

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
Dpto.de BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR I



**CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LA RUTA DE
DEGRADACIÓN DE ÁCIDO GÁLICO EN**
Pseudomonas putida

TESIS DOCTORAL



JUAN NOGALES ENRIQUE

Madrid, 2009

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



**CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LA RUTA DE
DEGRADACIÓN DE ÁCIDO GÁLICO EN**
Pseudomonas putida

TESIS DOCTORAL
JUAN NOGALES ENRIQUE

DIRECTOR:
Dr. EDUARDO DÍAZ FERNÁNDEZ

CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS
CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS



Madrid, 2009

*Somos probes, hija mía, porque icen
que son probes los que no tien dinero;
semos probes, somos probes, ¡qué sé yo!,
esu icen de nusotros, icen esu.*

*Porque semos asina, semos pardos,
del coló de la tierra,
los nietos de los machos que otros días
trunfaron en América.*

*Y tamién sus dirá que semos güenos,
que nuestra vida es güeña
en la pas d'un viví lleno e trebajos
y al doló d'un viví lleno e miserias:
¡el miajón que llevamos los castúos
por bajo e la corteza!*

*Y sus dirá tamién cómo palramos
los hijos d'estas tierras,
porqu'icimos asina: jierro, jumo
y la jacha y el jigo y la jiguera.
Son asina los cachorros de la raza
de castúos labraores extremeños,
que, inorantes de las cencias d'hoy en día,
cavilando tras las yuntas, descubrieron
que los campos de su Patria
y la madre de sus hijos, son lo mesmo.*

Extraído del Miajón de los Castuos de Luis Chamizo.

*A mis padres,
a mis hermanas.*

Agradecimientos

Suenan los clarines, no han acabado aún los operarios de allanar el albero, cuando, entre la satisfacción del respetable por tan fructífera tarde, el mozo del cartelillo anuncia al último enemigo. Número 342, Bandolero, negro bragao aunque paticalzo, cuellícorto, un poco barrigudo, serio de pitones... un morlaco de los de puerta grande o enfermería, a éste no se le hace una faena de trámite.

"Donde tú te ves, yo me ví y donde tú me ves... tú te verás"

Y ahora que "me veo" y viniendo de donde vengo, no puedo más que hacer honor al refrán y a mi tierra, pues aunque toscos y rudos, también somos bien nacidos y por tanto, agradecidos. Para que hoy Bandolero salga a la plaza, ha sido mucho lo vivido, no pocos los consejos recibidos, innumerables alegrías disfrutadas y alguna decepción sufrida.

*Bandolero y su tesis son así y no de otra manera...
Porque tuvieron en el tentadero a quien tuvieron y no a otro:*

Gracias Eduardo. Me remito a las sabias palabras de un viejo fumador de puros: "*Sí quieres triunfar en este oficio, búscate un buen jefe, hasta que puedas tener buenos becarios*". Sinceramente siento que ya sólo me resta conseguir la segunda parte de la ecuación. Gracias por todo lo que me has enseñado, consciente o inconscientemente, soy como una esponja que se ha ido empapando poco a poco de todo lo bueno que emanabas a lo largo de estos años. Para mí ya nunca más habrá novedades, habrá "*algo nuevo bajo el sol*"; los experimentos preliminares no serán prometedores, tendrán "*buen pinta*"; una alternativa siempre va a ser un "*y sí?*"; algo para que sea interesante, "*tendrá que tener novedad*"; y cuando un experimento no salga significará "*que las espadas siguen en alto*". Gracias por no castigarme en varas y dejarme con fuerzas aún jugándote el tipo, gracias por poner la muleta siempre en su sitio, en definitiva, gracias por convertir a Bandolero en un científico. Sólo siento haberte torturado estos años con Sinkopes, Extremoduros y Nirvanas.

*Bandolero y su tesis son así y no de otra manera...
Porque siempre los quites llegaron en el momento oportuno:*

Gracias José Luis, por tus "posibilidades" y por tus lecciones de política científica, gracias por enseñarme que la ciencia no es sólo hacer experimentos. Bandolero no sólo se nutre de aromáticos, también ha mamado colina, cápsulas, enzimas lítica y PHAs. Gracias Rubén, por crear esta gran familia que son los Rubenes, te haré caso en lo que me queda. Ernesto, gracias por los quites y los consejos aunque hayan sido a voces, ya sé que los vascos hablan para que se les oiga claro. Gracias Auxí, por tu ayuda en el dichoso modelo y en tantas otras cosas, espero que podamos hacer algún día el proyecto "condones low cost". Gracias Manuel, por echar ese cable cuando más falta hacía, por iniciarme en la regulación y por compartir blogs, Rock y LyseRRes. Y por supuesto... muchas gracias Pedro, no pensarías que iba a dejar a la mejor burra sin manta, Bandolero te agradece todos los momentos que has compartido con él, pese a tu afición desmesurada por el vinagre y a la lata que me distes con Roone, eres la argamasa del grupo, si no existieras, habría que inventarte. Me debes un single.

*Bandolero y su tesis son así y no de otra manera...
Porque tuvo muchos hermanos mayores de los que aprender:*

Gracias Beatriz, para mí también eres la fuente de sabiduría del labo, una fuente que nunca se agota y que siempre da agua fresca al que llega sediento, bandolero ya tiene donde mirarse. Gracias Tere por estos años, por tu ayuda en esos experimentos de quimiotaxis, esas soluciones prestadas y consejos dados y sobre todo por poner orden en el universo, gracias a tí Bandolero hoy es algo menos caótico. Gracias al Dr. Llul, porque me enseñó la mejor lección de todos estos años, "Nunca abandones tu sueño por muy difícil que parezca", muchísimas gracias Dani, intentaré ser siempre tan valiente como tú el resto de mi vida. Gracias Miriam por esos primeros años, muchísima suerte con tu embarazo y ojalá que todo te vaya muy bien. Gracias a los últimos que llegaron, Yuste, Perrea...la ciencia con risas siempre es mejor. Violeta, ¿es compatible el Taichi con Sinkope?, igual algún día cambio la guitarra por el silencio. Gracias Elo. Y sobre todo, muchas gracias Merche, por las risas entre espectros, por los pasillos y entre cañas, gracias por ser enseñarme que cumplir años no es aburrido.

*Bandolero y su tesis son así y no de otra manera...
Porque tuvo buenos mayores que cambiaron su destino:*

Gracias a Alberto, Paco, Rafa, Tino, Chus, Maribel I., Maribel G, Julia, Carlos, Ricardo... muchísimas gracias, cogisteis a un novillo que iba para cabestro y lo convertisteis en un toro de lidia. Nunca os podré agradecer lo suficiente lo que hicisteis por mí esos dos años en Cáceres.

*Bandolero y su tesis son así y no de otra manera...
Porque ha tenido los mejores compañeros de ganadería que uno pueda tener:*

Gracias Niño, por enseñarme a domar a KT y por afilarme los pitones, venía yo muy manso de la dehesa. Gracias por aquellos ratos en los que íbamos a pensar, ni el nicotínico ni el gálico serían lo mismo hoy sin ellos. Gracias Pepa por tus consejos de vestuario y las risas esos primeros años. Gracias CrisF, mi compí del AFA, la única que se me acercaba porque olía igual que yo, puedo prometer y prometo... que vengaré la afrenta del Paay!!!. Crism, Patricia, gracias por guiarme esos primeros meses. Gracias a mis compañeros de encierro, muchos años compartiendo penas y alegrías, muchos años de minipreses, betagales, footprines y RTses, pero también muchos años de Ondiñas, Lekumberris, Facultades y escapadas. S'abelita, gracias por los salchichotes, por ponerme la gomita evitando males mayores, aunque nuestra relación, sólo haya sido *in vitro*. Gracias Blas, no hay nada que te diga que no te haya dicho ya. Gracias Laura, la heavy de pega y mi borde favorita, nunca olvidaré ese Juaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaannnn, Dios santo que estridencia, eres mi Sheldon particular, acuérdate del Penny, Penny, Penny. No te achantes nunca aunque te torturen con perchas afiladas, el mundo necesita de bordes como nosotros. Muchas gracias Ana, contigo haré un resumen del resumen. Gracias por enseñarme el Ondiñas, gracias por enseñarme Madrid, gracias por saber escuchar, gracias por hacer el esfuerzo de ver lo que hay dentro de Bandolero y que pocos han visto, eres mi cuarta hermana. Gracias, por estar siempre pese a mis cortafuegos, mis centrales nucleares, mi reparo a los hippies y que "sólo" me quede con tu inteligencia. Gracias Gonn, por beberte una cerveza el 10 de Julio de 2009 (a ver cómo te libras ahora). Eres un ejemplo a seguir. Ha sido un placer coincidir contigo, no por tu ayuda en el *in vitro* o por ser la conciencia del 340-344 esos días de Facultades, también por tu paciencia infinita, los ratos del héroes, la wikipedia, las vueltas a las rotondas y las risas constantes, algún día contaremos el secreto de la fiesta de Blas,

mientras tanto, mucha suerte y que todo salga bien con Noa. Gracias María, por rescatarnos aquel día en que a los Rubenes casi nos tumban unos becarios facinerosos. Gracias por los bandidos y sus amantes, por el finde en Doností y por ese Hernán, Hernán que casi me hace llorar. Gracias Irene, por tenernos siempre la comida lista, incluyendo el salmorejo. Gracias Iria, el eslabón perdido, por aliviar el exceso de testosterona del 342 con algo de estrógeno. Gracias por enseñarme lo que no se aprende ni en la dehesa ni en el toril, gracias por sacar de Bandolero, aunque sin querer, lo que pensaba que no tenía dentro. Sólo siento tener tan poco de gallego. Gracias a los nuevos novillos y no tan nuevos, Vir, IFE, Juárez, Andrés, Nina, valle. Llegasteis pisando fuerte, contaminando medios, usurpando poses y acabando stocks. Bandolero es bramador pero poco empitonador y se calma si le acarician entre las orejas. V. gracias por abrirnos el 107 y las noches de locura. IFE, gracias por tus cartones y tus "plásticos". Javi, algún día me animaré con la espada, mientras tanto deja el pabellón bien alto. Andrés, gracias por las confesiones antes de que te asaltara a traición ese maldito vaso y por los cubatas perfectos. Nina, gracias por hacer que me entendías al principio y por esos partidos de pádel con J. valle, mi compí postdoc, gracias por las conversaciones sobre inciensos. Gracias a las nuevas neumas. Mar, gracias por ser siempre tan simpática con este malhumorado morlaco, te prometo que te daré ese regalo. Marta, Ely, Miri, seguid el camino de baldosas amarillas aunque la maleza lo cubra, mucha suerte chicas!!!. Bea, Bea Bea... Garrapato y cuatrola... Gracias a las Pingarronas, Beatriz (mi compí parte piñones) y Susana, fue una suerte teneros cerca cuando vimos lo que costaba el gálico marcado con C14. Muchas gracias chicas, el mundo sabrá que KT2440 no transporta gálico gracias a vosotras. Gracias ANAV., mi PROTECTED, espero que ya sepas que a Bandolero le gustan poco los tacones y el maquillaje y sí mucho hacer rabiar. Gracias por surtirme de pilas, caramelos, medios y risas, gracias por las torrijas aunque yo sea más de salao.

Chicos, si a Bandolero le dan el indulto y vuelve a la dehesa, ahí me tendréis para
LOKESSEA

*Bandolero y su tesis son así y no de otra manera...
Porque tuvo grandes compañeros en la dehesa:*

Y tuvo tantos que seguro que alguno se le olvida. Gracias Luque por enseñar a Bandolero a ser descarado y burlón, por los días de sierra y las noches de copas. Gracias a esos FDPs, Gaizka, Silvia, Jimena, Bártulos, Mariam, Kike... los únicos que aguantaron el ritmo del 342. Gracias Checho, Bea, Ángel, Ernesto, Juan Oreja. Gracias al 107, Rodri, Carlos, Asier. Gracias a los compís del Tajo y Gredos... por esas noches en las que arreglamos el mundo y pagamos la hipoteca de los barmans. Gracias a todos, el CIB is different.

*Bandolero y su tesis son así y no de otra manera...
Porque tuvo grandes compañeros desde siempre.*

Gracias a mis lamparones, Isa, Yoa, gracias por acompañarme desde siempre, desde que demolía paredes jugando a supermán o mataba "lagartos" suplantando a Donovan. Ría, gracias por los chírríwater, los combinados de importación y las visitas a ese infame bar en Zalamea. Sergio, Felissá, Alberto, Gus, Aitor, gracias por hacer que me entendíais. Felipe, Ana, gracias por ser mis primos favoritos, cuanto os tengo que agradecerii. Gracias a todos por las Ondiñadas, los botellones en los cañones y los conciertos. Gracias al resto de Nabuos, José, María, Juaní, Diego, Ana, Franci, Emi, al resto de NTS y a los que fueron y ya no son. Gracias a Deskontrol, Eskizofrenia y a Falazia. Gracias a mis bioquímicos. Juli, kímico, Andrea, Juanma, Minerva, Andrea, Mireia, gracias por esas fiestas de las migas y

los botellones en la plaza. Gracias a Blas (nótese que es la segunda vez). Gracias Blasete, por enseñarme a encender un po, por enseñarme el héroes, el counter strike y el Baldurs Gate. Y gracias sobre todo por ser mi cara simpática todos estos años, mi secretario (aunque no te pagaba), mi adaptador social, mi compañero de penas y mi guardián las veces que no te dormías en el metro. Intentaré devolverte con creces todo lo que me has dado, eso sí, cuando me pagues lo que me debes, y no me vale un teléfono.

*Bandolero y su tesis son así y no de otra manera...
Porque recibió una ayuda inestimable de multitud de grandes científicos.*

Quisiera dar las gracias a toda la gente ajena al 342 y cuya ayuda ha sido esencial para la realización de esta Tesis. Especialmente agradecer a los Dres. Jesús Jiménez-Barbero y a Ángeles Canales su ayuda en los experimentos de RMN. A los Dres. Germán Rivas y Carlos Rebollo su infinita ayuda y paciencia en los experimentos de ultracentrifugación analítica. A la Dra. María Jesús Vicente su inestimable ayuda en los experimentos de MS. A la Dra. Marisol Faraldos, sin cuya participación no se podrían haber hecho los experimentos de ICP. Al Dr. Enjí Masai por suministrarnos de forma desinteresada la cepa *S. paucimobilis* SYKDJ. A los Dres. D. Stjepandić y J. D. Hoheisel por proporcionarnos la genoteca de *P. putida*. Finalmente, también quisiera agradecer a los Dres. B.O. Palsson e Ines Thiele su ayuda durante mi estancia en San Diego, por enseñarme a mirar la biología desde otro punto de vista y ensanchar mi mente.

*Bandolero y su tesis son así y no de otra manera...
Porque tiene una gran familia que siempre le apoyó:*

Gracias a mis abuelos, a Francisco el galítero, por convertirme en un bricocientífico desde bien pequeñito, a Juan el largo, por inculcarme el amor a los números, a Florencia, por esas tortillas que siempre recordaré y a Quillerna, por ser mi niñera favorita, y por hacer la vista gorda cuando le quitaba las almendras del chinero a abuelo. A mis tíos, tita Petra y Santi, gracias por esos maravillosos años en Badajoz, vosotros visteis el comienzo de todo esto. Tita Natí, tío Emilio, gracias por animarme a dar el paso. Ana y Paco, Antonia y Antonio, Paquí y Juan María, Maxi, Antonio, gracias por vuestros ánimos siempre. A mis primos, Mariola, Guille, Esme, Ana, Franci, Guille, Jose, Juan, Florencia, M^a Carmen... Y a la cuarta generación de galíteros, David, Cristina, Pepe, Fran, Mariola, Esme, Alicia...

*Bandolero y su tesis son así y no de otra manera...
Porque de casta le viene al galgo:*

Gracias a mis hermanas, porque no se entiende a Bandolero o a su tesis sin vosotras. Guille, gracias por poner cordura, madurez, y por saber aguantar las investidas con buena cara. Gracias por entenderme, gracias por soportarme. Yoli, mi alma gemela, gracias por ser tan loca, por tus ánimos siempre, por ser mi secretaria, por las noches locas y días de resaca, por Juanitas y Quínes. María Florencia, la chica, muchas gracias por no permitirme crecer y por llenar la casa de alegría. Os quiero.

Gracias a mis padres por hacerme así. Mamá, papá, gracias por quererme tanto, gracias por entenderme siempre, gracias por el esfuerzo que os supuso perder al novillo tan pronto, por apoyar todas mis decisiones sin fisuras, por enseñarme que las cosas con esfuerzo saben mejor. Gracias por dármelo todo.

ÍNDICE	i
ABREVIATURAS	v
I. INTRODUCCIÓN	3
1. Los compuestos aromáticos en la naturaleza y su metabolismo en bacterias.	3
2. Características generales del catabolismo de compuestos aromáticos en bacterias.	5
2.1. El catabolismo anaeróbico de compuestos aromáticos.	5
2.2. El catabolismo aeróbico de compuestos aromáticos	6
2.2.1. Rutas periféricas de hidroxilación de los derivados del benceno	7
2.2.2. Ruptura de los anillos aromáticos y rutas centrales	8
2.3. Rutas aeróbicas híbridas.	12
3. Regulación de las rutas de degradación de compuestos aromáticos.	14
4. Degradación de aromáticos por <i>P. putida</i> KT2440	17
5. Degradación de ácido gálico.	21
II. OBJETIVOS	27
III. MATERIALES Y MÉTODOS	31
1. Cepas bacterianas.	33
2. Plásmidos	34
3. Medios y condiciones de cultivo.	36
4. Procedimientos de transferencia génica	38
4.1. Transformación y electroporación	38
4.2. Transferencia de plásmidos por conjugación.	38
5. Técnicas de manipulación de DNA.	38
5.1. Aislamiento del DNA.	39
5.2. Reacción de amplificación en cadena con DNA polimerasa termorresistente (PCR).	39
5.3. Secuenciación de DNA	42
5.4. Construcción de cepas mutantes <i>P. putida</i> KTGALdgal mediante mutagénesis insercional.	42
5.5. Mutagénesis dirigida del gen <i>galB</i> .	43
6. Técnicas de manipulación de RNA.	43
6.1. Extracción de RNA.	43
6.2. Retro-transcripción seguida de reacción de PCR (RT-PCR)	44
6.3. Determinación del sitio de inicio de la transcripción.	44
7. Técnicas de manipulación de proteínas.	46
7.1. Obtención de extractos protéicos.	46
7.2. Purificación de la proteína GalA.	46
7.3. Purificación de la proteína GalB.	47
7.4. Purificación de la proteína GalR.	48
7.5. Electroforesis en geles de poliacrilamida.	49
7.6. Determinación de la secuencia amino terminal de la proteína GalA.	49
7.7. Ensayos enzimáticos.	50

7.7.1. Actividad galato dioxigenasa y producción de OMA _{ceto} .	50
7.7.2. Actividad OMA ceto-enol isomerasa y producción de OMA _{enol} .	51
7.7.3. Actividad OMA hidratasa y producción de CHA	52
7.7.4. Actividad CHA aldolasa	53
7.7.5. Actividad β-galactosidasa	54
8. Ensayo de transporte de GA.	54
9. Ensayo de quimiotaxis hacia GA.	55
10. Ensayos de unión DNA-proteína.	56
10.1. Ensayo de retardo en gel.	56
10.2. Ensayos de protección (<i>footprinting</i>) frente a la digestión con DNasaI.	57
10.3. Ensayos de transcripción in vitro.	58
11. Análisis de metabolitos mediante Espectrometría de Masas (MS).	59
12. Caracterización estructural de metabolitos mediante Resonancia Magnética Nuclear (RMN).	59
13. Determinación del contenido en metales de la proteína GalB.	60
13.1. Determinación por Espectrometría de Emisión Atómica (ICP).	60
13.2. Determinación utilizando 4-(2-piridilazo) resorcinol (PAR).	61
14. Ultracentrifugación analítica	61
15. Modelado tridimensional de las proteínas GalA, GalD, GalB, GalC y GalR.	62
16. Análisis de los datos de secuencia.	63
IV. RESULTADOS	65
1. Los genes <i>gal</i> son los responsables de la degradación de GA en <i>P. putida</i>	64
1.1. Identificación del <i>cluster gal</i> .	67
1.2. Adaptación genotípica de <i>P. putida</i> KT2440 al crecimiento en GA.	70
1.3. Los genes <i>gal</i> son necesarios para el catabolismo del GA en <i>P. putida</i> KTGAL.	72
1.4. Los genes <i>gal</i> son suficientes para el catabolismo de GA: diseño de una casete <i>gal</i> movilizable.	75
2. Caracterización de los genes catabólicos <i>gal</i> y sus productos génicos.	78
2.1. Estudio del gen <i>galA</i> y de la proteína GalA.	79
2.1.1. Clonación del gen <i>galA</i> .	79
2.1.2. Hiperexpresión del gen <i>galA</i> en <i>E. coli</i> y confirmación de la actividad galato dioxigenasa del producto génico.	80
2.1.3. Purificación y caracterización bioquímica de la enzima GalA.	83
2.1.4. Caracterización del producto de la reacción catalizada por GalA.	86
2.1.5. Estudio sobre las relaciones estructura/función de GalA.	90
2.1.5.1. Conformación nativa de GalA.	90

2.1.5.2. Predicción de la estructura secundaria y modelado tridimensional de GalA.	90
2.2. Estudio del gen <i>galD</i> y de la proteína GalD.	93
2.2.1. Clonación y expresión heteróloga del gen <i>galD</i> .	94
2.2.2. Caracterización de la reacción catalizada por GalD	96
2.2.3. Estudios sobre la estructura de GalD.	98
2.3. Estudio del gen <i>galB</i> y de la proteína GalB.	101
2.3.1. Clonación del gen <i>galB</i> y complementación funcional de la hidratasa LigJ.	101
2.3.2. Purificación y caracterización bioquímica de la proteína GalB.	103
2.3.3. Caracterización del producto de la reacción catalizada por GalB.	107
2.3.4. Estudios sobre las relaciones entre estructura y función de GalB.	109
2.3.4.1. Conformación nativa de GalB.	109
2.3.4.2. Predicción de la estructura secundaria y modelado tridimensional de GalB.	110
2.3.4.3. Identificación de los residuos implicados en la catálisis de GalB.	113
2.4. Estudio del gen <i>galC</i> y de la proteína GalC.	116
2.4.1. Clonación del gen <i>galC</i> e hiperproducción de su producto génico.	116
3. Caracterización molecular de los genes <i>galT</i> y <i>galP</i> involucrados en el transporte de GA en <i>P. putida</i>.	119
3.1. Estudio de la implicación del gen <i>galT</i> en el transporte de GA en <i>P. putida</i> KT2440 y <i>P. putida</i> KTGAL.	119
3.1.1. Clonación y expresión del gen <i>galT</i> .	120
3.1.2. Rango de sustrato y mecanismo de transporte de la permeasa GalT.	123
3.1.3. Implicación de la proteína GalT en quimiotaxis.	125
3.2. Estudio del gen <i>galP</i> y de la porina GalP.	127
4. Caracterización de los elementos involucrados en la regulación transcripcional de los genes <i>gal</i>.	128
4.1. Organización transcripcional e inducción de los genes <i>gal</i> .	128
4.2. Análisis de la actividad de los promotores del <i>cluster gal</i> mediante fusiones con el gen reportero <i>lacZ</i> .	132
4.3. Estudio de represión catabólica sobre los genes <i>gal</i> .	136
4.4. Utilización de un circuito regulador GalR/ $P_B::lacZ$ para el diseño de un biosensor de GA.	137
4.5. Caracterización del regulador GalR	139
4.5.1. Clonación del gen <i>galR</i> y purificación de la proteína GalR.	139
4.5.2. Conformación nativa de GalR.	141

4.5.3. Predicción de la estructura secundaria y modelado tridimensional de GalR.	141
4.6. Caracterización in vitro de la interacción de GalR con los promotores P_B , P_R y P_T .	144
4.6.1. Análisis de la interacción de GalR con los promotores P_B , P_R y P_T .	144
4.6.2. Determinación del sitio de inicio de la transcripción (+1) de los promotores P_B , P_T y P_R .	147
4.6.3. Determinación de las regiones operadoras de GalR en la región promotora $PbPr$.	149
4.6.4. Estudio de la interacción de la RNAP con la región promotora $PbPr$.	150
4.6.5. Estudio in vitro de la actividad de los promotores P_B y P_R .	153
V. DISCUSIÓN.	155
1. Identificación y caracterización de los genes <i>gal</i> catabólicos implicados en la degradación de GA en <i>P. putida</i>.	157
1.1. La galato dioxigenasa GalA es el prototipo de un nuevo subgrupo de extradiol dioxigenasas.	159
1.2. Caracterización de una nueva etapa en la ruta del GA: estudio de la proteína GalD.	165
1.3. La proteína GalB es el prototipo de una nueva subfamilia de hidratatasas dependientes de Zn^{2+} .	173
1.4. El gen <i>galC</i> codifica una CHA aldolasa de la clase II.	184
2. Identificación y caracterización de los genes <i>galTP</i> implicados en el transporte de GA al interior celular.	191
2.1. GalT un nuevo miembro de la subfamilia AAHS de transportadores involucrado en transporte y en quimiotaxis hacia GA.	191
2.2. Estudio del gen <i>galP</i> y la implicación de su producto génico en transporte de GA a través de la membrana externa.	201
3. Organización transcripcional del <i>cluster gal</i> e identificación del sistema regulador.	206
3.1. El sistema regulador GalR/OMA controla la regulación específica del <i>cluster gal</i> .	206
3.2. GalR es un activador transcripcional de la familia LysR con una novedosa arquitectura modular.	210
3.3. Estudio del mecanismo de regulación específica de los promotores del <i>cluster gal</i> .	217
4. Distribución del <i>cluster gal</i> en otras bacterias.	226
VI. CONCLUSIONES.	233
VII. BIBLIOGRAFÍA.	239

ABREVIATURAS

αCTD	Dominio carboxilo terminal de la subunidad α de la RNA polimerasa
A	Adenina
$A_{600\text{nm}}$	Absorbancia medida a 600 nm
aa	Aminoácido
AAHS	Familia simporter ácido aromático: H^+
ABS	Sitio de unión de activación
ADP	Adenosina difosfato
cAMP	Adenosín monofosfato cíclico
Ap^r	Resistencia a ampicilina
ATP	Adenosina trifosfato
BSA	Seroalbúmina bovina
C°	Grado centígrado
C	Citosina
CCCP	Carbonilcianide <i>m</i> -clorofenilhidrazona
CHA	4-oxalcitromalato
Cm^r	Resistencia a cloranfenicol
CoA	Coenzima A
C-terminal	Carboxilo terminal
Da	Dalton
DBD	Dominio de unión a DNA
DEPC	Dietilpirocarbonato
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Desoxinucleótido trifosfato
DNP	2,4-Dinitrofenol
DTT	Ditiotreitol
ϵ	Coefficiente de extinción molar
EDC	1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida
EDTA	Ácido etilendiaminotetracético
FAD	Dinucleótido de flavina y adenina oxidado
FCCP	Carbonilcianide 4-(trifluorometoxi) fenilhidrazona
FADH_2	Dinucleótido de flavina y adenina reducido
FMN	Mononucleótido de flavina

g	Unidades de fuerza G
G	Guanina
Gm^r	Resistencia a gentamicina
GA	Ácido gálico
GTP	Guanosina trifosfato
h	Hora
HEPES	Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperacinetanosulfónico
HTH	Dominio hélice-giro-hélice
His₆	Secuencia de aminoácidos compuesta por 6 histidinas
IPTG	Isopropil-β-D-tiogalato piranosido
kb	1000 pares de bases
kDa	1000 dalton
K_m	Constante de Michaelis-Menten
Km^r	Resistencia a kanamicina
LB	Medio de cultivo Luria-Bertani
LTTR	Regulador de la familia LysR
M63	Medio mínimo M63
MA	Medio mínimo MA
MC	Medio mínimo MC
MCS	Sitio de clonación múltiple
mim	Minuto
NAD	Nicotinamina-adenina-dinucleótido oxidado
NADH	Nicotinamina-adenina-dinucleótido reducido
NADPH	Fosfato de Nicotinamina-adenina-dinucleótido reducido
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
nt	Nucleótido(s)
N-terminal	Amino terminal
MFS	<i>Mayor facilitator Superfamily</i>
MOPS	Ácido 3-(N-morfolin) propanosulfónico
OMA	4-oxalmesaconato
ORF	Marco abierto de lectura
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida
PAR	4-(2-piridilazo) resorcinol
pb	Pares de bases

p/v	relación peso/volumen
PCA	protocatecuato
PCR	Reacción de amplificación en cadena con DNA polimerasa termorresistente
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
PDC	2-pirona-4,6 dicarboxilato
PMSF	fenil metanosulfonilfluoride
RBS	Sitio de unión de represión
Rf^r	Resistencia a rifampicina
RNA	Ácido ribonucleico
RNA_m	RNA mensajero
RNAP	RNA polimerasa
RNasa	Ribonucleasa
RT-PCR	Reacción de retrotranscripción acoplada a PCR
σ	Subunidad sigma de la RNA polimerasa
SD	Secuencia <i>Shine-Dalgarno</i> de unión al ribosoma
SDS	Dodecilsulfato sódico
T	Timina
TAE	Tampón Tris-Acetato-EDTA
TBE	Tampón Tris-Borato-EDTA
Tris	Trihidroximetilaminometano
U	Unidad de actividad enzimática
<i>V_{máx}</i>	Velocidad máxima
v/v	Relación volumen/volumen
X-gal	5-Bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosido

I. INTRODUCCIÓN

1. Los compuestos aromáticos en la naturaleza y su metabolismo en bacterias.

Los compuestos aromáticos son todas aquellas moléculas que poseen estructuras cíclicas, planas, completamente conjugadas y que poseen $(4n+2)$ electrones π deslocalizados, donde n es un número entero positivo (regla de Hückel) (Vollhardt y Schore, 1994). Esta definición no se restringe al anillo de benceno, aunque sean los derivados de esta molécula los más estudiados en relación con el catabolismo de compuestos aromáticos en bacterias. El anillo de benceno es una molécula persistente en la naturaleza debido a que presenta una gran estabilidad termodinámica. El benceno es una estructura inusualmente inerte, debido a su alta energía de resonancia. Todos los átomos de carbono poseen una configuración de orbitales sp^2 y cada orbital p solapa de manera idéntica con sus dos vecinos. Los electrones desapareados conforman una nube electrónica π por debajo y por encima del anillo. Como resultado de la hibridación se genera una estructura hexagonal plana completamente regular, con idénticas distancias entre los átomos de carbono, que corresponderían a una longitud intermedia entre el enlace sencillo y el doble. La energía de resonancia de la nube π , también denominada de *deslocalización* o *aromaticidad*, es la responsable de la estabilidad de la molécula (Vollhardt y Schore, 1994). Todos los compuestos que contienen anillos bencénicos en su estructura ven aumentada su persistencia en la naturaleza debido a las características termodinámicas de dichos anillos.

Los compuestos derivados del benceno son ricos en densidad electrónica y, por lo tanto son susceptibles de sufrir reacciones de sustitución electrófila, lo que lleva a la pérdida de un protón del anillo que es reemplazado por un grupo electrófilo, aunque la molécula sigue poseyendo carácter aromático. La reacción ocurre a través de un intermedio no aromático, por lo que se requiere la pérdida de un protón para recuperar la aromaticidad de la molécula. Si el anillo de benceno contiene grupos hidroxilo o amino, que aumentan su densidad electrónica, las reacciones de sustitución electrófila se ven enormemente favorecidas y se dice, por tanto, que estos anillos sustituidos se encuentran activados.

Los compuestos aromáticos se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza (Dagley, 1981), siendo su origen eminentemente natural. Se forman en una gran variedad de procesos biogeoquímicos y es posible encontrarlos como moléculas de bajo peso molecular, como el benceno, o como componentes de biopolímeros tales

como la lignina, el polímero más abundante en la naturaleza después de la celulosa y que se encuentra formando parte de la pared celular vegetal constituyendo el 25% de la biomasa de la tierra (Gibson y Harwood, 2002). La presencia de compuestos aromáticos se extiende también a otros ámbitos y se encuentran presentes como componentes de los taninos (véase más adelante), 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. La actividad industrial supone una fuente adicional de compuestos aromáticos que son liberados al medio ambiente, entre ellos, se incluyen moléculas que no se encuentran de forma habitual en la naturaleza (compuestos xenobióticos) y para las que no existen, generalmente, procesos de degradación. Un gran número de los compuestos aromáticos de origen xenobiótico son particularmente tóxicos tales como los bifenilos, dioxinas polihalogenadas, compuestos nitroaromáticos, etc (Reineke y Knackmuss, 1988; Heiss y Knackmuss, 2002). Los compuestos xenobióticos, así como otros compuestos aromáticos naturales pero de difícil degradación, persistirán en el medio o bien serán eliminados de forma más lenta (Pieper y Reineke, 2000) y constituyen, por lo tanto, una fuente de contaminación.

Las bacterias, dada su gran versatilidad metabólica y su plasticidad genética, son capaces de desarrollar 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; Gibson y Harwood, 2002; Díaz, 2004; Vaillancourt *et al.*, 2004; Fuchs, 2008). Del mismo modo, es posible la modificación racional de la capacidad degradativa de las bacterias en el laboratorio, de forma que sea posible diseñar biocatalizadores optimizados para reducir significativamente la contaminación debida a ciertos compuestos aromáticos. La utilización de los microorganismos para combatir la contaminación medioambiental recibe el nombre genérico de biorremediación, definiéndose ésta como la disciplina que estudia los diferentes aspectos (bioquímicos, genéticos, microbiológicos etc) de los procesos catabólicos microbianos implicados en la degradación de estas moléculas contaminantes, así como el desarrollo experimental de nuevas rutas catabólicas para degradarlas (Ramos *et al.*, 1994). Un mayor conocimiento de estos procesos es fundamental para lograr la eliminación de contaminantes del medio ambiente mediante bacterias modificadas genéticamente (de Lorenzo, 2001).

2. Características generales del catabolismo de compuestos aromáticos en bacterias.

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 (ver apartado 1 de la Introducción). 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).

La diversidad de rutas periféricas es casi tan grande como la 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). Por el contrario, sólo existen unas pocas rutas centrales. 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-} , etc), la degradación es de tipo anaeróbica. Ambos tipos de catabolismo poseen características muy diferentes como se discutirá a continuación.

2.1. 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-hidroxinicotínico, 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) (Schink y Friedrich, 2000). A través de este metabolito son canalizados una gran mayoría de los compuestos aromáticos en el metabolismo anaeróbico (Heider y Fuchs, 1997; Schink y Friedrich, 2000; Gibson y Harwood, 2002). 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 en forma de ATP (Heider y Fuchs, 1997).

2. 2. El catabolismo aeróbico de compuestos aromáticos.

La degradación aeróbica de compuestos aromáticos es el mecanismo de mineralización mejor estudiado y en ella los diferentes sustratos son convertidos en derivados mono-, di-, o trihidroxilados 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. Una variante de las rutas clásicas de degradación aeróbica la constituyen las rutas aeróbicas híbridas (ver

apartado 2.3 de Introducción) (Díaz *et al.*, 2001; Jiménez *et al.*, 2004; Phale *et al.*, 2007).

A continuación se exponen algunos aspectos básicos de las rutas periféricas y centrales de la degradación aeróbica de compuestos aromáticos en bacterias.

2.2.1. Rutas periféricas de hidroxilación de los derivados del benceno.

Las rutas periféricas implicadas en el catabolismo aeróbico de los derivados bencénicos involucran diferentes actividades enzimáticas que transforman una gran variedad de compuestos aromáticos en unos pocos intermediarios centrales tales como catecol, protocatecuato, homoprotocatecuato, gentisato, homogentisato, hidroxiquinol e hidroquinona (Fig. 1). Las enzimas claves de estas rutas periféricas en el catabolismo aeróbico clásico son las oxigenasas de anillo que desestabilizan el anillo aromático mediante la inclusión de grupos hidroxilo. En general, las oxigenasas de anillo se pueden clasificar en monooxigenasas o dioxigenasas según introduzcan uno o dos grupos hidroxilo, respectivamente, empleando todas ellas oxígeno como co-sustrato y NAD(P)H como fuente de poder reductor (Mason y Cammack, 1992). Estas oxigenasas requieren además cofactores capaces de reaccionar con el oxígeno, ya que las reacciones directas entre el oxígeno, en su estado triplete, y las moléculas orgánicas, que existen en estado singlete, se encuentran prohibidas cinéticamente (Harayama y Timmis, 1992). Los cofactores que emplean las oxigenasas de anillo suelen ser metales de transición como el hierro (éste es el más frecuente), magnesio, manganeso, cobre y cobalto, aunque en ocasiones en las reacciones de oxigenación pueden actuar grupos prostéticos como las pteridinas, las flavinas, o grupos hemo (Harayama y Timmis, 1992; Fitzpatrick, 1999). Las oxigenasas de anillo que inician la degradación de los derivados de piridina (*N*-heterociclo) no utilizan O₂ como sustrato sino agua, y los equivalentes de reducción necesarios se generan en el transcurso de la reacción. Estas enzimas utilizan generalmente molibdeno como cofactor (Fetzner, 2000).

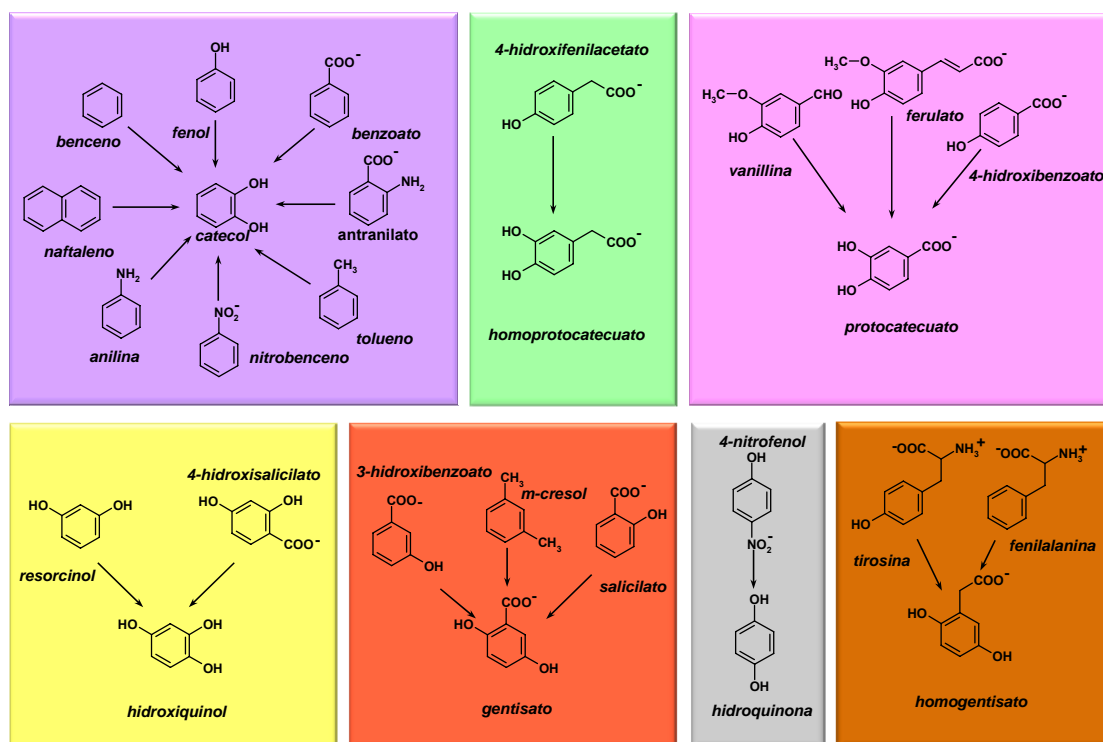


Figura 1. Intermediarios centrales más frecuentes que se generan en las rutas periféricas para la degradación aeróbica clásica de compuestos derivados del benceno. Una gran variedad de rutas periféricas convergen en unos pocos intermediarios centrales tales como el catecol (violeta), homoprotocatecuato (verde), protocatecuato (rosa), hidroquinol (amarillo), gentisato (rojo), hidroquinona (gris) y homogentisato (marrón).

2.2.2. Ruptura de los anillos aromáticos y rutas centrales.

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 metaloenzimas 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. 2).

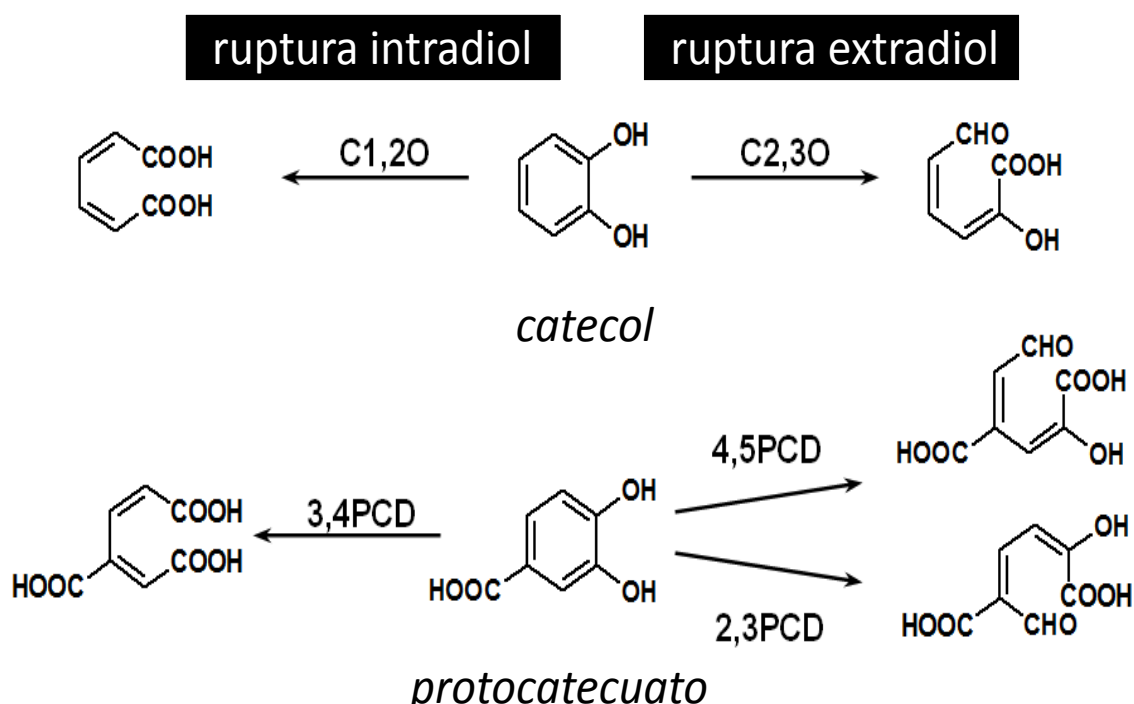


Figura 2. Ejemplos de reacciones catalizadas por dioxigenasas de ruptura. Se muestran los productos de ruptura intradiol o extradiol para los mismos sustratos. Las dioxigenasas que catalizan la ruptura son: C1,2O, catecol-1,2-dioxigenasa; C2,3O, catecol-2,3-dioxigenasa; 3,4PCD, protocatecuato-3,4-dioxigenasa; 4,5PCD, protocatecuato-4,5-dioxigenasa; 2,3PCD, protocatecuato-2,3-dioxigenasa.

Aunque las diferencias entre las intradiol y extradiol dioxigenasas puedan parecer pequeñas, estas enzimas 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 el catecol, el protocatecuato y el hidroxiquinol, y todos ellos poseen dos grupos hidroxilos contiguos (Fig. 2). Por el contrario, las extradiol dioxigenasas catalizan la ruptura de compuestos aromáticos catecólicos (catecol, protocatecuato, homoprotocatecuato) y de otros que presentan dos hidroxilos no contiguos como el gentisato, el homogentisato, y la hidroquinona (Vaillancourt *et al.*, 2004). También existen extradiol dioxigenasas que rompen 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).

Las intradiol dioxigenasas derivan de un ancestro común, por lo que aunque pueden estar constituidas por un número diferente de subunidades, todas ellas muestran

un plegamiento común para el centro activo, con cuatro residuos conservados para el anclaje del hierro (III) (Vaillancourt *et al.*, 2004).

Al contrario de lo que sucede con las intradiol dioxigenasas, las extradiol dioxigenasas muestran una gran diversidad evolutiva, que permite clasificarlas en, al menos, cuatro familias distintas. La primera de ellas comprende a la gran mayoría de las extradiol dioxigenasas caracterizadas y está constituida por enzimas de un único dominio, como la 2,3-dihidroxibifenil 1,2-dioxigenasa de *Rhodococcus globerulus* P6 (Asturias *et al.*, 1994), o de dos dominios que muestran similitud significativa, como la catecol 2,3-dioxigenasa de *P. putida* mt-2 (Kita *et al.*, 1999). Todas ellas muestran un plegamiento que consiste en cuatro láminas β y una hélice α , que sirve de puente entre la primera y la segunda lámina β . La presencia del segundo dominio en una gran mayoría de las proteínas de esta familia indica la existencia de un suceso de duplicación génica a partir de un ancestro común con un único dominio, siendo el dominio C-terminal de las enzimas de dos dominios el responsable de la actividad catalítica. El mecanismo catalítico de estas enzimas se fundamenta en la formación de un complejo entre el hierro (II) y uno de los hidroxilos del sustrato o de un intermediario de la reacción (Vaillancourt *et al.*, 2004).

La segunda familia de extradiol dioxigenasas comprende a un grupo diverso de enzimas que no comparten características estructurales definidas. Algunos miembros de esta familia, como la 2,3-dihidroxifenilpropionato dioxigenasa de *E. coli* poseen una única subunidad (Spence *et al.*, 1996), mientras que otros, como la protocatecolato 4,5-dioxigenasa de *Sphingomonas paucimobilis* SYK-6 presenta dos subunidades no relacionadas entre sí (Sugimoto *et al.*, 1999). (Tabla 1). En otros casos, las dos subunidades sí están relacionadas evolutivamente como ocurre con la 2-aminofenol 1,6-dioxigenasa de *P. pseudoalcaligenes* JS45 (Davis *et al.*, 1999).

La tercera familia está constituida por las dioxigenasas pertenecientes a la superfamilia de las cupinas (Tabla 1). Algunos ejemplos de proteínas que pertenecen a este grupo son la gentisato dioxigenasa de *P. testosteroni* (Harpel y Lipscomb, 1990b), la homogentisato dioxigenasa de *P. putida* (Arias-Barrau *et al.*, 2004) y la 1-hidroxi-2-naftoato dioxigenasa de *Nocardioides* sp. KP7 (Iwabuchi y Harayama, 1998). La superfamilia de las cupinas está compuesta por proteínas que contienen al menos un dominio con seis láminas β antiparalelas que forman un barril β . Se trata de una familia muy amplia formada por proteínas con diversas funciones biológicas, como la germina

(oxalato oxidasa), implicada en la respuesta de las plantas a los patógenos, o los reguladores transcripcionales de la familia AraC/XylS (Dunwell *et al.*, 2001).

Recientemente se ha descrito una nueva familia de extradiol dioxigenasas que no poseen similitud de secuencia con las anteriores y que, muy probablemente, deriva de las metaloproteasas. El prototipo es 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 de dos histidinas y un grupo carboxilato que ligan el ión Fe (II) (Hegg y Que, 1997; Que, 2000). Este motivo se encuentra en un gran número de enzimas no relacionadas que contienen Fe (II) no asociado a grupos hemo, y permite que estas proteínas catalicen diversas reacciones. Los residuos de la tríada facial se encuentran ocupando una de las caras de la esfera de coordinación del hierro, mientras que la otra cara se encuentra libre para unir el oxígeno necesario en la reacción (Que, 2000; Vaillancourt *et al.*, 2004; Vaillancourt *et al.*, 2006).

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. Así, en la degradación de la quinaldina (2-metilquinolina) en *A. ilicis* Rū61a y de la quinolina en *P. putida* 33/1 se forman intermediarios aromáticos heterocíclicos, 1*H*-3-hidroxi-4-oxoquinaldina y 1*H*-3-hidroxi-4-oxoquinolina, que son atacados por las 2,4-dioxigenasas Hod y Qdo, respectivamente (Bauer *et al.*, 1996; Fetzner, 2000). En la degradación del flavonol quercetina también se ha identificado una 2,4-dioxigenasa (quercetinasas). Las 2,4-dioxigenasas catalizan la inserción de O₂ en dos carbonos no adyacentes (C2 y C4) del compuesto heterocíclico produciendo la ruptura de dos enlaces carbono-carbono y la liberación de CO. El análisis de la estructura primaria de las 2,4-dioxigenasas permite englobarlas en la superfamilia de las α/β hidrolasas (Fetzner, 2002). Estas dioxigenasas han adaptado el centro activo de las α/β hidrolasas (tríada catalítica) para realizar la reacción dioxigenolítica (Frerichs-Deeken y Fetzner, 2005).

Finalmente, en la degradación de la vitamina B₆ (piridoxina) por *Pseudomonas* sp. MA-1 se genera ácido 2-metil-3-hidroxipiridina-5-carboxílico que sufre ruptura del anillo aromático mediante una dioxigenasa que muestra similitud con flavoprotein monooxigenasas y es dependiente de NADPH. Mientras que la reacción de

hidroxilación involucra FAD, la ruptura del anillo está aparentemente catalizada por residuos de la proteína (2-metil-3-hidroxi piridina-5-carboxílico oxigenasa) y no precisa de cofactores metálicos (Chaiyen *et al.*, 2004). En la degradación de la piridoxina por *Arthrobacter* Cr-7 se genera ácido 5-piridóxico que también sufre apertura del anillo mediante una dioxigenasa dependiente de FAD similar a la caracterizada en la cepa MA-1 (Nelson y Snell, 1986).

Tabla 1. Clasificación de las dioxigenasas de ruptura de anillos aromáticos.

Tipo	Ejemplo	Organismo	Subunidades	Referencia
Intradiol	Protocatecuato-3,4-dioxigenasa	<i>Pseudomonas putida</i> B10	($\alpha\beta$) ₁₂	(Ohlendorf <i>et al.</i> , 1988)
	Catecol-1,2-dioxigenasa	<i>Acinetobacter</i> sp. ADP1	α_2	(Vetting y Ohlendorf, 2000)
Extradiol				
I	2,3-Dihidroxibifenil 1,2-dioxigenasa	<i>Burkholderia</i> sp. LB400	α_8	(Han <i>et al.</i> , 1995)
	Catecol-2,3-dioxigenasa	<i>Pseudomonas putida</i> mt-2	α_4	(Kita <i>et al.</i> , 1999)
	Homoprotocatecuato 2,3-dioxigenasa	<i>Brevibacterium fuscum</i>	α_8	(Wang y Lipscomb, 1997)
II	2,3-Dihidroxifenilpropionato 1,2-dioxigenasa	<i>Escherichia coli</i>	α_4	(Bugg, 1993)
	Protocatecuato 4,5-dioxigenasa	<i>Sphingomonas paucimobilis</i> SYK-6	$\alpha_2\beta_2$	(Sugimoto <i>et al.</i> , 1999)
III (Cupinas)	2-Aminofenol 1,6-dioxigenasa	<i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i> JS45	$\alpha_2\beta_2$	(Davis <i>et al.</i> , 1999)
	Gentisato dioxigenasa	<i>Pseudomonas testosteroni</i>	α_4	(Harpel y Lipscomb, 1990b)
	1-Hidroxi-2-naftoato dioxigenasa	<i>Nocardioides</i> sp. KP7	α_6	(Iwabuchi y Harayama, 1998)
IV	2,5-dihidroxipiridina dioxigenasa	<i>Pseudomonas putida</i> KT2440	α_6	(Jiménez <i>et al.</i> , 2008)

(Adaptado de Vaillancourt *et al.* 2004)

2.3. 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 (Heider y Fuchs, 1997). Para su actividad, las CoA-ligasas requieren CoA, Mg^{2+} y ATP (Boll y Fuchs, 1995). A continuación, se produce la pérdida del carácter aromático del derivado de CoA mediante reacciones sucesivas de oxigenación y ruptura del anillo. La ruta aeróbica híbrida mejor estudiada es la de degradación de benzoato en *A. evansii* (Zaar *et al.*, 2004; Gescher *et al.*, 2005; Gescher *et al.*, 2006). El intermediario benzoil-CoA a través de la oxigenasa BoxAB sufre la introducción de O_2 en los carbonos 2 y 3 generando el correspondiente benzoil-CoA dihidrodiol (Zaar *et al.*, 2004). La apertura del anillo (no aromático) del benzoil-CoA dihidrodiol está catalizada por una benzoyl-CoA dihidrodiol liasa (BoxC), que no requiere ni oxígeno molecular ni metales ni otros cofactores para la catálisis, cuya estructura primaria revela dominios característicos de proteínas de la familia de las enoil-CoA hidratatas/isomerasas (Gescher *et al.*, 2005). El producto alifático que se origina sufre una serie de reacciones similares a las de la β -oxidación de ácidos grasos generando finalmente β -cetoacil-CoA, un intermediario de la ruta aeróbica clásica del β -cetoacilato (Gescher *et al.*, 2006). La degradación de benzoato a través de una ruta aeróbica híbrida también se ha descrito en otras bacterias tales como *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 de degradación más extendida es la involucrada en la degradación del ácido fenilacético, habiéndose identificado una gran variedad de bacterias y 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), en *P. putida* U (Olivera *et al.*, 1998), *Pseudomonas* sp. Y2 (Velasco *et al.*, 1998; Alonso *et al.*, 2003; Bartolomé-Martín *et al.*, 2004), *A. evansii* (Mohamed *et al.*, 2002), *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). 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).

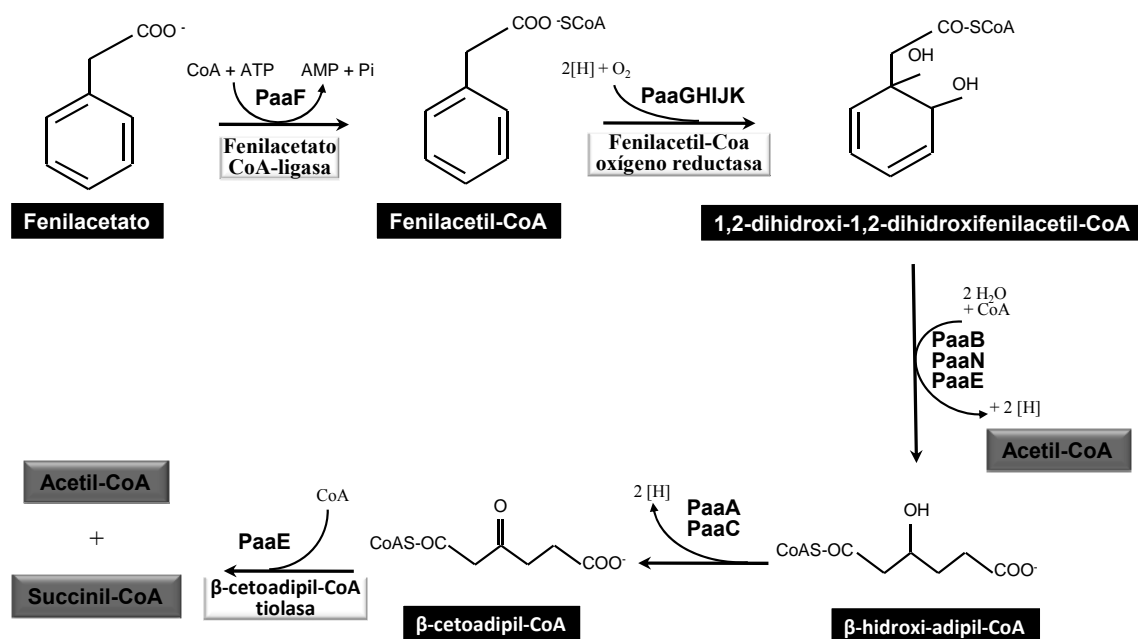


Figura 3. Ruta de degradación propuesta para el ácido fenilacetato en *E. coli* (Ismail *et al.*, 2003; Nogales *et al.*, 2007). Se muestra el nombre de cada intermediario así como, en negrita, las enzimas involucradas en cada paso. Los productos de degradación se muestran en cajas grises.

3. 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 o de la presencia de otra fuente de carbono preferencial para la bacteria (Prieto *et al.*, 2004; Tropel y van der Meer, 2004; Cases y de Lorenzo, 2005). 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 (Cases y de Lorenzo, 1998; Laurie *et al.*, 2003; Rojo y Dinamarca, 2004; Aranda-Olmedo *et al.*, 2006). Por último, las rutas catabólicas también se regulan a nivel post-traduccionales mediante la inhibición de las enzimas correspondientes en presencia de distintos análogos de sustrato 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).

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. 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 en 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). 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 (Díaz y Prieto, 2000; Cases y de Lorenzo, 2001; Prieto *et al.*, 2004; Cases y de Lorenzo, 2005).

En el segundo nivel de control transcripcional, los promotores catabólicos se encuentran sujetos a una regulación basada en el estado fisiológico de la bacteria, en respuesta a condiciones ambientales generales y no sólo a la presencia de determinados inductores relacionados con la ruta de degradación. Así por ejemplo, si la bacteria se encuentra en presencia de un compuesto aromático y de una fuente de carbono más fácil de asimilar (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. Este 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 receptora de cAMP (CRP) (Prieto *et al.*, 2004).

Proteínas como CyoB, PtsN, y BphQ se han visto implicadas en procesos de represión catabólica de rutas de degradación de compuestos aromáticos en bacterias de los géneros *Pseudomonas* y *Acidovorax* (Petruschka *et al.*, 2001; Ohtsubo *et al.*, 2006;

Pflugger y de Lorenzo, 2008). Por otro lado, la proteína Crc de *Pseudomonas* está implicada, mediante un mecanismo de control postranscripcional, en la represión que ejercen los aminoácidos sobre la expresión de rutas catabólicas de compuestos aromáticos (Moreno y Rojo, 2008).

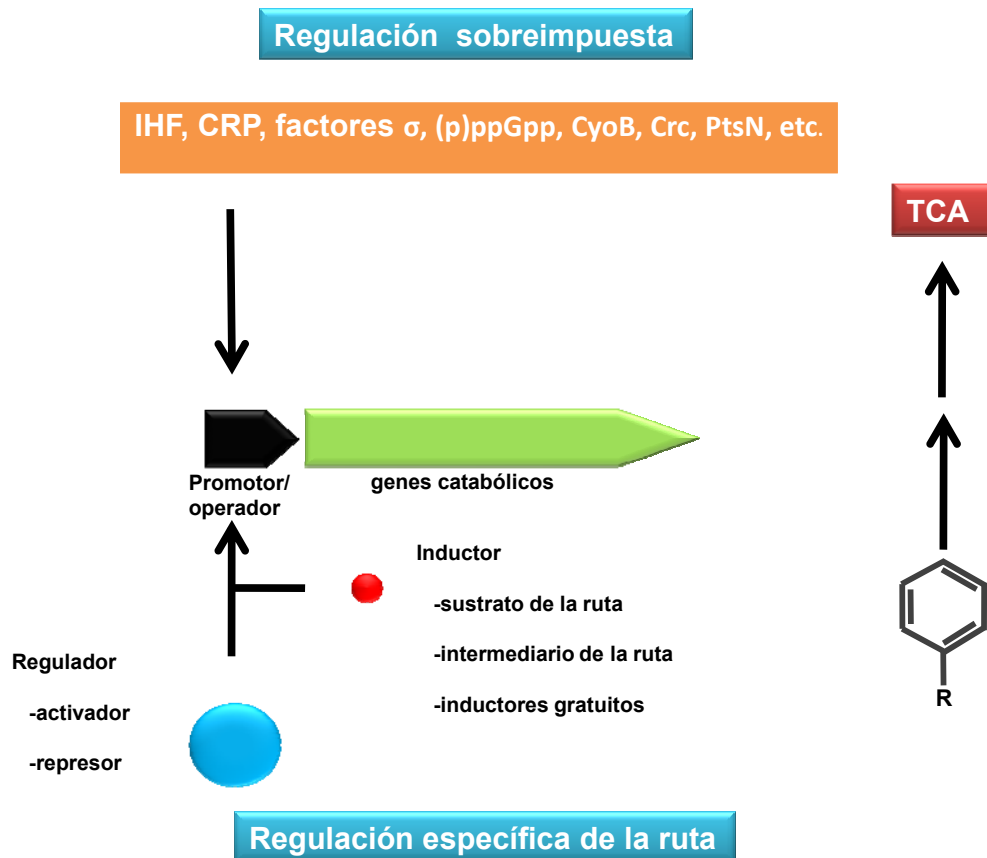


Figura 4. Esquema de los dos niveles de regulación transcripcional del catabolismo de compuestos aromáticos en bacterias. En la degradación de un compuesto aromático hasta intermediarios del ciclo de Krebs (TCA), la interacción regulador-promotor es el mecanismo de regulación específico en presencia de la molécula inductora de la ruta. Un segundo nivel de control está constituido por la regulación global o sobreimpuesta, en la que participan reguladores y factores transcripcionales como IHF (*Integration Host Factor*), CRP (*cAMP Receptor Protein*), factores alternativos de la RNA polimerasa (RNAP), (p)ppGpp (Guanosina tetra- o pentafosfato), CyoB (Citocromo *o* ubiquinol oxidasa), Crc (*Catabolite repression control*), PtsN (proteína IIA^{Ntr} del sistema fosfoenol piruvato:azúcar fosfotransferasa), etc.

4. Degradación de compuestos aromáticos por *P. putida* KT2440

La capacidad de catabolizar compuestos aromáticos está ampliamente extendida entre las bacterias (Harayama y Timmis, 1992; Ramos *et al.*, 1994; Pieper y Reineke, 2000), siendo las rutas catabólicas de compuestos aromáticos unas de las mejores caracterizadas de las bacterias del género *Pseudomonas* (Jiménez *et al.*, 2004). Las bacterias del género *Pseudomonas* son microorganismos ubicuos pertenecientes al grupo de las γ -proteobacterias, quimio-organotróficos, con flagelos polares, que poseen un metabolismo eminentemente respiratorio y que muestran un alto grado de adaptabilidad fisiológica y genética (Palleroni, 1984). Así, son capaces de colonizar diversos ambientes naturales (suelos, aguas dulces y marinas), y pueden ser saprofitas, patógenos o actuar en simbiosis con plantas y animales. Las cepas de *Pseudomonas* muestran una amplia versatilidad metabólica, lo que se refleja en que son capaces de degradar una gran variedad de compuestos aromáticos, tanto de origen natural como xenobióticos, a través de diferentes rutas centrales como las del catecol, protocatecuato, homogentisato, gentisato, hidroxiquinol, hidroquinona, homoprotocatecuato y fenilacetil-CoA para los derivados del benceno (Jiménez *et al.*, 2004). Las cepas de la especie *P. putida* son miembros del grupo I de rRNA del género *Pseudomonas*. Se trata de bacterias saprofitas no patógenas y tal vez constituyan los miembros mejor caracterizados del género. Actualmente se conoce el genoma completo de 4 cepas de *P. putida*: *P. putida* KT2440 (Nelson *et al.*, 2002), y recientemente tres nuevas cepas de interés tanto en biotecnología como en biodegradación, la cepa *P. putida* F1 (http://genome.jgi-psf.org/draft_microbes/psepu/psepu.home.html), la cepa *P. putida* W619 (http://genome.jgi-psf.org/finished_microbes/psepw/psepw.home.html) y la cepa *P. putida* GB-1 (http://genome.jgi-psf.org/finished_microbes/psepg/psepg.home.html).

P. putida KT2440 es una cepa derivada de *P. putida* mt-2 (Franklin *et al.*, 1981) que ha perdido de forma espontánea el plásmido TOL (pWW0) (Bayley *et al.*, 1977). La capacidad de *P. putida* mt-2 para degradar compuestos aromáticos es ampliamente conocida. Así, se sabe que *P. putida* mt-2 es capaz de utilizar como única fuente de carbono y energía distintos hidrocarburos aromáticos (tolueno, *m*-xileno, *p*-xileno, 3-etiltolueno, 1,2,4-trimetilbenceno (pseudocumeno)), así como sus derivados alcohol, aldehído y ácidos carboxílicos correspondientes, a través de una ruta de degradación tipo *meta* que está codificada en el plásmido pWW0 ó plásmido TOL (Franklin *et al.*,

1981; Assinder y Williams, 1990). Dada su plasticidad genética y metabólica, esta cepa se ha empleado tradicionalmente con fines biotecnológicos de diversa índole (Harayama y Timmis, 1989; Ramos *et al.*, 1994; dos Santos *et al.*, 2004). *P. putida* KT2440 se ha utilizado para el diseño o modificación de rutas metabólicas con el objetivo de degradar contaminantes y eliminar metales pesados (Ramos *et al.*, 1986; Ramos *et al.*, 1987; Rojo *et al.*, 1987; Erb *et al.*, 1997), para la producción de intermediarios de las rutas catabólicas, incluyendo la biosíntesis específica de sintones quirales para su posterior uso en síntesis orgánica (Schmid *et al.*, 2001), y también para la mejora de combustibles fósiles mediante procesos de biodesulfuración (Galán *et al.*, 2000). *P. putida* KT2440 también es capaz de colonizar la rizosfera de una gran variedad de plantas de cultivo, como el maíz, el trigo, la fresa, la caña de azúcar y la espinaca, y se está empleando para la estimulación del crecimiento de los cultivos así como para el desarrollo de nuevos biopesticidas (Espinosa-Urgel *et al.*, 2002).

Recientemente y tras la secuenciación completa de su genoma, distintos análisis han mostrado la gran capacidad de degradar ácidos aromáticos que posee *P. putida* KT2440 (Jiménez *et al.*, 2002; Kim *et al.*, 2006; Jiménez *et al.*, 2008), y que va más allá de la utilización del benzoato mediante la ruta de degradación tipo *orto* (ruta del β -cetoadipato) codificada en el cromosoma de la bacteria (Assinder y Williams, 1990). Así, el análisis genómico del potencial catabólico de *P. putida* frente a compuestos aromáticos predijo, además de la existencia de al menos tres rutas centrales para el catabolismo de compuestos aromáticos, i.e, ruta del β -cetoadipato (genes *cat* y *pca*), ruta del homogentisato (genes *hmg*) y ruta del fenilacetato (genes *paa*), la existencia de dos agrupaciones génicas adicionales que podrían estar involucradas en la degradación de compuestos aromáticos, genes *nic* y genes *pcm* (Fig. 5) (Jiménez *et al.*, 2002). El estudio de estas rutas centrales, incluido los genes *nic* encargados de la degradación del ácido nicotínico (Jiménez *et al.*, 2008), así como distintas rutas periféricas que convergen en las anteriores rutas centrales, ha sido completado en los últimos años, ampliando considerablemente el conocimiento de la amplia red de genes presentes en *P. putida* involucrados en la degradación de compuestos aromáticos (Arias-Barrau *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2006; Nogales *et al.*, 2007; Arias *et al.*, 2008) (Figs. 5 y 6).

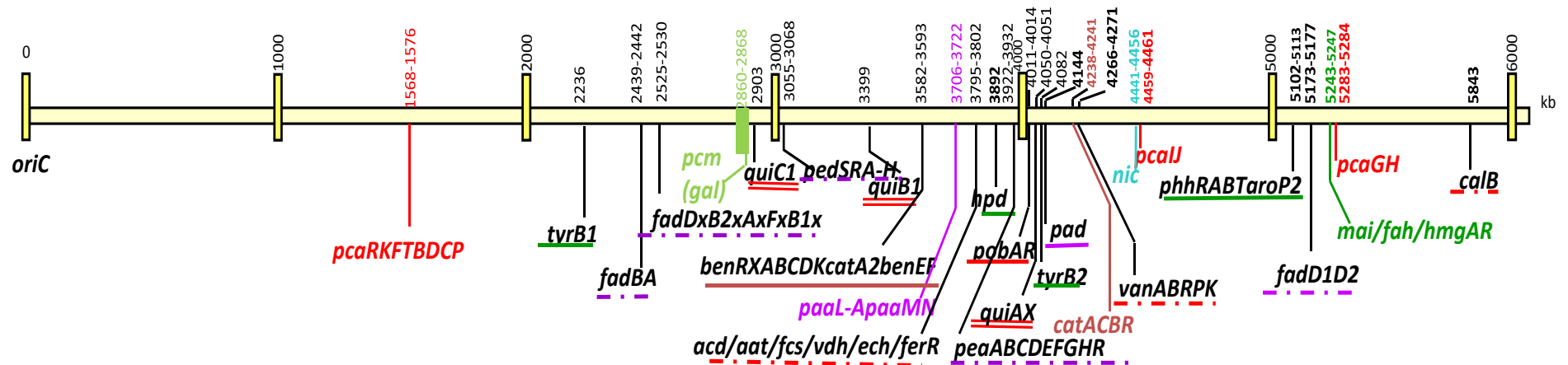


Figura 5. Localización de los agrupamientos génicos codificados en el genoma de *P. putida* KT2440 implicados en el metabolismo de compuestos aromáticos. Se muestra la distribución de los clusters génicos implicados en la degradación de compuestos aromáticos en *P. putida* KT2440. En rojo y en marrón se indican los genes que codifican las ramas del protocatecuato y catecol, respectivamente de la ruta central del β -cetoadipato. Subrayados de rojo o marrón se muestran aquellos genes que codifican las rutas periféricas que convergen en la del β -cetoadipato. En violeta, se indican los genes que codifican la ruta del fenilacetato y subrayados de violeta los genes involucrados en las rutas periféricas de ésta. En verde, se detallan los genes responsables de la ruta de degradación del homogentisato, estando subrayados en color verde los genes que codifican sus rutas periféricas. En azul se muestra la posición de los genes *nic*, involucrados en la degradación de nicotinato y en verde claro los genes *pcm* (*gal*), objeto de estudio en esta memoria. La posición de cada gen o agrupamiento génico, en kb, se indica en la parte superior de la figura. Figura modificada de Jiménez *et al.*, 2002.

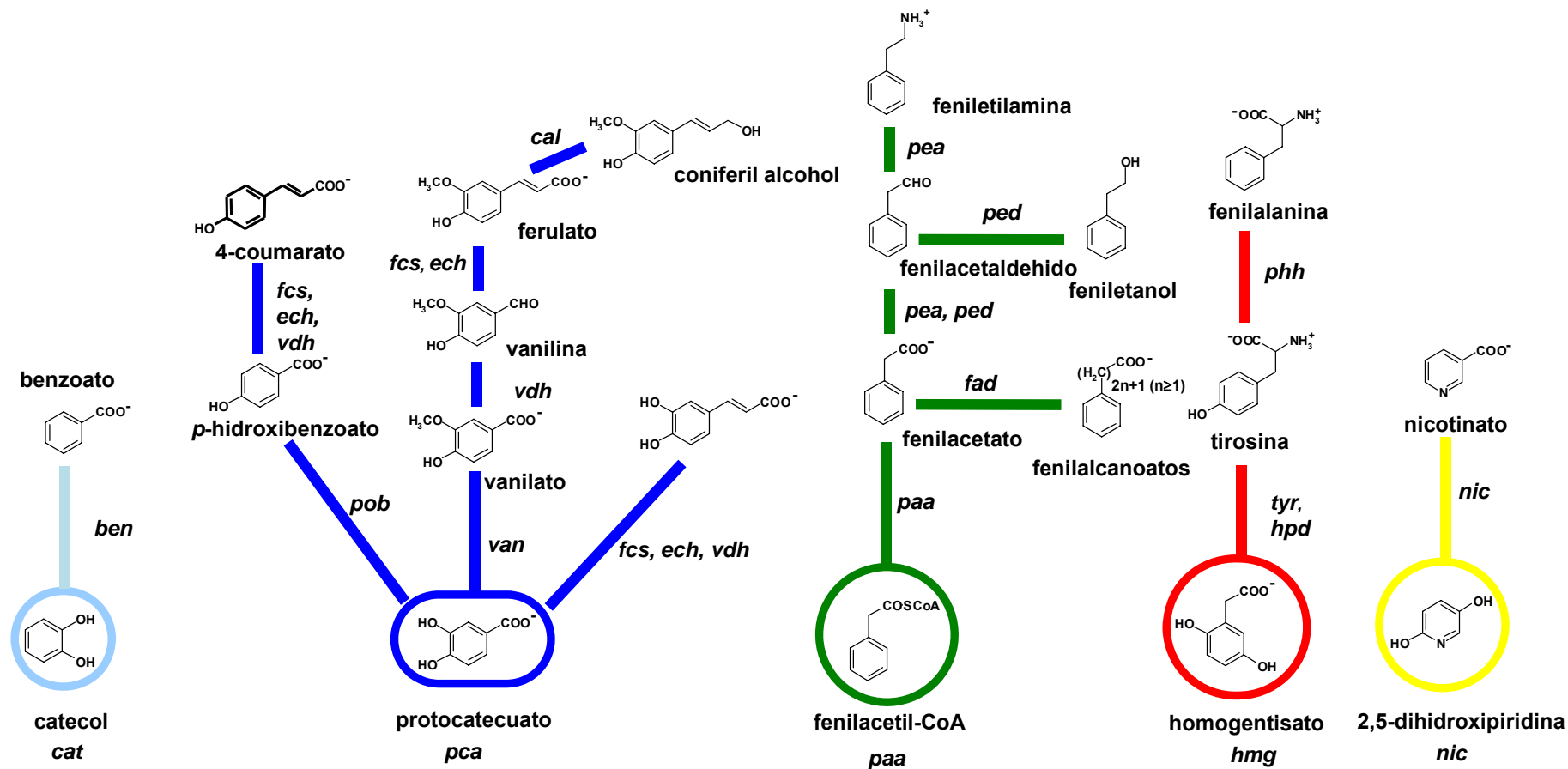


Figura 6. Rutas catabólicas de compuestos aromáticos y sus determinantes genéticos en *P. putida* KT2440. Las diferentes rutas periféricas (líneas de colores) que convergen en el mismo intermediario central (círculo de color) se indican con el mismo código de colores. El nombre de los genes que codifican las rutas periféricas centrales se indican igualmente. Los diferentes metabolitos centrales, mediante los productos de los genes indicados en cada caso, se mineralizan hasta intermediarios del metabolismo central. Figura modificada de (Jiménez *et al.*, 2009).

5. Degradación de ácido gálico.

Un grupo de compuestos aromáticos muy abundante en la naturaleza son los derivados trihidroxilados (en muchos casos, metoxilados) del anillo bencénico. En hongos, la formación de derivados bencénicos trihidroxilados constituye el mecanismo más frecuente para la degradación de un gran número de compuestos aromáticos. En bacterias, por el contrario, la formación de compuestos centrales trihidroxilados no es tan frecuente en el catabolismo aeróbico, siendo probablemente el hidroxiquinol (1,2,4-trihidroxibenceno) el intermediario trihidroxilado mejor estudiado (Fig. 1), el cual se genera en la degradación aeróbica de resorcinol, nitrofenoles, hidroxisalicilatos, etc. (Fig. 1) (Jain *et al.*, 1994; Samanta y Jain, 2000; Perry y Zylstra, 2007; Yoshida *et al.*, 2007).

Un compuesto trihidroxilado muy abundante en la naturaleza es el ácido gálico (GA), ó 3,4,5-trihidroxibenzoato. El GA es un compuesto de origen vegetal que se puede encontrar en la naturaleza de forma libre o formando parte de estructuras más complejas como en el caso de la lignina y los taninos. La lignina es el polímero más abundante de la naturaleza después de la celulosa y representa el 25% de la biomasa terrestre. La acción degradativa de los hongos sobre la lignina genera gran abundancia de compuestos monoméricos, muchos de los cuales son compuestos trihidroxilados con sustituyentes metoxilos e.g., siringato (3,5-dimetoxi-4-hidroxibenzoato) (Fig. 7), 3,4,5-trimetoxibenzoato y 3,4,5-trimetoxicinamato, los cuales originan GA como intermediario su degradación bacteriana (Masai *et al.*, 2007).

Los taninos son, después de la lignina, el segundo grupo más abundante de compuestos fenólicos vegetales. La abundancia de grupos hidroxilos fenólicos en los taninos permite que formen complejos y precipitados con las proteínas, lo que explica su toxicidad. Los galotaninos y elagitaninos generan GA y glucosa como resultado de la actividad hidrolítica de las tanasas de hongos y bacterias (Niehaus y Gross, 1997; Mondal *et al.*, 2000; Aguilar *et al.*, 2007) y de distintas fenoloxidasas fúngicas (Xia *et al.*, 2003) (Fig. 7).

El GA generado puede ser metabolizado, tanto anaeróbicamente como aeróbicamente, mediante distintas rutas centrales (Tack *et al.*, 1972b; Bhat *et al.*, 1998; Mingshu *et al.*, 2006; Masai *et al.*, 2007).

El metabolismo anaeróbico de GA comienza con la descarboxilación de este compuesto para producir pirogalol (Brune y Schink, 1992). La enzima que lleva a cabo

esta etapa enzimática se encuentra ampliamente distribuida en bacterias del rumen, es muy inestable y extremadamente sensible a oxígeno, por lo que aún no ha podido ser purificada ni estudiada en detalle (Mingshu *et al.*, 2006). Interesantemente, esta proteína es utilizada por muchas bacterias únicamente como enzima detoxificante, produciendo pirogalol y no metabolizándolo posteriormente, probablemente debido a la mayor toxicidad que presenta el GA o simplemente porque esta reacción es termodinámicamente favorable para la bacteria (Odenyo *et al.*, 2001; Messerschmidt *et al.*, 2004; Mingshu *et al.*, 2006). En una segunda etapa, el pirogalol producido es posteriormente isomerizado a floroglucinol por una pirogalol-floroglucinol isomerasa (Krumholz *et al.*, 1987; Krumholz y Bryant, 1988), metabolizándose este compuesto mediante la clásica ruta central de degradación reductiva de floroglucinol de bacterias fermentativas como *Eubacterium oxidoreducens* o *Pellobacter acidigallici*. El floroglucinol es reducido por una reductasa dependiente de NADPH a dihidrofloroglucinol, resultando en tres moléculas de acetato finalmente (Krumholz *et al.*, 1987; Boll, 2005).

Al contrario del metabolismo anaeróbico de GA, el metabolismo aeróbico es mejor conocido. Se han descrito dos rutas aeróbicas de degradación de GA. Una de ellas fue identificada en *Citrobacter freundii*, un microorganismo que degrada galotaninos y que fue aislado en las aguas residuales de una fábrica de curtido de pieles. De esta ruta se poseen pocas evidencias experimentales y la mayoría de los intermediarios propuestos necesitan confirmación. *C. freundii* produce una tanasa extracelular que es la encargada de generar GA (Kumar *et al.*, 1999). A continuación la degradación de GA comienza de forma parecida a como ocurre en el metabolismo anaeróbico, mediante la descarboxilación de éste y la producción de pirogalol (Kumar *et al.*, 1999). A partir de aquí, la ruta de degradación diverge de la ruta anaeróbica sugiriéndose que una dioxigenasa de anillo transformaría el pirogalol en un compuesto no aromático (Kumar *et al.*, 1999), siendo probablemente el ácido 2-hidroximucónico el producto de esta reacción (Saeki *et al.*, 1980; Groseclose y Ribbons, 1981). El ácido 2-hidroximucónico sería posteriormente degradado hasta formar piruvato (Kumar *et al.*, 1999).

