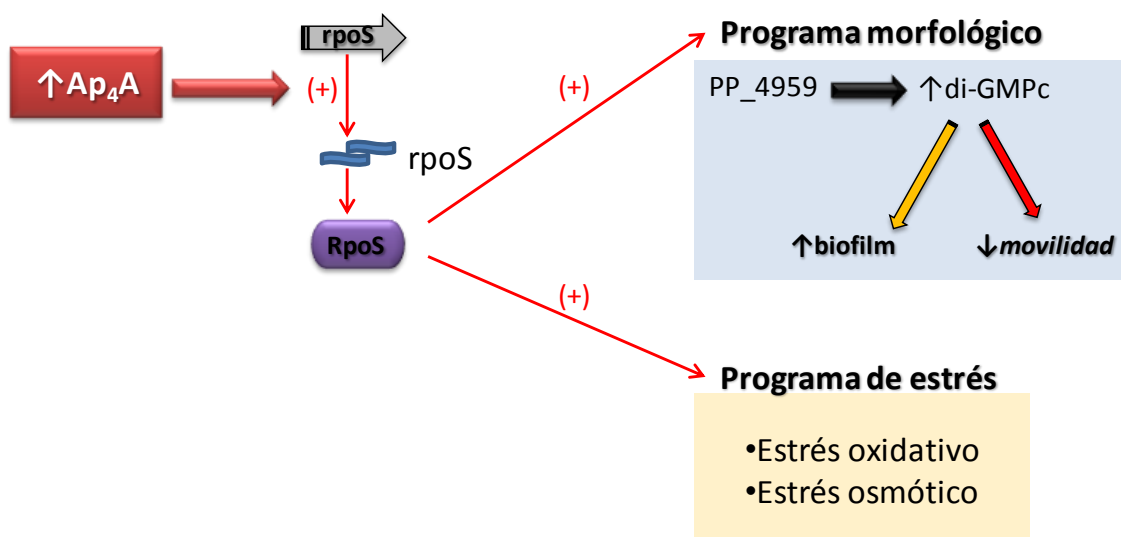


Figura 67. Modelo de la cascada de activación de los programas de estrés y morfológico mediada por RpoS. El aumento de Ap_4A (recuadro rojo) en un mutante *apaH* genera un aumento de la transcripción del gen *rpoS* (flecha gris) lo que conllevaría un aumento en los niveles de la proteína RpoS (en morado). RpoS, activaría el programa de estrés y, mediante la inducción de la proteína PP_4959 que sintetiza di-GMPc, el programa morfológico.

A pesar de que la implicación de RpoS como elemento regulador clave que controla los programas morfológico y de estrés en *P. putida* KT2440 Δ *apaH* parece clara, menos evidente es su implicación en los cambios del programa metabólico del mutante *apaH*. Así, tras analizar el regulón RpoS descrito en diferentes especies de *Pseudomonas* (Schuster *et al.*, 2004), no se ha identificado ninguna proteína de las inducidas/reprimidas en el mutante *P. putida* KT2440 Δ *apaH* y que claramente pudiese

estar implicada en el subóptimo estado energético de dicha cepa. Esta observación es consistente con el hecho de que un doble mutante *P. putida* KT2440 Δ *apaH**DrpoS* fue incapaz de revertir la fase de latencia extendida característica del mutante *apaH* (datos no mostrados), lo cual sugiere que RpoS no es el único elemento regulador que controla el programa metabólico de *P. putida* KT2440 Δ *apaH*, y permite especular con la existencia de un circuito regulador más global en el que se integraría RpoS controlando sólo alguno de los nodos reguladores.

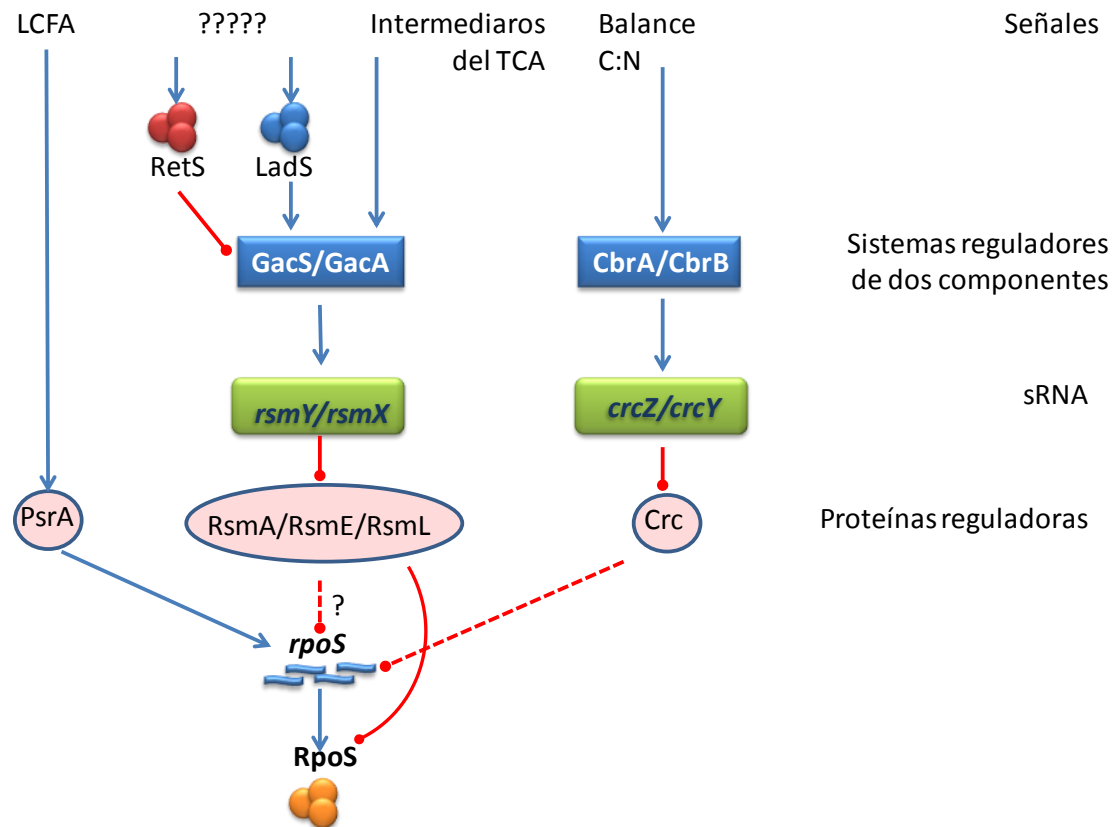


Figura 68. Esquema de los mecanismos moleculares que controlan la expresión del gen *rpoS* en *Pseudomonas*. Las flechas azules indican activación, y las líneas rojas represión. Las líneas continuas indican un control directo, y las líneas discontinuas un control indirecto. LCFA, ácidos grasos cadena larga.

Con objeto de profundizar en la cascada de señalización y regulación que detecta y responde a altos niveles de Ap_4A en *P. putida*, se investigaron los diferentes

mecanismos conocidos en *Pseudomonas* capaces de alterar la expresión, tanto a nivel transcripcional como post-transcripcional, del factor sigma RpoS: i) la activación transcripcional directa vía PrsA (Kojic y Venturi, 2001; Kojic *et al*, 2002) , ii) la represión transcripcional indirecta vía Cbr/Crc (Dong *et al*, 2013) y iii) la represión vía Rsm (Whistler *et al.*, 1998; Heeb *et al.*, 2005; Sonnleitner y Haas, 2011) (Fig. 68).

Cuando se analizó mediante RT-PCR cuantitativa la expresión del gen *psrA*, y del gen *crc* y sus dos sRNA no codificantes reguladores, i.e., *crcZ* y *crcY*, no se observaron diferencias significativas entre la cepa parental *P. putida* KT2440 y la cepa mutante KT2440 Δ *apaH* (Figs. 55 y 56). Estos resultados sugerían que el aumento de los niveles del gen *rpoS* en el mutante *apaH* no está mediado ni por el activador transcripcional PrsA ni por el efecto indirecto del regulador post-transcripcional Crc. Por el contrario, cuando se analizó el nivel de expresión de los genes *rsm* en ambas cepas, se observó que si bien los niveles de los genes *rsmA*, *rsmE* y *rsmL* no se encuentran alterados, el nivel de expresión de dos de sus sRNA no codificantes reguladores, i.e., *rsmX* y *rsmY*, en la cepa mutante es significativamente mayor que en la cepa parental (Fig. 57). Estos datos están de acuerdo con estudios previos que revelan que la proteína RsmA se controla fundamentalmente a nivel post-traducciona mediante su interacción con los sRNAs *rsm* que son los que determinan finalmente los niveles de RsmA libre para controlar los mRNAs dianas (Heeb *et al*, 2002; Kay *et al*, 2005; Brencic y Lory, 2009). Además, los resultados obtenidos sugieren que RsmA y, por ende, el sistema global de dos componentes GacS/GacA que controla positivamente los niveles transcripcionales de los sRNA *rsm*, está respondiendo a los niveles elevados de Ap₄A en la cepa mutante *apaH* y es el responsable de controlar los programas celulares que se inducen en dicha cepa, incluyendo el control de la expresión del gen *rpoS*. Aunque la regulación del gen *rpoS* difiere significativamente en *E. coli* y *P. putida*, en ambos organismos existe un control transcripcional y post-transcripcional (Venturi, 2003; Navarro-Llorens *et al*, 2010). Como se ha indicado anteriormente, en esta tesis se observa que unos niveles elevados de Ap₄A en *P. putida* KT2440 incrementan la expresión de *rpoS* a nivel transcripcional (Tabla 10). A pesar de que se han acumulado sobradas evidencias del control transcripcional de *rpoS* mediado por la inducción del sistema GacS/GacA en diferentes *Pseudomonas*, el mecanismo molecular es desconocido y pudiera implicar un control indirecto vía RsmA (Fig. 68) (Kang *et al*, 2004; Whistler *et al*, 1998). Con los resultados aportados en esta tesis no podemos confirmar si los niveles elevados de Ap₄A también inducen un control post-

transcripcional de *rpoS*, el cual estaría mediado de forma directa por RsmA (Heeb *et al.*, 2005, Sonnleitner y Haas, 2011). Futuros experimentos de cuantificación de los niveles de la proteína RpoS mediante técnicas más sensibles que la proteómica de alto rendimiento utilizada en este trabajo, permitirán confirmar si los niveles de la proteína RpoS se incrementan en la cepa mutante *apaH* como sugieren los experimentos de RT-PCR cuantitativa.

III.2 Integración y coordinación de los programas celulares vía GacS/GacA

El sistema de transducción de señales Gac (de sus siglas en inglés *Global Activator*) está formado por la histidina quinasa GacS y su regulador de respuesta asociado GacA, y desempeña un papel regulador central en *Pseudomonas* (Heeb *et al.*, 2002; 2005; Kang *et al.*, 2004; Hassan *et al.*, 2010). Así, se ha descrito que el sistema GacS/GacA está implicado en la regulación de la respuesta a diferentes estreses, en el metabolismo del carbono y en procesos de movilidad celular (Lapouge *et al.*, 2008), funciones que se integran en los tres programas celulares claramente alterados en el mutante *apaH* de *P. putida*. Por tanto, parece razonable pensar que el programa de respuesta a estrés y morfológico en *P. putida* KT2440 Δ *apaH* podría ser inducido mayoritariamente vía RpoS por el sistema GacS/GacA, siendo el programa metabólico controlado principalmente por algún otro regulador global distinto a RpoS y perteneciente a la cascada de señalización iniciada por el sistema GacS/GacA.

La proteína RsmA es homóloga al regulador de almacenamiento del carbono CsrA (de sus siglas en inglés *Carbon Storage Regulator*) de *E. coli*. Las proteínas RsmA/CsrA son reguladores post-transcripcionales que se unen a mRNAs dianas y regulan su estabilidad y traducción. En enterobacterias, la proteína CsrA es un componente clave del sistema de regulación global que está involucrado en la transición de fase exponencial a estacionaria (Romeo., 1998; Majdalani *et al.*, 2005). Así, se ha descrito que CsrA controla un número importante de procesos biológicos, no necesariamente relacionados, tales como movilidad, *quorum sensing*, estrés oxidativo, virulencia, metabolismo glicolítico, etc., muchos de los cuales se ven alterados en la cepa *P. putida* KT2440 Δ *apaH* (Fig. 69). Similar papel ha sido atribuido a RsmA en *Pseudomonas* (Fig. 69) (Heeb *et al.*, 2002; Heerb *et al.*, 2005; Lapouge *et al.*, 2008; Brencic y Lory, 2009;). Como se ha indicado más arriba, la actividad de las proteínas RsmA/CsrA está modulada post-traduccionalmente por sRNAs no codificantes, llamados *rsmY*, *rsmX*, *rsmZ* en *Pseudomonas* y *csrB*, *csrC* en *E. coli*, los cuales poseen

múltiples sitios de unión para RsmA/CsrA y secuestran a estas proteínas del citoplasma. (Liu *et al.*, 1997; Weilbacher *et al.*, 2003). En *E. coli* el sitio de unión consenso para la proteína CsrA en el extremo 5' del mRNA diana es 5'-RUACARGGAUGU-3' (R es una purina); además para la unión de CsrA es de vital importancia que la estructura del mRNA diana contenga el motivo GGA de la secuencia consenso en el lazo del bucle que incluye el sitio de unión al ribosoma (RBS). De forma similar, en *Pseudomonas* se ha identificado una secuencia consenso de unión de RsmA, 5'-A/UCANGGANGU/A-3' (N es cualquier nucleótido), con el motivo ANGGA localizado en el lazo del bucle que incluye el RBS (Brennic y Lory, 2009).

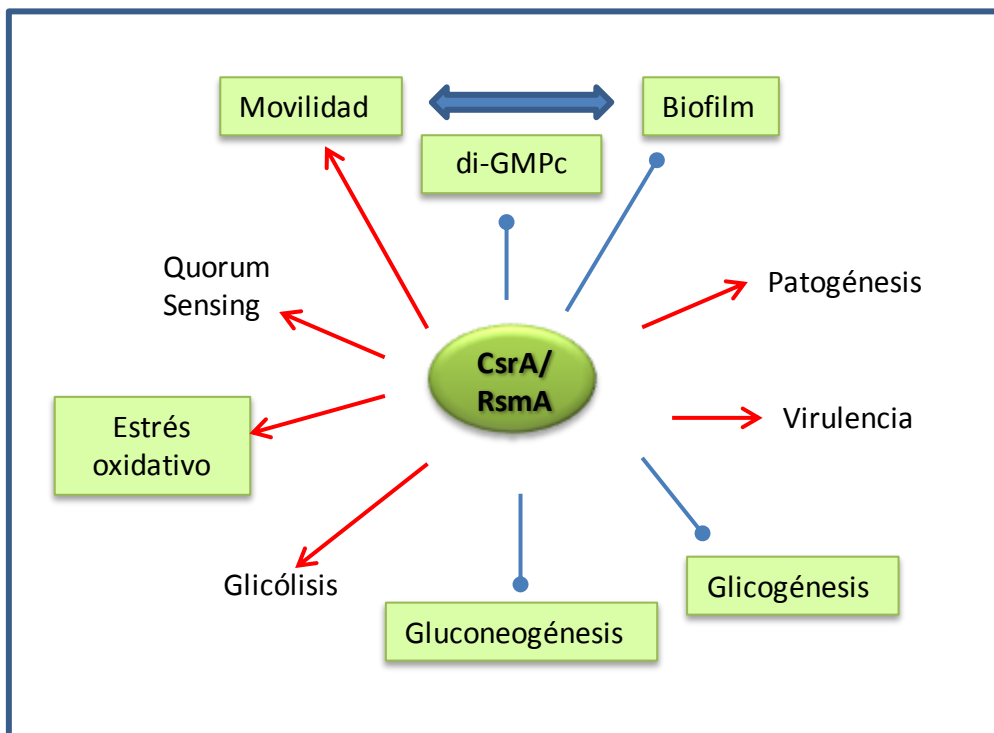


Figura 69. Regulación de procesos biológicos controlados por la proteína CsrA, en *E. coli*, o RsmA, en *Pseudomonas*. Las flechas rojas indican procesos regulados positivamente; las líneas azules indican procesos regulados negativamente. Los procesos afectados por la mutación del gen *apaH* en *P. putida* KT2440 se señalan con un recuadro.

Teniendo en cuenta estos antecedentes y el hecho que RsmA en *Pseudomonas* actúa fundamentalmente reprimiendo la traducción de sus mRNA dianas, es razonable pensar que parte de las proteínas inducidas en la cepa mutante *P. putida* KT2440 Δ *apaH*

podieran estar controladas por RsmA. El análisis *in silico* de la estructura secundaria predicha para la región 5' no traducida de los mRNA que codifican las proteínas inducidas en la cepa mutante *apaH* mostró que muchos de ellos poseían la secuencia GGA en el lazo del bucle del RBS (Fig. 70), sugiriendo su posible control post-transcripcional directo por RsmA. Así, en el extremo 5' no traducido de los genes *fumC2* (PP_1755) e *icd* (PP_4011), los cuales codifican dos proteínas inducidas y claramente implicadas en el programa metabólico del mutante *apaH* (ver apartado 3.2.2 II de resultados), se localizan sendas dianas para RsmA (Fig. 70). Igualmente se predicen dianas para RsmA en el extremo 5' no traducido del gen *fadE* (PP_1893), el cual codifica la principal acil-CoA deshidrogenasa de *P. putida*, el gen *murF* (PP_1333), que codifica la UDP-*N*-acetilmuramoil-*L*-alanil-*D*-glutamato-2,6-diaminopimelato ligasa responsable de una de las primeras etapas de síntesis del peptidoglicano, el gen *osmC* (PP_0089), que codifica una probable reductasa de hidroperóxidos orgánicos inducida por estrés osmótico, y el gen *glgB* (PP_4058), que podría codificar la 1,4- α -glucano ramificante, enzima responsable de sintetizar el glucógeno ramificado que sirve como precursor para iniciar la síntesis de trehalosa (Fig. 65). El hecho de que la expresión de proteínas implicadas en los programas morfológico, e.g., MurF, y de respuesta a estrés, e.g., OsmC y GlgB, pueda estar regulada vía RsmA da fe de la compleja respuesta desplegada por la cepa KT2440 Δ *apaH* y sugiere un doble control coordinado por el sistema GacS/GacA, i.e., un control directo (post-transcripcional) vía RsmA y un control indirecto (transcripcional) vía RpoS. Este control múltiple permitiría coordinar la respuesta ante alteraciones en los niveles de Ap₄A a través de la activación de diferentes programas celulares.

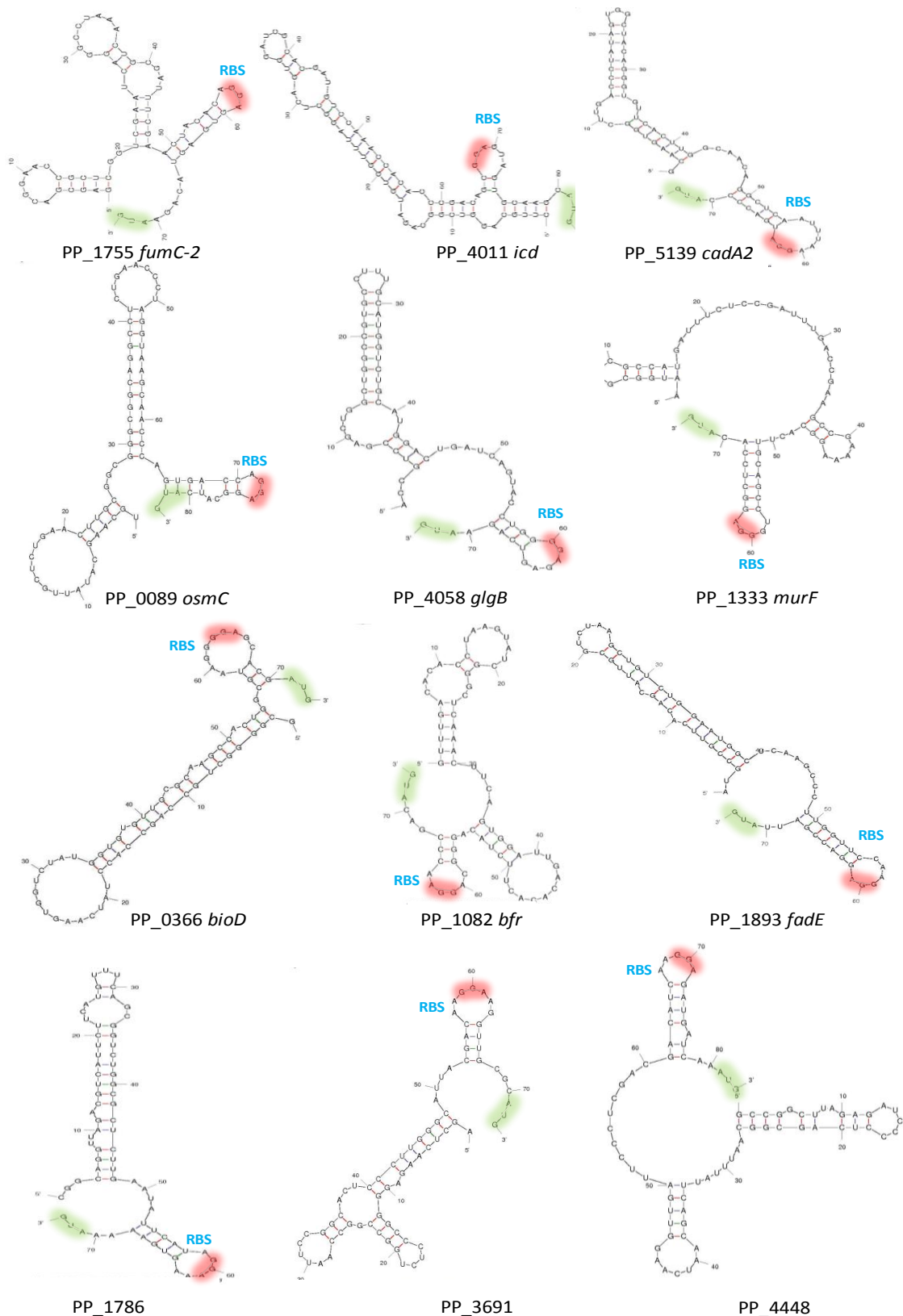


Figura 70. Predicción de la estructura secundaria del extremo 5' de los genes codificantes de algunas de las proteínas inducidas en la cepa *P. putida* KT2440Δ*apaH*. Se indica el motivo GGA (en rojo) de la presunta secuencia de interacción con la proteína RsmA dentro del bucle del RBS, y el codón de inicio AUG (en verde) de cada uno de los genes analizados.

Otro ejemplo de control a distintos niveles es el implicado en el circuito regulador del metabolismo del hierro. En *Pseudomonas*, el metabolismo del hierro es controlado fundamentalmente por el represor Fur (de sus siglas en inglés *Ferric Uptake Regulator*). Fur requiere Fe^{2+} como co-represor y se une a sus promotores diana reprimiendo la transcripción en condiciones no limitantes de aporte de hierro. Alternativamente, se ha descrito en *P. aeruginosa* que Fur controla indirectamente los genes responsables de la biosíntesis del sideróforo pioverdina a través de los reguladores PchR y PvdS (factor sigma extracitoplasmático) (Cornelis *et al*, 2009). No obstante, la fuerte inducción de los promotores controlados por Fur en mutantes *gacA* de diferente especies de *Pseudomonas* ha revelado que los mecanismos de adquisición de hierro controlados por este regulador están, a su vez, negativamente controlados por la cascada reguladora GacS/GacA a nivel transcripcional (Hassan *et al*, 2010). Esta cascada de regulación explica uno de los fenotipos observados en *P. putida* KT2440 Δ *apaH*, i.e., la menor producción de pioverdina en un medio limitante en hierro (Fig. 32), al tener dicha cepa mutante activado el sistema GacS/GacA debido el incremento en los niveles de Ap_4A . El hecho de que no se observen reprimidas las proteínas involucradas en la biosíntesis y metabolismo del hierro en el mutante *apaH* muy probablemente será debido a que en condiciones no limitantes de hierro, como son las que se utilizaron para recoger las muestras analizadas en proteómica, Fur estará reprimiendo constitutivamente los genes correspondientes tanto en la cepa parental como en la cepa mutante. Por otro lado, resulta interesante el hecho de que una diana para RsmA también fuera predicha en *bfr* (PP_1082) (Fig. 70), un gen que codifica una posible bacterioferritina inducida en el mutante *apaH*. Consideradas en su conjunto, estas observaciones sugieren que en el mutante *P. putida* KT2440 Δ *apaH* los niveles elevados de Ap_4A activan el sistema regulador GacS/GacA el cual inducirá la síntesis de bacterioferritinas directamente vía RsmA y reprimirá la síntesis de pioverdina a través de una cascada de regulación mediada por Fur.

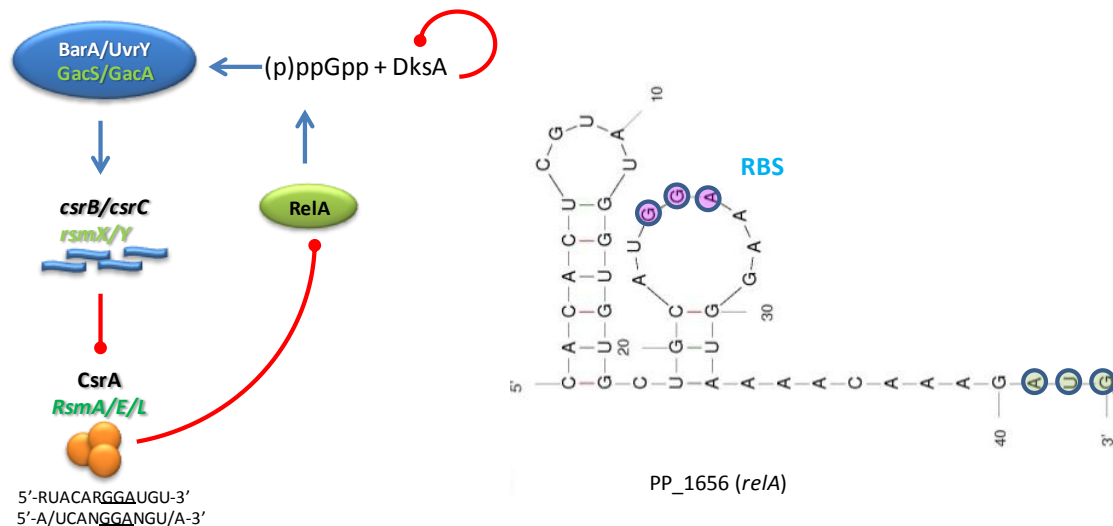


Figura 71. Regulación cruzada entre la respuesta estricta y el sistema regulador Csr/Rsm. A. En letras negras se indica el sistema Csr de *E. coli*, y en letras verdes el sistema Rsm de *Pseudomonas*. La elipse azul incluye el sistema regulador de dos componentes. Los sRNA reguladores se indican en azul. Los reguladores post-transcripcionales Csr y Rsm se indican con esferas naranjas. Las flechas azules indican activación, y las líneas rojas, represión. (Adaptado de Edwards *et al*, 2011.) B. Posible diana para RsmA en el extremo 5' del gen que codifica RelA (PP_1656) en *P. putida*. Se detallan el motivo GGA (en morado) en el lazo del bucle del RBS y el codón de inicio AUG (verde).

Uno de los fenotipos más característicos del mutante *P. putida* KT2440 Δ *apaH* es su fase de latencia extendida en diferentes fuentes de carbono, lo que nos ha llevado a sugerir que los altos niveles de Ap₄A estarían dificultando la recuperación energética y funcional de las células y, por lo tanto, la salida de la fase de latencia, una situación que recuerda a la de la respuesta estricta en bacterias (ver apartado II.2 de Discusión). En *E. coli* se ha descrito que existe una compleja interrelación entre la respuesta estricta y CsrA (Fig. 71) (Edwards *et al*, 2011). Así, se ha visto que la proteína DksA y el incremento en los niveles de ppGpp, que son responsables principales de la respuesta estricta, activan la transcripción de los sRNAs CsrB/C hasta diez veces. Este hecho resultaría en una bajada en los niveles de CsrA libre, una situación similar a la ocasionada por el incremento en los niveles de Ap₄A (ver más arriba). Adicionalmente, la proteína RelA, principal responsable de la síntesis de ppGpp, está negativamente regulada por CsrA por lo que la activación del sistema BarA/UvrY (homólogo a GacS/GacA de *Pseudomonas*) y la consiguiente reducción de los niveles de CsrA estarían a su vez potenciando aún más la respuesta estricta (Fig. 71.) (Edwards *et al*, 2011). Una interacción similar entre la respuesta estricta y el sistema LetS/LetA (homólogo al sistema GacS/GacA) se ha descrito en *Legionella pneumophila* (Molofsky

y Swanson, 2004). Con estos antecedentes, se procedió a la búsqueda *in silico* de dianas para RsmA en el extremo 5' no traducido del gen *relA* de *P. putida* KT2440, y se identificó un posible sitio de unión sugiriendo que, al igual que se ha descrito en *E. coli*, el sistema Gac/Rsm actuaría potenciando la respuesta estricta. Por otro lado, cabe destacar que los niveles del factor de elongación de la transcripción GreA, el cual contribuye a la eficiencia y fidelidad de la transcripción de sus promotores dianas, entre otros, los promotores que controlan las proteínas ribosomales y rRNAs (Potrykus *et al*, 2006; Stepanova *et al*, 2007), se vieron significativamente reducidos en la cepa mutante *apaH* (Tabla 7). Por tanto, la reducción en los niveles de GreA podría explicar el gran número de proteínas ribosomales que se ven reprimidas en la cepa mutante (Tablas 7 y S1). Por otra parte, es interesante destacar que los promotores que conducen la expresión de las proteínas ribosomales y rRNAs se controlan de forma antagónica por GreA y DksA/ppGpp. Así, mientras GreA estimula su expresión, el sistema DksA/ppGpp responsable de la respuesta estricta actúa reprimiendo la expresión de estos promotores (Potrykus *et al*, 2006; Vinella *et al*, 2012). Tomados en su conjunto, estas observaciones sugieren que la activación del sistema Gac/Rsm mediado por los altos niveles de Ap₄A estaría potenciando la respuesta estricta a varios niveles, i) incrementando la producción de RelA vía menor disponibilidad de RsmA, ii) contribuyendo mediante el aumento de la síntesis de purinas (como se ha discutido en el apartado II.1) a la síntesis de ppGpp, y iii) reduciendo los niveles de GreA. De cualquier modo, la confirmación de la relación entre el sistema Gac/Rsm, la respuesta estricta y GreA en *P. putida* requiere de experimentos futuros.

III. 3 Mecanismo de activación del sistema GacS/GacA mediado por altos niveles de Ap₄A.

Es bien conocido que la activación del sistema GacS/GacA involucra la autofosforilación de GacS y la subsiguiente transferencia del grupo fosfato a GacA (Goodman *et al*, 2009). A pesar del extensivo conocimiento de los efectos moleculares y fenotípicos que provoca una activación del sistema Gac, las señales que desencadenan su activación no son del todo bien conocidas. Se ha descrito que la activación del sistema Gac ocurre en respuesta a señales de secreción químicamente indefinidas que se producen a alta densidad celular (Heeb *et al*, 2002; Kay *et al*, 2005). Igualmente ha sido

descrito que el sistema Gac está controlado por dos histidín quinazas huérfanas, RetS y LadS, de forma antagónica. Mientras que LadS activa a GacS, RetS actuaría como un represor en la membrana citoplasmática (Fig. 68) (Goodman *et al.*, 2004).

Aunque con los datos aportados en esta tesis no es posible concluir el mecanismo por el cual los altos niveles de Ap₄A estarían activando al sistema Gac, se pueden plantear dos posibles escenarios. La posibilidad más sencilla sería pensar que el Ap₄A fuera la molécula señal efectora de GacS/GacA (o de alguna de las histidín quinazas que la controlan, como LadS y/o RetS). Este mecanismo directo implicaría que todos los fenotipos derivados de una mutación *apaH* serían conducidos estrictamente por el sistema Gac/Rsm. El hecho de que el doble mutante *apaH/gacA* restablezca el fenotipo parental en cuanto a la duración de la fase de latencia (Fig. 58) podría apuntar en esta dirección, pero a falta de una caracterización más exhaustiva de este doble mutante, la interacción indirecta entre Ap₄A y el sistema Gac no puede descartarse. Una segunda posibilidad es que el efecto de la mutación *apaH* sobre el sistema Gac sea indirecto y esté mediado, por ejemplo, por algún metabolito que se genere como consecuencia del efecto de altos niveles de Ap₄A en la célula. En este sentido, se ha descrito que intermediarios del ciclo del TCA promueven la activación del sistema Gac independientemente de la interacción de RetS y LadS con GacS (Fig. 68). Así, en *P. fluorescens* niveles elevados de fumarato, succinato y α -cetoglutarato, resultantes de una mutación en la fumarasa FumA, promueven una fuerte activación del sistema Gac, mientras que niveles elevados de piruvato promueven su inactivación (Takeuchi *et al.*, 2009). En este sentido, la inactivación de FumA en *P. putida* KT2440 Δ *apaH* (Fig. 53) (ver apartado II.2), permite especular con un mecanismo en el que el Ap₄A ejercería una activación indirecta del sistema Gac. Este mecanismo podría implicar la capacidad del Ap₄A de unirse e inactivar diversas chaperonas celulares (Bochner *et al.*, 1984; Johnstone y Farr, 1991; Fuge y Spencer, 1993). Dado que FumA es una enzima que posee un núcleo de Fe-S y se inactiva en presencia de subproductos del metabolismo, como por ejemplo especies reactivas de oxígeno (Flint *et al.*, 1993; Jang y Imlay, 2007), podría requerir chaperonas para la regeneración de su cofactor metálico y el mantenimiento de su actividad. Así pues, un posible mecanismo de actuación del Ap₄A sería vía inactivación de chaperonas que ocasionarían una reducida actividad FumA y un incremento en los niveles de fumarato/succinato, con la subsiguiente activación del sistema Gac. En cualquier caso, la demostración experimental de si el mecanismo de

activación del sistema Gac por Ap₄A es directo o indirecto, o incluso si co-existen ambos mecanismos, requerirá futuros experimentos.

III.4 Implicación del sistema Gac/Rsm en el control catabólico de la ruta gal de *P. putida*.

Dado que la mutación en el gen *apaH* fue identificada por evadir el efecto de represión que ejercía el metabolismo del AFA sobre la expresión de los genes *gal* en *P. putida* (Fig. 30), se procedió a la búsqueda de una explicación molecular a este hecho. En *Pseudomonas* el regulador traduccional Crc es el principal responsable de regular el metabolismo de fuentes de carbono no preferenciales (MacGregor *et al*, 1996; Rojo, 2010) incluyendo los compuestos aromáticos (ver apartado 2.2 de la Introducción). Crc es una proteína que une RNA (Moreno *et al.*, 2007) y regula la expresión génica uniéndose a una secuencia consenso (5' AANAANAA 3') localizada en las proximidades del codón de inicio, dificultando la formación del complejo de iniciación de la traducción (Moreno *et al*, 2007; Moreno y Rojo, 2008; Hernández-Arranz *et al*, 2013). Como se ha comentado previamente, la actividad de Crc está controlada en *P. putida* por los sRNA *crcZ* y *crcY*, los cuales actúan secuestrando a Crc limitando así la cantidad de proteína libre para unirse a sus mRNAs dianas (Moreno *et al*, 2012). La pérdida de la represión catabólica de los genes *gal* por el AFA en la cepa *P. putida* KTGAL*dapaH* (Fig. 30) y el hecho de que se hayan encontrado dianas para Crc en los extremos 5' no traducidos de los genes *galB* y *galT* (Hernández-Arranz *et al*, 2013), sugería la implicación de Crc en el fenotipo observado. No obstante, los análisis de expresión transcripcional tanto de *crc* como de sus dos sRNA reguladores, *crcZ* y *crcY* (Fig. 56), así como los datos de proteómica con la proteína Crc (Tabla S1), no mostraron diferencias significativas entre la cepa parental y el mutante *apaH*, lo cual argumentaba en contra de la participación de Crc en la represión sobre la ruta *gal* mediada por el metabolismo del AFA.

Hfq es una proteína reguladora global cuya principal función fisiológica incluye el control de la estabilidad de sRNAs y mRNAs, y la regulación transcripcional de mRNAs diana mediante sRNAs (Sledjeski *et al*, 2001; Moll *et al*, 2003; Sobrero y Valverde, 2012). Recientemente se ha demostrado que Hfq es además una proteína clave en la interacción *in vitro* de Crc con sus mRNAs dianas (Milojevic *et al*, 2013). A raíz de este nuevo papel propuesto para Hfq en represión catabólica y dado que se encontraron reducidos los niveles de esta proteína en la cepa mutante *apaH* (Tabla 7),

no se puede descartar que, incluso sin que exista una variación en los niveles de Crc, dicha disminución de los niveles de Hfq fuese responsable de una menor represión catabólica del AFA sobre los genes *gal* mediada por Crc en la cepa mutante *apaH*.

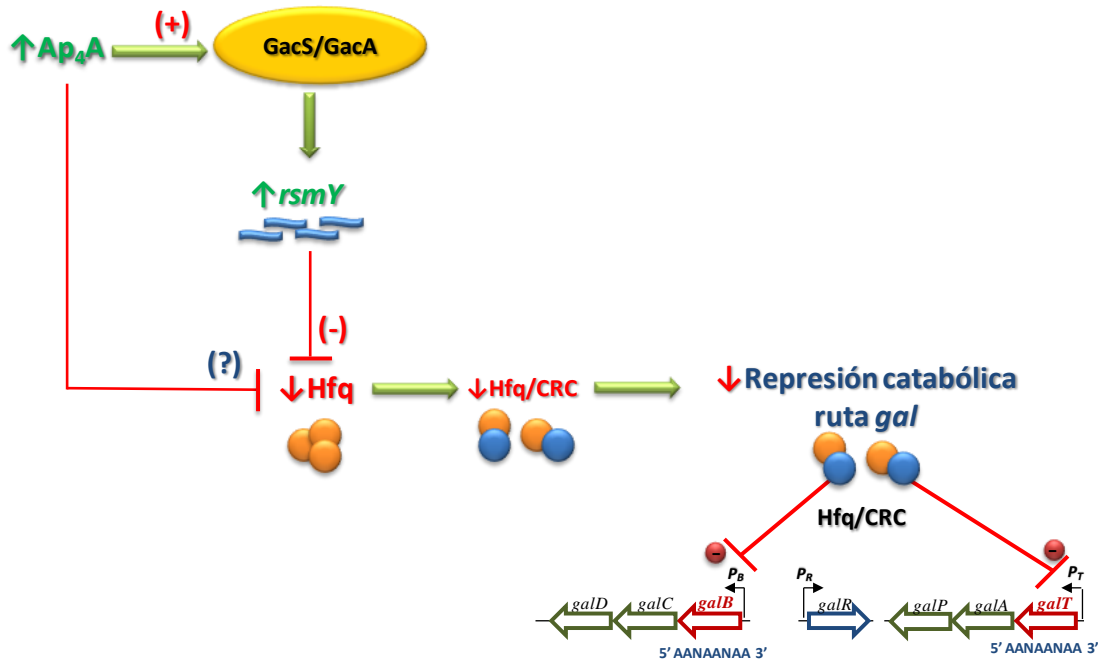


Figura 72. Modelo propuesto para la inhibición del control catabólico de los genes *gal* en *P. putida* KT2440Δ*apaH*. Las proteínas Hfq y Crc se indican con esferas naranjas y azules, respectivamente. La represión que ejerce el complejo Crc/Hfq sobre los promotores P_B y P_T se indica con el símbolo -. + y -, indica activación y represión, respectivamente. Se detallan las posibles dianas de interacción con Crc en el extremo 5' de los genes *galB* y *galT* (en rojo). Las flechas verticales verdes o rojas indican aumento o disminución, respectivamente

Los niveles de Hfq en la célula se encuentran estrictamente regulados y parecen responder a la tasa y fase de crecimiento celular (Kajitani *et al*, 1994), siendo significativamente superiores en la fase exponencial de crecimiento con respecto a la fase estacionaria (Ali Azam *et al*, 1999). El mecanismo por el cual los niveles de Hfq se encuentran disminuídos en la cepa mutante *apaH* no es del todo evidente, pero si que parecen correlacionar bien con la inducción del gen *rpoS* y el deficiente estado energético del mutante. Sorprende, no obstante, el hecho de que Hfq esté regulando positivamente la traducción de RpoS en *E. coli* mediado por sRNAs (Soper *et al*, 2010). Esto podría indicar que la regulación de RpoS en *Pseudomonas* es diferente a la que ocurre en enterobacterias, como ya ha sido sugerido (Venturi, 2003), o bien que Hfq no es esencial bajo condiciones donde los sRNAs y el mRNA que codifica RpoS pueden

formar un complejo estable por si solos (Soper *et al*, 2010). Merece la pena destacar que Hfq está modulada también por sus sRNA no codificantes dianas, de tal forma que un incremento en alguno de ellos puede disminuir los niveles de Hfq disponible para otros procesos. Así por ejemplo, se ha descrito que Hfq se une a RsmY en sitios distintos y solapantes a los que lo hace RsmA (Sorger-Domenigg *et al*, 2007). De esta forma, aunque no podemos asegurar que la activación del sistema Gac/Rsm sea la responsable de reprimir la expresión de Hfq, si que estaría negativamente regulándola mediante su secuestro a través de RsmY.

En resumen, si bien la demostración de la implicación directa de Crc en la represión de los genes *gal* necesita mayor soporte experimental, las dianas Crc identificadas en los genes *galB* y *galT*, y los fenotipos observados en la cepa *P. putida* KT2440 Δ *apaH* parecen indicar que los altos niveles de Ap₄A predichos como consecuencia de la inactivación del gen *apaH* podrían estar relajando el control catabólico de la ruta gal a través de la disminución de los niveles disponibles de Hfq vía activación del sistema Gac/Rsm (Fig. 72).

En resumen, los resultados presentados en esta tesis permiten proponer un modelo del mecanismo molecular de actuación de la alarmona Ap₄A y del circuito regulador asociado, y de cómo se afectan los programas morfológico, metabólico y de estrés cuando se incrementan los niveles de Ap₄A en *P. putida* (Fig. 73). Además, este trabajo desvela aspectos inéditos tanto del metabolismo como de los sistemas globales de regulación que eran desconocidos hasta la fecha en un organismo modelo como es *P. putida* KT2440, y cuyo estudio detallado requerirá sin duda un gran esfuerzo experimental futuro. Asimismo, la cepa *P. putida* KT2440 Δ *apaH* constituye un nuevo sistema modelo muy interesante para el estudio de los mecanismos moleculares básicos de adaptación de las bacterias frente a diferentes condiciones de estrés (nutricional, oxidativo, etc.). En este sentido, la posible utilización del mutante *apaH* como huésped para la expresión de genes que sólo se inducen bajo condiciones de estrés celular supone una aplicación biotecnológica a los estudios y al conocimiento que se deriva de esta tesis. Además, la menor represión catabólica y la resistencia a ciertas condiciones de estrés, e.g., estrés osmótico, observadas en la cepa *P. putida* KT2440 Δ *apaH* son aspectos que incrementan el valor biotecnológico de esta cepa para diferentes aplicaciones industriales.