Una segunda ruta de degradación aeróbica de GA mucho mejor caracterizada que la anterior fue descrita inicialmente en una cepa de *P. putida* aislada en presencia de siringato (3,5 dimetoxi-4-hidroxibenzoato) a principios de los 70s (Tack *et al.*, 1972b) (Fig. 7). En esta segunda ruta, una galato dioxigenasa específica ataca al GA para producir 4-oxalmesaconato (OMA). La enzima, pese a no poder purificarse debido

a su labilidad, se pudo identificar como una extradiol dioxigenasa dada su dependencia de Fe^{2+} . Aunque la galato dioxigenasa producía el mismo producto de reacción que la protocatecuato 4,5-dioxigenasa cuando ambas utilizan GA, son enzimas totalmente distintas, ya que la primera no cataliza la apertura del protocatecuato (Tack *et al.*, 1972b). Se identificó también una aldolasa tipo II como última enzima de la ruta de degradación del GA, la cual produciría la rotura aldólica del producto de hidratación del OMA, oxalacitromalato (CHA), generando un mol de piruvato y un mol de oxalacetato por mol de GA consumido (Tack *et al.*, 1972a) (Fig. 7). La ruta propuesta convergía con la ruta de degradación *meta* de protocatecuato descrita en *Comamonas testosteroni*, siendo ambas bioquímicamente idénticas a partir de la formación de OMA (Fig. 7) (Dagley *et al.*, 1968; Kersten *et al.*, 1982). El protocatecuato es un intermediario central en la degradación de un gran número de compuestos aromáticos muy diversos, e.g., fenilpropenoides, ftalatos, fluoreno hidroxibenzoato, clorobenzoatos, etc (Maruyama, 1985; Harwood y Parales, 1996; Wattiau *et al.*, 2001; Jiménez *et al.*, 2004; Masai *et al.*, 2007), y si bien en la mayoría de las bacterias se metaboliza vía rotura *ortho* (ruta del β -cetoadipato), en algunos microorganismos la degradación de protocatecuato se produce vía rotura *meta*. Esta ruta vía apertura *meta* (Fig. 7) ha sido ampliamente caracterizada en una *Pseudomonas* no fluorescente, *Pseudomonas ochraceae* (Maruyama *et al.*, 1978; Maruyama, 1979, 1983b, a, 1990b). Posteriormente, los determinantes genéticos de la ruta *meta* del protocatecuato han sido identificados en *Sphingomonas paucimobilis* SYK-6 (Masai *et al.*, 1999; Sugimoto *et al.*, 1999; Hara *et al.*, 2000; Hara *et al.*, 2003; Masai *et al.*, 2007), *P. ochraceae* NGJ1 (Maruyama *et al.*, 2004), *Sphingomonas* sp. LB126, (Wattiau *et al.*, 2001), *C. testosteroni* BR6020 (Providenti *et al.*, 2001) o *Arthrobacter keyseri* 12B (Eaton, 2001). *S. paucimobilis* SYK-6 es capaz de generar y metabolizar GA producido endógenamente en el metabolismo del ácido siríngico (Kasai *et al.*, 2005; Masai *et al.*, 2007). Aunque en un principio se pensaba que la protocatecuato 4,5-dioxigenasa (LigAB) era la encargada de romper el anillo aromático del GA, estudios surgidos durante el desarrollo de esta tesis demostraron la existencia de una galato dioxigenasa específica (DesB) que catalizaba eficazmente este paso enzimático (Fig. 7), si bien LigAB también contribuye en menor medida en esta conversión (Kasai *et al.*, 2005). La proteína DesB convierte el GA en OMA, conectando la degradación de GA con la ruta de degradación *meta* de protocatecuato (Fig. 7). No obstante, *S. paucimobilis* SYK-6 no utiliza GA como única fuente de carbono, siendo este compuesto un inhibidor del crecimiento de esta cepa

(Kasai *et al.*, 2005). Por tanto, al inicio de esta tesis no se conocían los determinantes genéticos en ningún microorganismo responsables de la utilización de GA como única fuente de carbono y energía, ni tampoco existían datos sobre cómo se regulan dichos determinantes genéticos.

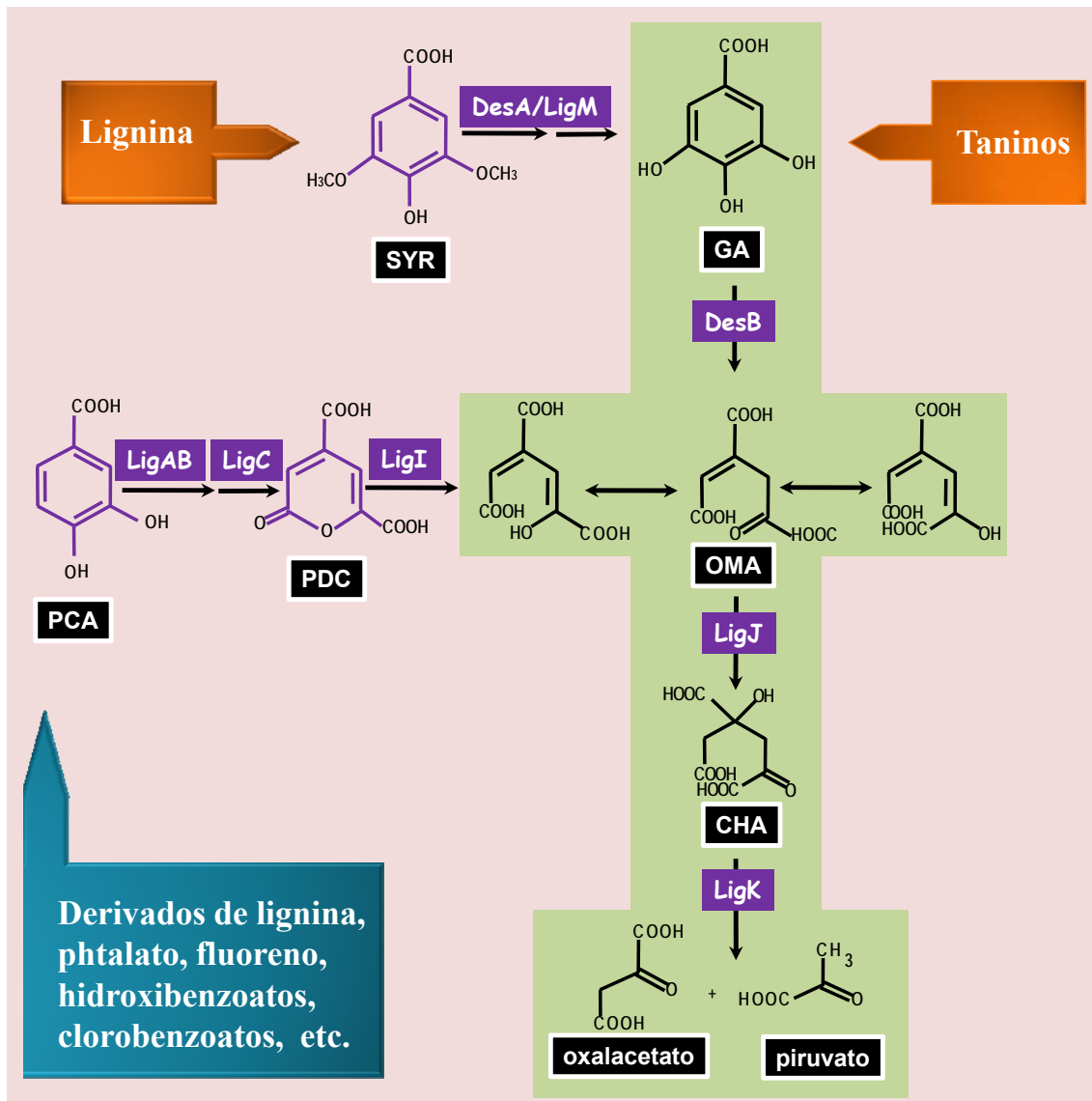


Figura 7. Fuentes de protocatecuato y GA en la naturaleza y convergencia de las rutas aeróbicas de degradación *meta* de protocatecuato y GA vía OMA. Se recuadran en azul y naranja las fuentes vegetales de protocatecuato y GA, respectivamente. Se indica el nombre de los compuestos más destacados: GA (galato), PCA (protocatecuato), SYR (syringato), PCD (2-pirona-4,6 dicarboxilato), OMA (oxalmesaconato), CHA (oxalcitromalato) mostrándose en morado aquellos que se han descrito como fuentes de carbono. Los productos génicos implicados en cada uno de los pasos enzimáticos en *S. paucimobilis* SYK-6 (Masai *et al.*, 2007) se indican en recuadros morados. Se recuadra en verde la ruta propuesta de mineralización de GA por Tack y colaboradores en *P. putida* (Tack *et al.*, 1972b) y de la que se desconocen sus determinantes genéticos.

Dado que *P. putida* se ha descrito en la literatura como una especie capaz de mineralizar GA (Tack *et al.*, 1972b; Sparnins y Dagley, 1975; Chowdhury *et al.*, 2004), que al comienzo de esta tesis se disponía de la secuencia completa del genoma de *P. putida* KT2440 (Nelson *et al.*, 2002), y que el análisis *in silico* del potencial catabólico frente a compuestos aromáticos había identificado un nuevo *cluster* génico, *pcm*, probablemente involucrado en la degradación de compuestos aromáticos vía apertura *meta* (Jiménez *et al.*, 2002), se planteó el estudio de este nuevo *cluster* génico identificado y su posible implicación en el metabolismo del GA en *P. putida* KT2440.

II. OBJETIVOS

Como se ha indicado en Introducción, la bacteria *P. putida* KT2440 posee una gran cantidad de rutas de degradación de compuestos aromáticos codificadas en su genoma, lo que refleja el gran potencial biodegradativo de este organismo. Adicionalmente a la presencia de rutas ya caracterizadas o descritas en otros organismos, el análisis *in silico* del genoma de *P. putida* KT2440 mostró la presencia de un agrupamiento génico, *cluster gal*, que podría estar involucrado en una nueva ruta central de degradación de compuestos aromáticos no descrita hasta la fecha y cuya función era desconocida.

En vista de lo comentado anteriormente, los objetivos propuestos en esta Tesis doctoral han sido:

1. Identificación de la función del *cluster gal* de *P. putida*.
2. Caracterización bioquímica y genética de las enzimas implicadas en la degradación de ácido gálico (GA) en *P. putida*.
3. Caracterización de los genes implicados en el transporte del GA al interior celular de *P. putida*.
4. Estudio de la organización transcripcional y del mecanismo de regulación específica del *cluster gal*.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

1. Cepas bacterianas.

Las cepas de bacterias que se han utilizado en este trabajo se detallan a continuación en la Tabla 2 junto con sus genotipos y características más relevantes.

Tabla 2. Cepas bacterianas empleadas en este trabajo.

Cepa	Genotipo/fenotipo relevante	Referencia
<u>E. coli</u>		
DH5 α	(ϕ 80 <i>lacZ</i> Δ M15) <i>endA1 recA1 hsdR17 (r_K⁻ m_K⁻) supE44 ΔlacU169</i>	(Sambrook y Russell, 2001)
DH10B	F ['] , <i>mcrA Δ(mrr hsdRMS-mcrBC) ϕ80d<i>lac</i>ΔM15 ΔlacX74 deoR recA1 araD139 Δ(ara-leu)7697 galU galK λ rpsL endA1 nupG</i>	Invitrogen
HB101	<i>supE44 ara14 galK2 leuB lacY1 Δ(gpt-proA)62 rpsL20 xyl-5 mtl-1 recA13 Δ(mcrC-mrr) hsdS20 (r_B⁻ m_B⁻) Sm^r</i>	(Sambrook y Russell, 2001)
S17-1 λ pir	Tp ^r Sm ^r <i>recA thi hsdRM⁺ RP4::2-Tc::Mu::Km Tn7 λpir</i> lisogénico	(de Lorenzo y Timmis, 1994)
CC118	<i>Δ(ara-leu) araD ΔlacX74 galE galK phoA20 thi-1 rpsE rpoB argE (Am) recA1 Rf^r Sp^r</i>	Manoil y Beckwith, 1985
BL21 (DE3)	F ⁻ <i>ompT hsdS_B(r_B⁻m_B⁻) gal dcm λDE3</i> (portador del gen <i>l</i> de la RNA polimerasa del fago T7 bajo el control del promotor <i>PlacUV5</i>)	(Sambrook y Russell, 2001)
W ATCC11105	Derivada de <i>E. coli</i> W ATCC 9637 auxótrofa para vitamina B12	(Davis y Mingioli, 1950)
<u>Pseudomonas</u>		
<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	Este trabajo
<i>P. putida</i> KTGALdgalA	Derivado de la cepa KTGAL con una inserción en el gen <i>galA</i>	Este trabajo
<i>P. putida</i> KTGALdgalB	Derivado de la cepa KTGAL con una inserción en el gen <i>galB</i>	Este trabajo
<i>P. putida</i> KTGALdgalC	Derivado de la cepa KTGAL con una inserción en el gen <i>galC</i>	Este trabajo
<i>P. putida</i> KTGALdgalD	Derivado de la cepa KTGAL con una inserción en el gen <i>galD</i>	Este trabajo
<i>P. putida</i> KTGALdgalR	Derivado de la cepa KTGAL con una inserción en el gen <i>galR</i>	Este trabajo
<i>P. putida</i> KTGALdgalT	Derivado de la cepa KTGAL con una inserción en el gen <i>galT</i>	Este trabajo
<i>P. putida</i> KTGALdgalP	Derivado de la cepa KTGAL con una inserción en el gen <i>galP</i>	Este trabajo
<i>P. putida</i> F1	Cepa silvestre.	(Gibson <i>et al.</i> , 1968)
<i>P. putida</i> GPo1	Cepa silvestre.	(Schwartz, 1973)
<i>P. putida</i> U	Cepa silvestre.	CECT 4848
<i>Pseudomonas</i> sp. MT14	Cepa silvestre.	(Williams y Worsey, 1976)
<u>Otras</u>		
<i>Sphingomonas paucimobilis</i> DLJ	Cepa derivada de <i>S. paucimobilis</i> SYK-6 conteniendo una delección en el gen <i>ligJ</i> .	(Hara <i>et al.</i> , 2000)
<i>Burkholderia cepacia</i> 383	Cepa silvestre.	(Coenye y Vandamme, 2003)

2. Plásmidos

Los plásmidos empleados en este trabajo y sus características más relevantes se muestran a continuación en la Tabla 3.

Tabla 3. Plásmidos empleados en este trabajo.

Plásmido	Descripción	Referencia
pK18 <i>mob</i>	Vector de clonación suicida para la construcción de mutantes por recombinación homóloga. Km ^r , <i>ori</i> Cole1, Mob ⁺ , <i>lacZ</i> α	(Schafer <i>et al.</i> , 1994)
pK18GalA	Vector pK18 <i>mob</i> que contiene un fragmento interno del gen <i>galA</i> . Km ^r	Este trabajo
pK18GalB	Vector pK18 <i>mob</i> que contiene un fragmento interno del gen <i>galB</i> . Km ^r	Este trabajo
pK18GalC	Vector pK18 <i>mob</i> que contiene un fragmento interno del gen <i>galC</i> . Km ^r	Este trabajo
pK18GalD	Vector pK18 <i>mob</i> que contiene un fragmento interno del gen <i>galD</i> . Km ^r	Este trabajo
pK18GalR	Vector pK18 <i>mob</i> que contiene un fragmento interno del gen <i>galR</i> . Km ^r	Este trabajo
pK18GalP	Vector pK18 <i>mob</i> que contiene un fragmento interno del gen <i>galP</i> . Km ^r	Este trabajo
pK18GalT	Vector pK18 <i>mob</i> que contiene un fragmento interno del gen <i>galT</i> . Km ^r	Este trabajo
pBBR1MCS-5	Vector de clonación de amplio espectro de huésped, Gm ^r <i>ori</i> pBBR1MCS, Mob ⁺ , <i>lacZ</i> α	(Kovach <i>et al.</i> , 1995)
pKTGAL	Vector pBBR1MCS-5 que contiene el agrupamiento <i>gal</i> completo procedente de la cepa KT2440. Gm ^r	Este trabajo
pGAL	Vector pBBR1MCS-5 que contiene el agrupamiento <i>gal</i> completo procedente de la cepa KTGAL. Gm ^r	Este trabajo
pIZ1016	Vector de clonación de amplio espectro de huésped, Gm ^r <i>ori</i> pBBR1MCS Mob ⁺ , <i>lacZ</i> α, <i>Ptac/lacI^q</i>	(Moreno-Ruiz <i>et al.</i> , 2003)
pIZGalA	Vector pIZ1016 que contiene el gen <i>galA</i> . Gm ^r	Este trabajo
pIZGalB	Vector pIZ1016 que contiene el gen <i>galB</i> . Gm ^r	Este trabajo
pIZGalC	Vector pIZ1016 que contiene el gen <i>galC</i> . Gm ^r	Este trabajo
pIZGalT	Vector pIZ1016 que contiene el gen <i>galT</i> . Gm ^r	Este trabajo
pIZP _B	Vector pIZ1016 que contiene la fusión traduccional P _B :: <i>lacZ</i> . Gm ^r	Este trabajo
pIZP _R	Vector pIZ1016 que contiene la fusión traduccional P _R :: <i>lacZ</i> . Gm ^r	Este trabajo
pIZP _T	Vector pIZ1016 que contiene la fusión traduccional P _T :: <i>lacZ</i> . Gm ^r	Este trabajo
pGEM-T easy	Vector de clonación de productos de PCR, Ap ^r , <i>ori</i> Cole1, <i>lacZ</i> α	Promega
pGEMTGalC	Vector pGEM-T easy que contiene el gen <i>galC</i> . Ap ^r	Este trabajo
pGEMTGalD	Vector pGEM-T easy que contiene el gen <i>galD</i> . Ap ^r	Este trabajo
pGEMTGalDc	Vector pGEM-T easy que contiene el gen <i>galD</i> . Ap ^r	Este trabajo
pGEMTGalR	Vector pGEM-T easy que contiene el gen <i>galR</i> . Ap ^r	Este trabajo
pGEMTGalRint	Vector pGEM-T easy que contiene un fragmento interno del gen <i>galR</i> (672 pb). Ap ^r	Este trabajo

pGEMTGalTint	Vector pGEM-T easy que contiene un fragmento interno del gen <i>galT</i> (609 pb). Ap ^r	Este trabajo
pET-29a (+)	Vector de clonación e hiperexpresión, Km ^r , <i>ori</i> ColE1	Novagen
pETGalA	Vector pET-29a (+) que expresa el gen <i>galA</i> . Km ^r	Este trabajo
pETGalD	Vector pET-29a (+) que expresa el gen <i>galD</i> . Km ^r	Este trabajo
pETGalDc	Vector pET-29a (+) que expresa el gen <i>galD</i> . Km ^r	Este trabajo
pETGalB	Vector pET-29a (+) que expresa el gen <i>galB</i> . Km ^r	Este trabajo
pGEMTBH14A	Vector pGEMT-easy que contiene el gen <i>galB</i> con la sustitución H14A. Ap ^r	Este trabajo
pGEMTBA16D	Vector pGEMT-easy que contiene el gen <i>galB</i> con la sustitución A16D. Ap ^r	Este trabajo
pGEMTBD17A	Vector pGEMT-easy que contiene el gen <i>galB</i> con la sustitución D17A. Ap ^r	Este trabajo
pGEMTBH127A	Vector pGEMT-easy que contiene el gen <i>galB</i> con la sustitución H127A. Ap ^r	Este trabajo
pGEMTBH198A	Vector pGEMT-easy que contiene el gen <i>galB</i> con la sustitución H198A. Ap ^r	Este trabajo
pETBH14A	Vector pET-29a (+) que expresa el gen <i>galB</i> con la sustitución H14A. Km ^r	Este trabajo
pETBA16D	Vector pET-29a (+) que expresa el gen <i>galB</i> con la sustitución A16D. Km ^r	Este trabajo
pETBD17A	Vector pET-29a (+) que expresa el gen <i>galB</i> con la sustitución D17A. Km ^r	Este trabajo
pETBH127A	Vector pET-29a (+) que expresa el gen <i>galB</i> con la sustitución H127A. Km ^r	Este trabajo
pETBH189A	Vector pET-29a (+) que expresa el gen <i>galB</i> con la sustitución H198A. Km ^r	Este trabajo
pETGalC	Vector pET-29a (+) que expresa el gen <i>galC</i> . Km ^r	Este trabajo
pETGalR	Vector pET-29a (+) que expresa el gen <i>galR</i> . Km ^r	Este trabajo
pETGalT	Vector pET-29a (+) que expresa el gen <i>galT</i> . Km ^r	Este trabajo
pSJ3	Vector de búsqueda de promotores, <i>lacZ</i> flanqueado por sitios <i>NotI</i> (fusiones traduccionales). Ap ^r , <i>ori</i> ColE1, ' <i>lacZ</i>	(Ferrández <i>et al.</i> , 1998)
pSJ3P _R	Vector pSJ3 que contiene la fusión traduccional P _R :: <i>lacZ</i> . Ap ^r	Este trabajo
pSJ3galRP _B	Vector pSJ3 que contiene la fusión traduccional P _B :: <i>lacZ</i> y el gen <i>galR</i> . Ap ^r	Este trabajo
pSJ3P _B	Vector pSJ3 que contiene la fusión traduccional P _B :: <i>lacZ</i> . Ap ^r	Este trabajo
pSJ3P _T	Vector pSJ3 que contiene la fusión traduccional P _T :: <i>lacZ</i> . Ap ^r	Este trabajo
pJCD01	Plásmido utilizado para los experimentos de transcripción in vitro. Ap ^r , <i>ori</i> ColE1, MCS de pUC19 flanqueado por los terminadores de los genes <i>rpoC</i> y <i>rrnBTIT2</i> .	(Marschall <i>et al.</i> , 1998)
pJCDP _B P _R	Derivado de pJD01 que contiene la región promotora <i>PbPr</i>	Este trabajo

3. Medios y condiciones de cultivo.

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 0,08 mM, así como isopropil-1-tio- β -galactopiranosido (IPTG) 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).

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 fue denominado medio MC. A este medio MC 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 siringato, pirogalol, protocatecuato y fenilacetato, se prepararon a una concentración 1 M disolviéndose en H₂O, a excepción del fenilacetato que se disolvió en isopropanol. El galato, metil-galato y ácido tánico, se añadieron directamente al medio de cultivo. El citrato, succinato, acetato, piruvato, glucosa y casaminoácidos se utilizarán a una concentración del 0,2% (p/v).

Cuando las células fueron cultivadas en galato, metil-galato y ácido tánico el medio de cultivo fue suplementado con L-cisteína 2 mM de y el pH ajustado a 6,5 para evitar la oxidación de estos compuestos.

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 600 nm (A_{600nm}) empleando un espectrofotómetro Beckman DU-520.

Los antibióticos se prepararon en soluciones (1000x) en agua, a excepción de la ampicilina, que se preparó en soluciones 250x y el 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 (Ap, 100 µg/ml), cloranfenicol (Cm, 34 µg/ml), kanamicina (Km, 50 µg/ml), y gentamicina (Gm, 10 µg/ml).

Durante periodos inferiores a un mes las cepas se conservaron a 4°C en placas de LB o medio mínimo. Para la 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. Procedimientos de transferencia génica

4.1. Transformación y electroporación.

Las células de *E. coli* 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 .

4.2. Transferencia de plásmidos por conjugación

Los plásmidos se movilizaron por conjugación tri-parental siguiendo el método descrito previamente (de Lorenzo y Timmis, 1994) y utilizando la cepa *E. coli* HB101 (pRK600) como *helper*. Los transconjugantes fueron seleccionados en placas de medio LB con los correspondientes antibióticos o, en el caso de utilizar *Pseudomonas* como organismo receptor, en placas de medio mínimo MC conteniendo citrato al 0.2% y el correspondiente antibiótico. En determinadas ocasiones se realizó una conjugación bi-parental utilizando la cepa *E. coli* S17-*lpir* como donadora (de Lorenzo y Timmis, 1994).

5. Técnicas de manipulación del DNA.

Las técnicas utilizadas para la preparación y manipulación del DNA han sido descritas previamente (Sambrook y Russell, 2001). Las enzimas de restricción se obtuvieron de Amersham, Tanaka y New England Biolabs. La enzima T4 DNA ligasa fue proporcionada por USB (Amersham), la DNA polimerasa I y el fragmento Klenow de la DNA polimerasa I de *E. coli* fueron suministradas por Biotools B. M. Labs. La RNA polimerasa utilizada en los ensayos de transcripción *in vitro* y de protección a la digestión con DNaseI (*footprinting*) fue suministrada por USB (*E. coli* RNA Polymerase Holoenzyme 1 U/ μ l). Todas las enzimas se utilizaron siguiendo las indicaciones de las respectivas casas comerciales. Los fragmentos de DNA se purificaron empleando geles de agarosa, mediante el kit *GeneClean* (BIO 101) siguiendo las indicaciones del fabricante.

5.1 Aislamiento de DNA plasmídico.

La extracción de DNA plasmídico se llevó a cabo empleando el sistema *High Pure Plasmid Purification Kit* (Roche), de acuerdo con el protocolo del fabricante.

5.2. 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 y la Pfu polimerasa, ambas proporcionadas por Biotools B. M. Labs. Las mezclas de reacción contenían MgCl₂ 1,5 mM y dNTPs 0,2 mM. Los productos amplificados se purificaron con el sistema *High Pure PCR Product Purification Kit* (Roche).

Los distintos oligonucleótidos empleados en las reacciones de PCR se indican en la Tabla 4, en la que se detalla la región amplificada y la finalidad del producto. Los oligonucleótidos fueron sintetizados empleando un equipo Oligo-1000M (Beckman Instruments, Inc.) en el servicio de Química de Proteínas del Centro de Investigaciones Biológicas, o bien fueron adquiridos a Sigma-Genosys.

Tabla 4. Oligonucleótidos empleadas en este trabajo.

Nombre	Secuencia 5'-3'	Descripción
galA5'int	CGGAATTCGACATGAGCTTTTCCGCG	Determinación de la expresión del gen <i>galA</i> en experimentos de RT-PCR y clonación de un fragmento interno del gen <i>galA</i> para la realización del mutante KTGALd <i>galA</i> . <i>EcoRI</i>
galA3'int	CGGAATTCAGCGTTTCTGAGCGAAC	Determinación de la expresión del gen <i>galA</i> en experimentos de RT-PCR; clonación de un fragmento interno del gen <i>galA</i> para la realización del mutante KTGALd <i>galA</i> ; clonación del gen <i>galT</i> . <i>EcoRI</i>
galB5'int	CCGACTTTGTCTGGCGTGCCG	Determinación de la expresión del gen <i>galB</i> en experimentos de RT-PCR y clonación de un fragmento interno del gen <i>galB</i> para la realización del mutante KTGALd <i>galB</i>
galB3'int	GCGCTGCAGGGCTACACGGG	Expresión del gen <i>galB</i> en experimentos de RT-PCR y clonación de un fragmento interno del <i>galB</i> para la realización del mutante KTGALd <i>galB</i> . <i>PstI</i>
galC5'int	TGCATGAGGCCCAAGTCGCAAGG	Amplificación de un fragmento interno del gen <i>galC</i> para la realización del mutante KTGALd <i>galC</i>
galC3'int	CACGATGTCACCGGCATTGACC	Amplificación de un fragmento interno del gen <i>galC</i> para la realización del mutante KTGALd <i>galC</i>
galD5'int	GGGAATCCAGATTGACGGCATCGGCGG C	Amplificación de un fragmento interno del gen <i>galD</i> para la realización del mutante KTGALd <i>galD</i>

galD3'int	CCC <u>GTCGACT</u> TGACCGTGCCGCCGTTGC GC	Amplificación de un fragmento interno del gen <i>galD</i> para la realización del mutante KTGALD <i>galD</i> . <i>SalI</i>
galR5'int	GGGAATTCGCGCTGACCGACTATGG	Clonación de fragmento interno del gen <i>galR</i> para la realización del mutante KTGALD <i>galR</i> . <i>EcoRI</i>
galR3'int	CGGCAACACCCAGCGCGCC	Amplificación de un fragmento interno del gen <i>galR</i> para la realización del mutante KTGALD <i>galR</i>
5'RTgalT	GCTGGAATTCGCTGCCGGCACCCGCTTT ACC	Amplificación de un fragmento interno del gen <i>galT</i> para la realización del mutante KTGALD <i>galT</i> . <i>EcoRI</i>
Sec6	CGAAAAATGGCCCCGAAGCG	Amplificación de un fragmento interno del gen <i>galT</i> para la realización del mutante KTGALD <i>galT</i>
Sec3	TCCTGCGCGCCGATGACG	Secuenciación cluster <i>gal</i> y amplificación de un fragmento interno del gen <i>galP</i> para la realización del mutante KTGALD <i>galP</i>
Sec4	CGGTTGTTTCAGTTCGCTGCC	Secuenciación cluster <i>gal</i> y amplificación de un fragmento interno del gen <i>galP</i> para la realización del mutante KTGALD <i>galP</i>
galTXhoI	GGGGCTCGAGAGCGCGGAATGTAGTC AGC	Construcción de la casete pGAL. <i>XhoI</i>
GalA5'	CGCATATGGGCTCGTATCATTGGTGG	Clonación del gen <i>galA</i> . <i>NdeI</i>
GalA3'	CGGAATTCCTCCAGGGATGGCAAAGCG C	Clonación del gen <i>galA</i> y para la Sustitución del cambio de fase en el gen <i>galT</i> . <i>EcoRI</i>
5' GalBpET	GGCATATGAATACCCACAAAAATCCG	Clonación del gen <i>galB</i> . <i>NdeI</i>
3'GalB	GGGACGTCGGTCTTGCCGATCAGCCCC C	Clonación del gen <i>galB</i> . <i>SacI</i>
5'galBH14A	CATATGAATACCCACAAAAATCCGCC CTGGTGGTCAGCGCAGCGTCCG	Clonación del gen <i>galB</i> que codifica GalBH14A. <i>NdeI</i>
5'galBA16D	CATATGAATACCCACAAAAATCCGCC CTGGTGGTCAGCGCACATTCCGACGAC T	Clonación del gen <i>galB</i> que codifica GalBA16D. <i>NdeI</i>
5'galBD17A	CATATGAATACCCACAAAAATCCGCC CTGGTGGTCAGCGCACATTCCGCCGCT TTG	Clonación del gen <i>galB</i> que codifica GalBD17A. <i>NdeI</i>
5'galBH127A	CCTTACAACACTACGACGCTCCGCTGGCCA TGCAC	Clonación del gen <i>galB</i> que codifica GalBH127A.
3'galBH127A	GTGCATGGCCAGCGGAGCGTCGTAGTT GTAAGG	Clonación del gen <i>galB</i> que codifica GalBH127A.
5'galBH198A	CAGGAAGCCCTCTGGGAGTACTACACC	Clonación del gen <i>galB</i> que codifica GalBH198A.
3'galBH198A	GGTGTAGTACTCCCAGAGGGCTTCCTG	Clonación del gen <i>galB</i> que codifica GalBH198A
5'GalDPET	CCGACCTGGAAGGCTGCATATGGGC	Clonación del gen <i>galD</i> . <i>NdeI</i>
5'GalDPETc	CATATGGGCCAGACCCGCATCCCGTGC CTG	Clonación del gen <i>galD</i> . <i>NdeI</i>
3'GalD	CCGTCGACGGTCAGTGCACCTTGC GGTTGT CC	Clonación del gen <i>galD</i> . <i>SalI</i>
5'pETC	GGCATATGAGCGGGCTGATCGGCAAG	Clonación del gen <i>galC</i> . <i>NdeI</i>

5'pcmZ	CCCAAGCTTTGACCTAAGGAGGTAAAT AATG	Clonación del gen <i>galC</i> . <i>HindIII</i>
3'galC	CCGAGCTCGGCAGGGTATGCGGGTCTG G	Clonación del gen <i>galC</i> . <i>SacI</i>
5'pETR	CCGACCATAATGATCGATGTGCGAACTGC CCAACC	Clonación del gen <i>galR</i> . <i>NdeI</i>
3'pETR	CCCTCGAGGCACCAACAGTTTCGATGA GAACAG	Clonación del gen <i>galR</i> . <i>XhoI</i>
Sec5	GCGGCCTGTGCATCGTCTC	Secuenciación del gen <i>galT</i>
RT_DC 5'	C GCCGACCTGGAAGAACGG	Determinación de la expresión de la región intergénica <i>galD/galC</i> en experimentos de RT-PCR.
Sec8	CGCCGGCCAGAATGTTGC	Determinación de la expresión de la región intergénica <i>galD/galC</i> en experimentos de RT-PCR.
RT_BC 5'	GCCGGTCTACGCCTTTGAGCC	Determinación de la expresión de la región intergénica <i>galB/galC</i> en experimentos de RT-PCR.
RT_BC 3'	CCTTGCGACCTTGGGCCTC	Determinación de la expresión de la región intergénica <i>galB/galC</i> en experimentos de RT-PCR.
5'galAPHE	GTACTGGGTGTGTCCAACCTGG	Determinación de la expresión de la región intergénica <i>galP/galA</i> en experimentos de RT-PCR.
RT_AT 5'	CGCTTCGGGGCCATTTTCG	Determinación de la expresión de la región intergénica <i>galA/galT</i> en experimentos de RT-PCR.
RT_AT 3'	CAGGGTGAAGGCGCTGTAATGC	Determinación de la expresión de la región intergénica <i>galA/galT</i> en experimentos de RT-PCR.
5'RTgalT.2	GATAACCGCCCCATTGCTGCC	Determinación de la expresión del gen <i>galT</i> en experimentos de RT-PCR.
3'RTgalT.2	GCAGTTGGGCATGGCCGC	
5'pETgalT	TCACCACATATGCTTAAGCCTCC	Clonación del gen <i>galT</i> . <i>NdeI</i>
pBlacZ5'	CCGGGATCCCTCCTGGGCTCACGCCTGC	Clonación del promotor P_B y P_R . <i>BamHI</i>
pBlacZ3'	CGGGATCCGCGGATTTTGTGGGGTATT	Clonación del promotor P_B y P_R . <i>BamHI</i>
pTlacZ5'	GGGTTCGACAGCGCGGAATGTAGTCAG C	Clonación del promotor P_T . <i>Sall</i>
5'galBLacZ	CCGTCGACTCCTGGGCTCACGCCTGC	Clonación del promotor P_B junto al gen <i>galR</i> . <i>Sall</i>
pTlacZ3'	C GGGATCCTCGACAGGAGGCTTAAGCAT GCGTGGT	Clonación del promotor P_T . <i>BamHI</i>
3'GalBLacZ- EcoRI	GGGAATTCGCGGATTTTGTGGGGTATT C	Marcaje de la sonda <i>PbP</i> en la hebra no codificante. <i>EcoRI</i>
5pBEcoRI	CCGGAATTCAACGCGGACTTGCATC AGG	Marcaje de la sonda <i>PbPr</i> en la hebra codificante. <i>EcoRI</i>
5pTEcoRI	GCCGAATTCAGCGCGGGAATGTAGTCA GC	Marcaje de la sonda <i>Pt</i> en la hebra codificante del gen <i>galT</i> . <i>EcoRI</i>
Sec2	GCACTGCCCGGCCATCG	Secuenciación del <i>cluster gal</i> .
F24	C GCCAGGGTTTCCAGTCACGAC	Empleado para analizar las disrupciones insercionales generadas mediante el plásmido pK18 <i>mob</i> .
R24	A GCGGATAACAATTTACACAGGA	Empleado para analizar las interrupciones génicas generadas mediante el plásmido pK18 <i>mob</i> .
Lac 57	C GATTAAGTTGGGTAACGCCAGGG	Determinación del sitio +1 de los promotores P_B , P_R y P_T

Se indica subrayada en la secuencia la diana de restricción que contienen algunos oligonucleótidos.

5.3. Secuenciación de DNA.

La secuenciación de DNA se llevó a cabo en el servicio de secuenciación automática de DNA del Centro de Investigaciones Biológicas utilizando un secuenciador automático modelo ABI Prism 3730 (Applied Biosystems). Para la reacción de secuenciación se utilizó el “Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit” de Applied Biosystems, y la DNA polimerasa AmpliTaq FS, de acuerdo con 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.

En el caso concreto de los experimentos de extensión por cebador (*primer extension*), la secuenciación del DNA patrón se llevó a cabo según el método de terminación de la polimerización por dideoxinucleótidos (Sanger *et al.*, 1977) utilizando el *T7 Sequencing™ Kit* (Amersham Pharmacia Biotech), y $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP}$ ($14,8 \times 10^{12}$ Bq/mmol, $3,7 \times 10^5$ Bq/ μl) (Amersham Biosciences) como deoxinucleósido trifosfato marcado radiactivamente, siguiendo las recomendaciones de los fabricantes.

5.4. Construcción de cepas mutantes *P. putida* KTGALdgal mediante mutagénesis insercional.

Para la construcción de los distintos mutantes *P. putida* KTGALdgal se procedió a la interrupción de los genes *galA*, *galB*, *galC*, *galD*, *galR*, *galP* y *galT* por recombinación homóloga. Para ello, se amplificaron fragmentos internos de cada uno de los genes citados, y se clonaron en el *polylinker* de pK18*mob* (plásmido movilizable que no replica en *Pseudomonas*). Las construcciones resultantes pK18GalA pK18GalB, pK18GalC, pK18GalD, pK18GalR, pK18GalP y pK18GalT (Tabla 3) (Fig. 14), fueron transferidas de la cepa donadora, *E. coli* DH10B, a la cepa receptora, *P. putida* KTGAL, mediante conjugación triparental utilizando la cepa *helper* *E. coli* HB101 (pRK600). Las transconjugantes presentaban interrumpido el gen diana mediante recombinación homóloga con los respectivos derivados del plásmido suicida pK18*mob* (Schafer *et al.*, 1994), y fueron seleccionados en medio MC conteniendo kanamicina (50 $\mu\text{g/ml}$) y citrato 0.2% (p/v) como fuente de carbono para la contraselección de la cepa donadora. Los mutantes obtenidos fueron analizados por PCR, empleando un oligonucleótido

específico del vector pK18*mob* (F24 ó R24; Tabla 4) y un oligonucleótido externo al fragmento clonado, para confirmar la disrupción de los respectivos genes truncados.

5.5. Mutagénesis dirigida del gen *galB*.

La construcción de mutaciones dirigidas en el gen *galB* se llevó a cabo siguiendo un protocolo en el que se emplean dos etapas sucesivas de PCR utilizando DNA genómico de *P. putida* KTGAL como molde y los oligonucleótidos diseñados que incluyen las mutaciones y se indican en la Tabla 4.

En una primera etapa, se amplificaron dos fragmentos del gen. El primero de ellos comprende desde el codón de inicio hasta el codón donde se inserta la mutación. El segundo fragmento comprende desde el codón de la mutación hasta el codón *stop*. En la segunda etapa de PCR se emplearon como molde los dos fragmentos obtenidos anteriormente, que solapan en la región de la mutación, y se amplificaron con los oligonucleótidos que hibridan en la posición 5' (5'*galBpET*; Tabla 4) y 3' (3'*galB*; Tabla 4) del gen *galB*, regenerando de esta forma un gen completo que incluye la mutación deseada. Para la construcción de las mutaciones GalBH14A, GalBA16D y GalBD17A, al estar la mutación muy próxima al extremo 5' del gen, la construcción de las variantes del gen *galB* se realizó en un solo paso, incorporando el cambio en el oligonucleótido 5' (Tabla 4). Los productos de PCR así obtenidos fueron purificados y se clonaron en el vector pGEM-T easy. Finalmente, los genes mutados se subclonaron en el vector de hiperexpresión pET-29a (+) (Novagen) empleando las dianas de restricción *NdeI* y *SacI* presentes en los oligonucleótidos 5'*galBpET* y 3'*galB*, respectivamente.

6.0. Técnicas de manipulación de RNA

6.1. Extracción de RNA.

Para la extracción del RNA total se cultivó a *P. putida* en medio mínimo MC, utilizando la fuente de carbono correspondiente. Las células fueron recogidas por centrifugación a 10.000 g durante 10 min cuando alcanzaron la mitad de su fase exponencial de crecimiento (A_{600nm} de 0,45-0,5 aproximadamente). El RNA total se extrajo utilizando el RNeasy kit (Qiagen) siguiendo las instrucciones del fabricante. A

continuación, el RNA fue procesado para la eliminación de DNA contaminante mediante el tratamiento con el *DNase and Removal treatment kit* (Ambion) siguiendo las especificaciones del fabricante. La concentración y pureza de las muestras de RNA fue medida con un espectrofotómetro ND1000 (Nanodrop Technologies), siguiendo las indicaciones del fabricante.

6.2. Retro-transcripción seguida de reacción de PCR (RT-PCR)

La reacción de retro-transcripción se realizó a partir de 1 µg de RNA total, empleando 200 U de la transcriptasa reversa *SuperScript II* (Invitrogen), 0,5 mM de cada uno de los dNTPs y 0,5 µM del oligonucleótido correspondiente, en un volumen final de 30 µl siguiendo las recomendaciones del fabricante. La mezcla se incubó durante 1 h a 42 °C. Se emplearon 15 µl de esta reacción (cDNA) como molde para la PCR posterior. El cDNA se amplificó utilizando 1 U de la DNA polimerasa de Biotools, y los oligonucleótidos correspondiente tal y como se detalla en el apartado 5.2 de esta sección. En cada una de las reacciones de PCR se incluyó un control con 15 µl de la reacción de RT en la que no se empleó la transcriptasa reversa, y en el que no se obtuvo ninguna banda de amplificación, lo que indica que las preparaciones de RNA no contenían DNA contaminante.

6.3. Determinación del sitio de inicio de la transcripción.

La técnica de extensión del cebador permitió determinar los sitios de iniciación de la transcripción a partir de los promotores P_B , P_R y P_T . Para ello, se cultivaron células de *P. putida* KTGAL conteniendo los plásmidos (pIZP_B, pIZP_R y pIZP_T) en GA (5 mM) o citrato (0,2 %) como condiciones de inducción o no inducción, respectivamente. Cuando las células alcanzaron una A_{600nm} de 0,6, se recogieron 6 ml de cada cultivo que se centrifugaron, lavaron y resuspendieron para proceder a la extracción de su RNA siguiendo el procedimiento descrito en el apartado anterior. Una vez extraído el RNA, se procedió al análisis de los sitios de inicio de la transcripción. La extensión se realiza mediante un cebador que hibrida con el mRNA en una posición cercana del supuesto sitio de iniciación de la transcripción. Para la identificación de la posición +1 los promotores *gal* se empleó el oligonucleótido Lac 57 (Tabla 4), que hibrida entre los

nucleótidos 39 y 62 respecto al residuo de adenina del codón de inicio de la traducción del gen *lacZ*.

Para el marcaje del oligonucleótido Lac 57 se emplearon 7 μ l del oligonucleótido (2,5 μ M), 2 μ l de tampón T4 polinucleótido kinasa 10x (Biolabs), 10 μ l de [γ - 32 P] ATP (3.000 Ci/mmol) (Amersham Pharmacia Biotech) y 10 U de T4 polinucleótido kinasa (Biolabs) en un volumen total de 20 μ l. Esta mezcla se incubó a 37 °C durante 30 min y la reacción se paró añadiendo 0,5 μ l de SDS 10% (p/v) y 0,5 μ l de EDTA 0,5 M pH 8,0. La mezcla de reacción se calentó a 65 °C durante 10 min y a continuación se añadió tampón TE (Tris-HCl 10 mM pH 7,5, EDTA 1 mM) hasta un volumen final de 100 μ l. Finalmente los oligonucleótidos marcados fueron purificados mediante la utilización de una columna de Sephadex G-25 previamente equilibrada en tampón TE.

Se tomaron 25 μ g de RNA purificado, el oligonucleótido marcado en el paso anterior (5 x 10⁵ cpm), 10 μ l de tampón acetato sódico 3 M pH 5,2 y agua destilada hasta completar un volumen final de 100 μ l. La mezcla resultante fue precipitada y lavada con etanol absoluto y etanol 70%, respectivamente. Tras secar la muestra a temperatura ambiente, el pellet resultante se resuspendió en 30 μ l de tampón de hibridación (PIPES 40 mM pH 6,6, formamida 1 mM, EDTA 1 mM pH 8,0, NaCl 0,4 M), se calentó a 85 °C durante 10 min. La hibridación del oligonucleótido Lac 57 con el RNA se dejó a 45 °C durante una noche. Después de ese tiempo, se añadieron otros 70 μ l de tampón de hibridación y la mezcla resultante fue precipitada con etanol absoluto y lavada con etanol 70% secándose posteriormente a temperatura ambiente.

El sedimento obtenido en el paso anterior se resuspendió en 10 μ l de una mezcla de reacción compuesta por 1 μ l de tampón 10x de transcriptasa reversa *Super ScriptTM II RNase H Reverse Transcriptase* (Invitrogen), 3,6 μ l de dNTPs 2,5 mM, 3 U de transcriptasa reversa *Super ScriptTM II* y agua destilada hasta 10 μ l. Esta mezcla se incubó 1 h a 42 °C y después de ese tiempo se detuvo la reacción añadiendo 2 μ l de NaOH 2 N. La muestra se mantuvo a temperatura ambiente durante una noche y después fue precipitada añadiendo 1,5 μ l de acetato sódico 3M y 30 μ l de etanol absoluto. Finalmente la muestra se lavó y secó obteniéndose un sedimento que fue resuspendido en 4 μ l de solución STOP (formamida 0,5% (v/v), EDTA 20 mM; azul de bromofenol 0,05% (p/v) y xilencianol 0,05% (p/v)). El resultado de la reacción fue analizado por electroforesis en gel de poliacrilamida 6%-urea 8M (Sambrook y Russell,

2001), detectándose los productos de la reacción por autorradiografía en películas HyperfilmTM-MP (Amersham Pharmacia Biotech) utilizando pantallas amplificadoras (Cronex Lightning Plus DuPont)). La secuenciación de los plásmidos pIZP_B, pIZP_R y pIZP_T se realizó utilizando el oligonucleótido Lac57, como se describe en el apartado 5.3 de esta sección.

7. Técnicas de manipulación de proteínas.

7.1. Obtención de los extractos proteicos.

Para la obtención de extractos crudos de *P. putida* KTGAL y sus cepas derivadas, las células se cultivaron en medio mínimo con la fuente de carbono apropiada en cada caso hasta alcanzar una $A_{600\text{nm}}$ de 0,5. 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). Las cepas de *E. coli* y *Pseudomonas* que expresan las distintas proteínas en vectores de hiperproducción se cultivaron en medio LB y, en los casos en los que fue necesario, se añadió IPTG a una concentración entre 0.1 mM y 1 mM cuando el cultivo había alcanzado una $A_{600\text{nm}}$ de 0.5-0.6. La inducción con IPTG se mantuvo durante 4 h. Para la obtención de los extractos proteicos, se procedió de forma idéntica a como se ha descrito anteriormente. Para la determinación de la proteína en los extractos se utilizó el reactivo de Bradford (Bradford, 1976).

7.2. Purificación de la proteína GalA.

Un preinóculo de 50 ml de células de *E. coli* BL21 (DE3) (pETGalA) fue cultivado durante 12 h en medio rico LB con agitación (200 rpm) a 37 °C. Posteriormente este cultivo fue diluido en medio fresco a una $A_{600\text{nm}}$ de 0.01 e inducido con IPTG 0.1 mM cuando las células habían alcanzado una $A_{600\text{nm}}$ de 0,6, manteniéndose la inducción durante 4 h, al cabo de este tiempo, las células fueron recogidas por centrifugación y se concentraron en un volumen de 20 ml de tampón MOPS 50 mM, pH 8,0 conteniendo SO₄Fe 2 μM, L-Cisteína 2 mM y glicerol 10% (tampón de purificación).

A continuación, las células se lisaron empleando la prensa de French y se obtuvo el extracto proteico como se indica en el apartado anterior. El extracto crudo se ultracentrifugó durante una hora a 50.000 g. Posteriormente, al sobrenadante de esta etapa de ultracentrifugación se le añadió SO_4NH_4 1 M y se le hizo pasar a través de una columna (3 ml) de fenil-sefarosa CL-4 previamente equilibrada con tampón de purificación conteniendo SO_4NH_4 1 M. La columna fue conectada a una bomba peristáltica y se lavó con 50 ml de tampón de purificación conteniendo SO_4NH_4 1 M empleando un flujo de 0,5 ml/min. A continuación, la proteína GalA fue eluida de la columna utilizando un gradiente lineal de 500 ml de tampón de purificación y 500 ml de este mismo tampón conteniendo SO_4NH_4 1 M. Se registró la $A_{280\text{nm}}$ de las fracciones recogidas y se comprobó su pureza mediante SDS-PAGE al 12,5 %. Las fracciones de GalA purificada eluían en torno a una concentración de SO_4NH_4 de 0,1 M.

7.3. Purificación de la proteína GalB.

Para la purificación de GalB se cultivó a la cepa de *E. coli* BL21 (DE3) (pETB) en un volumen de 200 ml de medio LB. Las células fueron recogidas por centrifugación y se concentraron en un volumen de 20 ml de tampón HEPES 50 mM, pH 7,0 conteniendo glicerol 8,7%. Posteriormente, y debido a la dependencia Zn^{2+} para la catálisis mediada por GalB, a este tampón se le añadió SO_4Zn 200 μM y DTT 1 mM (tampón de purificación).

Las células se lisaron empleando la prensa de French y se obtuvo el extracto proteico como se indica en el apartado 7.1 de Materiales y Métodos. El extracto crudo se ultracentrifugó durante una hora a 50.000 g. Posteriormente al sobrenadante de esta etapa de ultracentrifugación se le añadió NaCl 0,05 M y se le hizo pasar a través de una columna de 5 ml de DEAE-celulosa previamente equilibrada con tampón de purificación conteniendo NaCl 0,05 M. La columna fue conectada a una bomba peristáltica y se lavó con 100 ml de tampón de purificación conteniendo NaCl 0,05 M, empleando para ello un flujo de 0,5 ml/min. A continuación, la proteína GalB fue eluida de la columna utilizando un gradiente lineal de 100 ml de tampón de purificación (0,5M NaCl) y 100 ml de tampón sin NaCl. Se registró la $A_{280\text{nm}}$ de las fracciones recogidas y se comprobó su pureza mediante SDS-PAGE al 12,5 %. Las fracciones enriquecidas en GalB que eluyeron en torno a 0,3M de NaCl se agruparon (30 ml) y se añadió NaCl hasta llevarlas a una concentración de 0,5 M. Este extracto fue cargado nuevamente en

una columna de 3 ml de Fenil-sefarosa CL-4 previamente equilibrada con tampón de purificación conteniendo NaCl 0,5 M. La columna fue lavada con 100 ml de tampón de purificación (0,5M NaCl) previamente a la etapa de elución utilizando un gradiente lineal con 100 ml de este tampón y 100 ml de tampón exento de NaCl utilizando una bomba peristáltica programada a un flujo de 0,5 ml/min. Se registró la A_{280nm} de las fracciones recogidas y se comprobó su pureza mediante SDS-PAGE al 12,5 %. Las fracciones enriquecidas en GalB eluyeron a una concentración de NaCl de 0,1 M aproximadamente, agrupándose (10 ml) y dializándose en tampón de purificación. La proteína GalB se almacenó a -20 °C.

7.4. Purificación de la proteína GalR-His₆.

Para la purificación de GalR-His₆ se cultivó a la cepa de *E. coli* BL21 (DE3) (pETGalR) en un volumen de 200 ml de medio LB. Las células fueron recogidas por centrifugación y se concentraron en un volumen de 20 ml de tampón fosfato 50 mM pH 8,0 conteniendo NaCl 300 mM, imidazol 20 mM y β -mercaptoetanol 2 mM (tampón de purificación). Las células se lisaron empleando la prensa de French como se ha descrito anteriormente. El extracto crudo se centrifugó durante una hora a 20.000 g. Pese a que la mayor parte de la proteína GalR-His se encontraba formando parte de la fracción insoluble, aproximadamente el 10% de la proteína se hallaba en la fracción soluble. El sobrenadante se pasó a través de una columna de Ni-NTA de 5 ml previamente equilibrada con 50 ml tampón de purificación. Posteriormente fue lavada en el mismo tampón y eluída mediante un gradiente lineal de imidazol construido con 100 ml de tampón de purificación y 100 ml del mismo tampón conteniendo imidazol 500 mM. Se utilizó para ello una bomba peristáltica operando a un flujo de 0,5 ml/min. Se registró la A_{280nm} de las fracciones recogidas y se comprobó su pureza mediante SDS-PAGE al 12,5 %. Las fracciones enriquecidas en GalR-His₆ eluyeron a una concentración de imidazol de 300 mM aproximadamente, agrupándose (8 ml) y dializándose posteriormente en tampón de purificación. GalR-His₆, así purificada, se empleó para los experimentos de ultracentrifugación analítica. No obstante, la proteína en estas condiciones tenía una vida media de unas 48 h, precipitando al cabo de este tiempo. Modificaciones en el tampón de purificación y en la concentración de imidazol en el cual se conservaba la proteína no consiguieron alargar la vida media de ésta, por lo que nos vimos obligados a una constante producción de la proteína para los ensayos *in vitro*

en los que fue utilizada. De esta forma, la proteína se purificó de forma rutinaria utilizando minicolumnas de agarosa-níquel-ácido nitrilotriacético, Ni-NTA, (QIAGEN). Se prepararon extractos solubles procedentes de un cultivo de 50 ml de la cepa *E. coli* BL21 (DE3) (pETGalR) de la misma manera que para la purificación a gran escala. Tras equilibrar las minicolumnas en tampón de purificación, el extracto se hizo pasar por ellas de modo secuencial, lavándose posteriormente con tampón de purificación conteniendo 100 y 200 mM de imidazol, respectivamente. Finalmente, la proteína se eluyó con 200 μ l de tampón de purificación conteniendo imidazol 500 mM. La proteína GalR-His₆ purificada presentaba una concentración de 0,3-0,4 mg/ml, siendo utilizada inmediatamente para los ensayos en los que fue necesaria.

7.5. Electroforesis en geles de poliacrilamida.

Las electroforesis analíticas de proteínas se realizaron en todos los casos en condiciones desnaturalizantes y en presencia de dodecilsulfato sódico (SDS). La técnica utilizada fue la descrita por Laemmli (Laemmli, 1970) utilizando geles de poliacrilamida en placa (PAGE) a una concentración del 10-15%. Las muestras se hirvieron a 100°C durante 10 min en presencia del tampón de ruptura (Tris-HCl 62,5 mM pH 6,8; SDS 2%, β -mercaptoetanol 5%, glicerol 10% y azul de bromofenol 0,005%). Las electroforesis se realizaron a temperatura ambiente y a 50 mA (corriente constante), utilizando un electrolito que contenía Tris-HCl 25 mM pH 8,8, glicina 192 mM y SDS 0,1%. Las proteínas de los geles se tiñeron con azul brillante de Coomassie R-250 (Swank y Munkres, 1971). Las proteínas empleadas como marcadores de tamaño molecular (miosina, 200 kDa; β -galactosidasa, 116,2 kDa; fosforilasa B, 97,4 kDa; BSA, 66,2 kDa; ovoalbúmina, 45 kDa; anhidrasa carbónica, 31 kDa; inhibidor de tripsina, 21,5 kDa; lisozima, 14,4 kDa; aprotinina, 6,5 kDa) fueron proporcionadas por Bio-Rad (marcadores Broad-Range).

7.6. Determinación de la secuencia N-terminal de la proteína GalA.

Para determinar la secuencia N-terminal de la proteína GalA, ésta fue transferida a una membrana de polivinilideno a partir del gel SDS-PAGE al 12,5% según el método descrito previamente (Speicher, 1994). La secuenciación de la proteína se realizó en el Servicio de Química de Proteínas del Centro de Investigaciones Biológicas siguiendo el

método de Edman y empleando un secuenciador automático de proteínas modelo 477A (Applied Biosystems Inc.).

7.7. Ensayos enzimáticos.

7.7.1. Ensayo de actividad galato dioxigenasa y producción de OMA_{ceto}.

Los ensayos de actividad GA dioxigenasa (GalA) se llevaron a cabo de forma rutinaria espectrofotométricamente valorando la cinética de desaparición del GA. El ensayo enzimático se realizó en tampón Tris-HCl 100 mM pH 7,0. Se utilizaron 790 μ l del mismo a los que se añadió 2 μ l de la proteína GalA purificada (entre 3-5 μ g, dependiendo de la preparación), utilizándose esta mezcla para realizar el blanco. El ensayo se iniciaba con la adición de 8 μ l de GA 20 mM (disuelto en isopropanol) y monitorizando la desaparición de absorbancia a 265 nm (ϵ_{265} 6,700 M⁻¹ cm⁻¹).

Para comprobar la dependencia de la actividad GalA frente al pH se emplearon tampones fosfato sódico 50 mM (pH 6-9) y Tris-HCl 100 mM (pH 7,5-9). En los ensayos con iones metálicos, la proteína fue incubada con distintas soluciones de sales metálicas con posterioridad a la incubación con EDTA (1 mM) y α,α -dipiridil (2 mM). Las sales empleadas fueron: CdCl₂, NiCl₂, FeCl₃, CuCl₂, ZnSO₄, CaCl₂, MnCl₂, MgSO₄, CoCl₂ y FeSO₄. Todas ellas fueron preparadas en agua a una concentración final de 5 mM. La influencia de la temperatura en la actividad de GalA se monitorizó preincubando la solución de proteína durante 5 min a la temperatura del ensayo, el cual se realizó en una cubeta termostatzada en el intervalo de 20 a 45 °C. Para el estudio de la sensibilidad a agentes oxidantes, se utilizó H₂O₂ 2 mM, y para la recuperación de la actividad con agentes reductores se usó ácido ascórbico 10 mM. El tiempo de incubación con los distintos agentes inactivantes se indica en Resultados.

Las constantes cinéticas de la enzima se determinaron midiendo el consumo de oxígeno de la reacción cuando se emplean diferentes concentraciones de GA. Para ello, se empleó un electrodo de oxígeno modelo DW1 Hansa-Tech Oxygen Electrode (Hansa-Tech Oxygen Instrument Limited). El procedimiento es idéntico al descrito para el ensayo espectrofotométrico, pero el volumen final de la reacción fue de 1 ml. Los parámetros cinéticos se obtuvieron mediante el ajuste por regresión lineal de los puntos obtenidos utilizando el programa GraphPad Software (www.graphpad.com). La actividad de GalA frente a sustratos distintos a GA se realizó también empleando el

electrodo de oxígeno. Los sustratos se disolvieron en isopropanol a una concentración de 20 mM, utilizándose a una concentración final en el ensayo de 200 μ M. Los compuestos aromáticos empleados fueron: *orto*-dihidroxiados (catecoles) catecol (1,2-dihidroxibenceno) y protocatecuato (3,4-dihidroxibenzoato); *meta*-dihidroxiados como el resorcinol (1,3-dihidroxibenceno); y *para*-dihidroxiados como el gentisato (2,5-dihidroxibenzoato) e hidroquinona (2,5-dihidroxibenceno).

Dado que el ácido oxalmesoconato (OMA) no es un reactivo comercial, se sintetizó rutinariamente en el laboratorio en tampón fosfato 50 mM pH 7,0 utilizando GA 200 μ M y 3-5 μ g de GalA purificada. Tras comprobar espectrofotométricamente que la conversión de GA en OMA era completa, se saturó la muestra nuevamente de oxígeno y se procedió a una nueva adición de GA 200 μ M y 3-5 μ g de GalA purificada. Este proceso se repitió otras 3 veces más, consiguiendo de esta forma una concentración de OMA 1 mM disuelto en tampón fosfato. El OMA producido era filtrado y congelado hasta su utilización.

7.7.2. Ensayo de actividad ceto-enol OMA isomerasa y producción de OMA_{enol}.

La interconversión de OMA_{ceto} en OMA_{enol}, es un proceso espontáneo en el que al cabo de un tiempo se establece un equilibrio. Siendo la primera vez que se describe este proceso catalizado enzimáticamente, no contábamos con datos bibliográficos que nos indicaran como se podía detectar esta actividad. El estudio de la reacción catalizada por GalD (apartado 2.2.2 de Resultados) nos permitió identificar que la conversión de la forma OMA_{ceto} en la forma OMA_{enol} viene acompañada de un cambio significativo de absorbancia medible a 265 nm. Para la identificación de los cambios de absorbancia producidos por la actividad de GalD sobre OMA_{ceto}, un total de 3 μ g de GalA purificada se adicionaron a una mezcla de reacción que contenía GA 200 μ M en tampón Tris-HCl 100 mM pH 7,0 durante 2 min. Posteriormente, el producto generado se repartió entre la cubeta de ensayo y la de referencia. Un total de 0,1 μ g de extracto soluble de la cepa *E. coli* BL21 (DE3) (pETGalDc) y *E. coli* BL21 (DE3) (pET-29a (+)) fueron añadidos a la cubeta de ensayo y de referencia, respectivamente. El cambio de absorbancia entre 200 y 350 nm fue monitorizado cada 2 min con un espectrofotómetro Carry-400 de doble haz durante 20 min.

Se procedió posteriormente a calcular el coeficiente de extinción molar para la conversión de OMA_{ceto} a OMA_{enol} a 265 nm resultando un ϵ_{265} de 2000 M⁻¹ cm⁻¹,

empleándose éste para la determinación de la actividad OMA ceto-enol isomerasa (GalD).

Los ensayos de actividad OMA isomerasa (GalD) se llevaron a cabo espectrofotométricamente valorando el incremento de $A_{265\text{nm}}$, el cual refleja como acabamos de ver la cinética de interconversión de OMA_{ceto} en OMA_{enol}, empleando el coeficiente de extinción molar ya calculado. El ensayo enzimático se realizó en 590 μl tampón fosfato 50 mM pH 7,0 al que se añadió 200 μl de OMA_{ceto} recién preparado (Apartado 7.7.1 de Materiales y Métodos). El ensayo se iniciaba con la adición 0,1-0,2 μg del extracto soluble obtenido de la cepa *E. coli* BL21 (DE3) (pETGalDc) preparado en tampón fosfato tal y como se detalla en el apartado 7.1 de Materiales y Métodos, empleando 200 ml de cultivo de la cepa *E. coli* BL21 (DE3) (pETGalDc) los cuales fueron recogidos por centrifugación y resuspendidos en 20 ml de tampón fosfato 50 mM pH 7,0. Una unidad de actividad enzimática se definió como la isomerización de un μmol de OMA_{ceto} por minuto y por mg de proteína en estas condiciones.

El producto de la reacción (OMA_{enol}) fue empleado para valorar la actividad OMA hidratasa catalizada por GalB.

7.7.3. Ensayo de actividad OMA hidratasa y producción de CHA.

La actividad OMA hidratasa se midió espectrofotométricamente monitorizando el descenso de $A_{265\text{nm}}$ (ϵ_{265} de $2000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) el cual refleja la desaparición de OMA_{enol} de forma similar a como ya ha sido descrito (Hara *et al.*, 2000). El ensayo se inicia con la adición de 2 μl de la proteína GalB purificada (3-5 μg dependiendo de la preparación). Los parámetros cinéticos se obtuvieron mediante el ajuste por regresión lineal de los puntos obtenidos utilizando el programa GraphPad Software (www.graphpad.com). Para la determinación de pH óptimo el sustrato (OMA_{enol}) fue preparado en diferentes tampones (fosfato sódico 50 mM (pH 6-9) y Tris-HCl 100 mM (pH 7,5-9)) utilizando igualmente las enzimas GalA y GalD para su producción. La influencia de la temperatura en la actividad de GalB se monitorizó preincubando la solución de proteína durante 5 min a la temperatura del ensayo, el cual se realizó en una cubeta termostatazada en el intervalo de 20 a 45 °C. En los ensayos con iones metálicos, extractos solubles obtenidos de la cepa *E. coli* BL21 (DE3) (pETGalB) tal y como se detalla en el apartado 7.1 de esta sección, fueron tratados con distintas soluciones de

sales metálicas previa a la incubación con EDTA (0,1-1 mM). Las sales empleadas fueron: NiCl₂, CuCl₂, ZnSO₄, CaCl₂, MnCl₂, MgSO₄, y CoCl₂. Todas ellas fueron preparadas en agua a una concentración final de 5 mM. En los ensayos de inactivación por dilución, estos mismos extractos solubles fueron diluidos en tampón de purificación en presencia de las distintas sales metálicas. Para los experimentos de modificación de aminoácidos, la proteína GalB purificada fue incubada con *N*-etilmaleimida 1 mM, fenilmetanosulfonilfluoride (PMSF) (0,5 mM), Iodoacetamida (5 mM), 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil carbodiimida (EDC) (1 mM) y dietilpirocarbonato (DEPC) (0,5 mM) durante 30 min.

El producto de la hidratación del OMA_{enol} (CHA) producido, se utilizó para el ensayo CHA aldolasa.

7.7.4. Ensayo de actividad CHA aldolasa.

El ensayo enzimático CHA aldolasa se realizó utilizando el método ya descrito por Maruyama (Maruyama, 1990b). Se monitorizó el descenso de absorbancia a 340 nm derivado de la oxidación de NADH ($\epsilon_{340} = 6,6 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) en un ensayo acoplado utilizando la enzima lactato deshidrogenasa, la cual reduce a lactato el piruvato formado por la acción de GalC sobre CHA utilizando para ello NADH. La mezcla de reacción contenía CHA 200 μM , (preparado como se ha indicado en el apartado 7.7.3), NADH 140 μM , 30 U de lactato deshidrogenasa, MgCl₂ 1 mM en tampón fosfato sódico 50 mM pH 7,0. La reacción se iniciaba con la adición de 1 μg de extractos de la cepa *E. coli* BL21 DE3 (pETGalC) o 5 μg de extractos de *P. putida* KTGAL preparados como se detalla en el apartado 7.1 de esta sección. Para determinar la estequiometría de la reacción, se utilizaron concentraciones crecientes de GA para producir concentraciones crecientes de CHA, monitorizando el descenso total de absorbancia y relacionándolo con la producción de piruvato total producido por la acción de GalC. Para los ensayos de β -descarboxilación de oxalacetato, se utilizó similar metodología utilizando 50, 200 o 400 μM de oxalacetato en lugar de 200 μM de CHA en el ensayo. Los ensayos se llevaron a cabo a 30 °C y se monitorizaron durante 5 minutos. En este tiempo y en estas condiciones la descarboxilación espontánea de oxalacetato es inapreciable (Hara *et al.*, 2003). Se definió una unidad de actividad enzimática como aquella que causa la oxidación de un μmol de NADH por minuto por miligramo de proteína.

7.7.5. Ensayo de actividad β -galactosidasa.

Para el ensayo de actividad β -galactosidasa de las fusiones $P_B::lacZ$, $P_R::lacZ$, $P_{BgalR}::lacZ$ y $P_T::lacZ$, las cepas *E. coli* CC118 que las contenían fueron cultivadas en 20 ml de medio MC con glicerol 20 mM y glicerol 20 mM más GA 1 mM como condiciones de no inducción y de inducción, respectivamente. Para el ensayo de la actividad β -galactosidasa de las fusiones $P_B::lacZ$, $P_R::lacZ$ y $P_T::lacZ$ en *P. putida*, las cepas que las contenían fueron cultivadas en medio MC-citrato (0,2%), MC-GA 5 mM (MC-citrato más GA 2 mM de en las cepas mutantes en los genes *gal*) como condiciones de no inducción y de inducción, respectivamente. Los cultivos fueron recogidos cuando alcanzaron una A_{600nm} de 0,6 y 0,45-0,5 para las cepas de *E. coli* y *P. putida*, respectivamente. 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. Ensayo de transporte de GA.

Para medir el transporte de GA se utilizó un biosensor que utiliza la enzima lacasa por la capacidad de oxidar compuestos fenólicos que posee esta enzima. Este biosensor ha sido desarrollado y utilizado exitosamente para medir compuestos fenólicos en soluciones acuosas (Gamella *et al.*, 2006). Dado que la presencia de células en el ensayo no interfería en la medida, se pudo medir el transporte de GA mediado por diferentes cepas de *P. putida*, añadiendo éstas al ensayo y relacionando los cambios en la intensidad de corriente con cambios de concentración de los distintos compuestos fenólicos ensayados (Fig. 8). El transporte se expresó como mmoles de compuesto transportados por minuto y por mg de proteína.

Para la realización de los ensayos de transporte, las diferentes cepas fueron cultivadas en medio MC conteniendo 5 mM GA ó 2 mM GA más citrato (0,2%) como condición de inducción y MC conteniendo citrato (0,2%) en condiciones de no inducción, hasta alcanzar una A_{600nm} de 0,4-0,5. Dos ml de estos cultivos fueron recogidos por centrifugación, lavados 2 veces en medio fresco sin fuente de carbono, resuspendidos posteriormente en 50 μ l de tampón fosfato sódico 100 mM pH 6,0 y añadidos al ensayo, monitorizándose el descenso en la intensidad de corriente en

función del tiempo. Previamente a la adición de las células se había monitorizado el cambio en la intensidad de corriente ocasionado por la adición de la concentración apropiada del compuesto fenólico correspondiente (Fig. 8).

Para los ensayos de inhibición de la fuerza protón-motriz, se adicionó carbonilcianide *m*-clorofenilhidrazona (CCCP) (20 μM), carbonilcianide 4-(trifluorometoxi) fenilhidrazona (FCCP) (30 μM) y 2,4-dinitrofenol (DNP) (1 mM) una vez iniciado el experimento de transporte.

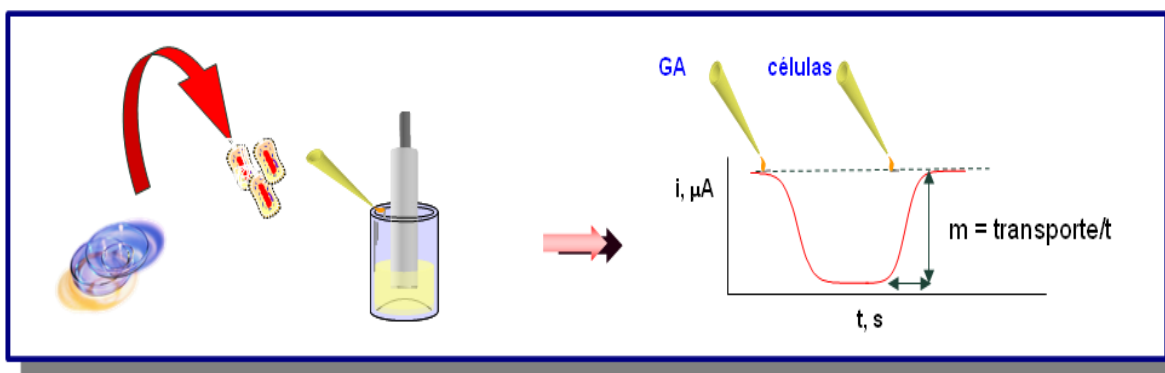


Figura. 8 Biosensor de lacasa para la determinación del transporte de GA en bacterias. El transporte de este compuesto aromático al interior celular hace disminuir la intensidad de corriente medida en el ensayo, relacionándose con la cantidad de GA transportado en función del tiempo y de la cantidad de células.

9. Ensayo de quimiotaxis hacia GA.

Los ensayos de quimiotaxis a tiempos cortos se realizaron mediante procedimientos ya descritos (Parales y Harwood, 2002). Las cepas *P. putida* KTGAL y *P. putida* KT2440 fueron cultivadas hasta alcanzar la fase exponencial en medio MC con GA 2 mM + citrato 0,2% o en medio MC con citrato 0,2% como condiciones de inducción o no inducción, respectivamente. Se tomaron 100 μl del cultivo y se depositaron en un portaobjetos que contiene un gota (10 μl) de agarosa *low melting* (Ambion) al 2% en medio MA y con GA 1 mM, entre dos toques de una mezcla de parafina-baselina (9:1 v/v) y el correspondiente cubreobjetos (Fig. 9). La preparación se observó al microscopio de contraste de fases y se tomaron fotografías del borde de la gota a los 5 y 10 minutos.

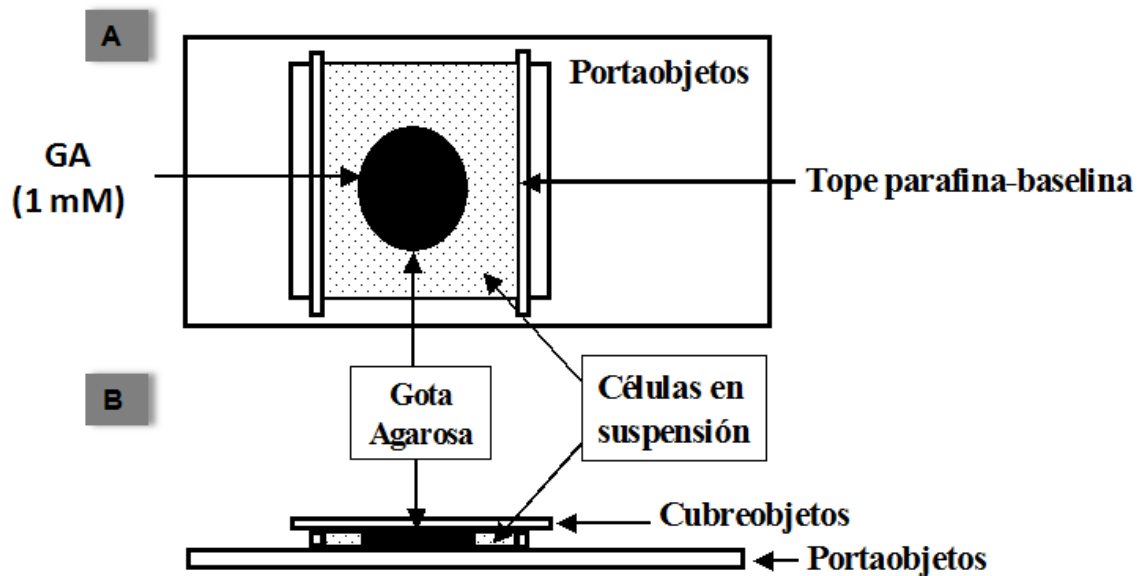


Figura 9. Esquema de la preparación microscópica utilizada para el ensayo de quimiotaxis (Agarose Plug Assay). **A.** En un portaobjetos se añade una gota de agarosa *low melting* al 2% en medio MA y con GA 1 mM. Las células se depositan en el espacio localizado entre la gota de agarosa y los toques de parafina en el portaobjetos. **B.** Sección transversal de la preparación.

10. Ensayos de unión DNA-proteína.

10.1. Ensayos de retardo en gel.

Para los ensayos de retardo en gel de la región intergénica *galB/galR* (*PbPr*) se utilizó un fragmento de DNA de 223 pb que incluía la región de 165 nucleótidos comprendida entre los inicios de la traducción de los genes *galB* y *galR* amplificada con la pareja de oligonucleótidos pBlacZ5' y 3'GalBlacZEcoRI para su marcaje en la hebra no codificante del gen *galB* y con la pareja las oligonucleótidos 5'pBEcoRI y pBlacZ3' para su marcaje en la hebra codificante. Para el estudio de la zona promotora del gen *galT* se utilizó un fragmento de DNA de 498 pb el cual contenía el promotor P_T amplificado con los oligonucleótidos pTlacZ3' y 5'pTEcoRI, utilizando DNA genómico de la cepa *P. putida* KTGAL como molde.

Los fragmentos obtenidos por PCR (200-250 ng), después de ser digeridos con *EcoRI*, se marcaron radioactivamente en el extremo cohesivo generado por esta enzima de restricción en presencia de [α - 32 P]dATP (6000 Ci/mmol; Amersham Biosciences) y el fragmento Klenow de la DNA polimerasa I de *E. coli*, utilizando procedimientos previamente descritos (Sambrook y Russell, 2001). Los fragmentos marcados (sondas *PbPr* y *Pt*) fueron purificados utilizando el kit Gene-Clean Turbo (Q-BIOgene).

Para los ensayos de retardo en gel, las mezclas de reacción contenían la proteína GalR-His₆ purificada (la concentración utilizada en cada caso se indica en el apartado correspondiente de Resultados), así como las sondas marcadas radioactivamente a una concentración de 0,1 nM en un volumen final de reacción de 9 µl. El tampón de retardo utilizado contenía Tris-HCl 20 mM, pH 7,5, glicerol 10%, β-mercaptoetanol 2 mM, KCl 50 mM y seroalbúmina bovina (BSA) 250 µg/ml. El resultado de la reacción se analizó por electroforesis en geles de poliacrilamida al 5% con tampón TBE 0,5x (Tris-borato 45 mM, EDTA 1 mM). El gel se secó sobre papel Whatman 3MM y los productos de la reacción se detectaron por autorradiografía con películas Hyperfilm MP (Amersham Biosciences).

10.2. Ensayos de protección (*footprinting*) frente a la DNasaI

Para realizar los ensayos de protección a la DNasa I (*footprinting*) se utilizó la sonda *PbPr* descrita en el apartado 10.1 de esta sección.

Las mezclas de reacción se realizaron en tampón de digestión (Tris-HCl 20 mM, pH 7,5, glicerol 10%, β-mercaptoetanol 2 mM y KCl 50 mM), al que se añadió BSA (500 µg/ml) en presencia de sonda marcada 2 nM y 15 µl de proteína GalR-His₆ purificada (a concentraciones variables indicadas en el correspondiente apartado de Resultados). Las muestras (en un volumen final de reacción de 20 µl) se incubaron a temperatura ambiente durante 20 min, transcurridos los cuales se añadieron 3 µl (0,05 U) de DNasa I (1µg/ml) (Amersham Biosciences) diluida en un tampón Tris-HCl 10 mM pH 7,5, CaCl₂ 10 mM, MgCl₂ 10 mM y KCl 125 mM. La digestión con DNasa I se realizó a 37°C durante 22 segundos y la reacción fue detenida por la adición de 180 µl de solución DNasa STOP (acetato sódico 0,4 M, EDTA 2,5 mM, 50 µg/ml de DNA de esperma de salmón y 0.3 µl/ml de glicógeno). Las muestras fueron sometidas a una extracción con fenol/cloroformo/alcohol isoamílico, el DNA fue precipitado en presencia de etanol absoluto tras una centrifugación a 10.000 g a 4°C y posteriormente lavado con etanol 70%. Las muestras se secaron y se resuspendieron en tampón de carga [Tris-HCl 10 mM pH 8,0, formamida 80%, EDTA 20%, azul de bromofenol 0,05% (p/v) y azul de xilencianol 0,05% (p/v)] y fueron desnaturalizadas por incubación a 95°C durante 5 min. Las mismas sondas fueron secuenciadas por el método A+G de Maxam y Gilbert (Maxam y Gilbert, 1980) y analizadas junto a las reacciones de protección a la DNasaI en geles desnaturalizantes de poliacrilamida 6% (v/v)-urea 8 M,

los cuales se secaron a vacío sobre papel Whatman 3 MM y, por último, se expusieron en películas Hyperfilm MP (Amersham Biosciences).