VII. CONCLUSIONES

VII Conclusiones

1. La ruta híbrida de degradación de AFA causa represión de las rutas clásicas de degradación aeróbica de compuestos aromáticos, tales como la ruta del 4HBA y la del galato, sugiriendo que el AFA y otros compuestos que se degradan vía fenilacetil-CoA a través de reacciones similares a las de β -oxidación de ácidos grasos, son fuentes de carbono aromáticas preferentes en *P. putida* KT2440.
2. La inactivación del gen *apaH*, que codifica la principal hidrolasa de la alarmona Ap₄A en bacterias, reduce significativamente la represión que ejerce el catabolismo del AFA sobre los genes *gal* responsables de la degradación de galato en *P. putida* KTGAL, sugiriendo que los niveles de Ap₄A están modulando algunos fenómenos de represión catabólica en *P. putida*.
3. La inactivación del gen *apaH* ocasiona efectos pleiotrópicos en *P. putida*. Así, por un lado, ocasiona una reducción de la movilidad celular, de la producción de pioverdina y de la resistencia al estrés oxidativo, y por otro lado, un incremento de la formación de biofilm y resistencia al estrés osmótico, así como una característica fase de latencia extendida de los cultivos cuando se utilizan diferentes fuentes de carbono.
4. Mediante un abordaje de biología de sistemas utilizando proteómica, estudios de transcripción cuantitativa y estudios de distribución de flujo utilizando el modelo metabólico iJN1411, se ha confirmado a nivel molecular que la inactivación del gen *apaH* afecta tanto a los programas de estrés y morfológico como al programa metabólico de *P. putida*.
5. Una de las principales consecuencias de la inactivación del gen *apaH* en *P. putida* es el remodelado del metabolismo central y la inducción de isoenzimas poco habituales en la célula, lo que provoca un estado energético subóptimo que podría explicar la fase de latencia extendida así como otros fenotipos relacionados con los programas de estrés y morfológico.
6. El gen *rpoS*, que codifica el factor sigma alternativo RpoS de respuesta a estrés, parece desempeñar un papel central en la cascada de regulación que responde a la inactivación del gen *apaH*, y que implica también a los *rsm* sRNA y el sistema regulador global GacS/GacA en *P. putida*.

7. Los resultados presentados en esta tesis abren campos de investigación futura sobre el papel del Ap₄A como molécula señal central que controla las redes reguladoras y metabólicas en bacterias, y como un elemento importante a considerar en el futuro para el diseño de microorganismos con diferentes aplicaciones biotecnológicas.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

VIII Bibliografía

1. **Agulló L, Cámara B, Martínez P, Latorre V y Seeger M.** (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**:167–175.
2. **Alhapel A, Darley D J, Wagener N, Eckel E, Elsner N y Pierik AJ.** (2006) Molecular and functional analysis of nicotinate catabolism in *Eubacterium barkeri*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **103**:12341-12346.
3. **Ali Azam T, Iwata A, Nishimura A, Ueda S y Ishihama A.** (1999) Growth Phase-Dependent Variation in Protein Composition of the *Escherichia coli*. *Nucleoid. Journal of Bacteriology*. **181**: 6361-6370
4. **Alonso S, Bartolomé-Martín D, del Álamo M, Díaz E, García J y Perera J.** (2003) Genetic characterization of the styrene lower catabolic pathway of *Pseudomonas* sp. strain Y2. *Gene* **319**.
5. **Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW y Lipman DJ.** (1990) Basic local alignment search tool. *Journal of molecular biology* **215**: 403-410.
6. **Andrews SC, Robinson AK y Rodríguez-Quiñones F.** (2003) Bacterial iron homeostasis. *FEMS Microbiol Rev.* **27**(2-3):215-37.
7. **Aranda-Olmedo I, Marín P, Ramos JL y Marqués S.** (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**: 7418-7421.
8. **Arias-Barrau E, Olivera ER, Luengo JM, Fernández C, Galán B, García JL, Díaz E y Miñambres B.** (2004) The Homogentisate Pathway: a Central Catabolic Pathway Involved in the Degradation of L-Phenylalanine, L-Tyrosine, and 3-Hydroxyphenylacetate in *Pseudomonas putida*. *J. Bacteriol.* **186**: 5062-5077.
9. **Argüelles JC.** (2000) Physiological roles of trehalose in bacteria and yeasts: a comparative analysis. *Arch Microbiol.* **174**(4):217-24
10. **Aruoma, O y Halliwell, B.** (1998) Molecular Biology of Free Radicals in Human Diseases. Saint Lucia: OICA International

11. **Baharoglu Z, Krin E y Mazel D.** (2013) RpoS plays a central role in the SOS induction by sub-lethal aminoglycoside concentrations in *Vibrio cholerae*. *PLoS Genet.* **9**(4):e1003421.
12. **Bartolomé-Martín D, Martínez-García E, Mascaraque V, Rubio J, Perera J y Alonso S.** (2004) Characterization of a second functional gene cluster for the catabolism of phenylacetic acid in *Pseudomonas* sp. strain Y2. *Gene* **341**: 167-179.
13. **Basu A, Apte SK y Phale PS.** (2006) Preferential utilization of aromatic compounds over glucose by *Pseudomonas putida* CSV86. *Appl Environ Microb* **72**: 2226–2230.
14. **Basu A, Das D, Bapat P, Wangikar PP y Phale PS.** (2007a) Sequential utilization of substrates by *Pseudomonas putida* CSV86: signatures of intermediate metabolites and online measurements. *Microbiol Res* **164**: 429–437.
15. **Basu A, Shrivastava R, Basu B, Apte SK y Phale PS.** (2007b) Modulation of glucose transport causes preferential utilization of aromatic compounds in *Pseudomonas putida* CSV86. *J Bacteriol* **189**: 7556–7562.
16. **Bauchop T y Elsdén SR.** (1960) The Growth of Micro-organisms in Relation to their Energy Supply. *J Gen Microbiol* **23**: 457-469.
17. **Beare PA, For RJ, Martin LW y Lamont IL.** (2003) Siderophore-mediated cell signalling in *Pseudomonas aeruginosa*: divergent pathways regulate virulence factor production and siderophore receptor synthesis. *Mol Microbiol.* **47**(1):195-207.
18. **Becker SA y Palsson BO.** (2008) Context-specific metabolic networks are consistent with experiments. *PLoS Comput Biol.* **4**(5):e1000082.
19. **Bertani I, Kojic M y Venturi V.** (2001) Regulation of the p-hydroxybenzoic acid hydroxylase gene (pobA) in plant-growth-promoting *Pseudomonas putida* WCS358. *Microbiology.* **147**(Pt 6):1611-20.
20. **Bleichrodt FS, Fischer R y Gerischer UC.** (2010) The beta-ketoadipate pathway of *Acinetobacter baylyi* undergoes carbon catabolite repression, cross-regulation and vertical regulation, and is affected by Crc. *Microbiology* **156**:1313-22.

21. **Bochner BR, Lee PC, Wilson SW, Cutler CW y Ames BN.** (1984) AppppA and related adenylylated nucleotides are synthesized as a consequence of oxidation stress. *Cell.* **37**(1):225-32.
22. **Bochner BR, Zylicz M y Georgopoulos C.** (1986) *Escherichia coli* DnaK protein possesses a 5'-nucleotidase activity that is inhibited by AppppA. *J Bacteriol.* **168**(2):931-5.
23. **Brevet A, Chen J, Lévêque F, Plateau P y Blanquet S.** (1989) In vivo synthesis of adenylylated bis(5'-nucleosidyl) tetraphosphates (Ap₄N) by *Escherichia coli* aminoacyl-tRNA synthetases. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **86**:8275-9.
24. **Boll M y Fuchs G.** (1995) Benzoyl-Coenzyme A Reductase (Dearomatizing), a Key Enzyme of Anaerobic Aromatic Metabolism. *European Journal of Biochemistry* **234**: 921-933
25. **Boll M, Löffler C, Morris BE y Kung JW.** (2013) Anaerobic degradation of homocyclic aromatic compounds via arylcarboxyl-coenzyme A esters: organisms, strategies and key enzymes. *Environ Microbiol.* doi: 10.1111/1462-2920.12328. [Epub ahead of print]
26. **Brencic A y Lory S.** (2009) Determination of the regulon and identification of novel mRNA targets of *Pseudomonas aeruginosa* RsmA. *Molecular Microbiology* **72**: 612-632
27. **Brzostowicz PC, Reams AB, Clark TJ y Neidle EL.** (2003) Transcriptional Cross-Regulation of the Catechol and Protocatechuate Branches of the β -keto adipate Pathway Contributes to Carbon Source-Dependent Expression of the *Acinetobacter* sp. Strain ADP1 *pobA* Gene. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**: 1598-1606.
28. **Cabiscol E, Tamarit J y Ros J.** (2000) Oxidative stress in bacteria and protein damage by reactive oxygen species. *International microbiology.* **3**:3-8.
29. **Carmona M, Prieto MA, Galán B, García JL y Díaz E.** (2008) Signaling networks and design of pollutants biosensors. In *In Microbial Biodegradation: genomics and molecular biology*. Díaz, E. (ed). Norfolk, UK: Caister Academic Press, pp. 97-143.
30. **Carmona M, Zamarro M T, Blázquez B, Durante-Rodríguez G, Juárez JF, Valderrama, JA, Barragán MJ, García JL y Díaz E.** (2009) Anaerobic

- catabolism of aromatic compounds: a genetic and genomic view. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **73**:71-133.
31. **Carrondo MA.** (2003). Ferritins, iron uptake and storage from the bacterioferritin viewpoint. *EMBO J.* **22**(9): 1959–1968.
 32. **Cases I, de Lorenzo V, Pérez-Martín J.** (1996) Involvement of sigma 54 in exponential silencing of the *Pseudomonas putida* TOL plasmid Pu promoter. *Mol Microbiol.* **19**(1):7-17.
 33. **Cases I y de Lorenzo V.** (1998) Expression systems and physiological control of promoter activity in bacteria. *Curr Opin Microbiol* **1**: 303 - 310.
 34. **Cases I y de Lorenzo V** (2001) The black cat/white cat principle of signal integration in bacterial promoters. *The EMBO Journal* **20**.
 35. **Cases I y de Lorenzo V.** (2005) Promoters in the environment: transcriptional regulation in its natural context. *Nat Rev Micro* **3**: 105-118.
 36. **Cesarino I, Araújo P, Pereira Domingues AJ y Mazzafera. P.** (2012) An overview of lignin metabolism and its effect on biomass recalcitrance. *Brazilian Journal of Botany* **35**: 303-311.
 37. **Chenier D, Beriault R, Mailloux R, Baquie M, Abramia G, Lemire J y Appanna V.** (2008) Involvement of fumarase C and NADH oxidase in metabolic adaptation of *Pseudomonas fluorescens* cells evoked by aluminum and gallium toxicity. *Appl Environ Microbiol.* **74**(13):3977-84.
 38. **Cho YS, Park SH, Kim CK, Oh KH.** (2000) Induction of stress shock proteins DnaK and GroEL by phenoxyherbicide 2,4-D in *Burkholderia* sp. YK-2 isolated from rice field. *Curr Microbiol.* **41**(1):33-8.
 39. **Clair G, Armengaud J y Duport C.** (2010) Restricting fermentative potential by proteome remodeling. *Mol Cell Proteomics.* **11**(6):M111.013102.
 40. **Clarke PH.** (1982) The metabolic versatility of *Pseudomonads*. *Antonie Van Leeuwenhoek* **48**:105-130.
 41. **Collier DN, Hager PW y Phibbs PV Jr.** (1996) Catabolite repression control in *Pseudomonads*. *Res Microbiol* **147**: 551–561.
 42. **Cornelis P, Matthijs S y Oeffelen L** (2009) Iron uptake regulation in *Pseudomonas aeruginosa*. *Biometals* **22**: 15-22.
 43. **Cowles CE, Nichols NN, Harwood CS.** (2000) BenR, a XylS homologue, regulates three different pathways of aromatic acid degradation in *Pseudomonas putida*. *J. Bacteriol.* **182**(22):6339-46.

44. **Crabbé A, Schurr MJ, Monsieurs P, Morici L, Schurr J, Wilson JW, Ott CM, Tsaprailis G, Pierson DL, Stefanyshyn-Piper H, Nickerson CA.** (2011) Transcriptional and proteomic responses of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 to spaceflight conditions involve Hfq regulation and reveal a role for oxygen. *Appl Environ Microbiol.* **77**(4):1221-30.
45. **Dabrowska G, Prusińska J y Goc A.** (2006) The stringent response--bacterial mechanism of an adaptive stress response. *Postepy Biochem.* **52**:87-93.
46. **Dal S, Steiner I y Gerischer U.** (2002) Multiple operons connected with catabolism of aromatic compounds in *Acinetobacter* sp. strain ADP1 are under carbon catabolite repression. *J Mol Microbiol Biotechnol.* **4**(4):389-404.
47. **Daniels C, Godoy P, Duque E, Molina-Henares MA, de la Torre J, del Arco JM, Herrera C, Segura A, Guazzaroni ME, Ferrer M y Ramos JL.** (2010) Global Regulation of Food Supply by *Pseudomonas putida* DOT-T1E *J Bacteriol* **192**: 2169-2181.
48. **Dejonghe W, Boon N, Seghers D, Top EM y Verstraete W.** (2001) Bioaugmentation of soils by increasing microbial richness: missing links. *Environ. Microbiol.***3**:649-657.
49. **del Castillo T y Ramos JL.** (2007) Simultaneous catabolite repression between glucose and toluene metabolism in *Pseudomonas putida* is channelled through different signalling pathways. *J Bacteriol* **189**: 5142-5152.
50. **de Lorenzo V, Herrero M, Jakubzik U y Timmis K N.** (1990) Mini-Tn5 transposon derivatives for insertion mutagenesis, promoter probing, and chromosomal insertion of cloned DNA in gram-negative eubacteria. *J Bacteriol* **172**: 6568-6572.
51. **de Lorenzo V y Timmis KN.** (1994) Analysis an construction of stable phenotypes in gram-negative bacteria with Tn5- and Tn-10 derived minitransposons. *Methods Enzymol* **235**: 386-405.
52. **del Peso-Santos T, Bartolomé-Martín D, Fernández C, Alonso S, García JL, Díaz E, Shingler V y Perera J.** (2006) Coregulation by phenylacetyl-coenzyme A-responsive PaaX integrates control of the upper and lower pathways for catabolism of styrene by *Pseudomonas* sp. strain Y2. *J Bacteriol.* **188**(13):4812-21.
53. **Del Peso-Santos T, Bernardo LM, Skärfstad E, Holmfeldt L, Togneri P y Shingler V.** (2011) A hyper-mutant of the unusual sigma70-Pr promoter

- bypasses synergistic ppGpp/DksA co-stimulation. *Nucleic Acids Res.* **39**:5853-65.
54. **Denef VJ, Patrauchan MA, Florizone C, Park J, Tsoi TV, Verstraete W, Tiedje JM y Eltis LD.** (2005) Growth substrate- and phase-specific expression of biphenyl, benzoate, and C1 metabolic pathways in *Burkholderia xenovorans* LB400. *J Bacteriol* **187**: 7996–8005.
 55. **Denef VJ, Klappenbach JA, Patrauchan MA, Florizone C, Rodrigues JLM, Tsoi TV, Verstraete W, Eltis LD y Tiedje JM.** (2006) Genetic and Genomic Insights into the Role of Benzoate-Catabolic Pathway Redundancy in *Burkholderia xenovorans* LB400. *Appl Environ Microbiol* **72**: 585 - 595.
 56. **Deutscher J, Francke C y Postma PW.** (2006) How phosphotransferase system-related protein phosphorylation regulates carbohydrate metabolism in bacteria. *Microbiol Mol Biol R* **70**: 939–1031.
 57. **Díaz E y Prieto M.** (2000) Bacterial promoters triggering biodegradation of aromatic pollutants. *Curr Opin Biotechnol* **11**: 467-475.
 58. **Díaz E, Ferrández A, Prieto MA y García JL.** (2001) Biodegradation of Aromatic Compounds by *Escherichia coli*. *Microbiol Mol Biol Rev* **65**: 523-569.
 59. **Díaz E.** (2004) Bacterial degradation of aromatic pollutants: a paradigm of metabolic versatility. *Int Microbiol* **7**: 173-180.
 60. **Díaz E, Jiménez JI y Nogales J.** (2013) Aerobic degradation of aromatic compounds. *Curr Opin Biotechnol.* **24**:431-442.
 61. **Domínguez-Cuevas P, González-Pastor JE, Marqués S, Ramos JL y de Lorenzo V.** (2006) Transcriptional tradeoff between metabolic and stress-response programs in *Pseudomonas putida* KT2440 cells exposed to toluene. *J Biol Chem.* **281**(17):11981-91.
 62. **Dong YH, Zhang XF y Zhang LH.** (2013) The global regulator Crc plays a multifaceted role in modulation of type III secretion system in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiologyopen.* **2**(1):161-72.
 63. **Donoso R, Pérez-Pantoja D y González B.** (2011) Strict and direct transcriptional repression of the *pobA* gene by benzoate avoids 4-hydroxybenzoate degradation in the pollutant degrader bacterium *Cupriavidus necator* JMP134. *Environ Microbiol.* **13** (6):1590-600.

64. **Duque E, Molina-Henares A J, de la Torre J, Molina-Henares MA, del Castillo T, Lam J y Ramos JL.** (2007) Towards a Genome-Wide Mutant Library of *Pseudomonas putida* Strain KT2440. *Pseudomonas*. pp 227-251.
65. **Edwards AN, Patterson-Fortin LM, Vakulskas CA, Mercante JW, Potrykus K, Vinella D, Camacho MI, Fields JA, Thompson SA, Georgellis D, Cashel M, Babitzke P y Romeo T** (2011) Circuitry linking the Csr and stringent response global regulatory systems. *Molecular Microbiology* **80**: 1561-1580.
66. **Erb TJ, Ismail W, Fuchs G.** (2008) Phenylacetate metabolism in thermophiles: characterization of phenylacetate-CoA ligase, the initial enzyme of the hybrid pathway in *Thermus thermophilus*. *Curr Microbiol.* **57**:27-32.
67. **Federal Register** (1982). Certified host–vector systems. Appendix E, 47:17197. *United States National Institutes of Health*.
68. **Farr SB, Arnosti DN, Chamberlin MJ y Ames BN.** (1989) An *apaH* mutation causes AppppA to accumulate and affects motility and catabolite repression in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **86**(13):5010-4.
69. **Feist AM y Palsson BO** (2010) The biomass objective function. *Current Opinion in Microbiology* **13**: 344-349
70. **Ferrández A, García JL y Díaz E** (1997) Genetic characterization and expression in heterologous hosts of the 3-(3-hydroxyphenyl)propionate catabolic pathway of *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* **179**: 2573-2581.
71. **Fernández C, Ferrández A, Minambres B, Díaz E y García JL.** (2006) Genetic Characterization of the Phenylacetyl-Coenzyme A Oxygenase from the Aerobic Phenylacetic Acid Degradation Pathway of *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**: 7422-7426.
72. **Fernández C, Díaz E y García JL.** (2013) Insights on the regulation of the phenylacetate degradation pathway from *Escherichia coli*. *Environ microbial reports*. Article first published online: 12 NOV 2013. DOI: 10.1111/1758-2229.12117
73. **Fetzner S.** (2002) Oxygenases without requirement for cofactors or metal ions. *Appl Microbiol Biotechnol* **60**: 243-257.
74. **Flårdh K y Kjelleberg S.** (1994) Glucose upshift of carbon-starved marine *Vibrio* sp. strain S14 causes amino acid starvation and induction of the stringent response. *J Bacteriol.* **176**(19):5897-903.

75. **Flint DH, Tuminello JF y Emptage MH.** (1993) The inactivation of Fe-S cluster containing hydro-lyases by superoxide. *Journal of Biological Chemistry* 268: 22369-22376.
76. **Franklin FC, Bagdasarian M, Bagdasarian MM y Timmis K.** (1981) Molecular and functional analysis of the TOL plasmid pWWO from *Pseudomonas putida* and cloning of genes for the entire regulated aromatic ring meta cleavage pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* **78**: 7458 - 7462.
77. **Freeman BC, Chen C y Beattie GA.** (2010) Identification of the trehalose biosynthetic loci of *Pseudomonas syringae* and their contribution to fitness in the phyllosphere. *Environ Microbiol.* **12**(6):1486-97.
78. **Frerichs-Deeken U y Fetzner S.** (2005) Dioxygenases without requirement for cofactors: identification of amino acid residues involved in substrate binding and catalysis, and testing for rate-limiting steps in the reaction of 1H-3-hydroxy-4-oxoquinoline 2,4-dioxygenase. *Curr Microbiol* **51**: 344-352.
79. **Fuchs G.** (2008) Anaerobic metabolism of aromatic compounds. *Ann N Y Acad Sci.* **1125**: 82-99.
80. **Fuchs G, Boll M y Heider J.** (2011) Microbial degradation of aromatic compounds - from one strategy to four. *Nat Rev Microbiol.* **9**: 803-16.
81. **Fuge EK y Farr SB.** (1993) AppppA-binding protein E89 is the *Escherichia coli* heat shock protein ClpB. *J Bacteriol.* **175**(8):2321-6.
82. **Furukawa K.** (2000) Biochemical and genetic bases of microbial degradation of polychlorinated biphenyls (PCBs). *J Gen Appl Microbiol* **46**: 283-296.
83. **Gerhardt P, Morroy RGE, Woody WA y Krieg NR.** (1994) Methods for general and molecular bacteriology. Washington DC: American Society for Microbiology.
84. **Gescher J, Eisenreich W, Wörth J, Bacher A y Fuchs G.** (2005) Aerobic benzoyl-CoA catabolic pathway in *Azoarcus evansii*: studies on the non-oxygenolytic ring cleavage enzyme. *Molecular Microbiology* **56**: 1586-1600.
85. **Gescher J, Ismail W, Olgeschlager E, Eisenreich W, Worth J y Fuchs G.** (2006) Aerobic Benzoyl-Coenzyme A (CoA) Catabolic Pathway in *Azoarcus evansii*: Conversion of Ring Cleavage Product by 3,4-Dehydrodipyl-CoA Semialdehyde Dehydrogenase. *J. Bacteriol.* **188**: 2919-2927.
86. **Gibson D y Parales R.** (2000) Aromatic hydrocarbon dioxygenases in environmental biotechnology. *Current Opinion in Biotechnology* **11**: 236-243.

87. **Gibson J y Harwood SC.** (2002) Metabolic diversity in aromatic compound utilization by anaerobic microbes. *Annual Review of Microbiology* **56**: 345-369.
88. **Giuffrida MG, Pessione E, Mazzoli R, Dellavalle G, Barello C, Conti A y Giunta C.** (2001) Media containing aromatic compounds induce peculiar proteins in *Acinetobacter radioresistens*, as revealed by proteome analysis. *Electrophoresis*. **22**(9):1705-11.
89. **Goodman AL, Kulasekara B, Rietsch A, Boyd D, Smith RS y Lory S.** (2004) A signaling network reciprocally regulates genes associated with acute infection and chronic persistence in *Pseudomonas aeruginosa*. *Dev Cell*. **7**(5):745-54.
90. **Goodman AL, Merighi M, Hyodo M, Ventre I, Filloux A y Lory S** (2009) Direct interaction between sensor kinase proteins mediates acute and chronic disease phenotypes in a bacterial pathogen. *Genes y Development* **23**: 249-259.
91. **Görke B y Stülke J.** (2008). Carbon catabolite repression in bacteria: many ways to make the most out of nutrients. *Nat Rev Microbiol*. **6**:613-24.
92. **Graf N y Altenbuchner J.** (2014) Genetic engineering of *Pseudomonas putida* KT2440 for rapid and high-yield production of vanillin from ferulic acid. *Appl Microbiol Biotechnol*. **98**(1):137-49.
93. **Haddock JD y Ferry JG.** (1989) Purification and properties of phloroglucinol reductase from *Eubacterium oxidoreducens* G-41. *J Biol Chem* **264**: 4423-4427.
94. **Hall T.** (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp*. **41**:95-98.
95. **Halliwell B y Gutteridge JM.** (1984) Lipid peroxidation, oxygen radicals, cell damage, and antioxidant therapy. *Lancet*. **1**(8391):1396-7.
96. **Hansen S, Lewis K y Vulić M.** (2008) Role of global regulators and nucleotide metabolism in antibiotic tolerance in *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother*. **52**(8):2718-26.
97. **Harayama S y Timmis K.** (1992) Aerobic biodegradation of aromatic hydrocarbons by bacteria. In *Metal ions in biological systems*. Sigel, H. y Sigel, A. (eds). New York: Marcel Dekker.
98. **Harayama S y Timmis KN.** (1989) Catabolism of aromatic hydrocarbons by *Pseudomonas*. In *Genetics of bacterial diversity*. Hopwood, D.A. (ed). N.Y.: Academic Press Inc, pp. 151-174.

99. **Harwood CS, Nichols NN, Kim MK, Ditty JL y Parales RE.** (1994) Identification of the *pcaRKF* gene cluster from *Pseudomonas putida*: involvement in chemotaxis, biodegradation, and transport of 4-hydroxybenzoate. *J Bacteriol.* **176**:6479-88.
100. **Harwood CS y Parales RE.** (1996) The β -keto adipate pathway and the biology of self-identity. *Annual Review of Microbiology* **50**: 553-590.
101. **Harwood CS, Burchhardt H, Herrmann H y Fuchs G.** (1998) Anaerobic metabolism of aromatic compounds via the benzoyl-CoA pathway. *FEMS Microbiol Rev* **22**: 439-458.
102. **Hassan KA, Johnson A, Shaffer BT, Ren Q, Kidarsa TA, Elbourne LDH, Hartney S, Duboy R, Goebel NC, Zabriskie TM, Paulsen IT y Loper JE** (2010) Inactivation of the GacA response regulator in *Pseudomonas fluorescens* Pf-5 has far-reaching transcriptomic consequences. *Environmental Microbiology* **12**: 899-915.
103. **Heeb S, Blumer C y Haas D.** (2002) Regulatory RNA as Mediator in GacA/RsmA-Dependent Global Control of Exoproduct Formation in *Pseudomonas fluorescens* CHA0. *J Bacteriol.* **184**(4): 1046–1056.
104. **Heeb S, Valverde C, Gigot-Bonnefoy C y Haas D.** (2005) Role of the stress sigma factor RpoS in GacA/RsmA-controlled secondary metabolism and resistance to oxidative stress in *Pseudomonas fluorescens* CHA0. *FEMS Microbiol Lett.* **243**(1):251-8.
105. **Heider J y Fuchs G.** (1997) Anaerobic Metabolism of Aromatic Compounds. *European Journal of Biochemistry* **243**: 577-596.
106. **Heider J, Boll M, Breese K, Breinig S, Ebenau-Jehle C, Feil U, Gad'on N, Laempe D, Leuthner B, Mohamed ME, Schneider S, Burchhardt G y Fuchs G.** (1998) Differential induction of enzymes involved in anaerobic metabolism of aromatic compounds in the denitrifying bacterium *Thauera aromatica*. *Arch Microbiol* **170**: 120-131.
107. **Hengge-Aronis R.** (2002) Signal transduction and regulatory mechanisms involved in control of the sigma(S) (RpoS) subunit of RNA polymerase. *Microbiol Mol Biol Rev.* **66**(3):373-95.
108. **Henle ES y Linn S.** (1997) Formation, prevention, and repair of DNA damage by iron/hydrogen peroxide. *J Biol Chem.* **272**(31):19095-8.

109. **Hernández-Arranz S, Moreno R y Rojo F.** (2013) The translational repressor Crc controls the *Pseudomonas putida* benzoate and alkane catabolic pathways using a multi-tier regulation strategy. *Environmental Microbiology* **15**: 227-241
110. **Herrera MC, Duque E, Rodríguez-Herva JJ, Fernández-Escamilla AM y Ramos JL** (2010) Identification and characterization of the PhhR regulon in *Pseudomonas putida*. *Environmental Microbiology* **12**: 1427-1438
111. **Herrera MC, Daddaoua A, Fernández-Escamilla A y Ramos JL.** (2012) Involvement of the global Crp regulator in cyclic AMP-dependent utilization of aromatic amino acids by *Pseudomonas putida*. *J Bacteriol.* **194**:406-12.
112. **Hintner JP, Lechner C, Riegert U, Kuhm AE, Storm T, Reemtsma T y Stolz A** (2001) Direct Ring Fission of Salicylate by a Salicylate 1,2-Dioxygenase Activity from *Pseudaminobacter salicylatoxidans*. *J. Bacteriol.* **183**: 6936-6942.
113. **Ishihama A** (2000) Functional modulation of *Escherichia coli* RNA Polymerase. *Annual Review of Microbiology* **54**: 499-518
114. **Ishiyama D, Vujaklija D y Davies J.** (2004) Novel Pathway of Salicylate Degradation by *Streptomyces* sp. Strain WA46. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**: 1297-1306.
115. **Ismail W, Mohamed MES, Wanner BL, Datsenko KA., Eisenreich W, Rohdich F, Bacher A y Fuchs G** (2003) Functional genomics by NMR spectroscopy. Phenylacetate catabolism in *Escherichia coli*. *European Journal of Biochemistry* **270**: 3047-3054.
116. **Iwabuchi T y Harayama S.** (1998) Biochemical and Molecular Characterization of 1-Hydroxy-2-naphthoate Dioxygenase from *Nocardioides* sp. KP7. *J. Biol. Chem.* **273**: 8332-8336.
117. **Jang S y Imlay JA.** (2007) Micromolar Intracellular Hydrogen Peroxide Disrupts Metabolism by Damaging Iron-Sulfur Enzymes. *Journal of Biological Chemistry* **282**: 929-937.
118. **Jiménez JI, Miñambres B, García JL y Díaz E.** (2002) Genomic analysis of the aromatic catabolic pathways from *Pseudomonas putida* KT2440. *Environmental Microbiology* **4**: 824 - 841.
119. **Jiménez JI, Miñambres B, García JL y Díaz E.** (2004) Genomic insights in the metabolism of aromatic compounds in *Pseudomonas*. In *Pseudomonas*.

- Ramos, J.L. (ed). New York: Kluwer Academic / Plenum Publishers, pp. 425-462.
120. **Jiménez JI, Canales Á, Jiménez-Barbero J, Ginalski K, Rychlewski L, García JL y Díaz E.** (2008) Deciphering the genetic determinants for aerobic nicotinic acid degradation: The nic cluster from *Pseudomonas putida* KT2440. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **105**: 11329-11334.
121. **Jiménez JI, Nogales J, García JL y Díaz E.** (2010) A Genomic View of the Catabolism of Aromatic Compounds in *Pseudomonas*. In Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology, Timmis K (ed), **91**, pp 1297-1325. Springer Berlin Heidelberg.
122. **Jimenez PN, Koch G, Thompson JA, Xavier KB, Cool RH y Quax WJ.** (2012) The multiple signaling systems regulating virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiol Mol Biol Rev.* **76**:46-65.
123. **Johnstone DB y Farr SB.** (1991) AppppA binds to several proteins in *Escherichia coli*, including the heat shock and oxidative stress proteins DnaK, GroEL, E89, C45 and C40. *EMBO J.* **10**(12):3897-904.
124. **Kamimura N, Aoyama T, Yoshida R, Takahashi K, Kasai D, Abe T, Mase K, Katayama Y, Fukuda M, Masai E.** (2010) Characterization of the protocatechuate 4,5-cleavage pathway operon in *Comamonas* sp. strain E6 and discovery of a novel pathway gene. *Appl Environ Microbiol.* **76**:8093-101.
125. **Kang BR, Cho BH, Anderson AJ y Kim YC.** (2004) The global regulator GacS of a biocontrol bacterium *Pseudomonas chlororaphis* O6 regulates transcription from the rpoS gene encoding a stationary-phase sigma factor and affects survival in oxidative stress. *Gene* **325**: 137-143
126. **Kang Y, Lunin VV, Skarina T, Savchenko A, Schurr MJ y Hoang TT.** (2009) The long-chain fatty acid sensor, PsrA, modulates the expression of rpoS and the type III secretion exsCEBA operon in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol.* **73**(1):120-36.
127. **Kay E, Dubuis C y Haas D** (2005) Three small RNAs jointly ensure secondary metabolism and biocontrol in *Pseudomonas fluorescens* CHA0. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**: 17136-17141
128. **Keyer K y Imlay JA.** (1996) Superoxide accelerates DNA damage by elevating free-iron levels. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **93**(24):13635-40.

129. **Kim YH, Cho K, Yun SH, Kim JY, Kwon KH, Yoo JS y Kim SI.** (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.
130. **Kim J, Yeom J, Jeon CO, Park W.** (2009) Intracellular 2-keto-3-deoxy-6-phosphogluconate is the signal for carbon catabolite repression of phenylacetic acid metabolism in *Pseudomonas putida* KT2440. *Microbiology*. **155**:2420-8.
131. **Kluge CA, Tschech y Fuchs G.** (1990) Anaerobic metabolism of resorcylic acids (mdihydroxybenzoic acids) and resorcinol (1,3-benzenediol) in a fermenting and a denitrifying bacterium. *Arch Microbiol* **155**: 68-74.
132. **Kojic M, Aguilar C y Venturi V.** (2002) TetR family member psrA directly binds the *Pseudomonas* rpoS and psrA promoters. *J Bacteriol*. **184**(8):2324-30.
133. **Kojic M y Venturi V.** (2001) Regulation of rpoS gene expression in *Pseudomonas*: involvement of a TetR family regulator. *J Bacteriol*. **183**(12):3712-20.
134. **Kovach ME, Elzer PH, Hill DS, Roberson GT, Farris MA, Roop RM y Peterson KM.** (1995) Four new derivatives of the broad-host-range cloning vector pBBR1MCS, carrying different antibiotic-resistance cassettes. *Gene* **166**: 175-176.
135. **Krasteva PV, Giglio KM y Sondermann H.** (2012) Sensing the messenger: the diverse ways that bacteria signal through c-di-GMP. *Protein Sci*. **21**:929-48.
136. **Kunishima N, Asada Y, Sugahara M, Ishijima J, Nodake Y, Sugahara M, Miyano M, Kuramitsu S, Yokoyama S y Sugahara M.** (2005) A novel induced-fit reaction mechanism of asymmetric hot dog thioesterase PaaI. *J Mol Biol* **352**: 212-228.
137. **Lamont IL y Martin LW.** (2003) Identification and characterization of novel pyoverdine synthesis genes in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology*. **149**(Pt 4):833-42.
138. **Lapouge K, Schubert M, Allain FHT y Haas D.** (2008) Gac/Rsm signal transduction pathway of γ -proteobacteria: from RNA recognition to regulation of social behaviour. *Molecular Microbiology* **67**: 241-253
139. **Laurie AD, Bernardo LMD, Sze CC, Skarfstad E, Szalewska-Palasz A, Nystrom T y Shingler V.** (2003) The Role of the Alarmone (p)ppGpp in

- sigma N Competition for Core RNA Polymerase. *J. Biol. Chem.* **278**: 1494-1503.
140. **Law A y Boulanger MJ.** (2003) Defining a structural and kinetic rationale for paralogous copies of phenylacetate-CoA ligases from the cystic fibrosis pathogen *Burkholderia cenocepacia* J2315. *J Biol Chem.* **286**:15577-85.
141. **Leichert LI, Scharf C y Hecker M.** (2003) Global characterization of disulfide stress in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol.* **185**(6):1967-75.
142. **Lévêque F, Plateau P, Dessen P y Blanquet S.** (1990) Homology of lysS and lysU, the two *Escherichia coli* genes encoding distinct lysyl-tRNA synthetase species. *Nucleic Acids Res.* **18**(2): 305–312.
143. **Liu MY, Gui G, Wei B, Preston JF 3rd, Oakford L, Yüksel U, Giedroc DP y Romeo T.** (1997) The RNA molecule CsrB binds to the global regulatory protein CsrA and antagonizes its activity in *Escherichia coli*. *J Biol Chem.* **272**(28):17502-10.
144. **Luengo JM, García JL y Olivera ER.** (2001) The phenylacetyl-CoA catabolon: a complex catabolic unit with broad biotechnological applications. *Mol Microbiol* **39**:1434-42.
145. **Luengo JM, García B, Sandoval A, Naharro G y Olivera ER.** (2003) Bioplastics from microorganisms. *Curr. Opin. Microbiol.* **6**:251-260.
146. **Majdalani N, Vanderpool CK y Gottesman S.** (2005) Bacterial small RNA regulators. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* **40**(2):93-113. Review.
147. **Martínková L, Uhnáková B, Pátek M, Nesvera J y Kren V.** (2009) Biodegradation potential of the genus *Rhodococcus*. *Environ Int* **35**:162-77.
148. **Martins dos Santos VA, Heim S, Moore ER, Stratz M y Timmis KN.** (2004) Insights into the genomic basis of niche specificity of *Pseudomonas putida* KT2440. *Environ Microbiol* **6**:1264–1286.
149. **Mason CA, Dünner J, Indra P y Colangelo T.** (1999) Heat-induced expression and chemically induced expression of the *Escherichia coli* stress protein HtpG are affected by the growth environment. *Appl Environ Microbiol.* **65**(8):3433-40.
150. **Matilla MA, Espinosa-Urgel M, Rodríguez-Herva JJ, Ramos JL y Ramos-González MI.** (2007) Genomic analysis reveals the major driving forces of bacterial life in the rhizosphere. *Genome Biol* 8: Issue 9, Article R179.

151. **Matilla MA, Travieso ML, Ramos JL y Ramos-González MI.** (2011) Cyclic diguanylate turnover mediated by the sole GGDEF/EAL response regulator in *Pseudomonas putida*: its role in the rhizosphere and an analysis of its target processes. *Environ Microbiol.* **13**(7):1745-66.
152. **Matthijs S, Laus G, Meyer JM, Abbaspour-Tehrani K, Schäfer M, Budzikiewicz H y Cornelis P.** (2009) Siderophore-mediated iron acquisition in the entomopathogenic bacterium *Pseudomonas entomophila* L48 and its close relative *Pseudomonas putida* KT2440. *Biometals.* **22**(6):951-64.
153. **McCloskey D, Palsson BØ y Feist AM.** (2013) Basic and applied uses of genome-scale metabolic network reconstructions of *Escherichia coli*. *Mol Syst Biol.* 2013;9:661. doi: 10.1038/msb.2013.18.
154. **MacGregor CH, Arora SK, Hager PW, Dail MB y Phibbs PV.** (1996) The nucleotide sequence of the *Pseudomonas aeruginosa* pyrE-crc-rph region and the purification of the crc gene product. *Journal of Bacteriology* **178**: 5627-5635.
155. **McIntyre H, Davies H, Hore T, Miller S, Dufour JPy Ronson C.** (2007) Trehalose Biosynthesis in *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* and Its Role in Desiccation Tolerance. *Appl Environ Microbiol.* **73**(12): 3984–3992.
156. **Mechulam Y, Fromant M, Mellot P, Plateau P, Blanchin-Roland S, Fayat G y Blanquet S.** (1985) Molecular cloning of the *Escherichia coli* gene for diadenosine 5',5''-P₁,P₄-tetrphosphate pyrophosphohydrolase. *J Bacteriol.* **164**:63-9.
157. **Meyer JM.** (2000) Pyoverdines: pigments, siderophores and potential taxonomic markers of fluorescent *Pseudomonas* species. *Arch Microbiol.* **174**(3):135-42.
158. **Milojevic T, Grishkovskaya I, Sonnleitner E, Djinovic-Carugo K y Bläsi U** (2013) The *Pseudomonas aeruginosa* Catabolite Repression Control Protein Crc Is Devoid of RNA Binding Activity. *PLoS ONE* **8**: e64609
159. **Mohamed M, Ismail W, Heider J y Fuchs G.** (2002) Aerobic metabolism of phenylacetic acids in *Azoarcus evansii*. *Arch Microbiol* **178**: 180-192.
160. **Molofsky AB y Swanson MS.** (2004) Differentiate to thrive: lessons from the *Legionella pneumophila* life cycle. *Mol Microbiol.* **53**(1):29-40. Review.

161. **Moll I, Afonyushkin T, Vytvytska O, Kaberdin VR y Bläsi U.** (2003) Coincident Hfq binding and RNase E cleavage sites on mRNA and small regulatory RNAs. *RNA* **9**: 1308-1314.
162. **Monds RD, Newell PD, Schwartzman JA y O'Toole GA.** (2006) Conservation of the Pho regulon in *Pseudomonas fluorescens* Pf0-1. *Appl Environ Microbiol.* **72**(3):1910-24.
163. **Monds RD, Newell PD, Wagner JC, Schwartzman JA, Lu W, Rabinowitz JD y O'Toole GA.** (2010) Di-adenosine tetraphosphate (Ap₄A) metabolism impacts biofilm formation by *Pseudomonas fluorescens* via modulation of c-di-GMP-dependent pathways. *J Bacteriol.* **192**(12):3011-23.
164. **Moon CD, Zhang XX, Matthijs S, Schäfer M, Budzikiewicz H y Rainey PB.** (2008) Genomic, genetic and structural analysis of pyoverdine-mediated iron acquisition in the plant growth-promoting bacterium *Pseudomonas fluorescens* SBW25. *BMC Microbiol.* doi: 10.1186/1471-2180-8-7.
165. **Morasch B, Schink B, Tebbe CC y Meckenstock RU.** (2004) Degradation of o-xylene and m-xylene by a novel sulfate-reducer belonging to the genus *Desulfotomaculum*. *Arch Microbiol* **181**: 407-417.
166. **Moreno-Ruiz E, Hernáez MJ, Martínez-Pérez O y Santero E.** (2003) Identification and functional characterization of *Sphingomonas macrogolitabida* strain TFA genes involved in the first two steps of the tetralin catabolic pathway. *J Bacteriol* **185**: 2026-2030.
167. **Moreno R, Ruiz-Manzano A, Yuste L, Rojo F.** (2007) The *Pseudomonas putida* Crc global regulator is an RNA binding protein that inhibits translation of the AlkS transcriptional regulator. *Mol Microbiol.* **64**:665-75.
168. **Moreno R y Rojo F.** (2008) The Target for the *Pseudomonas putida* Crc Global Regulator in the Benzoate Degradation Pathway Is the BenR Transcriptional Regulator. *J Bacteriol* **190**: 1539-1545.
169. **Moreno R, Fonseca P y Rojo F.** (2012) Two small RNAs, CrcY and CrcZ, act in concert to sequester the Crc global regulator in *Pseudomonas putida*, modulating catabolite repression. *Mol Microbiol.* **83**(1):24-40.
170. **Murray HD, Schneider DA y Gourse RL.** (2003) Control of rRNA expression by small molecules is dynamic and nonredundant. *Mol Cell.* **12**(1):125-34.

171. **Müller C, Petruschka L, Cuypers H, Burchhardt G y Herrmann H.** (1996) Carbon catabolite repression of phenol degradation in *Pseudomonas putida* is mediated by the inhibition of the activator protein PhlR. *J Bacteriol* **178**: 2030-2036.
172. **Navarro-Llorens JM, Patrauchan MA, Stewart GR, Davies JE, Eltis LD y Mohn WW.** (2005) Phenylacetate Catabolism in *Rhodococcus* sp. Strain RHA1: a Central Pathway for Degradation of Aromatic Compounds. *J. Bacteriol.* **187**: 4497-4504.
173. **Navarro-Llorens JM, Drzyzga O y Perera J.** (2008) Genetic analysis of phenylacetic acid catabolism in *Arthrobacter oxydans* CECT386. *Arch Microbiol* **190**: 89-100.
174. **Navarro-Llorens JM, Tormo A y Martínez-García E.** (2010) Stationary phase in gram-negative bacteria. *FEMS Microbiology Reviews.* **34**(4): 476–495.
175. **Navia R y Seeger M.** (2006) Biorremediación de Suelos Contaminados con Compuestos Orgánicos Persistentes (COPs), Vol. 1, 225 páginas, Editorial U. La Frontera, Temuco.
176. **Nelson KE, Weinel C, Paulsen IT, Dodson RJ, Hilbert H, Martins dos Santos VAP, Fouts DE, Gill SR, Pop M, Holmes M, Brinkac L, Beanan M, DeBoy RT, Daugherty S, Kolonay J, Madupu R, Nelson W, White O, Peterson J, Khouri H, Hance I, Chris-Lee P, Holtzapple E, Scanlan D, Tran K, Moazzez A, Utterback T, Rizzo M, Lee K, Kosack D, Moestl D, Wedler H, Lauber J, Stjepandic D, Hoheisel J, Straetz M, Heim S, Kiewitz C, Eisen J, Timmis KN, Düsterhöft A, Tümmeler B y Fraser CM.** (2002) Complete genome sequence and comparative analysis of the metabolically versatile *Pseudomonas putida* KT2440. *Environmental Microbiology* **4**: 799-808.
177. **Nichols NN y Harwood CS.** (1995) Repression of 4-hydroxybenzoate transport and degradation by benzoate: a new layer of regulatory control in the *Pseudomonas putida* beta- ketoacid pathway. *J Bacteriol* **177**: 7033-7040.
178. **Nichols NN, Harwood CS.** (1997) PcaK, a high-affinity permease for the aromatic compounds 4-hydroxybenzoate and protocatechuate from *Pseudomonas putida*. *J Bacteriol.* **179**(16):5056-61.