En aquellos experimentos en los que se estudió la interacción de la RNAP con la sonda *PbPr*, ésta se incluyó en los ensayos incubándose durante 10 min a 37 °C previamente a la adición de la DNasaI. En los experimentos en los que se utilizó OMA, éste se incluyó igualmente en el ensayo previamente a la digestión con la DNasaI. Las concentraciones de RNAP y OMA utilizadas se especifican en cada caso en el apartado de Resultados correspondiente.

10.3 Ensayos de transcripción *in vitro*.

Todas las soluciones se prepararon con agua destilada que contenía el inhibidor de RNasa dietilpírocarbonato (DEPC) (Sigma) y fueron filtradas antes de su uso. El tampón utilizado para la reacción contenía Tris-HCl pH 7,5 40 mM, MgCl₂ 10 mM y KCl 100 mM. Como molde para la transcripción se utilizó el plásmido pJDP_{BP_R} (Tabla 4). El volumen final de la mezcla de reacción fue de 50 µl y contenía DNA plasmídico 5 nM y BSA a 500 µg/ml. Se añadieron 3 µl de *E. coli RNA Polymerase Holoenzyme* 50 nM (1 U/µl; USB), incubándose esta mezcla a 37°C durante 10 min. Finalmente se añadieron las concentraciones correspondientes de proteína GalR-His₆ diluida en el tampón anteriormente mencionado que contenía además DTT 2 mM y BSA a 500 µg/ml. Cuando se utilizó OMA, éste fue preparado como se indica en el apartado 7.7.1 de esta sección utilizándose a una concentración de 50, 100 y 250 µM, respectivamente. Esta mezcla fue incubada a 37°C durante 10 min para permitir la formación de los complejos abiertos. La elongación de la cadena de RNA naciente comenzó al añadir 5 µl de una mezcla que contenía ATP, CTP y GTP 1 mM, y 1 µCi de [α -³²P] UTP (Amersham Biosciences). Se paró la reacción al cabo de 15 min con 50 µl de una solución STOP que contenía NaCl 350 mM, EDTA 50 mM y RNA transferente 100 µg/ml. El RNA fue precipitado con 3 volúmenes de etanol absoluto y durante a 1 hora a -80°C. Posteriormente, las muestras fueron centrifugadas a 10.000 g y -4°C y se llevó a cabo un segundo lavado con etanol al 70%. Las muestras se secaron y se resuspendieron en 25 µl de tampón de carga que contenía formamida al 80% (v/v), EDTA 20 mM, azul de bromofenol y azul de xilencianol, antes de ser calentadas a 90°C y cargadas en un gel desnaturalizante de poliacrilamida 4% (v/v)-urea 8 M. La electroforesis se desarrolló a 300 V. Los geles se secaron al vacío sobre papel Whatman 3MM y se expusieron en

películas Hyperfilm™ MP (Amersham Pharmacia Biotech) con pantallas amplificadoras (Cronex Lightning Plus DuPont).

11. Análisis de metabolitos mediante Espectrometría de Masas (MS)

El estudio de metabolitos fue realizado en un espectrómetro de masas LCQ Deca XP Plus (Thermo Instruments) utilizando un analizador de trampa iónica. La muestra se cargó por inyección directa en un alimentador de electrospray, empleando un flujo de 5 $\mu\text{l}/\text{min}$. Las condiciones del ensayo son las siguientes: voltaje del spray, 4000 V; temperatura de entrada, 250 °C; flujo de gas en la cromatografía, 29 (unidades arbitrarias); voltaje de capilar, 20 V. Adicionalmente, se realizaron tres experimentos en modo negativo y análisis completo, amplificando la señal entre los m/z correspondientes al intervalo entre 130 y 170 unidades.

También se realizó un estudio por ionización en electrospray con un analizador de cuadrupolo empleando un espectrómetro HPLC1100MSD (Agilent Technologies). El flujo de inyección en metanol para las muestras fue de 0,2 ml/min. El voltaje de fragmentación se fijó a 60 V; el flujo de nitrógeno a 10 l/min; la presión del nebulizador, 50 psi.; la temperatura del gas se fijó a 335 °C, y el voltaje del spray a 400 V.

El OMA analizado fue producido como se describe en el apartado 7.7.1 de esta sección. Una vez producido, éste fue extraído con acetato de etilo. Todos los estudios se realizaron en el Servicio Interdisciplinar de Investigación de la Universidad Autónoma de Madrid, bajo la supervisión de la Dra. M.J. Vicente.

12. Caracterización estructural de metabolitos mediante Resonancia Magnética Nuclear (RMN)

Para los ensayos de RMN (ensayos de ^1H) de las reacciones catalizadas por las enzimas Gal, los diferentes productos fueron producidos en tampón fosfato 50 mM pH 8,0, por la adición sucesiva de las proteínas GalA, extractos de la cepa *E. coli* BL21 (DE3) (pETGalDc) y GalB tal y como se especifica en apartados anteriores. Todas las muestras se preparan en 10 % de agua deuterada (D_2O) y se analizaron inmediatamente a pH 7,0 menos la determinación inicial del producto de apertura (Fig. 22A) que se

realizó a pH 3 habiéndose extraído la muestra previamente y disolviéndose posteriormente en 100% de D₂O.

Los patrones empleados en los ensayos de RMN se preparan disolviéndolos en el mismo tampón que las muestras, a una concentración final igual a la de los sustratos, o a la de los productos de las reacciones si las conversiones fueran completas. Los espectros de RMN se registran a 298 K en un espectrómetro AVANCE 500 MHz, equipado con una sonda broad-band z-gradient (Bruker). Los experimentos de acoplamiento heteronuclear (HSQC) (Santoro y King, 1992) se llevaron a cabo según los procedimientos proporcionados por el fabricante.

Todos los experimentos de RMN se realizaron en colaboración con el grupo del Dr. Jiménez-Barbero del Departamento de Estructura de Proteínas del Centro de Investigaciones Biológicas.

13. Determinación del contenido en metales de la proteína GalB.

13.1 Determinación por Espectrometría de Emisión Atómica (ICP).

La Espectrometría de Emisión Atómica (ICP) permite la detección y determinación de la mayoría de los elementos de la tabla periódica en un amplio intervalo de concentraciones que alcanzan hasta las ppm. Las muestras son introducidas en forma líquida, y posteriormente son transformadas en un aerosol mediante un nebulizador y finalmente excitadas mediante un plasma de argón. Las emisiones de los átomos excitados se recogen mediante un sistema óptico basado en un policromador con una red Echelle combinado con detectores SCD, obteniendo espectros para las líneas seleccionadas en cada elemento. El equipo empleado en los estudios del contenido en Fe y Zn²⁺ de la proteína GalB fue un ICP-OES Optima 2000DV (Perkin-Elmer). Los análisis se realizaron en el Servicio Universitario de Química Analítica del Centro de Catálisis y Petroleoquímica (CSIC).

Todas las muestras se prepararon en recipientes de plástico utilizando agua MilliQ (18 Ω). Se prepararon dos muestras de proteína GalB a una concentración de 15 μM, una de ellas purificada en ausencia de Zn²⁺ y la otra purificada con un tampón de purificación conteniendo SO₄Zn 200 μM. Previamente al análisis, ambas muestras de proteína fueron eluidas de una columna de DEAE-celulosa G-25 (Amershan) con tampón de purificación sin metales añadidos con el objeto de eliminar el metal no

incorporado en las proteínas. El blanco del análisis se preparó en este mismo tampón de purificación, al igual que los patrones para la curva de calibrado, que consistieron en disoluciones de Fe^{2+} y Zn^{2+} a concentraciones de: 0, 1,6, 3,2, 6,25, 12,5, 25, 50 y 100 μM .

13.2. Determinación utilizando 4-(2-piridilazo) resorcinol (PAR).

El cambio de absorbancia del PAR al reaccionar con Zn^{2+} medible a 500 nm (ϵ_{500} 66 $\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$) (Hunt *et al.*, 1985) fue utilizado para analizar el contenido en zinc tanto de la proteína parental GalB como de los diferentes mutantes generados sin necesidad de purificarlos. Siguiendo el método de Hunt y colaboradores, cantidades crecientes de extractos celulares (0,1, 0,5, 1, 5, 10, 20, 50 y 100 μg) conteniendo GalB o sus variantes fueron desnaturalizados en una solución conteniendo cloruro de guanidinio 4 M durante 30 min. Posteriormente, se añadió PAR 100 μM de disuelto en metanol y se incubó durante 10 min, al cabo de los cuales se monitorizó la $A_{500\text{nm}}$ de cada una de las muestras. La adición de 100 μg del extracto proteico de la cepa control, *E. coli* BL21 (DE3) (pET-29a (+)), no produjo aumento de $A_{500\text{nm}}$ significativo y fue utilizado como blanco para determinar el aumento de $A_{500\text{nm}}$ únicamente debido a la presencia del Zn^{2+} unido a GalB o sus variantes.

14. Ultracentrifugación analítica.

Los análisis de ultracentrifugación analítica mediante velocidad y equilibrio de sedimentación de GalA, GalB y GalR fueron realizados en el laboratorio del Dr. Germán Rivas, del Centro de Investigaciones Biológicas (CSIC). Los ensayos se llevaron a cabo a 20 °C en una ultracentrífuga analítica modelo Optima XL-A (Beckman) equipada con un espectrofotómetro UV-visible, con un rotor An50Ti.

La proteína GalA purificada se preparó a una concentración de 0,5 mg/ml en tampón MOPS 50 mM, pH 8,0 conteniendo SO_4Fe 2 μM , L-Cisteína 2 mM y glicerol 10% (p/v). Para el estudio mediante ultracentrifugación analítica de la proteína GalB, se prepararon muestras a una concentración de 0,5 mg/ml en tampón HEPES 50 mM, pH 7,0 conteniendo SO_4Zn 200 μM , DTT 1 mM y glicerol 10% (p/v). Finalmente, para GalR se usó una concentración de 0,4 mg/ml en tampón de de purificación consistente

en tampón fosfato 50 mM pH 8,0 conteniendo NaCl 300 mM, y β -mercaptoetanol 2 mM y glicerol 10% (p/v). Los ensayos de velocidad de sedimentación se realizaron a una velocidad de 40000 rpm, en un volumen de muestra de aproximadamente 350 μ l. La distribución de coeficientes de sedimentación se calculó mediante el programa SEDFIT (Schuck y Rossmann, 2000). La línea base fue determinada a continuación mediante centrifugación a alta velocidad (50000 rpm). La masa molecular aparente de GalA, GalB y GalR fueron determinadas mediante el ajuste de los datos experimentales a la ecuación que describe la distribución de concentraciones radiales de un soluto ideal. El volumen específico parcial de GalA, GalB y GalR fueron calculados a partir de la secuencia de aminoácidos de estas proteínas, usando el programa de acceso público SEDNTERP (Laue, 1992) (<http://www.jphilo.mailway.com/download.htm>).

15. Modelado tridimensional de las proteínas GalA, GalD, GalB, GalC y GalR.

Las proteínas GalA, GalD, GalB, GalC y GalR fueron modeladas utilizando el programa swissmodel (Arnold *et al.*, 2006) alojado en el servidor Expasy (<http://swissmodel.expasy.org/>). En el caso de GalA, GalD y GalC se utilizaron los valores por defecto, utilizándose las estructuras tridimensionales de las proteínas LigAB (PDB 1B4U), PrpF (PDB 2PVZ) y Rv3853 (PDB 1NXJ), respectivamente, como modelos. En el caso del modelo construido para GalB, se modificó el límite de identidad mínimo para poder modelar parcialmente la proteína debido a su baja identidad de secuencia con proteínas de estructura terciaria conocida. Se utilizaron como modelos las estructuras tridimensionales de las proteínas Rv1170 (PDB 1Q7T) y TT1542 (PDB 1UAN). Por último, el segundo dominio DBD y el dominio de unión al sustrato de GalR fueron modelados a partir de la estructura tridimensional completa de uno de los monómeros de la proteína CnbR (PDB 1AL3) siendo el primer dominio DBD de GalR modelado a partir del dominio DBD del segundo monómero de CnbR, superponiéndose posteriormente al modelo inicial ya generado.

La visualización de los distintos modelos y los análisis posteriores se realizaron con el programa PyMol (DeLano, 2002)

16. Análisis de los datos de secuencia.

Los análisis de las secuencias de nucleótidos se realizaron en el servidor BIOSUPPORT (<http://bioinfo.hku.hk/package.html>). Las búsquedas de marcos abiertos de lectura (ORFs) se realizaron con el programa ORF FINDER del servidor del *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>). Las búsquedas de similitudes de secuencia se realizaron utilizando el programa BLASTP (Altschul *et al.*, 1990) en el servidor del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>). Los alineamientos de secuencias de nucleótidos y los alineamientos múltiples de proteínas se realizaron con los programas DIALIGN (Morgenstern *et al.*, 1996) y CLUSTALW (Thompson *et al.*, 1994), respectivamente, alojados en el servidor EMBL-EBI (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/>). Las masas moleculares de las proteínas se calcularon con el programa Compute pI/Mw del servidor Expasy (http://www.expasy.org/tools/pi_tool.html), mientras que las predicciones de estructura secundaria se realizaron con el programa SCRATCH (<http://www.igb.uci.edu/tools/scratch/>). Los árboles filogenéticos se han construido utilizando el programa ClustalW para el alineamiento de secuencias y el método del vecino más próximo (*neighbor-joining*) para el cálculo de las distancias filogenéticas, en el servidor EMBL-EBI, posteriormente se han visualizado con el programa *Tree View program*, versión 1.6.6.

IV. RESULTADOS

1. Los genes *gal* son los responsables de la degradación de GA en *P. putida*.

1.1. Identificación del cluster *gal*.

Como se ha indicado en la Introducción, al comienzo de esta tesis doctoral los genes *pcm*, los cuales llamaremos genes *gal* a partir de ahora, se habían propuestos implicados en el metabolismo de compuestos aromáticos (Jiménez *et al.*, 2002).

Un análisis detallado de la región del genoma de *P. putida* KT2440 localizada entre las posiciones 2860-2868 kb, permitió definir con mayor precisión los marcos de lectura abiertos (ORFs) del *cluster gal* (Fig. 10). La agrupación *gal* estaba compuesta por un total de 7 ORFs: i) un presunto sistema de transporte constituido por los productos génicos *galP* (PP_2517) y *galT* (PP_2519), ii) un hipotético regulador transcripcional de la familia LysR codificado por el gen *galR* (PP_2516), y iii) un conjunto de posibles genes catabólicos que incluyen la presunta dioxigenasa *galA* (PP_2518) y aldolasa *galC* (PP_2514), mas los productos de los genes *galD* (PP_2513) y *galB* (PP_2515) de función desconocida (Tabla 5).

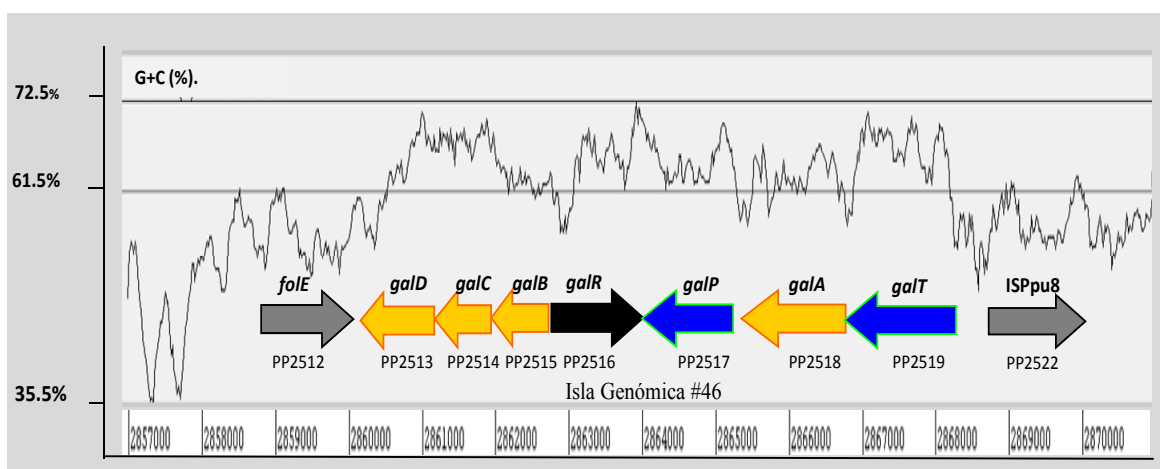


Figura 10. Organización génica del cluster *gal* en el genoma de *P. putida* KT2440. Se muestra la disposición de los genes *gal* en el genoma de *P. putida* KT2440 indicando el contenido G+C de la región. Se representan en naranja los presuntos genes catabólicos, en azul los transportadores y en negro el hipotético regulador de la ruta. Igualmente, se indican en gris los genes *folE* e *ISPpu8* el cual codifica una transposasa de la familia *ISPpu8*, flanqueando el *cluster gal*.

Tabla 5. Genes *gal* y sus productos génicos.

Gen	G+C	Distancia al gen más próximo (pb)	Producto génico (aa/kDa)	Probable función del producto génico	Productos génicos relacionados.				
					Nombre/tamaño (aa)	Función	Microorganismo	Identidad (%)	Nº de acceso
<i>galD</i> PP2513	65.7	524	361/37,5	Desconocida	AvinDRAFT_6642/360	Desconocida	<i>A. vinelandii</i>	70	EAM08041
					PrpF/397	<i>cis-trans</i> 2-metilacetonitato isomerasa	<i>S. oneidensis</i>	35	NP_715982
					FldA/356	Desconocida	<i>Sphingomonas</i> sp. LB126	63	CAB87567
<i>galC</i> PP2514	67.3	2	238/25,1	Aldolasa	AvinDRAFT_6641/238	Posible metiltransferasa	<i>A. vinelandii</i>	79	EAM08040
					YPO082/237	Posible transferasa	<i>Y. pestis</i>	66	CAC88948
					LigK/228	CHA aldolasa	<i>S. paucimobilis</i> SYK-6	62	BAB88738
<i>galB</i> PP2515	62.2	-1	244/27,4	Desconocida	AvinDRAFT_6640/245	Desconocida	<i>A. vinelandii</i>	87	ZP_00416185
					CsalDRAFT_1707/246	Desconocida	<i>C. salexigens</i>	85	ZP_00473090
					YPO083/310	Desconocida	<i>Y. pestis</i>	79	CAC88949
<i>galR</i> PP2516	67.00	117	397/43,3	Regulador transcripcional	AvinDRAFT_7596/397	Posible regulador LysR	<i>A. vinelandii</i>	68	EAM08038
					Bcepa03002145/417	Posible regulador LysR	<i>B. cepacia</i>	49	ZP_00216313
					YP0088/431	Posible regulador LysR	<i>Y. pestis</i>	47	AAS60367
<i>galP</i> PP2517	63.8	15	410/45,4	Porina de membrana externa	PSPPH_0938/422	Porina OprD	<i>P. syringae</i>	69	AAZ35838
					Pfl_3451/395	Porina OprD	<i>P. fluorescens</i>	68	YP_349180
					PP1383/418	Porina BenF	<i>P. putida</i>	68	NP_743542
<i>galA</i> PP2518	64.00	129	420/47,6	Extradiol dioxigenasa	CsalDRAFT_1714/428	Probable PCA ^a 4,5-dioxigenasa	<i>C. salexigens</i>	78	ZP_00473097
					AvinDRAFT_6637/420	Probable PCA ^a 4,5-dioxigenasa	<i>A. vinelandii</i>	76	ZP_00416183
					LigB/283	PCA ^a 4,5-dioxigenasa	<i>S. paucimobilis</i> SYK-6	39	BAB88743
<i>galT</i> PP2519	65.6	20	453/47,8	Transportador MFS ^b	AvinDRAFT_6635/446	Transportador MFS ^b	<i>A. vinelandii</i>	74	ZP_00416182
					RmetDRAFT_1575/441	Transportador MFS ^b	<i>R. metallidurans</i>	55	ZP_00597675
					PcaK/448	Transportador MFS ^b de 4-hidroxibenzoato.	<i>P. putida</i>	49	Q51955

a) PCA, protocatecuato

b) MFS, Mayor Facilitator Superfamily

Debido a la similitud que presentaban los productos de los genes *galA* y *galC* con proteínas implicadas en rutas centrales *meta* de degradación de protocatecuato en otros microorganismos, parecía lógico asumir un papel similar para estos genes en *P. putida*. Con el objetivo de determinar el sustrato de la ruta codificada por los genes *gal* de, se monitorizó la expresión del gen *galA* por RT-PCR en células de *P. putida* KT2440 utilizando citrato como fuente de carbono y en presencia de distintos compuestos aromáticos análogos del protocatecuato y susceptibles de ser degradados vía ruta *meta* central (Fig. 11A). Como se muestra en la figura 11B, el gen *galA* presentaba una significativa inducción cuando *P. putida* se cultivaba en presencia de GA. Ésta inducción era muy específica de GA ya que ninguno de los otros compuestos utilizados la producía, y sugería fuertemente que el producto del gen *galA* podría estar implicado en la degradación de este ácido aromático trihidroxilado.

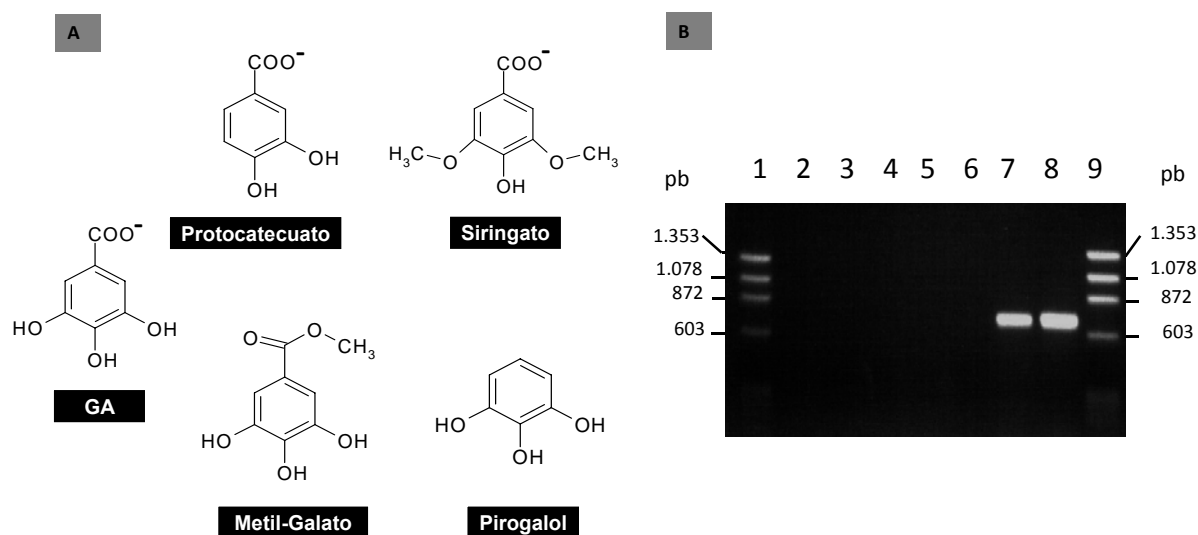


Figura 11. Expresión del gen *galA* en *P. putida* KT2440. **A.** Estructura química de los compuestos testados como posibles inductores del gen *galA*. **B.** Electroforesis en geles de agarosa de los productos de RT-PCR de un fragmento interno del gen *galA* generados a partir del RNA aislado de células de *P. putida* KT2440 cultivadas en medio mínimo M63 utilizando citrato 0,2% (p/v) como fuente de carbono (calle 6) y en presencia de diferentes compuestos aromático, tales como pirogalol (calle 2), siringato (calle 3), protocatecuato (calle 4), metil-galato (calle 5) y GA (calle 7). Los compuestos aromáticos se añadieron a una concentración final de 1 mM a un cultivo bacteriano que había alcanzado una A_{600nm} de 0,45 en citrato, y se prosiguió la incubación durante una hora. La calle 8, se corresponde al fragmento de *galA* generado por PCR utilizando DNA cromosómico de *P. putida* KT2440 como molde. Las calles 1 y 9 se corresponden al marcador de peso molecular utilizado, consistente en los fragmentos generados tras la digestión del DNA del fago $\Phi X174$ con *Hae*III (New England Biolabs). Las reacciones de RT-PCR se realizaron como se indican en el apartado 6.2 de Materiales y Métodos utilizando los oligonucleótidos 5'*galA*int y 3'*galA*int (Tabla 3) que

1.2. Adaptación genotípica de *P.putida* KT2440 al crecimiento en GA.

Los datos de expresión del gen *galA* en células de *P. putida* KT2440 cultivadas en presencia de GA indicaban que muy probablemente, la proteína GalA debía estar implicada en el metabolismo de este ácido aromático. No obstante, estos resultados contrastaban con trabajos previos que indicaban que *P. putida* KT2440 no es capaz de utilizar GA como única fuente de carbono y energía (Jiménez *et al.*, 2002). Sin embargo, no se podía descartar que las condiciones de cultivo utilizadas previamente no fueran las apropiadas para el crecimiento en GA ya que se observaba un fuerte y rápido oscurecimiento del medio de cultivo cuando se adicionaba GA. Este comportamiento es típico de los compuestos aromáticos polihidroxilados y se debe a su rápida oxidación y posterior polimerización, haciéndolos inaccesibles a las bacterias (Tack *et al.*, 1972b). Para comprobar si esta era la situación que ocurría con GA, se procedió a cultivar a *P. putida* en distintos medios de cultivo mínimos (M63 y MC), utilizando distintos agentes antioxidantes (DTT, L-cisteína, ácido ascórbico), y a distintos pHs. Estos experimentos permitieron observar que cultivando a *P. putida* en medio mínimo MC, utilizando 2 mM de L-cisteína como agente antioxidante y GA 5 mM como fuente de carbono a un pH de 6,5, se conseguía establecer un protocolo de adaptación de la cepa KT2440 a la utilización de GA como única fuente de carbono y energía. El proceso de adaptación se muestra en la figura 12, y consiste en cultivar a *P. putida* en GA como fuente de carbono durante, al menos, 3 incubaciones consecutivas, observándose al final un apreciable crecimiento de la bacteria y la ausencia de coloración en el medio de cultivo como resultado del eficiente consumo de GA. Dado que la adaptación sufrida por la cepa no se pierde si ésta se cultiva en medio rico y posteriormente se vuelve a cultivar en GA como fuente de carbono, parece lógico asumir que se trata de una adaptación genotípica como resultado de una mutación(es).

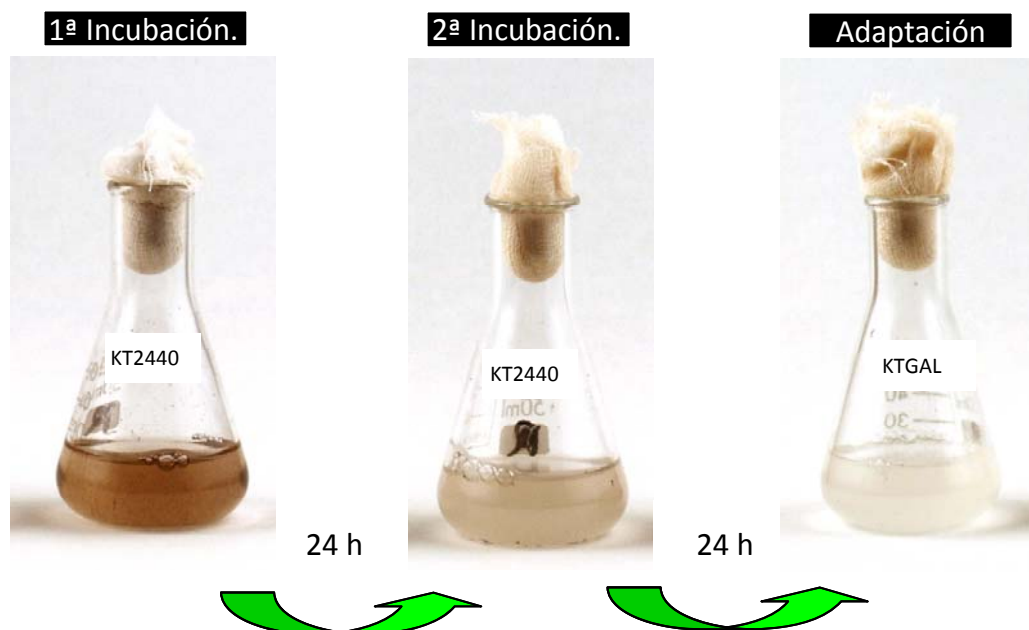


Figura 12. Proceso de adaptación de *P. putida* KT2440 a la utilización de GA como única fuente de carbono. Las células fueron cultivadas a 30 °C durante 24 h en medio MC a pH 6,5 conteniendo GA (5 mM) como fuente de carbono y L-cisteína (2 mM) como agente reductor. Al cabo de ese tiempo, fueron recogidas por centrifugación y cultivadas nuevamente en medio fresco durante otras 24 h. Tras repetirse este paso nuevamente, se consiguió finalmente la adaptación de la cepa al crecimiento en GA. Nótese como el color oscuro del medio debido a la oxidación y polimerización del GA en presencia de oxígeno, va disminuyendo a medida que la cepa se va adaptando al consumo de GA.

Para tratar de determinar la mutación sufrida por la nueva cepa, a la que se denominó *P. putida* KTGAL por su capacidad de utilizar GA como única fuente de carbono y energía, se secuenció la región del genoma donde se localizan los genes *gal*. El análisis de las más de 10 kb secuenciadas en la cepa KTGAL mostró que únicamente se había producido la delección de la citosina que ocupa la posición 2867088 del genoma de *P. putida* KT2440 dentro del gen *galT* (PP_2519) (Fig. 13). Curiosamente, en la anotación del genoma de *P. putida* KT2440 se indica que esta citosina forma parte de un cambio de fase de lectura necesario para que se sintetice la proteína GalT (Nelson *et al.*, 2002). Por lo tanto, los resultados obtenidos sugieren que la adaptación ocurrida en *P. putida* KTGAL consiste en la delección de una base en la secuencia del gen *galT* (denominado a partir de ahora *galT**) en *P. putida* KT2440 que impedía la traducción de una copia correcta de la proteína GalT en la cepa parental *P. putida* KT2440. La ausencia de un transportador activo y específico de GA impedirá el crecimiento de la cepa parental en GA como fuente de carbono, circunstancia que no ocurre en *P. putida*

KTGAL en donde el gen *galT* codifica una proteína transportadora funcional para la entrada rápida y eficaz de GA al interior celular, evitando así su oxidación y posterior polimerización extracelular (ver apartado 3 de Resultados).

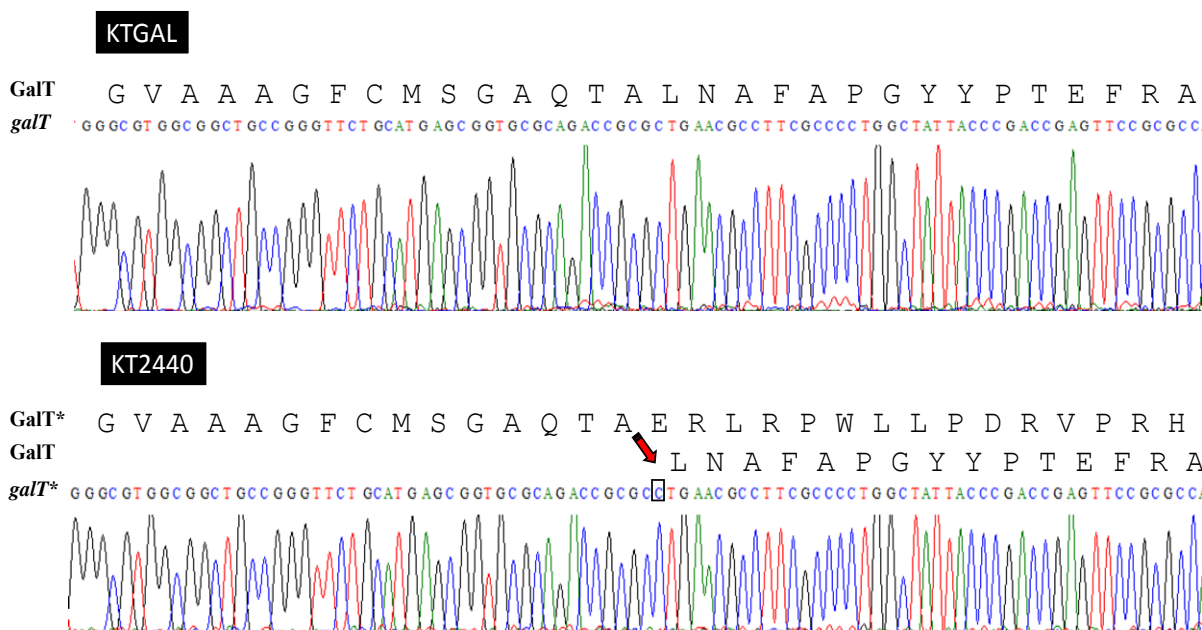


Figura 13. Identificación de la mutación sufrida por *P. putida* KTGAL en el cluster *gal* y que le permite el crecimiento en GA como única fuente de carbono. Cromatogramas que muestran la secuencia de la zona adyacente a la citosina localizada en la posición 2867088 del genoma de la cepa KT2440 y su equivalente en la cepa KTGAL. Nótese que la delección de esta base en la cepa KTGAL le permite sintetizar una copia correcta de la proteína GalT (gen *galT*), no ocurriendo lo mismo en la cepa KT2440 en donde el gen *galT** codifica una proteína GalT* alterada. La secuencia de aminoácidos deducida de la secuencia nucleotídica en ambos casos se muestra en la parte superior, y el cambio en la fase de lectura ocurrido en la cepa KTGAL se señala con una flecha roja en la secuencia de la cepa KT2440.

1.3. Los genes *gal* son necesarios para el catabolismo del GA en *P. putida* KTGAL.

Los resultados de comparación de secuencias (Tabla 5) junto con los datos de expresión del gen *gala* (Fig. 11) y el papel propuesto para GalT (apartado 1.2), sugieren que los genes *gal* están efectivamente involucrados en el catabolismo de GA en *P. putida*. Para confirmar esta hipótesis, se inactivaron mediante mutagénesis insercional cada uno de los genes *gal*, y se comprobó el fenotipo de las cepas mutantes mediante ensayos de crecimiento utilizando GA como única fuente de carbono.

Los distintos mutantes de *P. putida* KTGAL en los genes *gal* se construyeron mediante disrupción insercional de dichos genes siguiendo el procedimiento que se detalla en el apartado 5.4 de Materiales y Métodos. Un esquema del proceso de mutación, junto con los distintos mutantes generados, se muestra en la figura 14.

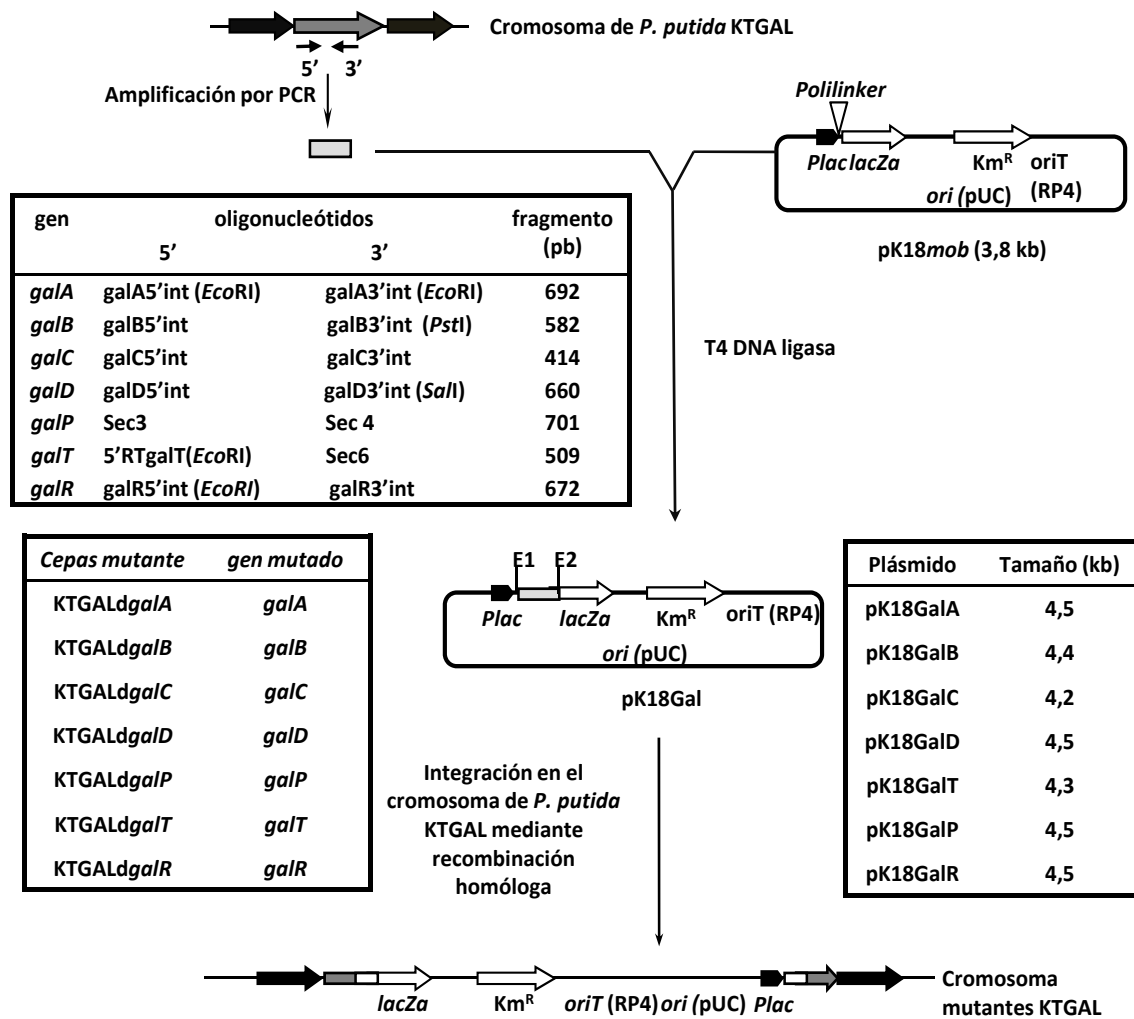


Figura 14. Representación esquemática de la construcción de los mutantes de inserción en los genes *gal* de *P. putida* KTGAL. Se amplificaron fragmentos internos de distintos genes *gal* por PCR utilizando los oligonucleótidos que se indican (su secuencia se detalla en la Tabla 4) y DNA genómico de *P. putida* KTGAL como molde, generando los fragmentos indicados. Posteriormente, los fragmentos resultantes se clonaron en el plásmido suicida pK18mob (Tabla 3) mediante digestión previa con las enzimas de restricción indicadas en cada caso. Los fragmentos generados por oligonucleótidos carentes de dianas de restricción se clonaron en como usando la diana de restricción *SmaI* del plásmido pK18mob. Los plásmidos pK18Gal resultantes que se detallan fueron transferidos por conjugación triparental a *P. putida* KTGAL según se detalla en el apartado 4.2 de Materiales y Métodos dando lugar a las cepas mutantes indicadas. Las abreviaturas utilizadas son: *Plac*, promotor *lac*; *lacZa*, fragmento que codifica la subunidad α de la β -galactosidasa; Km^R, gen que confiere resistencia a kanamicina; *ori*pUC, origen de replicación *colE1* de los plásmidos pUC; *ori*T RP4, origen de transferencia conjugativa del replicón RP4. E1 y E2 indican cada una de las dianas de restricción del polilinker del plásmido pK18mob utilizadas para la generación de cada uno de los plásmidos pK18Gal. Los plásmidos pK18GalT y pK18GalR se generaron clonando previamente los fragmentos internos de los genes *galT* y *galR* generados por PCR en el plásmido pGEMT-easy (Tabla 3) y subclonándolos posteriormente en pK18mob como insertos *EcoRI* y *PstI*, respectivamente.

Para caracterizar los mutantes de inserción en los genes *gal* de *P. putida* KTGAL se comprobó si tenían alterada su capacidad de crecer en GA como única fuente de carbono y energía. Los resultados obtenidos (Tabla 6), indicaban la implicación de los genes *gal* en el catabolismo de GA en *P. putida*. De los siete mutantes generados, sólo el mutante en el gen *galP*, que codifica una presumible porina de membrana externa crecía de forma similar a como lo hace la cepa parental en concentraciones variables de GA (1-5 mM) (Tabla 6). Por otra parte, la cepa que portaba una inserción en el gen *galD* y cuyo producto génico es una proteína de función desconocida, si bien presentaba un crecimiento similar al observado en la cepa parental creciendo en concentraciones elevadas de GA (5 mM), su crecimiento se veía ralentizado con respecto a la cepa parental cuando se cultivaba utilizando 1 mM de GA (Tabla 6), sugiriendo la implicación de este gen en el metabolismo del GA en *P. putida* KTGAL.

Tabla 6. Crecimiento en GA y citrato de *P. putida* KTGAL y de las cepas mutantes en los genes *gal*.

<i>P. putida</i>	Crecimiento en		
	GA (5mM)	GA (1 mM)	Citrato
KTGAL	+++	++	+++
KTGALd <i>galA</i>	-	-	+++
KTGALd <i>galB</i>	-	-	+++
KTGALd <i>galC</i>	-	-	+++
KTGALd <i>galD</i>	+++	+	+++
KTGALd <i>galR</i>	-	-	+++
KTGALd <i>galP</i>	+++	++	+++
KTGALd <i>galT</i>	-	-	+++

Las células fueron cultivadas en medio mínimo MC, utilizando GA (5mM), GA (1mM) o citrato 0,2% (p/v) como fuentes de carbono. +++, crecimiento hasta alcanzar una $A_{600nm} \approx 0,8$; ++, crecimiento hasta alcanzar una $A_{600nm} \approx 0,2$; +, crecimiento que nunca supera $A_{600nm} = 0,1$; -, no crecimiento.

Dado que la disrupción del gen *galR* implica una pérdida de la capacidad de crecer en GA, muy probablemente el producto de dicho gen actúe como un activador

transcripcional de los genes *gal*, dado su significativa similitud con reguladores transcripcionales de la familia LysR (Tabla 5).

Como ya se ha comentado, la proteína GalA presenta una alta identidad de secuencia con extradiol dioxigenasas que catalizan la rotura *meta* de anillos aromáticos tales como el del protocatecuato (Tabla 5) y el gen *galA* es fuertemente inducido cuando *P. putida* se cultiva en presencia de GA (Fig. 11), lo que sugiere que GalA podría tratarse de una galato dioxigenasa. Como complemento a la caracterización de los distintos mutantes de la cepa KTGAL en base a su capacidad de crecimiento en GA, se valoró la posible actividad galato dioxigenasa en la cepa parental y en sus distintos mutantes. Para ello, las diferentes cepas se crecieron en citrato 0,2 % (p/v) y en presencia de GA (1 mM). Únicamente los mutantes en los genes *galA*, *galT* y *galR* no presentaban actividad galato dioxigenasa, siendo esta actividad en el resto de mutantes similar a la de la cepa *P. putida* KTGAL (1,0 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de proteína). Estos resultados apoyan el papel propuesto para GalA como una galato dioxigenasa y para GalR como un activador transcripcional de los genes *gal*. La ausencia de actividad enzimática galato dioxigenasa en la cepa *P. putida* KTGALd*galT* pudiera deberse a un efecto polar de la mutación sobre la transcripción del gen *galA*.

En resumen, todos los resultados presentados en este apartado permiten concluir que efectivamente los genes *gal* están implicados y son necesarios en el catabolismo aeróbico de GA en *P. putida*, si bien, faltaba por confirmar si los genes que integran el *cluster gal* son suficientes para permitir dicho metabolismo, así como el papel específico de cada uno de ellos en la ruta de degradación de GA.

1.4. Los genes *gal* son suficientes para el catabolismo de GA: diseño de una casete *gal* movilizable.

Los experimentos descritos anteriormente y el estudio *in silico* del *cluster gal* no permiten concluir si en el agrupamiento se encuentran presentes todos los genes necesarios y suficientes para dar cuenta de todas las etapas enzimáticas que se requieren en la degradación de GA, así como si se incluyen todos los elementos de transporte y regulación necesarios para el correcto funcionamiento de la ruta catabólica. Con el objeto de confirmar si el *cluster gal* contiene todos los determinantes genéticos necesarios para el metabolismo de GA, se procedió a la construcción de una casete de DNA que contenía los genes *galBCDgalRgalTAP*. El *cluster gal* se aisló de una librería

genómica de *P. putida* KT2440 construida sobre el vector Lawrist-7 (amablemente cedida por los Dres. D. Stjepandic y J.D.Hoheisel. El cósmido PPZIA58 contiene un inserto de 41 kb que comprende desde el nucleótido 2.854.165 al 2.895.166 del genoma de la cepa *P. putida* KT2440, conteniendo todos los genes *gal*. Utilizando dicho cósmido, se aisló un fragmento *EcoRI* de 9616 pb que contenía todos los genes *gal* y se subclonó en el vector de amplio espectro de huésped pBBR1MCS-5 (Tabla 3), generando el plásmido pGALKT (Fig. 15).

Para comprobar la función de los genes *gal* en el plásmido pGALKT se analizó su capacidad de complementar el crecimiento en GA de los mutantes *P. putida* KTGALd*galA* y KTGALd*galC*.

En ninguno de los dos casos el plásmido pGALKT restableció la capacidad de crecimiento en GA a los mutantes. Dado que la casete generada a partir de la cepa *P. putida* KT2440 contiene el gen *galT**, se procedió a sustituir la copia del gen *galT** del plásmido pGALKT por una copia del gen *galT* proveniente de la cepa *P. putida* KTGAL (Fig. 15). El plásmido resultante, pGAL, fue transferido por conjugación triparental a las cepas mutantes *P. putida* KTGALd*galA*, KTGALd*galB*, KTGALd*galC*, KTGALd*galR* y KTGALd*galT* y todos los exconjugantes fueron capaces de utilizar GA como única fuente de carbono y energía, demostrándose así el correcto funcionamiento de la casete *gal* en el plásmido pGAL.

Para determinar si en la casete *gal* clonada en el plásmido pGAL se encontraban presentes todos los genes necesarios y suficientes para la degradación de GA, el plásmido pGAL se transfirió a otras bacterias incapaces de utilizar este ácido aromático como fuente de carbono. En primer lugar, el plásmido pGAL fue transferido a una bacteria próxima filogenéticamente a *P. putida* (*Pseudomonas* sp MT14, una cepa que de acuerdo con su secuencia de 16S rDNA muy probablemente pertenece a la especie *Pseudomonas frederiksbergensis* (Jiménez, 2006) y que carecía de la capacidad de crecer en GA como única fuente de carbono y energía. Los transformantes fueron cultivados en medio mínimo MC conteniendo GA 5mM como fuente de carbono. Se pudo comprobar de esta forma que *Pseudomonas* sp. MT14 conteniendo el plásmido pGAL adquiriría la capacidad de utilizar GA como única fuente de carbono y energía (Fig. 16). Este experimento demostraba que la casete *gal* no sólo era funcional en *P. putida* KTGAL, sino también en otras especies del género *Pseudomonas* incapaces de degradar GA.

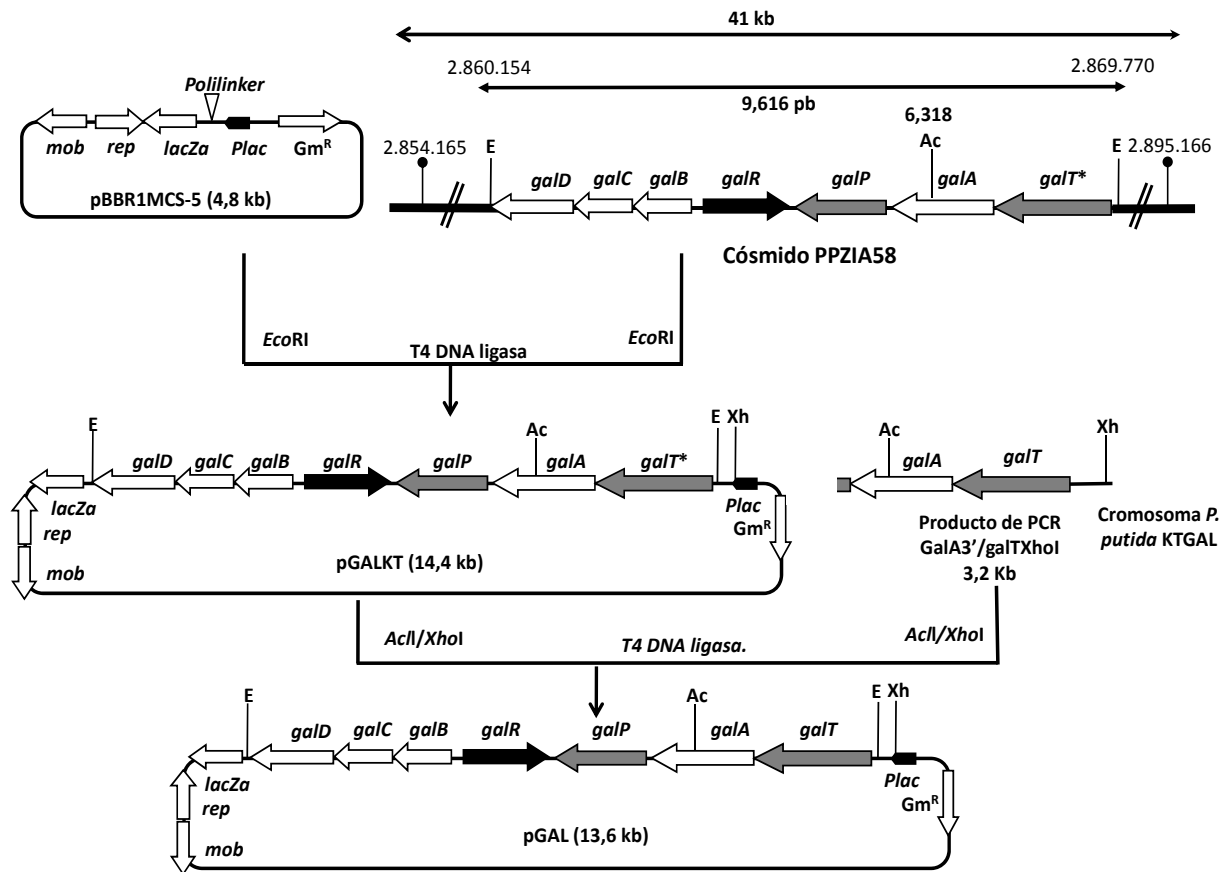


Figura 15. Representación esquemática de la construcción de los plásmidos pGALKT y pGAL. El cósmido PPZIA58 que contiene un fragmento del genoma de *P. putida* KT2440 (posiciones 2.154.165 a 2.895.166) fue digerido con la enzima de restricción *EcoRI*. El fragmento generado (9,6 kb) se subclonó en pBBR1MCS-5 originando el plásmido pGALKT. Posteriormente, la región que contenía el gen *galA* y *galT* así como sus regiones adyacentes fue sustituida por la región equivalente del genoma de la cepa *P. putida* KTGAL amplificada utilizando los oligonucleótidos GalA3' y galTXhoI (Tabla 4), resultando el plásmido pGAL. Las abreviaturas utilizadas son: *lacZα*, fragmento que codifica la subunidad α de la β -galactosidasa; *Gm^R*, gen que confiere resistencia a gentamicina; *rep* y *mob*, genes de replicación y movilización, respectivamente, del plásmido pBBR1MCS-5; *Plac*, promotor *lac*. Las dianas de restricción señaladas son: E, *EcoRI*; Xh, *XhoI*; Ac, *AclI*. En blanco se muestran los genes *gal* catabólicos; en gris se muestran los genes transportadores, y en negro el gen regulador *galR*.

Posteriormente se quiso testar el potencial del plásmido pGAL para transferir la habilidad de utilizar GA como única fuente de carbono a miembros de otros géneros bacterianos. Para ello, se seleccionó la cepa *E. coli* W, una enterobacteria capaz de utilizar gran variedad de ácidos aromáticos pero no GA como fuente de carbono. El plásmido pGAL fue transferido a *E. coli* W por electroporación y la cepa resultante, *E. coli* W (pGAL), cultivada en medio MC conteniendo GA como única fuente de carbono y energía fue capaz de crecer con una tasa de duplicación similar a la de *Pseudomonas*

sp. MT14 (pGAL) (Fig. 16). Cabe destacar que la velocidad de crecimiento de estas cepas recombinantes conteniendo el plásmido pGAL era menor al observado con la cepa *P. putida* KTGAL (Fig. 16). Este crecimiento más lento pudiera deberse a cierto efecto tóxico producido por una excesiva dosis génica del *cluster gal* en el plásmido multicopia pGAL, efecto que también se observa en la propia *P. putida* KTGAL cuando contiene el plásmido pGAL (Fig. 16).

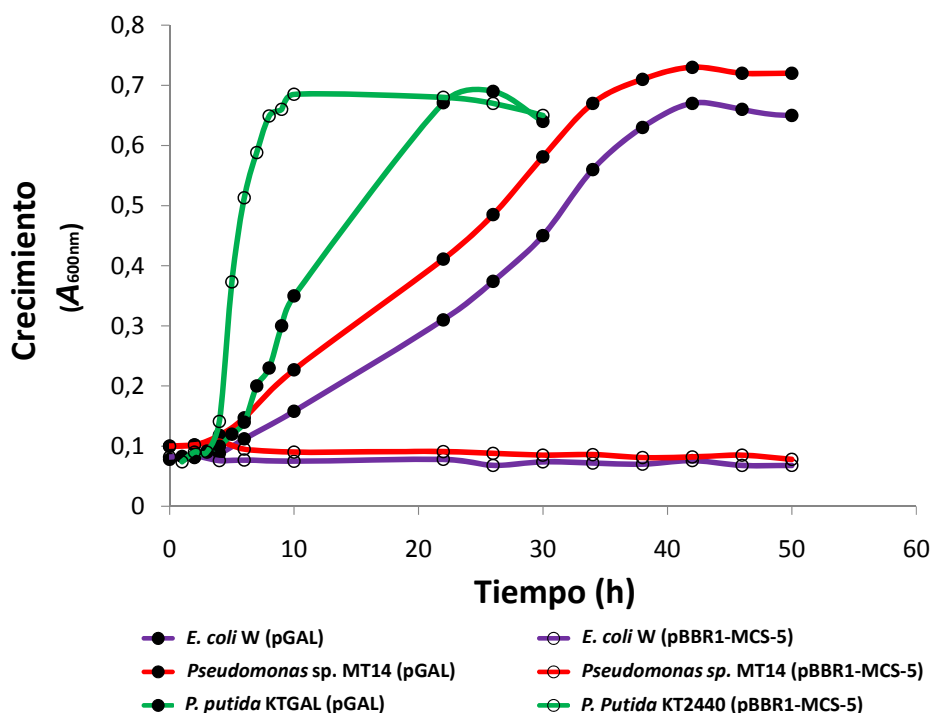


Figura 16. Crecimiento en GA de *P. putida* KTGAL, *Pseudomonas* sp. MT14 y *E. coli* W conteniendo el plásmido control pBBR1MCS-5 o el plásmido pGAL. Las bacterias se cultivaron a 30 °C en medio mínimo MC suplementado con GA (5 mM). Se registró el aumento de A_{600nm} .

A modo de resumen de este primer bloque de resultados se puede concluir que los genes *gal* son necesarios y suficientes para permitir el catabolismo aeróbico del GA en distintos microorganismos.

2. Caracterización de los genes catabólicos *gal* y sus productos génicos.

Una vez demostrado que los genes *gal* son necesarios y suficientes para la degradación aeróbica de GA, en este capítulo se procede a estudiar cada uno de los pasos enzimáticos que intervienen en la degradación de este compuesto aromático a través del estudio de los genes catabólicos *gal* y de sus productos génicos.

2.1. Estudio del gen *galA* y de la proteína GalA.

Tal y como se indica en la Introducción, la ruta de degradación de GA en *P. putida* fue propuesta por analogía con la ruta de degradación *meta* del protocatecuato (Tack *et al.*, 1972b; Sparnins y Dagley, 1975), si bien, las enzimas no fueron purificadas ni estudiadas en detalle. En estos estudios pioneros, ya se apuntó que el primer paso de la degradación consistía en la apertura del anillo aromático por una extradiol dioxigenasa (Fig. 7). El estudio de comparación de secuencias presentado en la Tabla 5, y la pérdida de actividad galato dioxigenasa en un mutante en el gen *galA*, sugerían que la proteína GalA podría ser la responsable de la primera etapa de degradación de GA en *P. putida* KTGAL. Para comprobar esta hipótesis, se procedió a la clonación del gen *galA* y al estudio del correspondiente producto génico.

2.1.1. Clonación del gen *galA*.

Como primer paso para la caracterización de la proteína GalA se procedió a la clonación del gen *galA* utilizando como molde DNA genómico de *P. putida*. En base a la comparación de secuencias de GalA con otras dioxigenasas, se revisó y rectificó la anotación original del gen *galA* (PP_2518) en el genoma de la cepa *P. putida* KT2440 (Nelson *et al.*, 2002), ya que estaba incorrectamente anotado resultando en un gen truncado con 240 nt menos en su extremo 5', lo que se traducía en una proteína igualmente truncada en 80 aa de su extremo N-terminal. El gen *galA* reanotado (1263 pb, 420 aa) (Tabla 5), fue amplificado por PCR y clonado en el plásmido pET-29a (+), resultando el plásmido pETGalA (Fig. 17). El plásmido pETGalA expresa el gen *galA* bajo el control de un promotor fuerte, el promotor del gen 10 del fago T7 (P_{T7}), y con una región de unión al ribosoma (SD) heterólogo consenso que permite una eficiente traducción. Dado que el plásmido pETGalA no replica en *Pseudomonas*, se subclonó el gen *galA* en el plásmido de amplio espectro de huésped pIZ1016 manteniendo la SD del plásmido pET-29a (+) y bajo el control del sistema regulador *Ptac/lacI* inducible por IPTG (Fig. 17). El plásmido pIZGalA se empleó en los estudios de regulación del cluster gal (ver más adelante).

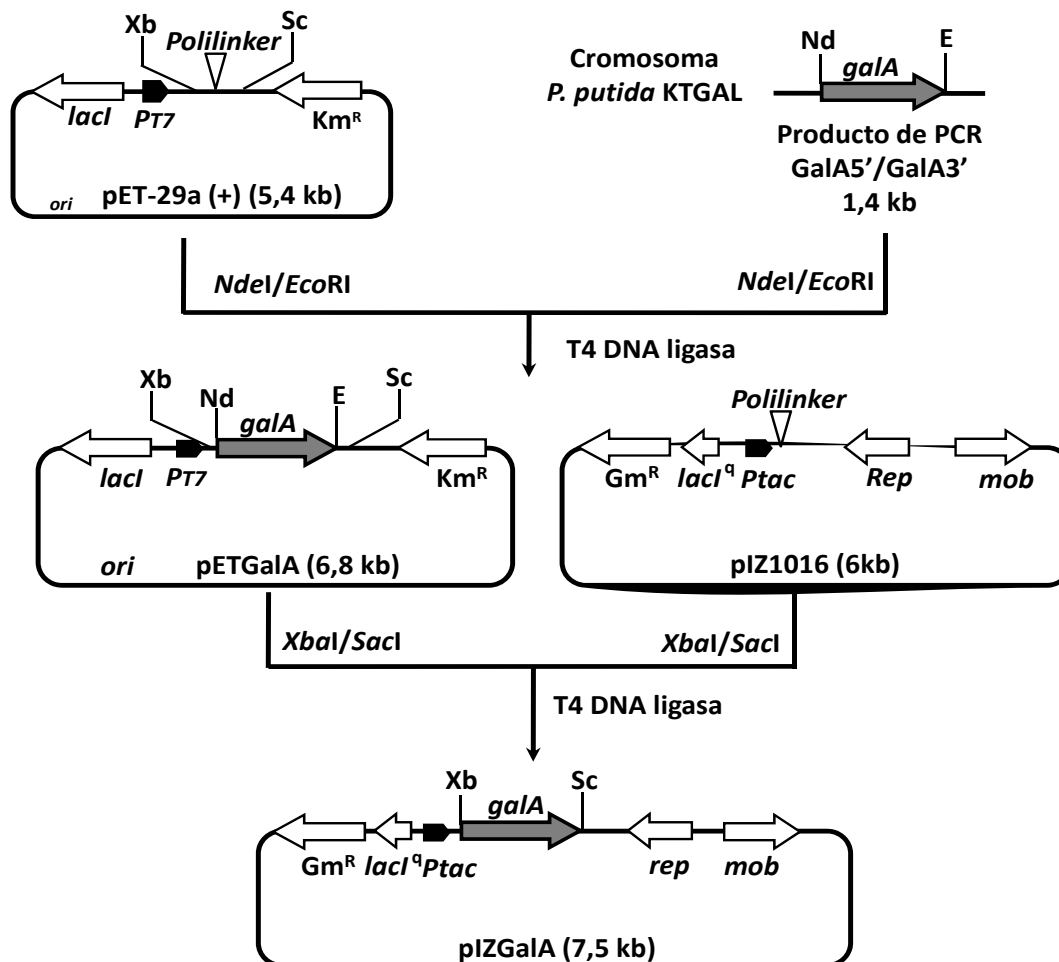


Figura 17. Representación esquemática de la construcción de los plásmidos pETGalA y pIZGalA. El gen *galA* fue amplificado a partir de DNA genómico de la cepa *P. putida* KTGAL con los oligonucleótidos GalA 5' y GalA 3' (Tabla 4) y clonado en el vector de hiperexpresión pET-29a (+) como un inserto *NdeI/EcoRI*. Posteriormente el gen *galA* junto con la SD proporcionada por el vector, fue subclonado en el plásmido de amplio espectro de huésped pIZ1016 como un inserto *XbaI/SacI*, resultando el plásmido pIZGalA. Las abreviaturas utilizadas son: *PT7*, promotor del gen 10 del fago T7, *Ptac*, promotor *Ptac*; *lacI^q*, gen que codifica el represor LacI; *Km^R*, gen que confiere resistencia a kanamicina; *ori*, origen de replicación del plásmido pBBR322; *Gm^R*, gen que confiere resistencia a gentamicina; *rep* y *mob*, genes de replicación y movilización, respectivamente, del plásmido pIZ1016. Las dianas de restricción utilizadas son: *E*, *EcoRI*; *Sc*, *SacI*; *Xb*, *XbaI*; *Nd*, *NdeI*.

2.1.2. Hiperexpresión del gen *galA* en *E. coli* y confirmación de la actividad galato dioxigenasa del producto génico.

Para estudiar el producto del gen *galA*, el plásmido pETGalA fue transferido a la cepa *E. coli* BL21 (DE3) (Tabla 2) que posee el fondo genético necesario para la correcta expresión desde el promotor *P_{T7}*. Los extractos crudos obtenidos de la cepa *E. coli* BL21(DE3) (pETGalA), cultivada como se indica en el apartado 7.2 de Materiales

y Métodos, se analizaron mediante SDS-PAGE, observándose una intensa banda de hiperproducción cuya masa molecular aparente (47 kDa) se corresponde con el valor esperado para el producto del gen *galA* (47,6 kDa) (Fig. 18). Para confirmar que la banda de 47 kDa se trataba de la proteína GalA, se determinó su secuencia N-terminal según se detalla en el apartado 7.6 de Materiales y Métodos. Como resultado, se obtuvo la secuencia Ala-Arg-Ile-Ile-Gly-Gly, que coincide con la secuencia de aminoácidos predicha para el producto del gen *galA* reanotado.

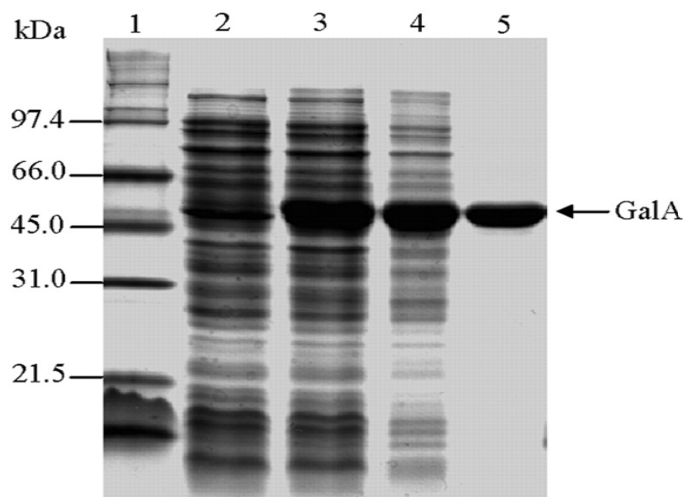


Figura 18. Purificación de la proteína GalA a partir de extractos de *E. coli* BL21 (DE3) (pETGalA). Las células se cultivaron como se indica en el apartado 7.2 de Materiales y Métodos. Los extractos crudos y las distintas fracciones de la purificación se analizaron mediante SDS-PAGE al 12,5 %. Calle 2, extracto control de células de *E. coli* BL21 (DE3) (pET-29a (+)); calle 3, extracto de células de *E. coli* BL21 (DE3) (pETGalA); calle 4, fracción de la purificación después de la etapa de ultracentrifugación; calle 5, fracción de la purificación después de la cromatografía Fenil-Sefarosa. La proteína GalA se indica con una flecha. En las calles 2 y 3 se cargaron 5 μ g de proteína total, mientras que en las calles 4 y 5 se cargaron 3 μ g. Calle 1, marcadores de peso molecular “Broad-Range” de BioRad.

Para determinar que efectivamente el producto del gen *galA* era una dioxigenasa de rotura de anillo aromático, extractos crudos de la cepa *E. coli* BL21 (DE3) (pETGalA) fueron ensayados midiendo consumo de oxígeno en presencia de diferentes sustratos como se detalla en el apartado 7.7.1 de Materiales y Métodos. Se probaron compuestos aromáticos dihidroxilados en posición *orto* e.g., catecol (1,2-dihidroxibenceno) y protocatecuato (3,4-dihidroxibenzoato), *meta* e.g., resorcinol (1,3-dihidroxibenceno) y resorcinolato (1,3-dihidroxibenzoato) o *para*, e.g., gentisato (2,5-dihidroxibenzoato) e hidroquinona (2,5-dihidroxibenceno), así como compuestos trihidroxilados tales como GA, pirogalol (3,4,5-trihidroxibenceno) o derivados metoxilados como el sirigato (3,5-dimetoxi-4-hidroxibenzoato). De todos los compuestos probados, sólo el GA producía un significativo consumo de oxígeno (19,1

$\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg proteína}^{-1}$), no observado cuando se utilizaron extractos de la cepa control *E. coli* BL21 (DE3) (pET-29a (+)). Tampoco otro análogo de GA, como el metilgalato, producía consumo de oxígeno, sugiriendo que la proteína GalA presentaba una alta especificidad de sustrato.

Una vez determinado que GalA era una dioxigenasa de anillo muy específica de GA, se estudió la estequiometría de la reacción. Para ello, concentraciones crecientes de GA se fueron añadiendo al ensayo y se midió el consumo de oxígeno en cada reacción. Como se muestra en la figura 19, para 150, 200 y 250 nmoles de GA añadidos se observó un consumo de 141, 188 y 245 nmoles de oxígeno, respectivamente, indicando que aproximadamente 1 mol de O_2 es consumido por mol de GA utilizado como sustrato.

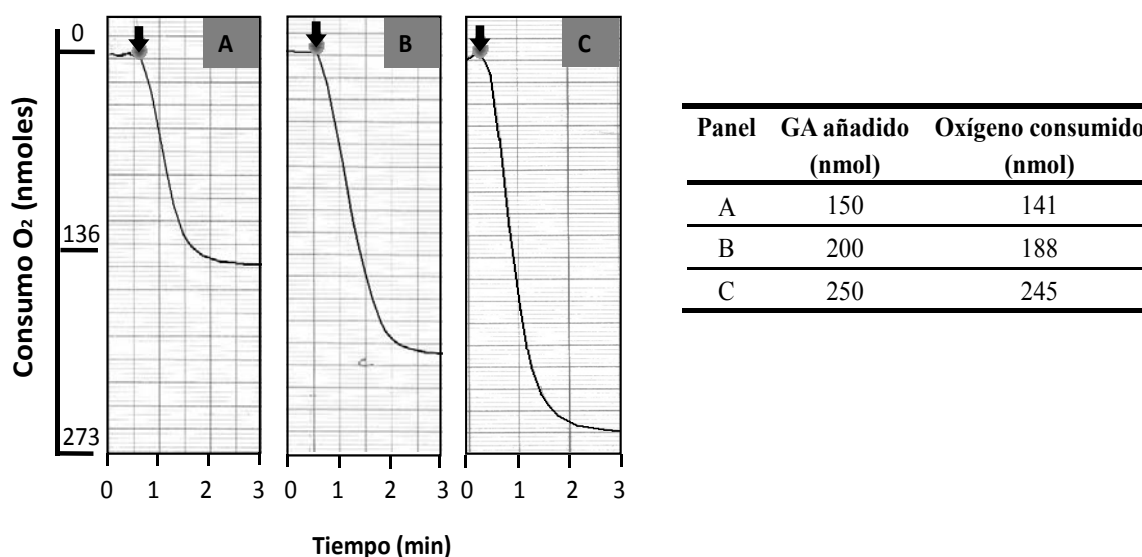


Figura 19. Experimento de consumo de oxígeno mediado por GalA y la adición de GA. Concentraciones crecientes de GA fueron añadidas (paneles A, B, C) en el momento indicado por la flecha a un tampón de ensayo que contenía 1 μg de extracto de la cepa BL21 (DE3) (pETGalA). Se monitorizó el consumo de oxígeno a lo largo del tiempo utilizando un electrodo de oxígeno como se detalla en el apartado 7.7.1 de Materiales y Métodos. Se indica mediante flechas el momento en el que se añadió GA al ensayo.

Los resultados presentados apoyaban la hipótesis de que GalA es una galato dioxigenasa específica, la primera de estructura primaria conocida cuyo determinante génico había sido identificado y clonado.

Para profundizar en el estudio de la enzima GalA, se procedió a su purificación y posterior caracterización bioquímica.

2.1.3. Purificación y caracterización bioquímica de la enzima GalA.

La purificación de GalA utilizando extractos de *E. coli* BL21 (DE3) (pETGalA) se realizó en dos etapas, una primera etapa de ultracentrifugación y una segunda de cromatografía de intercambio iónico con una columna de Fenil-sefarosa, como se describe en el apartado 7.2 de Materiales y Métodos. La evolución del proceso de purificación se siguió por SDS-PAGE (Fig. 18) y el rendimiento del proceso se recoge en la Tabla 7.

Utilizando la enzima GalA purificada, se procedió a su caracterización bioquímica. En primer lugar, se calcularon las constantes cinéticas de GalA utilizando el ensayo basado en el consumo de oxígeno, el cual permite realizar una cinética enzimática en un intervalo muy amplio de concentraciones de sustrato. De este modo las constantes cinéticas determinadas para GalA fueron una K_m y $V_{m\acute{a}x}$ de 144 μM y 53,2 $\mu\text{moles}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg prote\acute{i}na}^{-1}$, respectivamente (Fig. 21A).

Tabla 7. Etapas de la purificación de la proteína GalA hiperproducida en *E. coli* BL21 (DE3) (pETGalA).

Etapas	Proteína (mg)	Actividad total ($\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}$)	Actividad específica ($\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg prote\acute{i}na}^{-1}$)	Recuperación (%)	Factor de purificación
Extracto crudo	490	10.497	21,4	100	1
Ultracentrifugación	385	9.673	25,1	92,1	1,7
Cromatografía Fenil-sefarosa	150	6.412	42,7	61	2,0

La purificación de la proteína GalA se detalla en el apartado 7.2 de Materiales y Métodos.

Por otro lado, se determinó una actividad máxima a pH 7,0 (Fig. 20B), y una temperatura óptima de 30 °C.

El espectro visible-UV de la proteína GalA purificada presentaba un máximo de absorbancia a 280 nm, pico característico de la absorción debida al enlace peptídico. No se observaron picos a longitudes de onda características de centros de hierro-azufre o de cofactores orgánicos como flavinas o grupos hemo. Debido a que la mayoría de las dioxigenasas de apertura de anillo contienen hierro como cofactor, Fe^{2+} en el caso de extradiol dioxigenasas y Fe^{3+} en el caso de las intradiol dioxigenasas, pero también

existen algunos ejemplos de dioxigenasas que contienen Mn (II) y Mg (II), se estudió la dependencia de metales de GalA. La adición al ensayo de un agente quelante no específico como el EDTA disminuía la actividad galato dioxigenasa a menos de un 1 % de la actividad de la enzima sin tratar (Fig. 20C). Además la adición de α,α -dipiridil, un quelante específico de Fe^{2+} , también abolía la actividad galato dioxigenasa completamente (Fig. 20C). Cuando diferentes cationes, e. g., Fe^{2+} , Fe^{3+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} o Co^{2+} se añadieron a la muestra de GalA tratada con EDTA sólo con Fe^{2+} la actividad fue recobrada completamente. No obstante con Mn^{2+} , Cu^{2+} y Co^{2+} se consiguió recobrar un 8%, 9% y 5% de la actividad, respectivamente (Fig. 20C). Como ocurre con otras extradiol dioxigenasas, la adición de peróxido de hidrógeno (H_2O_2), un potente agente oxidante, reducía la actividad a un 15%, y ésta se recuperaba parcialmente (50% de la actividad de la enzima sin tratar) adicionando ascorbato al ensayo (Fig. 20D). Estos resultados sugieren que el ión Fe^{2+} es el cofactor preferente para la actividad galato dioxigenasa y, por lo tanto, que el producto del gen *galA* es una extradiol dioxigenasa que actúa sobre GA.

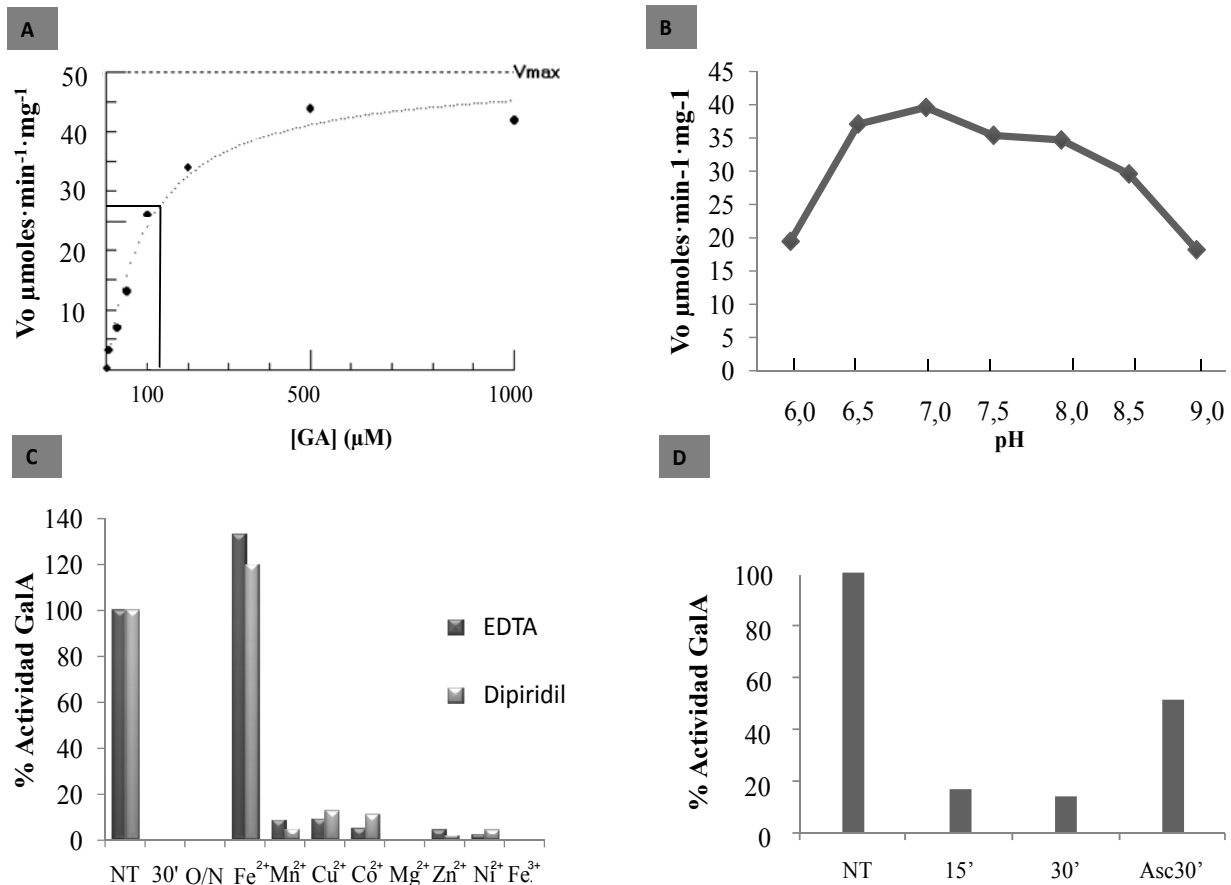


Figura 20. Caracterización bioquímica de la enzima GalA. **A.** Representación de Michaelis-Menten para la actividad galato dioxigenasa. La velocidad de la reacción de consumo de oxígeno se midió con un electrodo de oxígeno y las concentraciones de sustrato empleadas fueron 0,5, 1, 5, 25, 50, 100, 500 y 1000 μM , en las condiciones que se describen en el apartado 7.7.1. Las constantes cinéticas K_m y $V_{m\acute{a}x}$ se calcularon utilizando el programa GraphPad Software (www.graphpad.com) tal y como se detalla en el apartado 7.7.1 de Materiales y Métodos. **B.** Actividad galato dioxigenasa en función del pH. El ensayo se realizó en un rango de pH de 6 a 9 tal y como se detalla en el apartado 7.7.1 de Materiales y Métodos. **C.** Efecto de los quelantes EDTA (1 mM) y α,α -dipiridil (2 mM) en la actividad galato dioxigenasa. NT, enzima no tratada. 30' y O/N tratamiento durante 30 min o 12h con los quelantes, respectivamente. La enzima tratada durante 12 horas fue incubada posteriormente durante 30 min con Fe^{2+} , Fe^{3+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} y Co^{2+} añadidos a una concentración final de 2 mM determinándose posteriormente la actividad galato dioxigenasa según se detalla en el apartado 7.7.1 de Materiales y Métodos, 100% representa la actividad de la enzima GalA no tratada. **D.** Efecto de la adición de H_2O_2 en la actividad galato dioxigenasa. NT, enzima no tratada. 15' y 30', tratamiento de la enzima con H_2O_2 (1 mM) durante un periodo de 15 min y 30 min, respectivamente. Asc30', actividad dioxigenasa que presentaba la enzima GalA tratada durante 30 min con H_2O_2 (1 mM) y posterior incubación con ácido ascórbico (10 mM) durante otros 30 min. 100% representa la actividad de la enzima GalA no tratada. La actividad galato dioxigenasa en los paneles B, C y D fue valorada utilizando el ensayo espectrofotométrico (apartado 7.7.1 de Materiales y Métodos).