179. Nilsson M, Chiang WC, Fazli M, Gjermansen M, Givskov M, Tolker-Nielsen T. (2011) Influence of putative exopolysaccharide genes on *Pseudomonas putida* KT2440 biofilm stability. *Environ Microbiol.* **13**(5):1357-69.
180. Nogales J, Macchi R, Franchi F, Barzagli D, Fernández C, García JL, Bertoni G y Díaz E. (2007) Characterization of the last step of the aerobic phenylacetic acid degradation pathway. *Microbiology* **153**: 357-365.
181. Nogales J, Palsson B O y Thiele I. (2008) A genome-scale metabolic reconstruction of *Pseudomonas putida* KT2440: iJN746 as a cell factory. *BMC Syst Biol* **2**:79.
182. Nogales Enrique Juan. (2009). Caracterización de la ruta de degradación de ácido gálico en *Pseudomonas putida*. *Tesis Doctoral Universidad Complutense de Madrid*.
183. Nogales J, Canales A, Jiménez-Barbero J, Serra B, Pingarrón JM, García JL y Díaz E. (2011) Unravelling the gallic acid degradation pathway in bacteria: the gal cluster from *Pseudomonas putida*. *Mol Microbiol.* **79**(2):359-74.
184. O'Leary ND, O'Connor KE, Duetz W y Dobson ADW. (2001) Transcriptional regulation of styrene degradation in *Pseudomonas putida* CA-3. *Microbiology* **147**: 973-979.
185. Olivera ER, Miñambres B, García B, Muñiz C, Moreno MA, Ferrández A, Díaz E, García JL y Luengo JM. (1998) Molecular characterization of the phenylacetic acid catabolic pathway in *Pseudomonas putida* U: The phenylacetyl-CoA catabolon. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**: 6419-6424.
186. Ohtsubo Y, Goto H, Nagata Y, Kudo T y Tsuda M. (2006) Identification of a response regulator gene for catabolite control from a PCB-degrading beta-proteobacteria, *Acidovorax* sp. KKS102. *Molecular Microbiology* **60**: 1563-1575.
187. Orth JD, Thiele I y Palsson BO (2010) What is flux balance analysis? *Nat Biotech* **28**: 245-248
188. Österberg S, del Peso-Santos T y Shingler V. (2011) Regulation of alternative sigma factor use. *Annu Rev Microbiol.* **65**:37-55.

189. **O'Toole GA y Kolter R.** (1998) Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Mol Microbiol.* **30**(2):295-304.
190. **Park SH, Oh KH y Kim CK.** (2001) Adaptive and cross-protective responses of *Pseudomonas* sp. DJ-12 to several aromatics and other stress shocks. *Curr Microbiol.* **43**(3):176-81.
191. **Park YH, Lee BR, Seok YJ y Peterkofsky A.** (2006) In vitro reconstitution of catabolite repression in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **281**: 6448–6454.
192. **Peters F, Rother M y Boll M.** (2004) Selenocysteine-Containing Proteins in Anaerobic Benzoate Metabolism of *Desulfococcus multivorans*. *J Bacteriol* **186**: 2156-2163.
193. **Petruschka L, Burchhardt G, Müller C, Weihe C y Herrmann H** (2001) The cyo operon of *Pseudomonas putida* is involved in carbon catabolite repression of phenol degradation. *Mol Genet Genomics* **266**: 199-206
194. **Pfluger, K. y de Lorenzo, V.** (2008) Evidence of In Vivo Cross Talk between the Nitrogen-Related and Fructose-Related Branches of the Carbohydrate Phosphotransferase System of *Pseudomonas putida*. *J. Bacteriol.* **190**: 3374-3380.
195. **Phale PS, Basu A, Majhi PD, Deveryshetty J, Vamsee-Krishna C y Shrivastava R.** (2007) Metabolic Diversity in Bacterial Degradation of Aromatic Compounds. *OMICS: A Journal of Integrative Biology.* **11**: 252-279.
196. **Philp J C, Bamforth S M, Singleton I y Atlas R M.** (2005) Environmental pollution and restoration: a role for bioremediation. En *Biorremediation. Athlas*, R. M. y Philp, J. (eds). ASM press, Washington, D. C., pp. 1-48.
197. **Pieper D y Reineke W.** (2000) Engineering bacteria for bioremediation. *Curr Opin Biotechnol* **11**: 262-270.
198. **Plateau P y Blanquet S.** (1994) Dinucleoside oligophosphates in microorganisms. *Adv Microb Physiol.* **36**:81-109.
199. **Potrykus K, Vinella D, Murphy H, Szalewska-Palasz A, D'Ari R y Cashel M.** (2006) Antagonistic Regulation of *Escherichia coli* Ribosomal RNA rrnB P1 Promoter Activity by GreA and DksA. *Journal of Biological Chemistry* **281**: 15238-15248

200. **Prasad J, McJarrow P y Gopal P** (2003) Heat and osmotic stress responses of probiotic *Lactobacillus rhamnosus* HN001 (DR20) in relation to viability after drying. *Appl Environ Microbiol.* **69**(2):917-25.
201. **Prieto MA, Galán B, Torres B, Ferrández A, Fernández C, Miñambres B, García J y Díaz E.** (2004) Aromatic metabolism versus carbon availability: the regulatory network that controls catabolism of less-preferred carbon sources in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Rev* **28**: 503-518.
202. **Prieto MA, de Eugenio LI, Galán B, Luengo JM y Witholt B.** (2007) Synthesis and degradation of polyhydroxyalkanoates, p. 397-428. In Ramos, J.L. y Filloux, A. (ed.), *Pseudomonas: a model system in biology*, vol. V. Springer, Berlin, Germany.
203. **Puchalka J, Oberhardt MA, Godinho M, Bielecka A, Regenhardt D, Timmis KN, Papin JA y Martins dos Santos VA.** (2008) Genome-scale reconstruction and analysis of the *Pseudomonas putida* KT2440 metabolic network facilitates applications in biotechnology. *PLoS Comput. Biol.* **4**:e1000210.
204. **Ramos J, Díaz E, Dowling D, de Lorenzo V, Molin S, O'Gara F, Ramos C y Timmis K.** (1994) The behavior of bacteria designed for biodegradation. *Biotechnology (N Y)* **12**: 1349-1356.
205. **Ramos-González MI y Molin S.** (1998) Cloning, sequencing, and phenotypic characterization of the *rpoS* gene from *Pseudomonas putida* KT2440. *J Bacteriol.* **180**(13):3421-31.
206. **Rampioni G, Leoni L, Pietrangeli B y Zennaro.** (2008) The interplay of StyR and IHF regulates substrate-dependent induction and carbon catabolite repression of styrene catabolism genes in *Pseudomonas fluorescens* ST. *BMC Microbiol* **8**:92.
207. **Rather LJ, Bill E, Ismail W y Fuchs G.** (2011a) The reducing component BoxA of benzoyl-coenzyme A epoxidase from *Azoarcus evansii* is a [4Fe-4S] protein. *Biochim Biophys Acta.* **1814**:1609-1615.
208. **Rather LJ, Weinert T, Demmer U, Bill E, Ismail W, Fuchs G y Ermler U.** (2011b) Structure and mechanism of the diiron benzoyl-coenzyme A epoxidase BoxB. *J Biol Chem.* **286**:29241-29248.
209. **Ravel J y Cornelis P.** (2003) Genomics of pyoverdine-mediated iron uptake in pseudomonads. *Trends Microbiol.* **11**(5):195-200.

210. **Robles-González IV, Fava F y Poggi-Varaldo HM.** (2008) A review on slurry bioreactors for bioremediation of soils and sediments. *Microb Cell Fact* 7:5.
211. **Romeo T.** (1998) Global regulation by the small RNA-binding protein CsrA and the non-coding RNA molecule CsrB. *Mol Microbiol.* **29**(6):1321-30.
212. **Romero-Steiner S, Parales RE, Harwood CS y Houghton JE.** (1994) Characterization of the *pcaR* regulatory gene from *Pseudomonas putida*, which is required for the complete degradation of p-hydroxybenzoate. *J Bacteriol.* **176**(18):5771-9.
213. **Römling U, Galperinb M y Gomelskyc M.** (2013). Cyclic di-GMP: the First 25 Years of a Universal Bacterial Second Messenger. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* March **77**: 1-52
214. **Rojo F y Dinamarca A.** (2004) Catabolite repression and physiological control. In *Pseudomonas*. Ramos, J.L. (ed). New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers.
215. **Rojo F.** (2010) Carbon catabolite repression in *Pseudomonas*: optimizing metabolic versatility and interactions with the environment. *FEMS Microbiol Rev* **34**(5):658-84.
216. **Rosen R y Ron EZ.** (2002) Proteome analysis in the study of the bacterial heat-shock response. *Mass Spectrom Rev.* **21**(4):244-65.
217. **Sakamoto K, Agari Y, Kuramitsu S, Shinkai A.** (2011) Phenylacetyl coenzyme A is an effector molecule of the TetR family transcriptional repressor PaaR from *Thermus thermophilus* HB8. *J Bacteriol.* **193**:4388-95
218. **Sambrook J, Fritsch EF y Maniatis T.** (1989) Molecular cloning. A Laboratory Manual (2^a ed.), Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
219. **Sambrook J y Russell DW.** (2001) *Molecular Cloning: A laboratory manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
220. **Sarniguet A, Kraus J, Henkels M, Muehlchen AM y Loper JE.** (1995) The sigma factor sigma s affects antibiotic production and biological control activity of *Pseudomonas fluorescens* Pf-5. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **92**(26): 12255–12259.

221. **Santos PM, Blatny JM, Di Bartolo I, Valla S, Zennaro E.** (2000) Physiological analysis of the expression of the styrene degradation gene cluster in *Pseudomonas fluorescens* ST. *Appl Environ Microbiol* **66**:1305-10.
222. **Santos PM, Benndorf D y Sá-Correia I.** (2004) Insights into *Pseudomonas putida* KT2440 response to phenol-induced stress by quantitative proteomics. *Proteomics*. **4**(9):2640-52.
223. **Schäfer A, Tauch A, Jager W, LKalinowski J, Thierbach G y Puhler A.** (1994) Small mobilizable multi-purpose cloning vectors derived from the *Escherichia coli* plasmids pK18 and pK19: selection of defined deletions in the chromosome of *Corynebacterium glutamicum*. *Gene* **145**: 69-73.
224. **Schellenberger J, Que R, Fleming RM, Thiele I, Orth JD, Feist AM, Zielinski DC, Bordbar A, Lewis NE, Rahmanian S, Kang J, Hyduke DR y Palsson BØ.** (2011) Quantitative prediction of cellular metabolism with constraint-based models: the COBRA Toolbox v2.0. *Nat Protoc*. **6**(9):1290-307
225. **Schmid A, Dordick JS, Hauer B, Kiener A, Wubbolts M y Witholt B.** (2001) Industrial biocatalysis today and tomorrow. *Nature* **409**:258-268.
226. **Schink B y Friedrich M.** (2000) Bacterial metabolism: Phosphite oxidation by sulphate reduction. *Nature* **406**: 37.
227. **Schleissner C, Olivera E R, Fernández-Valverde M y Luengo J M.** (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**: 7667-7676.
228. **Schuetz R, Zamboni N, Zampieri M, Heinemann M y Sauer U** (2012) Multidimensional Optimality of Microbial Metabolism. *Science* **336**: 601-604.
229. **Schuhle K, Jahn M, Ghisla S y Fuchs G.** (2001) Two Similar Gene Clusters Coding for Enzymes of a New Type of Aerobic 2-Aminobenzoate (Anthranilate) Metabolism in the Bacterium *Azoarcus evansii*. *J. Bacteriol.* **183**: 5268-5278.
230. **Schuster M, Hawkins AC, Harwood CS y Greenberg EP.** (2004) The *Pseudomonas aeruginosa* RpoS regulon and its relationship to quorum sensing. *Molecular Microbiology* **51**: 973-985

231. **Scott JC, Greenhut IV y Leveau JH.** (2013) Functional characterization of the bacterial *iac* genes for degradation of the plant hormone indole-3-acetic acid. *J Chem Ecol.* **39**(7):942-51.
232. **Sikkema J, de Bont JA y Poolman B.** (1995) Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. *Microbiol Rev.* **59**: 201-222.
233. **Silby MW, Winstanley C, Godfrey SA, Levy SB, y Jackson RW.** (2011) *Pseudomonas* genomes: diverse and adaptable. *FEMS Microbiol. Rev.* **35**:652-680.
234. **Singer MA, Lindquist S.** (1998) Thermotolerance in *Saccharomyces cerevisiae*: the Yin and Yang of trehalose. *Trends Biotechnol.* **16**(11):460-8. Review.
235. **Sledjeski DD, Whitman C y Zhang A.** (2001) Hfq Is Necessary for Regulation by the Untranslated RNA DsrA. *Journal of Bacteriology* **183**: 1997-2005
236. **Sobrero P y Valverde C.** (2012) The bacterial protein Hfq: much more than a mere RNA-binding factor. *Critical Reviews in Microbiology* **38**: 276-299.
237. **Song F, Zhuang Z, Finci L, Dunaway-Mariano D, Kniewel R, Buglino JA, Solorzano V, Wu J y Lima CD.** (2006) Structure, Function, and Mechanism of the Phenylacetate Pathway Hot Dog-fold Thioesterase PaaI. *J. Biol. Chem.* **281**: 11028-11038.
238. **Sonnleitner E y Haas D.** (2011) Small RNAs as regulators of primary and secondary metabolism in *Pseudomonas* species. *Appl Microbiol Biotechnol.* **91**(1):63-79.
239. **Sonnleitner E, Hagens S, Rosenau F, Wilhelm S, Habel A, Jäger KE y Bläsi U.** (2003) Reduced virulence of a *hfq* mutant of *Pseudomonas aeruginosa* O1. *Microb Pathog.* **35**(5):217-28.
240. **Spormann A y Widdel F.** (2000) Metabolism of alkylbenzenes, alkanes, and other hydrocarbons in anaerobic bacteria. *Biodegradation* **11**: 85-105.
241. **Stainer RY y Ingraham JL.** (1954) Protocatechuic acid oxidase. *J Biol Chem* **210**:799-808.
242. **Starkey M, Hickman J, Ma L, Zhang N, De Long S, Hinz A, Palacios S, Manoi CI, Kirisits MJ, Starner T, Wozniak D, Harwood C, y Parsek M.** (2009). *Pseudomonas aeruginosa* rugose small-colony variants have

- adaptations that likely promote persistence in the cystic fibrosis lung. *J. Bacteriol.* **191**:3492–3503.
243. **Stepanova E, Lee J, Ozerova M, Semenova E, Datsenko K, Wanner BL, Severinov K y Borukhov S** (2007) Analysis of Promoter Targets for Escherichia coli Transcription Elongation Factor GreA In Vivo and In Vitro. *Journal of Bacteriology* **189**: 8772-8785.
244. **Soper T, Mandin P, Majdalani N, Gottesman S y Woodson SA.** (2010) Positive regulation by small RNAs and the role of Hfq. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* **107**: 9602-9607.
245. **Sorger-Domenigg T, Sonnleitner E, Kaberdin VR y Bläsi U.** (2007) Distinct and overlapping binding sites of Pseudomonas aeruginosa Hfq and RsmA proteins on the non-coding RNA RsmY. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* **352**: 769-773.
246. **Stockwell VO y Loper JE** (2005) The sigma factor RpoS is required for stress tolerance and environmental fitness of Pseudomonas fluorescens Pf-5. *Microbiology* **151**: 3001-3009
247. **Suh S-J, Silo-Suh L, Woods DE, Hassett DJ, West SEH y Ohman DE** (1999) Effect of rpoS Mutation on the Stress Response and Expression of Virulence Factors in Pseudomonas aeruginosa. *Journal of Bacteriology* **181**: 3890-3897.
248. **Takenaka S, Murakami S, Shinke R, Hatakeyama K, Yukawa H y Aoki K.** (1997) Novel Genes Encoding 2-Aminophenol 1,6-Dioxygenase from Pseudomonas sp. AP-3 Growing on 2-Aminophenol and Catalytic Properties of the Purified Enzyme. *J. Biol. Chem.* **272**: 14727-14732.
249. **Takeuchi K, Kiefer P, Reimmann C, Keel C, Dubuis C, Rolli J, Vorholt JA y Haas D** (2009) Small RNA-dependent Expression of Secondary Metabolism Is Controlled by Krebs Cycle Function in Pseudomonas fluorescens. *Journal of Biological Chemistry* **284**: 34976-34985.
250. **Tanner JA, Wright M, Christie EM, Preuss MK y Miller AD.** (2006) Investigation into the interactions between diadenosine 5',5'''-P1,P4-tetraphosphate and two proteins: molecular chaperone GroEL and cAMP receptor protein. *Biochemistry.* **45**(9):3095-106.
251. **Tarassova K, Tegova R, Tover A, Teras R, Tark M, Saumaa S y Kivisaar M** (2009) Elevated Mutation Frequency in Surviving Populations of Carbon-

- Starved rpoS-Deficient *Pseudomonas putida* Is Caused by Reduced Expression of Superoxide Dismutase and Catalase. *Journal of Bacteriology* **191**: 3604-3614
252. **Teufel R, Mascaraque V, Ismail W, Voss M, Perera J, Eisenreich W, Haehnel W y Fuchs G.** (2010) Bacterial phenylalanine and phenylacetate catabolic pathway revealed. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **107**(32):14390-14395.
253. **Teufel R, Gantert C, Voss M, Eisenreich W, Haehnel W y Fuchs G.** (2011) Studies on the mechanism of ring hydrolysis in phenylacetate degradation: a metabolic branching point. *J Biol Chem.* **286**: 11021-11034.
254. **Teufel, R, Friedrich T y Fuchs G.** (2012) An oxygenase that forms and deoxygenates toxic epoxide. *Nature* **483**:359–362.
255. **Thompson J, Higgins D, y Gibson T.** (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* **22**(22): 4673–4680.
256. **Timmis KN y Pieper DH.** (1999). Bacteria designed for bioremediation. *Trends in Biotechnology* **17**: 201-204.
257. **Timmis, K. N.** (2002). *Pseudomonas putida*: a cosmopolitan opportunist par excellence. *Environ. Microbiol.* **4**:779-781.
258. **Trautwein K, Grundmann O, Wöhlbrand L, Eberlein C, Boll M y Rabus R.** (2012). Benzoate Mediates Repression of C4-Dicarboxylate Utilization in “*Aromatoleum aromaticum*” EbN1. *J Bacteriol.* **194**: 518–528.
259. **Tropel D y van der Meer JR.** (2004) Bacterial Transcriptional Regulators for Degradation Pathways of Aromatic Compounds. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **68**: 474-500.
260. **Ueda Y, Yumoto N, Tokushige M, Fukui K, Ohya-Nishiguchi H.** (1991) Purification and characterization of two types of fumarase from *Escherichia coli*. *J Biochem.* **109**(5):728-33.
261. **Vaillancourt F, Bolin JT y Eltis LD.** (2004) Ring-cleavage dioxygenases. In *Pseudomonas*. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers, pp. 359-395.
262. **Vaillancourt FH, Bolin JT y Eltis LD.** (2006) The Ins and Outs of Ring-Cleaving Dioxygenases. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* **41**: 241-267.

263. **Valderrama JA, Shingler V, Carmona M y Diaz E.** (2013) AccR is a master regulator involved in carbon catabolite repression of the anaerobic catabolism of aromatic compounds in *Azoarcus* sp. *CIB. J Biol Chem.* 2013 Dec 3. [*Epub ahead of print*]
264. **van Duuren JB, Puchalka J, Mars AE, Bücker R, Eggink G, Wittmann C, Dos Santos VA.** (2013) Reconciling in vivo and in silico key biological parameters of *Pseudomonas putida* KT2440 during growth on glucose under carbon-limited condition. *BMC Biotechnol.* 2013 Oct 29;13:93. doi: 10.1186/1472-6750-13-93.
265. **Varma A y Palsson BO.** (1994) Stoichiometric flux balance models quantitatively predict growth and metabolic by-product secretion in wild-type *Escherichia coli* W3110. *Appl Environ Microbiol.* **60**(10):3724-31.
266. **Velázquez F, de Lorenzo V, Valls M** (2006) The m-xylene biodegradation capacity of *Pseudomonas putida* mt-2 is submitted to adaptation to abiotic stresses: evidence from expression profiling of xyl genes. *Environ Microbiol.* **8**:591-602.
267. **Venturi V** (2003) Control of rpoS transcription in *Escherichia coli* and *Pseudomonas*: why so different? *Molecular Microbiology* **49**: 1-9.
268. **Vinella D, Potrykus K, Murphy H y Cashel M.** (2012) Effects on Growth by Changes of the Balance between GreA, GreB, and DksA Suggest Mutual Competition and Functional Redundancy in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* **194**: 261-273.
269. **Walsh UF, Morrissey JP, y O'Gara F.** (2001). *Pseudomonas* for biocontrol of phytopathogens: from functional genomics to commercial exploitation. *Curr Opin. Biotechnol.* **12**:289-295.
270. **Weber H, Polen T, Heuveling J, Wendisch VF y Hengge R** (2005) Genome-Wide Analysis of the General Stress Response Network in *Escherichia coli*: σ S-Dependent Genes, Promoters, and Sigma Factor Selectivity. *Journal of Bacteriology* **187**: 1591-1603.
271. **Weilbacher T, Suzuki K, Dubey AK, Wang X, Gudapaty S, Morozov I, Baker CS, Georgellis D, Babitzke P y Romeo T.** (2003) A novel sRNA component of the carbon storage regulatory system of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol.* **48**(3):657-70.