Para confirmar la ruptura del anillo de GA, se procedió a caracterizar el producto de la reacción catalizada por GalA.

2.1.4. Caracterización del producto de la reacción catalizada por GalA.

Para determinar la estructura del producto de la actividad de GalA sobre GA, se utilizaron técnicas de RMN y de espectrometría de masas.

Se analizó el espectro de protón (espectro ^1H), en el cual se registran las señales procedentes de aquellos átomos de hidrógeno de la estructura que se encuentren en un entorno que no permita su intercambio con los átomos de deuterio del agua deuterada. En la figura 21 se muestra el esquema de la reacción propuesta para GalA y los protones susceptibles de dar una señal en RMN. En la molécula de GA hay dos protones (1 y 2) susceptibles de producir resonancia (Fig. 21). Debido a que son dos protones totalmente simétricos, se espera una sola señal de resonancia resultante de la suma de la señal individual de ambos protones. Como era de esperar en el espectro de resonancia obtenido para el GA, se puede observar una sola señal de resonancia (pico III), con un desplazamiento químico de 7.07 ppm, correspondiente a los protones 1 y 2. (Fig. 22A).

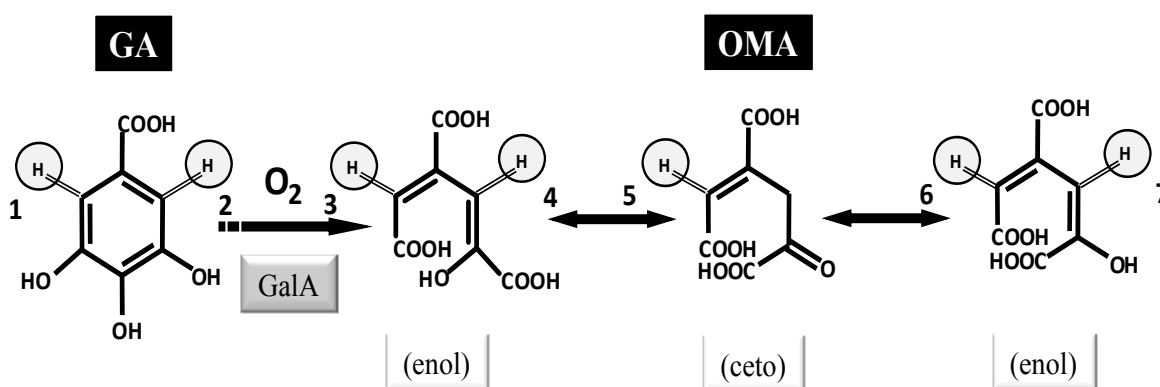


Figura 21. Reacción catalizada por GalA. Se indican los sustratos (GA y O_2) y el producto (OMA) de la reacción. Los círculos grises destacan aquellos protones que pueden ser detectados en un espectro de RMN en las condiciones del ensayo utilizadas. El ácido oxalmesacónico (OMA) se encuentra en un equilibrio entre sus dos formas enólicas y la forma cetona.

Se ha sugerido, por analogía con el producto de apertura *meta* del protocatecuato, que el producto de apertura del GA por acción de una dioxigenasa es la mezcla de los 3 isómeros del ácido oxalmesacónico (OMA) (Tack *et al.*, 1972b; Kasai

et al., 2005). En la figura 21 se puede ver la estructura química de estos 3 isómeros así como los protones susceptibles de ser detectados en un espectro de RMN. Después de la incubación del GA con GalA, el producto de la reacción muestra un espectro con una única señal de resonancia (pico I), con un desplazamiento químico de 6.77 (Fig. 22A). El valor de desplazamiento químico obtenido es compatible con el esperado para los protones 3, 5 o 6 de las formas tautoméricas del OMA (Fig. 22A).

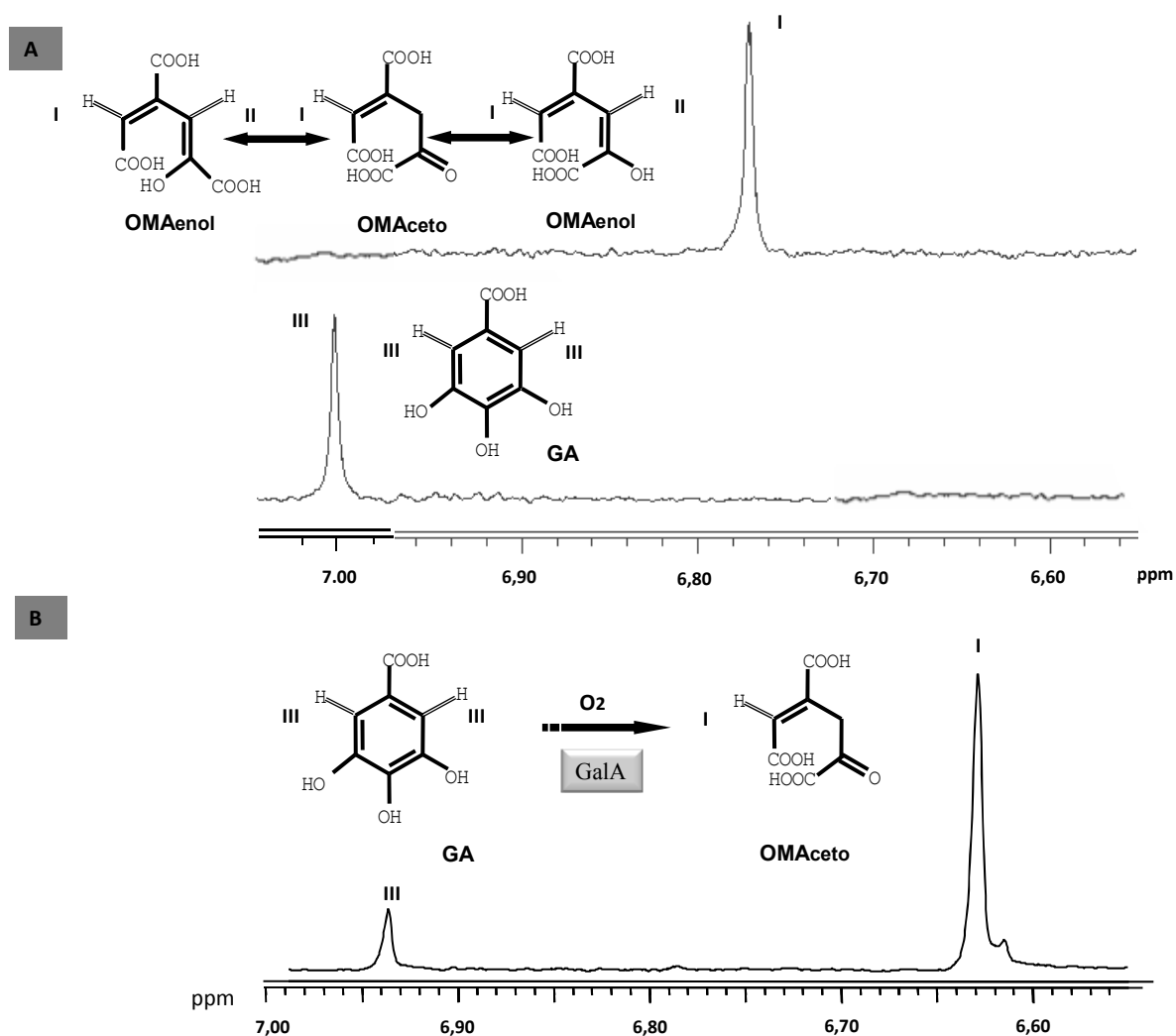


Figura 22. Espectros de protón (^1H) del sustrato y producto de la reacción catalizada por GalA. En el panel **A**. Se muestra el espectro de protón del GA (abajo) y el correspondiente al del producto de apertura (arriba) en condiciones ácidas (pH 3,0) y utilizando 100% de D_2O en el ensayo (ver apartado 12 de Materiales y Métodos). En el panel **B**. Se muestra el espectro de protón del producto de la actividad GalA sobre GA analizado en 10% de D_2O y en condiciones de pH neutro (pH 7,0). Las estructuras del GA, OMA_{ceto} y las dos formas OMA_{enol} están representadas. Los protones susceptibles de ser detectados en las condiciones de ensayo están numerados como I, II y III, aplicándose la misma nomenclatura para el pico de resonancia que presenta cada uno. Nótese que el protón II únicamente podrá ser detectado utilizando el segundo protocolo de análisis, infiriéndose a partir del resultado que la reacción catalizada por GalA es la que se muestra en el panel B.

Los datos obtenidos del análisis del espectro de protón para el producto de apertura no descartan completamente que alguna de las dos formas enoles del OMA sea el producto de apertura, ya que en las condiciones de ensayo utilizadas, únicamente el protón nombrado como I (correspondiente al 3,5,6 de la Fig. 21) sería detectable (Fig. 22A). Para intentar determinar cuál de las formas isoméricas del OMA era el verdadero producto de la reacción, se repitió el experimento de RMN en 10% de D₂O lo cual nos permitía detectar los protones 3 y 4, 6 y 7 de cualquiera de las formas enólicas o el protón 5 de la forma ceto (Fig. 21), y se analizó inmediatamente después de la acción de GalA (sin extraer la muestra). En el espectro de resonancia obtenido para el producto de la acción de GalA sobre GA en estas nuevas condiciones, aparece una única señal de resonancia a 6.63 ppm correspondiente a un protón olefínico (I) (Fig. 22B), correspondiente al protón 5 de la forma OMA_{ceto} (Fig. 21). La diferencia observada de 0,14 ppm con respecto a la señal obtenida para el OMA mostrado en la figura 22A, es debida al diferente pH usado en las dos condiciones (ver apartado 12 de Materiales y Métodos). Parte del GA utilizado en la reacción permanece tras la adición de GalA, produciendo una señal de resonancia del protón olefínico (III) de 6.94 ppm (Fig. 22B) igualmente 0,13 ppm menor que el valor de resonancia obtenido en las condiciones de la figura 22A, y mostrando que la rapidez con la cual se realizó el experimento no permitió que todo el GA fuera transformado en OMA. Dado que no aparece la segunda señal de resonancia esperada para el segundo protón de cualquiera de las formas enólicas del OMA (protones 4 y 7 en Fig. 21), los resultados parecen confirmar que el verdadero producto de la acción de GalA sobre GA es únicamente la forma OMA_{ceto}.

Para completar la información obtenida mediante RMN, se realizaron experimentos de espectrometría de masas, empleando muestras idénticas a las empleadas para los análisis de RMN de la figura 22A. El sustrato de la reacción, GA, poseía un espectro de masas en el que aparecía un único ión [M-H]⁻ caracterizado por un cociente *m/z* de 169,1. Este pico desaparecía completamente tras la adición de la enzima GalA, y en su lugar aparecían dos nuevos picos a *m/z* de 201 y 183. El ión molecular de *m/z* 201 se corresponde con el producto de apertura del GA por la adición de dos átomos de oxígeno (OMA) (Fig. 23). El ión molecular correspondiente al pico de *m/z* 183 se trata, muy probablemente, del ácido 2-pirona 4,6-dicarboxílico (PDC), el cual se forma a partir del OMA por la pérdida de una molécula de agua (Maruyama, 1983b). Dado que el PDC no fue detectado en el análisis por RMN (el protón olefínico debería de dar una señal a 6.92 ppm que no se observó), muy probablemente la

formación de PDC se deba a las condiciones de preparación de la muestra para el análisis por espectrometría de masas provocando su deshidratación o por las mismas condiciones del ensayo (Ver apartado 11 de Materiales y Métodos) y no sea por tanto un verdadero producto de la apertura del anillo del GA. De igual modo, los picos correspondientes a m/z de 139 (compuesto II) y 157 (compuesto I) se corresponden con los productos de descarboxilación del PDC y OMA, respectivamente (Fig. 23), y no se trata de productos generados por la actividad galato dioxigenasa.

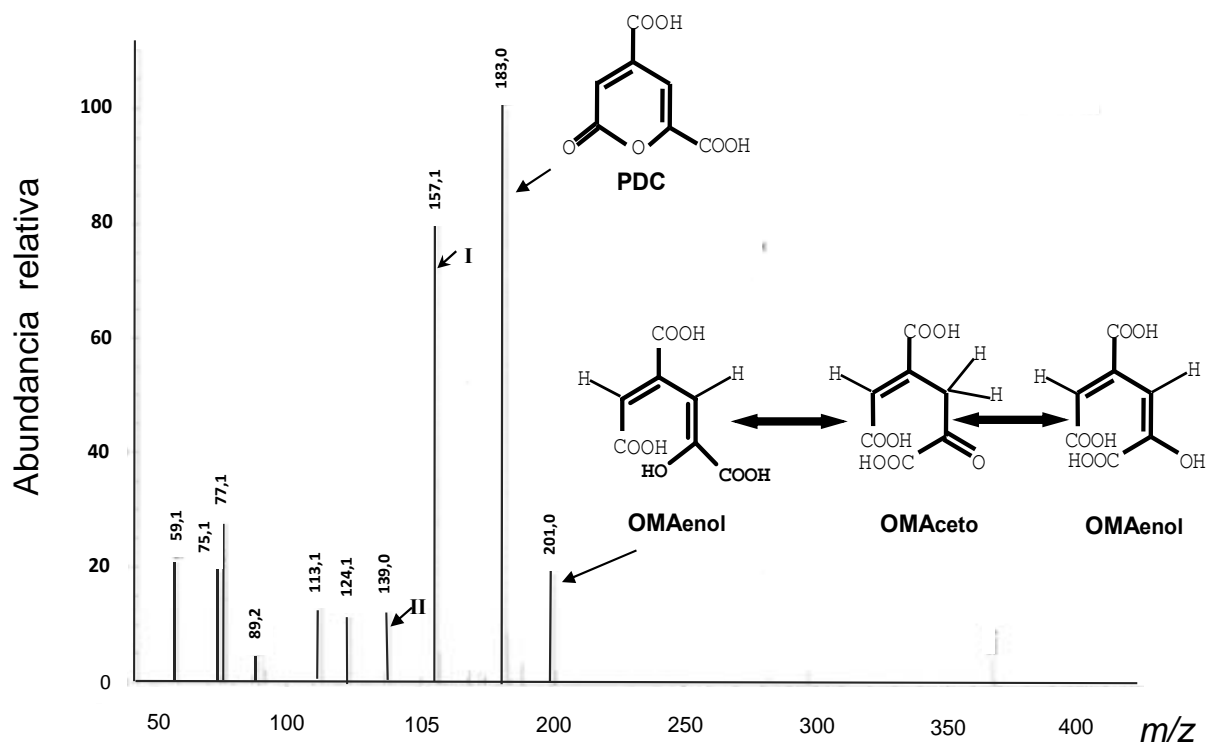


Figura 23. Análisis mediante espectrometría de masas del producto de la reacción catalizada por GalA. El producto de ruptura de GA generado tras la reacción con la dioxigenasa GalA fue analizado por espectrometría de masas tal y como se indica en el apartado 11 de Materiales y Métodos. En la figura se muestra la estructura de las formas isoméricas del OMA así como la estructura del PDC. Los picos correspondientes a los compuestos I y II generados por la descarboxilación tanto del OMA como del PDC, respectivamente, son igualmente indicados.

En conclusión, tanto los datos de RMN, donde la señal de resonancia del protón olefínico es compatible con la estructura química de la forma ceto del OMA, como los de espectrometría de masas, donde el aumento de masa asociado al producto de apertura concuerda con la adición de dos átomos de oxígeno al sustrato de partida, tal y como se espera de una actividad dioxigenasa, coinciden en que el producto de la actividad de GalA sobre GA es la forma ceto del OMA. Se establece así por primera vez que el tautómero OMA_{ceto} y no una mezcla de los 3 tautómeros como se había sugerido

previamente, es el verdadero producto de la apertura de anillo del GA mediada por una extradiol dioxigenasa.

2.1.5. Estudio sobre las relaciones estructura/función de GalA.

Dado que GalA representó la primera galato dioxigenasa de estructura primaria conocida, se procedió a un estudio más detallado sobre sus relaciones estructura/función.

2.1.5.1. Conformación nativa de GalA.

Con objetivo de identificar la masa molecular de la proteína GalA nativa, se realizó un análisis de velocidad de sedimentación mediante ultracentrifugación analítica. Este análisis indicaba que el pico de sedimentación predominante correspondía a una especie proteica con un coeficiente de sedimentación corregido de $7,29 \pm 0.10$ S. Por otra parte, la masa molecular de esta especie principal obtenida por equilibrio de sedimentación era de $132,000 \pm 12,000$ Da. Debido a que la masa molecular del monómero deducido de su composición de aminoácidos es de 47,644 Da, los datos de ultracentrifugación analítica son compatibles con el hecho de que la principal especie de GalA en solución es un trímero globular compuesto por subunidades idénticas.

2.1.5.2. Predicción de la estructura secundaria y modelado tridimensional de GalA.

Como ya se ha indicado anteriormente, la galato dioxigenasa de *P. putida* muestra una significativa similitud con protocatecuato 4,5 dioxigenasas (Tabla 5), proteínas pertenecientes al grupo de las extradiol dioxigenasas tipo II (Ver apartado 2.2.2 de la Introducción). Un estudio más en detalle de la estructura primaria de GalA, reveló que su región N-terminal (residuos 1-281) mostraba una identidad de secuencia muy significativa con la subunidad mayor (β) de las protocatecuato 4,5-dioxigenasas, e. g., FldU de *Sphingomonas* sp. LB126 (44% de identidad), ProOb de *P. ochraceae* (42%), PmdB de *C. testosteroni* BR6020 (42%) o LigB de *S. paucimobilis* SYK-6 (39%). Por otra parte, la región C-terminal de GalA (residuos 294-420) presentaba similitud con las correspondientes subunidades pequeñas (α) de las protocatecuato 4,5 dioxigenasas, e. g., FldV, ProOa, PmdA y LigA, aunque esta región está mucho menos conservada (24-28 % de identidad) que la anterior. Este análisis sugiere que la galato

dioxigenasa de *P. putida* posee una arquitectura modular con dos dominios separados por una región *linker* que se extiende del residuo 282 hasta el 293 (Fig. 24).

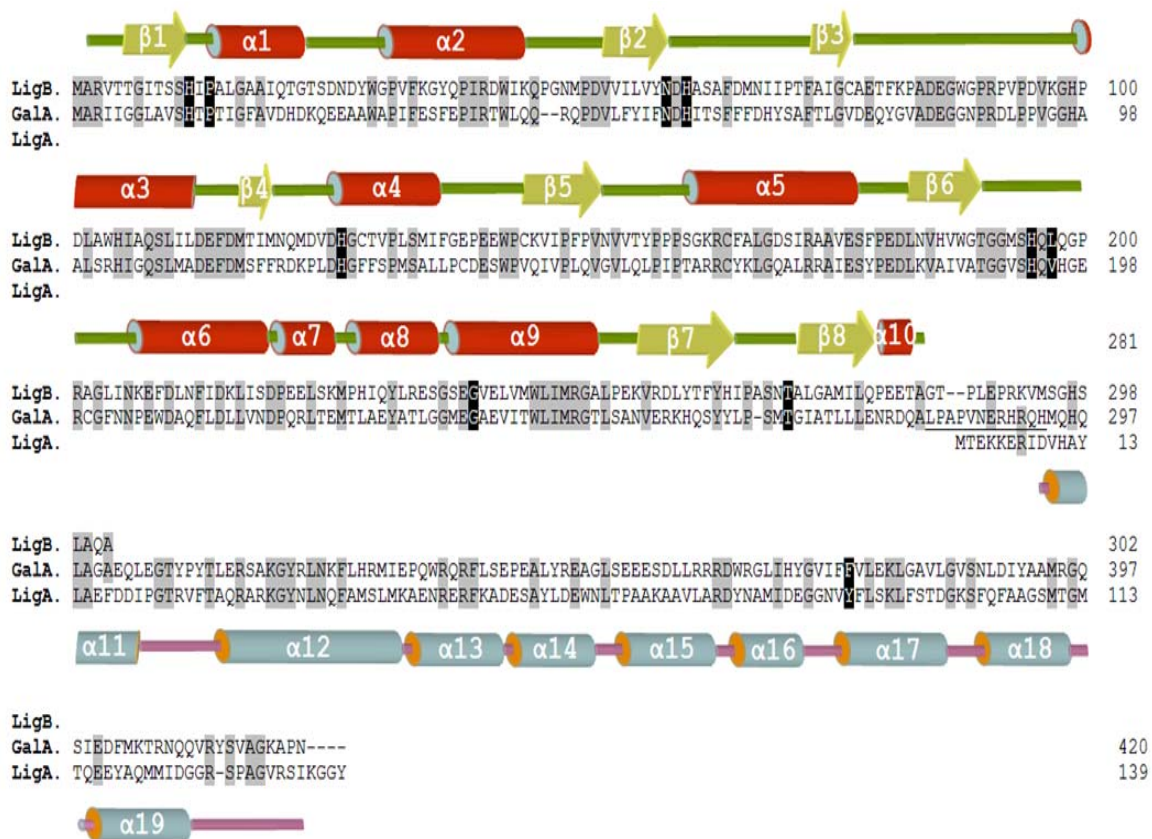


Figura 24. Alineamiento de la secuencia de GalA con las subunidades grande (LigB) y pequeña (LigA) de la protocatecuato 4,5-dioxigenasa de *S. paucimobilis* SYK-6. Los aminoácidos se representan por el código estándar de una letra y se encuentran numerados a la derecha. El alineamiento de secuencias se realizó utilizando el programa ClustalW. Se representan sombreados en gris aquellos residuos idénticos y en negro aquéllos discutidos en el texto y propuestos como esenciales en la catálisis enzimática. La estructura secundaria fue predicha a partir del modelo tridimensional de la galato dioxigenasa (Fig. 25). Las α -hélices (cilindros rojos) y cadenas- β (flechas amarillas) del dominio N-terminal de GalA se indican en la parte de arriba del alineamiento. Las α -hélice (cilindros azules) del dominio C-terminal de GalA se muestran en la parte inferior del alineamiento. Los 12 aminoácidos que constituirían la región *linker* entre ambos dominios se presentan subrayados.

Debido a que se conoce la estructura tridimensional de la protocatecuato 4,5-dioxigenasa de *S. paucimobilis* SYK-6 (LigAB) (Sugimoto *et al.*, 1999), se realizó un alineamiento de secuencias entre GalA y LigAB (Fig. 24) así como un modelado por homología de la estructura tridimensional tanto del dominio N-terminal como del C-terminal de GalA (Fig. 25). Según este modelo, el dominio N-terminal de la galato dioxigenasa forma una estructura globular α/β en donde los aminoácidos His12, His59 y Glu240 serían los residuos que unen el Fe^{2+} , y la His193 sería el residuo que actúa como

base catalítica en la reacción. Adicionalmente, un probable ligando débil de Fe^{2+} en la protocatecuato 4,5-dioxigenasa, Asn59, está también conservado en GalA, Asn57 (Figs. 24 y 25).

Finalmente, y a modo de resumen, los análisis de comparación de secuencias, predicción de estructura secundaria y modelado tridimensional sugieren que la galato dioxigenasa GalA de *P. putida* tiene una novedosa arquitectura modular, organizada en 2 dominios, que puede haber evolucionado de la fusión de las dos subunidades de las protocatecuato 4,5-dioxigenasas.

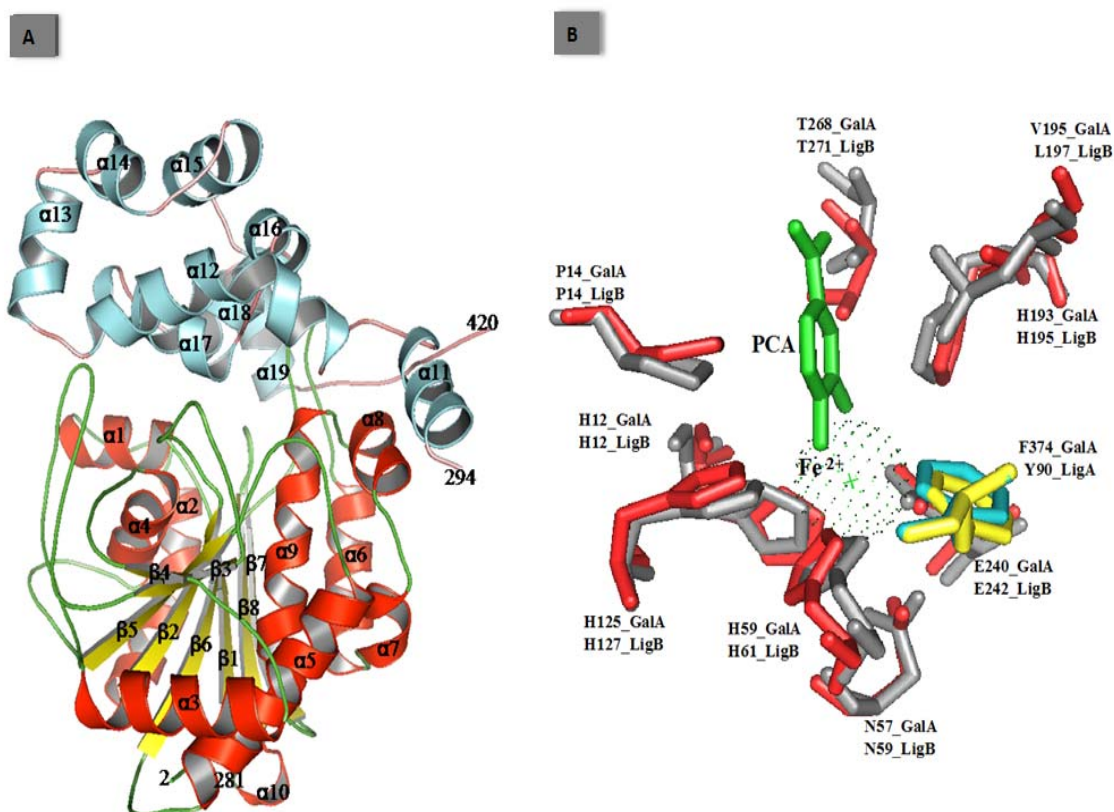


Figura 25. A. Modelo tridimensional de la galato dioxigenasa GalA de *P. putida*. La estructura globular α/β del dominio N-terminal (residuos 2-281) contiene 10 α -hélices (en rojo) y 8 cadenas- β (en amarillo). Las regiones que forman *loops* se indican en verde. La estructura predicha del dominio C-terminal (residuos 294-420) contiene 9 α -hélices ($\alpha 11$ - $\alpha 19$) (en azul). **B. Comparación del centro activo de la protocatecuato 4,5-dioxigenasa (LigAB) unida a protocatecuato (PCA) y el centro catalítico predicho para GalA.** Los residuos del dominio N- y C-terminal de la galato dioxigenasa se indican en rojo y azul respectivamente. Los residuos de LigA y LigB se muestran en amarillo y gris respectivamente. La esfera de coordinación del Fe^{2+} y el PCA se indican en verde. Ambos paneles fueron preparados con el programa PyMOL (DeLano, 2002).

2.2. Estudio del gen *galD* y de la proteína GalD.

El estudio de comparación de secuencias (Tabla 5) mostró que el gen *galD* codificaba una proteína hipotética conservada en *clusters* de degradación *meta* de protocatecuato de diferentes bacterias y cuya función es desconocida. Aunque la mutación del gen *galD* en *P. putida* KTGALd*galD* no impedía el crecimiento de la cepa en GA 5 mM, si lo ralentizaba en GA 1 mM (Tabla 6).

Una observación experimental fue determinante para identificar la función de GalD. Cuando se monitorizaba a tiempos largos la actividad galato dioxigenasa utilizando el ensayo espectrofotométrico, se veía como a la disminución inicial de la absorbancia a 265 nm debido a la pérdida de aromaticidad ocasionada por la apertura del anillo aromático y la formación de OMA, le seguía un aumento en la absorbancia a 265 nm de forma espontánea. Extractos de la cepa *P. putida* KTGAL creciendo en GA como única fuente de carbono y energía aceleraban este proceso espontáneo, mientras que, por el contrario, cuando se utilizaban extractos de la cepa *P. putida* KTGALd*galD*, el proceso se asemejaba al comportamiento espontáneo, sugiriendo que la actividad de GalD estaba relacionada con esta variación de absorbancia a 265 nm (Fig. 26). Este resultado sugería que el gen *galD* estaba implicado en una nueva etapa enzimática no descrita hasta la fecha en la ruta de degradación de GA. Para profundizar en el estudio y caracterización de esta nueva reacción, se procedió a la clonación del gen *galD*.

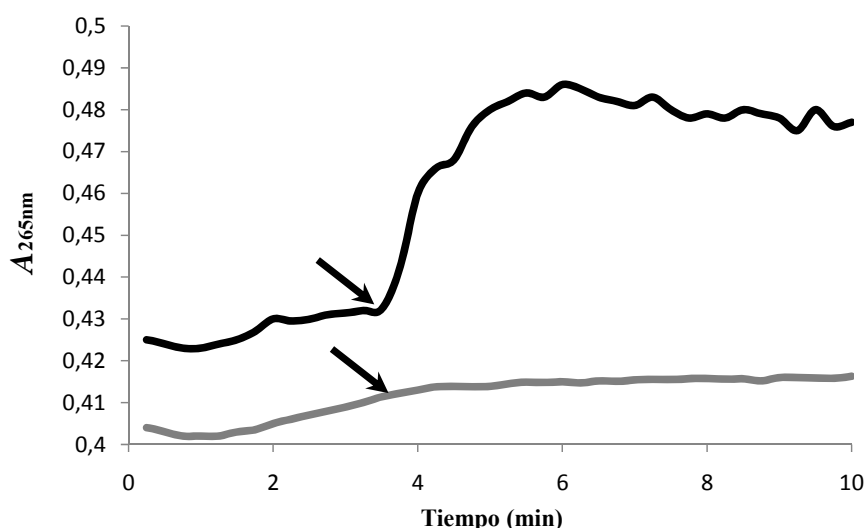


Figura 26. Cambios en la A_{265nm} observados en el producto de apertura del GA (OMA) y mediados por el producto del gen *galD*. El ensayo contenía GA 200 μ M en tampón Tris-HCl 100 mM pH 7,5. Tras la adición de 2 μ g de la enzima GalA purificada, la reacción se incubó a 30 °C durante 2 minutos. Posteriormente (tiempo 0), se monitorizó nuevamente la A_{265nm} y se añadieron en el momento indicado por la flecha 5 μ g del extractos de la cepa *P. putida* KTGALd*galD* (gris) o *P. putida* KTGAL (negro) las cuales habían sido cultivadas en GA 5 mM como fuente de carbono.

2.2.1. Clonación y expresión heteróloga del gen *galD*.

Para estudiar el papel del gen *galD* en la ruta de degradación de GA se procedió, en primer lugar, a su clonación e hiperexpresión en *E. coli*. Para ello, fue amplificado por PCR y subclonado en el vector de hiperexpresión pET-29a (+) bajo el control del promotor 10 del fago T7, resultando en el plásmido pETGalD (Fig. 27). Los extractos celulares de cultivos de *E. coli* BL21 (DE3) (pETGalD) obtenidos tras probar distintas condiciones de fermentación, en las cuales se cambiaron la temperatura, agitación, tiempo de inducción con IPTG, etc., no mostraban banda de hiperproducción correspondiente a GalD mediante análisis por SDS-PAGE (resultados no mostrados).

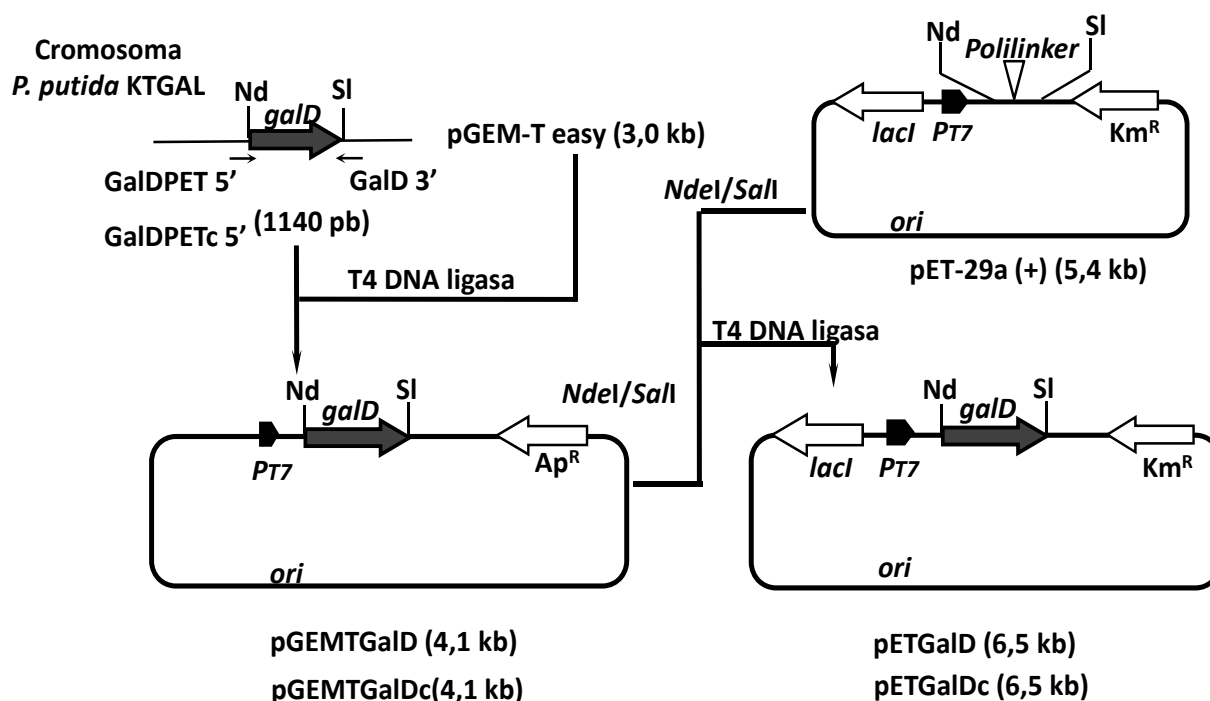


Figura 27. Representación esquemática de la construcción de los plásmidos pETGalD y pETGalDc. El gen *galD* fue amplificado por PCR utilizando la pareja de oligonucleótidos GalDPET 5'/GalDPETc5' y GalD3' (Tabla 4) y DNA genómico de *P. putida* KTGAL como molde. La región se clonó en el plásmido pGEM-T easy y fue subclonada en el vector pET-29a (+) empleando las enzimas de restricción *NdeI* y *SalI*. Las abreviaturas utilizadas son: Ap^R, gen que confiere resistencia a ampicilina; Km^R, gen que confiere resistencia a kanamicina; *lacI*, gen que codifica el represor LacI; *ori*, origen de replicación del plásmido pBR322; *P_{T7}*, promotor del gen 10 del fago T7. Las dianas de restricción señaladas son: SI, *SalI*; Nd, *NdeI*. Los plásmidos pGEMTGalDc y pETGalDc contienen un gen *galD* con dos mutaciones puntuales silenciosas en los codones 6 y 7.

Un análisis en detalle del uso de codones de la región 5' del gen *galD* reveló la presencia de dos codones *raros* tanto para *P. putida* como para *E. coli*, i. e, el sexto codón (ATA) que codifica una Ile y el séptimo (CCC) que codifica una Pro.

Sospechando una relación entre la falta de hiperexpresión del gen *galD* y la presencia de estos dos codones *raros* seguidos al comienzo de la proteína, se diseñó un nuevo oligonucleótido para la amplificación de *galD* que contenía los codones más frecuentes para estos aminoácidos, es decir, ATC para la Ile y CCG para la Pro según el uso de codones de *E. coli* y de *P. putida* (http://gcua.schoedl.de/compare_v2.html) (<http://www.kazusa.or.jp/codon/>). El proceso de clonación se llevó a cabo de la misma manera que se ha descrito anteriormente, generándose el plásmido pETGalDc (Fig. 27). Cuando se analizaron los extractos de la cepa de *E. coli* BL21 (DE3) (pETGalDc), se observó una intensa banda en el análisis por SDS-PAGE correspondiente a una proteína de 37 kDa (Fig. 28), lo que coincide con el tamaño predicho para GalD (37,5 kDa). Estos resultados confirman la hiperexpresión del gen *galD* en *E. coli* y sugieren un mecanismo de control de su expresión dependiente del uso de codones poco frecuentes en el extremo 5' del gen.

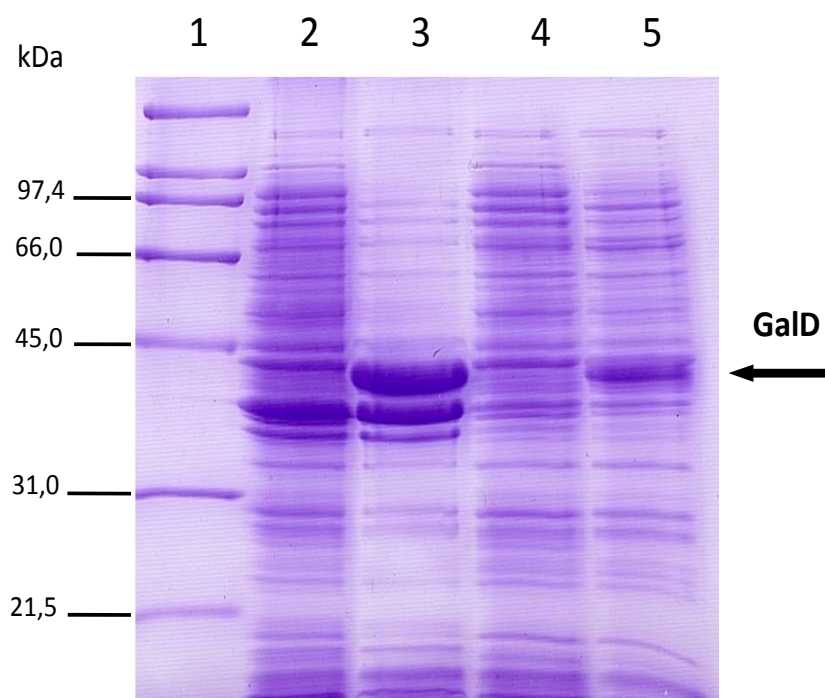


Figura 28. Hiperexpresión del gen *galD* en *E. coli*. Análisis mediante SDS-PAGE al 12,5% de los extractos celulares de las cepas *E. coli* BL21 (DE3) (pET-29a (+)) y *E. coli* BL21 (DE3) (pETGalDc). Calle 1, marcadores de peso molecular “Broad-Range” de BioRad; calles 2 y 4, extractos insoluble y soluble, respectivamente, de la cepa *E. coli* BL21 (DE3) (pET-29a (+)); calles 3 y 5, extractos insoluble y soluble, respectivamente, de la cepa *E. coli* BL21 (DE3) (pETGalDc). La posición de la banda de hiperproducción correspondiente a GalD se indica con una flecha. En todas las calles, exceptuando la calle de los marcadores, se cargaron 5 µg de proteína total.

2.2.2. Caracterización de la reacción catalizada por GalD

Para estudiar la reacción catalizada por GalD se utilizaron extractos proteicos conteniendo a la proteína GalD hiperproducida (Fig. 28) que se añadieron al producto de la reacción catalizada por GalA, i. e., OMA_{ceto}, tal y como se detalla en el apartado 7.7.2 de Materiales y Métodos. La adición de GalD ocasionaba un aumento de absorbancia a 275 nm. que era concomitante con una disminución de absorbancia a 210 nm. (Figs. 29A y B).

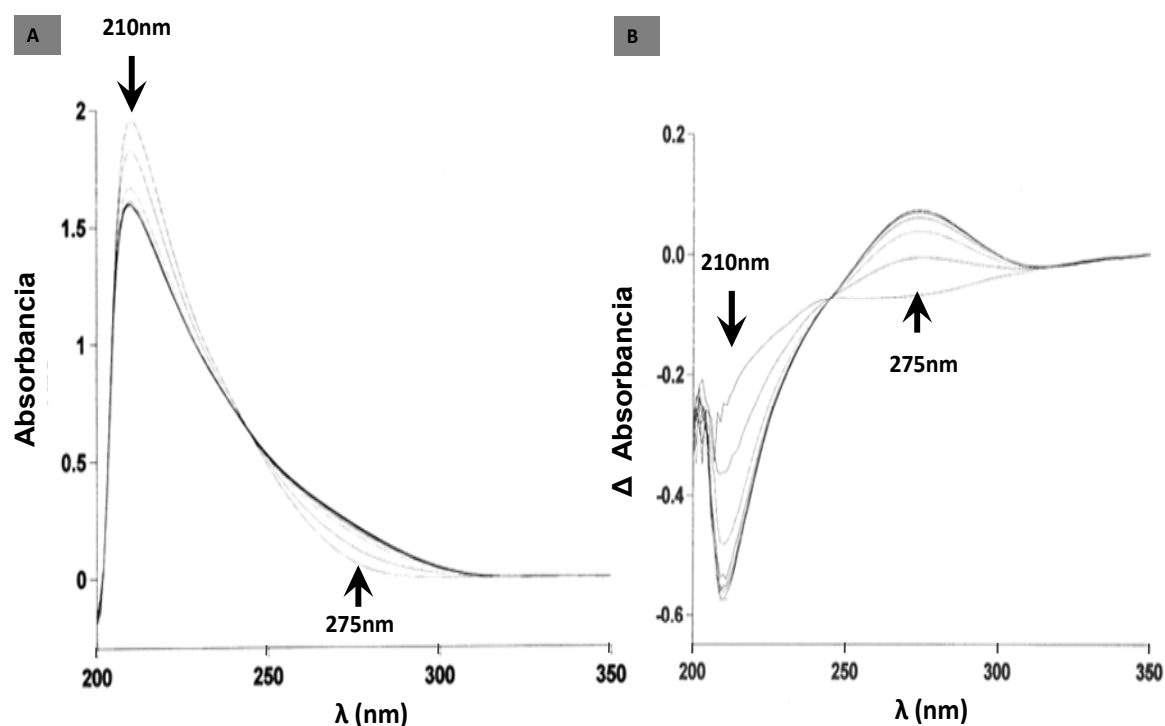


Figura 29. Cambios de absorbancia observados en el producto de apertura (OMA_{ceto}) de GA mediados por el producto del gen *galD*. Para la reacción previa catalizada por GalA se utilizó GA 200 μ M de en tampón Tris-HCl 100 mM pH 7,5. Tras la adición de 2 μ g de GalA purificada, la reacción se incubó durante 2 minutos dividiéndose posteriormente en la cubeta de ensayo y la de referencia. Un total de 0,1 μ g de extracto soluble de la cepa *E. coli* BL21 (DE3) (pETGalDc) y (pET-29a (+)) fueron añadidos a la cubeta de ensayo y de referencia, respectivamente. El cambio de absorbancia en el rango 200-350 nm fue monitorizado cada 2 minutos con un espectrofotómetro Carry-400 de doble haz durante 20 minutos. El experimento se hizo por duplicado, obteniéndose resultados similares. En el panel A se indican los valores de absorbancia obtenidos, señalándose con flechas los correspondientes a 210 y 275 nm. En el panel B se indican las variaciones de absorbancia respecto a los valores obtenidos a tiempo 0.

Espectros similares a los que produce GalD sobre el OMA se han descrito en algunas rutas de degradación de compuestos aromáticos por la acción de diferentes isomerasas sobre alguno de los intermediarios (Whitman *et al.*, 1991).

Teniendo en cuenta que el OMA es un compuesto que posee una tautomería ceto-enólica y que el producto de apertura del anillo del GA fue identificado como la forma ceto, se podría pensar que la reacción que estaba catalizando GalD era la isomerización de la forma ceto del OMA a la forma enol. Para tratar de demostrar esta hipótesis tanto OMA (forma ceto) como el producto de la reacción de GalD sobre éste, fueron analizados por RMN (Fig. 30).

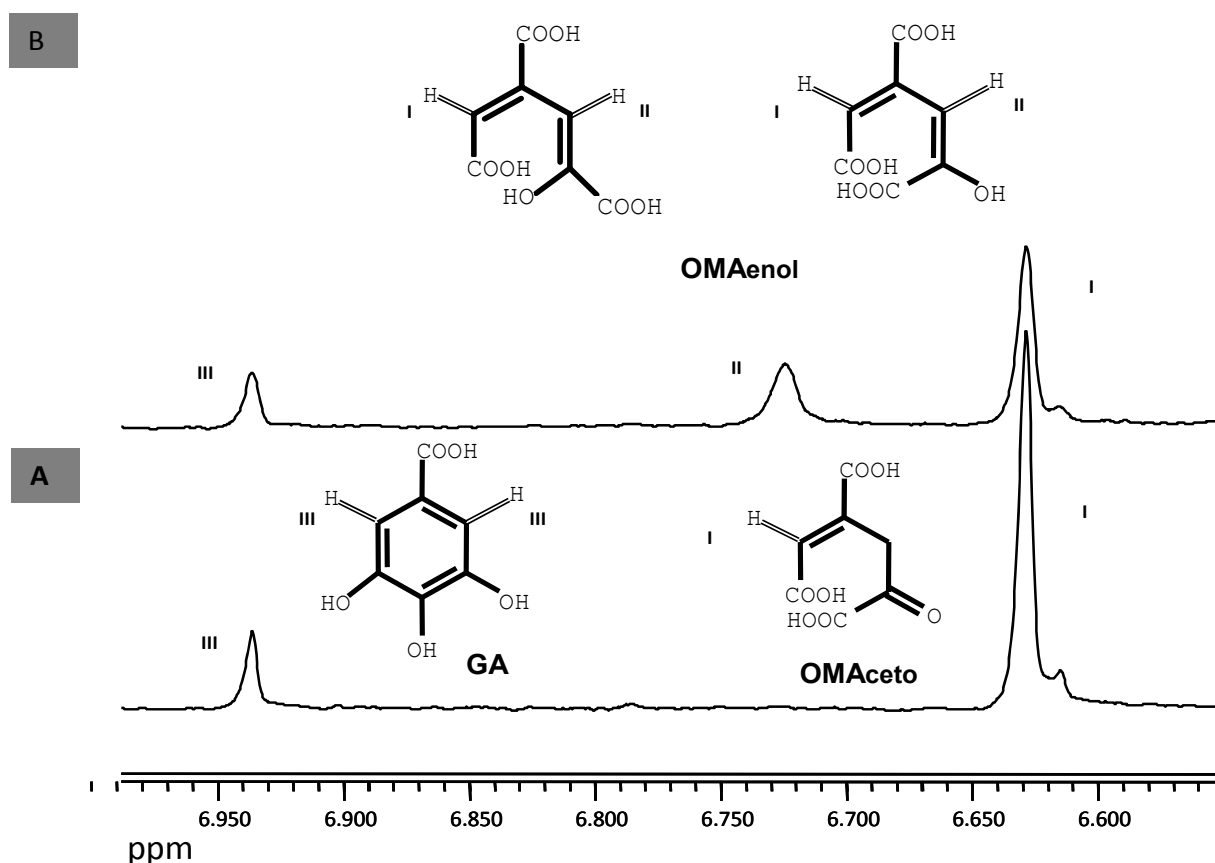


Figura 30. Espectros de protón (^1H) del sustrato y producto de la reacción catalizada por GalD. En el panel **A**. Se muestra el espectro de protón del OMA (forma ceto) producido por GalA y sustrato de GalD. En el panel **B**. Se muestra el espectro de protón del producto de la actividad GalD sobre OMA_{ceto}. Las estructuras de GA, OMA_{ceto} y sus dos formas enol están representadas. Los protones susceptibles de ser detectados en las condiciones de ensayo (ver apartado 12 de Materiales y Métodos) se numeran como I, II y III, aplicándose la misma nomenclatura para el pico de resonancia que presenta cada uno.

En el espectro de protón (espectro ^1H) obtenido para el producto de la acción de GalA sobre GA se observa una única señal de resonancia a 6,63 ppm correspondiente al protón olefínico (I) de forma ceto (Figs. 22 y 30). Además, parte del GA utilizado en la reacción permanece tras la adición de GalA, produciendo una señal de resonancia del protón olefínico (III) de 6.94 ppm. La reacción del OMA_{ceto} con GalD genera una nueva señal olefínica a 6,73 ppm (II), la cual se corresponde al proceso de isomerización ceto-

enólica del OMA, produciéndose una enolización desde la forma ceto proveniente de la apertura del anillo (Fig. 30B). Dado que las dos formas enólicas proporcionan una señal equivalente, resulta imposible identificar cual de las dos es, o si son las dos, el producto real de la reacción de GalD sobre OMA_{ceto}. La señal remanente a 6,63 ppm, se corresponde con el protón olefínico I presente tanto en la forma ceto como en la forma enólica del OMA.

Como resumen, los resultados presentados en esta sección permiten concluir que GalD es una ceto-enol isomerasa que cataliza la enolización de OMA. Dado que esta etapa no había sido incluida hasta la fecha en ninguna ruta de degradación propuesta para el GA, su caracterización y la determinación del producto génico implicado contribuyen en gran medida a completar el estudio del catabolismo aeróbico de este compuesto aromático.

2.2.3. Estudios sobre la estructura de GalD.

Dado que es la primera vez que se identifica una OMA ceno-enol isomerasa y que nada se sabe del posible mecanismo de acción de GalD, se procedió a un estudio de la estructura de la proteína GalD con el objeto de profundizar en la caracterización bioquímica de esta nueva isomerasa.

A lo largo del desarrollo de esta Tesis han aparecido dos estructuras cristalográficas de proteínas que muestran identidad de secuencia (alrededor del 34%) con GalD. En primer lugar, la estructura de una proteína de *P. aeruginosa* de función desconocida perteneciente a la familia DUF453, la misma a la que pertenece GalD, fue depositada en los bancos de datos de estructuras por el *Joint Center for Structural Genomics* (PDB 2H9F). Por otro lado, se ha publicado recientemente la estructura tridimensional de PrpF, una nueva proteína de la familia DUF453 (Garvey *et al.*, 2007). PrpF es una proteína involucrada en el metabolismo del propionato en *Shewanella oneidensis*, actuando como una 2-metilcitrate *cis-trans* isomerasa. Dado que el porcentaje de identidad de secuencia entre GalD y ambas proteínas era similar, utilizamos como molde para la realización del modelo tridimensional de GalD la estructura de PrpF, ya que se conocían también algunos datos bioquímicos de esta isomerasa. El alineamiento de las secuencias de ambas proteínas así como la predicción de la estructura secundaria para GalD se muestra en la figura 31.

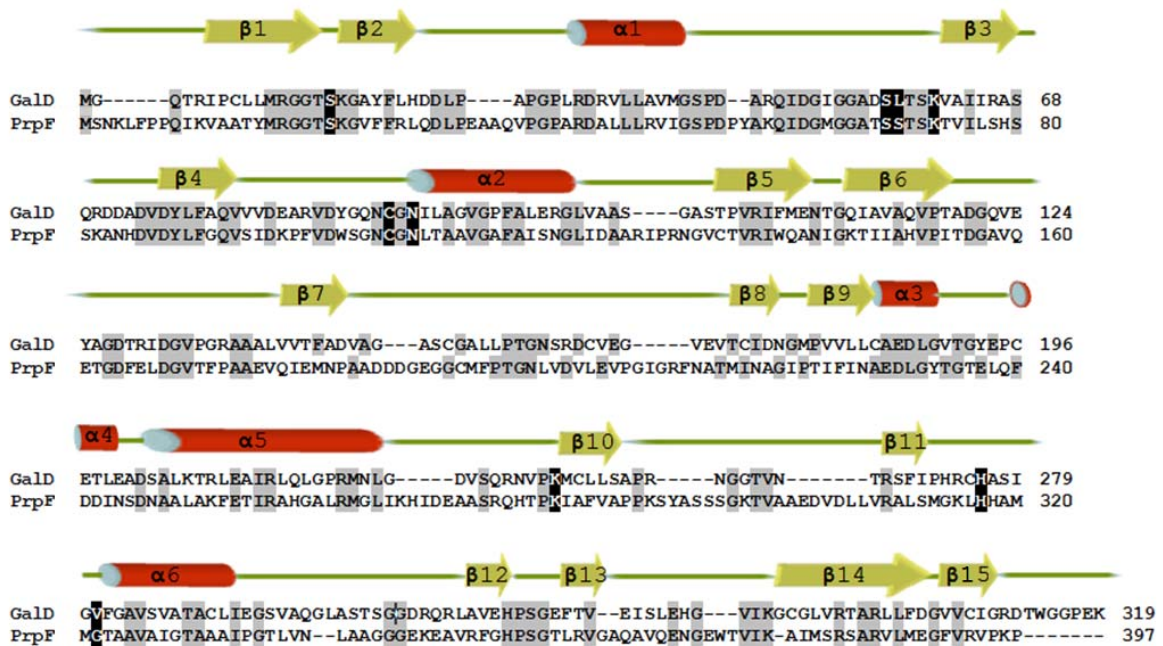


Figura 31. Alineamiento de la secuencia de GalD con la secuencia de la proteína PrpF. Los aminoácidos de cada secuencia se representan con el código estándar de una letra y se encuentran numerados a la derecha. El alineamiento de secuencias se realizó utilizando el programa ClustalW. Se representan sombreados de gris aquellos residuos idénticos y en negro aquéllos discutidos en el texto y propuestos como claves en la catálisis enzimática. La estructura secundaria fue predicha a partir del modelo tridimensional de GalD (Fig. 32). Las α -hélices (cilindros rojos) y cadenas- β (flechas amarillas) se muestran en la parte de arriba del alineamiento.

El modelo de la estructura tridimensional de GalD sugiere que esta proteína está compuesta de dos dominios estructurales que exhiben la misma topología (Fig. 32). Cada uno de ellos está dominado por una α -hélice central rodeada de cadenas beta, mayoritariamente antiparalelas, formando en conjunto un pronunciado barril beta. Una α -hélice adicional completa la estructura del dominio situándose fuera del barril y contactando con algunas de las cadenas beta. Esta organización estructural es más evidente en el dominio N-terminal, mejor modelado debido a que hay una mayor identidad entre GalD y PrpF, aunque es igualmente perceptible también en el dominio C-terminal.

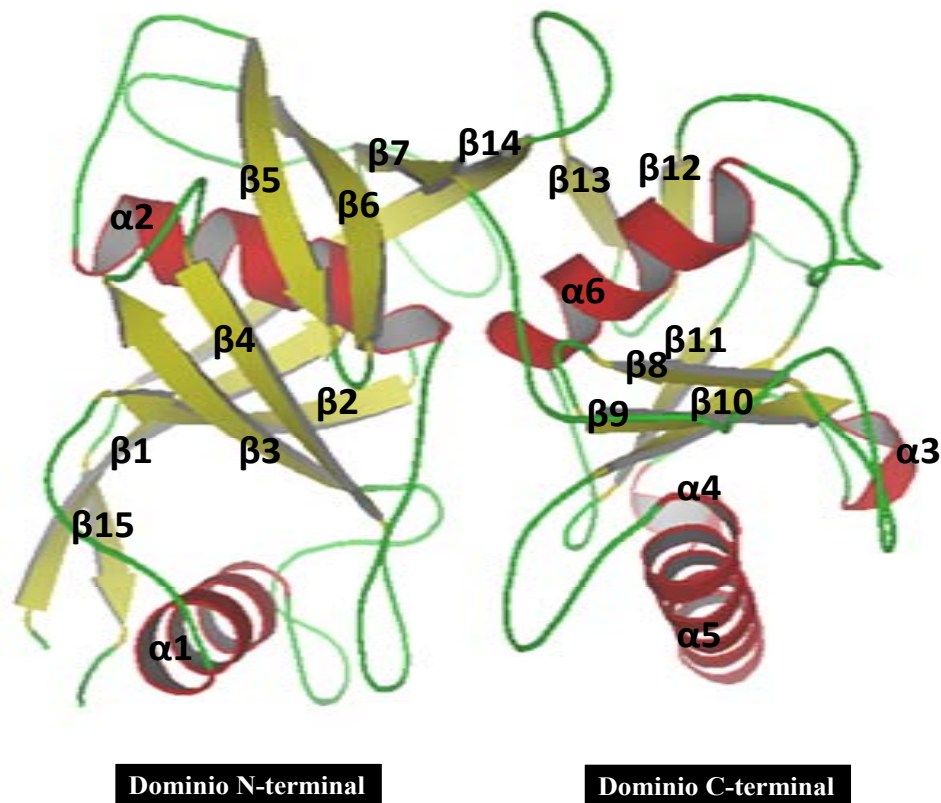


Figura 32. Modelo tridimensional de la OMA ceto-enol isomerasa (GalD) de *P. putida*. Se muestran en rojo las α -hélices ($\alpha 1$ - $\alpha 6$) y en amarillo las cadenas- β ($\beta 1$ - $\beta 15$) del modelo tridimensional propuesto para los dominios estructurales de GalD.

El centro activo de PrpF fue definido al cristalizarse junto con un análogo del sustrato de la reacción, el *trans*-aconitato. Éste se une a la prominente hendidura que se forma entre los dos dominios estructurales en los que se divide PrpF. Los tres carboxilos del *trans*-aconitato están coordinados por una extensa red de puentes de hidrógenos donadores (Garvey *et al.*, 2007). Hay adicionalmente 3 residuos cargados, Lys73, Lys281 e His317, que servirían para neutralizar las 3 cargas negativas del sustrato, estos tres residuos están perfectamente conservados en GalD, (Lys61, Lys252 e His276, respectivamente) en zonas igualmente de alta identidad con PrpF. De la misma forma que el *trans*-aconitato, el OMA presenta 3 grupos carboxilos en su estructura, por lo que la conservación estructural de estos tres residuos sugiere que también cumplirán la función de neutralizar las cargas negativas de los tres grupos carboxilos del OMA. En el caso de PrpF, el carbono C4 del *trans*-aconitato está implicado en el mecanismo ácido/base de la reacción. En esta proteína, el residuo Lys73 está posicionado de forma ideal para producir la abstracción del protón del C4. Dado que este residuo está ampliamente conservado en la familia de proteínas DUF453, es de esperar que el residuo equivalente de GalD (Lys61) actué como principal base en la enolización del

OMA. Finalmente, otros residuos implicados en la coordinación del sustrato así como en el mantenimiento del centro catalítico están igualmente conservados en GalD (Figs. 32 y 74) lo que sugiere un mecanismo de catálisis para esta enzima similar al que presenta PrpF.

2.3. Estudio del gen *galB* y de la proteína GalB.

Una vez demostrado la formación y enolización del OMA, era de esperar que este compuesto se hidratase para formar oxal-citromalato (CHA) como ya había sido propuesto anteriormente en *P. putida* (Tack *et al.*, 1972b) y al igual que ocurre en las rutas *meta* de degradación de protocatecuato (Fig. 7) (Hara *et al.*, 2003). En *S. paucimobilis* SYK-6 este paso enzimático está catalizado por la proteína LigJ (Hara *et al.*, 2000). Un análisis en detalle del cluster *gal* y del genoma de la cepa *P. putida* KT2440 no identificó ninguna proteína homóloga a LigJ, lo que sugería que la hidratación del OMA_{enol} en *P. putida* podría estar catalizada por un miembro de una nueva familia de hidratatas no descrita hasta la fecha. Teniendo en cuenta que el producto del gen *galB* no mostraba similitud con proteínas de función conocida, y que era el único gen del cluster *gal* cuya función quedaba por asignar, era lógico pensar que podría estar involucrado en la hidratación del OMA_{enol}. Por tanto, se procedió a la clonación del gen *galB* y al estudio de su producto génico.

2.3.1. Clonación del gen *galB* y complementación funcional de la hidratasa LigJ.

El gen *galB* fue clonado en el vector de hiperexpresión pET-29a (+) bajo el control del promotor P_{T7} , generando el plásmido pETGalB (Fig. 33). Para expresar el gen *galB* en otras bacterias distintas a *E. coli*, se subclonó bajo el control del promotor *P_{tac}* en el plásmido de amplio espectro de huésped pIZ1016 generando el plásmido pIZGalB (Fig. 33).

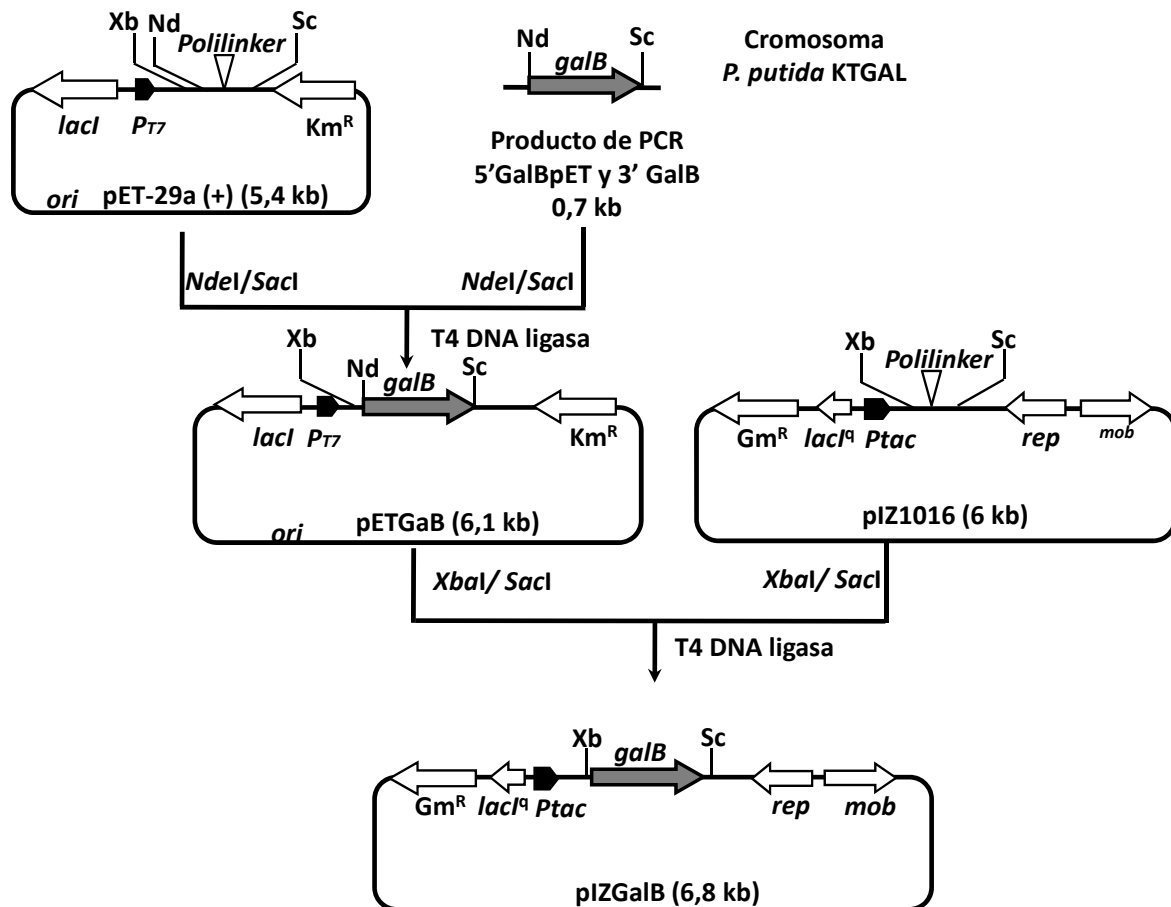


Figura 33. Representación esquemática de la construcción de los plásmidos pETGalB y pIZGalB. El gen *galB* fue amplificado por PCR utilizando la pareja de oligonucleótidos 5'GalBpET y 3'GalB (Tabla 4) y DNA genómico de *P. putida* KTGAL como molde. El gen se clonó en el vector pET-29a (+) empleando las enzimas de restricción *NdeI* y *SacI*. Posteriormente, fue subclonado en el vector de amplio espectro de huésped pIZ1016 como un inserto *XbaI/SacI* originando el plásmido pIZGalB. Las abreviaturas utilizadas son: *Gm^R*, gen que confiere resistencia a gentamicina; *Km^R*, gen que confiere resistencia a kanamicina; *lacI^q*, gen que codifica el represor LacI; *ori*, origen de replicación del plásmido pBB322; *rep* y *mob*, genes de replicación y movilización, respectivamente, del plásmido pIZ1016; *P_{T7}*, promotor del gen *10* del fago T7; *Ptac*, promotor *Ptac*. Las dianas de restricción señaladas son: *Nd*, *NdeI*; *Xb*, *XbaI*; *Sc*, *SacI*.

Para confirmar si el producto del gen *galB* era el responsable de la actividad OMA hidratasa, se realizó en primer lugar una aproximación genética *in vivo*. Para ello, se utilizó la cepa de *S. paucimobilis* SYK-6 DLJ (Tabla 2), que contiene el gen *ligJ* delecionado y, por lo tanto, es incapaz de crecer en siringato como única fuente de carbono y energía al tener bloqueada la correspondiente ruta de degradación *meta* de protocatecuato a nivel de la hidratasa LigJ (Hara *et al.*, 2000) (Fig. 7). Mediante electroporación, el plásmido pIZGalB y el plásmido control pIZ1016 fueron introducidos en la cepa *S. paucimobilis* SYK-6 DJ. Mientras que la cepa mutante

conteniendo el plásmido pIZGalB recobró la capacidad de crecer en siringato (5 mM) como única fuente de carbono y energía, la cepa mutante conteniendo el plásmido control pIZ1016 no, lo que claramente confirmaba la complementación funcional de la hidratasa LigJ con el producto del gen *galB*. Estos datos sugerían que el producto génico de *galB* era una hidratasa involucrada en la ruta de degradación de GA, siendo además la primera representante de una nueva familia de hidratatas ya que GalB no presenta similitud significativa con ninguna otra hidratasa conocida. Para caracterizar en detalle la proteína GalB, se procedió inicialmente a su hiperproducción y purificación.

2.3.2. Purificación y caracterización bioquímica de la proteína GalB.

El gen *galB* fue hiperexpresado en *E. coli* utilizando el plásmido pETGalB (Fig. 33). Los extractos celulares de cultivos de *E. coli* BL21 (DE3) (pETGalB) mostraban en SDS-PAGE una banda de hiperproducción de una proteína de 27 kDa (Fig. 34), lo que coincide con el tamaño predicho para GalB (27,4 kDa) según se deduce de la secuencia codificante del gen *galB* (Tabla 5). Además, los extractos de *E. coli* BL21 (DE3) (pETGalB) mostraban una significativa actividad OMA hidratasa ($10 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg proteína}^{-1}$) que no se observó en los extractos control *E. coli* BL21 (DE3) (pET-29a (+)), confirmando que el gen *galB* codifica una hidratasa que actúa sobre OMA.

La purificación de GalB a homogeneidad electroforética se realizó mediante dos etapas cromatográficas, la primera en DEAE-celulosa, y la segunda en Fenil-sefarosa, con una ultracentrifugación previa tal y como se describe en el apartado 7.3 de Materiales y Métodos. La evolución del proceso de purificación se comprobó por SDS-PAGE como se muestra en la figura 34.

Sin embargo, cuando se analizó el rendimiento del proceso de purificación, se observó una considerable pérdida de actividad en los sucesivos pasos de purificación que rendían una proteína prácticamente inactiva al final del proceso (Tabla 8). Este hecho sucede frecuentemente en la purificación de proteínas que requieren algún cofactor, e. g., ión metálico, para su actividad y éste no se encuentra en el tampón de purificación.

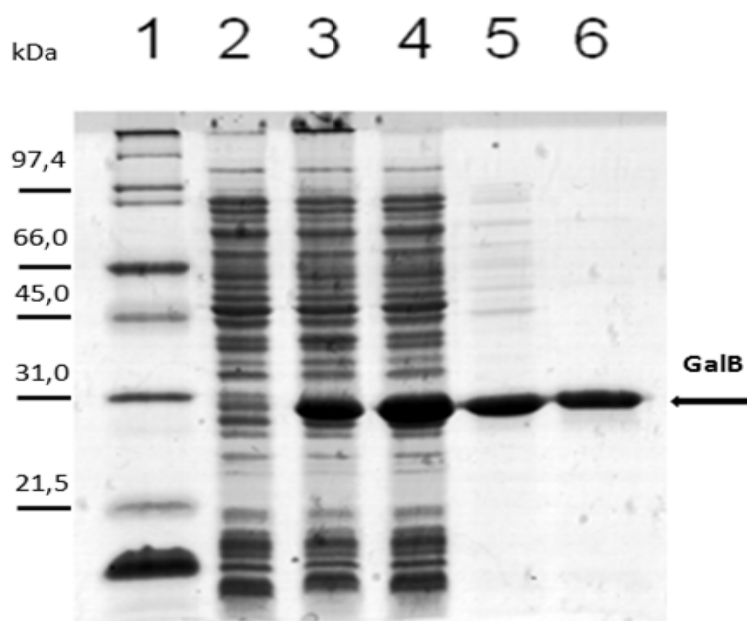


Figura 34. Hiperproducción y purificación de la proteína GalB en *E. coli*. SDS-PAGE al 12.5 %. Calle 2, extracto control de células de *E. coli* BL21 (DE3) (pET-29a (+)); calle 3, extracto de células de *E. coli* BL21 (DE3) (pETGalB); calle 4, fracción de la purificación después de la etapa de ultracentrifugación; calle 5, fracción de la purificación después de la cromatografía en DEAE-celulosa; calle 6, GalB purificada después de la cromatografía en Fenil-sefarosa. La proteína GalB se indica con una flecha. En las calles 2, 3 y 4 se cargaron 5 μg de proteína total, mientras que en las calles 5 y 6 se cargaron 3 μg . Calle 1, marcadores de peso molecular “Broad-Range” de BioRad.

Tabla 8. Proceso de purificación de la proteína GalB.

Etapa	Proteína (mg)	Actividad total ($\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}$)	Actividad específica ($\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg proteína}^{-1}$)	Recuperación (%)	Factor de purificación
Extracto crudo	230 (187,9)	2367,3 (2847,7)	10,4 (15,1)	100	1
Ultracentrifugación	78 (95)	1740,6 (1634)	22,4 (17,2)	73,5 (57,4)	2,2 (1,8)
Cromatografía DEAE celulosa	30,8 (35)	1145,2 (106,05)	37 (3)	48,4 (3,7)	3,6 (0,2)
Cromatografía Fenil-sefarosa	11,7 (18)	504,3 (16,8)	43,09 (0,93)	21,4 (0,6)	4,1 (0,06)

Entre paréntesis se muestran los datos obtenidos en cada una de las etapas de la purificación de la proteína GalB sin Zn^{2+} en el tampón de purificación.

Para entender el fenómeno de inactivación de GalB durante su purificación, se analizó el efecto que producía la adición de un agente quelante de cationes divalentes sobre la actividad OMA hidratasa. Para ello, extractos proteicos provenientes de la cepa *E. coli* BL21 (DE3) (pETGalB), fueron tratados con EDTA. La adición de concentraciones recientes de este agente quelante hacía disminuir la actividad OMA hidratasa, llegando a inhibir un 80% de la actividad enzimática cuando se utilizaba EDTA 500 μM (Fig. 35A). Estos datos, sugerían que GalB era una enzima dependiente de un catión divalente para su actividad. Además, cuando estos extractos tratados con EDTA se incubaron con diferentes cationes divalentes i. e., Fe^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} o Co^{2+} 2 mM, no se recobró en ningún caso la actividad hidratasa inicial (resultados no mostrados), sugiriendo que la inactivación por EDTA era irreversible.

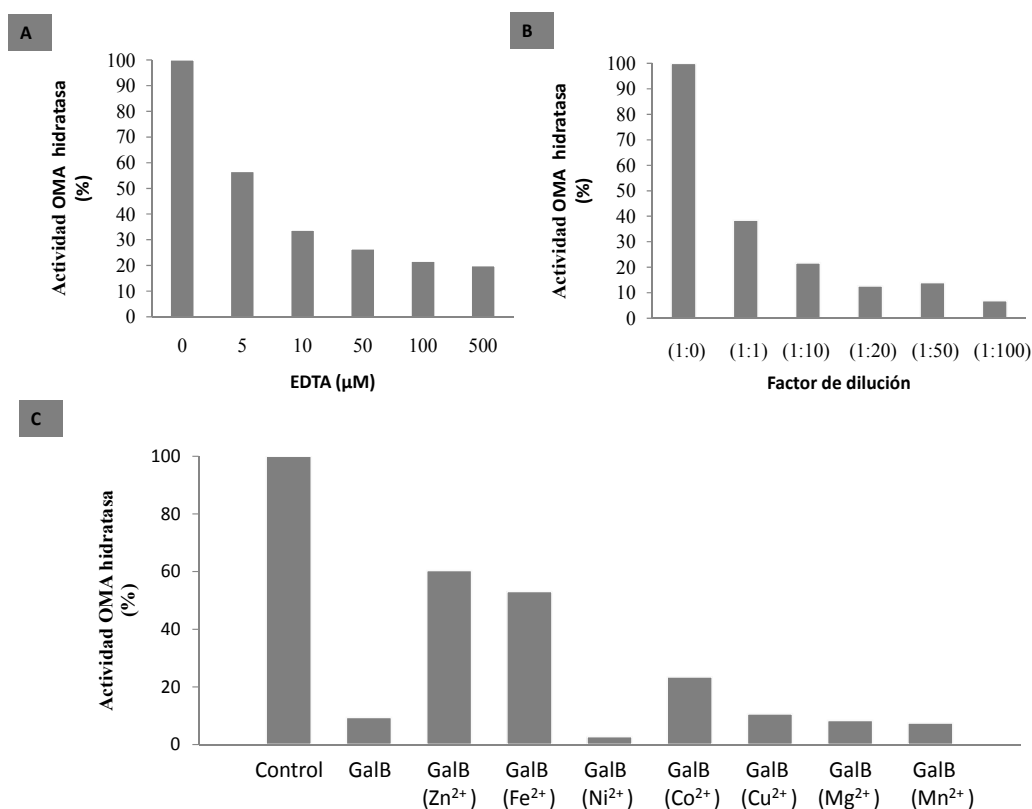


Figura 35. Dependencia de metales para la actividad de la enzima GalB. A. Efecto de la adición de EDTA a extractos de la cepa *E. coli* BL21 (DE3) (pETGalB). Se añadió 5, 10, 50, 100 y 500 μM de EDTA a los extractos, tras incubación 3 h a 4 °C se determinó la actividad OMA hidratasa según se detalla en el apartado 7.7.3 de Materiales y Métodos. B. Efecto de la dilución de los extractos de la cepa *E. coli* BL21 (DE3) (pETGalB). Los extractos fueron diluidos en tampón de purificación (sin contener metales), conservados durante 2 h a 4 °C, midiéndose al cabo de este tiempo su actividad OMA hidratasa. C. Efecto de la adición de cationes divalentes sobre la actividad OMA hidratasa de extractos de la cepa *E. coli* BL21 (DE3) (pETGalB) diluidos 1:100 (GalB). El extracto proteico fue diluido en tampón de purificación conteniendo 2 mM de los diferentes cationes, incubado durante 2 h a 4 °C, posteriormente se determinó su actividad OMA hidratasa. Control, extracto proteico sin diluir.

Por otro lado, se quiso comprobar si la dilución del extracto en el tampón de purificación tenía algún efecto sobre la actividad OMA hidratasa. Se pudo ver de esta forma que la actividad enzimática disminuía conforme el extracto proteico conteniendo GalB era diluido, perdiendo hasta el 60% de la actividad en una dilución 1:1 y manteniendo únicamente el 9% de la actividad en una dilución 1:100 (Fig. 35B). Cuando los extractos protéicos se diluían (1:100) en tampón de purificación conteniendo 2 mM de los cationes divalentes anteriormente citados, se observó, que si bien la adición de Mg^{2+} , Mn^{2+} , Ni^{2+} o Cu^{2+} no tenía ningún efecto sobre la pérdida de actividad, ésta se mantenía al 60%, 53% y 23% de la actividad máxima cuando se añadían Zn^{2+} , Fe^{2+} o Co^{2+} , respectivamente (Fig. 35C).

Estos datos, tomados en conjunto, parecen sugerir que GalB es una hidratasa dependiente de metales, siendo los cationes Zn^{2+} y Fe^{2+} los mejores cofactores para la catálisis enzimática.

Para identificar el ión metálico que actuaba como cofactor de GalB, se realizó un análisis mediante espectrometría de emisión atómica (ICP) de la proteína purificada (15 μM) y se detectó 2,1 μM de Zn^{2+} y 2,6 μM de Fe^{2+} , lo que sugería que el Zn^{2+} y/o Fe^{2+} eran los cofactores de GalB y que muy probablemente éstos se perdían en el proceso de purificación. No obstante, dado que GalB presenta en su estructura primaria un dominio presente en proteínas de unión a Zn^{2+} (ver más adelante) y que pese a que el Zn^{2+} es un catión mucho menos abundante en la naturaleza que el Fe^{2+} se encuentra en la misma proporción que éste último en la proteína GalB purificada, hizo sospechar que GalB era una hidratasa dependiente de Zn^{2+} que, en ausencia de este metal, también podría utilizar Fe^{2+} o con menor eficacia Co^{2+} como cofactor. Como consecuencia, se procedió a purificar la proteína GalB añadiendo $ZnSO_4$ en los tampones de purificación. Con estas condiciones de purificación se evitó la inactivación observada cuando la proteína se purificaba sin adicionar Zn^{2+} (Tabla 8). El análisis mediante ICP de la proteína GalB purificada en presencia de Zn^{2+} mostró la presencia de 14,2 μM de Zn^{2+} en 15 μM de proteína GalB, detectándose no obstante trazas de Fe^{2+} (0,2 μM), lo que sugiere la interacción de un átomo de Zn^{2+} por cada molécula de proteína GalB.

Con la enzima GalB purificada y activa, se procedió a la determinación de algunas constantes cinéticas. Así, la proteína GalB presentaba una K_m y $V_{m\acute{a}x}$ de 85 μM y 76 $\mu moles \cdot min^{-1} \cdot mg \text{ proteína}^{-1}$, respectivamente, presentando una temperatura óptima de 30 °C y un pH óptimo de 7,0 (ver apartado 7.7.3 de Materiales y Métodos).

Posteriormente, se realizó un estudio con distintos agentes que modifican los grupos funcionales de ciertos aminoácidos con intención de conocer los residuos que podrían estar formando parte del centro catalítico. Para ello, la proteína GalB purificada fue incubada en presencia de PMFS (modifica Ser), DEPC (modifica His), *N*-etilmaleimida e iodoacetamida (codifican Cys) y EDC (modifica Glu y Asp). Sólo la incubación con DEPC producía una significativa pérdida de actividad OMA hidratasa (Fig. 36), indicando que, al menos, algún residuo de histidina podría estar implicado en la catálisis enzimática.