272. **Whistler CA, Corbell NA, Sarniguet A, Ream W y Loper JE.** (1998) The two-component regulators GacS and GacA influence accumulation of the stationary-phase sigma factor sigmaS and the stress response in *Pseudomonas fluorescens* Pf-5. *J Bacteriol.* **180**(24):6635-41.
273. **Widdel F y Rabus R.** (2001) Anaerobic biodegradation of saturated and aromatic hydrocarbons. *Curr Opin Biotechnol* **12**: 259-276.
274. **Wilson, I.G.** (1997) Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. *Appl. Environ. Microbiol.* **63** (10), 3741–3751.
275. **Winsor GL, Van Rossum T, Lo R, Khaira B, Whiteside MD, Hancock RE y Brinkman FS.** (2009) *Pseudomonas* Genome Database: facilitating user-friendly, comprehensive comparisons of microbial genomes. *Nucleic Acids Res.* (Database issue):D483-8.
276. **Wirth R, Friesenegger A y Fiedler S.** (1989) Transformation of various species of gram-negative bacteria belonging to 11 different genera by electroporation. *Mol Gen Genet* **216**: 175-177.
277. **Woods SA, Schwartzbach SD y Guest JR** (1988) Two biochemically distinct classes of fumarase in *Escherichia coli*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology* **954**: 14-26
278. **Wu X, Monchy S, Taghavi S, Zhu W, Ramos JL y van der Lelie D.** (2011) Comparative genomics and functional analysis of niche-specific adaptation in *Pseudomonas putida*. *FEMS Microbiol. Rev.* **35**:299-323.
279. **Yamada T, Shimomura Y, Hiraoka Y y Kimbara K.** (2006) Oxidative stress by biphenyl metabolites induces inhibition of bacterial cell separation. *Appl Microbiol Biotechnol* **73**: 452-457.
280. **Yanisch-Perron C, Vieira J y Messing J.** (1985) Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene.* **33**(1):103-19.
281. **Yuste L, Hervás AB, Canosa I, Tobes R, Jiménez JI, Nogales J, Pérez-Pérez MM, Santero E, Díaz E, Ramos JL, de Lorenzo V y Rojo F.** (2006). Growth-phase dependent expression of the *Pseudomonas putida* KT2440 transcriptional machinery analyzed with a genome-wide DNA microarray. *Environ Microbiol* **8**: 165–177.

282. **Zaar, A., Eisenreich, W., Bacher, A. y Fuchs, G.** (2001) A Novel Pathway of Aerobic Benzoate Catabolism in the Bacteria *Azoarcus evansii* and *Bacillus stearothermophilus*. *J. Biol. Chem.* **276**: 24997-25004.
283. **Zaar, A., Gescher, J., Eisenreich, W., Bacher, A. y Fuchs, G.** (2004) New enzymes involved in aerobic benzoate metabolism in *Azoarcus evansii*. *Molecular Microbiology* **54**: 223-238.

IX. Material Suplementario.

Tabla S1

Número de acceso PP_	Anotación funcional	pI	Masa teórica (Da)	Expresión	pValue
PP_0006	yidC gene product	8,80	61880	1,88	1,62E-02
PP_0011	dnaN gene product	5,16	40693	1,01	4,65E-01
PP_0013	gyrB gene product	5,64	89975	-1,85	1,74E-02
PP_0017	transcriptional regulator MvaT, P16 subunit	6,61	13484	1,07	4,33E-01
PP_0018	hypothetical protein	5,72	31216	-1,17	1,48E-01
PP_0060	glyS gene product	5,12	75066	-1,25	8,07E-03
PP_0061	glyQ gene product	5,00	36001	-1,11	4,26E-01
PP_0068	def gene product	5,26	19398	1,23	3,42E-01
PP_0072	qor-1 gene product	7,70	34203	1,51	6,25E-04
PP_0074	aroE gene product	5,24	29271	1,09	3,98E-01
PP_0082	trpA gene product	5,17	28465	-2,12	3,41E-02
PP_0083	trpB gene product	5,94	44018	-1,05	3,10E-01
PP_0085	hypothetical protein	9,58	18200	4,50	1,06E-03
PP_0086	hypothetical protein	6,97	7954	1,63	2,32E-02
PP_0089	osmC gene product	6,11	14567	7,00	5,82E-04
PP_0096	prlC gene product	5,20	75674	1,86	1,10E-02
PP_0100	cynT gene product	6,29	25984	1,05	4,19E-01
PP_0112	metal ABC transporter substrate-binding protein	6,92	27694	2,83	2,05E-03
PP_0115	katE gene product	6,21	78057	39,67	3,24E-05
PP_0123	polA gene product	5,24	99546	-1,05	4,43E-01
PP_0153	hypothetical protein	11,11	8249	3,00	9,45E-02
PP_0167	toxin secretion ATP-binding protein	7,24	78534	2,00	7,92E-02
PP_0168	surface adhesion protein	4,12	887687	3,15	1,76E-02
PP_0183	glutathione S-transferase	5,57	24423	1,13	3,91E-01
PP_0184	argH gene product	5,41	52028	1,15	3,09E-01
PP_0186	hemC gene product	5,27	33420	-1,58	6,60E-02
PP_0194	algP gene product	10,53	32281	1,22	2,00E-01
PP_0202	hypothetical protein	6,84	16038	1,86	1,46E-01
PP_0213	gabD gene product	5,42	51517	1,26	1,31E-02
PP_0214	gabT gene product	5,85	44796	1,25	5,76E-02
PP_0227	cystine transporter subunit	7,69	28738	1,76	1,43E-01
PP_0234	oprE gene product	5,43	48287	1,15	3,05E-01
PP_0235	lsfA gene product	5,68	23933	2,33	8,50E-02
PP_0245	S1 RNA-binding domain-containing protein	8,57	94246	-2,33	1,98E-01
PP_0246	ompR gene product	5,87	27475	1,00	5,00E-01
PP_0258	LysM domain/BON superfamily protein	5,44	15606	2,57	2,90E-02
PP_0268	oprQ gene product	5,80	47758	-1,44	4,46E-02
PP_0282	amino acid ABC transporter substrate-binding protein	5,46	27851	1,00	5,00E-01
PP_0287	AsmA family protein	5,80	80228	2,23	7,41E-02

PP_0289	hisB gene product	5,91	23405	-1,59	9,72E-03
PP_0292	hisA gene product	5,15	25890	-1,40	2,90E-01
PP_0296	glycine/betaine ABC transporter substrate-binding protein	6,22	34547	1,67	2,25E-01
PP_0321	threonine aldolase	5,44	38044	-1,38	4,15E-02
PP_0336	msrA gene product	4,92	24549	1,38	5,00E-02
PP_0338	aceF gene product	5,42	55620	1,44	6,46E-02
PP_0339	aceE gene product	5,56	99269	2,08	2,15E-03
PP_0340	glnE gene product	5,40	109365	1,75	1,84E-01
PP_0356	glcB gene product	5,64	78298	-2,63	4,50E-05
PP_0357	ACT domain-containing protein	4,77	19011	4,40	2,62E-02
PP_0362	bioB gene product	5,53	38925	-3,59	1,18E-02
PP_0364	bioH gene product	5,03	26327	2,00	1,24E-01
PP_0366	bioD gene product	5,42	23857	2,13	4,47E-02
PP_0368	acyl-CoA dehydrogenase	5,62	65499	1,50	3,09E-02
PP_0387	rpoD gene product	4,92	69353	1,51	1,09E-01
PP_0389	rpsU gene product	10,79	8365	-1,11	4,09E-01
PP_0397	serine protein kinase PrkA	5,74	73737	2,64	9,57E-04
PP_0403	surA gene product	5,40	49052	-3,67	6,33E-03
PP_0420	trpG gene product	5,82	21663	1,27	2,08E-01
PP_0422	trpC gene product	4,95	30414	1,06	4,37E-01
PP_0425	OsmC family protein	5,95	15133	1,00	5,00E-01
PP_0428	histidine triad (HIT) protein	5,80	12720	-1,04	4,66E-01
PP_0432	argC gene product	6,30	36255	-1,23	2,16E-01
PP_0433	iron-sulfur cluster insertion protein ErpA	4,57	14392	-1,33	2,81E-01
PP_0436	tyrS gene product	5,59	44260	-1,40	1,47E-01
PP_0440	tuf gene product	5,22	43468	-1,29	7,24E-02
PP_0442	nusG gene product	6,00	20035	-1,20	1,73E-01
PP_0443	rplK gene product	9,81	14857	-1,01	4,65E-01
PP_0444	rplA gene product	9,50	24236	-1,59	7,49E-05
PP_0445	rplJ gene product	9,43	17676	-1,25	1,70E-01
PP_0446	rplL gene product	4,74	12592	-1,32	1,65E-01
PP_0447	rpoB gene product	5,57	150898	1,33	5,69E-02
PP_0448	rpoC gene product	6,80	154701	1,49	1,82E-02
PP_0449	rpsL gene product	11,14	13718	-1,40	1,74E-01
PP_0450	rpsG gene product	10,15	17567	-1,73	2,41E-02
PP_0451	fusA gene product	5,13	78768	-1,23	4,54E-02
PP_0452	tuf gene product	5,22	43451	1,12	1,95E-01
PP_0453	rpsJ gene product	9,77	11745	-1,57	6,00E-02
PP_0454	rplC gene product	9,94	22589	-1,72	8,92E-03
PP_0455	rplD gene product	9,73	21798	-1,89	1,39E-02
PP_0456	rplW gene product	9,87	10893	-1,15	3,62E-01
PP_0457	rplB gene product	11,14	29651	-1,92	2,20E-03
PP_0458	rpsS gene product	10,62	10342	-1,38	1,91E-01
PP_0459	rplV gene product	10,12	11904	-1,30	7,04E-02
PP_0460	rpsC gene product	10,05	25709	-2,55	9,29E-04
PP_0461	rplP gene product	11,35	15364	-1,57	1,01E-01

PP_0462	rpmC gene product	10,61	7168	-1,19	3,17E-01
PP_0463	rpsQ gene product	9,81	10052	-1,29	7,99E-02
PP_0464	rplN gene product	10,94	13401	-1,49	1,10E-01
PP_0465	rplX gene product	10,05	11322	-1,86	6,55E-02
PP_0466	rplE gene product	9,69	20316	-1,65	4,28E-02
PP_0467	rpsN gene product	11,77	11396	-1,96	1,29E-02
PP_0468	rpsH gene product	9,63	13966	-1,48	1,14E-01
PP_0469	rplF gene product	9,73	19131	-1,68	2,74E-03
PP_0470	rplR gene product	10,19	12620	-1,06	4,28E-01
PP_0471	rpsE gene product	10,00	17655	-1,40	2,71E-02
PP_0472	rpmD gene product	10,01	6447	-1,06	4,13E-01
PP_0473	rplO gene product	10,77	15180	-1,56	2,87E-03
PP_0474	secY gene product	9,90	47822	-1,89	1,06E-02
PP_0476	rpsM gene product	10,67	13248	-1,44	1,18E-01
PP_0477	rpsK gene product	10,83	13651	-1,46	3,88E-03
PP_0478	rpsD gene product	9,98	23042	-2,15	3,22E-04
PP_0479	rpoA gene product	4,91	36607	-1,84	3,45E-03
PP_0480	rplQ gene product	10,60	14354	-1,41	1,17E-01
PP_0482	bacterioferritin	4,80	17961	4,38	7,07E-02
PP_0483	uvrA gene product	6,50	104314	2,00	6,89E-02
PP_0485	ssb gene product	5,88	20047	-1,54	7,48E-02
PP_0504	oprG gene product	4,95	24181	-1,17	4,26E-01
PP_0510	trx-1 gene product	4,87	31802	-1,11	3,46E-01
PP_0516	ribBA-1 gene product	5,13	39194	-1,73	5,28E-02
PP_0517	ribH gene product	5,39	16410	-1,07	3,73E-01
PP_0538	ppa gene product	4,77	19177	1,28	1,62E-01
PP_0541	acetyltransferase	6,84	17748	2,12	4,28E-02
PP_0545	aldehyde dehydrogenase	5,70	55233	1,34	1,11E-01
PP_0558	accC-1 gene product	6,09	49057	1,07	3,31E-01
PP_0559	accB gene product	4,95	16175	-1,29	2,16E-01
PP_0560	aroQ-1 gene product	6,34	16481	1,39	2,10E-01
PP_0564	hypothetical protein	6,25	40199	1,75	5,62E-02
PP_0570	alpha-2-macroglobulin	5,37	178364	7,29	3,88E-03
PP_0574	LuxR family transcriptional regulator	5,28	29022	-1,20	3,22E-01
PP_0587	hypothetical protein	7,76	13818	1,50	2,87E-01
PP_0592	short chain dehydrogenase	5,71	24612	3,22	3,75E-03
PP_0596	beta alanine--pyruvate transaminase	6,28	48499	-2,33	8,50E-02
PP_0600	rpsT gene product	10,75	10063	-1,42	3,78E-02
PP_0603	ileS gene product	5,72	105734	1,43	4,71E-02
PP_0625	clpB gene product	5,38	94803	1,58	1,23E-03
PP_0626	ndh gene product	8,79	47051	1,36	2,24E-01
PP_0671	glyA gene product	5,85	44869	1,11	1,06E-01
PP_0674	ABC transporter ATP-binding protein	5,40	61823	1,12	1,97E-01
PP_0675	gdhA gene product	6,12	48839	-1,67	1,23E-02
PP_0680	ATP-dependent protease	4,80	89622	-1,21	2,32E-01
PP_0684	fklB-1 gene product	4,64	21665	-1,57	2,11E-01

PP_0687	ispB gene product	5,09	35247	1,00	5,00E-01
PP_0688	rplU gene product	9,99	11624	-1,56	1,33E-01
PP_0689	rpmA gene product	10,33	9335	-1,57	1,31E-01
PP_0693	hypothetical protein	5,26	106492	-1,17	3,84E-01
PP_0707	mechanosensitive ion channel protein MscS	9,52	92067	2,20	1,61E-02
PP_0711	isochorismatase superfamily hydrolase	5,43	23012	3,33	8,50E-03
PP_0721	50S ribosomal protein L25	6,00	23228	-1,80	1,08E-02
PP_0722	prsA gene product	5,70	34171	-2,27	9,96E-04
PP_0737	hypothetical protein	4,73	19012	3,29	2,69E-02
PP_0746	upp gene product	6,53	22985	1,00	5,00E-01
PP_0749	hypothetical protein	9,64	17241	2,33	1,24E-01
PP_0750	hypothetical protein	4,86	11847	-2,25	2,31E-01
PP_0751	mgo-1 gene product	8,19	54248	-1,50	4,65E-03
PP_0753	lipoprotein	9,20	20471	1,21	1,93E-01
PP_0759	hypothetical protein	6,44	29724	1,29	3,04E-01
PP_0763	long-chain-fatty-acid--CoA ligase	5,47	62086	2,68	6,94E-04
PP_0765	hypothetical protein	5,18	67895	-1,02	4,76E-01
PP_0766	hypothetical protein	9,17	50541	1,25	9,99E-02
PP_0773	OmpA/MotB domain-containing protein	9,24	24738	2,20	1,25E-01
PP_0774	pta gene product	5,36	74596	2,00	8,50E-02
PP_0776	slyD gene product	4,52	17195	-1,44	6,74E-02
PP_0786	trxB gene product	5,22	33820	1,45	3,00E-02
PP_0787	nadC gene product	5,36	30145	-1,44	3,23E-02
PP_0804	protein secretion ABC efflux system, permease and ATP-binding protein	8,96	79509	8,67	3,76E-02
PP_0806	surface adhesion protein	3,67	615314	3,44	1,16E-02
PP_0812	cyoA gene product	6,24	34535	-1,20	2,05E-01
PP_0813	cyoB gene product	7,33	74342	2,57	8,44E-02
PP_0817	aminotransferase	7,73	44968	-1,68	1,11E-03
PP_0824	phosphonate ABC transporter substrate-binding protein	8,35	31085	1,45	1,03E-01
PP_0834	yajC gene product	8,96	11894	1,64	6,22E-02
PP_0835	secD gene product	9,09	66872	1,31	1,76E-01
PP_0836	secF gene product	5,05	32738	4,33	6,98E-03
PP_0838	suhB gene product	6,19	29735	-3,63	4,66E-04
PP_0841	BadM/Rrf2 family transcriptional regulator	7,01	17845	1,00	5,00E-01
PP_0842	iscS gene product	5,85	44441	-1,06	2,85E-01
PP_0843	iscU gene product	5,41	13847	1,20	3,39E-01
PP_0844	iscA gene product	4,72	11632	1,25	2,90E-01
PP_0846	hscA gene product	4,92	65848	-1,12	1,47E-01
PP_0848	hypothetical protein	4,33	7518	-1,80	2,75E-01
PP_0849	ndk gene product	5,45	15035	1,17	2,64E-01
PP_0854	hisS gene product	5,29	47709	1,11	3,84E-01
PP_0855	hypothetical protein	4,82	22501	-1,75	9,65E-02
PP_0886	hypothetical protein	7,74	25618	5,67	1,09E-02
PP_0888	Fis family transcriptional regulator	5,15	20762	1,60	1,74E-01
PP_0893	Pfpi family intracellular protease	5,44	21058	1,85	6,47E-02

PP_0897	Fe-S type, tartrate/fumarate subfamily hydro-lyase subunit alpha	5,14	54732	-1,38	5,94E-02
PP_0901	colR gene product	5,81	25473	1,00	5,00E-01
PP_0909	hypothetical protein	6,02	38357	1,00	5,00E-01
PP_0913	hypothetical protein	4,61	46990	-1,47	3,51E-02
PP_0915	sodB gene product	5,55	21925	1,25	1,88E-01
PP_0925	hypothetical protein	5,71	31390	1,80	4,90E-02
PP_0930	gatB gene product	5,06	52645	1,37	7,12E-02
PP_0931	gatA gene product	5,89	51486	1,28	2,44E-01
PP_0933	mreB gene product	5,32	36936	-1,20	2,19E-01
PP_0950	ptsN gene product	5,07	16762	-1,20	3,62E-01
PP_0951	rpoX gene product	6,41	11494	-3,10	7,86E-02
PP_0953	ABC transporter ATP-binding protein	6,51	26563	1,29	3,04E-01
PP_0956	YrbI family phosphatase	5,59	18855	4,20	1,65E-02
PP_0957	KpsF/GutQ family protein	5,47	34376	1,25	2,68E-01
PP_0960	ttg2C gene product	4,79	16943	1,00	5,00E-01
PP_0964	murA gene product	5,35	44944	1,09	3,38E-01
PP_0965	hisG gene product	7,82	22924	1,23	2,70E-01
PP_0975	hupN gene product	9,40	9667	1,00	5,00E-01
PP_0977	valS gene product	5,30	107429	1,10	2,37E-01
PP_0980	pepA gene product	7,00	52400	1,16	1,19E-01
PP_0985	cold-shock domain-contain protein	9,98	18574	-1,16	3,13E-01
PP_0986	gcvT-1 gene product	5,96	40294	-1,40	1,34E-01
PP_0988	gcvP-1 gene product	5,68	101927	-4,67	5,02E-02
PP_0999	arcC gene product	5,63	33403	3,57	9,95E-03
PP_1000	argI gene product	5,92	37887	2,09	1,12E-02
PP_1001	arcA gene product	5,57	46433	3,87	1,57E-03
PP_1025	leuA gene product	5,26	61674	-1,74	2,92E-03
PP_1031	guaB gene product	6,50	51733	1,28	3,31E-02
PP_1032	guaA gene product	5,30	58168	1,12	2,45E-01
PP_1037	purL gene product	4,95	140730	2,12	1,04E-03
PP_1068	amino acid ABC transporter ATP-binding protein	8,24	28130	-2,44	3,50E-02
PP_1070	polar amino acid ABC transporter inner membrane subunit	7,70	27447	-1,22	3,91E-01
PP_1071	amino acid ABC transporter substrate-binding protein	8,61	33407	-2,03	1,46E-03
PP_1079	argF gene product	5,53	34411	-2,44	1,00E-02
PP_1081	glutaredoxin-like protein	4,88	12115	1,26	3,15E-01
PP_1082	bfr gene product	4,74	17960	2,89	1,56E-02
PP_1084	anti-oxidant AhpCTSA family protein	5,06	21716	1,30	8,86E-02
PP_1088	argG gene product	5,31	45136	-1,72	5,16E-03
PP_1097	metG gene product	5,51	75139	1,45	8,31E-02
PP_1098	ATP-binding Mrp/Nbp35 family protein	5,03	38183	-1,67	3,34E-02
PP_1099	cold-shock domain-contain protein	6,54	7635	-2,18	1,75E-01
PP_1100	dcd gene product	5,50	21220	1,40	1,44E-01
PP_1108	acylase	8,50	88674	2,33	8,50E-02
PP_1111	synthetase	5,68	29388	-3,50	1,80E-03