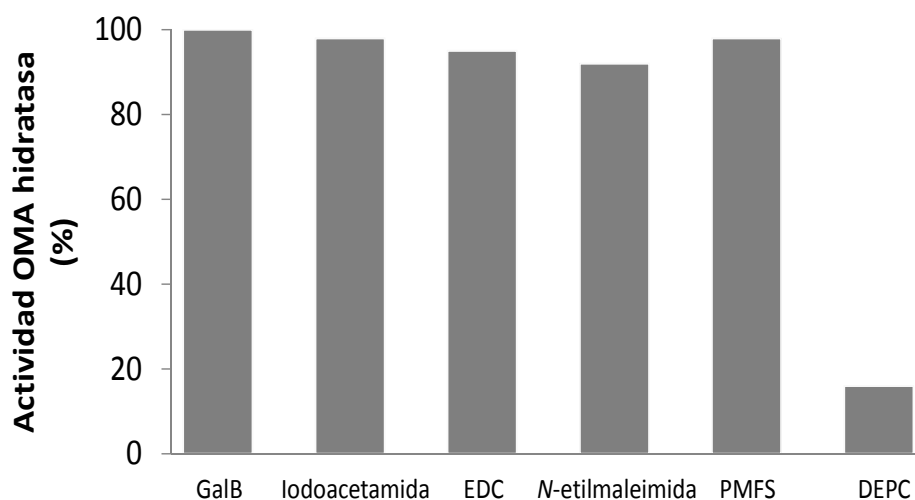


Figura 36. Efecto de distintos compuestos que modifican grupos funcionales sobre la actividad de GalB. Efecto sobre la actividad OMA hidratasa ocasionado por la incubación de la proteína GalB purificada con *N*-etilmaleimida (1 mM), PMSF (0,5 mM), iodoacetamida (5 mM), EDC (1 mM) y DEPC (0,5 mM) previa al ensayo enzimático (ver apartado 7.7.3 de Materiales y Métodos). El tiempo de incubación con el agente químico fue de 30 min en todos los casos a excepción del DEPC que se incubó tan sólo 7 min.

Como resumen de la caracterización bioquímica de la hidratasa GalB, se puede concluir que esta enzima necesita metales divalentes para la catálisis, siendo el Zn^{2+} el metal que se encuentra preferentemente como cofactor y que algún residuo de histidina podría estar formando parte de su centro catalítico.

2.3.3. Caracterización del producto de la reacción catalizada por GalB.

La inclusión de la reacción catalizada por GalD en la ruta de degradación de GA, sugería que el sustrato sobre el que actúa GalB es alguna de las formas enoles del OMA. El hecho de no detectarse actividad OMA hidratasa utilizando OMA_{ceto} como sustrato avala esta hipótesis y el papel clave de GalD en la ruta de degradación del GA, pese a

que esta etapa enzimática había pasado desapercibida hasta la fecha (Tack *et al.*, 1972b) (Fig. 7).

Para determinar la estructura del producto de la actividad de GalB sobre OMA, se analizó el producto de la reacción catalizada por GalB mediante RMN. Cuando la hidratasa es añadida a la reacción, aparece un nuevo sistema AB (IV) en la región alifática del espectro (Fig. 37B), con un desplazamiento de A 2,49 ppm y B 2,41 ppm, el cual puede ser asignado a los grupos CH₂ del CHA debido a que los dos protones metilenos son diastereotópicos.

Estos datos sugieren que el producto de la hidratación del OMA es CHA, y que GalB realizaría una reacción idéntica a la catalizada por otras hidratatas de OMA, tales como LigJ.

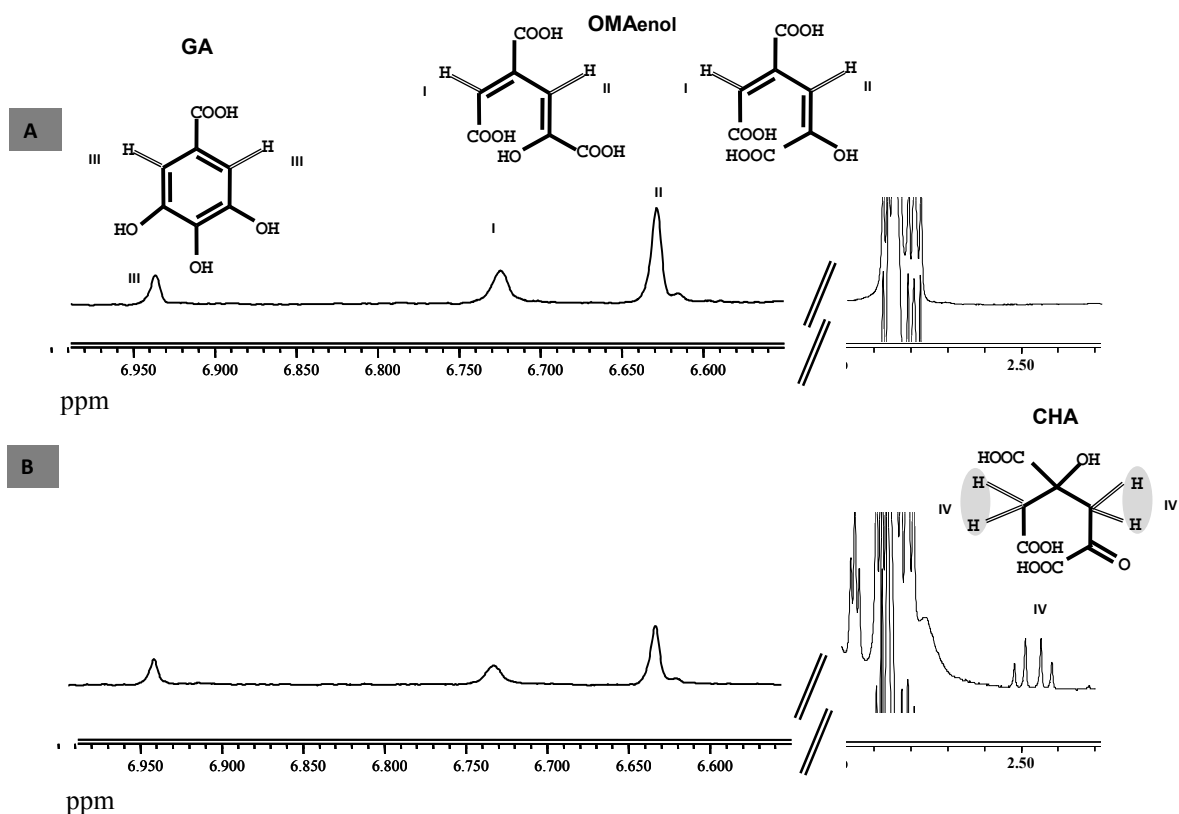


Figura 37. Espectros de protón (¹H) del sustrato y producto de la reacción catalizada por GalB. En el panel **A**. Se muestra el espectro de protón del OMA forma enol. Éste fue preparado enzimáticamente por la adición simultánea de las proteínas GalA y GalD, utilizando GA 200 μM. En el panel **B**. Se muestra el espectro de protón del producto de la actividad GalB sobre OMA_{enol}. Las reacciones catalizadas por GalA, GalD y GalB no implican una conversión completa de los correspondientes sustratos y por ello se siguen observando restos de moléculas de OMA, (I y II) y GA (III). Las estructuras del GA, OMA_{enol} y CHA se muestran junto con los protones que dan señal numerados y relacionados con su respectiva señal detectada por RMN. El grupo AB del CHA, se muestra sombreado. Las condiciones de reacción se encuentran especificadas en el apartado 12 de Materiales y Métodos.

2.3.4. Estudios sobre las relaciones entre estructura y función de GalB.

Los análisis realizados hasta ahora con la proteína GalB habían demostrado que cataliza la hidratación del OMA para producir CHA y que es el primer representante de una nueva familia de hidratatas dependientes de Zn^{2+} . Para profundizar más en el conocimiento sobre GalB y, por extensión en el de esta nueva familia de Zn^{2+} -hidratatas, se llevó a cabo un estudio sobre las relaciones entre estructura y función de GalB.

2.3.4.1. Conformación nativa de GalB.

Para determinar la masa molecular de la proteína GalB en solución se realizó un análisis de velocidad de sedimentación mediante ultracentrifugación analítica. Este análisis indicaba que el pico de sedimentación predominante (más del 95%) correspondía a una especie protéica con un coeficiente de sedimentación corregido de $7,0 \pm 0,10$ S respectivamente (Fig. 38A). Por otro lado, la masa molecular de esta especie principal obtenida por equilibrio de sedimentación era de $151.310 \pm 12,000$ Da (Fig. 38B). Teniendo en cuenta que la masa molecular del monómero deducido de su composición de aminoácidos es de 27,4 kDa, los datos de ultracentrifugación analítica son compatibles con que la principal especie de GalB en solución es un hexámero globular compuesto por subunidades idénticas.

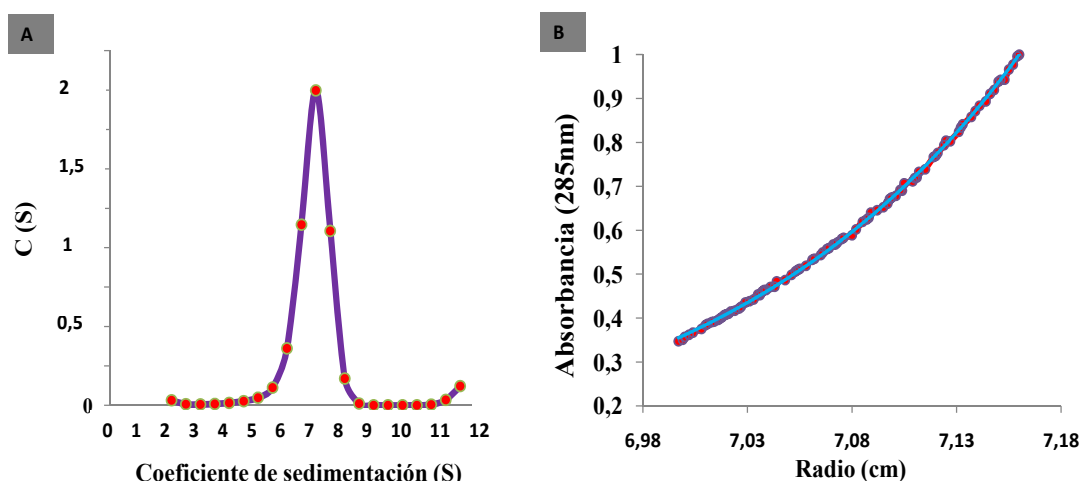


Figura 38. Ultracentrifugación analítica de la proteína GalB. **A.** Distribución continua de concentraciones representada frente al coeficiente de sedimentación tras el análisis mediante velocidad de sedimentación. Las velocidades y condiciones empleadas en los ensayos se detallan en el apartado 14 de Materiales y Métodos. **B.** Valores de absorbancia para los diferentes radios de la cubeta una vez alcanzado el equilibrio de sedimentación. Los datos experimentales se representan con círculos rojos. Se muestra el mejor ajuste para un soluto ideal correspondiente con la masa de un hexámero (línea azul).

2.3.4.2. Predicción de la estructura secundaria y modelado tridimensional de GalB.

Como ya se indicado anteriormente, la proteína GalB completa no presenta identidad de secuencia significativa con ninguna proteína de función conocida. No obstante, un análisis detallado de la región N-terminal de GalB (aminoácidos 3-50) reveló una significativa identidad de secuencia (26%) con la proteína TT1542 de *Thermus thermophilus*, una proteína de función desconocida pero cuya estructura tridimensional ha sido resuelta (Handa *et al.*, 2003). La proteína TT1542 es el representante de una familia de proteínas de función desconocida denominada *LmbE-like* según la base de datos de clasificación estructural de proteínas SCOP (<http://supfam.mrc-lmb.cam.ac.uk/SUPERFAMILY/cgi-bin/scop.cgi?sunid=102588>). Destaca la conservación de un motivo V X P/A H P/S D/A D presente en el extremo N-terminal de éstas proteínas. La conservación de este motivo también es característico de una familia de deacetilasas (Fig. 39), las cuales pertenecen a la superfamilia de las hidrolasas dependientes de Zn²⁺ y cuyos prototipos son la proteína Pig-L humana que interviene en la biosíntesis del lípido A (Whittington *et al.*, 2003) y la deacetilasa, MshB de *Mycobacterium tuberculosis* (Maynes *et al.*, 2003) (<http://pfam.sanger.ac.uk/family/Pig-L>) (Hernick y Fierke, 2005). Estos datos sugieren que la hidratasa GalB, al igual que la proteína TT1542 podrían compartir elementos estructurales y características funcionales y catalíticas con miembros de la familia Pig-L.

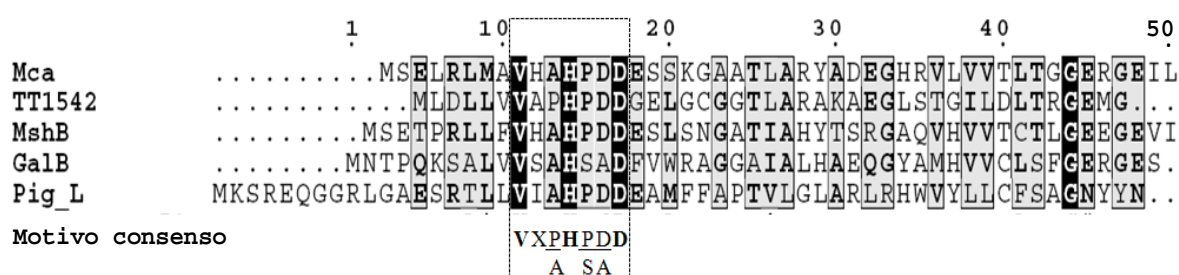


Figura 39. Alineamiento del extremo N-terminal de GalB con deacetilasas de la familia Pig-L y la proteína de función desconocida TT1542 de *T. thermophilus*. Las proteínas utilizadas para el alineamiento así como sus n° de acceso son: Mca_ *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv, (NP_215598); TT_1542_ *Thermus thermophilus*, (YP_144466); MshB_ *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv, (NP_215686); PigL_ *Homo.sapien*, (AB017165) y GalB de *P. putida*. Se muestran en recuadros las cajas de homología entre las distintas proteínas. Sombreados de negro se indican los aminoácidos idénticos y en gris se indican los aminoácidos conservados. El motivo consenso en todas estas proteínas (V X P/A H P/S D/A D) se indica recuadrado.

Para profundizar más en las relaciones estructura-función de GalB se realizó inicialmente un alineamiento de la secuencia de GalB y la de la proteína TT1542, así como una predicción de la estructura secundaria de GalB en base a la estructura conocida de la proteína TT1542. La estructura secundaria predicha para GalB se muestra en la figura 40 y consta de una serie de 8 cadenas β y 7 hélices α . Posteriormente se realizó un modelo de la estructura tridimensional de GalB utilizando la estructura conocida de la proteína TT1542 como molde (Fig. 41).

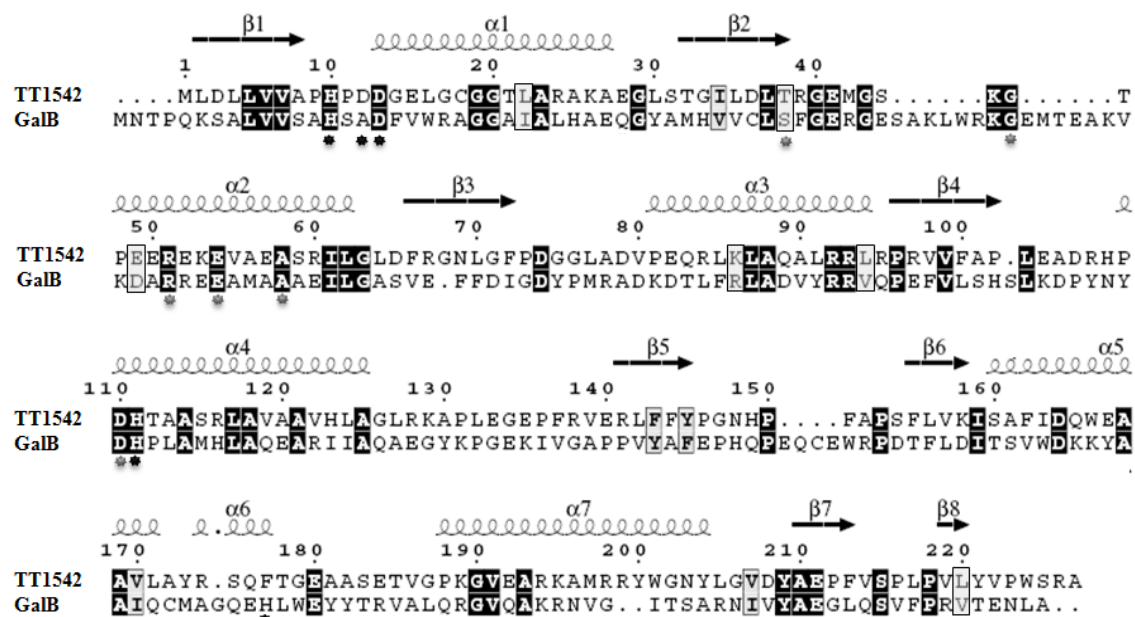


Figura 40. Alineamiento de las proteínas TT1542 y GalB. El alineamiento de las secuencias se realizó con el programa ClustalW. La predicción de estructura secundaria de GalB en función de la estructura tridimensional de TT1542 se realizó con el programa EsPript (<http://espript.ibcp.fr/ESPrript/cgi-bin/ESPrript.cgi>) y se muestra encima del alineamiento, al igual que la posición de los aminoácidos de la proteína TT1542. Los aminoácidos idénticos se muestran en cajas negras y aquellos conservados en cajas grises. Se indican mediante asteriscos, aquellos residuos propuestos como integrantes del centro catalítico en la proteína TT1542 y que se conservan en GalB, indicándose con un asterisco de color negro aquellos que han sido mutagenizados en GalB (ver más adelante).

En la región N-terminal de la proteína TT2542, las cadenas β 1- β 5 y las α -hélices α 1- α 4 presentan una topología similar a un *Rossmann fold* incompleto (Handa *et al.*, 2003). Una topología similar se predice en la región N-terminal de GalB. En el modelo tridimensional propuesto para GalB, algunos elementos predichos de estructura secundaria, tales como las cadenas β 5, β 6, β 7 y β 8 no pudieron ser modelados, apareciendo como largos *loops*, consecuencia presumiblemente de la baja identidad de secuencia existente entre esas regiones de GalB y TT1542. Resulta importante destacar el hecho de que aquellos residuos que fueron sugeridos como integrantes del hipotético

centro catalítico en la proteína TT1542 están perfectamente conservados en GalB (Fig. 40) y se superponen en la estructura tridimensional de ambas proteínas (Fig. 41). Así, los residuos His10, Asp13, Thr38, Glu40, Arg51, Glu54, Ala58, Asp110 e His111 de TT1542 se encuentran ocupando las mismas posiciones en el espacio que los residuos His14, Asp17, Ser42, Gly44, Arg55, Glu58, Ala62, Asp126 e His127 en GalB, (Fig. 41), lo que sugiere que dichos residuos forman también el centro activo de GalB.

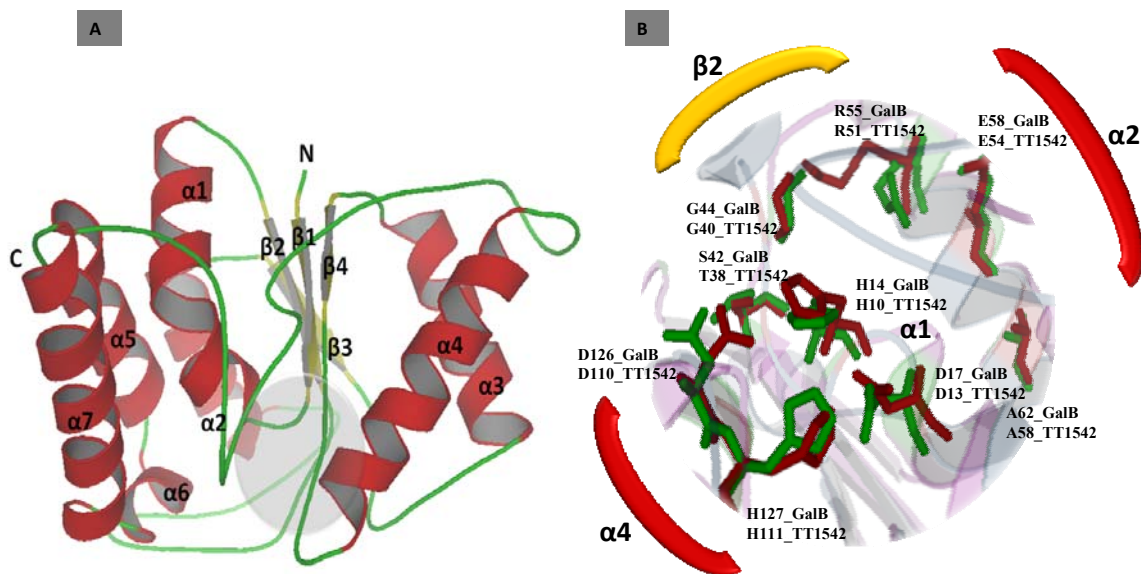


Figura 41. A. Modelo tridimensional de la OMA hidratasa (GalB) de *P. putida*. Se muestran en rojo las α -hélices ($\alpha 1$ - $\alpha 7$) y en amarillo las cadenas- β $\beta 1$ - $\beta 4$ modeladas siguiendo la numeración de la estructura secundaria predicha. Los *loops* que unen estos elementos, así como las regiones correspondientes a las cadenas β no modeladas, se muestran en verde. Se sombrea en gris la zona en la que se sitúa el probable centro catalítico de GalB. **B. Comparación de los residuos que forman el posible centro catalítico de la proteína TT154 (verde) con sus equivalentes en GalB (rojo).** Se indican los elementos de estructura secundaria en el cual se incluyen estos residuos. Ambos paneles fueron generados con el programa PyMol (DeLano, 2002).

Por otro lado, la superposición del posible centro activo de GalB con el centro activo de la proteína MshB, una deacetilasa dependiente de Zn^{2+} de *M. tuberculosis* que cataliza la segunda etapa en la síntesis de micotiol y cuya estructura es conocida (Maynes *et al.*, 2003), reveló que los residuos His13 y Asp16 (localizados dentro del motivo conservado V X P/A H P/S D/A D) e His147, los cuales están implicados en la coordinación del átomo de Zn^{2+} en MshB (Maynes *et al.*, 2003) ocupan las mismas posiciones en el espacio que los correspondientes residuos His14, Asp17 e His127 en el modelo de GalB (Fig. 42).

En conclusión, el análisis de la estructura tridimensional predicha para GalB sugiere que esta enzima pertenece a la superfamilia de las hidrolasas dependientes de Zn^{2+} , siendo los residuos His14, Asp17 e His127 los implicados en la interacción con este metal.

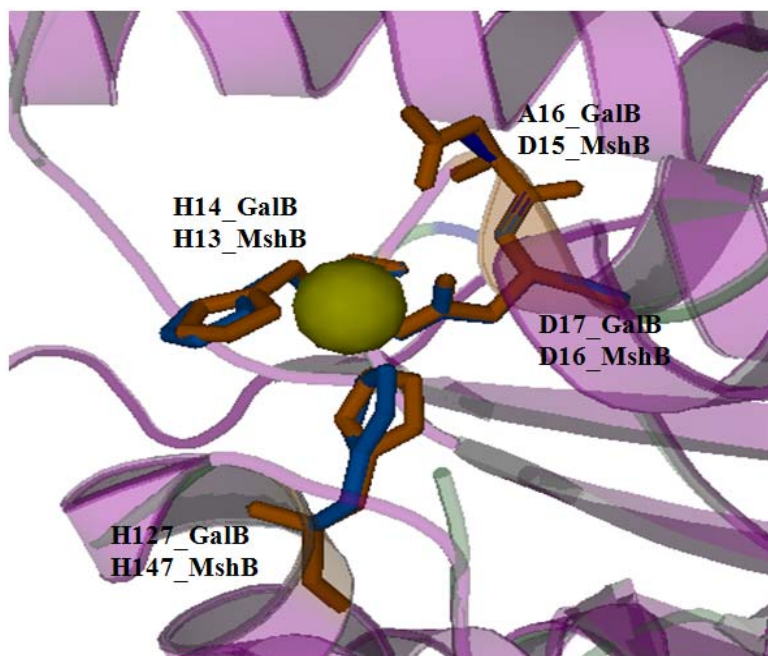


Figura 42. Superposición de la triada de coordinación de Zn^{2+} de la proteína MshB con la posible triada de coordinación en GalB. Se muestran en naranja los residuos His13, Asp16 e His147 implicados en la coordinación del Zn^{2+} en MshB y en azul los residuos His14, Asp17 y His127 propuestos para la coordinación del Zn^{2+} en GalB. El espacio ocupado por el Zn^{2+} se muestra como una esfera amarilla. Se muestran igualmente los residuos Ala16 de GalB y Glu15 de MshB. La figura fue preparada con el programa PyMol (DeLano, 2002).

2.3.4.3. Identificación de los residuos implicados en la catálisis de GalB.

La comparación de la estructura tridimensional del centro activo de la deacetilasa MshB de *M. tuberculosis* y la proteína de función desconocida TT1452 de *T. thermophilus* con el modelo estructural propuesto para la proteína GalB había revelado la existencia de una serie de residuos conservados (His14, Asp17 e His127) presumiblemente implicados en la coordinación del Zn^{2+} , los cuales serían claves en la catálisis enzimática llevada a cabo por GalB. Para confirmar esta hipótesis y probar de forma inequívoca que GalB es una enzima dependiente de Zn^{2+} , se procedió a la mutagénesis dirigida de los residuos que coordinarían el Zn^{2+} sustituyéndolos por Ala, tal y como se describe en el apartado 5.5 de Materiales y Métodos. Los estudios de

mutagénesis dirigida se completaron con la sustitución del residuo Ala16, residuo conservado en las proteínas ortólogas a GalB pero que se encuentra sustituido por un residuo Asp en las deacetilasas dependientes de Zn^{2+} (Fig. 39). Por último, el residuo His198, que en el modelo de GalB se encuentra en la superficie de la proteína alejado del centro activo y cuya modificación no debería afectar a la catálisis enzimática también fue sustituido por Ala como control.

La proteína GalB parental y las proteínas mutantes GalBH14A, GalBA16D, GalBD17A, GalBH127A y GalBH198A fueron producidas en células de *E. coli* BL21 (DE3) conteniendo los plásmidos pETGalB, pETBH14A, pETBA16D, pETBD17A pETBH127A y pETH198A, respectivamente (Tabla 3). Las distintas proteínas se produjeron a niveles similares en la fracción soluble de los distintos extractos crudos (Fig. 43A). A continuación, se valoró la actividad específica OMA hidratasa de las proteínas mutantes y se comparó con la actividad que muestra la proteína GalB parental va (Fig. 43B). Los resultados obtenidos muestran que las distintas proteínas mutantes pierden completamente la actividad, lo que sugiere que los residuos His14, Asp17 e His127 podrían constituir efectivamente la triada facial encargada de coordinar el ión metálico en el centro activo de la enzima GalB. Como era de esperar, la mutación control H198A no afecta significativamente a la actividad. Sin embargo, la sustitución A16D tiene como consecuencia la pérdida de la actividad de la enzima, lo que indica que pese a que este residuo no forme parte de la triada de coordinación del Zn^{2+} , sí que podría tener importancia en la estabilidad conformacional de dicha triada o podría estar implicado en la unión del sustrato o de algún intermediario de reacción, siendo de igual modo clave para la catálisis enzimática.

Para demostrar de forma directa la implicación de algunos de los residuos sustituidos en GalB en la interacción con el Zn^{2+} , se determinó el Zn^{2+} que contenían las distintas proteínas mediante un ensayo colorimétrico basado en la reacción específica de este catión con el reactivo PAR (ver apartado 13.2 de Materiales y Métodos). La cantidad de Zn^{2+} detectada en las proteínas mutantes GalBH14A, GalBD17A y GalBH127A era inferior al 10% de la detectada en la proteína GalB parental (Fig. 43C). Por otra parte, la proteína mutante control GalBH198A mostró unos niveles de Zn^{2+} similares a los detectados en la proteína GalB parental (Fig. 43C). Finalmente, aunque en el mutante GalBA16D se detectó un menor contenido en Zn^{2+} (alrededor del 20%) que en la proteína parental, la ausencia de actividad en esta proteína mutante probablemente no se pueda achacar sólo a la ausencia de Zn^{2+} sino más bien a

que el residuo Ala16 interviene en la interacción con el sustrato o algún intermediario de reacción.

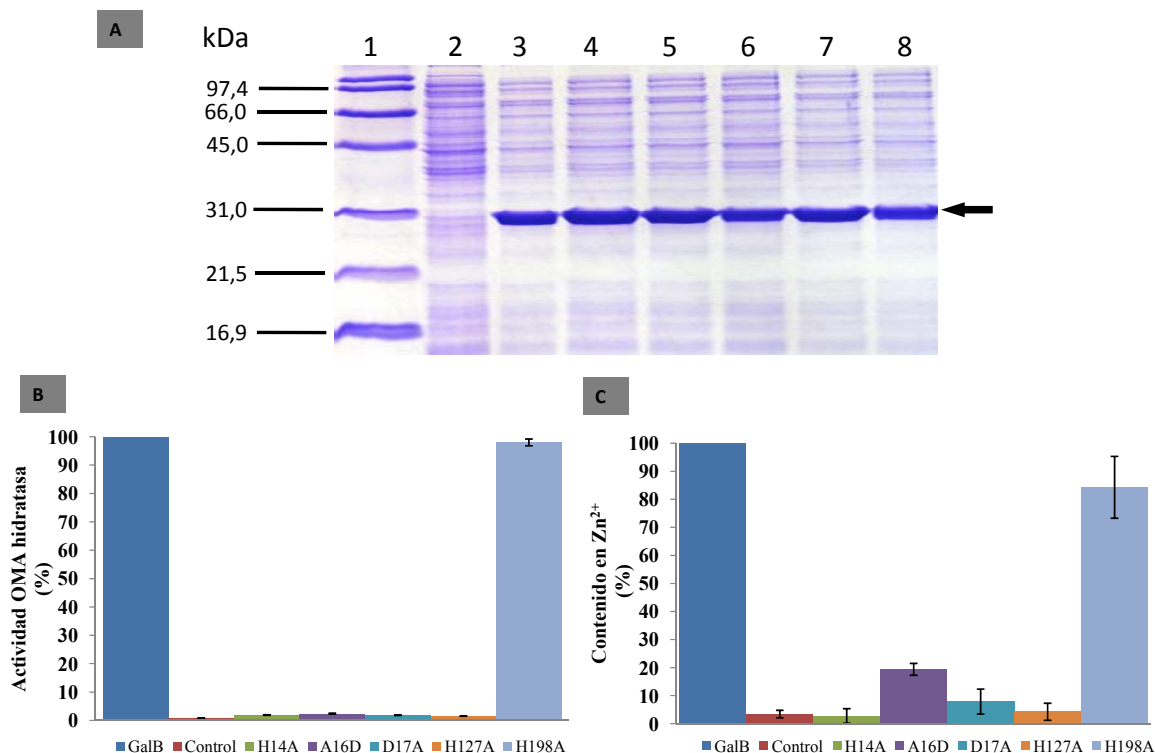


Figura 43. A. Hiperproducción en *E. coli* de diferentes proteínas GalB. SDS-PAGE al 12,5 % mostrando la hiperproducción de la proteína GalB (calle 3) y de las proteínas mutantes GalBH14A (calle 4), GalBA16D (calle 5), GalBD17A (calle 6), GalBH127A (calle 7) y GalBH198A (calle 8) en la fracción soluble de extractos (5 μ g proteína total) de *E. coli* BL21 (DE3) conteniendo los plásmidos pETGalB, pETBH14A, pETBA16D, pETBD17A, pETBH127A y pETH198A, respectivamente. La calle 2 se corresponde con un extracto proteico control de la cepa *E. coli* BL21 (DE3) (pET-29a (+)). Calle 1, marcadores de peso molecular “Broad-Range” de BioRad. **B. Actividad OMA hidratasa de diferentes proteínas GalB.** La actividad se calculó según el ensayo indicado en el apartado 7.7.3 de Materiales y Métodos y se muestra en porcentaje respecto a la actividad de extractos que contienen la proteína GalB parental. **C. Contenido en Zn²⁺ de las diferentes proteínas GalB.** El contenido se muestra igualmente en porcentaje respecto al detectado en la proteína GalB parental. Se utilizó el ensayo de reacción del Zn²⁺ con PAR para medir el contenido en Zn²⁺ de cada uno de las proteínas mutantes y de la proteína GalB parental tal y como se describe en el apartado 13.2 de Materiales y Métodos.

En conjunto, los datos que aquí se presentan demuestran que los residuos His14, Asp17 e His127 son indispensables para la coordinación del Zn²⁺ y, por ende, para la actividad de la enzima GalB, confirmando a GalB como el primer representante de una nueva familia de hidratatas dependientes de Zn²⁺ cuyo centro activo puede haber evolucionado del centro activo que poseen Zinc-hidrolasas de la familia Pig-L.

2.4. Estudio del gen *galC* y de la proteína GalC.

La rotura aldólica de CHA para producir piruvato y oxalacetato, conectando de esta forma el catabolismo de GA con el metabolismo central de la bacteria, ha sido propuesto como la última etapa en la degradación de GA en *P. putida* (Tack *et al.*, 1972b, a; Sparnins y Dagley, 1975) (Fig. 7) aunque el gen que codifica esta aldolasa, no ha sido identificado en *P. putida* hasta la fecha. No obstante, varios genes que codifican aldolasas de CHA han sido identificados en diferentes microorganismos y sus productos génicos estudiados bioquímicamente (Hara *et al.*, 2003; Maruyama *et al.*, 2004). Dado que el producto del gen *galC* presenta un porcentaje de identidad de un 62 % con LigK, la aldolasa que cataliza la rotura de CHA en la ruta *meta* de degradación de protocatecuato en *S. paucimobilis* SYK-6 (Hara *et al.*, 2003) (Fig. 7), es lógico pensar que el último paso en la ruta de degradación de GA en *P. putida* está catalizado por GalC.

2.4.1. Clonación del gen *galC* e hiperproducción de su producto génico.

Para comprobar si GalC era la aldolasa que finalizaba la ruta bioquímica de degradación de GA en *P. putida*, se procedió a la clonación del gen *galC* en el plásmido de amplio espectro de huésped pIZ1016 originando el plásmido pIZGalC (Fig. 44).

Como era de esperar, la cepa *P. putida* KTGALd*galC* recobraba la capacidad de crecer en GA como única fuente de carbono cuando se transformaba con el plásmido pIZGalC, lo que indicaba la expresión funcional del gen *galC* en dicho plásmido. Para demostrar que el producto del gen *galC* era el responsable de la actividad CHA aldolasa, se procedió a medir esta actividad en extractos de *P. putida* KTGAL y de las cepas KTGALd*galC* (pIZ1016) y KTGALd*galC* (pIZGalC) cultivadas en medio MC-citrato conteniendo GA 2 mM tal y como se describe en el apartado 7.7.4 de Materiales y Métodos. Mientras que no se pudo detectar formación de piruvato a partir de CHA en extractos de la cepa *P. putida* KTGALd*galC* (pIZ1016), los niveles de actividad CHA aldolasa eran mayores en extractos de la cepa *P. putida* KTGALd*galC* (pIZGalC) (8,3 U/mg proteína) que en extractos de la cepa *P. putida* KTGAL parental (2,1 U/mg de proteína) en concordancia con el hecho de que el gen *galC* se encuentra clonado en multicopia en el plásmido pIZGalC y confirmando así que *galC* codifica una CHA aldolasa.

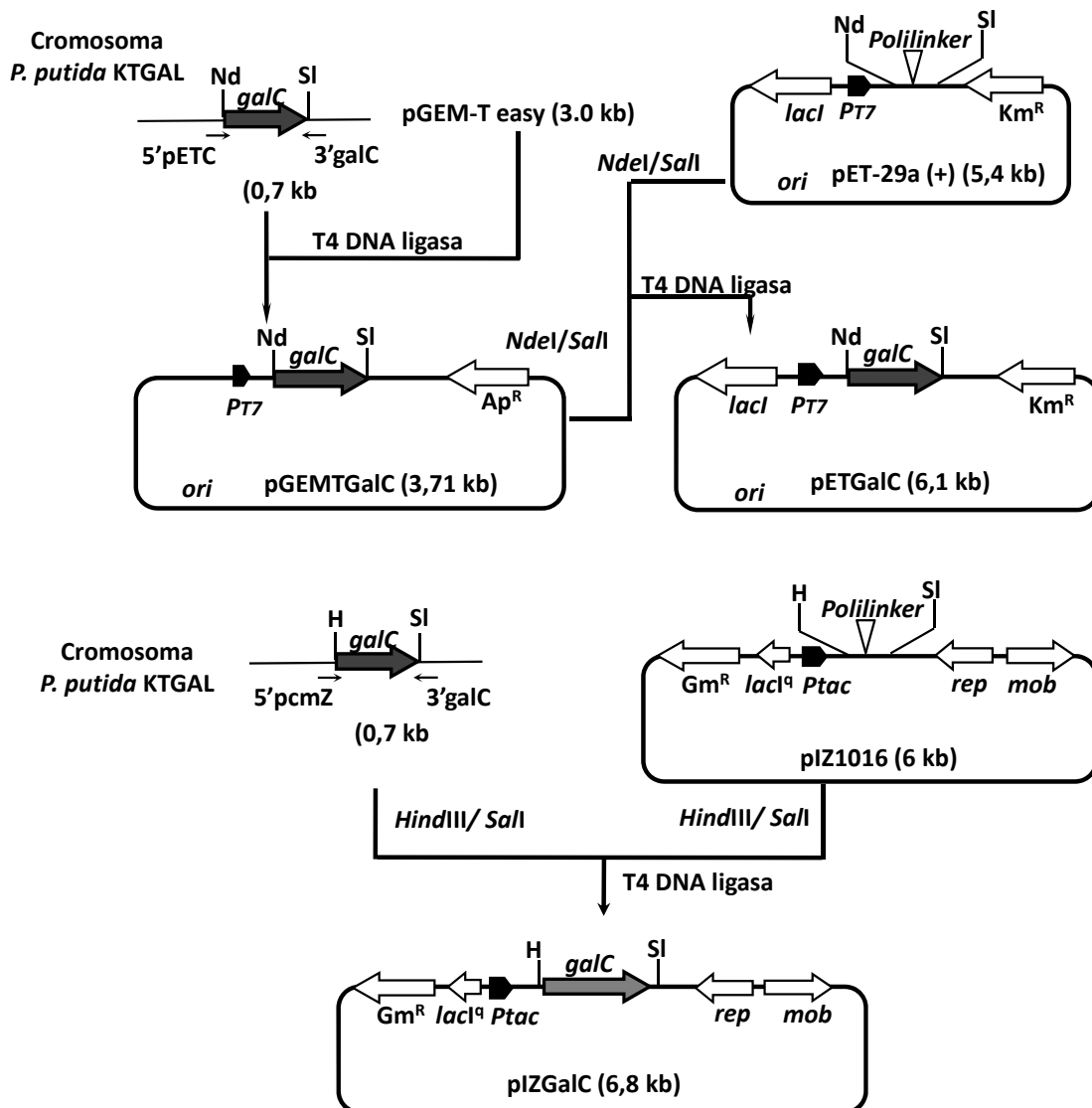


Figura 44. Representación esquemática de la construcción de los plásmidos pETGalC y pIZGalC. Para construir el plásmido pETGalC, el gen *galC* fue amplificado por PCR utilizando la pareja de oligonucleótidos 5'pETC y 3'galC (Tabla 4) y DNA genómico de *P. putida* KTGAL como molde. El gen se clonó directamente en el plásmido pGEM-T easy generando el plásmido pGEMTGalC. Posteriormente fue subclonado en el vector pET-29a (+) empleando las enzimas de restricción *NdeI* y *SalI*, generando de esta forma el plásmido pETGalC. Para construir el plásmido pIZGalC, el gen *galC* fue amplificado por PCR utilizando la pareja de oligonucleótidos 5' pcmZ y 3' galC (Tabla 4) y DNA genómico de *P. putida* KTGAL como molde. El gen se clonó directamente en el plásmido pIZ1016 empleando las enzimas de restricción *HindIII* y *SalI*, generando de esta forma el plásmido pIZGalC. Las abreviaturas utilizadas son: *Gm^R*, gen que confiere resistencia a gentamicina; *Km^R*, gen que confiere resistencia a kanamicina; *Ap^R*, gen que confiere resistencia a ampicilina; *lacI^q*, gen que codifica el represor LacI; *ori*, origen de replicación del plásmido pBB322; *rep* y *mob*, genes de replicación y movilización, respectivamente, del plásmido pIZ1016; *P_{T7}*, promotor del gen 10 del fago T7; *P_{tac}*, promotor *P_{tac}*. Las dianas de restricción señaladas son: *NdeI*, *SalI*, *SalI* y *HindIII*.

Para proceder a la hiperexpresión del gen *galC* en *E. coli*, éste se clonó en el plásmido pET-29a (+) generándose la construcción pETGalC (Fig. 44). Los extractos de la cepa *E. coli* BL21 (DE3) (pETGalC) analizados mediante SDS-PAGE mostraban una banda de hiperproducción de 25 kDa, coincidiendo con el peso molecular de la proteína GalC deducido de su secuencia de aminoácidos (25,1 kDa) (Tabla 5). En extractos ultracentrifugados la proteína GalC representaba aproximadamente un 30% de la proteína total (Fig. 45). La actividad CHA aldolasa de la fracción soluble de los extractos de *E. coli* BL21 (DE3) (pETGalC) (24,5 U/mg de proteína) fue mayor que la detectada en los extractos de *P. putida* KTGAL (pIZGalC), no encontrándose actividad aldolasa en los extractos de la cepa control *E. coli* BL21 (DE3) pET-29a (+), lo que confirma la hiperproducción de una aldolasa GalC funcional en *E. coli*.

Aunque el ensayo de actividad realizado sugiere que GalC cataliza la rotura aldólica de un mol de CHA para producir un mol de piruvato y otro de oxalacetato, se sabe que otras CHA aldolasas, como por ejemplo LigK (Hara *et al.*, 2003), son capaces de realizar una posterior β -descarboxilación del oxalacetato formado generando así 2 moles de piruvato por mol de CHA. Para confirmar si GalC presentaba esta actividad β -descarboxilasa, se procedió a medir la formación de piruvato a partir de oxalacetato utilizando extractos de *E. coli* BL21 (DE3) (pETGalC) y el ensayo acoplado de consumo de NADH debido a la conversión del piruvato a lactato (ver apartado 7.7.4 de Materiales y Métodos). En ningún caso se observó consumo de NADH al añadir concentraciones crecientes de oxalacetato. Por lo tanto, los experimentos realizados descartan que GalC tenga actividad β -descarboxilasa sobre oxalacetato.

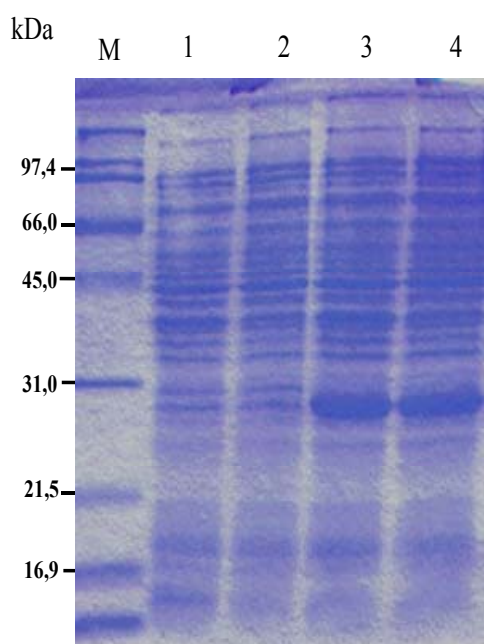


Figura 45. Hiperproducción de la proteína GalC en extractos de *E. coli* BL21 (DE3) (pETGalC). SDS-PAGE al 12,5 %. Calle 1, extracto total de la cepa *E. coli* BL21 (DE3) (pET-29a (+)). Calle 2, fracción soluble del extracto de la cepa *E. coli* BL21 (DE3) (pET-29a (+)). Calle 3, extracto total de la cepa *E. coli* BL21 (DE3) (pETGalC). Calle 4, fracción soluble del extracto de la cepa *E. coli* BL21 (DE3) (pETGalC). Calle marcada como M, marcadores de peso molecular “Broad-Range” de BioRad. La banda correspondiente a la proteína GalC se indica con una flecha. En todas las calles se cargaron 5 μ g de proteína total.

3. Caracterización molecular de los genes *galT* y *galP* involucrados en el transporte de GA en *P. putida*.

El transporte de los compuestos utilizados como fuente de carbono al interior celular es el primer paso para su posterior metabolismo. A pesar del carácter hidrofóbico de gran parte de la molécula de un ácido aromático, éste generalmente requiere una proteína transportadora que facilite su entrada en el citoplasma celular (Nichols y Harwood, 1997b). Este hecho cobra mayor importancia en compuestos como el GA, el cual posee un elevado carácter polar al presentar no sólo un grupo ácido, sino 3 grupos hidroxilos en su molécula.

3.1. Estudio de la implicación del gen *galT* en el transporte de GA en *P. putida* KT2440 y *P. putida* KTGAL.

El estudio molecular de la adaptación de *P. putida* a la utilización de GA como única fuente de carbono y energía había puesto en evidencia la necesidad del producto del gen *galT*, una presunta permeasa de membrana interna de la familia MFS (Tabla 5), para un eficiente crecimiento en GA (ver apartado 1.2 de Resultados). Para confirmar que la proteína GalT es un transportador de GA, se midió la capacidad de transportar este ácido aromático tanto en la cepa parental *P. putida* KT2440 como en la cepa adaptada al crecimiento en GA *P. putida* KTGAL. Para ello *P. putida* KT2440 y *P. putida* KTGAL se cultivaron en citrato (condiciones de no inducción de los genes *gal*) o citrato más GA (condiciones de inducción) y las células se recogieron en fase exponencial de crecimiento llevándose a cabo el experimento de transporte utilizando un sensor electroquímico tal y como se detalla en el apartado de 8 de Materiales y Métodos. Como se muestra en la figura 46, mientras que no se detectó transporte de GA con células de *P. putida* KT2440, éste sí se produjo cuando se emplearon células de la cepa *P. putida* KTGAL. Además, el transporte de GA es inducible y sólo se produce cuando la cepa *P. putida* KTGAL se cultiva en presencia de GA (Fig. 46). Estos resultados sugieren que el gen *galT* codifica un transportador de GA en *P. putida*.

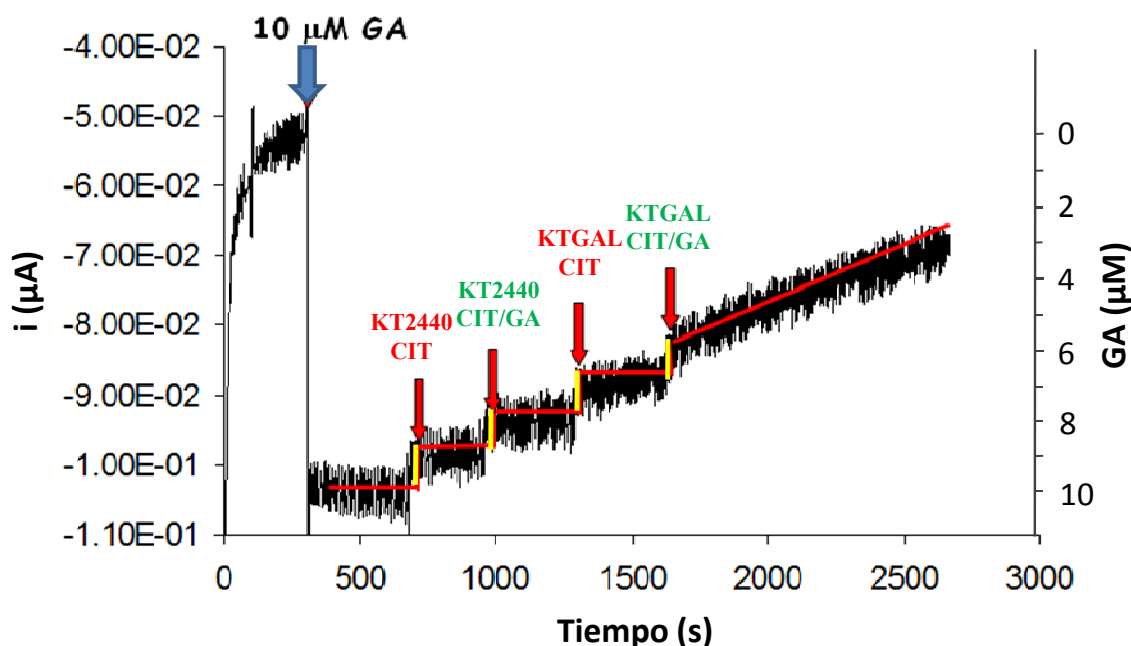


Figura 46. Transporte de GA en las cepas *P. putida* KTGAL y *P. putida* KT2440. El experimento se llevó a cabo utilizando un sensor electroquímico tal y como se describe en el apartado 8 de Materiales y Métodos. El experimento comenzó con la adición de GA 10 μM (flecha azul). Tras estabilizarse la medida, se adicionaron las células. En todos los casos las células fueron cultivadas en medio MC conteniendo citrato 0,2% (p/v) (rojo) o citrato 0,2% (p/v) más GA 2mM (verde). Se utilizaron 2 ml de células crecidas en estas condiciones y recogidas en fase exponencial ($A_{600\text{ nm}}$ 0,5) las cuales fueron lavadas dos veces y finalmente resuspendidas en 100 μl de tampón fosfato (100 mM pH 6,0). La adición de cada una de las muestras se indica con flechas rojas. La desaparición de GA debida a una interacción inespecífica con las células se indica en amarillo.

3.1.1. Clonación y expresión del gen *galT*.

Para confirmar la implicación directa del gen *galT* en el transporte de GA, se procedió a su clonación tal y como se detalla en la figura 47.

Si bien extractos de *P. putida* conteniendo el plásmido pIZGalT no mostraban una banda de hiperproducción de la proteína GalT en SDS-PAGE, tampoco las células presentaban la morfología aberrante observada en *E. coli* conteniendo los plásmidos pETGalT o pIZGalT (datos no mostrados), por lo que parecía que la expresión del gen *galT* en el sistema homólogo resultaba menos tóxica y por ello se utilizó *P. putida* como huésped para analizar los efectos de la expresión del gen *galT* en el transporte de GA. Cuando se realizó un experimento de transporte de GA utilizando las cepas *P. putida* KT2440 y *P. putida* KTGAL conteniendo los plásmidos pIZGalT y pIZ1016 (control) cultivadas en citrato o citrato más GA se obtuvieron los resultados que se muestran en la Tabla 9. A diferencia del plásmido control pIZ1016, el plásmido pIZGalT es capaz de conferir la capacidad de transportar GA a la cepa parental *P. putida* KT2440 cuando

ésta se cultiva en presencia de este ácido aromático (Tabla 9). En la cepa *P. putida* KTGAL, el plásmido pIZGalT incrementa 5 veces el transporte de GA en células cultivadas en presencia de GA y permite el transporte de este compuesto incluso en células que no han sido cultivadas en presencia de GA (Tabla 9). Por lo tanto, estos resultados confirman la implicación del gen *galT* en el transporte de GA en *P. putida*, y revelan que dicho transporte se ve favorecido cuando se induce la degradación de dicho compuesto en las células, i. e., cuando las células se cultivan en presencia de GA.

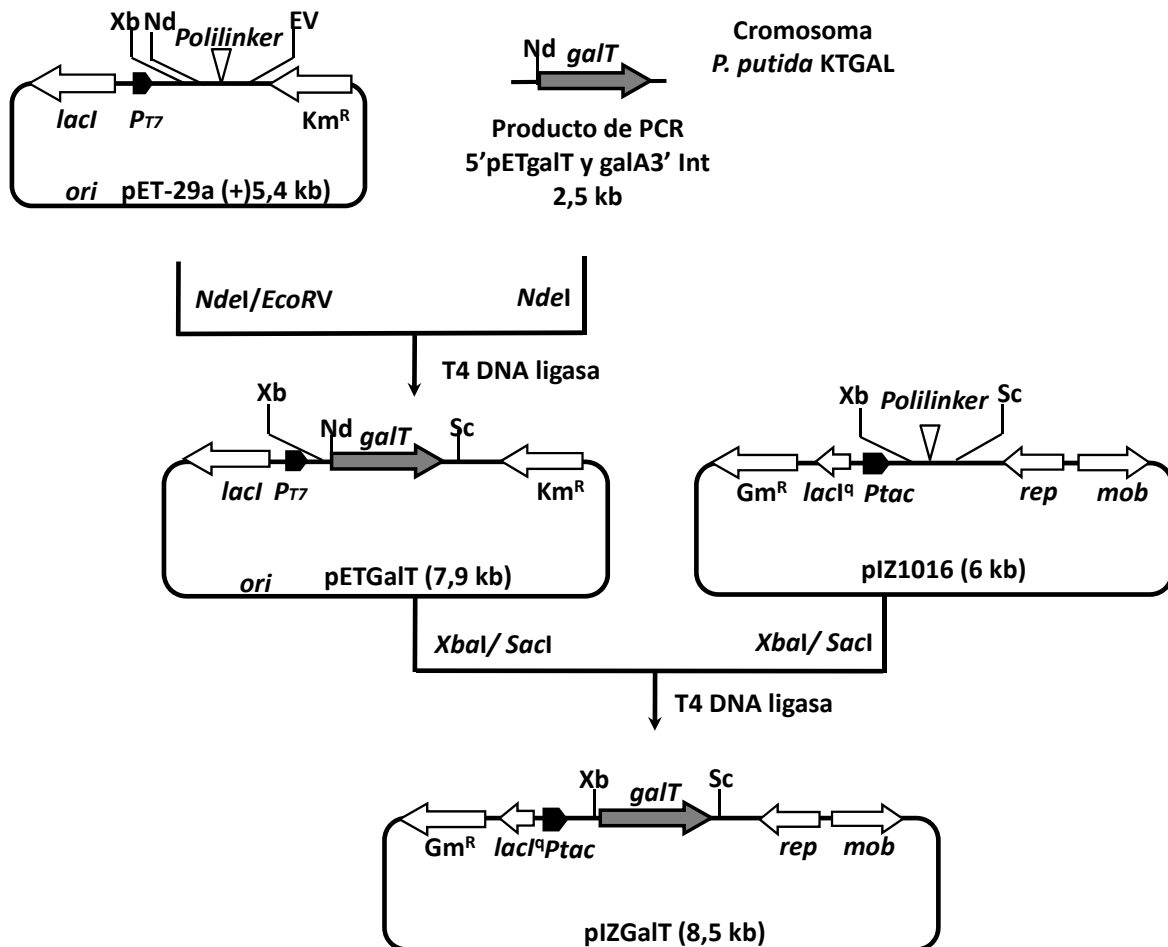


Figura 47. Representación esquemática de la construcción de los plásmidos pETGalT y pIZGalT. El gen *galT* fue amplificado por PCR utilizando la pareja de oligonucleótidos 5' pETGalT y *galA3'Int* (Tabla 3) y DNA genómico de *P. putida* KTGAL como molde. El gen se clonó en el vector pET-29a (+) empleando las enzimas de restricción *NdeI* y *EcoRV*. Posteriormente el gen *galT* fue subclonado en el vector de amplio espectro de huésped pIZ1016 como un inserto *XbaI/SacI* originando el plásmido pIZGalT. Las abreviaturas utilizadas son: Gm^R , gen que confiere resistencia a gentamicina; Km^R , gen que confiere resistencia a kanamicina; *lacI/lacI^q*, gen que codifica el represor LacI/LacI^q; *ori*, origen de replicación del plásmido pBR322; *rep* y *mob*, genes de replicación y movilización, respectivamente, del plásmido pIZ1016; P_{T7} , promotor del gen *10* del fago T7; *Ptac*, promotor *Ptac*. Las dianas de restricción señaladas son: EV, *EcoRV*; Nd, *NdeI*; Xb, *XbaI*; Sc, *SacI*.

Tabla 9. Transporte de GA en *P. putida* KT2440 y *P. putida* KTGAL conteniendo los plásmidos pIZ1016 y pIZGalT

Cepa	Fuente de carbono ^a	Plásmido	Velocidad de transporte (nmoles.min ⁻¹ .mg proteína ⁻¹)
<i>P. putida</i> KT2440	Citrato/GA	pIZ1016	Nd ^b
		pIZGalT	Nd
<i>P. Putida</i> KTGAL	Citrato/GA	pIZ1016	Nd
		pIZGalT	9,8 ± 0,75
<i>P. Putida</i> KTGAL	Citrato	pIZ1016	Nd
		pIZGalT	0,9 ± 0,1
<i>P. Putida</i> KTGAL	Citrato/GA	pIZ1016	6,9 ± 0,9
		pIZGalT	33,5 ± 2,8

a) Se utilizó citrato 0,2% (p/v) y GA 2 mM.

b) Nd, no detectado.

Los ensayos de transporte se realizaron como se detalla en el apartado 8 de Materiales y Métodos y utilizando 10 µM de GA. Los resultados presentados son la media de tres experimentos independientes.

Por otro lado, cuando *P. putida* KT2440 conteniendo el plásmido pIZGalT se cultivó en medio MC suplementado con GA como única fuente de carbono, mostró un crecimiento similar al observado con la cepa *P. putida* KTGAL (Fig. 48), confirmando que la expresión de un gen *galT* funcional es necesario y suficiente para permitir el crecimiento de *P. putida* KT2440 en GA como única fuente de carbono.

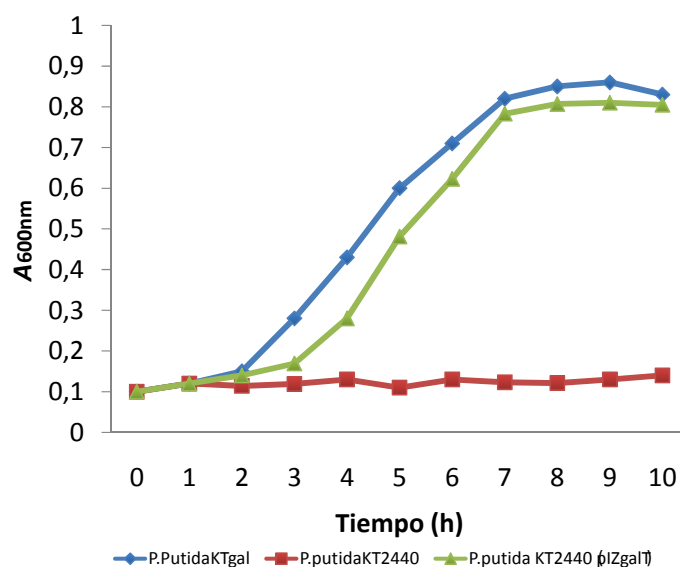


Figura 48. Crecimiento en GA de las cepas *P. putida* KTGAL (azul), *P. putida* KT2440 (pIZGalT) (verde) y *P. putida* KT2440 (pIZ1016) (rojo). Las células fueron cultivadas en medio MC conteniendo GA 5 mM y la A_{600nm} de los cultivos fue monitorizada a lo largo del tiempo.

3.1.2. Rango de sustrato y mecanismo de transporte de la permeasa GalT.

Para determinar el rango de sustrato de la proteína GalT se realizó un experimento de transporte utilizando células de *P. putida* KTGAL cultivadas en GA. De todos los análogos estructurales de GA probados, sólo el protocatecuato era transportado al interior celular aunque con una eficiencia 3 veces menor a la calculada para el GA (Tabla 10).

Tabla 10. Rango de sustrato de la proteína GalT.

Compuesto aromático	Velocidad de transporte (nmol.min ⁻¹ .mg de proteína ⁻¹)	% Transporte
Galato	7,2	100
Metilgalato	Nd ^a	-
Siringato	Nd	-
Protocatecuato	2.6	36,5
4-Hidroxibenzoato	Nd	-
Benzoato	Nd	-
Pirogalol	Nd	-
Homogentisato	Nd	-
Cafeato	Nd	-
Catecol	Nd	-

^{a)} Nd, no detectado.

Las células de *P. putida* KTGAL fueron cultivadas en medio MC conteniendo GA (5 mM) como fuente de carbono. El experimento se realizó tal y como se describe en el apartado 8 de Materiales y Métodos utilizando 50 µM de cada uno de los distintos compuestos aromáticos.

Cuando se analizó más en detalle el transporte de GA y protocatecuato en células de *P. putida* KTGAL cultivadas en GA, se observó en ambos casos una cinética de tipo Michaelis-Menten con una K_m y $V_{máx}$ aparente para GA y protocatecuato de 3,2 µM y 7,2 nmol.min⁻¹.mg proteína⁻¹, y de de 15,1 µM y 2,9 nmol.min⁻¹.mg proteína⁻¹ respectivamente (Fig. 49).

Estos experimentos confirmaban que GalT es un transportador de alta afinidad y especificidad por GA. No obstante, GalT es capaz de transportar eficazmente protocatecuato, un ácido aromático dihidroxilado muy relacionado estructuralmente con el GA.

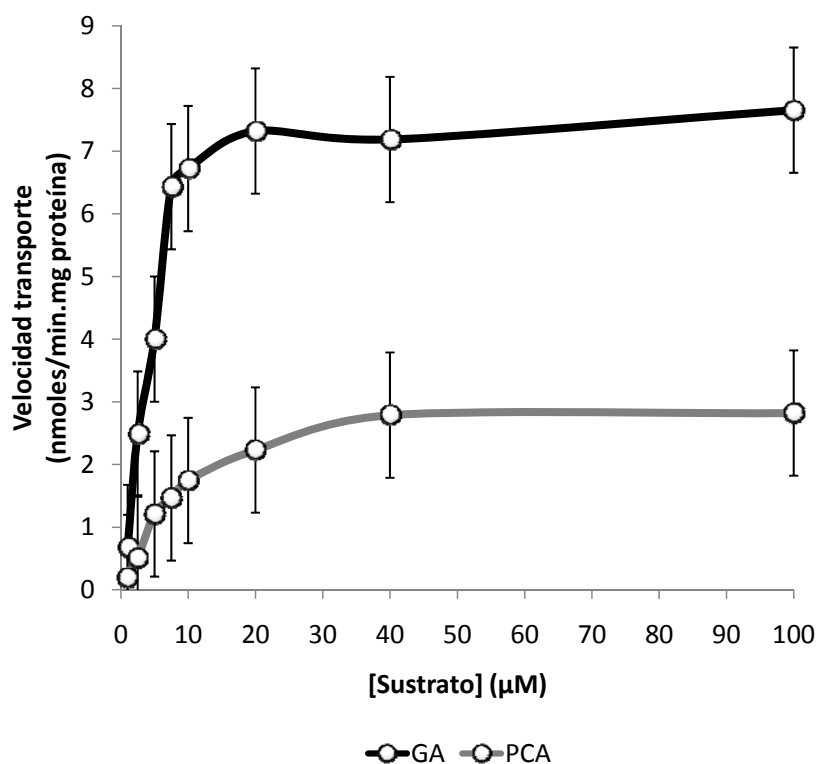


Figura 49. Cinética del transporte de GA y protocatecuato mediado por la proteína GalT. El experimento de transporte fue realizado utilizando un sensor electroquímico tal y como se detalla en el apartado 8 de Materiales y Métodos. Se utilizó la cepa *P. putida* KTGAL cultivada en GA 5 mM. Las células fueron crecidas hasta A_{600nm} de 0,5, lavadas dos veces, y finalmente resuspendidas en 100 μ l de tampón fosfato (100 mM pH 6,0). Las concentraciones de sustrato GA (negro) y protocatecuato (gris) empleadas fueron 0,5, 1, 5, 7,5, 10, 20, 40 y 100 μ M. Se muestran los valores promedio de tres experimentos independientes. Las barras indican la desviación estándar.

Como ya se ha mostrado anteriormente (Tabla 5), GalT presenta similitud de secuencia con proteínas transportadoras de compuestos aromáticos que pertenecen a la familia symporter ácido aromático: H^+ (AAHS) incluida dentro de la superfamilia MFS de transportadores (Pao *et al.*, 1998), donde la proteína PcaK es el prototipo. PcaK es un transportador activo que requiere de la fuerza protón motriz para transportar 4-hidroxibenzoato y protocatecuato en *P. putida* (Harwood *et al.*, 1994; Nichols y Harwood, 1997b). Para comprobar si el transporte de GA es un transporte activo dependiente de la fuerza protón motriz, se realizó un experimento de transporte en el que, una vez iniciado el transporte, se añadieron diferentes agentes desacoplantes que disipan el gradiente de protones de la fuerza protón motriz. Cuando se añadió CCCP, FCCP o DNP se observó una inmediata inhibición del transporte del 95, 93 y 90%, respectivamente (Fig. 50) Estos resultados muestran claramente que el transporte

mediado por GalT es un transporte activo, el cual utiliza la fuerza protón motriz para transportar GA al interior celular de *P. putida*.

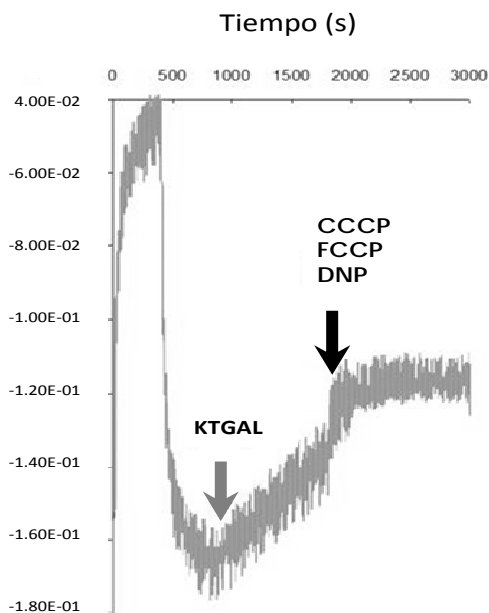


Figura 50. Inhibición del transporte de GA en *P. putida* por agentes desacoplantes. El experimento de transporte fue realizado según el protocolo detallado en el apartado 8 de Materiales y Métodos. Se utilizó la cepa *P. putida* KTGAL (pIZGalT) cultivada en GA 5 mM como fuente de carbono. La adición de las células se indica mediante una flecha gris. La adición de los agentes desacoplantes CCCP (20 μ M), FCCP (30 μ M) y DNP (1 mM) se indica con una flecha negra. Se muestra la gráfica resultante de la adición de FCCP (30 μ M), obteniéndose gráficas similares con CCCP y DNP.

3.1.3. Implicación de la proteína GalT en quimiotaxis.

Dado que GalT posee una similitud significativa con PcaK, y esta última es una proteína un tanto inusual dentro de las permeasas de la familia MFS ya que posee una doble función, i. e., por un lado es un transportador y por otro juega un papel importante en la quimiotaxis de *P. putida* hacia 4-hidroxibenzoato y otros ácidos aromáticos (Harwood *et al.*, 1994), se procedió a comprobar si GalT también presentaba esta doble función. Para ello, se realizó un experimento de quimiotaxis a tiempos cortos utilizando el método *Agarosa Plug Assay* (ver apartado 9 de Materiales y Métodos). Como muestra la figura 51, las células de *P. putida* KTGAL cultivadas en presencia de GA presentan quimiotaxis hacia GA, lo que no ocurre con células de *P. putida* KT2440 cultivadas en las mismas condiciones. Como cabría esperar, la quimiotaxis hacia GA no se produce con células cultivadas en ausencia de GA (Fig. 51).

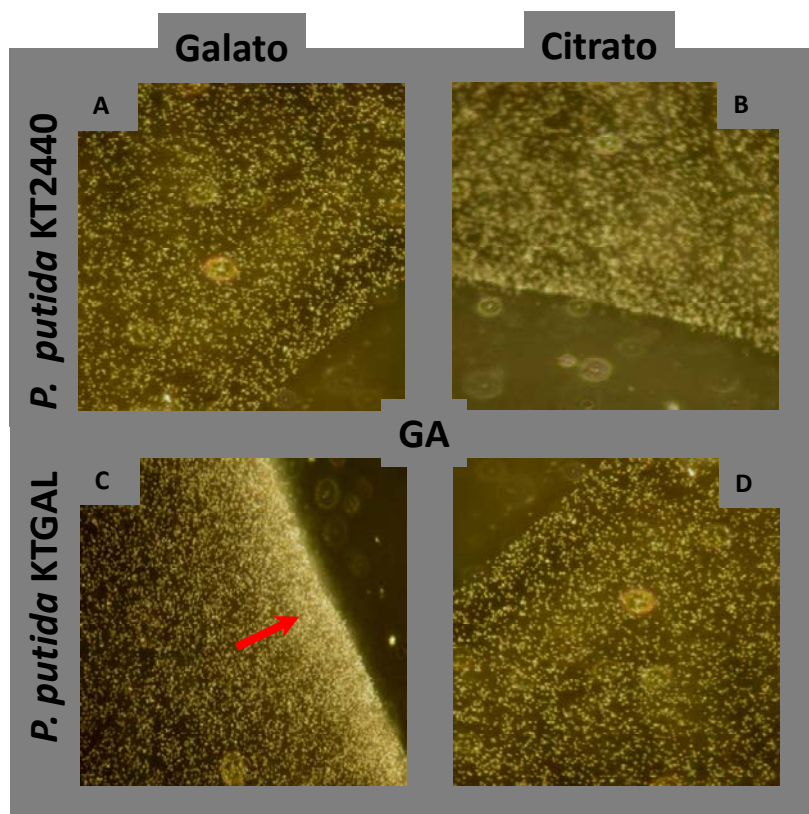


Figura 51. Capacidad quimiotáctica hacia GA de las cepas *P. putida* KTGAL y *P. putida* KT2440. El experimento fue llevado a cabo utilizando el método de *Agarosa Plug Assay* tal y como se describe en el apartado 9 de Materiales y Métodos. Las células de *P. putida* KTGAL y *P. putida* KT2440 fueron cultivadas en medio MC conteniendo citrato 0,2% (p/v) más GA 2 mM (paneles A y C) o citrato 0,2% (p/v) (paneles B y D) hasta alcanzar una A_{600nm} de 0,5. Posteriormente fueron lavadas dos veces en medio MC y finalmente resuspendidas en este mismo medio. La concentración de GA utilizada como atrayente en el ensayo fue de 1 mM. La flecha indica la acumulación de células entorno a la gota de agarosa que contiene GA 1 mM

Todos estos resultados demuestran que la proteína GalT interviene en la respuesta quimiotáctica de *P. putida* KTGAL frente a GA, y confirman la doble función de esta proteína en el transporte y quimiotaxis de GA.

3.2. Estudio del gen *galP* y de la porina GalP.

Como se muestra en la Tabla 5, el gen *galP* codifica una presunta porina de membrana externa de la familia OprD. Pese a que un mutante en este gen, cepa *P. putida* KTGAL*dg**alP*, crece de forma muy similar a la cepa parental *P. putida* KTGAL en medio MC suplementado con GA 5 mM (Tabla 6, Fig. 52A), es bien conocido que en la mayoría de las ocasiones la inactivación de una porina no ocasiona diferencias significativas en el crecimiento bacteriano (Olivera *et al.*, 1998; Jiménez *et al.*, 2004). Para ver si la ausencia de la proteína GalP tenía algún efecto sobre el transporte de GA, se realizó el correspondiente ensayo de transporte con la cepa *P. putida* KTGAL*dg**alP*.

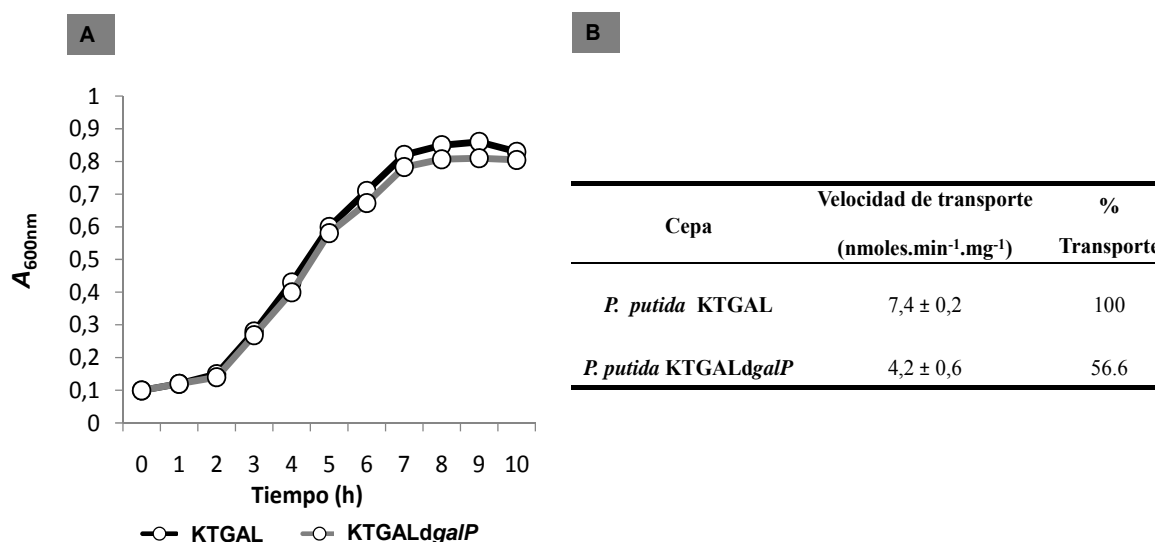


Figura 52. Implicación del gen *galP* en el metabolismo de GA en *P. putida* KTGAL.
A. Efecto sobre el crecimiento bacteriano de una mutación por inserción en el gen *galP*. Las cepas *P. putida* KTGAL (negro) y *P. putida* KTGAL*dg**alP* (gris) fueron cultivadas en medio MC utilizando GA 5 mM como fuente de carbono, y se monitorizó su crecimiento midiendo la A_{600nm} a lo largo del tiempo. **B.** Efecto sobre el transporte de GA de una mutación por inserción en el gen *galP*. Las cepas *P. putida* KTGAL y *P. putida* KTGAL*dg**alP* fueron cultivadas en GA 5 mM, y utilizadas para analizar el transporte de GA 10 μ M tal y como se indica en el apartado 8 de Materiales y Métodos. Se indica el valor promedio y la desviación estándar de tres experimentos independientes

Los resultados demuestran que la ausencia de la porina GalP se plasma en un descenso de la velocidad de transporte de GA de casi un 50% con respecto a la de la cepa parental que produce GalP (Fig. 52B). Por lo tanto, si bien en las condiciones de laboratorio utilizadas GalP no es esencial para el crecimiento de *P. putida* en GA (5 mM) en otras condiciones donde la concentración de éste sustrato sea más baja, e. g.,

ecosistemas naturales, GalP podría tener un papel destacado en el transporte al interior celular de este compuesto aromático.

4. Caracterización de los elementos involucrados en la regulación transcripcional de los genes *gal*.

Una vez estudiados los determinantes catabólicos y elementos de transporte de la ruta de degradación del GA en *P. putida*, se propuso conocer la regulación de los genes que codifican estos elementos. Los resultados obtenidos durante el estudio de los genes *gal* catabólicos y de transporte sugerían que la expresión de los genes *gal* está finamente regulada en *P. putida*. Para profundizar en el estudio de esta regulación, como primer abordaje se procedió a determinar la organización transcripcional del *cluster gal*.

4.1. Organización transcripcional e inducción de los genes *gal*.

La organización génica del *cluster gal* revela dos grupos de genes con igual orientación, *galTAP* y *galBCD*, separados por el gen *galR* que se transcribe en orientación opuesta (Figs. 10 y 53). Esta organización física en el genoma de *P. putida* permite especular con la existencia de, al menos, tres unidades transcripcionales, *galTAP*, *galR* y *galBCD* cuya expresión sería conducida por los 3 hipotéticos promotores P_T , P_R y P_B , respectivamente.

Para determinar la organización transcripcional del *cluster gal*, se realizó un estudio de la expresión de distintas regiones intergénicas mediante experimentos de RT-PCR (Fig. 53). Para ello se aisló el RNA total de cultivos de *P. putida* KTGAL crecidos en GA (condiciones de inducción) o en citrato (condiciones de no inducción) como únicas fuentes de carbono y energía. Como cabía esperar, sólo se observó expresión de los genes *gal* en condiciones de inducción. Además, la co-transcripción de los genes *galT/galA* y *galA/galP* sugiere fuertemente que *galTAP* es efectivamente una unidad transcripcional controlada por el promotor P_T , al igual que ocurre con la co-transcripción de los genes *galB/galC* y *galC/galD*, confirmando lo propio con el operón *galBCD* controlado por el promotor P_B (Fig. 53B).

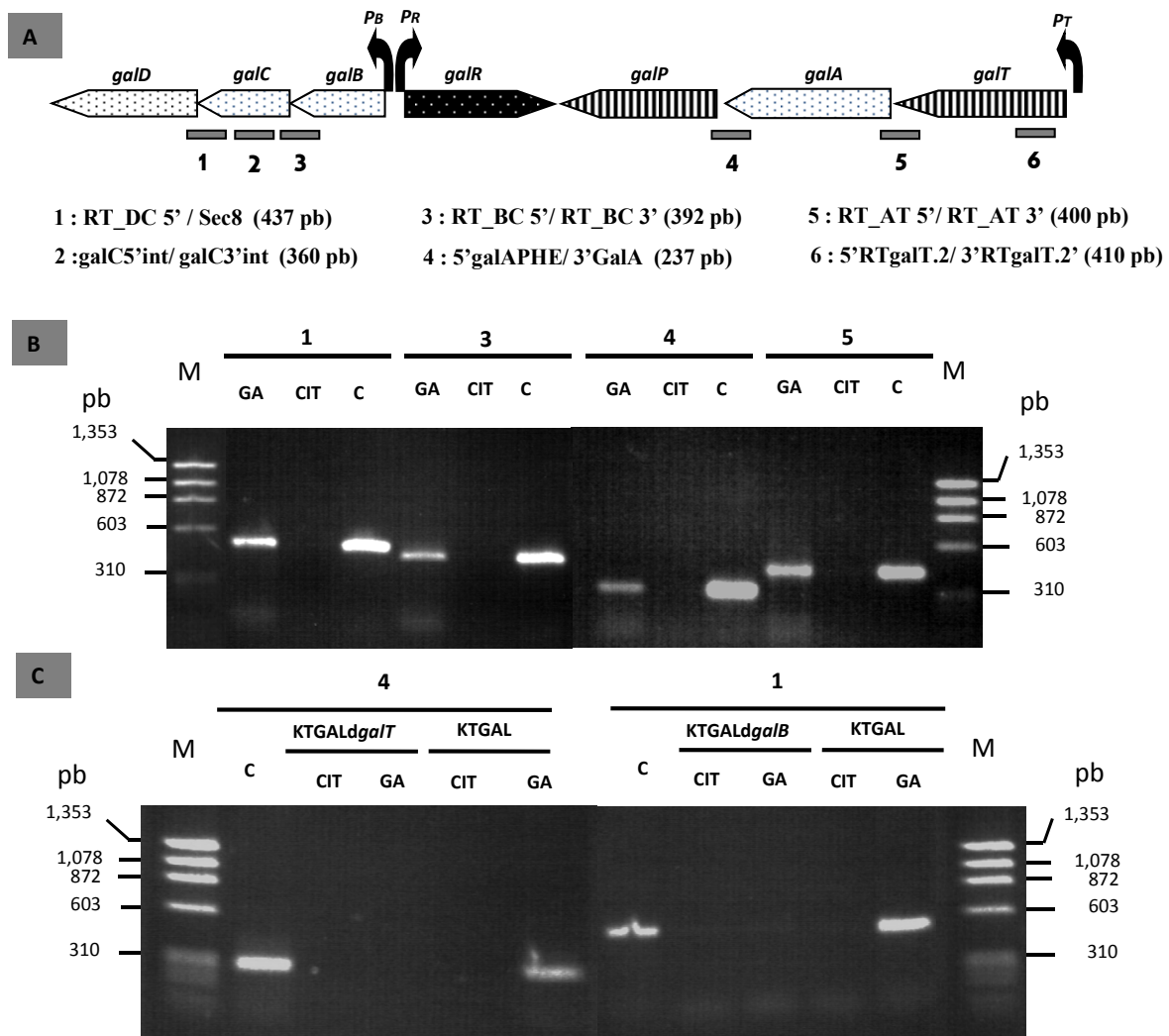


Figura 53. Organización transcripcional del cluster gal. **A.** Organización física de los genes gal. Se muestran en blanco punteados los genes catabólicos, rayados los genes que codifican transportadores, y en negro el posible gen regulador del cluster. La localización de los promotores P_B , P_R y P_T se indica mediante flechas curvadas. Las regiones amplificadas se muestran numeradas. Las parejas de oligonucleótidos empleadas para la amplificación de estas regiones (ver Tabla 4 de Materiales y Métodos), así como el tamaño de éstas se especifican. **B.** Electroforesis en geles de agarosa de los productos de RT-PCR generados a partir del RNA aislado de células de *P. putida* KTGAL. *P. putida* KTGAL se cultivó en medio mínimo MC con GA 5 mM o citrato (CIT) 0,2% hasta que los cultivos alcanzaron una A_{600} de 0,5. **C.** Electroforesis en geles de agarosa de los productos de RT-PCR generados a partir del RNA aislado de células de *P. putida* KTGAL, KTGALdgalT y KTGALdgalB. Las cepas fueron cultivadas en medio mínimo MC utilizando como fuente de carbono GA 2 mM más citrato 0,2% (GA) o citrato 0,2% (CIT) hasta que los cultivos alcanzaron una A_{600} de 0,5. El RNA total de los cultivos y los experimentos de RT-PCR se realizaron como se indica en el apartado 6.2 de Materiales y Métodos utilizándose las parejas de oligonucleótidos que se indican en el panel A (Tabla 4). Las calles C se corresponden al fragmento control generado por PCR utilizando DNA cromosómico de *P. putida* KTGAL como molde y los mismos oligonucleótidos que los utilizados en la reacción de RT-PCR correspondiente. Como marcadores de peso molecular (M) se emplearon los fragmentos generados tras la digestión del DNA del fago Φ X174 con *Hae*III (New England Biolabs).

Para confirmar la organización transcripcional del *cluster gal* y descartar la presencia de algún promotor interno en los operones *galBCD* y *galTAP*, se analizó mediante RT-PCR la expresión de las regiones intergénicas *galC/galD* y *galA/galP* en las cepas *P. putida* KTGALd*galB* y *P. putida* KTGALd*galT* portadoras de mutaciones polares en los genes *galB* y *galT*, respectivamente. Para ello, se extrajeron los RNAs totales de la cepa parental, *P. putida* KTGAL, y de las dos cepas mutantes cultivadas en citrato (condiciones de no inducción) o en citrato más GA (condiciones de inducción). Los resultados mostrados en la figura 53C revelan que si bien las regiones *galC/galD* y *galA/galP* se expresan en la cepa parental en condiciones de inducción, no existe expresión bajo ninguna condición en las dos cepas mutantes, sugiriendo que los promotores P_B y P_R son los únicos que controlan la expresión de los operones *galBCD* y *galTAP*, respectivamente. La expresión del gen *galR* no pudo ser monitorizada por RT-PCR en ninguna de las condiciones intentadas, posiblemente debido a una baja expresión y/o a la inestabilidad de este RNA mensajero, una característica frecuente para transcritos que codifican reguladores transcripcionales.

Datos preliminares apuntaban a que GalR era un activador transcripcional de los genes *gal*, ya que un mutante en este gen (*P. putida* KTGALd*galR*) era incapaz de crecer en GA como única fuente de carbono (Tabla 6). Con objeto de corroborar esta hipótesis se realizó un nuevo experimento de RT-PCR con RNAs extraídos de la cepa *P. putida* KTGALd*galR* cultivada en citrato o en citrato más galato (condiciones de inducción). Se analizó la expresión de los operones *galBCD* y *galTAP* monitorizando la de los genes *galC* y *galT*, respectivamente. Se observó que, a diferencia de lo que ocurre en la cepa parental, estos dos genes no se expresaban bajo ninguna condición en la cepa mutante *P. putida* KTGALd*galR* (Fig. 54), confirmando que GalR era un activador transcripcional necesario para la expresión de los dos operones catabólicos *gal*.

Para determinar si era el GA o alguno de los compuestos intermediarios en su degradación el metabolito inductor del sistema, se realizó un experimento de RT-PCR en el que fueron analizados RNAs totales extraídos de la cepa *P. putida* KTGALd*galA* cultivada en condiciones de inducción (citrato más galato) o de no inducción (citrato). Cuando se monitorizó la expresión de los genes *galC* y *galT* se pudo comprobar que no había transcripción de ninguno de ellos en ninguna de las condiciones ensayadas, sugiriendo que no era el GA sino algún metabolito intermediario de su degradación el que actúa como molécula inductora del sistema de regulación.

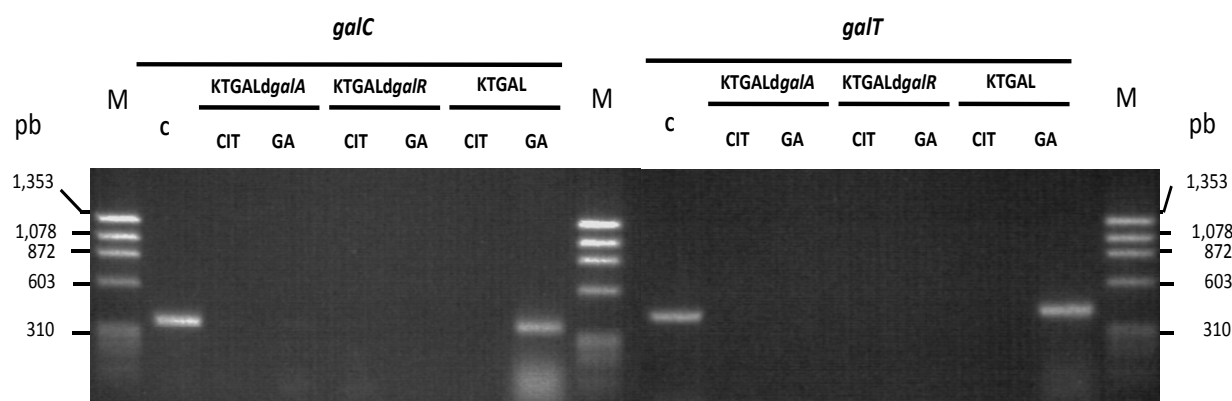


Figura 54. Electroforesis en geles de agarosa de los productos de RT-PCR de los genes *galC* y *galT*. Las cepas *P. putida* KTGAL, *P. putida* KTGALdgalA y *P. putida* KTGALdgalR fueron cultivadas en medio mínimo MC utilizando como fuente de carbono GA 2 mM más citrato 0,2% (GA) o citrato 0,2% (p/v) (CIT) hasta que los cultivos alcanzaron una $A_{600\text{nm}}$ de 0,5. El RNA total de los cultivos y los experimentos de RT-PCT se realizaron como se indica en el apartado 6.2 de Materiales y Métodos utilizándose las parejas de oligonucleótidos que se indican en la figura 53A (Tabla 4) para la amplificación de las regiones 2 (gen *galC*) y 6 (gen *galT*) señaladas en la Fig. 53A. Las calles C, se corresponden al fragmento generado por PCR utilizando DNA cromosómico de *P. putida* KTGAL como molde y los mismos oligonucleótidos que los utilizados en la reacción de RT-PCR correspondiente. Como marcadores de peso molecular (M) se emplearon los fragmentos generados tras la digestión del DNA del fago $\Phi X174$ con *Hae*III (New England Biolabs)

En su conjunto, la organización del *cluster gal* y los experimentos de RT-PCR revelan la existencia de, al menos, tres operones, *galTAP*, *galR* y *galBCD*, que se transcriben a partir de los hipotéticos promotores P_T , P_R y P_B , respectivamente (Fig. 53). Por otro lado, el gen *galR* codifica un activador transcripcional necesario para la expresión inducible de los operones *galTAP* y *galBCD*, no siendo el propio GA sino algún metabolito intermediario de su degradación el que actúa como molécula inductora.

4.2. Análisis de la actividad de los promotores del *cluster gal* mediante fusiones con el gen reportero *lacZ*.

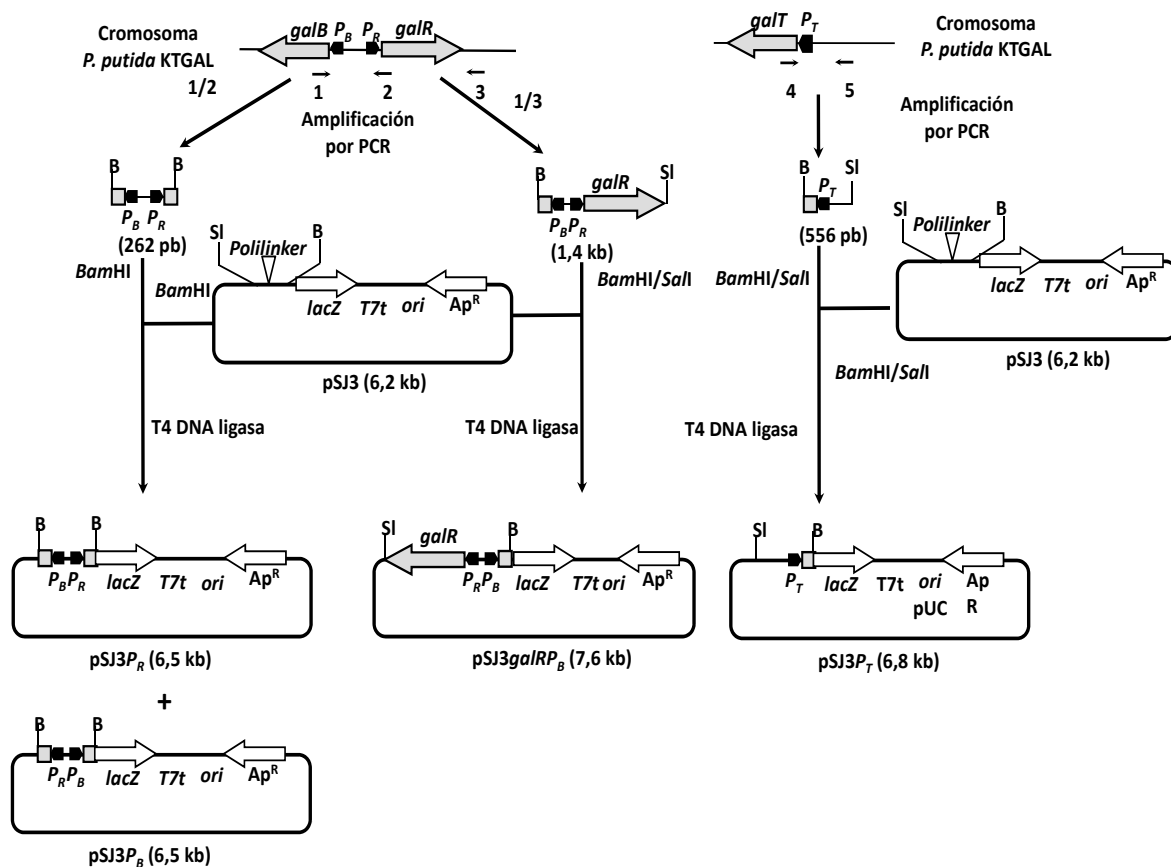


Figura 55. Representación esquemática de la construcción de los plásmidos pSJ3_{P_R}, pSJ3_{P_B}, pSJ3_{galRP_B} y pSJ3_{P_T}. Las regiones intergénicas conteniendo los promotores P_B , P_T y P_R fueron amplificadas por PCR utilizando como molde el DNA genómico de *P. putida* KTGAL y la pareja de oligonucleótidos indicada en cada caso: 1, pBlacZ 3'; 2, pBlacZ 5'; 3, 5' galBlacZ; 4, 3'pTlacZ y 5, 5'pTlacZ (Tabla 4). Los productos de PCR se clonaron en el plásmido pSJ3 de búsqueda de promotores tras digestión con las enzimas de restricción indicadas en cada caso. Las abreviaturas utilizadas son: T7t, terminador de la transcripción del fago T7; *lacZ*, gen que codifica la β -galactosidasa de *E. coli*; Ap^R, gen que confiere resistencia a ampicilina; *ori*, origen de replicación del plásmido pUC. Las dianas de restricción indicadas son: B, *Bam*HI; Sl, *Sal*I.

El análisis de la organización transcripcional del *cluster gal* había identificado tres posibles regiones promotoras (Fig. 53). Para confirmar la actividad de los hipotéticos promotores P_B , P_R y P_T , las regiones intergenéticas que los contenían se amplificaron desde el genoma de *P. putida* KTGAL mediante PCR y los productos obtenidos fueron clonados en posición 5' del gen reportero *lacZ* en el vector de búsqueda de promotores pSJ3 originando las fusiones traduccionales $P_R::lacZ$ (pSJ3_{P_R}),

$P_B::lacZ$ (pSJ3 P_B) y $P_T::lacZ$ (pSJ3 P_T) (Fig. 57). Se construyó además el plásmido pSJ3 $galRP_B$ que contiene la fusión $P_B::lacZ$ junto con el gen $galR$ expresado bajo su propio promotor. Las fusiones traducciónales $P_B::lacZ$, $P_R::lacZ$ y $P_T::lacZ$ fueron posteriormente subclonadas como fragmentos $KpnI/HindIII$ en el vector de amplio espectro de huésped pIZ1016 generándose los plásmidos pIZ P_B , pIZ P_R y pIZ P_T , respectivamente (Fig. 56), que permiten estudiar la expresión de dichas fusiones en huéspedes distintos a *E. coli*, tales como *P. putida*.

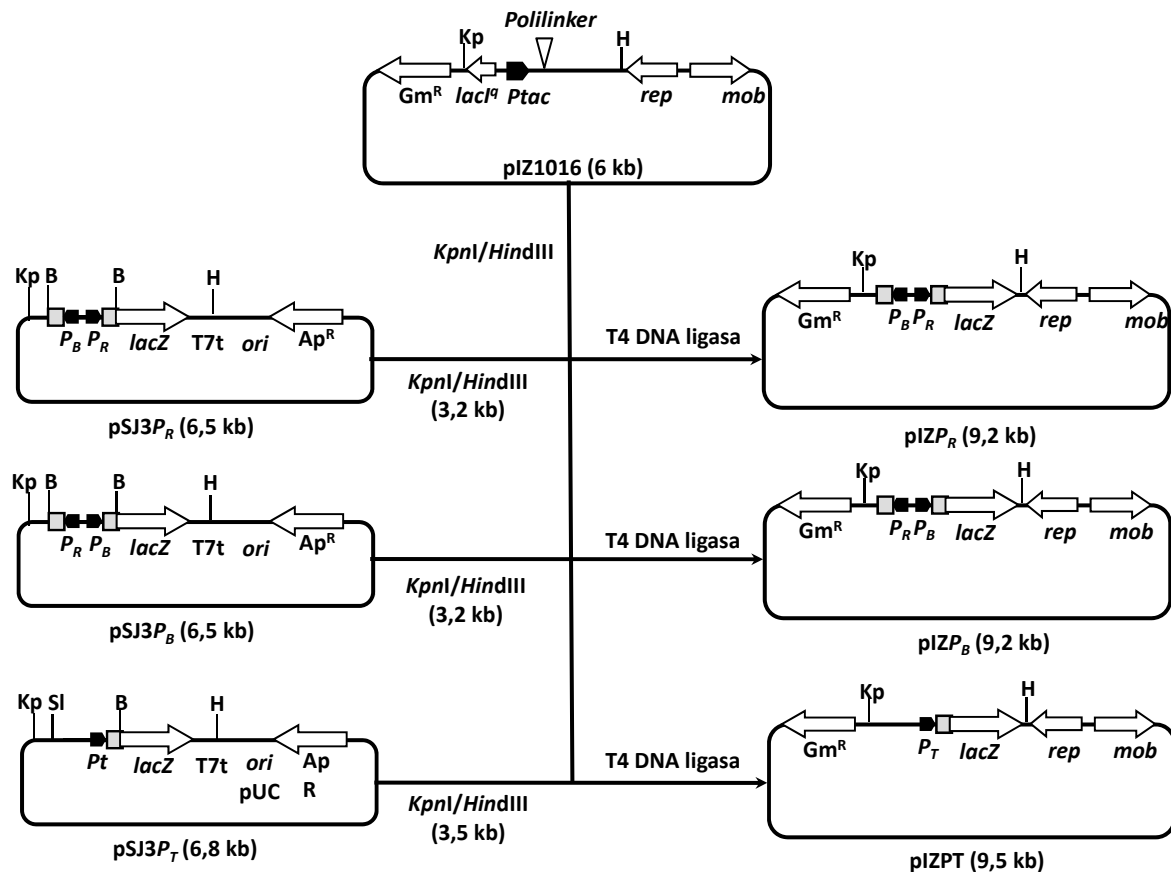


Figura 56. Representación esquemática de la construcción de los plásmidos pIZ P_R , pIZ P_B y pIZ P_T . Las fusiones traducciónales $P_R::lacZ$, $P_B::lacZ$ y $P_T::lacZ$ fueron subclonadas en el plásmido pIZ1016 como insertos $KpnI/HindIII$ tal y como se detalla en la figura. Las abreviaturas utilizadas son: T7t, terminador de la transcripción del fago T7; $lacZ$ gen que codifica la β -galactosidasa de *E. coli*; Ap^R , gen que confiere resistencia a ampicilina; ori , origen de replicación del plásmido pUC; Gm^R , gen que confiere resistencia a gentamicina; $lacI^q$, gen que codifica el represor LacI; rep y mob , origen de replicación y región de movilización del plásmido pBBR1-MCS; P_{tac} , promotor P_{tac} . Las dianas de restricción indicadas son: B, *Bam*HI; SI, *Sall*; Kp, *Kpn*I; H, *Hind*III.

Los plásmidos pIZ P_R , pIZ P_B y pIZ P_T fueron introducidos en la cepa *P. putida* KTGAL y en las cepas mutantes *P. putida* KTGAL $galR$, KTGAL $galA$ y KTGAL $galB$ mediante electroporación. Las cepas resultantes fueron cultivadas en medio MC conteniendo citrato ó citrato más GA como fuentes de carbono, analizándose

la actividad β -galactosidasa cuando las células se encontraban en la fase exponencial de crecimiento. Los resultados obtenidos con la cepa *P. putida* KTGAL revelan que si bien el promotor P_B presenta una actividad 4 veces superior a la del promotor P_T , ambos poseen una significativa actividad promotora sólo en presencia de GA, i. e., condiciones de inducción (Fig. 57). Por el contrario, el promotor P_R posee actividad tanto en condiciones de inducción como de no inducción, indicando que se trata de un promotor constitutivo. Por otro lado, los bajos niveles de actividad del promotor P_R comparados con los de los promotores P_B y P_T confirman que P_R es un promotor mucho más débil y explica, en parte, el hecho de que no fuese posible detectar la expresión del gen *galR* en los experimentos de RT-PCR (véase apartado 4.1 de Resultados).

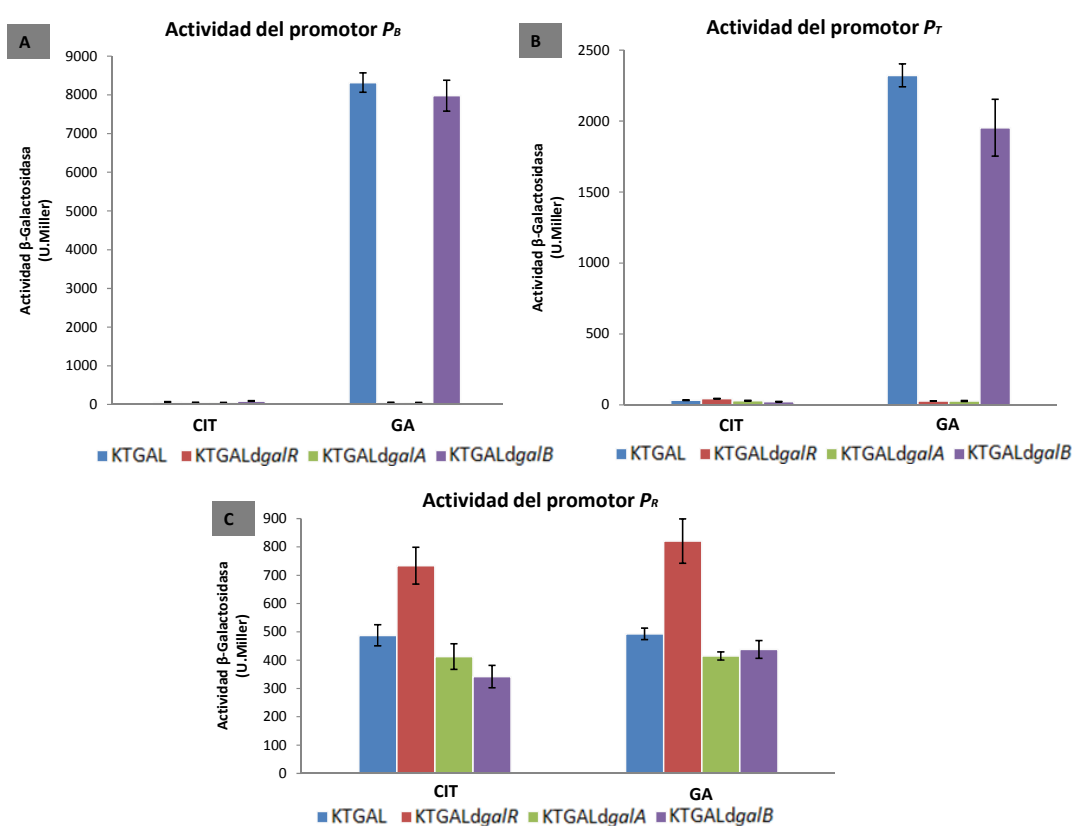


Figura 57. Estudio de la actividad de los promotores P_B , P_T y P_R en *P. putida* KTGAL y en distintas cepas mutantes. Las células fueron cultivadas en medio MC conteniendo citrato 0,2% (CIT) o citrato 0,2% más GA, 2 mM GA hasta alcanzar una A_{600nm} de 0,5. **A. Actividad del promotor P_B .** Actividad β -galactosidasa de las cepas *P. putida* KTGAL, KTGALdgalR, KTGALdgalA y KTGALdgalB conteniendo el plásmido pIZP_B ($P_B::lacZ$). **B. Actividad del promotor P_T .** Actividad β -galactosidasa de las cepas *P. putida* KTGAL, KTGALdgalR, KTGALdgalA y KTGALdgalB conteniendo el plásmido pIZP_T ($P_T::lacZ$). **C. Actividad del promotor P_R .** Actividad β -galactosidasa de las cepas *P. putida* KTGAL, KTGALdgalR, KTGALdgalA y KTGALdgalB conteniendo el plásmido pIZP_R ($P_R::lacZ$). Los ensayos de actividad β -galactosidasa (en unidades Miller, U. Miller) se realizaron con células permeabilizadas como se indica en el apartado 7.7.5 de Materiales y Métodos. Se muestra la media de los valores obtenidos en tres experimentos independientes, indicándose con barras la desviación estándar.

Los ensayos de actividad β -galactosidasa utilizando la cepa *P. putida* KTGALdgalR confirman que el gen *galR* es necesario para la actividad de los promotores P_B y P_T en presencia de GA, actuando como un activador transcripcional de éstos. Por el contrario, el promotor P_R no sólo no necesita de la participación de GalR para su actividad, sino que ésta se incrementa un 50% en células que carecen del gen *galR*, lo que sugiere que GalR controla su propia expresión actuando, en este caso, como un represor transcripcional (Fig. 57).

Los ensayos realizados con las cepas *P. putida* KTGALdgalA y KTGALdgalB, revelan que el gen *galA* es estrictamente necesario para la actividad de los promotores P_B y P_T , sin embargo, estos son activos en la cepa mutante *P. putida* KTGALdgalB en presencia de GA, lo que confirma que el GA no es el verdadero inductor de la activación mediada por GalR sino que la molécula inductora es el OMA, intermediario que se acumula en la cepa KTGALdgalB cultivada en presencia de GA. Nuevamente, el promotor P_R muestra una actividad constitutiva tanto en la cepa *P. putida* KTGAL como en las cepas *P. putida* KTGALdgalA y *P. putida* KTGALdgalB, poniendo de manifiesto la independencia del OMA para su actividad.

El papel del OMA como verdadero inductor de la regulación mediada por GalR se confirmó valorando la expresión de la fusión traduccional $P_B::lacZ$ en *E. coli*. Para ello, células de *E. coli* conteniendo los plásmidos pSJ3 P_B ($P_B::lacZ$), pSJ3galRP B (*galR*/ $P_B::lacZ$) y pIZGalA/pSJ3galRP B (Tabla 3, Figs. 17 y 55) fueron cultivadas en glicerol (condición de no inducción) o en glicerol más GA (condición de inducción). Sólo cuando las células habían sido cultivadas en condiciones de inducción y contenían los genes *galR* y *galA* se observó un significativo incremento de la actividad del promotor P_B (Fig. 58) indicando que efectivamente GalR activa al promotor P_B sólo cuando se genera el producto de la actividad de GalA sobre GA, i. e., OMA_{ceto}. Además, estos ensayos revelaron que GalR en ausencia del inductor (OMA) actúa como un represor débil del promotor P_B , reduciendo a la mitad su actividad en la cepa *E. coli* CC118 (pSJ3galRP B), con respecto a la detectada en la cepa *E. coli* CC118 (pSJ3 P_B) (Fig. 58).

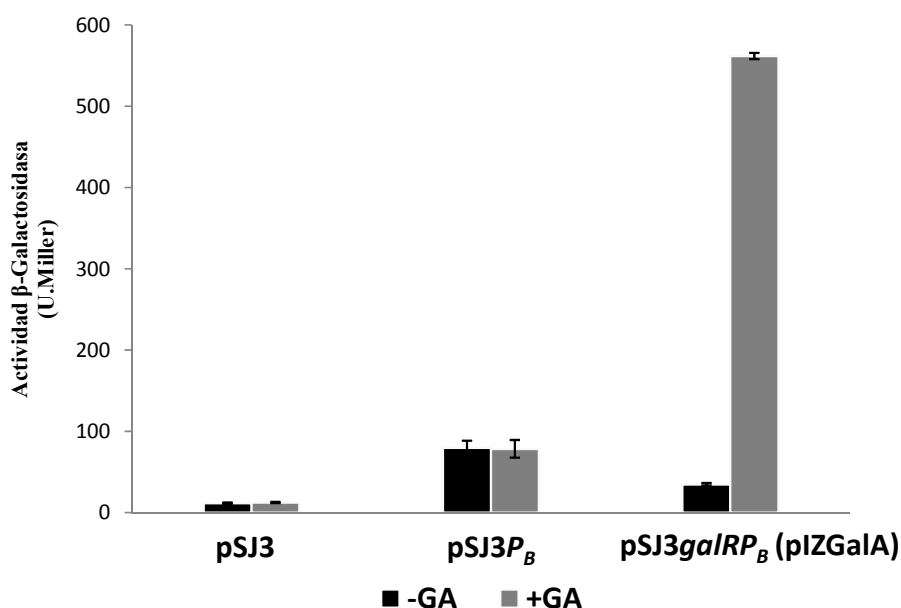


Figura 58. Expresión de la fusión traduccional $P_B::lacZ$ en *E. coli* CC118. Las células de *E. coli* CC118 conteniendo los plásmidos pSJ3 (control) pSJ3P_B ($P_B::lacZ$), pSJ3galRP_B ($galR/P_B::lacZ$) y pIZGalA ($galA$), fueron cultivadas en medio MC conteniendo glicerol 20 mM, (- GA) o glicerol 20 mM más GA 2mM, (+ GA) hasta alcanzar una A_{600nm} de 0,5. Los ensayos de actividad β -galactosidasa (en unidades Miller, U. Miller) se realizaron con células permeabilizadas como se indica en el apartado 7.7.5 de Materiales y Métodos. Se muestra la media de los valores obtenidos en tres experimentos independientes indicándose con barras la desviación estándar.

4.3. Estudio de represión catabólica sobre los promotores *gal*.

Una vez establecida la regulación específica del cluster *gal* mediada por GalR/OMA, se propuso confirmar la existencia de una posible represión catabólica sobre los genes *gal*. Como se ha indicado en la Introducción, se entiende por represión catabólica el efecto represor que ejercen ciertas fuentes de carbono fácilmente asimilables por la bacteria sobre la expresión de los genes implicados en rutas de degradación de otras fuentes de carbono que no son preferenciales para este organismo. El hecho de que el metabolismo de compuestos aromáticos suponga un estrés para la célula y se trate de compuestos ciertamente tóxicos para ella, hace que el efecto de la represión catabólica sobre la degradación de estos compuestos sea muy acusado.

Para determinar si la expresión de los genes *gal* está sujeta a represión catabólica, se monitorizó la expresión del gen reportero *lacZ* a partir de los promotores P_B y P_T en las cepas *P. putida* KTGAL (pIZP_B) y *P. putida* KTGAL (pIZP_T) cultivadas en GA 2 mM (inductor) y en presencia o ausencia de otros compuestos metabolizables por la bacteria, tales como otros ácidos aromáticos e. g., fenilacetato, ácidos orgánicos, e. g., succinato, acetato, citrato y piruvato, azúcares, e. g., glucosa y aminoácidos, e. g.,

casaminoácidos. Los resultados, mostrados en la figura 59, claramente demuestran que compuestos como el acetato y el fenilacetato ejercen una importante represión catabólica sobre los dos promotores estudiados. Por el contrario, compuestos como el piruvato, uno de los productos finales de la ruta del GA, la glucosa o el citrato no ejercen ningún tipo de represión catabólica sobre ninguno de los dos promotores. El comportamiento de P_B y P_T es diferente en presencia de aminoácidos o succinato, no ejerciendo represión sobre el promotor P_B y sí sobre el promotor P_T . Este dato sugiere que el promotor P_T está más controlado a nivel global, siendo, al menos, más sensible a la represión catabólica que el promotor P_B .

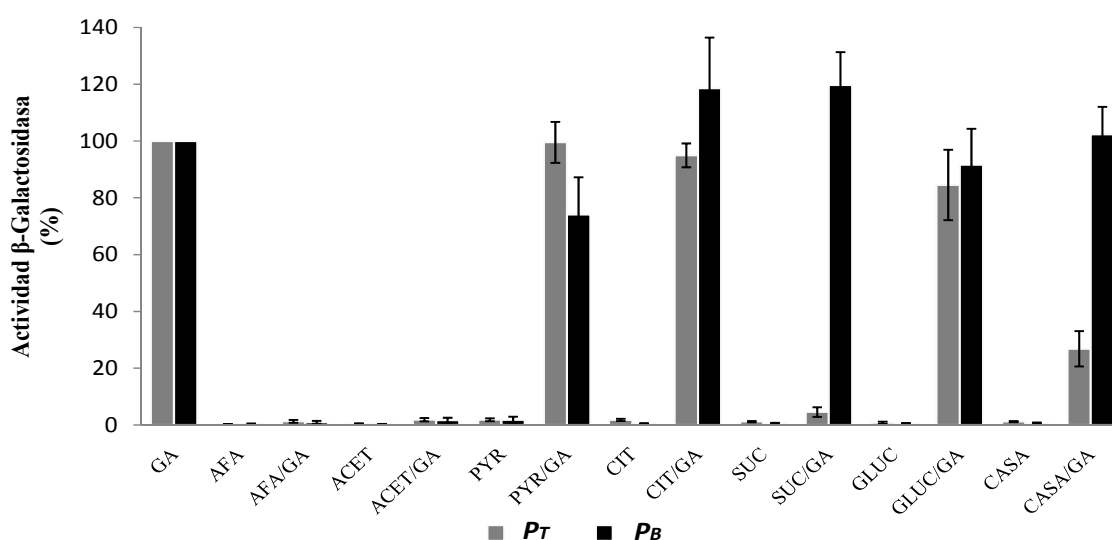


Figura 59. Estudio de represión catabólica sobre los promotores P_B y P_T . Las cepas *P. putida* KTGAL ($pIZP_B$) ($P_B::lacZ$) y *P. putida* KTGAL ($pIZP_T$) ($P_T::lacZ$) fueron cultivadas en medio mínimo MC conteniendo GA 5 mM, fenilacetato (AFA) 5 mM, ó 0,2% de acetato (ACE), piruvato (PYR), citrato (CIT), glucosa (GLUC), casaminoácidos (CASA) y succinato (SUC) como fuente de carbono, y en ausencia o presencia de GA 2 mM. Las células fueron recogidas 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 7.7.5 de Materiales y Métodos. Los resultados se muestran como porcentaje de actividad frente a los niveles alcanzados por las células creciendo en GA como única fuente de carbono y energía.

4.4. Utilización de un circuito regulador GalR/ $P_B::lacZ$ para el diseño de un biosensor de GA.

El uso de biosensores para la detección de compuestos potencialmente tóxicos o de interés biotecnológico, es una alternativa ingeniosa y eficaz al empleo de técnicas analíticas convencionales. A menudo, la utilización de biosensores reduce la infraestructura y el tiempo necesario para la identificación de estos compuestos, permitiendo una detección mucho más sensible.

Dado que no se ha desarrollado hasta la fecha ningún biosensor celular que pueda detectar GA de forma específica y sencilla, y que la determinación y cuantificación de este ácido aromático necesita de técnicas analíticas complicadas, nos propusimos la construcción y validación de un biosensor para GA utilizando algunos de los elementos genéticos ya caracterizados del cluster *gal* y el gen *lacZ* como reportero. Con este fin, se utilizó la fusión traduccional $P_B::lacZ$ contenida en el plásmido pIZP_B (Fig. 56) y *P. putida* KTGAL como célula huésped. Para la validación del biosensor, células de *P. putida* KTGAL (pIZP_B) se incubaron con concentraciones crecientes (0,1, 0,5, 1,5, 10, 50, 100, 500 y 1000 μM) de GA a 30 °C durante una hora, procediéndose a la determinación de la actividad β-galactosidasa de los diferentes cultivos. Los resultados obtenidos muestran que el sistema biosensor es capaz de detectar GA incluso a concentraciones tan bajas como 0,5 μM (Fig. 60). Interesantemente, se establece una elevada correlación (R^2 de 0,992) entre la concentración de GA presente en el medio de cultivo, extendiéndose en el rango de 0,5 hasta 100 μM de GA y la actividad β-galactosidasa detectada (Fig. 60).

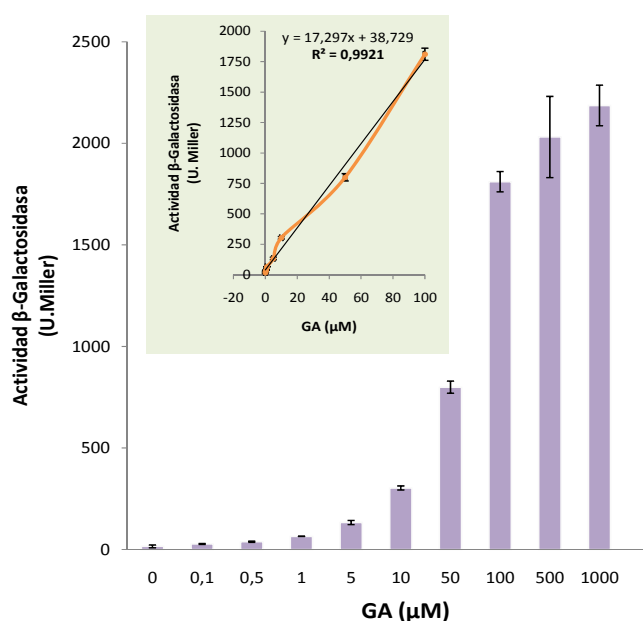


Figura 60. Validación del biosensor de GA basado en la cepa *P. putida* KTGAL (pIZP_B). Se muestra la actividad β-galactosidasa de la cepa *P. putida* KTGAL (pIZP_B) expuesta a concentraciones crecientes de GA. Las células fueron cultivadas en medio MC conteniendo citrato 0,2%, (hasta alcanzar una A_{600nm} de 0,5), lavadas, resuspendidas de nuevo en medio MC-citrato y expuestas durante 1h y a 30 °C a concentraciones crecientes de GA (0, 0,1, 0,5, 1, 5, 10, 50, 100 y 1000 μM). Posteriormente, se midió la actividad β-galactosidasa presente en cada una de las muestras. En la parte superior se muestra el intervalo de concentración de GA en el que se observa una respuesta lineal de actividad β-galactosidasa. Los ensayos de actividad β-galactosidasa (en unidades Miller, U. Miller) se realizaron con células permeabilizadas como se indica en el apartado 7.7.5 de Materiales y Métodos. Se muestra la media de los valores obtenidos en tres experimentos independientes indicándose con barras la desviación estándar.

4.5. Caracterización del regulador transcripcional GalR.

Para seguir profundizando en la regulación mediada por GalR, se procedió a la clonación del gen *galR* y a la realización de abordajes *in vitro* para estudiar la interacción de GalR con sus promotores diana.

4.5.1. Clonación del gen *galR* y purificación de la proteína GalR.

Para demostrar que GalR era capaz de interactuar directamente con las regiones promotoras P_B , P_R y P_T e investigar el mecanismo de activación y de represión de los promotores *gal*, se procedió a la clonación y al estudio en detalle del gen *galR*.

El gen *galR* fue amplificado del cromosoma de la cepa *P. putida* KTGAL y subclonado en el vector de hiperexpresión pET-29a (+) generando el plásmido pETGalR (Fig. 61).

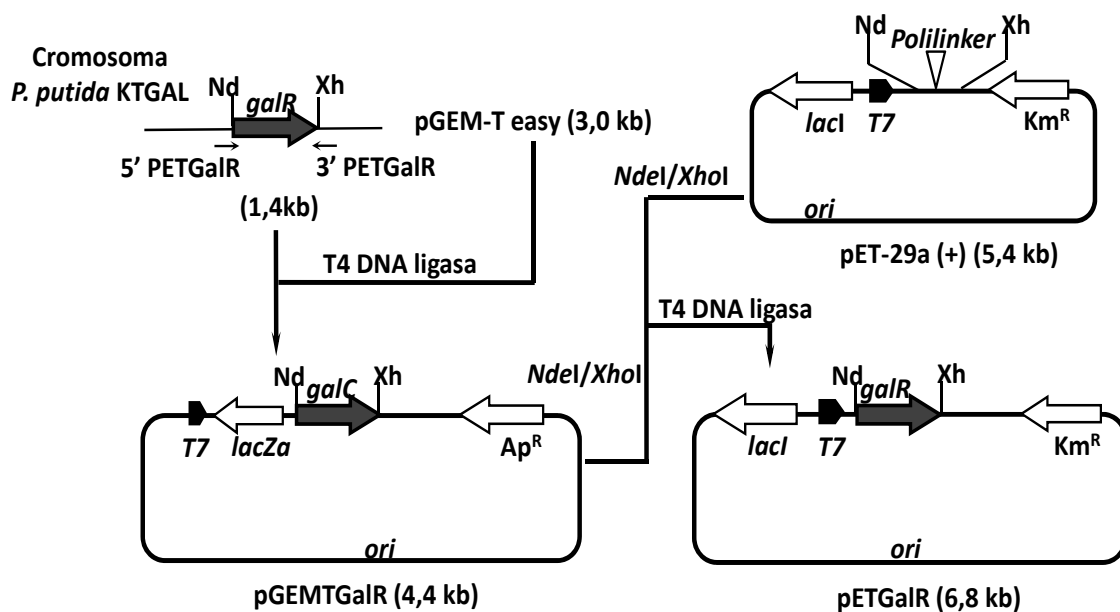


Figura 61. Construcción del plásmido pETGalR. El gen *galR* fue amplificado por PCR utilizando la pareja de oligonucleótidos 5'pETR y 3'pETR (Tabla 4) y DNA genómico de *P. putida* KTGAL como molde. El oligonucleótido 3'pETR fue diseñado eliminando el codón stop del gen *galR* e introduciendo en su lugar la diana de restricción *XhoI*. El gen se clonó directamente en el vector pGEMT-easy originando el plásmido pGEMTGalR. Posteriormente, el fragmento que contenía el gen *galR* fue subclonado en el vector pET-29a (+) como un inserto *NdeI/XhoI* originando el plásmido pETGalR que expresa un gen *galR* cuyo extremo 3' tiene fusionados en fase 6 tripletes que codifican un *tag* de 6His. Las abreviaturas utilizadas son: *lacZα*, subunidad α de la β -galactosidasa; *Km^R*, gen que confiere resistencia a kanamicina; *Ap^R*, gen que confiere resistencia a ampicilina; *lacI*, gen que codifica el represor LacI; *ori*, origen de replicación; *P_{T7}*, promotor del gen *10* del fago T7; *P_{tac}*, promotor *P_{tac}*. Las dianas de restricción señaladas son: *NdI*, *NdeI*; *Xh*, *XhoI*.

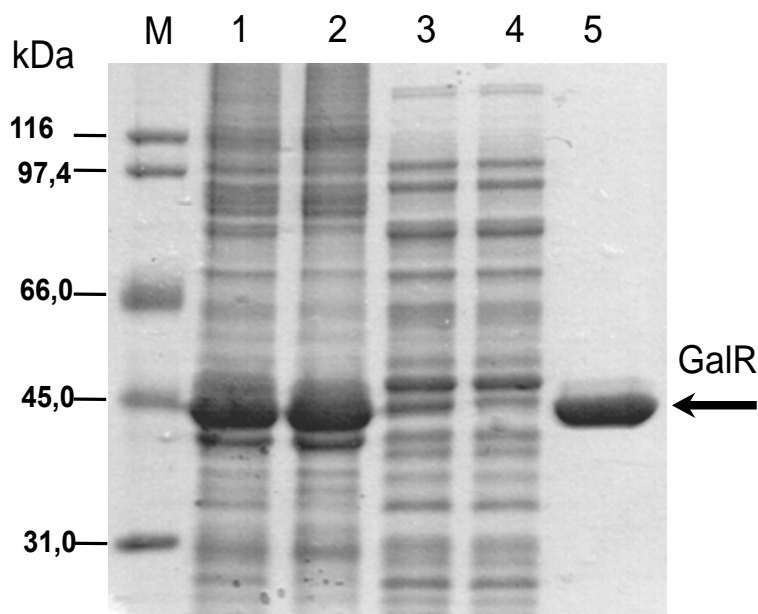


Figura 62. Hiperproducción y purificación de la proteína GalR a partir de extractos de *E. coli* BL21 (DE3) (pETGalR). SDS-PAGE al 12,5 %. Calle 1, extracto de células de *E. coli* BL21(DE3) (pETGalR); calle 2, fracción insoluble después de la etapa de centrifugación (60 min 20.000 x g); calle 3, fracción soluble tras el proceso de ultracentrifugación; calle 4, fracción no retenida tras la cromatografía de afinidad; calle 5, proteína GalR-His₆ purificada; calle M, marcadores de peso molecular “Broad-Range” de BioRad, su tamaño (en kDa) se indica en el lateral izquierdo de la figura. La proteína GalR-His₆ se señala con una flecha. En todas las calles se cargaron 5 µg de proteína total.

La expresión del gen *galR* se llevó a cabo en la cepa *E. coli* BL21 (DE3) conteniendo el plásmido pETGalR. El extracto celular se analizó mediante SDS-PAGE mostrando una banda de hiperproducción de un tamaño aproximado de 43 kDa, que coincide con el tamaño deducido a partir de la secuencia primaria de la proteína GalR-His₆ (Fig. 62). Tal y como se muestra en la figura 62, la mayor parte de la proteína GalR era insoluble, no obstante una pequeña fracción soluble pudo ser utilizada para su purificación mediante cromatografía de afinidad en columnas de Ni-NTA (ver apartado 7.4 de Materiales y Métodos). Lamentablemente, la proteína GalR purificada (0,4 mg/ml) era extremadamente lábil, precipitando en un corto periodo de tiempo. Intentos para incrementar la vida media de la proteína utilizando distintos tampones, agentes estabilizantes o concentraciones de imidazol resultaron inútiles, no consiguiéndose en ningún caso superar las 48 h antes de la inactivación de la proteína. Este hecho obligó a la producción y purificación de la proteína GalR cada vez que se realizó un experimento *in vitro* con dicha proteína.

Como etapa previa al estudio de la interacción de la proteína GalR con los promotores *gal*, se abordaron algunos aspectos de la relación entre estructura y función de la proteína reguladora.

4.5.2. Conformación nativa de GalR.

En primer lugar, se determinó la masa molecular de la conformación nativa de la proteína GalR. Para ello, se realizó un análisis de velocidad de sedimentación mediante ultracentrifugación analítica. Este análisis mostró un único pico mayoritario (88.5 % de la proteína total) el cual correspondía a una especie proteica con un coeficiente de sedimentación corregido de $4,39 \pm 0.20$ S (Fig. 63). Aunque la inestabilidad de la proteína hizo imposible realizar experimentos de equilibrio de sedimentación, el coeficiente de sedimentación obtenido es compatible con una especie mayoritaria dimerica de GalR, la cual estaría compuesta por dos subunidades idénticas.

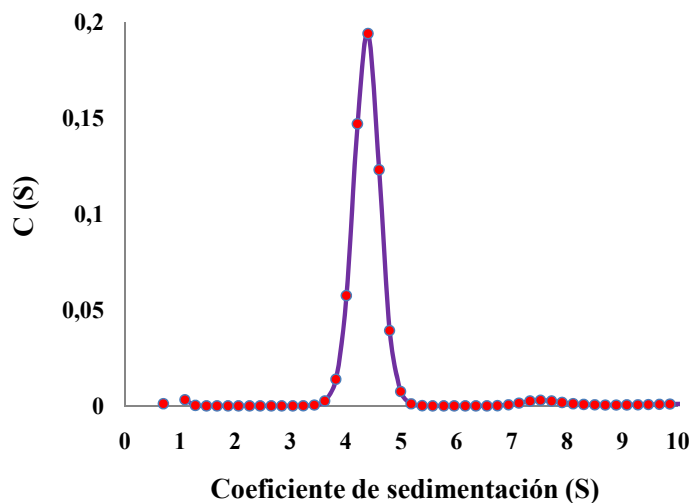


Figura 63. Ultracentrifugación analítica de la proteína GalR. Distribución continua de concentraciones representada frente al coeficiente de sedimentación tras el análisis mediante velocidad de sedimentación en la ultracentrífuga analítica. Las velocidades y condiciones empleadas en los ensayos se detallan en el apartado 14 de Materiales y Métodos.

4.5.3. Predicción de la estructura secundaria y modelado tridimensional de GalR.

Los reguladores de la familia LysR son proteínas de una longitud aproximada de 280 aa, presentando una organización en dos dominios claramente distintos en cuanto a función y estructura. En el dominio N-terminal (DBD, *DNA binding domain*) se localiza un motivo HTH alado de unos 65 aa de longitud altamente conservado entre todos los miembros de la familia y encargado de la unión al DNA diana. El extremo C-terminal constituye el dominio regulador encargado de la unión a la molécula inductora. Ambos dominios están conectados por una larga α -hélice que actúa a modo de *linker*. GalR es

una proteína de 397 aa (Tabla 5), presentando 100 aa más que la mayoría de los reguladores de la familia LysR. Un estudio en detalle de la estructura primaria de GalR y una predicción de su estructura secundaria muestran que, sorprendentemente, GalR no presenta uno sino dos dominios de unión a DNA en su extremo N-terminal (DBD1 y DBD2), además del dominio regulador en el extremo C-terminal (Fig. 64). Basado en la significativa similitud de secuencia (38 % de identidad) que presenta GalR con la proteína CbnR, un regulador de la familia LysR de estructura conocida (PDB 1AL3) e implicado en la degradación del 3-clorobenzoato en la bacteria *Ralstonia eutropha* NH9 (Muraoka *et al.*, 2003), se procedió a la realización de un modelo de la estructura tridimensional de GalR. El dominio DBD2 junto con el dominio de unión a sustrato de GalR fue modelado directamente, teniéndose que modelar por separado el dominio DBD1 e incorporarlo posteriormente al modelo anterior. El modelo completo de GalR se muestra en la figura 64C. Los dominios DBD están compuestos de un motivo globular (HTH) más una larga α -hélice que formaría un *linker* encargado de la interacción entre los dominios DBD ($\alpha 4$, *linker1*) y entre el dominio DBD2 y el de interacción con el sustrato ($\alpha 8$, *linker2*). El motivo estructural HTH alado está formado por tres α -hélices, $\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\alpha 3$, donde las hélices $\alpha 2$ y $\alpha 3$ forman la estructura HTH y el ala estaría formada por el bucle que comparten las cadenas $\beta 1$ y $\beta 2$ en el motivo HTH1, siendo las α -hélices $\alpha 5$, $\alpha 6$ y $\alpha 7$, junto con el bucle entre $\beta 3$ y $\beta 4$, las que formarían el motivo HTH2. Así pues, GalR representa el primer miembro de la amplia familia de reguladores transcripcionales LysR que muestra una duplicación del dominio DBD en su región N-terminal.

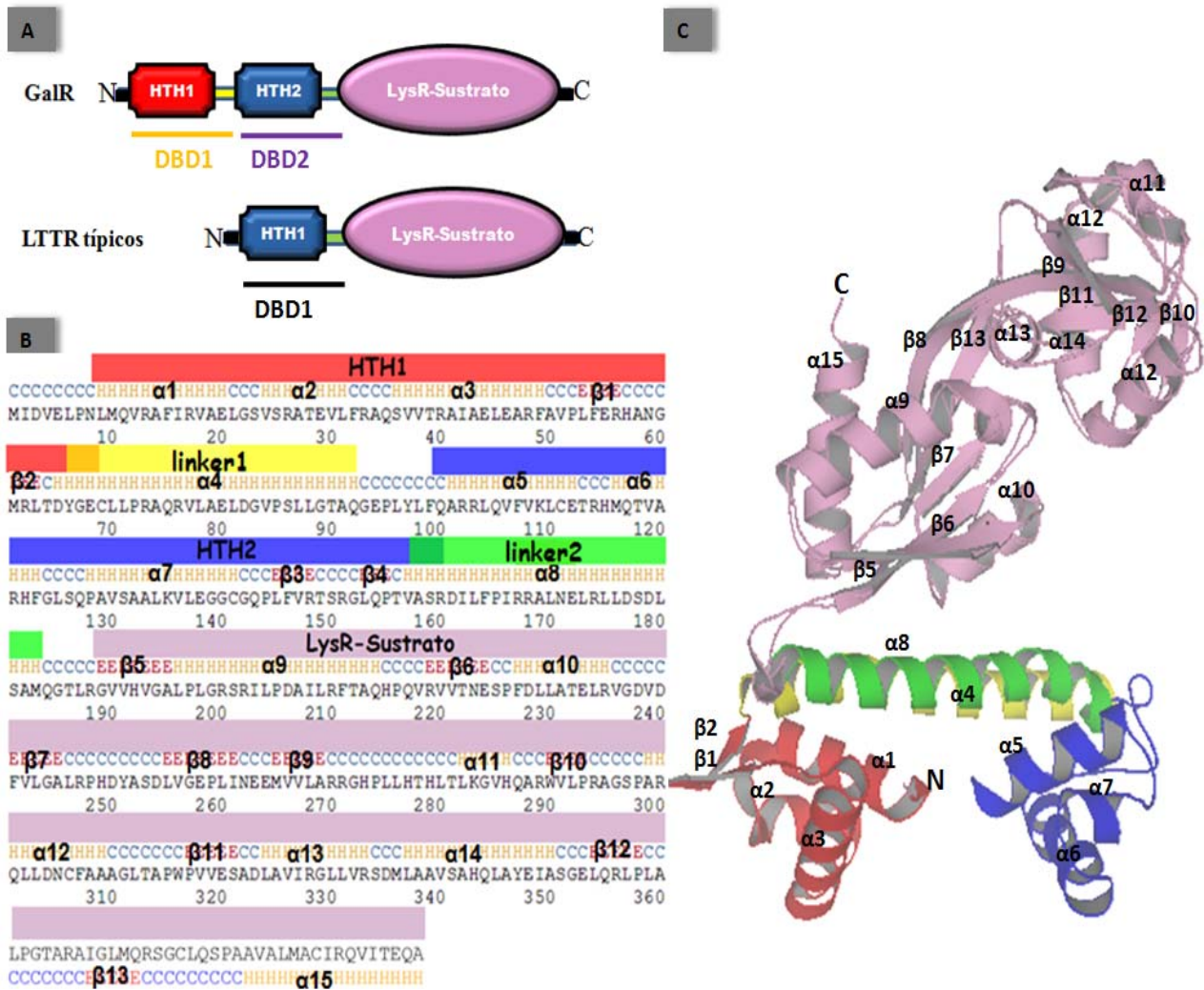


Figura 64. Arquitectura modular, predicción de la estructura secundaria, y modelado tridimensional de la proteína GalR. **A.** Distribución de los dominios de GalR. Se indican en rojo y azul los dos motivos HTH1 y HTH2, respectivamente, y en morado el dominio de unión a sustrato de GalR comparados con el único motivo HTH (azul) y el dominio de unión a sustrato (morado) de los reguladores típicos de la familia LysR. Las regiones *linker1* y *linker2* se muestran en amarillo y verde, respectivamente. Los dos dominios DBD1 y DBD2 de la proteína GalR se muestran subrayados en naranja y morado, respectivamente, indicándose en negro el dominio DBD único de los reguladores de la familia LysR. **B.** Predicción de la estructura secundaria del regulador GalR. Se representan como **C** aquellos residuos predichos con disposición no ordenada (*coiled coil*), como **H** aquellos que son predichos formando parte de una α -hélice, y como **E** aquellos que estarían formando parte de una cadena β . Se enumeran tanto las hélices α como las cadenas β predichas a lo largo de la secuencia. **C.** Predicción de la estructura tridimensional de la proteína GalR tomando como modelo la proteína CbnR. Tanto las hélices α como las cadenas β se encuentran numeradas. La participación de éstas en la formación de los distintos dominios se indica en el código de colores detallado en los paneles A y B. En rojo se muestra el motivo HTH1, en azul el motivo HTH2, siendo amarillo y verde los dos *linkers* que conformarían junto a estos motivos los dominios DBD1 y DBD2, respectivamente. En morado se muestra el dominio de unión a sustrato. El panel C fue generado con el programa PyMol (DeLano, 2002).

4.6. Caracterización *in vitro* de la interacción de GalR con los promotores P_B , P_R y P_T .

Identificados los promotores P_B , P_R y P_T , y disponiendo de la proteína GalR purificada, se procedió al estudio *in vitro* de los promotores *gal* y de la interacción de éstos con la proteína activadora GalR. Como primer abordaje, se analizó si GalR era capaz de unirse a las regiones intergénicas que contienen los promotores *gal*.

4.6.1. Análisis de la interacción de GalR con los promotores P_B , P_R y P_T .

Para confirmar la interacción de la proteína GalR con la región intergénica *galB/galR* y con la región promotora *galT*, se realizaron ensayos de retardo en gel utilizando la proteína GalR purificada y las sondas *PbPr* (223 pb) y *Pt* (498 pb), que comprenden las regiones utilizadas previamente para la identificación de los promotores P_B/P_R y P_T , respectivamente, (Fig. 55, 56)

La adición de cantidades crecientes de la proteína GalR purificada mostró un claro retardo de ambas sondas (Fig. 65, calles 2-6), lo que demuestra que GalR se une directamente a ambas regiones intergénicas. La especificidad de la interacción de la proteína GalR con ambas sondas se confirmó mediante la adición al ensayo de retardo de sonda no marcada radiactivamente, observándose una inhibición del retardo (Fig. 65, calles 8). Por el contrario, la adición de DNA heterólogo no marcado no afectaba a la unión de la proteína GalR a ninguna de las dos sondas (Fig. 66, calles 7).

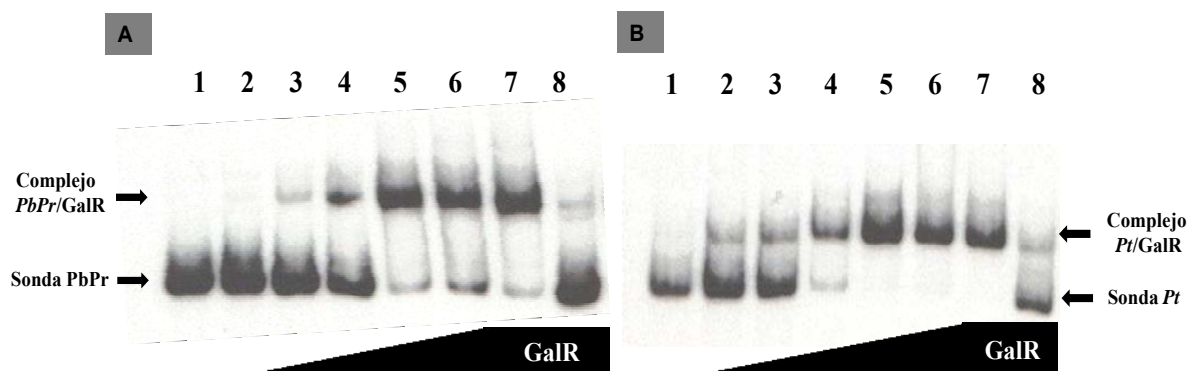


Figura 65. Ensayos de retardo en gel con la proteína GalR purificada sobre las sondas *PbPr* (A) y *Pt* (B). Calles 1, sonda sin proteína. Calles 2-6, concentraciones crecientes de la proteína GalR-His₆ (1, 5, 10, 50 y 100 nM). Calles 7, GalR-His₆ 100 nM y 300 ng de DNA de esperma de salmón. Calles 8, GalR-His₆ 100 nM y sonda no marcada radiactivamente (300 ng). Los ensayos de retardo en gel se realizaron como se indica en el apartado 10.1 de Materiales y Métodos. La localización de las sondas y los complejos sonda/proteína se indican con flechas.

Para comprobar si la proteína GalR respondía *in vitro* al efecto del OMA observado *in vivo*, se realizaron ensayos de retardo en gel incluyendo este compuesto en las reacciones de unión. Si bien el OMA no es indispensable para la interacción de la proteína GalR con la sonda *PbPr*, sí incrementa ligeramente la afinidad del regulador por ésta (Fig. 66).

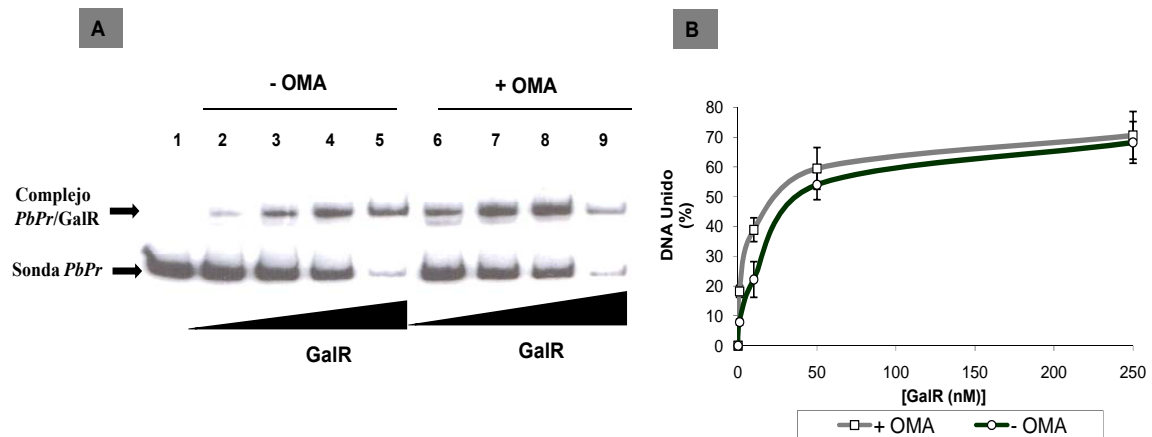


Figura 66. Efecto del OMA en la unión de GalR a la sonda *PbPr*. **A.** Ensayos de retardo en gel con la proteína GalR purificada sobre la sonda *PbPr*. Calle 1, sonda *PbPr* sin proteína; Calles 2-5, concentraciones crecientes de la proteína GalR-His₆ purificada (1, 10, 50 y 250 nM, respectivamente) en ausencia de OMA. Calles 6-9, concentraciones crecientes de la proteína GalR-His₆ purificada (1, 10, 50 y 250 nM, respectivamente) en presencia de OMA 100 μ M. **B.** Cuantificación del efecto producido por el OMA en la unión de GalR a la sonda *PbPr*. Se muestra el porcentaje de sonda unida a la proteína en función de la cantidad de proteína GalR. En gris y negro se muestran los datos obtenidos en presencia y ausencia de OMA, respectivamente. Los datos proceden de la cuantificación del experimento de retardo en gel. Se muestra la media de los valores obtenidos en tres experimentos independientes, indicándose con barras de desviación estándar. En el panel A, se muestra uno de ellos. Los ensayos de retardo en gel se realizaron como se indica en el apartado 10.1 de Materiales y Métodos. El OMA se obtuvo como se indica en el apartado 7.7.1 de Materiales y Métodos.

Los ensayos de retardo en gel en presencia de OMA se utilizaron para determinar la afinidad de GalR por cada una de las regiones promotoras. Los resultados obtenidos mostraron que GalR posee una elevada afinidad por ambas regiones promotoras, con unas *K_d* de 30 y 0,65 nM para las regiones *PbPr* y *Pt*, respectivamente (Fig. 67).

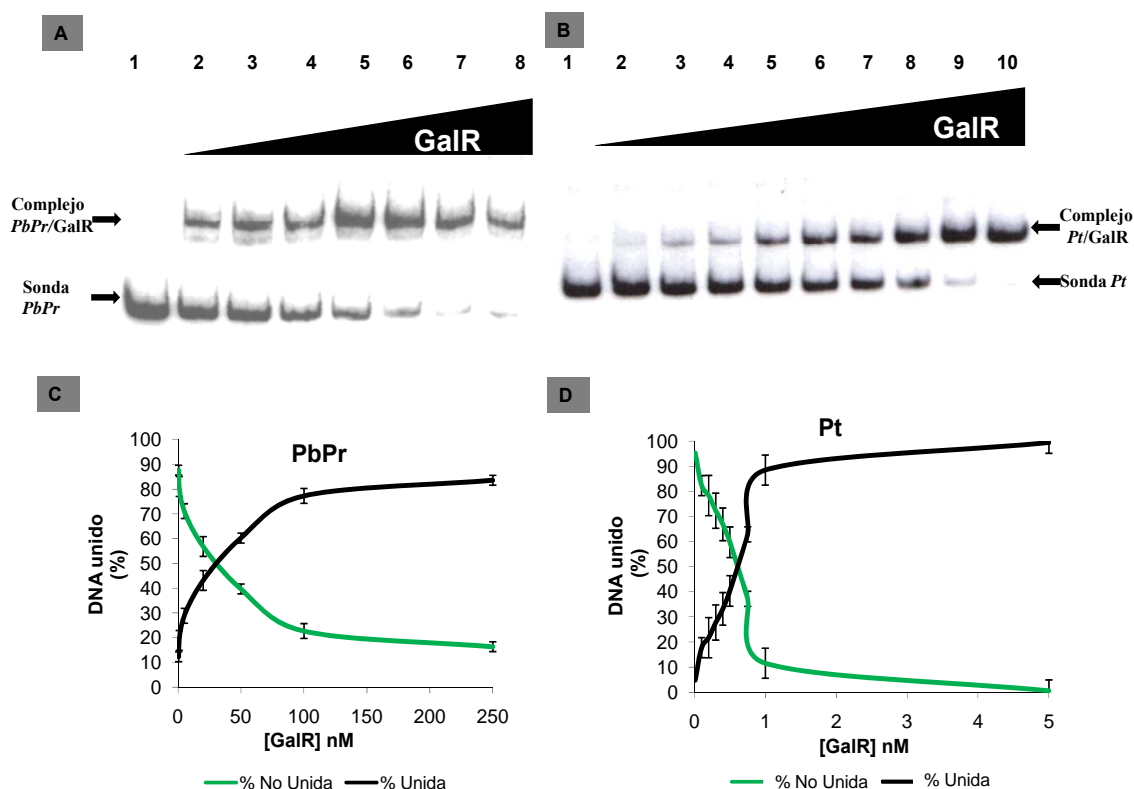


Figura 67. Cálculo de la constante de disociación (k_d) en la unión de GalR a las sondas *PbPr* y *Pt*. A y B. Ensayos de retardo en gel con la proteína GalR purificada sobre las sondas *PbPr* (panel A) y *Pt* (panel B) en presencia de OMA 100 μ M. Las concentraciones de GalR-His₆ empleadas fueron 0, 0,5, 1, 5, 20, 50, 100 y 250 nM (calles 1-8, panel A) y 0, 0,01, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,75, 1 y 5 nM (calles 1-10, panel B). C y D. Cuantificación del porcentaje de sonda unida a GalR en función de la concentración del regulador para las sondas *PbPr* (panel C) y *Pt* (panel D). En los paneles C y D se muestra la media de los valores obtenidos en tres experimentos independientes indicándose con barras la desviación estándar. La localización de las sondas y los complejos sonda/proteína se indican con flechas. Los ensayos de retardo en gel se realizaron como se indica en el apartado 10.1 de Materiales y Métodos.

Cuando se representó el logaritmo de la concentración de GalR frente al logaritmo del porcentaje de DNA unido/ DNA no unido a la proteína, se determinó un coeficiente de Hill de 0,56 y 0,72 para la interacción de GalR con las regiones *PbPr* y *Pt*, respectivamente (Fig. 68). Este parámetro mide el grado de cooperatividad en la unión de un ligando (GalR) a una macromolécula (DNA), y ha sido utilizado habitualmente para determinar el grado de asociación de proteínas reguladoras cuando se encuentran unidas a sus regiones operadoras (Schuster *et al.*, 2004). Como es bien conocido, un valor del coeficiente de Hill menor que uno indica una cooperatividad negativa en la interacción, indicando que una vez unido un dímero de GalR (estado oligomérico en solución) a cada una de las regiones promotoras, se impide la unión de un segundo dímero. Estos resultados sugieren que la forma activa de GalR es un

dímero, en contraposición con el resto de reguladores de su familia estudiados hasta ahora, que son homotetrámeros cuando interactúan con su promotor diana.

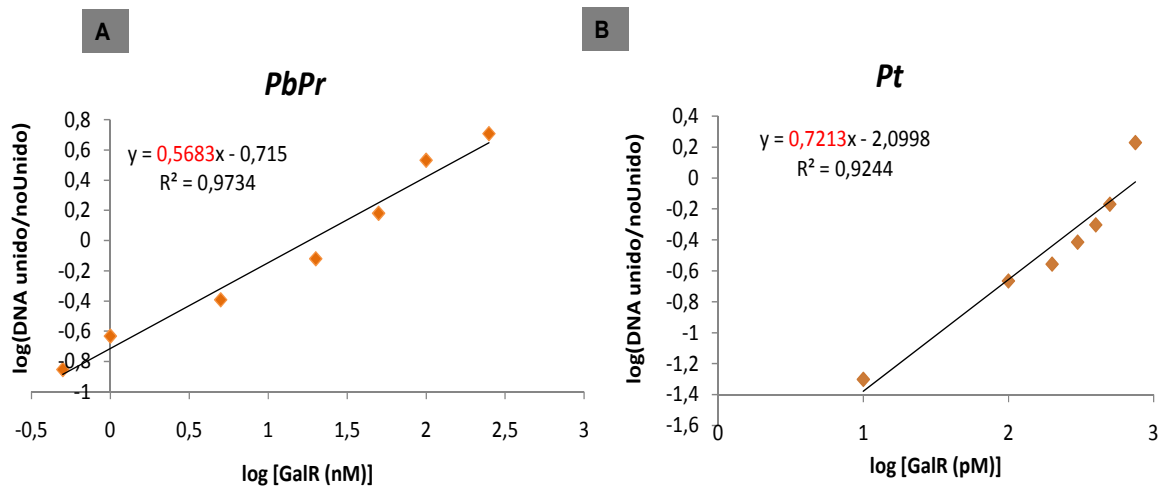


Figura 68. Cálculo del coeficiente de Hill para la unión de la proteína GalR a las sondas *PbPr* (A) y *Pt* (B). Se representa la relación entre el log de la concentración de GalR frente al log del cociente DNA Unido/DNA no unido. La ecuación lineal que relaciona ambos parámetros se indica en cada caso, siendo la pendiente de ésta el coeficiente de Hill. Las gráficas fueron elaboradas con los resultados mostrados en la figura 67. Para la región *Pt* se eliminaron del análisis las concentraciones de GalR 1 y 5 nM.

4.6.2. Determinación del sitio de inicio de la transcripción (+1) de los promotores

P_B, *P_R* y *P_T*.

Una vez confirmada la interacción de GalR con las regiones promotoras *PbPr* y *Pt*, se procedió a conocer las posiciones de inicio (+1) de los RNA transcritos a partir de cada uno de los promotores como paso previo a la localización de las cajas operadoras. Para identificar el inicio de la transcripción de cada uno de los promotores *gal*, se realizaron experimentos de extensión por cebador (*primer extension*). Para ello, se extrajeron los RNA totales de las cepas *P. putida* KTGAL conteniendo los plásmidos *pIZP_B*, *pIZP_R* y *pIZP_T* cultivada en GA (condición de inducción) o en Citrato (condición de no inducción). Estos experimentos mostraron un sitio único de inicio de la transcripción para cada uno de los promotores, i. e., la A, T y G localizadas a 26 pb, 26 pb y 37 pb de los correspondientes codones de inicio de la traducción de los genes *galB*, *galR* y *galT*, respectivamente (Fig. 69). Las presuntas cajas -10 y -35 de interacción con la subunidad σ^{70} de la RNAP también pudieron ser identificadas (Fig. 70)

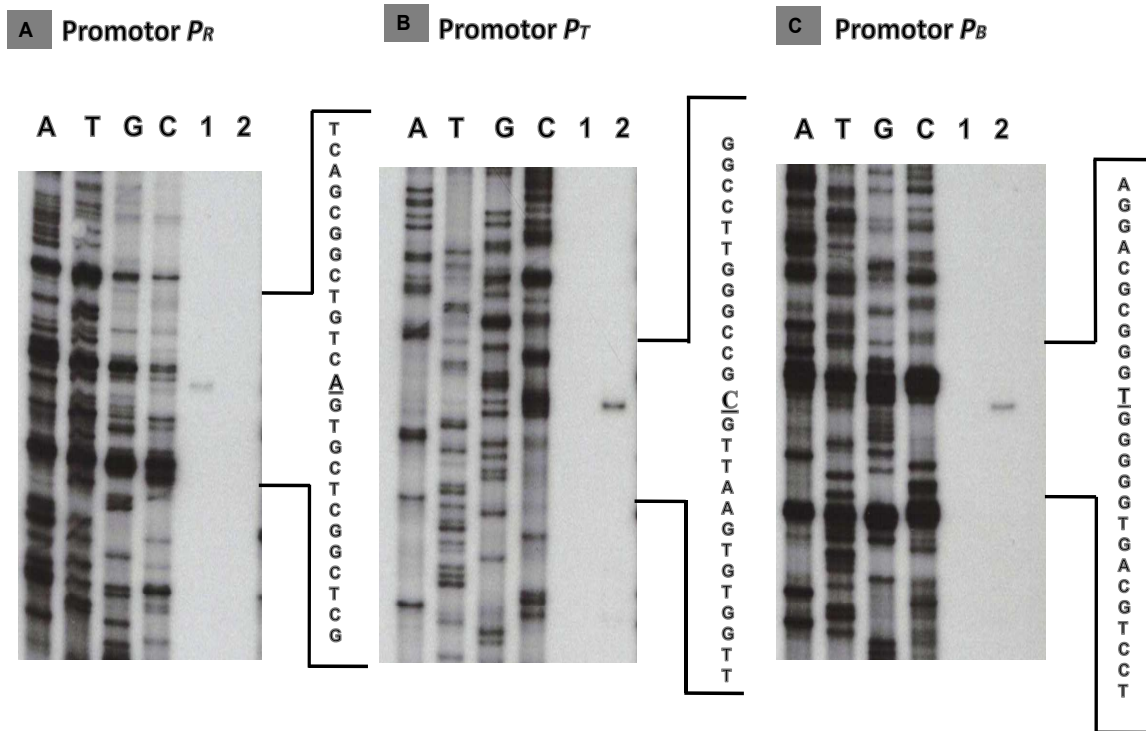


Figura 69. Determinación del sitio de inicio de la transcripción de los promotores P_R (A), P_T (B) y P_B (C). El experimento *de extensión del cebador* se realizó según se detalla en el apartado 6.3 de Materiales y Métodos a partir del RNA total aislado de células de las cepas *P. putida* KTGAL conteniendo los plásmidos $pIZP_R$, $pIZP_T$ y $pIZP_B$, respectivamente. Las células fueron cultivadas en medio MC-citrato 0,2 % (calles 1) o MC-GA 5 mM (calle 2). Se utilizó el oligonucleótido Lac57, el cual hibrida a 57 nt del inicio de traducción del gen *lacZ* (Tabla 4) para producir la extensión. La localización del producto de extensión se determinó comparándolo con el patrón de secuencia de los promotores correspondiente utilizando el mismo oligonucleótido Lac57 (calles A, T, G, C). En el lateral derecho de cada una de las figuras se muestra la secuencia de nucleótidos que flanquea el sitio +1 (subrayado), de la hebra no codificante.

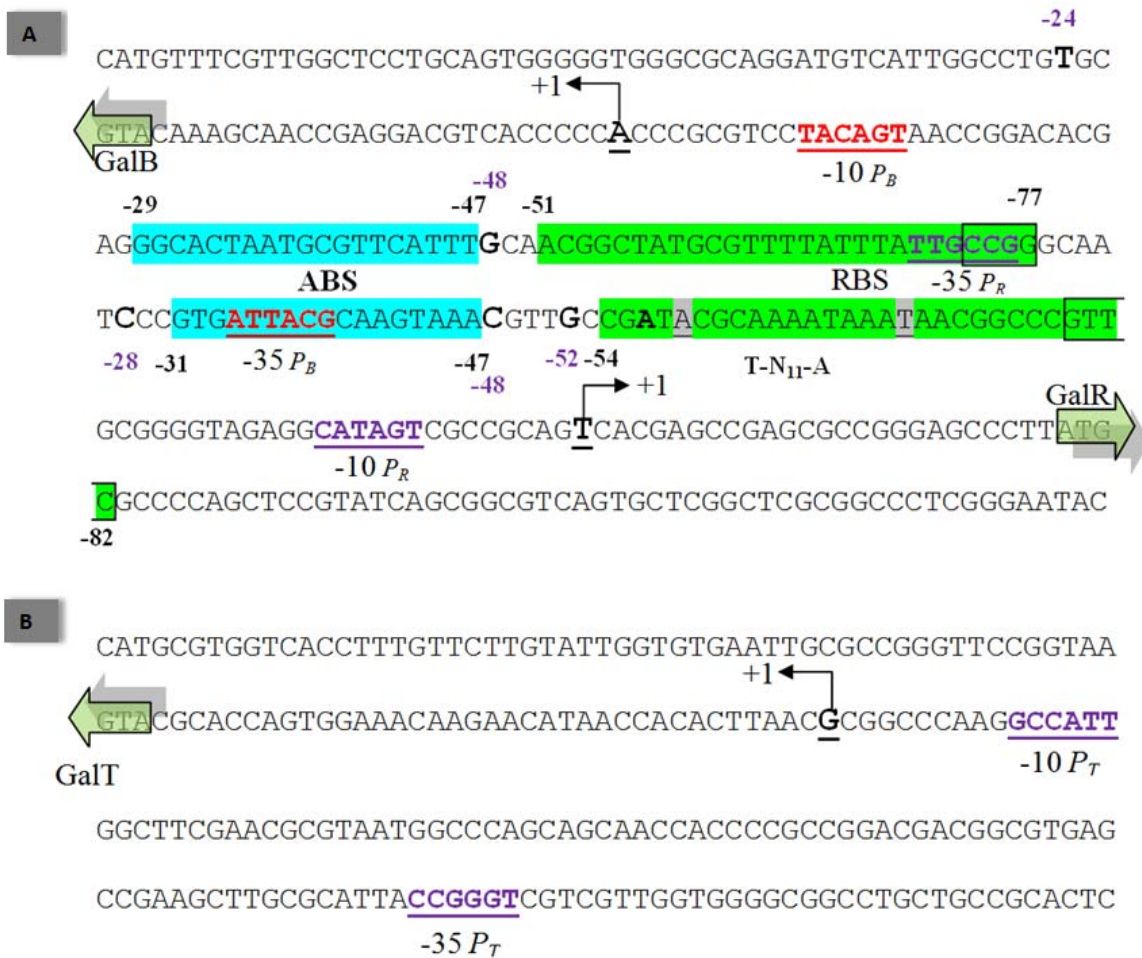


Figura 70. Esquema general de las regiones intergénicas *gal*. **A. Elementos reguladores identificados en la región intergénica *galB-galR*.** Las posiciones se indican con respecto al inicio de la transcripción del promotor P_B . Se muestran sombreadas en verde y azul las regiones RBS y ABS en ambas hebras, respectivamente, recuadrándose las bases del RBS que dejan de protegerse en presencia de OMA. Las bases que componen el motivo T-N₁₁-A se muestran sombreadas de gris dentro de la región RBS. El inicio de la transcripción para ambos promotores se indica mediante flechas y la base que ocupa esa posición subrayada, en negrita y con un tamaño de letra mayor. Las posiciones de hipersensibilidad a la DNasaI se muestran con un tamaño de letra mayor indicándose su posición en morado. Los codones de inicio de las proteínas *GalB* y *GalR* se indican mediante flechas verdes. Las cajas -10 y -35 de los promotores P_B y P_R se indican en la hebra codificante correspondiente en rojo y morado, respectivamente. **B.** Elementos reguladores identificados en el regulador P_T . Se muestra el inicio de transcripción del promotor P_T indicado mediante una flecha y las hipotéticas cajas -10 y -35 en morado y subrayadas. El codón de inicio de la proteína *GalT* se indica mediante una flecha verde.