PP_1113	pyridoxal-phosphate dependent enzyme family protein	7,14	32576	-2,00	1,20E-01
PP_1121	OmpA/MotB domain-containing protein	5,16	24069	1,50	1,03E-02
PP_1131	hypothetical protein	9,03	15672	1,16	3,33E-01
PP_1141	braC gene product	6,02	39377	-1,33	6,59E-02
PP_1145	hepA gene product	5,06	105929	1,21	3,68E-01
PP_1157	acetolactate synthase	5,75	60021	1,51	3,82E-02
PP_1177	nrdB gene product	4,81	46959	-1,46	2,31E-02
PP_1179	nrdA gene product	5,61	106882	-1,10	2,29E-01
PP_1185	oprH gene product	6,27	21488	-1,15	2,20E-01
PP_1190	hypothetical protein	9,30	17582	1,13	4,07E-01
PP_1205	proS gene product	5,19	63584	1,53	1,05E-01
PP_1206	oprD gene product	4,84	46092	-1,01	4,32E-01
PP_1207	histidine triad (HIT) protein	5,06	15588	-1,12	4,34E-01
PP_1210	DNA-binding stress protein	5,20	17850	1,88	5,06E-02
PP_1213	aspS gene product	5,34	66526	-1,17	4,78E-02
PP_1219	tolQ gene product	5,98	25294	1,27	1,84E-01
PP_1222	tolB gene product	9,44	47401	-1,12	3,49E-01
PP_1223	oprL gene product	5,16	17822	1,04	3,84E-01
PP_1237	dapA gene product	5,73	31634	-1,67	3,09E-02
PP_1240	purC gene product	5,37	26899	-1,51	2,30E-02
PP_1246	hypothetical protein	5,84	65911	1,67	1,44E-01
PP_1249	hypothetical protein	9,18	6709	1,05	4,50E-01
PP_1251	mgo-2 gene product	6,11	59867	5,67	2,13E-03
PP_1261	2-hydroxyacid dehydrogenase	6,93	34897	1,07	4,45E-01
PP_1269	universal stress protein	5,11	15961	1,80	1,71E-01
PP_1291	PhoH family protein	5,53	51824	3,62	6,29E-04
PP_1297	aapJ gene product	5,84	36402	3,57	2,04E-02
PP_1303	cysD gene product	6,29	35262	-2,00	4,82E-02
PP_1304	cysNC gene product	5,51	69006	-1,34	8,05E-02
PP_1309	hypothetical protein	5,86	16008	1,33	1,17E-01
PP_1314	aldo/keto reductase	6,08	38753	-1,25	2,90E-01
PP_1315	rplM gene product	9,70	15852	-2,25	1,51E-03
PP_1316	rpsI gene product	11,20	14583	-1,60	2,86E-03
PP_1322	transport-associated protein	9,33	20667	1,88	1,17E-01
PP_1323	gmhA gene product	4,89	21005	-3,00	1,38E-01
PP_1325	LppC family lipoprotein	6,98	64598	-1,12	2,34E-01
PP_1332	murE gene product	5,33	53570	1,46	1,40E-01
PP_1333	murF gene product	6,16	46721	4,00	4,21E-03
PP_1338	murC gene product	5,94	52133	1,40	2,59E-01
PP_1339	ddl gene product	4,89	34110	3,75	3,60E-03
PP_1341	ftsA gene product	5,13	47414	1,19	2,33E-01
PP_1342	ftsZ gene product	4,98	41804	1,08	1,87E-01
PP_1343	lpxC gene product	5,06	33248	-1,19	1,48E-01
PP_1345	secA gene product	5,59	102804	1,17	1,28E-01
PP_1346	argJ gene product	5,22	42210	1,11	3,58E-01
PP_1347	glutathione S-transferase	5,39	23233	-1,12	3,42E-01

PP_1352	nucleotide-binding protein	6,65	18550	1,00	5,00E-01
PP_1358	hypothetical protein	7,31	31986	1,27	2,08E-01
PP_1360	groES gene product	5,40	10217	-1,50	1,38E-01
PP_1361	groEL gene product	4,97	56708	-1,51	5,78E-04
PP_1362	pykA gene product	6,22	52025	1,77	5,69E-03
PP_1366	transcriptional regulator MvaT, P16 subunit	9,40	14176	-1,08	3,40E-01
PP_1367	purU gene product	6,09	32355	1,67	6,99E-02
PP_1384	ttgC gene product	5,29	52832	2,50	7,36E-02
PP_1385	ttgB gene product	5,49	112764	4,50	2,39E-02
PP_1389	carboxyphosphoenolpyruvate phosphonmutase	5,18	31763	-1,56	6,59E-02
PP_1400	metabolite/H+ symporter major facilitator superfamily metabolite/H+ symporter	9,18	47604	2,20	1,05E-01
PP_1424	hypothetical protein	4,59	10256	-1,40	3,39E-01
PP_1430	algY gene product	6,22	52584	1,36	7,02E-02
PP_1431	lepA gene product	5,51	66075	-2,20	7,24E-02
PP_1433	rnc gene product	5,46	25481	-1,83	1,73E-01
PP_1436	pdxJ gene product	5,85	26721	-1,07	3,91E-01
PP_1443	lon-1 gene product	6,02	89739	1,27	2,34E-01
PP_1444	gcd gene product	5,76	86527	2,45	3,56E-02
PP_1457	purT gene product	5,61	42549	1,05	4,31E-01
PP_1462	rpsP gene product	10,94	9183	-1,62	5,13E-02
PP_1465	rplS gene product	10,27	13004	-1,40	6,51E-02
PP_1470	hom gene product	5,26	46165	-1,46	3,59E-02
PP_1471	thrC gene product	5,86	51613	-1,60	3,78E-03
PP_1478	NADH:flavin oxidoreductase	5,63	40601	4,44	7,20E-03
PP_1481	gamma-aminobutyraldehyde dehydrogenase	5,55	50886	1,33	2,05E-01
PP_1487	hypothetical protein	6,12	24048	2,42	6,03E-02
PP_1496	lysS gene product	5,23	57102	-1,23	1,68E-01
PP_1502	OmpA/MotB domain-containing protein	9,06	28947	4,37	4,19E-05
PP_1503	hypothetical protein	8,73	16827	4,63	5,29E-03
PP_1505	ppc gene product	6,14	96904	1,05	4,65E-01
PP_1506	adk gene product	5,59	23208	-1,54	3,98E-04
PP_1517	acriflavin resistance protein	6,76	112864	4,00	1,53E-01
PP_1530	2,3,4,5-tetrahydropyridine-2,6-carboxylate N-succinyltransferase	5,53	35836	-1,72	1,19E-02
PP_1588	succinyldiaminopimelate transaminase	5,43	43731	-2,17	2,86E-02
PP_1590	map gene product	6,13	28938	1,25	2,25E-01
PP_1591	rpsB gene product	8,85	27006	-1,82	1,29E-02
PP_1592	tsf gene product	5,14	30413	-1,54	1,32E-02
PP_1593	pyrH gene product	5,87	26467	1,07	4,39E-01
PP_1594	fir gene product	7,88	20140	1,15	3,57E-01
PP_1599	surface antigen family outer membrane protein	4,96	86461	-1,39	2,33E-01
PP_1600	ompH gene product	9,40	18797	1,25	3,22E-01
PP_1602	fabZ gene product	5,91	18397	1,44	1,87E-01
PP_1606	dnaE gene product	5,42	130841	2,50	1,29E-01
PP_1607	accA gene product	5,79	35113	-1,42	3,34E-02
PP_1610	pyrG gene product	5,61	59437	1,00	5,00E-01

PP_1612	eno gene product	4,92	45462	-1,19	1,35E-01
PP_1616	D-isomer specific 2-hydroxyacid dehydrogenase	5,95	39339	-1,09	4,01E-01
PP_1618	ispF gene product	6,28	16806	2,00	5,25E-02
PP_1623	rpoS gene product	5,14	38152	-1,39	3,68E-02
PP_1628	CinA domain-containing protein	5,48	16709	-1,08	4,10E-01
PP_1629	recA gene product	5,50	37521	-1,02	4,67E-01
PP_1638	fpr gene product	5,22	29691	-1,58	3,05E-02
PP_1659	hypothetical protein	5,71	48306	4,00	1,49E-03
PP_1661	dehydrogenase subunit	5,54	80969	13,00	2,21E-03
PP_1665	purM gene product	4,85	36919	1,07	2,15E-01
PP_1702	rdgC gene product	4,87	34262	1,00	5,00E-01
PP_1714	flkB-2 gene product	5,03	26504	-1,49	1,67E-02
PP_1719	prc gene product	6,59	79049	-1,60	1,33E-01
PP_1721	HAD superfamily hydrolase	4,79	24555	-1,50	1,44E-01
PP_1726	ABC transporter substrate-binding protein	5,81	38612	3,40	5,84E-03
PP_1733	minD gene product	5,92	29632	-1,14	2,99E-01
PP_1752	hypothetical protein	7,75	57602	-1,25	3,49E-01
PP_1755	fumC-2 gene product	5,93	49100	4,05	6,62E-04
PP_1756	hypothetical protein	9,52	18961	2,00	1,20E-01
PP_1758	hypothetical protein	5,48	35141	-2,50	1,61E-02
PP_1764	phosphoglycolate phosphatase	4,68	24357	-2,00	7,41E-02
PP_1765	ubiG gene product	5,60	26067	1,10	3,71E-01
PP_1767	gyrA gene product	4,98	101975	1,27	4,46E-02
PP_1768	serC gene product	5,31	39886	-1,80	3,75E-03
PP_1769	pheA gene product	5,99	40791	-1,67	1,45E-01
PP_1770	bifunctional cyclohexadienyl dehydrogenase/ 3-phosphoshikimate 1-carboxyvinyltransferase	5,99	79084	1,32	1,43E-01
PP_1771	cmk gene product	5,12	24676	-1,40	2,90E-01
PP_1772	rpsA gene product	4,82	61518	-1,50	9,93E-04
PP_1776	mannose-6-phosphate isomerase	5,29	52956	1,42	8,77E-02
PP_1780	mannosyltransferase	5,56	179931	7,17	3,14E-04
PP_1782	rmlC gene product	4,94	20209	-1,15	3,35E-01
PP_1783	rmlA gene product	5,09	32497	-1,92	9,78E-03
PP_1785	rmlB gene product	5,76	40664	-1,94	1,36E-02
PP_1786	glycosyl transferase family protein	5,97	128420	2,49	1,31E-03
PP_1791	aldolase	5,61	58497	1,26	2,34E-01
PP_1792	glycosyl transferase family protein	6,01	88251	-5,25	7,24E-04
PP_1794	hypothetical protein	3,68	48686	1,33	3,15E-01
PP_1799	gmd gene product	6,07	40099	-1,31	7,45E-02
PP_1807	kdsA-2 gene product	5,78	30450	1,15	1,84E-01
PP_1808	pgi gene product	6,29	61345	1,63	2,13E-01
PP_1815	pyrF gene product	5,14	24536	-1,14	4,01E-01
PP_1816	zinc-containing alcohol dehydrogenase	6,85	35780	3,14	6,44E-04
PP_1821	glutathione S-transferase	5,52	23193	1,25	3,39E-01
PP_1823	folE gene product	7,73	21374	-1,33	2,81E-01
PP_1826	isochorismatase superfamily hydrolase	7,05	21270	-2,25	2,51E-02
PP_1827	N5-glutamine S-adenosyl-L-methionine-	4,68	34073	-1,20	2,87E-01

	dependent methyltransferase				
PP_1842	amidotransferase	5,05	27299	-2,75	2,15E-02
PP_1845	enoyl-CoA hydratase	7,06	24626	-1,18	1,78E-01
PP_1858	efp gene product	4,73	21290	1,09	2,11E-01
PP_1859	ohr gene product	6,27	14656	2,06	1,32E-02
PP_1868	DEAD/DEAH box helicase	8,94	60888	-1,05	4,18E-01
PP_1872	aminotransferase	5,61	44677	1,00	5,00E-01
PP_1874	glutathione peroxidase	9,30	17938	1,80	1,65E-01
PP_1876	hypothetical protein	8,74	38939	-1,27	1,84E-01
PP_1893	fadE gene product	6,42	89138	4,36	5,49E-03
PP_1894	glutathione S-transferase	5,22	23653	1,17	3,04E-01
PP_1898	MotA/TolQ/ExbB proton channel	6,44	24392	1,57	1,47E-01
PP_1905	rne gene product	5,02	120833	1,37	5,72E-02
PP_1911	rpmF gene product	9,69	6751	-2,15	8,75E-02
PP_1913	fabD gene product	4,98	32594	-1,35	1,28E-01
PP_1914	fabG gene product	5,94	25454	-1,10	2,94E-01
PP_1915	acpP gene product	4,11	8706	-1,10	3,93E-01
PP_1972	tyrB-1 gene product	5,69	43263	1,22	2,62E-01
PP_1977	gltX gene product	5,60	56447	-1,44	2,34E-01
PP_1980	thioesterase	5,91	16597	1,33	3,46E-01
PP_1982	ibpA gene product	5,94	16329	1,40	2,90E-01
PP_1986	leuD gene product	5,36	24269	-2,70	5,06E-03
PP_1987	UbiE/COQ5 family methyltransferase	5,55	28163	-2,67	2,74E-02
PP_1988	leuB gene product	5,03	38800	-1,41	5,72E-02
PP_1989	asd gene product	5,46	40646	-1,93	3,90E-03
PP_1993	peptidoglycan-binding LysM	4,09	96860	12,29	1,07E-04
PP_1996	accD gene product	7,61	32489	-1,68	3,89E-02
PP_2000	purF gene product	6,04	55365	1,14	1,73E-01
PP_2001	metZ gene product	5,45	43257	-1,33	2,81E-01
PP_2002	oxidoreductase	6,16	27195	1,23	3,14E-01
PP_2017	pepN gene product	5,01	99512	1,69	3,59E-02
PP_2019	hypothetical protein	6,14	87676	2,00	1,20E-01
PP_2024	sbcC gene product	5,52	136010	1,40	1,93E-01
PP_2059	CsbD family protein	5,36	8682	5,14	1,33E-03
PP_2080	NAD-glutamate dehydrogenase	5,65	186928	9,23	1,66E-04
PP_2082	ppsA gene product	5,02	85962	-1,27	2,01E-02
PP_2084	menG gene product	4,91	17635	1,27	2,24E-01
PP_2087	cmpX gene product	5,77	29093	1,60	9,20E-02
PP_2089	oprF gene product	4,72	36989	2,08	3,40E-02
PP_2105	hypothetical protein	5,11	11363	2,50	3,81E-02
PP_2112	acnA gene product	5,56	99085	8,21	2,45E-04
PP_2117	pdxB gene product	5,25	41589	1,80	1,03E-01
PP_2121	lipoprotein	5,27	8126	2,50	3,56E-02
PP_2122	moaB-1 gene product	5,87	19054	1,55	1,40E-01
PP_2131	ABC transporter ATP-binding protein	5,29	71354	-2,00	1,20E-01
PP_2132	universal stress protein	6,14	16198	1,02	4,72E-01

PP_2136	fadB gene product	5,81	77401	-1,71	1,69E-02
PP_2137	fadA gene product	6,53	41529	-2,03	5,96E-02
PP_2139	topA gene product	8,13	97178	1,23	3,06E-01
PP_2146	Snf2/Rad54 family helicase	5,81	75186	2,00	1,20E-01
PP_2148	mfd gene product	5,62	128222	3,38	2,89E-02
PP_2149	gap-2 gene product	7,23	52982	-1,22	9,83E-03
PP_2151	sthA gene product	7,22	50874	2,00	2,06E-01
PP_2152	glycerophosphoryl diester phosphodiesterase	7,08	26236	-1,31	4,90E-02
PP_2163	vacJ gene product	5,43	26045	1,10	3,97E-01
PP_2168	tal gene product	5,24	33594	1,56	1,05E-02
PP_2189	hypothetical protein	5,14	15166	1,86	1,14E-01
PP_2217	fadB 1x gene product	5,43	27650	1,09	3,67E-01
PP_2238	peptidase M24	5,37	68872	1,50	2,18E-01
PP_2292	hypothetical protein	5,72	28505	1,57	9,59E-02
PP_2299	tig gene product	4,85	49159	-1,37	2,36E-02
PP_2300	clpP gene product	5,53	23500	-1,57	3,87E-02
PP_2301	clpX gene product	5,07	48496	-1,22	2,75E-02
PP_2302	lon-2 gene product	5,76	88667	-1,60	1,46E-02
PP_2303	hupB gene product	9,40	9244	-1,09	3,73E-01
PP_2304	PpiC-type peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	5,08	68538	-1,55	2,15E-01
PP_2306	lipoprotein	9,18	9991	3,33	6,46E-03
PP_2322	oprI gene product	7,87	8795	1,43	4,45E-02
PP_2324	aroF-1 gene product	5,95	40235	-1,50	1,20E-01
PP_2327	cysB gene product	6,27	35933	2,33	8,50E-02
PP_2334	prpB gene product	5,45	31791	-2,00	1,38E-02
PP_2335	methylcitrate synthase	6,25	41968	-1,94	3,31E-02
PP_2336	aconitate hydratase	5,40	93903	1,00	5,00E-01
PP_2339	acnB gene product	5,18	93551	-1,17	1,16E-02
PP_2355	response regulator receiver protein	4,80	17095	1,00	5,00E-01
PP_2356	phytochrome family protein	5,78	83807	3,33	9,88E-03
PP_2364	hypothetical protein	5,27	42435	-1,84	3,28E-03
PP_2370	hypothetical protein	5,08	19065	-1,91	3,34E-02
PP_2371	cysI gene product	5,61	62153	-1,91	8,53E-03
PP_2375	metH gene product	4,92	135324	3,04	1,28E-04
PP_2378	yhgI gene product	4,49	20942	1,18	4,12E-01
PP_2396	hypothetical protein	7,83	20579	1,86	3,32E-02
PP_2422	alkylhydroperoxidase	6,71	12127	3,00	1,06E-02
PP_2426	D-isomer specific 2-hydroxyacid dehydrogenase	5,66	37757	-9,58	4,04E-03
PP_2432	dihydropteridine reductase	6,45	24197	1,50	1,44E-01
PP_2439	ahpC gene product	4,98	20494	-1,02	4,66E-01
PP_2442	hypothetical protein	5,33	23836	1,71	1,19E-01
PP_2453	ansA gene product	6,99	38584	-3,91	4,49E-03
PP_2463	cspA-2 gene product	6,57	7706	-3,71	7,26E-02
PP_2465	thrS gene product	5,64	72652	-1,26	1,56E-02
PP_2466	infC gene product	9,32	20108	1,03	4,29E-01
PP_2467	rpmI gene product	12,15	7340	-1,31	1,22E-01

PP_2468	rplT gene product	11,60	13272	-1,02	4,64E-01
PP_2470	pheT gene product	5,07	86564	-1,33	2,51E-02
PP_2471	ihfA gene product	9,34	11493	1,08	4,51E-01
PP_2474	glutathione S-transferase	5,76	23778	-1,20	2,87E-01
PP_2528	metY gene product	6,00	45207	1,12	2,94E-01
PP_2536	glutathione S-transferase	6,06	23560	-1,71	2,20E-01
PP_2550	hypothetical protein	4,91	25300	1,18	2,90E-01
PP_2628	ABC transporter ATP-binding protein	9,13	71762	1,71	4,52E-02
PP_2652	hydratase/decarboxylase	6,13	27757	2,60	1,44E-02
PP_2674	qedH gene product	6,52	69130	-1,65	1,43E-01
PP_2680	aldehyde dehydrogenase	5,54	54869	-1,47	2,94E-01
PP_2867	pyridine nucleotide-disulfide oxidoreductase	5,54	42457	1,25	3,11E-01
PP_2903	ppiB gene product	6,07	18189	-1,05	4,20E-01
PP_2904	glnS gene product	5,81	64614	1,83	4,15E-02
PP_2905	cysS gene product	5,64	51644	1,00	5,00E-01
PP_2913	hemB-1 gene product	5,17	35203	1,42	1,95E-02
PP_2925	mgo-3 gene product	7,15	59634	3,00	1,12E-03
PP_2928	saccharopine dehydrogenase	5,17	45335	-2,33	1,98E-01
PP_2932	amidase	4,78	60309	1,08	3,62E-01
PP_2933	glutathione S-transferase	5,73	31183	1,58	7,75E-02
PP_2947	transcriptional regulator MvaT, P16 subunit	9,15	14087	2,60	7,69E-02
PP_3072	ecotin	7,73	17371	-1,38	2,37E-01
PP_3079	ppiC-2 gene product	5,59	9938	1,42	1,87E-01
PP_3089	hypothetical protein	5,42	19441	1,53	7,90E-03
PP_3099	hypothetical protein	5,14	56037	5,43	8,38E-04
PP_3100	hypothetical protein	6,78	21728	6,33	1,30E-03
PP_3106	hypothetical protein	5,54	69486	1,00	5,00E-01
PP_3107	hypothetical protein	5,21	19098	-1,20	3,09E-01
PP_3108	rhs-like protein	5,70	155716	3,00	9,04E-02
PP_3126	polysaccharide export protein	5,15	19515	2,00	1,20E-01
PP_3128	protein-tyrosine kinase	6,59	29604	3,75	2,05E-03
PP_3134	transferase hexapeptide repeat containing protein	9,63	25683	3,67	2,68E-02
PP_3145	hypothetical protein	9,35	29867	1,70	6,74E-02
PP_3154	hypothetical protein	6,07	23959	-1,67	2,55E-01
PP_3157	inositol monophosphatase	4,55	27776	-2,09	3,71E-03
PP_3185	pet18 gene product	5,11	23844	-1,63	8,70E-02
PP_3186	TenA family transcriptional activator	5,05	24285	1,36	2,40E-01
PP_3248	Dyp-type peroxidase	4,82	31276	-2,00	1,62E-01
PP_3270	phaL gene product	6,35	72836	-1,43	1,22E-02
PP_3271	phaK gene product	6,40	46094	-2,05	1,13E-02
PP_3272	actP gene product	9,25	55026	1,45	1,26E-01
PP_3273	hypothetical protein	9,43	11192	-1,29	3,98E-01
PP_3274	phaI gene product	5,30	39455	-1,94	3,23E-03
PP_3276	phenylacetate-CoA oxygenase subunit PaaI	5,30	27843	-1,87	1,55E-03
PP_3277	paaB gene product	5,79	10419	-1,76	1,01E-01
PP_3278	paaA gene product	6,42	37806	-2,79	3,96E-04