4.6.3. Determinación de las regiones operadoras de *GalR* en la región promotora *PbPr*.

La interacción de los reguladores *LysR* con la región promotora reguladora ocurre en dos regiones diferentes, i. e., RBS (*repressor binding site*) que contiene la secuencia consenso T-N₁₁-A y ABS (*activator binding site*). Para definir la zona de

unión de GalR a la región intergénica *galB/galR* se llevó a cabo un ensayo de protección de la sonda *PbPr* a la digestión con DNasaI (Fig. 71). El resultado reveló que GalR protege en la hebra codificante de *galB* una región de 29 nucleótidos, localizados entre la posición -54 y -82 respecto al sitio +1 del promotor P_B (Fig. 71A, calles 3-5) conteniendo el motivo de unión consenso de reguladores de la familia LysR (T-N₁₁-A), y tratándose por lo tanto de la región RBS del promotor P_B (Fig. 70). No se encontró protegida la región del supuesto ABS, lo que sugería que GalR necesitaría de la presencia de la molécula inductora para unirse a esta segunda región. Para identificar la región del ABS del promotor P_B , se realizó un nuevo experimento de protección frente a la DNasaI sobre la sonda *PbPr* añadiendo concentraciones crecientes de OMA y fijando la concentración de GalR a 100 nM. Los resultados muestran la aparición de una nueva región protegida a medida que se aumenta la concentración de OMA (Fig. 71A, calles 6-8). Esta región se extiende desde la posición -31 hasta la posición -47, solapando la caja -35 del promotor P_B (Fig. 70). Las regiones protegidas en la hebra no codificante del gen *galB* son similares, localizándose el RBS entre las posición -51 y -77 y el ABS entre la posición -29 y -47 con respecto al sitio +1 del promotor P_B (Figs. 70 y 71B). La unión de GalR al ABS, ocasiona ligeros cambios en la región protegida correspondiente al RBS, debido probablemente al desplazamiento que esta proteína debe sufrir para poder unirse al ABS en presencia de OMA (Fig. 71). Interesantemente, al no aparecer bandas de hipersensibilidad en presencia de GalR, y sólo aparecer cuando además de GalR se encuentra presente OMA (Fig. 71), sugiere que la recolocación de GalR en presencia de OMA para unirse al ABS ocasiona un cambio en la curvatura del DNA exponiendo estas zonas a la DNasaI (Fig. 70 y 71).

4.6.4. Estudio de la interacción de la RNAP con la región promotora *PbPr*.

Experimentos de retardo en gel utilizando la sonda *PbPr* y RNAP de *E. coli* confirmaron que ésta era capaz de unirse a la sonda en ausencia del regulador GalR, (resultados no mostrados). Para identificar las regiones a las que se une la RNAP en la sonda *PbPr* y para determinar su interacción con la proteína reguladora GalR en los promotores P_B y P_R se realizó un experimento de protección de las dos hebras marcadas frente a la digestión con DNasaI. La adición de concentraciones crecientes de RNAP confirma los resultados observados en los experimentos de retardo en gel y muestra claramente que la RNAP de *E. coli* se une a la sonda *PbPr* aún en ausencia de GalR,

generando una larga huella de protección que es especialmente patente en torno a las regiones -35 y -10 de los promotores P_B y P_R (Fig. 71 calles 9-11).

Cuando la sonda $PbPr$ se incuba con RNAP y GalR previamente a la digestión con la DNasaI (Fig. 71, calles 12), se observa desaparición de la protección de ambas hebras atribuida a la RNAP, sugiriendo que GalR es capaz de inhibir la interacción de la RNAP con ambos promotores. Además, la protección de ambas hebras debida a la unión de GalR al RBS no es tan evidente en presencia de RNAP (compárese las calles 5 y 12 de Fig. 71). Estos resultados sugieren que si bien GalR y RNAP son capaces de unirse por sí solas a los promotores P_B y P_R , cuando ambas proteínas están presentes se establece una competición entre ellas que dificulta su interacción eficaz con los promotores, si bien GalR todavía mantiene parcialmente su capacidad de unirse a la región RBS y desplazar a la RNAP. En presencia de OMA esta competición entre GalR y RNAP cambia a un interesante sinergismo en su unión a la región promotora P_B . Así, concentraciones crecientes de OMA (Fig. 71, calles 13-15) originan la aparición simultánea de las regiones protegidas individualmente por GalR (RBS y ABS) y por RNAP (cajas -35 y -10), haciéndose muy intensa la banda de hipersensibilidad en la posición -48 del promotor P_B y observable en ambas hebras. Además, la protección debida a la unión de la RNAP alrededor de las regiones -35 y -10 del promotor P_B es más intensa que la observada utilizando únicamente RNAP, lo que sugiere que GalR en presencia de OMA facilita la unión de la RNAP al promotor P_B resultando en una mayor protección frente a la acción de la DNasaI. Sin embargo, y en contraposición a lo que ocurre con el promotor P_B , la adición de OMA no permite recuperar la protección debida a la interacción de la RNAP con el promotor P_R , especialmente en la región -10 y +1 (Fig. 71, calles 13-15).

Todos los resultados obtenidos con la técnica de protección a la digestión con DNasaI se resumen en la figura 70 y revelan un complejo mecanismo de regulación para los promotores divergentes P_B y P_R que comparten las regiones operadoras RBS y ABS de interacción con el regulador GalR (Fig. 89).

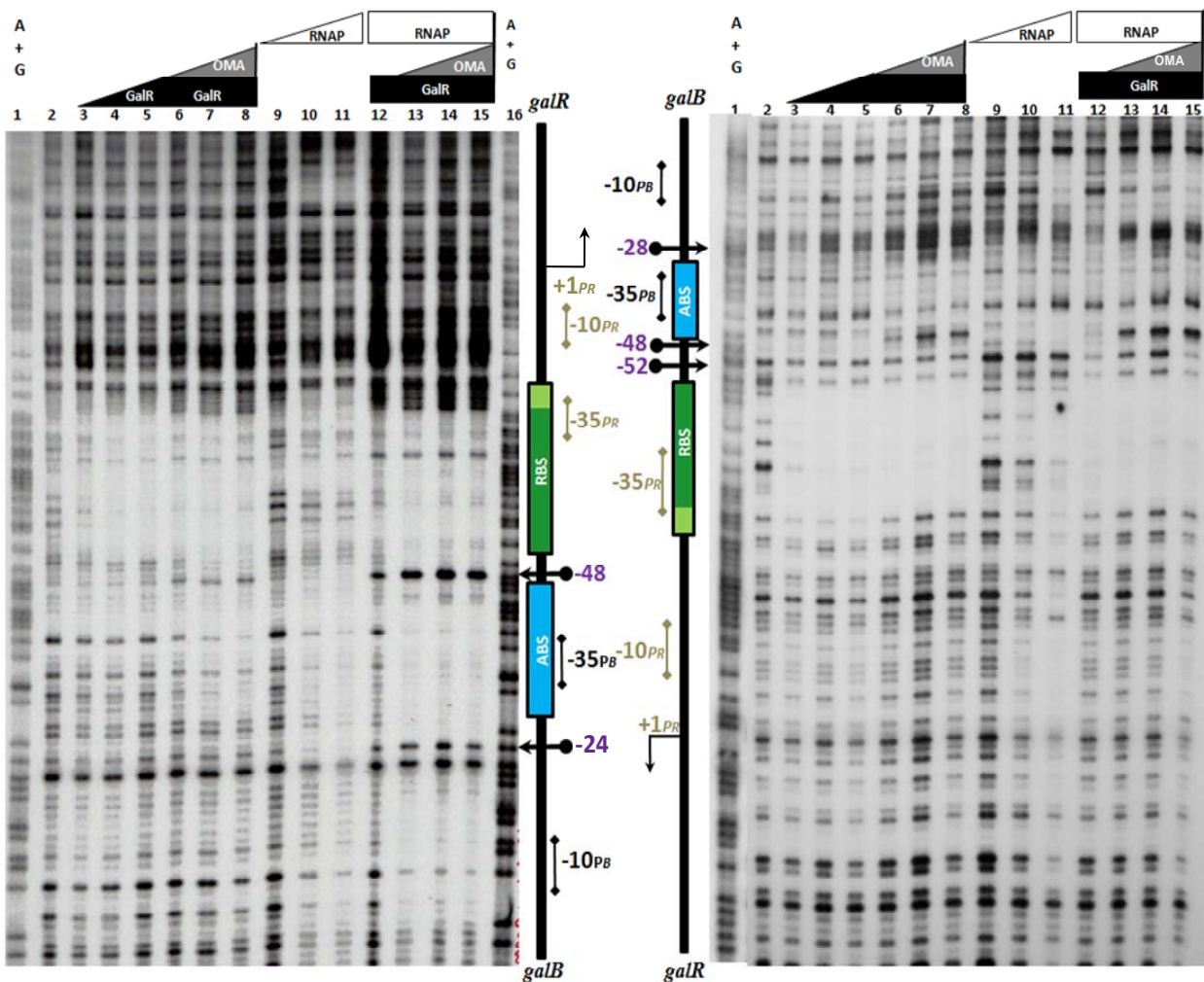


Figura 71. Identificación de los sitios de unión de la proteína GalR y la RNAP a la región promotora *PbPr* mediante experimentos de protección frente a la digestión con DNasaI. A. Experimento realizado con la hebra codificante de *galB* marcada en su extremo 3'. B. Experimento realizado con la hebra no codificante de *galB* marcada en su extremo 3'. Las concentraciones crecientes de la proteína GalR utilizadas fueron 25, 50 y 100 nM (calles 3-5). Se fijó la concentración de GalR a 100 nM en los experimentos en los cuales OMA o RNAP fueron añadidas al ensayo. Las concentraciones de OMA crecientes fueron 50, 100, 250 μ M (calles 6-8 y calles 13-15). Las concentraciones de RNAP añadidas al ensayo fueron 10, 50 y 100 nM (calles 9-11), utilizándose esta última concentración en las calles 12-15. Las calles 1 y 16 marcadas como A+G muestran la reacción de secuenciación de la sonda *PbPr* por el método de Maxam y Gilbert. Las calles 2 muestran la sonda *PbPr* digerida por la DNasaI en ausencia de GalR. Las secuencias protegidas RBS y ABS se indican en verde y azul, respectivamente, indicándose con un verde más claro la región de RBS que deja de protegerse en presencia de OMA. Las bandas de hipersensibilidad a la digestión con la DNasaI se indican mediante flechas en la figura, indicándose su posición en morado. Las cajas -10 y -35 se muestran, en negro para el promotor *P_B* y en gris para el promotor *P_R*. El inicio de la transcripción (+1) del promotor *P_R*, se indica mediante una flecha curvada.

4.6.5. Estudio *in vitro* de la actividad de los promotores P_B y P_R .

Los estudios realizados *in vivo* sobre la actividad de los promotores P_B y P_R utilizando fusiones al gen reportero *lacZ* habían demostrado que el promotor catabólico P_B necesitaba ser activado por la proteína GalR en presencia de OMA. Por el contrario, el promotor del gen regulador (P_R), está controlado negativamente por la propia proteína GalR y su activación es independiente de OMA (Fig. 57). Con objeto de demostrar que GalR y OMA no sólo son necesarios sino suficientes para llevar a cabo la activación de P_B y la represión de P_R , se llevó a cabo un experimento de transcripción *in vitro* a partir de los citados promotores. Para ello, la región promotora $PbPr$ fue subclonada como un fragmento *Bam*HI desde el plásmido pSJ3 $P_B P_R$ (Fig. 55) en el plásmido pJCD01 (Tabla 3). El plásmido resultante pJCD $P_B P_R$ (Tabla 3), contiene los promotores P_B y P_R transcribiendo dos mRNA de 120 nt y 154 nt, respectivamente.

Los resultados mostrados en la figura 72A demuestran que el promotor P_R produce un transcrito del tamaño esperado en ausencia de GalR, inhibiéndose su actividad en presencia de concentraciones crecientes de esta proteína reguladora. Por el contrario, en el caso del promotor P_B la adición creciente de OMA en presencia de GalR se traduce en un aumento en la cantidad de transcrito (Fig. 72B). Por otro lado, la adición de OMA no revierte la represión del promotor P_R debida a GalR (Fig. 72B). En conclusión, estos resultados confirman *in vitro* la actividad de los promotores P_B y P_R observada *in vivo*, sugiriendo que GalR/OMA y la RNAP son los únicos elementos reguladores necesarios para el control de dichos promotores.

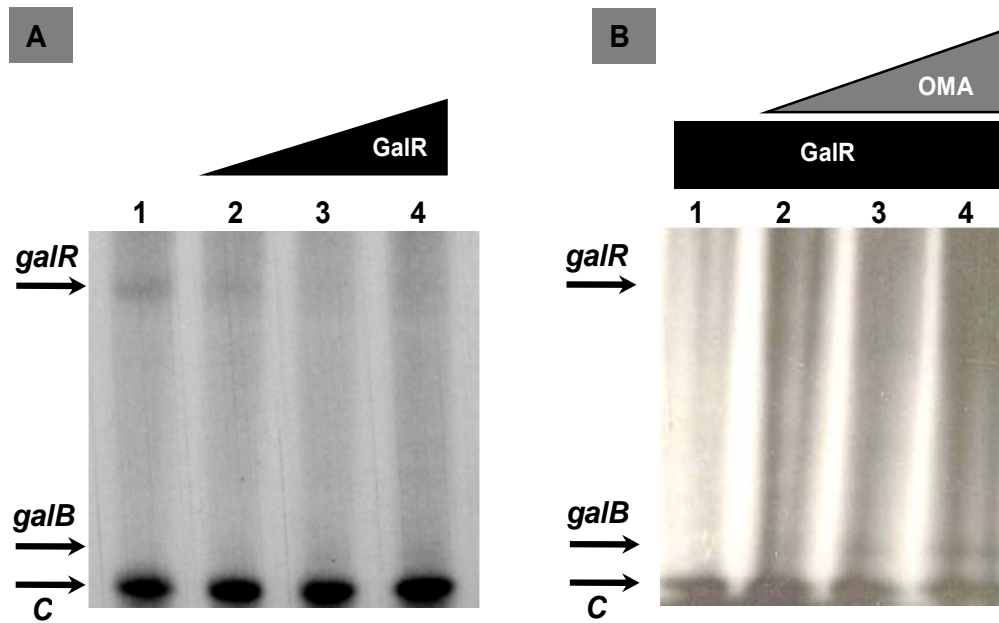


Figura 72. Experimento de transcripción *in vitro* de los promotores P_B y P_R . Los ensayos de transcripción *in vitro* se realizaron como se indica en el apartado 10.3 de Materiales y Métodos. En todos los casos se utilizó RNAP (100 nM) y el plásmido pJCD $P_B P_R$. **A.** Calles 1, 2, 3 y 4 transcripción en presencia de 0, 25, 50 y 100 nM de proteína GalR-His₆ purificada, respectivamente. **B.** Calles 1, 2, 3 y 4, transcripción producida por la adición de GalR-His₆ 100 nM y concentraciones crecientes de OMA (0, 50, 100 y 250 μM), respectivamente. El transcrito producido a partir del promotor P_R (*galR*) y P_B (*galB*) se indica con una flecha. El mRNA control de 105 nt del plásmido pJCD01 (C) también se indica con una flecha.

V. DISCUSIÓN.

1. Identificación y caracterización de los genes gal catabólicos implicados en la degradación de GA en *P. putida*.

El análisis *in silico* del genoma de *P. putida* KT2440 reveló la existencia de un agrupamiento de 7 genes, *cluster gal* (*galBCDgalRgalTAP*), localizado entre las posiciones 2860-2868 kb del cromosoma de dicha bacteria (Figs. 5 y 10), y presuntamente implicado en el catabolismo de compuestos aromáticos (Tabla 5). La realización de una serie de experimentos cuyos resultados se indican a continuación revelaron que los genes *gal* eran necesarios y suficientes para la mineralización de GA en *P. putida*: i) el gen *galA* se induce específicamente cuando *P. putida* KT2440 se cultiva en presencia de GA (Fig. 11); ii) la adaptación de *P. putida* KT2440 a la utilización de GA como única fuente de carbono y energía permitió la selección de la cepa *P. putida* KTGAL (Fig. 12) que contiene un gen *galT* desprovisto de un nucleótido (la citosina que ocupa la posición 2867088 del genoma de *P. putida* KT2440) que ocasiona un cambio de fase de lectura en el gen *galT** de la cepa KT2440 (Fig. 13); iii) la construcción de mutantes de *P. putida* KTGAL en distintos genes *gal* supuso la incapacidad para la mayor parte de éstos de utilizar GA como fuente de carbono (Tabla 6); iv) la clonación del *cluster gal* en un plásmido promiscuo (pGAL) confería la capacidad de degradar GA a las cepas *P. putida* KTGAL mutantes en los genes *gal*, así como a otras bacterias del mismo género (*Pseudomonas* sp. MT14) o de otros géneros (*E. coli* W), incapaces de utilizar este compuesto como única fuente de carbono (Fig. 16).

El hecho de que el GA se oxide fácilmente y polimerice generando compuestos que no pueden utilizarse como fuente de carbono, explica que hasta la fecha no se haya descrito en la literatura, con excepción de un único trabajo (Chowdhury *et al.*, 2004), el cultivo aeróbico de microorganismos utilizando GA como única fuente de carbono y energía. La gran mayoría de los microorganismos capaces de degradar GA se han aislado y cultivado en compuestos, e. g., siringato, taninos, etc., que generan GA durante su degradación (Tack *et al.*, 1972b; Sparnins y Dagley, 1975; Franco *et al.*, 2005; Mingshu *et al.*, 2006; Masai *et al.*, 2007). Sin embargo, el medio de cultivo desarrollado en esta tesis, medio mínimo MC pH 6,5 conteniendo L-cisteína 2 mM, permite el crecimiento de distintos microorganismos utilizando GA como única fuente de carbono y energía y, por ello, será de gran utilidad para el aislamiento y estudio de nuevos microorganismos degradadores de GA en condiciones aeróbicas.

Los genes *gal* presentan un porcentaje G+C medio de 65,1 %, ligeramente superior al porcentaje G+C medio (61,5 %) del genoma de *P. putida* KT2440 (Nelson *et al.*, 2002). Esta observación, junto con el hecho de que el gen PP_2522, el cual codifica una presunta transposasa de la familia ISPpu8, se encuentre adyacente al extremo 3' del *cluster gal*, interrumpiendo un gen que codifica una posible glutaminasa (PP_2521 y PP_2523), parece sugerir que los genes *gal* podrían ser el resultado de una reciente adquisición del genoma de esta bacteria vía transferencia horizontal. Una composición atípica de la frecuencia de oligonucleótidos o del contenido G+C de una región genómica indica que este DNA, denominado isla genómica, ha sido sometido a presiones evolutivas distintas a las que operan en la bacteria huésped indicando, por tanto, que estas islas pudieron ser adquiridas en el transcurso de la evolución de otro organismo distinto. En este sentido, parte del *cluster gal* (genes *galBCD*) constituye el extremo 3' de la isla genómica 46, la cual se extiende desde la posición 2.831.000 pb a 2.862.000 pb del cromosoma de *P. putida* KT2440 conteniendo un total de 32 ORFs, entre las que se encuentran también varias agrupaciones de oxidorreductasas, proteínas de reparación de DNA, reguladores y proteínas fágicas, así como distintas integrasas (Weinel *et al.*, 2002). Todos estos datos tomados en su conjunto parecen sugerir que el *cluster gal* de *P. putida* proviene de otra especie bacteriana vía transferencia horizontal. Dado que el *cluster gal* sólo está presente, dentro del género *Pseudomonas* en la especie *P. putida*, su adquisición por parte de esta especie muy probablemente ha sido posterior al proceso de especiación dentro del género *Pseudomonas*.

Finalmente, la construcción de una casete génica conteniendo los genes *gal* que confiere la capacidad de degradar GA a especies de distintos géneros bacterianos (Fig. 16), permite utilizarla como una herramienta biotecnológica de gran interés para expandir la capacidad de degradar GA a distintos biocatalizadores de relevancia medioambiental.

Mediante abordajes genéticos y bioquímicos se han analizado los 7 genes *gal* y sus correspondientes productos génicos. A continuación se exponen y discuten los resultados obtenidos y la implicación de los genes *gal* catabólicos en la ruta de degradación de GA en *P. putida*

1.1. La galato dioxigenasa GalA es el prototipo de un nuevo subgrupo de extradiol dioxigenasas.

Como se indicó en el apartado 5 de Introducción, en *P. putida* se había descrito que la primera etapa de la degradación de GA es la apertura del anillo aromático por la acción de una extradiol dioxigenasa (Tack *et al.*, 1972b) (Fig. 7). En este trabajo pionero también se establecieron las bases de la ruta bioquímica de degradación aeróbica de GA, identificándose ésta como una ruta de rotura meta, al demostrarse la formación de un mol de piruvato y otro de oxalacetato a partir de un mol de GA. Aunque en este primer trabajo se determinó que la dioxigenasa de apertura de anillo utilizaba Fe^{2+} como cofactor para la catálisis, ya que su actividad se veía completamente inhibida cuando se trataban los extractos celulares con α, α' -dipiridil 1 mM, la pérdida de actividad galato dioxigenasa durante el fraccionamiento del extracto celular, achacado a la naturaleza extremadamente lábil de la proteína, no permitieron su purificación y caracterización bioquímica (Tack *et al.*, 1972b). En esta tesis se demuestra que el gen *galA* de *P. putida* codifica la primera galato dioxigenasa de estructura primaria conocida que se ha descrito en un organismo (Nogales *et al.*, 2005), si bien casi simultáneamente a la publicación de este trabajo se describió una segunda galato dioxigenasa (DesB) en *S. paucimobilis* SYK-6 (Kasai *et al.*, 2005).

Para determinar de forma inequívoca el producto de la reacción catalizada por GalA y estudiar las características bioquímicas de esta proteína, la enzima GalA se purificó de la cepa hiperproductora *E. coli* BL21 (DE3) que contenía el gen *galA* clonado en el plásmido pETGalA (Fig. 18), lo que permitía descartar cualquier tipo de contaminación en la preparación de GalA con otra enzima de *P. putida* relacionada con el metabolismo del GA.

Los experimentos realizados midiendo consumo de oxígeno utilizando la proteína GalA purificada revelaron que la estequiometría de la reacción es de un mol de O_2 consumido por mol de GA utilizado (Fig. 19). La dependencia que presentaba GalA por el ión Fe^{2+} se puso de manifiesto por la inhibición de la actividad enzimática en presencia de agentes quelantes tales como EDTA o α, α' -dipiridil (Fig. 20). Igualmente, la actividad dioxigenasa fue inhibida por la adición de agentes oxidantes tales como H_2O_2 , y se recobraba nuevamente tras la adición de agentes reductores tales como el ascorbato (Fig. 20), al igual que ocurre con otras extradiol dioxigenasas (Vaillancourt *et*

al., 2004), incluyendo la galato dioxigenasa DesB de *S. paucimobilis* SYK-6 (Kasai *et al.*, 2005). Estos resultados indicaban que GalA es también una extradiol dioxigenasa.

La enzima muestra una alta especificidad de sustrato, dado que de todos los sustratos aromáticos testados, incluyendo compuestos dihidroxilados (catecol protocatecuato, resorcinol, gentisato o hidroquinona), trihidroxilados (galato o pirogalol), y metoxilados (siringato, metil-galato), únicamente se detectó actividad dioxigenasa utilizando GA como sustrato.

Es interesante el hecho de que GalA no reconozca protocatecuato como sustrato ya que la enzima que inicia la degradación vía rotura *meta* del protocatecuato en *S. paucimobilis* (protocatecuato 4,5-dioxigenasa, LigAB) sí es capaz de utilizar GA como sustrato si bien, la catálisis es mucho menos eficiente que cuando utiliza protocatecuato (Tabla 11) (Kasai *et al.*, 2005). La rotura del anillo aromático de GA por la protocatecuato 3,4-dioxigenasa, una intradiol dioxigenasa, también se ha descrito previamente en ensayos *in vitro*, si bien en este caso no se genera OMA sino PDC como producto de la reacción (Zabinski *et al.*, 1972; Kersten *et al.*, 1982). Adicionalmente, la enzima *O*-metil-galato dioxigenasa (DesZ), de la ruta de degradación de siringato vía *O*-metil-galato de *S. paucimobilis* SYK-6 es capaz de romper igualmente el anillo aromático de GA (Kasai *et al.*, 2004). Como se ha indicado anteriormente en el transcurso de esta tesis se ha descrito una tercera extradiol dioxigenasa en *S. paucimobilis* SYK-6 (DesB) que actúa específicamente sobre GA para producir OMA siendo así el ortólogo de GalA de *P. putida* (Kasai *et al.*, 2005).

La proteína GalA purificada presenta una K_m y $V_{m\acute{a}x}$ de 144 μM y 53,2 $\mu\text{moles}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg prote\acute{i}na}^{-1}$ (Fig. 20), respectivamente. Si se comparan las constantes cinéticas de la proteína GalA con las correspondientes a las distintas extradiol dioxigenasas que utilizan GA identificadas en *S. paucimobilis* (Tabla 11), queda patente que éstas son mucho más parecidas a las de la proteína DesB, identificada como la auténtica galato dioxigenasa en esta bacteria, que a las de las dioxigenasas DesZ (*O*-metilgalato-dioxigenasa) o LigAB (protocatecuato 4,5-dioxigenasa). La proteína GalA muestra la actividad máxima a una temperatura de 30 °C y a un pH de 7,0, valores que están en consonancia con los descritos para otras extradiol dioxigenasas de *Pseudomonas* y para la otra galato dioxigenasa, DesB, descrita hasta la fecha (Harpel y Lipscomb, 1990a; Kasai *et al.*, 2005; Jiménez *et al.*, 2008). Estas características cinéticas sugieren que la proteína GalA es la extradiol dioxigenasa identificada por Tack

y colaboradores, ya que esa dioxigenasa era igualmente específica para GA y no utilizaba protocatecuato como sustrato (Tack *et al.*, 1972b).

Tabla 11. Comparación de las constantes catalíticas de diferentes extradiol dioxigenasas que actúan sobre GA.

Enzima	$V_{\text{máx}}$ ($\mu\text{moles} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}$ proteína^{-1})	K_m (μM)	$V_{\text{máx}}/K_m$
GalA	53,2	144	0.37
DesB*	42,7	66.9	0.64
DesZ*	2,75	371	0.0074
LigAB*	15	381	0.029

*Dioxigenasas de *S. paucimobilis* SYK-6, tomado de Kasai *et al.*, (2005).

Para identificar el producto de la reacción catalizada por GalA, éste se analizó por técnicas de RMN y de espectroscopía de masas (Figs. 22 y 23) concluyéndose, como se había sugerido anteriormente (Tack *et al.*, 1972b), que es el mismo producto (OMA) que el generado por la acción de la enzima protocatecuato 4,5-dioxigenasa sobre GA. No obstante, si bien hasta ahora las tres formas tautoméricas del OMA habían sido consideradas como el producto de apertura del GA mediado por una extradiol dioxigenasa (Tack *et al.*, 1972b; Kersten *et al.*, 1982; Kasai *et al.*, 2005), el empleo de RMN ha permitido identificar, por primera vez, a la forma ceto del OMA como el producto directo de la rotura *meta* del anillo bencénico del GA (Fig. 22). Es importante hacer notar que si bien el OMA puede ser considerado como el resultado de una rotura intradiol del GA, la dependencia de GalA por Fe^{2+} indica que se trata de una reacción catalizada por una extradiol dioxigenasa.

Como se ha indicado en el apartado 2.2.2 de Introducción, se han descrito cuatro familias (Tipos) principales de extradiol dioxigenasas atendiendo a su origen evolutivo (Tabla 1). No obstante, a pesar de la diversidad filogenética de las extradiol dioxigenasas, todas ellas poseen un motivo conservado responsable de la catálisis, compuesto por dos histidinas y un grupo carboxilato (tríada facial) (Hegg y Que, 1997; Que, 2000). Este motivo estructural se encuentra presente en una gran variedad de enzimas que participan en diferentes procesos biológicos y todas ellas requieren un ión divalente metálico, generalmente Fe (II), que no se encuentra asociado a grupos hemo. El centro activo de la enzima contiene el Fe (II) ligado a las dos histidinas y al grupo carboxilato que ocupan una de las caras de la esfera de coordinación, lo que permite que existan hasta otros tres sitios de la esfera de coordinación del metal para ligar moléculas del solvente o del sustrato. En el mecanismo de catálisis, la molécula de oxígeno y el

sustrato se unen al Fe (II) de modo que la proximidad entre ambos permite la incorporación de los átomos de oxígeno al sustrato y la ruptura del anillo aromático. (Hegg y Que, 1997; Que, 2000; Vaillancourt *et al.*, 2004).

Las extradiol dioxigenasas de Tipo II son enzimas que presentan una baja similitud de secuencia entre sí, no agrupándose en una superfamilia determinada. En este grupo se incluyen enzimas como las 2,3-dihidroxifenilpropionato 1,2-dioxigenasas, e. g., MhpB de *E. coli* (Spence *et al.*, 1996), las 2-aminofenol 1,6-dioxigenasas, e. g., AmnAB de *P. pseudoalcaligenes* JS45 (Davis *et al.*, 1999), las protocatecuato 4,5-dioxigenasas, e. g., LigAB de *S. paucimobilis* SYK-6 (Sugimoto *et al.*, 1999) (Fig. 75), y algunas otras con una afiliación menos clara como la homoprotocatecuato 2,3-dioxigenasa (HpaD) de *E. coli* W (Prieto *et al.*, 1996) o la catecol 2,3-dioxigenasa (Mpcl) de *R. eutropha* JMP222 (Kabisch y Fortnagel, 1990), entre otras (Fig. 73).

El análisis de la secuencia de GalA mostró una similitud significativa con la estructura primaria de las protocatecuato 4,5 dioxigenasas (Tabla 5). El estudio en detalle del alineamiento de secuencias mostró que el extremo N-terminal de GalA (residuos 1-281) mostraba una identidad significativa (40%-44%) con la subunidad (β) de las protocatecuato 4,5-dioxigenasas, FldU, ProOb, PmdB y LigB (Fig. 24). Por otra parte, el extremo C-terminal de GalA (residuos 294-420) presenta homología con las correspondientes subunidades pequeñas (α) de las protocatecuato 4,5-dioxigenasas (FldV, ProOa, PmdA y LigA), (Fig. 24), aunque esta región está menos conservada que la anterior (24%-28% identidad de secuencia).

El modelo de la estructura tridimensional propuesto para la proteína GalA se realizó en base a la estructura conocida de la proteína LigAB de *S. paucimobilis* SYK-6 (Sugimoto *et al.*, 1999) y mostró que los residuos conservados en la estructura primaria también ocupaban posiciones equivalentes en la estructura nativa de las proteínas (Fig. 24 y 25). Así, los residuos His-12, His-61 y Glu-242 de LigB, los cuales conforman la tríada catalítica de ésta, se encuentran perfectamente conservados en el dominio N-terminal de GalA (His-12, His-59 y Glu-240) donde constituirán la tríada catalítica que une el Fe²⁺ y siendo la His-193 de GalA el residuo que actuará como base catalítica en la reacción (Fig. 25) .

En la protocatecuato 4,5-dioxigenasa de *S. paucimobilis* SYK-6, el sustrato (protocatecuato) se acomoda en una cavidad situada en la parte superior de la subunidad mayor (LigB), con la subunidad menor (LigA) formando una especie de tapa que cierra el centro catalítico para no permitir interacciones entre el protocatecuato y el solvente

(Sugimoto *et al.*, 1999). Mimetizando el papel de la subunidad pequeña en LigAB, el dominio C-terminal de GalA debería plegarse y situarse encima del bolsillo catalítico constituido por el dominio N-terminal. En este sentido el dominio C-terminal de GalA se predice como una estructura formada por nueve α -hélices, resultando en una larga superficie de contacto que puede contribuir a la interacción con el dominio N-terminal actuando a modo de tapa (Fig. 25). Otros residuos propuestos como críticos para la actividad de LigAB están también conservados en GalA. Así, la His-125, que se corresponde con la His-127 en la subunidad LigB podría estabilizar la coordinación del sustrato con el ión de hierro, y los residuos Pro-14, Val-195 y Thr-268, los cuales corresponden a Pro-14, Leu-197 y Thr-271 en LigB, harían contacto con el anillo aromático del sustrato (Fig. 25). Por el contrario, el residuo Tyr-90 de LigA, el cual ocupa la posición del O₂ en el centro activo de la enzima en ausencia de sustrato, es sustituido por la Phe-374 en el dominio C-terminal de GalA (Fig. 25)

El análisis de comparación de secuencias y el modelo de la estructura tridimensional sugieren por lo tanto, que la galato dioxigenasa de *P. putida* KT2440 posee un antecesor común con las protocatecuato 4,5-dioxigenasas, y su arquitectura modular consistente en dos dominios podría haber surgido en la evolución por la fusión de las subunidades β y α de las protocatecuato 4,5 dioxigenasas de dos componentes. De acuerdo con esta hipótesis, un evento similar de fusión génica también pudo ocurrir en la evolución de la protocatecuato 4,5-dioxigenasa monocomponente (PcmA) de *A. keyseri* 12B, una proteína cuyos dominios N-terminal y C-terminal muestran similitud con las subunidades α y β de las protocatecuato 4,5-dioxigenasas de dos componentes (Eaton, 2001). Por otra parte, la proteína GalA muestra un alto grado de identidad (64%-76%) a lo largo de toda su secuencia con varias proteínas depositadas en las bases de datos, algunas de las cuales ya han sido caracterizadas como galato dioxigenasas, e. g., DesB de *S. paucimobilis* SYK-6 (Kasai *et al.*, 2005), y otras están codificadas en agrupamientos génicos ortólogos al *cluster gal* (ver apartado 4 de Discusión) y, por tanto, muy probablemente constituyan también galato dioxigenasas. El árbol filogenético construido con las extradiol dioxigenasas tipo II descritas hasta la fecha (Fig. 73), sugiere claramente que las galato dioxigenasas definen un nuevo subgrupo de enzimas, las cuales compartirían un antecesor común con las protocatecuato 4,5-dioxigenasas, siendo la proteína GalA de *P. putida* caracterizada en esta tesis el prototipo y primer miembro que se describió dentro de este nuevo subgrupo de proteínas (Nogales *et al.*, 2005).

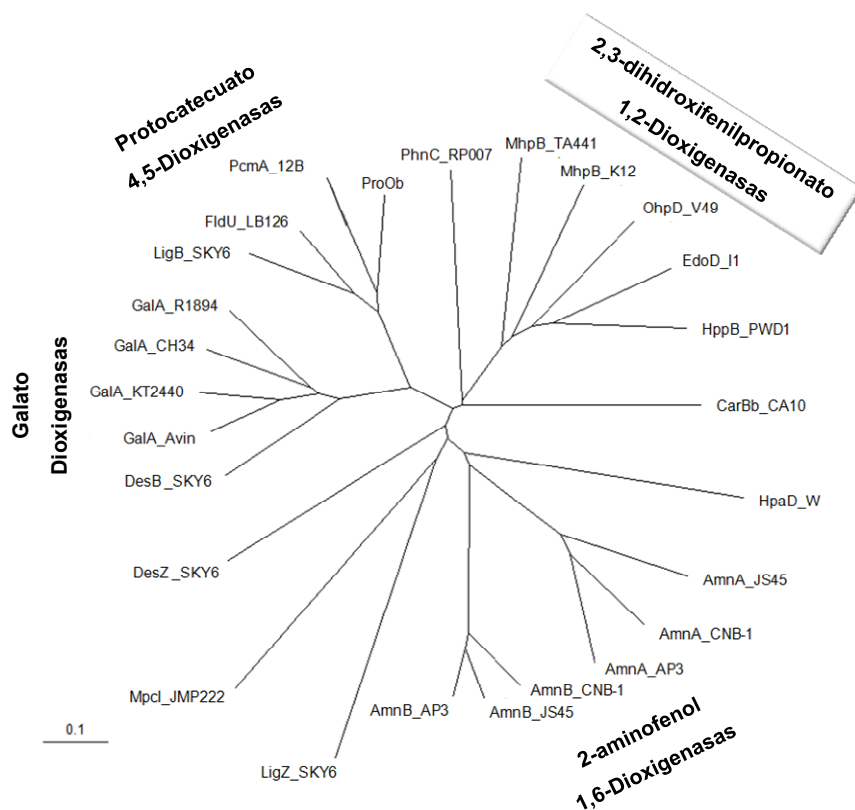


Figura. 73 Árbol filogenético de las extradiol dioxigenasas Tipo II. El alineamiento múltiple de las proteínas se realizó con el programa CLUSTALW y el árbol filogenético se ha realizado (según el método de vecino más próximo) y visualizado como se indica en el apartado 16 de Materiales y Métodos. La barra indica una sustitución de un aminoácido por cada 10. Las enzimas son: AmnA_CNb-1 y AmnB_CNb-1, subunidades α y β de la 2-aminofenol 1,6-dioxigenasa de *Comamonas* sp. CNB-1 (AAT35227, AAT35226); AmnA_JS45 y AmnB_JS45, subunidades α y β de la 2-aminofenol 1,6-dioxigenasa de *Pseudomonas pseudoalcaligenes* JS45 (AAB71525, AAB71524); AmnA_AP3 y AmnB_AP3, subunidades α y β de la 2-aminofenol 1,6-dioxigenasa de *Pseudomonas* sp. AP-3 (BAB03532, BAB03531); CarBb_CA10, subunidad β de la 2'-aminobifenil-2,3-diol 1,2-dioxigenasa de *Pseudomonas resinovorans* CA10 (NP_758569; DesB_SYK-6, galato dioxigenasa de *S.paucimobilis* SYK-6 (BAD80871); DesZ_SYK-6, 3-O-metilgalato dioxigenasa de *S. paucimobilis* SYK-6 (BAC79261); EdoD_I1, extradiol dioxigenasa de *Rhodococcus* sp. I1 (CAA06875); FldU_LB126, subunidad β de la protocatecuato dioxigenasa de *Sphingomonas* sp. LB126 (CAB87561); GalA_KT2440, galato dioxigenasa de *P. putida* KT2440; GalA_Avinelandii, probable galato dioxigenasa de *Azotobacter vinelandii* (ZP_00090231); GalA_CH34, probable galato dioxigenasa de *Ralstonia metallidurans* CH34 (ZP_00273634); GalA_R18194, probable galato dioxigenasa de *Burkholderia cepacia* R18194 (ZP_00216311); HpaD_W, homoprotocatecuato 2,3-dioxigenasa de *E. coli* W (CAA86042); HppB_PWD1, 2,3-dihidroxifenilpropionato 1,2-dioxigenasa de *R. globerulus* PWD1 (AAB81314); MhpB_K12, 2,3-dihidroxifenilpropionato 1,2-dioxigenasa de *E. coli* K-12 (CAA70748); MhpB_TA441, 2,3-dihidroxifenilpropionato 1,2-dioxigenasa de *C. testosteroni* TA441 (BAA82879); LigB_SYK-6, subunidad β de la protocatecuato dioxigenasa de *S. paucimobilis* SYK-6 (BAA97118); LigZ_SYK-6, 5,5'-dihidrovánilato dioxigenasa de *S. paucimobilis* SYK-6 (BAA75884); MpcI_JMP222, catecol 2,3-dioxigenasa I de *Ralstonia eutropha* JMP222 (S10154); OhpD_V49, 2,3-dihidroxifenilpropionato 1,2-dioxigenasa de *Rhodococcus* sp. V49 (AAF81826); PhnC_RP007, extradiol dioxigenasa de *Burkholderia* sp. RP007 (AAD09870); PcmA_12B, protocatecuato 4,5-dioxigenasa of *A. keyseri* 12B (AAK16524); ProOb_NGJ1 subunidad β de la protocatecuato 4,5-dioxigenasa de *Pseudomonas ochraceae* NGJ1 (BAD04058).

1.2. Caracterización de una nueva etapa en la ruta del GA: estudio de la proteína GalD.

El estudio de comparación de secuencias realizado con los genes *gal* (Tabla 5) sugería que el gen *galD* codifica una proteína conservada en bacterias y de función desconocida. Proteínas homólogas a GalD están presentes en *clusters* de degradación de diferentes compuestos aromáticos vía apertura *meta* del protocatecuato. Así Wattiau y colaboradores encontraron un homólogo a *galD* en el *cluster* de genes involucrados en la degradación de fluoreno vía rotura *meta* del protocatecuato. La proteína, llamada FldA (63% de identidad con GalD, (Tabla 5)), pese a desconocerse su función se sugirió que podría estar asociada a la membrana dado su perfil de hidrofobicidad, y se comprobó que era esencial para el crecimiento de *Sphingomonas* sp. LB126 en fluoreno como única fuente de carbono y energía (Wattiau *et al.*, 2001). De la misma forma, otro homólogo de *galD*, *orf1* (60% de identidad con GalD), fue encontrado asociado a los genes de degradación *meta* del protocatecuato en el metabolismo del siringato de *S. paucimobilis* SYK-6. La proteína Orf1, a diferencia de FldA e igual que sucede con GalD, no era esencial para el crecimiento de la bacteria en siringato como fuente de carbono cuando éste se encuentra a en altas concentraciones (5 mM), y se sugirió que podría estar implicada en procesos de transporte dada la alta hidrofobicidad deducida de su secuencia (Hara *et al.*, 2003). Dado que el *cluster gal* ya poseía dos claros transportadores (GalT y GalP) en base al estudio de comparación de secuencia (Tabla 5), se hacía difícil pensar que GalD también estuviera implicada en procesos de transporte, por lo que se investigó si GalD estaba involucrada en algún paso enzimático de la ruta de degradación de GA. En este sentido, a lo largo del desarrollo de esta tesis doctoral se han publicado dos secuencias de proteínas que presentan un 37 % (Mii) y 35 % (PrpF) de identidad con GalD y que actúan como sendas isomerasas en las rutas de la degradación anaeróbica de ácido nicotínico en *E. barkeri* (Alhapel *et al.*, 2006), la primera, y en la de de propionato de *S. oneidensis* (Garvey *et al.*, 2007), la segunda. La significativa similitud de GalD con Mii y PrpF sugería, de nuevo, su implicación en alguna etapa catabólica de la ruta del GA.

La ruta de degradación aeróbica de GA hasta ahora establecida fue esbozada bioquímicamente por Track y colaboradores (Tack *et al.*, 1972b) y ha sido completada en los últimos años con la caracterización de los genes que codifican para las diferentes etapas enzimáticas (Hara *et al.*, 2000; Hara *et al.*, 2003; Kasai *et al.*, 2005; Nogales *et*

al., 2005) (Fig. 7). En esta ruta, tras la reacción de apertura del anillo aromático del GA por la acción de la galato dioxigenasa, se produce la hidratación del producto resultante. Sin embargo, la ausencia de actividad hidratasa cuando se utilizaba el producto de apertura del GA (OMA_{ceto}) y el incremento espontáneo de absorbancia del producto de apertura del anillo aromático del GA en función del tiempo, hacía sospechar que probablemente la forma OMA_{ceto} no fuese el sustrato de la hidratasa (GalB). Curiosamente, este aumento de la absorbancia del producto de apertura se incrementaba significativamente cuando se añadían extractos de la cepa *P. putida* KTGAL, pero no cuando se utilizaban extractos de la cepa *P. putida* KTGAL_{galD} (Fig. 26).

Todas estas observaciones, junto con el hecho de que el gen *galD* se encuentre presente en todos los *clusters gal* de γ -proteobacterias así como en muchos *clusters gal* de β - y α -proteobacterias (ver apartado 4 de Discusión), sugerían que GalD podría estar implicada en la transformación del producto resultante de la apertura del anillo aromático del GA (OMA_{ceto}) en el verdadero sustrato de la reacción de hidratación.

Los cambios de absorbancia del producto de apertura del GA catalizados por la adición de extractos proteicos que contenían GalD hiperproducida mostraron de forma inequívoca que el producto de apertura (OMA_{ceto}) era transformado en un compuesto que presentaba una mayor absorbancia a 275 nm y una menor absorbancia a 210 nm, con dos puntos isobélicos a 207 y 243 nm (Fig. 29), sugiriendo un aumento en el grado de insaturación de dicho producto. Los datos obtenidos mediante RMN del producto de la acción de GalD sobre el OMA_{ceto} son compatibles con la aparición de las formas enólicas del OMA (Fig. 30). No obstante, con el procedimiento utilizado, no es posible saber si las dos formas enólicas del OMA o sólo una de ellas es el resultado de la acción de GalD sobre OMA_{ceto}, ya que ambos tautómeros proporcionan una señal equivalente en RMN.

Como se ha indicado en el apartado 5 de Introducción, tanto la ruta bioquímica de degradación de GA como la de degradación de protocatecuato vía apertura *meta*, pueden considerarse dos ramas que convergen en la ruta común de degradación de OMA en bacterias (Fig. 7) (Dennis *et al.*, 1973; Masai *et al.*, 2007). El OMA es producido por la acción de la 2-pirona-4,6-dicarboxilato hidrolasa (LigI) a partir del PDC en la rama del protocatecuato (Maruyama, 1979, 1983b; Masai *et al.*, 1999) o bien directamente a partir de GA por la acción de la galato dioxigenasa en la rama del GA (Fig. 7) (Tack *et al.*, 1972b; Kasai *et al.*, 2005; Nogales *et al.*, 2005). Aunque inicialmente se sugirió que la forma OMA_{ceto} era el tautómero generado en la rama del

protocatecuato (Maruyama, 1983b), sólo las formas enoles pudieron ser detectadas utilizando espectrometría de masas en estudios posteriores (Masai *et al.*, 1999). Esto es debido probablemente a que aunque el OMA_{ceto} es un α -cetoácido y podría ser fácilmente distinguible de las formas OMA_{enol} (ya que el grupo ceto no se trimetilsilila), un α -cetoácido es generalmente inestable y podría haberse degradado durante el proceso de extracción (Masai *et al.*, 1999). Por otra parte, un equilibrio entre los 3 isómeros del OMA ha sido sugerido igualmente para el producto de apertura del GA por acción de la galato dioxigenasa (Kasai *et al.*, 2005), considerándose por tanto hasta ahora, que el OMA producido durante la degradación del GA o del protocatecuato se encuentra en equilibrio entre las tres formas tautoméricas posibles. Sin embargo, dado que homólogos a la proteína GalD se encuentran codificados en los *clusters* de degradación *meta* de protocatecuato de *S. paucimobilis* SYK-6 (Hara *et al.*, 2003), y *Sphingomonas* sp. LB126 (Wattiau *et al.*, 2001), entre otros (ver apartado 4 de Discusión), parece lógico asumir que dichas proteínas, e. g., ORF1 y FldA, catalizan también la reacción de enolización de la forma OMA_{ceto} en la degradación *meta* del protocatecuato en *Sphingomonas*. Por lo tanto, los resultados presentados en esta tesis sugieren que la presencia del gen *galD* o sus ortólogos en los *cluster gal* o en los *cluster* de degradación *meta* del protocatecuato en distintas bacterias, representa una adquisición evolutiva para la eficaz conversión del OMA_{ceto} que se genera en la ruta en OMA_{enol}, siendo este último el verdadero sustrato de la posterior reacción de hidratación.

El diferente comportamiento observado en bacterias en las que el gen *galD* o sus ortólogos han sido inactivados, no permitiendo el crecimiento en *Sphingomonas* sp. LB126 y si el *P. putida* KTGAL o *S. paucimobilis* SYK-6 cuando se emplean elevadas concentraciones de fluoreno, GA o siringato, respectivamente, como fuentes de carbono, podría ser explicado por la presencia en el genoma de las cepas KTGAL y SYK-6, pero no en la cepa LB126 de otras isomerasas inespecíficas que podrían reemplazar a GalD y catalizar la formación de OMA_{enol} a partir de OMA_{ceto} de forma más o menos eficaz. Así por ejemplo, en el genoma de *P. putida* están codificadas dos proteínas, PP_2055 y PP_2337, que muestran un 49% y 36% de identidad de secuencia con GalD, respectivamente. La proteína PP_2055 se encuentra codificada en un *cluster* que incluye un posible transportador de ácidos dicarboxílicos de 4 átomos de carbono (PP_2056, *dctP*), un presunto transportador de citrato (PP_2057) y una posible porina de ácidos dicarboxílicos (PP_2058), lo cual sugiere que este agrupamiento génico se encuentra implicado en el catabolismo de ácidos dicarboxílicos. El segundo homólogo

(PP_2337) se encuentra formando parte del *cluster prp* (PP_2333-9), probablemente involucrado en el metabolismo del propionato en *P.putida* KT2440, en donde la proteína PP_2337 estaría catalizando la reacción que lleva a cabo la isomerasa PrpF de *S. oneidensis* (Garvey *et al.*, 2007) dado el alto grado de identidad (78%) compartido por estas dos proteínas. No obstante, tampoco se puede descartar que el crecimiento de *P. putida* KTGALdgalD en GA 5 mM pueda ser debido a una isomerización espontánea del OMA_{ceto} en OMA_{enol} como consecuencia de las elevadas concentraciones de sustrato utilizado. En cualquiera de los dos casos, tanto si la isomerización es espontánea o debida a la acción de isomerasas de la célula, la ausencia de un gen *galD* funcional dificulta el crecimiento de *P. putida* a concentraciones de GA \leq 1 mM (Tabla 6), lo que sugiere que la isomerización enzimática catalizada por GalD es imprescindible para una eficaz ruta GAL cuando *P. putida* se encuentra presente en la mayoría de sus ambientes naturales.

Durante el desarrollo de esta tesis doctoral se ha resuelto la estructura tridimensional de dos proteínas homólogas a GalD pertenecientes a la familia de proteínas DUF453. Por un lado, la de la proteína de función desconocida 2H9F de *P. aeruginosa* (PDB 2H9F) (<http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>). Por otro lado, se ha publicado recientemente la estructura tridimensional de la proteína PrpF una 2-metilcitrato *cis-trans* isomerasa involucrada en el metabolismo del propionato de *S. oneidensis* (Garvey *et al.*, 2007). Utilizando la estructura conocida de la proteína PrpF se ha modelado la estructura tridimensional de GalD (Fig. 32). La estructura tridimensional propuesta para GalD revela dos dominios similares los cuales se organizan formando un barril β , compuesto por una α -hélice rodeada de cadenas β mayoritariamente antiparalelas (Fig. 32).

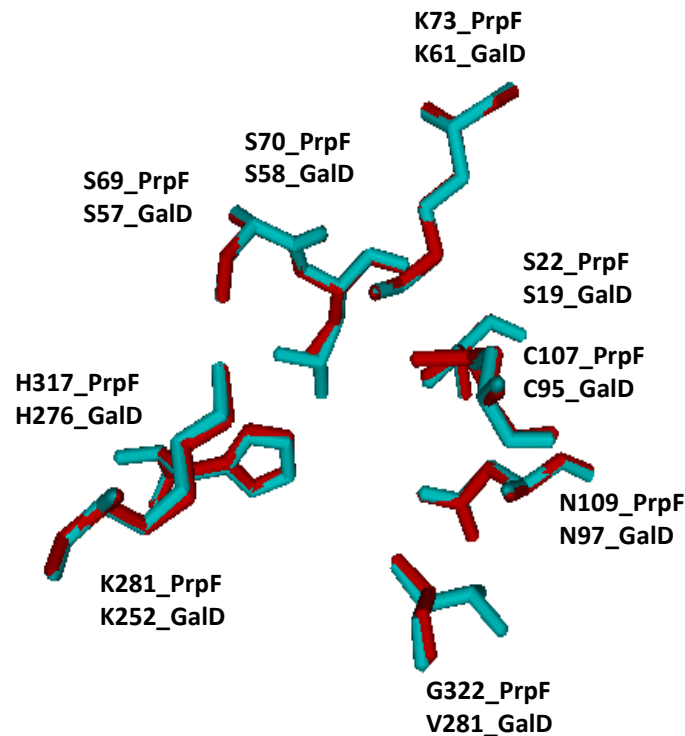


Figura 74. Comparación de los residuos que forman el centro catalítico de la proteína PrpF y sus equivalentes en GalD. Se muestran en azul los aminoácidos de la proteína PrpF y en rojo los pertenecientes a GalD. Para la comparación del centro catalítico de ambas proteínas se empleó el programa PyMol (DeLano, 2002).

La organización tridimensional sugerida para las proteínas 2H9F, PrpF y GalD es similar a la ya descrita para otras isomerasas no dependientes de piridoxal fosfato (PLP) tales como diferentes diaminopimelato epimerasas, e. g., la proteína DapF de *Haemophilus influenzae* (Cirilli *et al.*, 1998; Pillai *et al.*, 2006), isomerasas relacionadas con la síntesis de fenazina como la proteína PhzF de *P. fluorescens*, una 2,3-dihidro-3-hidroxi-antranilato *cis-trans* isomerasa (Blankenfeldt *et al.*, 2004), EhpD de *P. agglomerans* (*Erwinia herbicola* Eh1087) (Giddens *et al.*, 2002) o epimerasas de función desconocida como la proteína YddE de *E. coli* (Grassick *et al.*, 2004). Igualmente, una estructura similar ha sido descrita para una probable prolina racemasa de *Brucella melitensis*, (PDB, 1TM0). Todas estas proteínas definen una familia que comparte tanto la misma topología como la duplicación de dominios. En particular, todas ellas exhiben la inserción del segundo dominio justo antes de la última lámina β del primero (Fig. 32), indicando probablemente, que todas ellas surgieron del mismo evento de duplicación génica, compartiendo una antecesor común (Garvey *et al.*, 2007).

El centro activo de la diaminopimelato epimerasa (DapF) fue definido por la localización de los residuos altamente conservados y a través de la resolución de la

estructura de la proteína acomplejada con diferentes inhibidores. Estos estudios mostraron que el bolsillo catalítico se localiza en la hendidura que surge entre ambos dominios (Cirilli *et al.*, 1998; Pillai *et al.*, 2006). Los residuos catalíticos, Cys73 y Cys217, se encuentran situados al final de las α -hélices centrales de ambos dominios y serían los responsables del mecanismo general ácido/base implicado en la reacción de epimerización (Cirilli *et al.*, 1998; Pillai *et al.*, 2006). Estos residuos se encuentran parcialmente conservados en las proteínas PrpF (Cys 107, Met321) y GalD (Cys95, Gly280).

Por otra parte, PrpF pudo ser cristalizada también con *trans*-aconitato (un análogo del verdadero sustrato), resolviéndose la estructura del complejo (Garvey *et al.*, 2007). Al igual que ocurre en la diaminopimelato isomerasa DapF, el bolsillo catalítico de la proteína PrpF se localiza en la hendidura que se forma entre los dos dominios estructurales de la proteína. Interesantemente 3 residuos cargados del bolsillo catalítico, Lys73, Lys281 e His317, forman puentes de hidrógeno para la neutralización de las 3 cargas negativas del sustrato. Estos tres residuos, no sólo están conservados a nivel de estructura primaria en GalD (Lys61, Lys252 e His276), sino que ocupan la misma posición en la estructura tridimensional predicha (Fig. 74), lo que sugiere que estarían neutralizando los 3 grupos carboxilos que presenta el OMA. En el mecanismo catalítico propuesto para la proteína PrpF, se ha sugerido que la Lys73 actuaría como una base, abstrayendo un protón del C4 del sustrato, siendo el residuo clave en el mecanismo ácido/base de la reacción. Por el contrario, aunque las Cys107_{PrpF} y Cys95_{GalD} se encuentran formando parte del posible centro catalítico de estas proteínas (Fig. 74) no parecen situarse a una distancia idónea para llevar a cabo la catálisis (Garvey *et al.*, 2007). Interesantemente, cuando se superpuso la estructura de la proteína PrpF con la de otros miembros de esta familia de isomerasas se pudo ver que la Lys73 ocupaba una posición equivalente al residuo catalítico Glu45 de la proteína PhzF de *P. fluorescens* (Blankenfeldt *et al.*, 2004). En conjunto, todos estos datos sugieren la idea de que esta familia de isomerasas, pueden utilizar una gran variedad de residuos como bases o ácidos, y que lo más importante no es la conservación de estos, sino la posición del grupo catalítico con respecto al sustrato.

El árbol filogenético construido con las secuencias primarias de esta extensa familia de proteínas muestra que la ceto-enol OMA isomerasa GalD forma junto a las proteínas FldA de *Sphingomonas* sp. LB126, Orf1 de *S. paucimobilis* SYK-6 y los homólogos GalD de diferentes organismos, e. g., *A. vinelandii*, una subfamilia

claramente diferenciada del resto y emparentada con la de otras isomerasas tales como las metilaconitato isomerasas, e. g., Mii (3-metilaconato isomerasa) y PrpF (2-metilaconitato isomerasa) (Fig. 75).

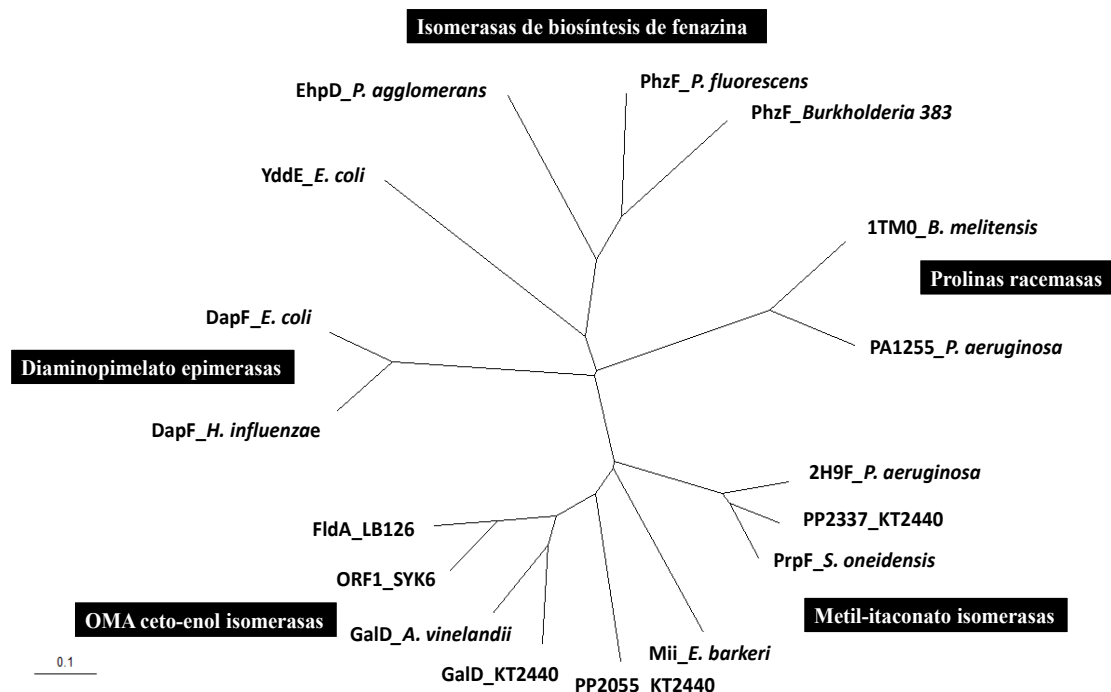


Figura 75. Afiliación filogenética de la familia de isomerasas relacionadas con GalD. El alineamiento múltiple de las proteínas se realizó con el programa CLUSTALW y el árbol filogenético se ha realizado (según el método de vecino más próximo) y visualizado como se indica en el apartado 16 de Materiales y Métodos. La barra indica una sustitución de un aminoácido por cada 10. Se detalla la función de las distintas subfamilias. El árbol filogenético fue construido utilizando las siguientes secuencias de proteínas: PhzF_Burkholderia sp. 383 (YP_372329); PhzF_P. fluorescens (Q51792); EhpD_P. agglomerans (AAN40893); YddE_E. coli (P37757); DapF_E. coli (AP_003990); DapF_H. influenzae (NP_438909); FldA_Sphingomonas sp. LB126 (CAB87567); ORF1_S. paucimobilis SKY6 (BAB88737); GalD_A. vinelandii (ZP_00416187); GalD_P. putida KT2440; PP2055_P. putida KT2440 (AE015451); Mii_E. barkeri (ABC88404); PrpF_S. Odeinensis (AE014299); PP2337_P. putida KT2440 (AE015451); 2H9F_P. aeruginosa (NP_249484); PA1255_P. aeruginosa (NP_249946); 1TM0_B. melitensis (NP_540503).

El agrupamiento, junto con PrpF de las proteínas PP_2337 y 2H9F de *P. putida* y *P. aeruginosa*, respectivamente, parece sugerir que estas dos proteínas de función desconocida podrían, igualmente, estar involucradas en la degradación de propionato en *Pseudomonas* catalizando la formación de *trans* 2-metilaconitato a partir del isómero *cis*. La posición intermedia que ocupa la proteína PP_2055 de *P. putida* KT2440 entre las subfamilias de metilaconitato isomerasas y OMA isomerasas, sugeriría que podría

ser el representante de una nueva subfamilia de proteínas que catalizarían la isomerización de algún compuesto relacionado estructuralmente con el OMA y el metilacetonato, argumento que se ve reforzado por el entorno genético que presenta este *orf* en el genoma de *P. putida* estando rodeado de supuestos transportadores de ácidos di- o tri-carboxílicos. Por otro lado, en una rama más distanciada del árbol, sugiriendo una escisión evolutiva más temprana, se encontrarían las otras tres subfamilias de proteínas relacionadas estructural y funcionalmente con GalD: las diaminopimelato isomerasas (proteínas DapF de *H. influenzae* y *E. coli*), las isomerasas involucradas en biosíntesis de fenazina (proteínas PhzF de *P. fluorescens* y *Burkholderia* sp 383 y EhpD de *P. agglomerans*), y las prolina racemasas (PA2155 de *P. aeruginosa* y 1TM0 de *B. mellitensis*).

Cambios de absorbancia similares al mostrado por la enolización del OMA, han sido descritos en la tautomería ceto-enólica de diferentes intermediarios en algunas rutas de degradación de compuestos aromáticos. Así, el 4-oxalacronato, un intermediario de la ruta *meta* de degradación de catecol, está sujeto a una tautomería ceto-enólica. Este dienol cetona en una solución acuosa espontáneamente ($t_{1/2}$ de 3 a 6 min) o por acción enzimática llevada a cabo por la enzima 4-oxalacronato tautomerasa codificada por el gen *xylH* del plásmido TOL (pWW0) (Sala-Trepat y Evans, 1971; Harayama *et al.*, 1984; Harayama *et al.*, 1989; Whitman *et al.*, 1991; Chen *et al.*, 1992; Whitman, 2002). Esta enzima consta de 62 aa y ha sido estudiada en detalle, conociéndose tanto sus propiedades bioquímicas como estructurales (Chen *et al.*, 1992; Taylor *et al.*, 1998; Harris *et al.*, 1999; Cisneros *et al.*, 2003). Por otro lado, en la ruta *meta* de degradación del 4-hidroxifenilacetato en *E. coli* W y *E. coli* C, las proteínas HpaF y HpcD, respectivamente, cataliza la isomerización del 5-carboximetil-2-hidroxiacetonato para originar 5-carboximetil-2-oxo-hex-3-eno-1,5-dioato (Roper y Cooper, 1990; Prieto *et al.*, 1996). La proteína HpcD es un trímero compuesto de monómeros de 14 kDa (126 aa). La estructura terciaria de esta proteína ha sido resuelta e identificado el mecanismo catalítico, en el cual una prolina del N-terminal actúa como base (Roper *et al.*, 1994; Subramanya *et al.*, 1996). Pese a que tanto las proteínas XylH como HpaF o HpcD no parecen tener una evidente similitud de secuencia, la superposición de las estructuras terciarias de estas proteínas revela cierta similitud en el centro catalítico, lo cual confirmaría el mismo mecanismo catalítico para ambas (Roper *et al.*, 1994; Subramanya *et al.*, 1996). La estructura tridimensional propuesta para GalD no parece guardar similitud con la de estas otras isomerasas descritas en rutas de degradación de otros

compuestos aromáticos, y aunque un residuo de lisina ha sido sugerido como base que iniciaría la catálisis (Garvey *et al.*, 2007), se hace necesario profundizar en el estudio de GalD con objeto de caracterizar esta nueva subfamilia de isomerasas.

1.3. La proteína GalB es el prototipo de una nueva subfamilia de hidratasas dependientes de Zn²⁺.

La hidratación del OMA para dar CHA es el penúltimo paso en la degradación aeróbica de GA y otros compuestos que generan OMA en su catabolismo. (Tack *et al.*, 1972b; Sparnins y Dagley, 1975; Maruyama, 1985; Hara *et al.*, 2000) (Fig. 7). Dos únicas OMA hidratasas han sido caracterizadas bioquímicamente y genéticamente hasta ahora, i. e., la proteína ProH de la ruta de degradación de fthalato en *P. ochraceae* (Maruyama, 1985; Maruyama *et al.*, 2004) y la proteína LigJ, involucrada en la degradación de derivados de lignina en *S. paucimobilis* SYK-6 (Hara *et al.*, 2000) perteneciendo ambas proteínas a la familia de las amidohidrolasas_2 (código Pfam: PF04909) (Holm y Sander, 1997). No obstante, homólogos de estas dos OMA hidratasas que presentan una identidad de secuencia con éstas entorno al 60%, se han descrito en *clusters* de degradación de diferentes compuestos aromáticos que generan OMA como intermediario, entre otras, la proteína FldW, involucrada en la degradación de fluoreno en *Sphingomonas* sp. LB126 (Wattiau *et al.*, 2001) o la proteína PmdE de *C. testosteroni* BR6020 involucrada en la degradación de diferentes compuestos aromáticos vía rotura *meta* de protocatecuato (Providenti *et al.*, 2001). Sin embargo, la búsqueda de la posible OMA hidratasa en el genoma de *P. putida* KT2440 no permitió identificar ninguna proteína homóloga a las proteínas LigJ, ProH, FldW o PmdE. El hecho de que la *casete gal* contenida en el plásmido pGal portase todas las actividades enzimáticas implicadas en la degradación de GA (Fig. 16), sugería que algún gen *gal* podría codificar una OMA hidratasa no relacionada evolutivamente con las OMA hidratasas identificadas hasta ahora. La única proteína Gal, a excepción de GalD, cuya función no había podido ser predicha era GalB. La complementación del crecimiento en siringato de una cepa mutante de *S. paucimobilis* que presentaba el gen *ligJ* delecionado con el plásmido pIZGalB confirmó la actividad OMA hidratasa del producto génico de *galB*.

Dado que GalB parecía constituir el prototipo de una nueva clase de hidratasas, ésta fue hiperproducida en *E. coli*. Si bien se detectó actividad OMA hidratasa en los extractos celulares de la cepa *E. coli* BL21 (DE3) (pETGalB), fue necesario

suplementar los buffers con SO_4Zn durante el proceso de purificación para obtener una significativa actividad OMA hidratasa con la proteína purificada (Tabla 8), lo que sugería que GalB era una hidratasa dependiente de Zn^{2+} para su actividad.

Las constantes catalíticas de GalB fueron calculadas detectándose una K_m y una $V_{m\acute{a}x}$ para el OMA de $85\ \mu\text{M}$ y $76\ \mu\text{moles}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}\ \text{proteína}^{-1}$, respectivamente, lo que indica que GalB es una enzima con una mayor afinidad por OMA que LigJ ($K_m\ 138\ \mu\text{M}$ y $V_{m\acute{a}x}\ 440\ \mu\text{moles}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}\ \text{proteína}^{-1}$) (Hara *et al.*, 2000) pero con menor afinidad que ProH ($K_m\ 6,4\ \mu\text{M}$ y $V_{m\acute{a}x} = 14\ \mu\text{moles}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}\ \text{proteína}^{-1}$) (Maruyama, 1985). No obstante, los valores calculados para las 3 proteínas indican que se trata de hidratasas con elevada actividad sobre el OMA.

El producto de la acción de GalB sobre OMA fue identificado utilizando técnicas de RMN. Los resultados mostraron que la adición de GalB a una solución que contiene OMA_{enol} ocasiona la aparición de dos grupos CH_2 en la molécula (Fig. 37), los cuales pueden ser adscritos a la formación de CHA, confirmándose definitivamente que GalB cataliza una reacción similar a la catalizada por las hidratasas de la familia amidohidrolasa_2 en otras rutas de degradación de OMA en bacterias. Los estudios bioquímicos realizados con las hidratasas de esta familia (Maruyama, 1985; Hara *et al.*, 2000) no permitieron identificar el verdadero sustrato de estas proteínas, al considerar que el OMA se encontraba en equilibrio entre sus tres formas tautoméricas y éstas no podían distinguirse mediante las técnicas de GA-MS. No obstante, se había sugerido que el sustrato podría ser la forma ceto del OMA atendiendo a la estructura química del producto de la reacción (Hara *et al.*, 2000). El empleo de técnicas de RMN, las cuales permitían identificar las formas enol y ceto del OMA, y la caracterización de la proteína GalD, permite concluir que el verdadero sustrato de GalB es la forma enol del OMA siendo GalB inactiva cuando se utiliza OMA_{ceto} (ver apartado 2.3.3 de Resultados). La presencia de un gen homólogo a *galD* en los clusters de degradación *meta* de protocatecuato en *S. paucimobilis* SYK-6 (Orf1), o de degradación de fluoreno en la cepa *Sphingomonas* sp. LB126 (FldA), parece sugerir igualmente que las hidratasas LigJ y FldW, respectivamente, presentan la misma especificidad de sustrato que GalB, reconociendo el OMA_{enol} .

Aunque no hay mucha información sobre del mecanismo de catálisis de las hidratasas de la familia amidohidrolasa_2, la reactivación de estas proteínas al utilizar agentes reductores, tales como cisteína, glutatión o ditiotreitól, y su inactivación al incubarse con HgCl_2 , sugiere que algún residuo de cisteína está involucrado en la

catálisis, no encontrándose, por otra parte, una dependencia de metales para la actividad (Maruyama, 1985; Hara *et al.*, 2000). Recientemente, se ha estudiado mediante mutagénesis la participación en la catálisis de los 8 residuos de cisteína de la proteína ProH, no encontrándose aparentemente que ninguno de ellos sea crucial en la catálisis enzimática (Li *et al.*, 2007). La reciente determinación de la estructura tridimensional de la proteína LigJ de *Rhodopseudomonas palustris* (PDB 2GWG), la cual presenta un mol de Zn^{2+} por mol de proteína, hizo reexaminar a Li y colaboradores la dependencia de metales de la proteína ProH, pudiéndose confirmar que si bien, en condiciones nativas la proteína no se ve inhibida por quelantes y no se detectó Zn^{2+} , sí se encontró un mol de Zn^{2+} por mol de proteína cuando se midió en condiciones desnaturalizantes, sugiriéndose la participación de este metal en la catálisis enzimática aunque no ha podido determinarse el centro catalítico de esta enzima (Li *et al.*, 2007). Este dato sugiere una convergencia funcional en cuanto a la utilización del Zn^{2+} como elemento co-catalítico entre las hidratatas de la familia LigJ y las de la familia GalB, hecho que puede explicarse debido a que muchas de las propiedades del Zn^{2+} lo capacitan como un ventajoso cofactor en catálisis enzimática, especialmente en reacciones de hidrólisis o hidratación (Christianson, 1991; Holm *et al.*, 1996). GalB, por otro lado, parece unir el átomo de Zn^{2+} de forma más débil a como lo hace la proteína ProH, lo que permite explicar el hecho de que sea fuertemente inhibida en presencia de quelantes de iones divalentes (Fig. 35). Por el contrario, y a diferencia de las hidratatas de la familia amidohidrolasa_2, no se inhibe en presencia de reactivos que interaccionan con grupos -SH tales como *N*-etilmaleimida o iodoacetamida y sí lo hace cuando se incuba en presencia de DEPC (Fig. 36), sugiriendo la participación de algún residuo de histidina en su catálisis.

La caracterización bioquímica de GalB pone de manifiesto la necesidad de Zn^{2+} como cofactor principal para la catálisis y muestra que esta nueva hidratasa no sólo posee un origen evolutivo distinto a las OMA-hidratatas previamente identificadas, sino que muy probablemente lleva a cabo la hidratación de OMA utilizando un mecanismo catalítico igualmente diferente. Las diferencias entre ambas familias de hidratatas también se ponen de manifiesto a nivel de la estructura cuaternaria, siendo GalB un homohexámero (Fig. 38) y homodímeros las hidratatas LigJ (Hara *et al.*, 2000) y ProH (Maruyama, 1985).

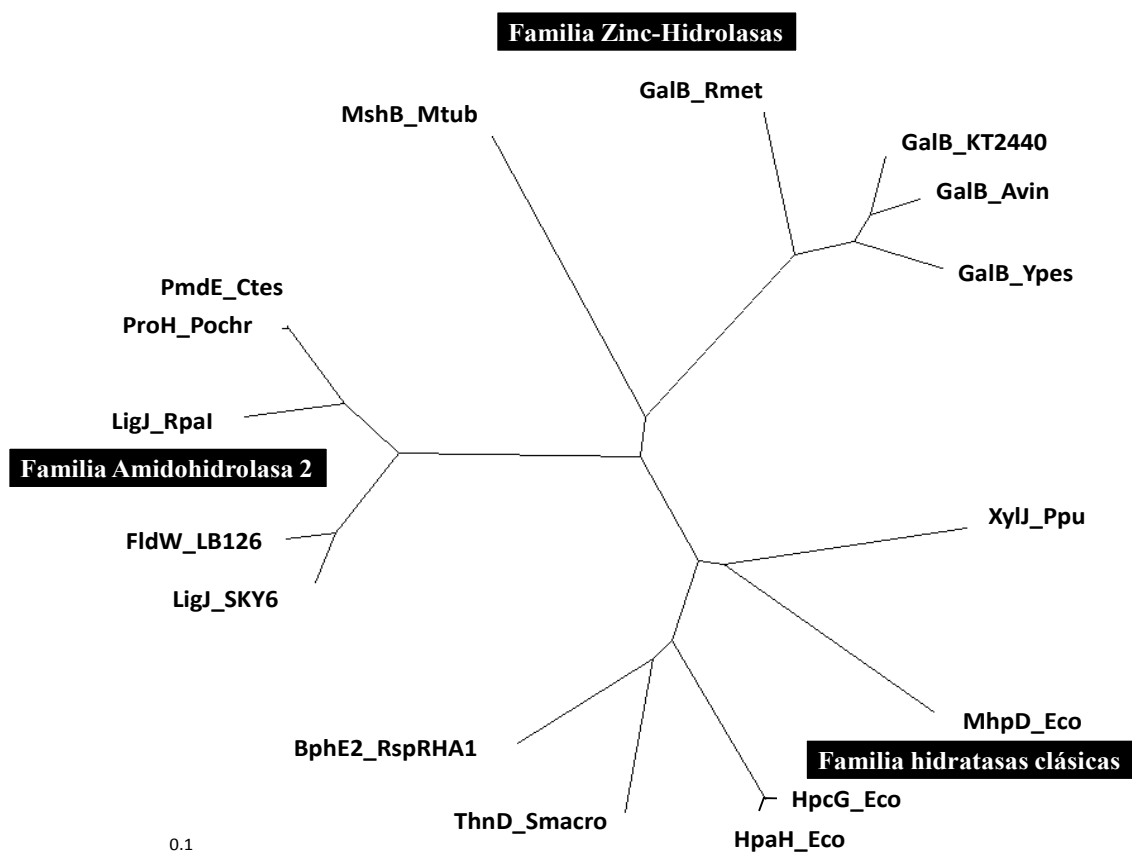


Figura 76. Afiliación filogenética de las tres familias de hidratasas involucradas en las rutas de degradación *meta* de compuestos aromáticos. El alineamiento múltiple de las proteínas se realizó con el programa CLUSTALW y el árbol filogenético se ha realizado (según el método de vecino más próximo) y visualizado como se indica en el apartado 16 de Materiales y Métodos. La barra indica una sustitución de un aminoácido por cada 10. Se ha incluido la deacetilasa MshB para reflejar la relación de la proteína GalB con deacetilasas dependientes de Zn^{2+} . Las proteínas incluidas en el alineamiento son: MshB de *M. tuberculosis* (1Q7T); GalB de *R. metallidurans* (ZP_00598003); GalB de *P. putida* KT2440; GalB de *A. vinelandii* (YP_002800266); GalB de *Y. pestis* (AAS60366); XylJ de *P. putida* (M64747); MhpD de *E. coli* (D86239); HpcG de *E. coli* (X81446); HpaH de *E. coli* (CAA86044); ThnD de *S. macroglotabida* (AF204963); BphE2 de *Rhodococcus sp.* RHA1 (D78322); LigJ de *S. paucimobilis* SYK-6 (BAB88741); FldW de *Sphingomonas sp.* LB126 (CAB87563); LigJ de *Rhodopseudomonas palustris* (2GWG); ProH de *P. ocharaceae* (BAB21455); PmdE de *C. testosteroni* (AAK73569).

Un tercer grupo de hidratasas participantes en la degradación de compuestos aromáticos son las clásicas hidratasas involucradas en rutas de degradación *meta* de compuestos catecólicos (Pollard y Bugg, 1998). Todas ellas forman una familia de proteínas que se encuentran significativamente relacionadas presentando una identidad de secuencia mayor del 30%. Dentro de este grupo de proteínas se encuentran las arqueotípicas proteínas XylJ de *P. putida* y MhpD de *E. coli*, las cuales catalizan la hidratación del ácido 2-hidroxipentadienoico en la ruta *meta* de degradación del catecol y del 2,3-dihidroxifenilpropionato respectivamente (Harayama *et al.*, 1989; Roper y

Cooper, 1990; Pollard y Bugg, 1998) y las proteínas las proteínas HpcG y HpaH de *E. coli* encargadas de hidratar el ácido 2-oxo-hept-3-en-1,7-dioico en la ruta de degradación *meta* del homoprotocatecuato (Roper *et al.*, 1995; Prieto *et al.*, 1996). Igualmente, dentro de este grupo se encuentran hidratatas involucradas en la degradación del etilbenceno y bifenilos (Romine *et al.*, 1999), las cuales no han sido caracterizadas bioquímicamente aún, o la proteína ThnE de *Sphingomonas macroglotabida*, la cual hidrata el ácido 2-hidroxidec-2,4-dieno-1,10-dioico en la ruta de degradación de la tetralina (Moreno-Ruiz *et al.*, 2003).

Se pueden considerar, por tanto, 3 grandes familias de hidratatas involucradas en rutas *meta* de degradación de compuestos aromáticos, las hidratatas clásicas, las pertenecientes a la familia amidohidrolasa_2 y las de la familia GalB que se encuentran relacionadas con hidrolatas dependientes de que Zn^{2+} (Fig. 76).