PP_3279	phaE gene product	6,03	49495	-2,32	2,59E-03
PP_3280	phaD gene product	6,03	42441	-1,53	1,52E-02
PP_3281	phenylacetic acid degradation protein PaaD	5,28	15607	1,02	4,72E-01
PP_3282	paaC gene product	5,56	53048	-1,17	7,52E-02
PP_3283	phaB gene product	6,34	28708	-1,37	8,54E-03
PP_3284	enoyl-CoA hydratase	6,45	27175	-1,79	5,23E-03
PP_3285	phaM gene product	6,22	21079	1,05	4,14E-01
PP_3406	acetyltransferase	4,98	18079	-1,10	4,23E-01
PP_3431	ThiJ/PfpI domain-containing protein	6,08	25230	1,92	1,90E-02
PP_3437	hypothetical protein	5,24	57207	3,67	6,33E-03
PP_3443	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	5,89	59943	5,00	1,49E-03
PP_3456	hydrophobe/amphiphile efflux-1 (HAE1) family transporter	5,18	111498	1,80	1,71E-01
PP_3491	enoyl-coenzyme A hydratase/isomerase	5,05	39357	-2,00	9,04E-02
PP_3496	endoribonuclease L-PSP	5,07	14318	1,89	1,37E-01
PP_3508	cobW gene product	4,82	38556	3,33	3,85E-02
PP_3511	ilvE gene product	6,72	36840	-1,57	1,28E-02
PP_3569	quinat dehydrogenase	6,42	85284	19,00	2,71E-02
PP_3578	phosphoglucomutase	5,48	58584	-1,25	2,90E-01
PP_3587	tpx gene product	4,99	17398	1,01	4,88E-01
PP_3590	tyrB-2 gene product	5,67	43604	-1,44	6,91E-02
PP_3602	ketoglutarate semialdehyde dehydrogenase	5,32	55503	-3,17	2,51E-02
PP_3611	hypothetical protein	9,07	20811	2,50	4,05E-02
PP_3621	(2Fe-2S)-binding protein	5,22	15926	-7,75	5,38E-02
PP_3622	isoquinoline 1-oxidoreductase subunit beta	6,55	80839	-9,38	1,69E-05
PP_3623	gluconate 2-dehydrogenase	6,70	47820	-9,33	5,35E-04
PP_3638	acyl-CoA dehydrogenase	5,82	38452	3,00	4,98E-02
PP_3639	alkylhydroperoxidase	6,91	23702	4,33	1,89E-01
PP_3649	GntR family transcriptional regulator	6,48	28161	-1,33	2,41E-01
PP_3662	decarboxylase	6,21	50697	-1,89	2,17E-02
PP_3668	catalase/peroxidase HPI	5,64	82011	2,49	4,78E-03
PP_3691	DNA helicase-like protein	5,19	245129	3,23	1,14E-02
PP_3693	transcriptional regulator MvaT, P16 subunit	6,75	13728	1,28	3,43E-01
PP_3742	glutathione S-transferase	5,98	24027	-1,64	5,72E-02
PP_3754	beta-ketothiolase	6,41	40962	-1,82	1,07E-01
PP_3755	paaH gene product	5,97	30069	-1,70	1,42E-01
PP_3761	multi-sensor hybrid histidine kinase	5,11	129371	3,87	6,24E-04
PP_3765	transcriptional regulator MvaT, P16 subunit	9,99	13550	4,42	4,64E-03
PP_3766	gloA gene product	5,13	19799	1,45	1,15E-01
PP_3768	aroE gene product	5,75	29059	3,00	1,38E-01
PP_3778	proC-1 gene product	5,85	27697	-1,25	3,49E-01
PP_3806	isochorismatase superfamily hydrolase	5,95	19502	-1,22	3,55E-01
PP_3821	galU gene product	5,46	30938	-1,31	1,53E-02
PP_3839	adhA gene product	5,61	35375	3,12	5,87E-03
PP_3924	sterol-binding domain-containing protein	4,34	11304	-1,12	4,28E-01
PP_3957	choline/carnitine/betaine transporter family protein	7,06	72743	1,80	1,65E-01

PP_3988	hypothetical protein	5,93	76213	-1,67	2,25E-01
PP_3990	hypothetical protein	7,87	24341	-1,09	3,26E-01
PP_4000	serS gene product	5,28	46820	-1,21	8,78E-02
PP_4007	infA gene product	9,15	8297	-1,11	3,74E-01
PP_4008	clpA gene product	5,59	83260	-2,71	3,95E-02
PP_4011	icd gene product	5,46	45666	3,91	3,62E-04
PP_4012	isocitrate dehydrogenase	5,44	79850	-1,50	7,92E-03
PP_4016	purB gene product	5,69	50524	-1,24	1,01E-01
PP_4021	est gene product	5,70	30187	12,67	2,35E-05
PP_4043	gnd gene product	6,02	35344	2,33	1,29E-02
PP_4054	hypothetical protein	10,05	10282	1,43	3,19E-01
PP_4055	glgX gene product	5,21	80994	3,00	2,64E-03
PP_4058	glgB gene product	5,57	82825	7,50	2,75E-03
PP_4059	trehalose synthase	5,42	125511	6,33	3,10E-02
PP_4060	alpha-amylase	5,76	75495	7,00	1,37E-03
PP_4111	fusA gene product	5,25	77783	2,75	7,11E-02
PP_4116	aceA gene product	5,38	48603	-3,41	1,61E-05
PP_4119	nuoA gene product	9,80	15075	1,71	1,87E-01
PP_4120	nuoB gene product	5,18	25507	-2,00	1,97E-02
PP_4121	nuoCD gene product	6,08	67566	1,19	1,23E-01
PP_4124	nuoG gene product	5,69	97521	-2,11	2,10E-01
PP_4129	nuoL gene product	8,97	66136	-1,75	2,58E-01
PP_4138	NADPH-dependent FMN reductase	8,54	20341	1,29	1,57E-01
PP_4169	gpsA gene product	6,20	36497	1,11	2,87E-01
PP_4174	fabA gene product	6,08	18778	1,00	5,00E-01
PP_4175	fabB gene product	5,42	43237	-1,21	1,66E-01
PP_4178	dienelactone hydrolase	6,54	26252	-1,10	2,25E-01
PP_4179	htpG gene product	5,21	71567	-1,39	5,06E-02
PP_4185	sucD gene product	5,89	30092	-1,23	5,10E-02
PP_4186	sucC gene product	5,83	41214	-1,15	2,56E-02
PP_4187	lpdG gene product	5,93	49881	1,02	3,99E-01
PP_4188	kgdB gene product	5,28	42408	-1,13	1,52E-01
PP_4189	sucA gene product	6,10	106455	1,06	3,15E-01
PP_4190	sdhB gene product	7,41	25983	-1,25	1,44E-01
PP_4191	sdhA gene product	5,83	63409	1,01	4,69E-01
PP_4193	sdhC gene product	9,72	13804	2,33	3,23E-02
PP_4194	gltA gene product	6,51	47591	-1,50	3,67E-02
PP_4198	OmpA/MotB domain-containing protein	8,64	29677	-1,25	3,49E-01
PP_4201	electron transfer flavoprotein subunit alpha	5,07	31218	-1,32	6,48E-03
PP_4202	electron transfer flavoprotein subunit beta	9,02	26344	-1,62	1,62E-03
PP_4203	electron-transferring-flavoprotein dehydrogenase	5,57	61044	-2,20	6,71E-02
PP_4217	fpvA gene product	5,46	89670	2,50	9,65E-02
PP_4248	hypothetical protein	4,72	10342	1,07	4,21E-01
PP_4256	ccoO-2 gene product	8,78	22623	1,06	4,26E-01
PP_4266	apt gene product	4,85	20005	1,00	5,00E-01
PP_4268	hypothetical protein	4,93	12028	-1,14	3,81E-01

PP_4275	zipA gene product	5,75	35290	2,75	1,00E-02
PP_4315	PhzF family phenazine biosynthesis protein	4,78	28420	-2,50	1,61E-02
PP_4332	cheW gene product	4,39	17773	1,72	1,60E-02
PP_4338	cheA gene product	4,67	79625	-1,50	1,24E-01
PP_4373	fleQ gene product	5,49	55516	2,10	5,31E-02
PP_4378	fliC gene product	4,39	67806	-1,36	9,49E-02
PP_4448	hypothetical protein	5,73	66291	2,58	1,58E-04
PP_4472	csrA gene product	6,56	6898	-2,33	1,98E-01
PP_4473	aspartate kinase	5,25	44577	-1,45	2,79E-02
PP_4474	alaS gene product	5,28	94653	-1,09	2,62E-01
PP_4481	argD gene product	6,01	43463	-1,28	2,07E-01
PP_4486	amino acid ABC transporter substrate-binding protein	7,62	28285	2,36	6,44E-04
PP_4487	acsA gene product	5,94	71751	-3,75	5,47E-02
PP_4502	hypothetical protein	5,21	10521	-1,30	2,15E-01
PP_4506	nitroreductase	6,16	19981	1,50	1,22E-01
PP_4519	tolC gene product	5,53	50363	-1,14	1,53E-01
PP_4541	ppiA gene product	8,64	20161	1,80	1,87E-01
PP_4545	3-oxoacyl-ACP synthase	5,61	42299	-1,04	4,39E-01
PP_4546	hrpA gene product	8,27	146860	5,33	5,85E-03
PP_4570	hypothetical protein	9,70	35824	2,60	5,28E-02
PP_4571	cysK gene product	5,55	34336	1,19	7,19E-02
PP_4573	ATPase AAA	5,69	32126	1,25	3,39E-01
PP_4588	nitroreductase	5,73	21983	1,47	8,88E-02
PP_4591	rnd gene product	5,56	42641	1,67	2,25E-01
PP_4620	fumarylacetoacetase	5,65	46296	2,33	2,64E-03
PP_4635	trans-2-enoyl-CoA reductase	5,23	44238	1,11	3,00E-01
PP_4641	cstA gene product	8,91	73716	1,15	3,32E-01
PP_4642	type IV pilus assembly PilZ	4,82	15238	1,80	1,03E-01
PP_4645	mscL gene product	5,07	14721	3,20	3,97E-03
PP_4646	oxidoreductase FAD/NAD(P)-binding domain-containing protein	5,38	28942	-2,56	2,03E-02
PP_4651	cioA gene product	8,71	52982	2,17	9,18E-02
PP_4666	mmsB gene product	5,84	30301	2,88	1,42E-02
PP_4669	OmpA/MotB domain-containing protein	9,46	18229	1,17	4,07E-01
PP_4674	recC gene product	5,35	130314	2,00	2,06E-01
PP_4678	ilvC gene product	5,48	36347	-1,87	6,51E-05
PP_4679	ilvH gene product	5,93	17774	1,14	3,35E-01
PP_4680	ilvB gene product	6,36	62741	-1,04	3,15E-01
PP_4684	hypothetical protein	5,25	56061	1,57	2,94E-02
PP_4693	C4-type zinc finger DksA/TraR family protein	5,60	17121	1,06	3,98E-01
PP_4696	Fis family transcriptional regulator	5,41	52553	2,40	4,97E-02
PP_4701	pgi gene product	6,29	61416	4,67	1,88E-01
PP_4704	hypothetical protein	5,64	107187	2,25	1,01E-01
PP_4707	transport-associated protein	7,93	12031	8,00	1,52E-03
PP_4708	pnp gene product	5,12	74964	-1,49	2,30E-02
PP_4709	rpsO gene product	10,15	10024	-1,31	1,68E-01

PP_4712	infB gene product	6,42	91405	-1,08	3,06E-01
PP_4713	nusA gene product	4,58	54640	-1,32	3,77E-02
PP_4715	tpiA gene product	5,02	25975	3,50	6,98E-03
PP_4718	ftsH gene product	5,47	69679	1,41	3,21E-02
PP_4719	rrmJ gene product	7,84	23150	-1,40	2,90E-01
PP_4722	greA gene product	4,85	17564	-3,60	3,00E-02
PP_4723	carB gene product	5,17	117322	1,13	1,00E-01
PP_4724	carA gene product	5,57	40549	-1,40	7,05E-02
PP_4725	dapB gene product	5,68	28406	-4,29	1,55E-03
PP_4727	dnaK gene product	4,83	68758	1,04	3,44E-01
PP_4728	grpE gene product	4,92	20518	-1,50	2,41E-01
PP_4730	fur gene product	5,43	15190	1,29	2,37E-01
PP_4760	zinc-containing alcohol dehydrogenase	5,86	35593	6,00	7,75E-03
PP_4779	AMP nucleosidase	6,31	54464	-2,00	1,24E-01
PP_4780	acyl-CoA dehydrogenase	6,18	59765	2,33	8,50E-02
PP_4782	thiD gene product	5,22	28320	-1,67	3,52E-02
PP_4783	thiE gene product	6,96	21688	1,75	1,84E-01
PP_4784	hemL gene product	5,53	45150	-1,07	4,10E-01
PP_4789	hypothetical protein	4,93	31374	1,12	2,68E-01
PP_4794	leuS gene product	5,55	96636	1,12	3,45E-01
PP_4795	rare lipoprotein B	6,02	22401	1,00	5,00E-01
PP_4803	dacA gene product	6,15	42261	-1,15	9,11E-02
PP_4809	iojap family protein	5,51	15607	-1,13	3,91E-01
PP_4811	proA gene product	5,82	45389	-1,22	1,78E-01
PP_4817	acyl dehydratase MaoC	6,08	16838	1,94	6,42E-02
PP_4822	purH gene product	6,06	57660	-1,13	2,08E-01
PP_4847	hypothetical protein	4,55	11550	2,09	9,66E-02
PP_4848	DnaJ family curved-DNA-binding protein	9,18	34787	1,57	1,15E-01
PP_4856	bacterioferritin	4,93	19191	10,00	6,92E-04
PP_4862	short chain dehydrogenase/reductase oxidoreductase	5,97	27383	1,22	1,26E-01
PP_4867	ABC transporter substrate-binding protein	5,93	40245	2,00	2,80E-02
PP_4869	nadE gene product	5,52	29255	-1,15	1,98E-01
PP_4870	azurin	6,41	16018	-1,36	1,31E-01
PP_4874	rpII gene product	5,42	15457	-1,62	1,06E-02
PP_4876	rpsR gene product	10,74	8922	-1,10	3,61E-01
PP_4877	rpsF gene product	4,94	16363	-1,90	8,25E-02
PP_4880	vacB gene product	7,68	96629	1,91	2,92E-02
PP_4881	iron ABC transporter substrate-binding protein	5,27	36777	1,33	2,05E-01
PP_4889	purA gene product	5,56	46804	-1,14	2,25E-01
PP_4891	hflC gene product	9,37	32981	-1,12	3,58E-01
PP_4892	hflK gene product	5,37	44734	1,51	7,00E-03
PP_4894	hfq gene product	8,07	9456	-2,36	6,90E-02
PP_4898	hypothetical protein	4,94	16960	1,00	5,00E-01
PP_4902	orn gene product	5,59	20774	-1,17	3,91E-01
PP_4908	psd gene product	8,66	31527	-1,50	2,87E-01
PP_4909	serB gene product	5,31	45006	1,13	3,22E-01

PP_4911	hypothetical protein	8,45	27320	1,50	6,99E-02
PP_4921	NCS1 nucleoside transporter	7,82	44921	3,33	9,95E-02
PP_4922	thiC gene product	5,57	69683	-1,57	7,72E-03
PP_4934	bifunctional heptose 7-phosphate kinase/heptose 1-phosphate adenylyltransferase	5,65	49940	1,37	2,12E-01
PP_4935	lipid ABC transporter ATPase/inner membrane protein	7,02	66238	2,11	1,56E-01
PP_4937	toluene tolerance protein	10,06	25940	1,00	5,00E-01
PP_4944	carbamoyltransferase	6,78	65604	-1,64	1,25E-01
PP_4947	putA gene product	5,91	142493	7,92	5,90E-05
PP_4959	response regulator receiver modulated diguanylate cyclase/phosphodiesterase with PAS/PAC sensor(s)	5,07	78846	3,33	9,88E-03
PP_4960	fda gene product	5,48	38428	-1,11	2,56E-01
PP_4963	pgk gene product	5,16	39980	-1,33	8,70E-02
PP_4965	tktA gene product	5,20	72418	1,14	1,88E-01
PP_4967	metK gene product	5,26	42752	1,28	1,67E-02
PP_4972	hypothetical protein	6,69	13904	2,00	8,24E-02
PP_4975	thioesterase	6,74	14893	3,20	1,02E-02
PP_4980	DEAD/DEAH box helicase	9,97	68033	1,63	2,13E-01
PP_4981	hypothetical protein	7,89	22115	1,57	2,26E-01
PP_4988	chemotaxis protein CheA	4,90	179895	4,33	1,38E-02
PP_4993	gshB gene product	5,34	35232	1,19	2,73E-01
PP_4998	pyrB gene product	6,56	36321	-1,46	1,56E-02
PP_5000	hslV gene product	5,82	18755	1,27	2,58E-01
PP_5001	hslU gene product	5,67	49951	-1,44	4,90E-02
PP_5003	phaA gene product	6,90	62203	1,09	3,88E-01
PP_5007	poly(hydroxyalkanoate) granule-associated protein	10,15	26198	2,92	3,83E-03
PP_5008	poly(hydroxyalkanoate) granule-associated protein	9,07	15540	1,41	2,63E-01
PP_5011	ubiE gene product	9,06	28380	-2,71	2,89E-02
PP_5014	hisI gene product	6,05	14997	1,25	3,76E-01
PP_5020	methyl-accepting chemotaxis sensory transducer	5,10	68975	4,67	2,05E-03
PP_5024	amino acid ABC transporter substrate-binding protein	7,76	29829	-1,34	1,28E-01
PP_5025	mdoH gene product	8,40	95815	3,40	5,06E-02
PP_5026	mdoG gene product	6,08	62302	1,80	1,06E-02
PP_5028	pip gene product	5,82	36566	4,33	4,65E-02
PP_5041	glgP gene product	5,98	91947	6,86	4,97E-03
PP_5044	GTP-binding protein TypA	5,40	67116	-3,26	1,66E-03
PP_5046	glnA gene product	5,21	51708	1,07	2,89E-01
PP_5053	secB gene product	4,46	17743	-1,04	4,22E-01
PP_5056	pgm gene product	5,07	55146	1,16	6,21E-02
PP_5075	gltD gene product	6,03	51786	-3,17	1,97E-03
PP_5076	gltB gene product	5,88	161671	1,06	3,36E-01
PP_5077	sporulation domain-containing protein	6,54	55400	-1,14	2,74E-01
PP_5078	aroB gene product	5,71	39461	-1,46	5,06E-02
PP_5085	maeB gene product	5,09	45099	-1,32	1,84E-02

PP_5087	rpmE gene product	9,05	7839	-1,57	2,43E-01
PP_5089	argS gene product	5,57	63629	1,20	1,67E-01
PP_5095	proC-2 gene product	4,98	28241	1,03	4,36E-01
PP_5104	thiG gene product	5,74	28899	1,43	9,11E-02
PP_5111	ftsY gene product	5,13	51649	2,67	1,31E-01
PP_5118	rhodanese domain-containing protein	5,51	30731	1,05	4,10E-01
PP_5123	coaD gene product	6,98	17983	1,75	5,90E-02
PP_5127	hypothetical protein	6,48	44099	1,00	5,00E-01
PP_5128	ilvD gene product	5,61	65630	-1,45	3,31E-03
PP_5139	cadA-2 gene product	6,04	79279	8,50	4,53E-02
PP_5145	ptsP gene product	5,42	83285	1,25	1,44E-01
PP_5150	rpiA gene product	5,12	23481	-1,08	4,26E-01
PP_5153	fumarylacetoacetate (FAA) hydrolase	4,93	23891	1,50	2,87E-01
PP_5155	serA gene product	5,93	44311	-1,10	2,08E-01
PP_5177	potI gene product	9,58	32226	2,00	2,06E-01
PP_5179	potG gene product	6,10	42445	-2,40	1,08E-01
PP_5181	potF-2 gene product	6,04	40042	-1,17	2,00E-01
PP_5184	glutamine synthetase	4,78	50943	-1,13	3,88E-01
PP_5186	argE gene product	5,10	41399	1,22	2,68E-01
PP_5194	gcvT gene product	5,34	39355	2,80	9,89E-03
PP_5196	iron ABC transporter substrate-binding protein	5,64	36806	1,03	4,62E-01
PP_5214	rho gene product	7,72	47012	-1,34	1,19E-01
PP_5215	trx-2 gene product	5,02	11737	1,27	2,71E-01
PP_5216	ppx gene product	6,37	55924	1,00	5,00E-01
PP_5217	ppk gene product	7,33	81681	1,38	1,03E-01
PP_5220	elbB gene product	5,19	23376	1,69	2,67E-02
PP_5229	hypothetical protein	5,77	26379	1,00	5,00E-01
PP_5234	nitrogen regulatory protein P-II	5,42	12323	1,66	5,19E-02
PP_5265	xpt gene product	5,83	20374	-1,14	3,89E-01
PP_5278	aldehyde dehydrogenase	5,56	53020	1,09	3,74E-01
PP_5281	rpmG gene product	9,99	5986	-1,52	1,38E-01
PP_5282	rpmB gene product	11,78	8917	-1,29	1,86E-01
PP_5286	dut gene product	5,37	15904	-1,60	2,39E-01
PP_5289	argB gene product	5,57	31933	-1,11	4,02E-01
PP_5291	pyrE gene product	5,09	23065	-1,14	3,72E-01
PP_5292	crc gene product	5,10	29768	1,07	3,62E-01
PP_5294	rph gene product	5,82	25707	1,50	1,80E-01
PP_5301	rpoZ gene product	4,40	9740	-1,22	3,15E-01
PP_5303	endoribonuclease	5,15	13499	-1,03	4,70E-01
PP_5335	purK gene product	5,31	38678	1,20	1,72E-01
PP_5336	purE gene product	5,90	16933	1,45	1,30E-01
PP_5346	oadA gene product	5,42	65585	1,32	2,08E-01
PP_5347	accC-2 gene product	6,07	51910	-1,75	1,84E-01
PP_5352	uvrD gene product	5,87	81642	-1,06	3,49E-01
PP_5353	hypothetical protein	6,60	30652	1,41	3,33E-02
PP_5378	cytochrome c family protein	5,89	27534	-3,33	2,15E-02

PP_5380	copA gene product	5,64	74176	2,00	5,25E-02
PP_5383	copR gene product	5,60	25125	1,86	1,64E-01
PP_5395	hypothetical protein	5,53	31603	-1,14	2,41E-01
PP_5411	glmU gene product	6,24	48441	-1,62	4,54E-02
PP_5412	atpC gene product	5,25	14528	1,50	1,58E-01
PP_5413	atpD gene product	4,88	49328	-1,07	1,72E-01
PP_5414	atpG gene product	8,91	31444	-1,29	3,14E-02
PP_5415	atpA gene product	5,38	55318	-1,20	5,65E-02
PP_5416	atpH gene product	5,57	19185	1,00	5,00E-01
PP_5417	atpF gene product	5,56	16888	1,34	1,39E-01
PP_5419	atpB gene product	6,17	31692	-1,47	2,33E-01