La existencia de una molécula de Zn^{2+} por molécula de GalB sugiere que esta enzima posee un centro mononuclear de unión a zinc catalítico. Esta hipótesis está de acuerdo con la existencia en la región N-terminal de GalB de un motivo conservado en una extensa familia de deacetilasas implicado en la interacción con Zn^{2+} (Hernick y Fierke, 2005; Hernick *et al.*, 2005; Urbaniak *et al.*, 2005). Este motivo se caracteriza por la siguiente secuencia de aminoácidos, **V X (P/A) H (P/S) (D/A) D**, en donde los residuos en negrita se encuentran estrictamente conservados, siendo H y D dos de los 3 residuos de la proteína implicados en coordinar el zinc. El tercer ligando de interacción con el Zn^{2+} en esta familia de proteínas es otra histidina que se encuentra separada por una longitud variable de aminoácidos, en torno a 100 residuos, de los dos primeros. Una molécula de H_2O se ocupa de coordinar al zinc sirviendo como cuarto ligando no proteico en este grupo de enzimas de zinc mononucleares (Auld, 2001; Hernick y Fierke, 2005). Todas estas zinc-deacetilasas conforman una familia de proteínas (familia Pig-L) englobadas en la gran superfamilia de las zinc-hidrolatas (Wouter y Husain, 2001; Hernick y Fierke, 2005). Esta extensa superfamilia de proteínas representa el mayor grupo conocido de enzimas dependiente de zinc, en las cuales, un grupo hidroxilo coordinado por el zinc actúa como nucleófilo en la reacción de hidrólisis. (Coleman, 1998). El centro activo de algunas fosfatasas (por ejemplo la fosfatasa alcalina) contiene 3 iones de zinc, mientras que el grupo de las peptidasas (por ejemplo, aminopeptidasas o la carboxipeptidasa G) contienen un complejo binuclear de zinc en su centro activo (Coleman, 1998). Las zinc-hidrolatas que contienen un complejo mononuclear de Zn^{2+} incluyen, entre otras, a la familia de las deacetilasas Pig-L como la

proteína MshB de *M. smegmatis* (Maynes *et al.*, 2003). Los ligandos, tanto proteicos como no proteicos, que coordinan el zinc en algunos de los representantes de las zinc-hidrolasas mononucleares se muestran en la Tabla 12.

Tabla 12. Ejemplos de ligandos de zinc en zinc-hidrolasas mononucleares y la hidratasa dependiente de zinc GalB.

<i>Enzima</i>	<i>Ligando1</i>	<i>Distancia</i> (aa)	<i>Ligando2</i>	<i>Distancia</i> (aa)	<i>Ligando3</i>	<i>Ligando4</i>	<i>Referencia</i>
LpxC	His	158	His	4	Asp	H ₂ O	(Whittington <i>et al.</i> , 2003)
Carboxipeptidasa A	His	2	Glu	124	His	H ₂ O	(Auld, 2001)
Termolisina	His	3	His	19	Glu	H ₂ O	(Auld, 2001)
Metaloproteasa	His	3	His	5	His	H ₂ O	(Auld, 2001)
D-Aminoacilasa	Cys	123	His	29	His	Acetato	(Liaw <i>et al.</i> , 2003)
Histona deacetilasa	Asp	1	His	86	Asp	H ₂ O	(Somoza <i>et al.</i> , 2004)
MshB	His	2	Asp	130	His	H ₂ O	(Maynes <i>et al.</i> , 2003)
GalB	His	2	Asp	110	His	¿?	Esta Tesis

Algunas de las zinc-deacetilasas de la familia Pig-L han sido estudiadas en detalle tanto a nivel estructural como a nivel bioquímico, como es el caso de la *N*-acetil-1-*D*-mio-inositol-2-amido-2-deoxi- α -*D*-glucopiranosido deacetilasa (MshB), una enzima involucrada en la síntesis de micotiol en *M. smegmatis* (Newton *et al.*, 2000; Maynes *et al.*, 2003), la UDP-3-*O*-acil *N*-acetilglucosamina deacetilasa (LpxC) de *E. coli* (Jackman *et al.*, 1999; Whittington *et al.*, 2003; Hernick y Fierke, 2005; Hernick *et al.*, 2005), o la *N*-acetil-*D*-glucosaminil-fosfatidil-inositol de-*N*-acetilasa (GlcNac-PI, Mca) de *Trypanosoma brucei* involucrada en la biosíntesis de glicosilfosfatidilinositol (Urbaniak *et al.*, 2005). Aunque estas proteínas no presentan una identidad de secuencia significativa con GalB, si poseen características bioquímicas comunes. En el caso de la proteína LpxC, la cual parece haber sufrido una inversión génica, (Tabla 12), se observó una inactivación de la enzima durante el proceso de purificación, al igual que ocurre con GalB (Tabla 8). Se ha sugerido que esta inactivación de LpxC es debida a un exceso de zinc, al igual que ocurre con la proteína Mca (Urbaniak *et al.*, 2005) y otras zinc-hidrolasas (Larsen y Auld, 1989). Esta inactivación viene mediada por la unión de un segundo átomo de zinc, cuando éste se encuentra en exceso, cercano al centro catalítico (sitio de inhibición), el cual hace que el zinc que se encuentra unido en el verdadero sitio catalítico cambie en parte su conformación, impidiendo de esta forma la catálisis. Este efecto, que se produce en numerosas zinc-hidrolasas mononucleares

parece responder a estados intermedios en la evolución entre enzimas mononucleares y binucleares (Larsen y Auld, 1989; Jackman *et al.*, 1999; Hernick y Fierke, 2005). En el caso de GalB, la inactivación durante el proceso de purificación no parece que sea debida a la presencia de un segundo átomo de zinc, ya que no hay inhibición de la actividad hidratasa cuando la proteína GalB, bien en extractos o purificada, se incuban en 2 mM de Zn^{2+} (datos no mostrados). Por el contrario, la inhibición de la actividad de GalB ocurre cuando hay bajas concentraciones de Zn^{2+} , ya sea por dilución del Zn^{2+} presente en los extractos celulares o por la incubación de dichos extractos con agentes quelantes de iones divalentes (Fig. 35), indicando que el proceso de inactivación de GalB durante la purificación vendría mediado por la pérdida del átomo de Zn^{2+} . Es importante destacar que la inactivación que se produce por la incubación de GalB con EDTA parece ser irreversible ya que no se recupera la actividad cuando la proteína GalB una vez tratada con EDTA, se incuba en presencia de Zn^{2+} . Este resultado sugiere un cambio estructural de la proteína GalB en el centro activo cuando pierde el ión metálico que la incapacitaría para tomarlo de nuevo. Este fenómeno ha sido observado frecuentemente en otras zinc-hidrolasas, como por ejemplo la proteína Mca, la cual únicamente recupera el 28% de su actividad inicial cuando, después de ser tratada con agentes quelantes, es incubada nuevamente con zinc (Urbaniak *et al.*, 2005).

Un modelo de la estructura tridimensional de GalB, realizado en base a la estructura conocida de la proteína TT1542 de *T. thermophilus*, una proteína de función desconocida (Handa *et al.*, 2003), reveló que los residuos que fueron propuestos como candidatos a formar parte del bolsillo catalítico de la proteína TT1542 se encontraban conservados, tanto a nivel de estructura primaria como espacialmente, en la proteína GalB, incluidos los 3 residuos (His14, Asp17 e His127) que estarían coordinando el átomo de Zn^{2+} (Fig. 41). Igualmente estos 3 residuos se conservaban en el espacio cuando se realizó un modelo tridimensional del centro activo de GalB tomando el de la deacetilasa MshB como modelo (Fig. 42), sugiriendo que dichos residuos estarían efectivamente encargados de coordinar el zinc en la proteína GalB. Esta hipótesis se confirmó experimentalmente sustituyendo estos tres residuos por residuos de Ala y comprobando que las correspondientes proteínas mutantes GalBH14A, GalBD17A y GalBH127A no poseían actividad OMA hidratasa y su contenido en Zn^{2+} era inferior al 10% del contenido en Zn^{2+} que presentaba la proteína parental (Fig. 43). La proteína mutante control GalBH198A, que no debería tener alterada su actividad y contenido en Zn^{2+} ya que el residuo H198 no se predice situado cerca del centro activo, se comportó

como la proteína parental GalB (Fig. 43). Estos resultados confirmaban la especificidad del efecto observado con la sustitución de los residuos His14, Asp17 e His127, y la implicación de estos residuos en la catálisis mediada por GalB. La participación de, al menos, dos histidinas en la catálisis está en consonancia con la significativa pérdida de actividad observada cuando la proteína GalB era tratada con DEPC, un conocido agente que modifica residuos de histidina (Fig. 36). Estudios similares de mutagénesis dirigida de los residuos implicados en la coordinación del Zn^{2+} en otros miembros de la superfamilia de las zinc-hidrolasas ya han sido descritos (Medina *et al.*, 1991; Kiefer y Fierke, 1994; McCafferty *et al.*, 1997; Fu *et al.*, 1998; Jackman *et al.*, 1999, 2001; Urbaniak *et al.*, 2005), y revelan resultados similares a los obtenidos en esta tesis con GalB.

GalB presenta, por tanto, propiedades bioquímicas y estructurales muy similares a las de algunos miembros de la superfamilia de las zinc-hidrolasas. Sin embargo, GalB es única dentro de esta superfamilia ya que no cataliza una reacción de hidrólisis sino de hidratación del correspondiente sustrato (Coleman, 1998; Auld, 2001; Hernick y Fierke, 2005). Dado que muy probablemente el mecanismo por el cual se incorpora el ión hidroxilo debe ser muy similar a como ocurre en las zinc-hidrolasas, el mecanismo de hidratación puede entenderse como una hidrólisis incompleta (rotura de un doble enlace) debido a las características del sustrato.

Cuando se realizó un alineamiento de la región N-terminal de distintos miembros de la familia Pig-L (Fig. 77), se pudo observar que el primer residuo Asp del motivo consenso **V X (P/A) H (P/S) (D/A) D**, presente en las deacetilasas dependientes de Zn^{2+} , se encuentra sustituido por Ala en GalB y sus ortólogos en otros *clusters* de degradación de GA así como en *clusters galBCD* de función desconocida presentes en otras bacterias (ver apartado 4 de Discusión). Adicionalmente, el quinto residuo del motivo consenso es una Pro en los grupos de deacetilasas analizadas, siendo mayoritariamente una Ser en GalB y sus ortólogos (Fig. 77). Esta observación sugiere que la presencia de los residuos Ala y Pro en las posiciones 5 y 6 del motivo consenso de la familia Pig-L podría definir una nueva subfamilia de enzimas mononucleares dependientes de Zn^{2+} cuya actividad no es hidrolítica sino hidratasa. De hecho, cuando se sustituye la Ala16 de GalB por el residuo Asp equivalente presente en las hidrolasas, la proteína GalBA16D mutante retiene aproximadamente el 20% del contenido en Zn^{2+} de la proteína parental, pero pierde gran parte de la actividad OMA hidratasa (Fig. 43), lo que sugiere que este residuo es importante, no sólo para la interacción con el Zn^{2+}

sino para la catálisis, pudiendo estar implicado en la interacción con alguno de los intermediarios de reacción de hidratación. Dado que un resultado similar se ha obtenido cuando se sustituye el Asp por Ala en zinc-hidrolasas (Jackman *et al.*, 2001; Urbaniak *et al.*, 2005), la hipótesis de que el Asp esté implicado en la reacción de hidrólisis y la Ala en la de hidratación es plausible. Por otra parte, en lo que se refiere al primer residuo del motivo consenso, no parece que sea invariablemente una Val como se ha descrito, ya que si bien es el aminoácido que con mayor frecuencia aparece, puede ser sustituido por otro aminoácido hidrofóbico, i. e., Leu, Ile o Phe (Fig. 77). Mayor variabilidad se encuentra en el segundo residuo del motivo consenso, no obstante, se pueden observar ciertos patrones, como la presencia invariable de una His en todas las deacetilasas ortólogas a las proteínas MshB o Mca, una Ile mayoritariamente en las deacetilasas ortólogas a Pig-L, una Ser, pudiendo ser sustituida por The en las proteínas ortólogas a GalB, o una Ala en las proteínas ortólogas a TT1542 (Fig. 77). Esta variabilidad parece sugerir que este residuo estaría implicado en discernir entre los diferentes sustratos más que en discernir entre un mecanismo de catálisis de hidratación o hidrólisis. No obstante, se necesitan más estudios bioquímicos, enzimáticos y estructurales para probar esta hipótesis y conocer en detalle el mecanismo por el cual GalB cataliza la hidratación de OMA_{enol} para producir CHA. De cualquier forma, los resultados presentados en esta tesis permiten extender la familia de las zinc-hidrolasas incluyendo a otros tipos de enzimas, tales como la hidratasa GalB que no desarrolla una función hidrolítica.

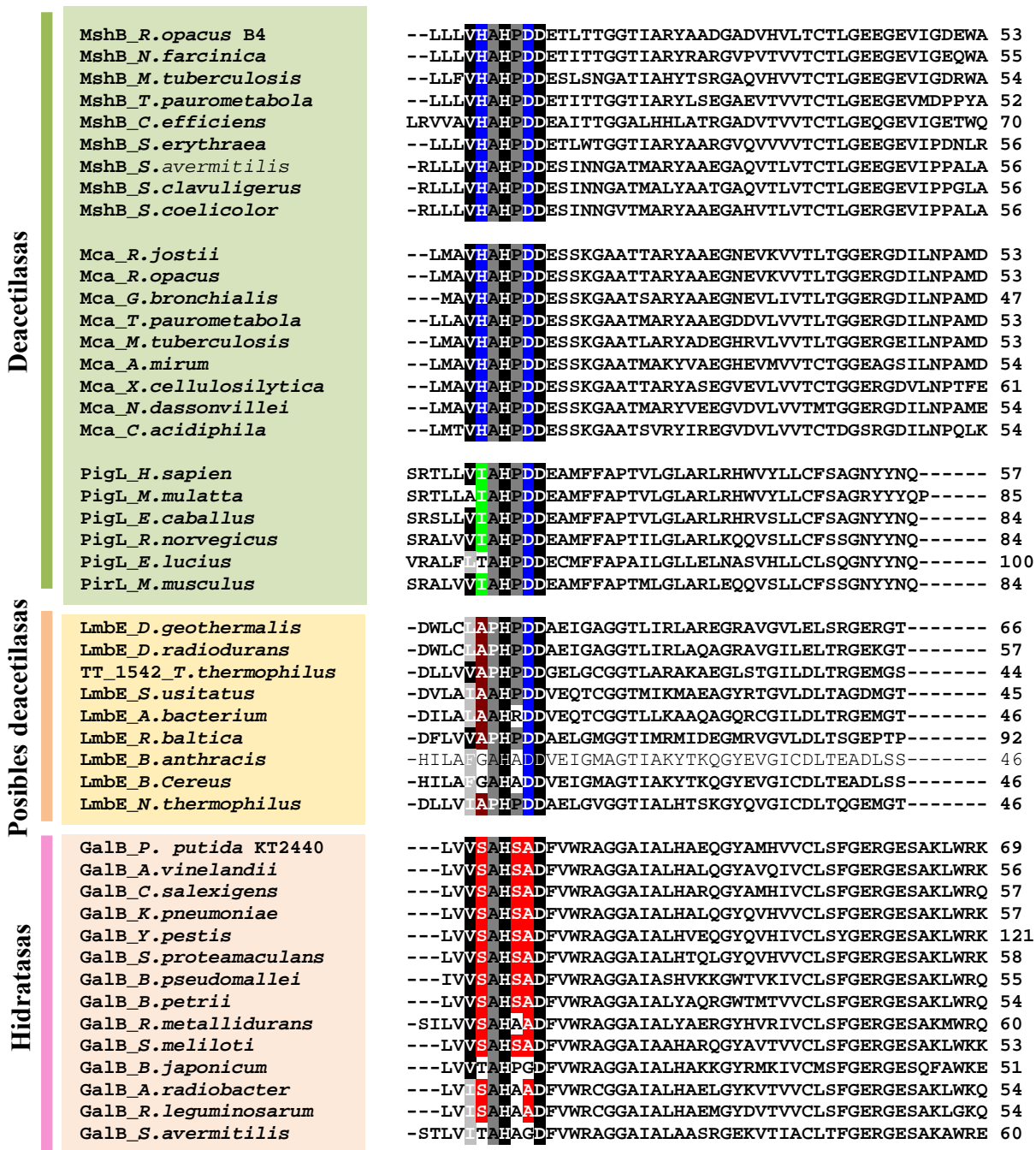


Figura 77. Alineamiento de la región N-terminal de algunas proteínas de la familia PigL. Se sombreen los aminoácidos que se conservan dentro del motivo consenso de unión a Zn^{2+} V X (P/A) H (P/S) (D/A) D. En negro se sombreen los 3 residuos propuestos como invariables dentro del motivo consenso, i. e., la Val que ocupa la primera posición y la His y el Asp que ocupan las posiciones 4 y 7, respectivamente. En azul se sombrea el Asp que ocupa la posición 6 del motivo y es característico de esta posición en Zinc-deacetilasas. En rojo se sombreen los residuos conservados únicamente en las zinc-hidratasas. Se sombrea de verde la Ile característica de la posición 2 en las proteínas PigL y en marrón la Ala característica de esta posición en las proteínas anotadas como LmbE. Los números de acceso de las proteínas utilizadas en el alineamiento son:

Figura 77. (Continuación). MshB de *Rhodococcus opacus* B4 (YP_002783188); MshB de *Nocardia farcinica* IFM 10152 (YP_120973); MshB de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv (NP_215686); MshB de *Tsukamurella paurometabola* DSM 20162 (ZP_04027633); MshB de *Saccharopolyspora erythraea* NRRL 2338, (YP_001103265); MshB de *Corynebacterium efficiens* YS-314 (NP_737768); MshB de *Streptomyces avermitilis* MA-4680 (NP_824314); MshB de *Streptomyces clavuligerus* ATCC 27064 (YP_002193070); MshB de *Streptomyces coelicolor* A3 (NP_629275); Mca de *Rhodococcus jostii* RHA1 (YP_705787); Mca de *Rhodococcus opacus* B4 (YP_002783106); Mca de *Gordonia bronchialis* DSM 43247 (ZP_03887156); Mca de *Tsukamurella paurometabola* DSM 20162 (ZP_04028851); Mca de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv (NP_215598); Mca de *Actinosynnema mirum* DSM 43827 (ZP_03816625); Mca de *Xylanimonas cellulositytica* DSM 15894 (ZP_03912799); Mca de *Nocardiopsis dassonvillei* subsp. *dassonvillei* DSM 43111 (ZP_04331762); Mca de *Catenulispora acidiphila* DSM 44928 (ZP_04370860); PigL de *Homo sapien* (AB017165); PigL de *Macaca mulatta* (XP_001088273); PigL de *Equus caballus* (XP_001504923); PigL de *Rattus norvegicus* (NP_620256); PigL de *Esox lucius* (ACO14133); PigL de *Mus musculus* (BAC87658); LmbE de *Deinococcus geothermalis* DSM 11300 (YP_605766); LmbE de *Deinococcus radiodurans* R1 (NP_296086); TT_1542 de *Thermus thermophilus* HB8 (YP_144466); LmbE de *Solibacter usitatus* Ellin 6076 (YP_826049); LmbE de *Acidobacteria bacterium* Ellin 345 (YP_592508); LmbE de *Rhodopirellula baltica* SH 1 (NP_869207); LmbE de *Bacillus anthracis* str. Ames (NP_844007); LmbE de *Bacillus Cereus* (2IXD); LmbE de *Natranaerobius thermophilus* JW/NM-WN-LF (YP_001917446); GalB de *P.putida* KT2440 (NP_744663); GalB de *Azotobacter vinelandii* DJ (YP_002800266); GalB de *Chromohalobacter salexigens* DSM 3043 (YP_572391); GalB de *Klebsiella pneumoniae* 342 (YP_002235929); GalB de *Yersinia pestis Antiqua* (YP_653365); GalB de *Serratia proteamaculans* 568 (YP_001478323); GalB de *Burkholderia pseudomallei* NCTC 13177 (ZP_02494348); GalB de *Bordetella petrii* DSM 12804 (YP_001632217); GalB de *Ralstonia metallidurans* CH34 (YP_586340); GalB de *Sinorhizobium meliloti* 1021 (NP_385870); GalB de *Bradyrhizobium japonicum* USDA 110 (NP_770481); GalB de *Agrobacterium radiobacter* K84 (YP_002544918); GalB de *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* 3841 (YP_768438); GalB de *Streptomyces avermitilis* MA-4680 (NP_822794).

En conclusión, GalB constituye el prototipo de una nueva familia de hidratatas no descrita hasta la fecha cuyo centro activo y su dependencia del Zn^{2+} para la catálisis podrían tener un origen evolutivo común con el de algunos miembros de las zinc-hidrolasas (familia Pig-L) o, por el contrario, ser un ejemplo de convergencia evolutiva entre ambos grupos de enzimas.

1.4. El gen *galC* codifica una CHA aldolasa de la clase II.

La última etapa en la degradación de OMA en bacterias consiste en la rotura aldólica del CHA para producir un mol de piruvato y un mol de oxalacetato (Tack *et al.*, 1972b; Spornins y Dagley, 1975) (Fig. 7). Esta reacción se encuentra catalizada por la 4-carboxi-4-hidroxi-2-oxoadipato (CHA) aldolasa, una enzima que ha sido caracterizada bioquímicamente en la degradación de GA en *P. putida* (Tack *et al.*, 1972a) de fthalato (ProA) en *P. ochraceae* (Maruyama *et al.*, 2001) y de derivados de la lignina (LigK) a en *S. paucimobilis* SYK-6 (Hara *et al.*, 2003), conociéndose en éstos dos últimos casos sus determinantes genéticos. Dado que la proteína GalC presentaba una alta identidad de secuencia con LigK, y ProA (Tabla 5), era lógico pensar que sería la aldolasa encargada de finalizar la ruta de degradación de GA en *P. putida* KT2440.

La disrupción del gen *galC* en la cepa *P. putida* KTGALd*galC* iba acompañada de la pérdida de la capacidad de crecimiento en GA, lo que evidenciaba que este gen era imprescindible para completar la ruta de degradación de GA en *P. putida* (Tabla 6). Por otra parte, la ausencia de actividad CHA aldolasa en esta cepa mutante y su recuperación en la cepa *P. putida* KTGALd*galC* conteniendo el plásmido pIZGalC demostraba que el gen *galC* codificaba efectivamente una CHA aldolasa. Así pues, en esta tesis se ha identificado por primera vez el gen *galC* que codifica la CHA aldolasa de *P. putida*. El gen *galC* fue clonado en el plásmido de hiperexpresión pET-29a (+) y la proteína hiperproducida en *E. coli* (Fig. 45), utilizándose extractos crudos de esta cepa recombinante para estudiar algún aspecto concreto de la actividad enzimática sobre CHA.

La confirmación de los productos de la rotura aldólica del CHA se realizó mediante la demostración de la formación de un mol de piruvato como consecuencia de la actividad enzimática de GalC sobre un mol de CHA en un ensayo acoplado, y comprobando en ensayos a tiempos largos la formación de un segundo mol de piruvato como consecuencia de la descarboxilación espontánea que sufre el oxalacetato en el medio de reacción como ya había sido descrito (Tack *et al.*, 1972a).

Como se ha dicho anteriormente la CHA aldolasa de *P. putida* había sido caracterizada bioquímicamente en los años 70, observándose que su actividad enzimática dependía de la presencia de Mg²⁺ en el ensayo, si bien el Mn²⁺ podía sustituir al primero en la catálisis (Tack *et al.*, 1972a). Tack y colaboradores demostraron una K_m para el CHA de 290 μ M y observaron que el oxalacetato era un

potente inhibidor de la enzima, calculándose una K_i de 83 μM , mientras que, por el contrario, una concentración de 500 μM de piruvato no tenía ningún efecto inhibitor en la actividad. Más recientemente han sido caracterizadas las CHA aldolasas ProA y LigK de *P. ochraceae* (Maruyama *et al.*, 2001) y *S. paucimobilis* SYK-6 (Hara *et al.*, 2003), respectivamente, encontrándose la misma dependencia por el ión Mg^{2+} y unas K_m y $V_{m\acute{a}x}$ de 15,2 μM y 135 $\mu\text{moles}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg prote\acute{i}na}^{-1}$ para la primera y 11,2 μM y 265 $\mu\text{moles}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg prote\acute{i}na}^{-1}$ para la segunda. Las diferentes afinidades observadas entre, por un lado, la aldolasa de *P. putida* y, por otro lado, las de *S. paucimobilis* y *P. ochraceae*, reflejan las diferencias existentes entre estos dos grupos de aldolasas respecto a la especificidad de sustrato. Así, mientras que los dos isómeros del CHA, *d*-CHA y *l*-CHA, parecen ser sustratos de las aldolasas LigK y ProA, aunque presentan una mayor afinidad por el isómero *l*-CHA lo que permite sugerir a éste como sustrato fisiológico de la enzima (Maruyama, 1990b; Maruyama *et al.*, 2001; Hara *et al.*, 2003), la aldolasa de *P. putida* parece reconocer únicamente el isómero levógiro (Tack *et al.*, 1972a). Interesantemente, la enzima de *P. putida* parece presentar una mayor especificidad de sustrato, ya que ni el 4-hidroxi-2-oxovalerato ni el 4-hidroxi-2-oxocaproato, los cuales son intermediarios en la ruta de degradación *meta* del catecol y del 4-metilcatecol, respectivamente, son reconocidos como sustratos (Tack *et al.*, 1972a) y, por el contrario, sí son reconocidos aunque con baja afinidad por la aldolasa ProA de *P. ochraceae* (Maruyama, 1990b). Además, mientras que las aldolasas de *S. paucimobilis* SYK-6 y *P. ochraceae* parecen reconocer oxalacetato como sustrato, descarboxilándolo a piruvato y regulando de esta forma la producción de oxalacetato en la célula (Maruyama, 1990a), el oxalacetato es un potente inhibidor para la aldolasa de *P. putida* (Tack *et al.*, 1972a), como queda confirmado en esta tesis con los estudios realizados con GalC, los cuales no permitieron detectar la actividad β -descarboxilasa sobre el oxalacetato.

Tack y colaboradores demostraron que la CHA aldolasa de *P. putida* tenía un peso molecular aproximado de 27 kDa en buena concordancia con el peso molecular observado para GalC (Fig. 45), y que la estructura cuaternaria de la proteína estaba formada por 6 unidades idénticas unidas a través de puentes disulfuro (Tack *et al.*, 1972a). La misma estructura cuaternaria fue descrita para las aldolasas de *S. paucimobilis* SYK-6, LigK (Hara *et al.*, 2003) y *P. ochraceae*, ProA (Maruyama, 1990b).

Resulta interesante el hecho de que la proteína ProA de *P. ochraceae* sea activada por diferentes aniones divalentes, tales como X-PO₃²⁻, HO-AsO₃²⁻ y CO₃²⁻, donde X representaría un pequeño grupo como OH (Pi), H (ácido fosfórico), CH₃COO (acetilfosfato) o PO₄²⁻ (PPi). El Pi y el arsenato fueron los más potentes activadores, indicando que un grupo hidroxilo es necesario para la máxima activación (Maruyama, 1990a). Algunas aldolasas y metiltransferasas como la α -amilasa, la sulfatasa de hígado (Webb y Morrow, 1959), la aspartato acetiltransferasa (Goldstein, 1959), la fumarasa de corazón de cerdo (Massey, 1953) o la tetrahidropteriltriglutamato metiltransferasa de *E. coli* (Whitfield et al., 1970) entre otras, también se activan fuertemente por este tipo de aniones divalentes. Este efecto activador igualmente ha sido observado en la CHA aldolasa de *S. paucimobilis* SYK-6 (LigK) (Hara et al., 2003). En *P. ochraceae* se ha sugerido que tanto los niveles de Mg²⁺ como de Pi modulan la actividad CHA aldolasa en la célula estando esta actividad controlada sensiblemente por pequeños cambios locales en la concentración intracelular de Mg²⁺ (Maruyama, 1990a). Así, unos altos niveles de ATP intracelulares, encontrándose éste formando el complejo Mg²⁺-ATP²⁻, no permitirían a estos compuestos actuar como activadores de la enzima. Por el contrario, una bajada en los niveles de ATP conduciría a un incremento en los niveles de Mg²⁺ intracelular, ocasionando una mayor actividad de la enzima. Se podría especular que los niveles de ATP en la célula estarían, de alguna manera, regulando la actividad de estas enzimas, convirtiendo el último paso enzimático de la degradación de ftalato (*P. ochraceae*), derivados de lignina (*S. paucimobilis*) o GA (*P. putida*) en una etapa altamente regulada a nivel bioquímico, ya que al efecto retroinhibidor del oxalacetato habría que sumarle el efecto regulador conducido por los niveles energéticos de la célula.

En general, las aldolasas han sido clasificadas tradicionalmente en dos grupos, clase I y clase II, diferenciadas en función de su mecanismo catalítico. Las aldolasas de la Clase I no requieren de iones metálicos y utilizan un enlace imino entre un residuo de lisina del centro activo y un grupo carboxilo del sustrato para producir la rotura aldólica. Por el contrario, las aldolasas de la clase II utilizan, un ión metálico en la catálisis. Aunque la clasificación de las aldolasas en estos dos grandes grupos responde a criterios muy generales y agrupa a enzimas que no presentan identidad de secuencia significativa, las CHA aldolasas evidencian una gran dependencia por cationes divalentes, especialmente Mg²⁺, lo que las agrupa dentro de la clase II de aldolasas.

La comparación de la estructura primaria de GalC con la de otras proteínas revela que no presenta una similitud significativa con otras aldolasas distintas a las CHA aldolasas ya caracterizadas, e.g., LigK (Hara *et al.*, 2003), FldZ (Wattiau *et al.*, 2001) o ProA (Maruyama *et al.*, 2004). No obstante, GalC presenta aproximadamente un 40 % de identidad con diferentes proteínas depositadas en las bases de datos y anotadas como metiltransferasas dependientes de S-adenosilmetionina (SAM) (Fig. 78), de hecho, GalC está anotada en el genoma de *P. putida* KT2440 como una metiltransferasa dependiente de SAM (Nelson *et al.*, 2002). No obstante, recientemente se ha sugerido que la anotación de estas proteínas en multitud de genomas como metiltransferasas SAM-dependientes es errónea, ya que no presentan los motivos de estructura terciaria que caracterizan a las metiltransferasas (Johnston *et al.*, 2003). Así, una de estas proteínas erróneamente anotada como metiltransferasa es la proteína Rv3853 de *M. tuberculosis* la cual presenta plegamientos típicos de dominios fosfohistidina y de sistemas de transferencia de grupos fosfatos (Johnston *et al.*, 2003). Así, la activación por iones fosfato observado en las CHA aldolasas podría explicarse por la similitud que poseen éstas con proteínas que poseen plegamientos típicos de sistemas de transferencia de grupos fosfatos. Utilizando como molde la proteína de estructura conocida Rv3853 de *M. tuberculosis* se realizó un modelo de la estructura tridimensional de la proteína GalC. El modelo del número de GalC está compuesto por 8 cadenas β y 6 hélices α que se organizan como un sandwich α - β - β - α . La primera capa (S1) de láminas β está compuesta en orden por β 1, β 7 y β 8. La segunda lámina β (S2) está formada por las cadenas β 4, β 3, β 2, β 5 y β 6. Las hélices α del extremo N-terminal, α 1 y α 2, empaquetan la primera lámina S1, mientras que las hélices α 3 y α 4 hacen lo propio con la lámina S2. El extremo C-terminal de GalC contiene dos largas hélices- α , α 5 y α 6, que estarían involucradas en la oligomerización de la proteína al igual que ocurre con la proteína Rv3853 (Fig. 79).

La comparación de las secuencias de distintas CHA aldolasas con las de la proteína Rv3853 y alguna de sus homólogos, junto con la información obtenida tras la resolución de la estructura terciaria de esta última proteína (Johnston *et al.*, 2003), ha permitido identificar una serie de residuos altamente conservados en este conjunto de proteínas que podrían estar participando en el mantenimiento de la estructura terciaria unos (Gly59, Gly84, Gly101, Gly115, Gly167 y Gly176 en GalC) y formando parte del hipotético centro catalítico otros (residuos His35, Thr63, Asp69, Asn70, Ala90, Arg123 y Asp173 en GalC (Fig. 78).

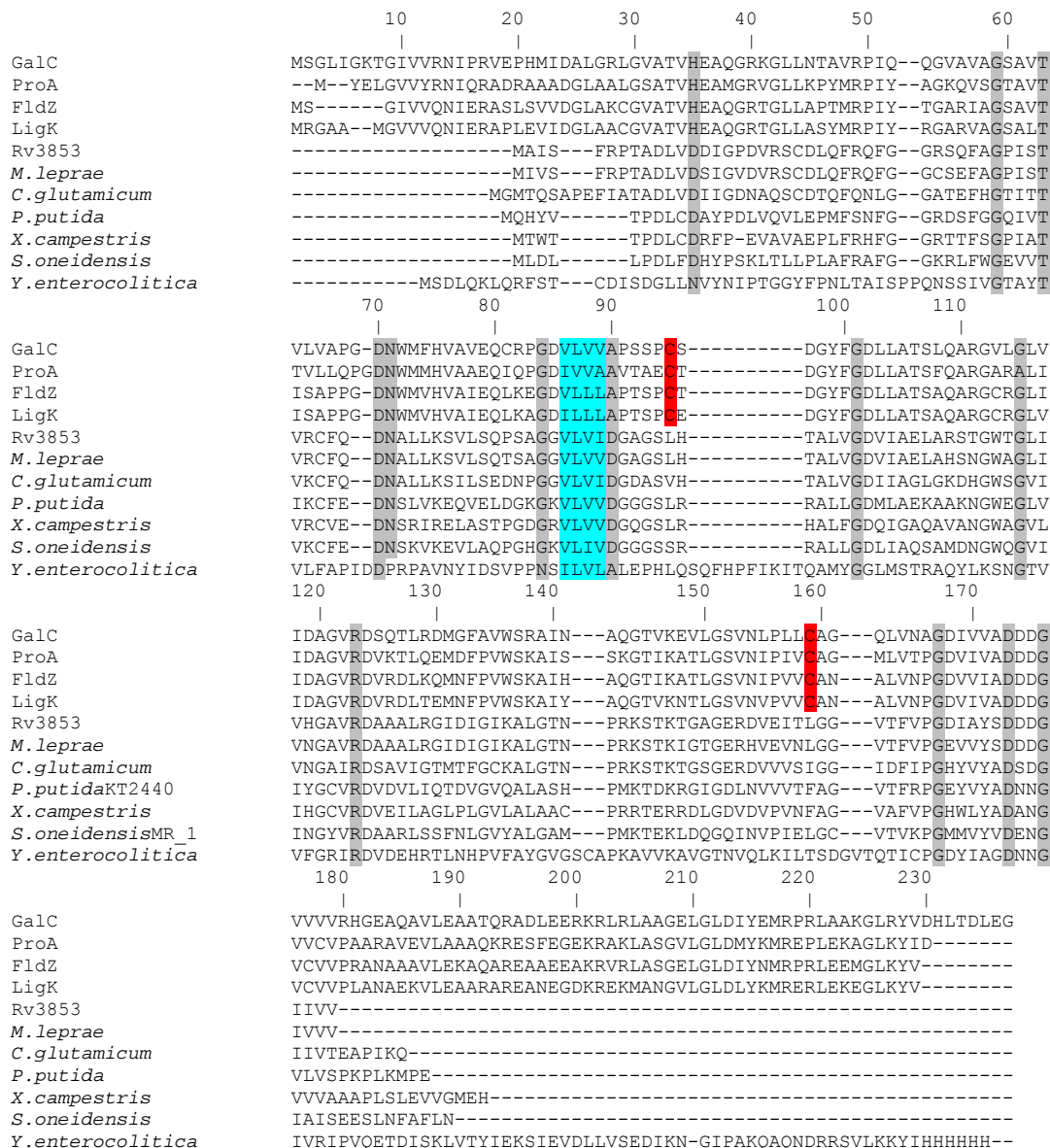


Figura 78. Alineamiento de las CHA aldolasas GalC, ProA, FldZ y LigK con proteínas erróneamente clasificadas como miembros de la familia de metilasas dependiente de SAM. El alineamiento se realizó con el programa ClustalW. Los aminoácidos conservados y sugeridos como importantes, estructural o funcionalmente se encuentran sombreados en gris. La región hidrofóbica conservada en todo este grupo de proteínas se indica en azul, sombreándose en rojo los residuos de cisteína conservados en las CHA aldolasas. La numeración de los residuos correspondiente a GalC se indica en la parte superior del alineamiento. Las proteínas utilizadas en el alineamiento fueron: ProA de *Pseudomonas straminea* (*P. ochraceae*) (BAB21456); FldZ de *Sphingomonas* sp. LB126 (CAB87566); LigK de *S. paucimobilis* SYK-6 (BAB88738); Rv3853 de *Mycobacterium Tuberculosis* (1NXJ); y las proteínas de *Corynebacterium glutamicum* (Q8NRW6); *P. putida* KT2440 (NP_744234); *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* str. B100 (YP_001902931); *Shewanella oneidensis* MR-1 (NP_719725); *Yersinia enterocolitica* subsp. *enterocolitica* 8081 (CAL10244)

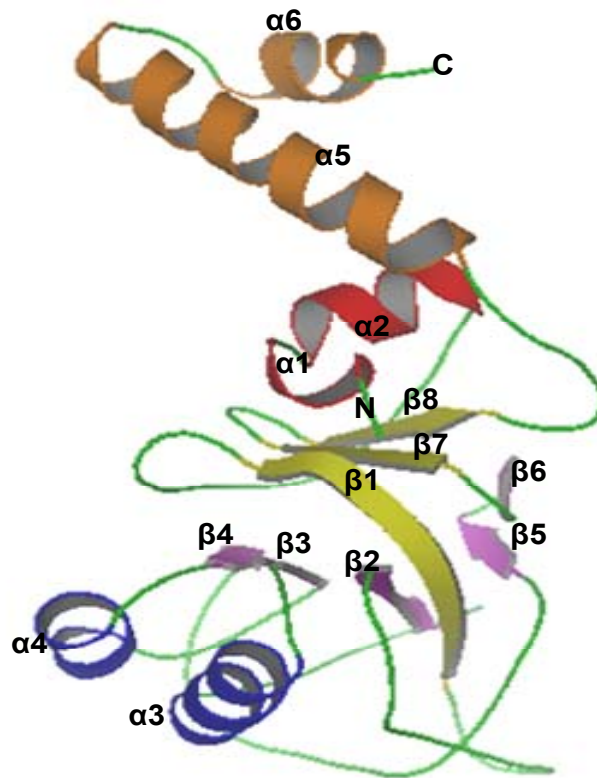


Figura 79. Modelo tridimensional de la proteína GalC. El modelo fue realizado utilizando la proteína Rv3853 de *M. tuberculosis* como molde. Se muestran en amarillo y morado las láminas β S1 y S2, respectivamente. En rojo y azul se indican las hélices α que flanquean S1 y S2, respectivamente y en naranja se muestran las dos hélices α del extremo C-terminal, las cuales estarían implicadas en la oligomerización de la proteína. Los bucles que conectan estos elementos de estructura secundaria se muestran en verde. La figura fue preparada con el programa PyMol (DeLano, 2002).

Merece la pena destacar la conservación de dos Cys entre las CHA aldolasas, (Cys 95 y C159 en GalC) (Fig. 78), que podrían jugar un papel importante en la catálisis, toda vez que la proteína LigK veía inhibida su actividad enzimática cuando se incubaba con 1 mM de HgCl_2 o *N*-etilmaleimida, sugiriendo de esta forma que alguna Cys debería estar implicada en la catálisis (Hara *et al.*, 2003). El modelo de la estructura tridimensional propuesto para GalC en esta tesis constituye el punto de partida para realizar un análisis detallado de los residuos clave y el mecanismo catalítico de las CHA aldolasas en un futuro próximo.

Los resultados obtenidos en esta Tesis doctoral en el estudio y caracterización de los genes *gal* catabólicos y sus productos génicos en *P. putida* KTGAL se resumen en la figura 80.

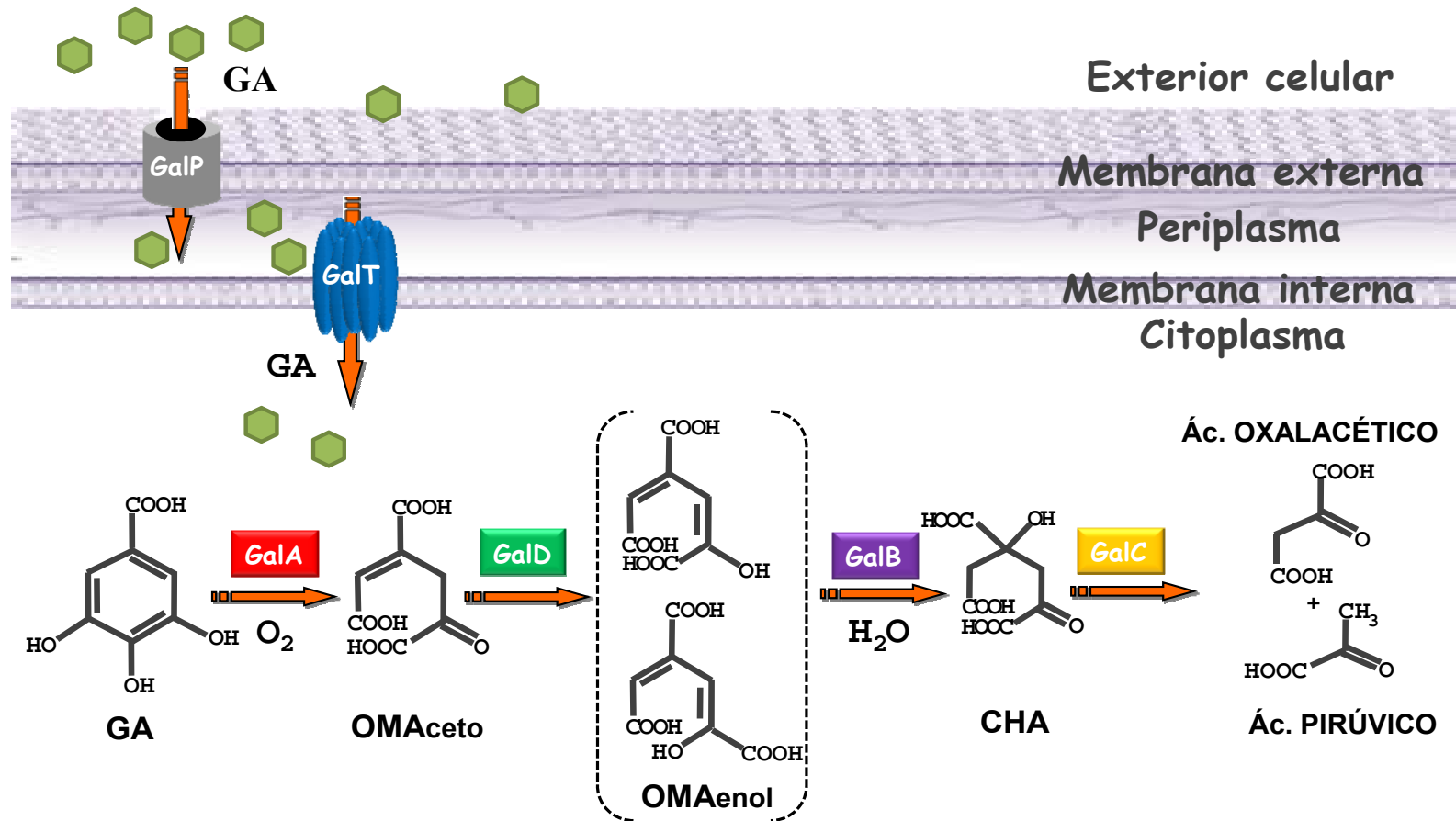


Figura 80. Ruta de degradación del GA en *P. putida* KTGAL. Se muestra la reacción enzimática o proceso de transporte llevado a cabo por cada una de las proteínas Gal. Se representa mediante hexágonos verdes el GA durante el proceso de transporte a través de la membrana. Las proteínas se representan mediante el siguiente código de colores: en gris, la porina que lleva a cabo el transporte del GA a través de la membrana externa (GalP); en azul oscuro, la permeasa que lleva a cabo el transporte del GA a través de la membrana interna (GalT); en rojo, la galato dioxigenasa (GalA); en verde, la ceto-enol OMA isomerasa (GalD), en morado, la OMA hidratasa (GalB) y en amarillo, la CHA aldolasa (GalC). Igualmente se muestra el nombre y la estructura química de cada uno de los intermediarios que participan en la ruta de degradación.

2. Identificación y caracterización de los genes *galTP* implicados en el transporte de GA al interior celular.

Si bien muchos de los compuestos aromáticos pueden atravesar la envuelta bacteriana mediante difusión pasiva dado su carácter hidrofóbico (Kashket, 1985), la presencia de elementos de transporte específicos incrementa significativamente la velocidad de entrada de estos compuestos al interior celular, especialmente cuando éstos se encuentran en el medio a concentraciones bajas. En este sentido, durante las últimas dos décadas se han ido acumulando evidencias que confirman que la estrategia de un transporte activo para este tipo de compuestos está ampliamente distribuida en bacterias (Groenewegen *et al.*, 1990; Allende *et al.*, 1992; Locher *et al.*, 1993; Harwood *et al.*, 1994; Míguez *et al.*, 1995; Saint y Romas, 1996; Prieto y García, 1997; Leveau *et al.*, 1998; Olivera *et al.*, 1998; Mooney *et al.*, 2006; Hearn *et al.*, 2008; Jiménez *et al.*, 2008). Así, el análisis del genoma de *P. putida* KT2440 ha permitido identificar una gran variedad de hipotéticas proteínas transportadoras de compuestos aromáticos (Jiménez *et al.*, 2002; Jiménez *et al.*, 2004), y se ha estimado que aproximadamente un 20% de los *orfs* de esta bacteria codifican proteínas transportadoras de algún tipo de compuesto (Nelson *et al.*, 2002; dos Santos *et al.*, 2004).

2.1. GalT un nuevo miembro de la subfamilia AAHS de transportadores involucrado en transporte y en quimiotaxis hacia GA.

El proceso de adaptación de *P. putida* KT2440 a la utilización de GA como fuente de carbono y energía (Fig. 12) y la posterior secuenciación del *cluster gal* en la cepa resultante *P. putida* KTGAL (Fig. 13) había mostrado que una única mutación, la delección del nucleótido C localizado en la posición 2867088 del genoma (Fig. 13), era responsable de este cambio fenotípico. La mutación tenía lugar en el gen *galT** y ocasionaba la eliminación de un supuesto cambio de fase de lectura anotado en la secuencia del genoma (Nelson *et al.*, 2002), evitando de esta forma la traducción de una proteína GalT* truncada en su dominio C-terminal. El nuevo gen *galT* de la cepa *P. putida* KTGAL codifica una permeasa de membrana interna (GalT) que pertenece a la superfamilia de transportadores MFS. Los experimentos de transporte realizados tanto con la cepa *P. putida* KT2440 como con la cepa adaptada *P. putida* KTGAL ponían de manifiesto que mientras que la cepa KT2440 era incapaz de transportar GA, la cepa

adaptada KTGAL mostraba un eficiente transporte de GA que era inducible cuando las células se cultivaban en presencia de este ácido aromático (Fig. 46). Estos resultados demuestran que la proteína GalT interviene en el transporte de GA al interior celular y que esta permeasa es una proteína esencial para el crecimiento de *P. putida* en GA. De hecho, *galT* constituye uno de los pocos ejemplos en los que se demuestra que los transportadores de compuestos aromáticos pueden ser esenciales también para el crecimiento de los cultivos en condiciones de laboratorio. Así, el papel de los transportadores en el catabolismo de compuestos aromáticos se hace más patente cuando la concentración de dichos compuestos no es muy elevada, situación frecuente en el medio ambiente, y su inactivación no suele ocasionar una deficiencia significativa del crecimiento en condiciones de laboratorio, donde se utilizan elevadas concentraciones (1-5 mM) del compuesto aromático (Díaz *et al.*, 2001). Otro ejemplo en el que la inactivación del transportador impide el crecimiento de la cepa mutante incluso en presencia de elevadas concentraciones del compuesto aromático son los mutantes de *P. putida* U en los genes *phaJ* (codifica un transportador de la familia sodio:soluto simporter (SSS) y *phaK* (codifica una porina de la familia OprD) de la ruta de degradación del fenilacetato, los cuales son incapaces de utilizar concentraciones milimolares de este compuesto aromático como única fuente de carbono (Olivera *et al.*, 1998). Dada la importancia del transportador en el metabolismo del GA en *P. putida*, se procedió a la clonación y expresión del gen *galT* en el plásmido promiscuo pIZGalT bajo el promotor heterólogo *Ptac* (Fig. 47). La expresión del gen *galT* parecía producir cierto efecto de toxicidad en *E. coli*, y tampoco fue posible visualizar la proteína GalT mediante análisis de SDS-PAGE en extractos de *P. putida* conteniendo el plásmido pIZGalT. Un resultado similar se ha descrito con el transportador PcaK de *P. putida*, el cual únicamente se pudo visualizar mediante SDS-PAGE utilizando marcaje radiactivo de la proteína hiperproducida en *E. coli* (Nichols y Harwood, 1997a). Sin embargo, el gen *galT* clonado en pIZGalT complementa la deficiencia de la cepa *P. putida* KT2440 para transportar GA (Tabla 9) y crecer en este compuesto como única fuente de carbono y energía (Fig. 48), corroborando que una proteína funcional GalT era la única causa responsable de la adaptación de la cepa *P. putida* KTGAL al crecimiento en GA.

Merece la pena destacar que la velocidad de transporte de GA en células de *P. putida* KTGAL (pIZGalT) cultivadas en presencia de GA es significativamente mayor que cuando las mismas células se cultivan en citrato (Tabla 9). Dado que el transporte a través de la membrana es un proceso reversible, éste se verá acelerado cuando se

produzca un consumo significativo del GA que va entrando al interior celular, situación que ocurre cuando las células se cultivan en presencia de GA. En condiciones de no inducción (crecimiento en citrato) el catabolismo del GA transportado al interior celular no se produce y, por tanto, se observa una menor velocidad de transporte. Este fenómeno ha sido igualmente descrito para otros sistemas transportadores MFS. Así, por ejemplo, la presencia o no de la dioxigenasa TfdA, encargada de iniciar la degradación de 2,4-diclorofenoxiacetato en *Cupriavidus necator* JMP134 (pJP4), antigua *Ralstonia eutropha* JMP134, hace variar ostensiblemente la velocidad de transporte de este aromático mediado por TfdK, un transportador de la superfamilia MFS, llegando incluso a no detectarse prácticamente transporte en la cepa mutante en el gen *tfdA* y sugiriéndose que la actividad de TfdA es el verdadero elemento limitante en la velocidad de transporte (Leveau *et al.*, 1998). En el mismo sentido, cuando se expresó en *E. coli* desde un plásmido multicopia el gen *pcaK* que codifica un transportador de 4-hidroxibenzoato (PcaK) de *P. putida* se observaron velocidades de transporte 20 veces menores que las detectadas en *P. putida* cultivada en 4-hidroxibenzoato donde el gen *pcaK* se encuentra presente en monocopia en el genoma de la bacteria (Nichols y Harwood, 1997a).

La proteína GalT presenta una alta especificidad de sustrato, ya que de una variedad de compuestos aromáticos estructuralmente relacionados, tan sólo GA y protocatecuato eran transportados por GalT (Tabla 10). La reducción a uno en el número de los grupos hidroxilos del anillo bencénico, la sustitución del grupo carboxilo o el aumento en la longitud de la cadena lateral, impiden que los correspondientes sustratos sean transportados por GalT (Tabla 10). No obstante, aún siendo transportadores específicos, existe cierta promiscuidad de sustrato en algunos transportadores de aromáticos de la superfamilia MFS. Así, la permeasa PcaK es capaz de transportar tanto 4-hidroxibenzoato como protocatecuato (Nichols y Harwood, 1997b), y HpaX, un transportador involucrado en la degradación del 4-hidroxifenilacetato en *E. coli*, transporta eficientemente compuestos relacionados tales como el 3-hidroxifenilacetato o el propio fenilacetato (Prieto y García, 1997).

GalT posee una K_m y una $V_{m\acute{a}x}$ aparentes para GA y protocatecuato de 3,2 μM y 7,2 $\text{nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg prote\acute{i}na}^{-1}$ y de 15,1 μM y 2,9 $\text{nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg prote\acute{i}na}^{-1}$, respectivamente (Fig. 49), siendo estos valores del mismo orden de magnitud que los ya determinados para otros transportadores de la misma familia, como por ejemplo TfdK, el cual posee una $V_{m\acute{a}x}$ y K_m aparentes para el 2,4-diclorofenoxiacetato de 20 $\text{nmol}\cdot\text{min}^{-1}$

$1 \text{ mg proteína}^{-1}$ y $5 \text{ }\mu\text{M}$, respectivamente (Leveau *et al.*, 1998), o PcaK, el cual posee una $V_{\text{máx}}$ y K_m aparentes para 4-hidroxibenzoato de $25 \text{ nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg proteína}^{-1}$ y $6 \text{ }\mu\text{M}$, respectivamente (Nichols y Harwood, 1997b). Todos estos datos tomados en su conjunto permiten definir a GalT como el primer transportador de alta afinidad y especificidad para GA que se describe en la literatura, el cual también es capaz de transportar protocatecuato.

Los experimentos realizados adicionando compuestos desacoplantes que disipan el potencial de membrana en los experimentos de transporte, revelan la pérdida de la capacidad de transportar GA en las células de *P. putida* KTGAL (pIZGalT) (Fig. 50), sugiriendo que es el potencial de membrana el que proporciona la energía para el transporte de GA mediado por GalT, al igual que ocurre con otros transportadores de compuestos aromáticos de la superfamilia MFS (Nichols y Harwood, 1997b; Prieto y García, 1997; Leveau *et al.*, 1998; Pao *et al.*, 1998; Saier *et al.*, 1999).

La superfamilia MFS de transportadores es el grupo de permeasas energizadas por potencial electroquímico más extendida entre los organismos vivos, estando presente tanto en bacterias, como en arqueas y eucariotas. Dentro de esta superfamilia se encuentran transportadores que funcionan como uniporters, como soluto/cación simporters, soluto/cación antiporters y/o soluto/soluto antiporters (Pao *et al.*, 1998). A día de hoy, la superfamilia está compuesta por 64 familias, agrupadas en función de la especificidad de sustratos que presentan. (<http://www.tcdb.org/tcdb/index.php?tc=2.A.1>) Aunque en un principio se creyó que únicamente transportaban azúcares (Maiden *et al.*, 1987), estudios posteriores demostraron que este tipo de transportadores sirven como sistemas de eflujo de distintas drogas y transportadores de metabolitos del ciclo de Krebs (Griffith *et al.*, 1992; Paulsen *et al.*, 1996). La familia fue luego expandida incluyendo intercambiadores organofosfatos:fosfato y permeasas de simporte oligosacáridos: H^+ (Marger y Saier, 1993). Finalmente, se han incluido en la superfamilia una serie de transportadores bacterianos que transportan ácidos aromáticos y que constituyen la denominada familia de simporter ácidos aromáticos: H^+ (AAHS) (Pao *et al.*, 1998), siendo el transportador de protocatecuato y 4-hidroxibenzoato de *P. putida*, la proteína PcaK (Harwood *et al.*, 1994; Nichols and Harwood, 1997), el prototipo y el miembro mejor estudiado. Siguiendo el sistema de clasificación propuesto para los transportadores (TC), a la proteína PcaK se le ha asignado el número (TC: 2.A.1.15.1) (Saier *et al.*, 1999), en donde los números 2.A.1 hacen referencia a la superfamilia MFS, el 15 a la familia

AAHS y el 1 a la especificidad de sustrato de esta proteína. Otras proteínas incluidas en la familia AAHS son BenK de *Acinetobacter baylyi* ADP1 (TC: 2.A.1.15.5) implicada en el transporte de benzoato (Collier *et al.*, 1997), la proteína MhpT de *E. coli* (TC: 2.A.1.15.2) responsable del transporte de 3-hidroxifenilpropionato (Ferrández *et al.*, 1997), o la proteína TfdK de *C. necator* JMP134 (TC: 2.A.1.15.3) transportador de 2,4-diclorofenoxiacetato (Leveau *et al.*, 1998). También se encuentran formando parte de esta familia proteínas que no transportan estrictamente ácidos aromáticos pero sí metabolitos de su degradación, como la proteína MucK de *Acinetobacter baylyi* ADP1 (TC: 2.A.1.15.4) que transporta *cis,cis*-muconato, un metabolito producido en la ruta del β -cetoadipato (Williams y Shaw, 1997). Hasta un total de 9 proteínas diferentes están incluidas en esta familia en la base de datos de clasificación de transportadores (<http://www.tcdb.org/tcdb/index.php?tc=2.A.1>). Todas ellas presentan una longitud bastante uniforme, en torno a 450 aminoácidos, y un alto grado de identidad de secuencia. Los análisis de comparación de secuencias sugieren que GalT es un nuevo miembro de la familia de transportadores AAHS, cuyo número de clasificación sería TC: 2.A.1.15.10. Las relaciones filogenéticas de los 10 miembros de la familia AAHS descritos hasta la fecha se muestran en la figura 81.

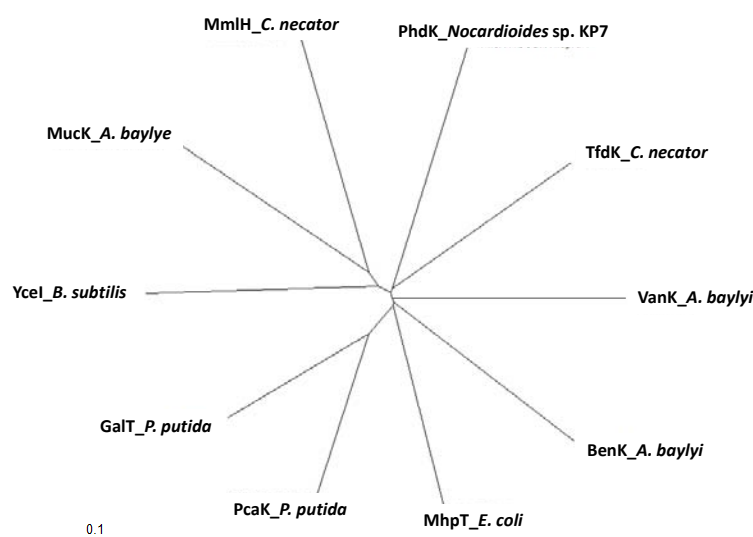


Figura 81. Árbol filogenético construido con las secuencias de los 10 transportadores diferentes compuestos aromáticos de la familia AAHS. Las proteínas son: GalT, transportador de GA de *P. putida*; PcaK, transportador de protocatecuato de *P. putida* (Q51955); MhpT, transportador de 3-hidroxifenilpropionato de *Escherichia coli* (P77589); BenK, transportador de benzoato de *A. baylyi* ADP1 (O30513); VanK, transportador de vanilato de *A. baylyi* ADP1 (O24842); TfdK, transportador de 2,4-diclorofenoxiacetato de *C. necator* JMP134 (P70737); PhdK, transportador de 1-hidroxi-2-naftoato de *Nocardioides* sp. KP7 (O24723); MmlH, transportador de 4-metilmucolactona de *C. necator* JMP134 (O51798); MucK, transportador de *cis,cis*-muconato de *A. baylyi* ADP1 (P94131); YceI, transportador de nicotinato de *B. subtilis* (O34691). El alineamiento múltiple de las proteínas se realizó con el programa CLUSTALW y el árbol filogenético se ha realizado (según el método de vecino más próximo) y visualizado como se indica en el apartado 16 de Materiales y Métodos. La barra indica una sustitución de un aminoácido por cada 10.

Quizás la característica más interesante de esta familia de transportadores de compuestos aromáticos es que algunos de sus miembros se han visto implicados en la quimiotaxis hacia el correspondiente sustrato aromático, propiedad que le permite a la bacteria desplazarse siguiendo un gradiente de concentración creciente de sustrato, acoplado de esta manera movilidad y catabolismo. Esta característica ha sido especialmente estudiada en las proteínas PcaK de *P. putida* PRS2000 implicada en quimiotaxis hacia 4-hidroxibenzoato (Harwood *et al.*, 1994) y TfdK de *C. necator* JMP134 (pJ4) implicada en quimiotaxis hacia 2,4-diclorofenoxiacetato (Hawkins y Harwood, 2002). Los experimentos de quimiotaxis realizados en esta tesis (Fig. 51), claramente revelan que la permeasa GalT está involucrada en la quimiotaxis de *P. putida* KTGAL hacia GA. Si bien el GA ya había sido demostrado como un quimio-atrayente para la bacteria *Rhizobium trifolii* 2066, un microorganismo incapaz de utilizar GA como única fuente de carbono y energía (Parke *et al.*, 1985), hasta la fecha no se había descrito ninguna proteína capaz de reconocer GA e interactuar con el aparato de quimiotaxis de la célula.

La quimiotaxis bacteriana ha sido extensamente estudiada en bacterias entéricas, utilizando azúcares simples, aminoácidos o ácidos orgánicos como quimio-atrayentes (Armitage, 1999). Las bacterias entéricas detectan la concentración de solutos fuera de la célula utilizando receptores transmembrana de unión a ligandos (MCP, *methyl-accepting chemotaxis proteins*) los cuales transmiten la señal en forma de cambio conformacional a la histidín quinasa CheA, que se autofosforila y transmite el grupo fosfato al regulador de la respuesta CheY, el cual interactúa con el motor flagelar controlando el movimiento de la bacteria (Bren y Eisenbach, 2000). Por otro lado, un buen número de trabajos han sido publicados sobre quimiotaxis bacteriana frente a los compuestos aromáticos, e. g., naftaleno, salicilato, bifenilo, benzoato, tolueno, benceno, fenol o metilfenol, y 2,4-diclorofenoxiacetato, demostrándose que tanto estos sustratos metabolizables como análogos no metabolizables, actúan como quimio-atrayentes (Harwood *et al.*, 1984; Grimm y Harwood, 1997; Nichols y Harwood, 1997a; Parales *et al.*, 2000; Samanta y Jain, 2000; Hawkins y Harwood, 2002; Parales, 2004; Sarand *et al.*, 2008). Recientemente, se ha demostrado en *P. putida* que a diferencia de lo que ocurre frente a otros compuestos aromáticos, tales como benzoato, naftaleno o tolueno que requieren de un quimio-receptor específico, la taxis frente a (metil)fenoles viene mediada en respuesta al metabolismo activo de estos compuestos por la bacteria, es decir, es una taxis dependiente del balance energético celular (Sarand *et al.*, 2008). En

este tipo de taxis dependiente de energía el sistema de transducción de señales es similar al ya descrito en enterobacterias, viéndose igualmente una expresión diferencial de receptores tipo Aer, los cuales poseen una localización polarizada en la célula interaccionando con CheA. La proteína Aer de *E. coli* es un receptor de aerotaxis que media no sólo la respuesta a oxígeno sino también la taxis dependiente de metabolismo frente a succinato, glicerol, ribosa, galactosa, maltosa, malato, prolina, alanina y algunos sustratos del sistema fosfotransferasa (Bibikov *et al.*, 1997; Zhulin *et al.*, 1997; Greer-Phillips *et al.*, 2003).

Todos estos datos sugieren que los mecanismos que controlan la quimiotaxis en *Pseudomonas* comparten muchas de las características típicas de la quimiotaxis en enterobacterias. Sorprende, no obstante, el hecho de que pese a la absoluta necesidad de la presencia de permeasas tales como PcaK, TdfK o GalT para producir una respuesta quimiotáctica frente a 4-hidroxibenzoato, 2,4-diclorofenoxiacetato o GA, respectivamente, aún no se conozca en qué punto de la cadena de transmisión de señales que determinan dicha respuesta intervienen estas permeasas. Se ha sugerido que estos transportadores podrían jugar un papel directo en la señalización y comunicación de la señal, la cual ocurriría por un cambio conformacional de estas permeasas durante la unión o transporte del sustrato, estando asociadas a una proteína MCP o a otra proteína quimiosensora. No obstante, y dado que muchos de los compuestos aromáticos son capaces de difundir a través de la membrana pero probablemente no alcanzan concentraciones intracelulares locales elevadas, se ha sugerido un papel secundario alternativo para los transportadores de la familia AAHS en quimiotaxis, los cuales estarían implicados en producir concentraciones locales altas de los sustratos aromáticos, concentraciones que sí serían suficientes para producir una respuesta quimiotáctica estándar (Ditty y Harwood, 1999; Sarand *et al.*, 2008).



Figura 82. Alineamiento de las secuencias de las proteínas PcaK y GalT. El alineamiento se realizó utilizando el programa ClustalW. Se indica en gris la secuencia del motivo consenso GXXXD(R/K)XGR(R/K) localizado en los *loops* situados entre la segunda y tercera hélices transmembrana así como entre la octava y la novena hélices transmembranas. En negro se indican los residuos cargados situados en las hélices transmembrana implicada tanto en transporte como en quimiotaxis en PcaK y conservados en GalT, así como el motivo DGXD característico de los miembros de la familia AAHS.

Todos los miembros de la superfamilia MFS comparten una arquitectura molecular común, consistente en 12 o 14 α -hélices transmembrana conectadas por bucles (*loops*) y formando un poro a través del cual es transportado el soluto. El movimiento del soluto es a menudo acompañado de la translocación de un protón u otro ión (Kaback, 2005). Igualmente, comparten una serie de aminoácidos conservados en el bucle citosólico situado entre la segunda y tercera hélice transmembrana y que definen la secuencia consenso GXXXD(R/K)XGR(R/K) (Fig. 82). Esta secuencia se repite en el bucle citosólico que separa la octava de la novena hélice transmembrana, aunque se encuentra menos conservada (Fig. 82). Los dos representantes de la superfamilia MFS más estudiados y de cuales se conoce incluso su estructura tridimensional son la permeasa de la lactosa LacY de *E. coli* (Roepe *et al.*, 1990; Kaback, 1992; Kaback, 2005) y el antiporter de tetraciclina TetA codificado en el transposón Tn10 de *E. coli* (Yamaguchi *et al.*, 1990; Yamaguchi *et al.*, 1992; Yamaguchi *et al.*, 1993). En ambas proteínas se ha demostrado que los aminoácidos conservados en estos bucles citosólicos

son absolutamente necesarios para el transporte. Como cabía esperar, la predicción de la estructura secundaria de GalT revela la conservación de la arquitectura molecular típica de los transportadores MFS así como de los motivos de secuencia característicos de los bucles citosólicos (Figs. 82, 83). Experimentos de mutagénesis para la sustitución de los residuos conservados en los bucles citosólicos han permitido concluir que estos residuos son absolutamente necesarios para el transporte del 4-hidroxibenzoato y la quimiotaxis hacia este compuesto mediada por la proteína PcaK. No obstante, el hecho de que algunas mutaciones mostraran un fenotipo más severo de pérdida de quimiotaxis que de transporte podría sugerir que algún cambio conformacional en estos bucles estaría mediando el desencadenamiento de la quimiotaxis (Ditty y Harwood, 1999, 2002). Adicionalmente, se han identificado residuos cargados en los dominios transmembrana tanto de TetA como de LacY que están involucrados en el intercambio de solutos (Yamaguchi *et al.*, 1992; Sahin-Toth *et al.*, 2000), si bien, la conservación de estos residuos varía en función de la familia de transportadores MFS. Así, en la familia AAHS parecen conservarse específicamente 4 residuos, i. e., Arg124, Arg386, Arg398 y Glu144 en la proteína PcaK, y Arg122, Arg381, Arg394 y Glu142 de la proteína GalT (Figs. 82, 83). La sustitución de estos residuos cargados en la proteína PcaK, al igual que ocurrió con TetA o LacY, inhibe la capacidad transportadora de la proteína, evidenciando su papel activo en el proceso (Ditty y Harwood, 2002). Una característica peculiar de la familia AAHS de transportadores es la conservación de una pequeña secuencia de aminoácidos cargados (DGXD) en la primera hélice transmembrana, motivo que también aparece conservado en la proteína GalT (Figs. 82, 83), y cuya sustitución por aminoácidos no cargados acarrea igualmente la pérdida de la función de transporte y quimiotaxis de la proteína PcaK, no ocurriendo esto cuando se sustituyen por otros residuos cargados (Ditty y Harwood, 2002).

En conclusión, el alto grado de identidad que muestra la proteína GalT con permeasas de la familia AAHS y el hecho de que se conserven en GalT la mayoría de los residuos que en PcaK están implicados tanto en quimiotaxis como en transporte, permite sugerir que dichos residuos intervienen también en el transporte de GA al interior celular y en la capacidad quimiotáctica hacia GA de *P. putida*. Trabajo futuro permitirá confirmar experimentalmente la hipótesis propuesta.

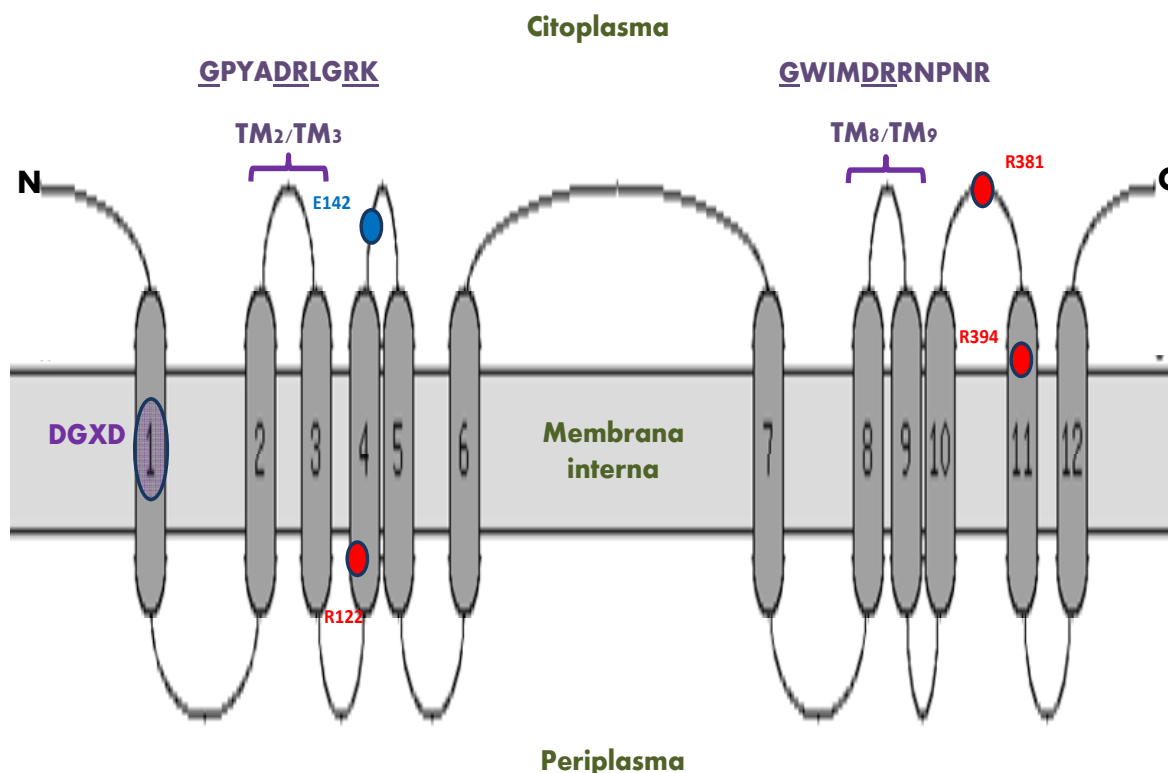


Figura 83. Representación de la estructura secundaria de GalT y su posible localización en la membrana interna de *P. putida*. En cilindros grises se indican las 12 α -hélices transmembranas. Se representan en morado las secuencias del motivo consenso GXXXD(R/K)XGR(R/K) situado en los bucles entre la segunda/tercera y octava/novena hélices transmembrana. Igualmente se indica en morado la localización del motivo DGXD en la primera hélice transmembrana. En rojo se detalla la posición de la Arg122, Arg381 y Arg394, y finalmente en azul se indica la posición del Glu142.

El GA no es un compuesto especialmente tóxico, pero su presencia en el vino, te y otros alimentos lo convierte en un compuesto de gran interés para la industria alimentaria. La construcción y validación de un biosensor para GA utilizando algunos de los elementos genéticos del cluster *gal* y el gen *lacZ* como reportero desarrollado en esta tesis (ver apartado 4.4 de Resultados, Fig. 60), permite detectar concentraciones tan bajas como 0,5 μ M de este ácido aromático. Dado que la hiperproducción del transportador GalT en la cepa *P. putida* KTGAL (pIZGalT) incrementa en 5 veces la velocidad de transporte de GA que posee la cepa utilizada en el desarrollo del biosensor de GA (*P. putida* KTGAL) (Tabla 9), no es descabellado pensar que la inclusión del transportador GalT al sistema pudiera bajar el límite de detección que posee el biosensor ya desarrollado. Los circuitos reguladores de la expresión génica se han utilizado en algunas ocasiones para el diseño de biosensores celulares que permiten la detección y cuantificación fácil y eficaz de la concentración biodisponible de un determinado compuesto, siendo una alternativa de gran interés al empleo de técnicas

analíticas convencionales. La inclusión de elementos de transporte del metabolito diana en estos biosensores basados en elementos reguladores, podría suponer una mejora considerable de éstos en cuanto a especificidad y límite de detección.

2.2. Estudio del gen *galP* y la implicación de su producto génico en transporte de GA a través de la membrana externa.

La membrana externa de las bacterias del género *Pseudomonas* posee un coeficiente de permeabilidad estimado del orden de 10 a 500 veces inferior al mostrado por la membrana externa de *E. coli* (Yoshimura y Nikaido, 1982; Hancock, 1997). Esta baja permeabilidad se puede considerar como una adaptación de este grupo de bacterias para resistir el ataque de antibióticos y otros compuestos tóxicos producidos por organismos competidores en el medio ambiente, no obstante plantea problemas potenciales de adquisición de nutrientes cuando estos se encuentran en baja concentración, situación corriente en la naturaleza. Sorprende, por tanto, el hecho de que este género de bacterias, especialmente la especie *P. putida*, sean consideradas un paradigma de versatilidad metabólica (Stanier *et al.*, 1966; Nelson *et al.*, 2002; dos Santos *et al.*, 2004; Jiménez *et al.*, 2004; Nogales *et al.*, 2008). Esta paradoja se explica si se tiene en cuenta que los nutrientes hidrofílicos atraviesan la membrana externa de la bacteria por canales protéicos hidrofílicos denominados porinas (Yoshimura y Nikaido, 1982).

Existen dos clases principales de porinas, generales y específicas, atendiendo a su especificidad de sustrato. Muchas bacterias Gram-negativas, exceptuando las del género *Pseudomonas* y otras bacterias de suelo relacionadas, poseen porinas generales en alto número de copias a través de las cuales difunden moléculas hidrofílicas pequeñas no necesariamente relacionadas estructuralmente (Tamber y Hancock, 2004). La cinética de difusión a través de estas porinas generales viene mediada por propiedades fisicoquímicas, tamaño, volumen, carga o polaridad del compuesto a transportar, entre otras, y por el gradiente de concentración de la molécula en cuestión. Las porinas específicas, por el contrario, poseen estereoespecificidad de sustrato, poseyendo sitios de unión a ligando que sirven para facilitar la difusión de moléculas estructuralmente relacionadas orientándolas a través del canal hidrofílico. En *Pseudomonas* y otras bacterias relacionadas el transporte facilitado a través de porinas inespecíficas es deficiente en condiciones de baja concentración de nutrientes y puede

limitar la velocidad de crecimiento, solventándose esta deficiencia mediante la existencia de numerosas porinas específicas, a menudo en alto número de copias, que son inducidas por el sustrato que transportan (Nikaido y Vaara, 1985; Tamber y Hancock, 2004).

Las porinas específicas han sido bien caracterizadas en *P. aeruginosa*, en donde se han agrupado en 4 familias principales i) OprB, implicadas en el transporte de carbohidratos (Wylie y Worobec, 1995), ii) OprP, implicadas en el transporte de fosfatos (Hancock y Benz, 1986), iii) OprO, específicas para el transporte de ortofosfatos (Siehnel *et al.*, 1992), y iv) OprD, responsables del transporte de aminoácidos básicos y antibióticos como el imipenem o meropenem (Trias y Nikaido, 1990b, a). Por lo general, estas proteínas tienden a formar un poro en la membrana externa ocluyéndolo con un largo bucle que actúa a modo de tapa (Koebnik *et al.*, 2000). El transporte selectivo a través de estas porinas se facilita por la interacción específica del sustrato con la proteína, lo cual permite que ésta adquiera la conformación ideal para que el soluto de interés pase a través de ella, excluyendo de esta forma solutos inespecíficos (Schirmer *et al.*, 1995; Ye y van den Berg, 2004). No obstante, en algunas ocasiones ciertos compuestos que no son específicamente reconocidos pueden atravesar la membrana utilizando estas porinas como canales inespecíficos, incrementando de esta forma la permeabilidad de la membrana externa de estas bacterias (Huang y Hancock, 1993).

El análisis de comparación de secuencias reveló que GalP mostraba una alta identidad con porinas de membrana externa de la familia OprD (Tabla 5), tales como la porina BenF de *P. putida* (Nishikawa *et al.*, 2008) o la proteína OprD de *P. aeruginosa* (Huang y Hancock, 1993). La importancia que tiene el transporte de GA a través de la membrana interna de *P. putida* nos hizo preguntarnos si, al igual que ocurre en el caso del metabolismo del fenilacetato en *P. putida* U (Olivera *et al.*, 1998), una porina de membrana externa era esencial para el crecimiento de *P. putida* KTGAL a expensas de GA. Cuando se analizó la curva de crecimiento que mostraba la cepa *P. putida* KTGALdgalD cultivada a expensas de GA (5 mM) como única fuente de carbono y energía, se pudo concluir que GalP no era esencial para dicho crecimiento, al menos en las condiciones de laboratorio utilizadas, ya que no había diferencias significativas con el crecimiento mostrado por la cepa parental *P. putida* KTGAL (Fig. 52). No obstante, y dado que en la naturaleza no se suelen alcanzar unas concentraciones de sustrato tan elevadas como las que se utilizan para el crecimiento en laboratorio, siendo

precisamente en estas condiciones cuando los transportadores desempeñan un papel determinante (Nikaido y Vaara, 1985; Díaz *et al.*, 2001), se decidió comprobar si GalP era importante para un eficiente transporte de bajas concentraciones de GA (10 μ M). Interesantemente, en estas condiciones la cepa mutante *P. putida* KTGALdgalP transportaba GA a la mitad de la velocidad a la que lo hacía la cepa parental *P. putida* KTGAL (Fig. 52), evidenciando que GalP interviene en el transporte en GA y sugiriendo que en condiciones de baja concentración de sustrato, cuando la difusión pasiva es insuficiente, GalP es esencial para alcanzar una velocidad óptima de crecimiento.

Como se ha mencionado anteriormente, la proteína OprD de *P. aeruginosa* PAO1 que fue identificada como una porina de membrana externa implicada en el transporte de aminoácidos básicos, ha dado nombre a toda una familia de porinas que comparten muchas características comunes (Trias y Nikaido, 1990b; Huang y Hancock, 1993; Stover *et al.*, 2000). Se trata de una familia de proteínas que forman canales en la membrana externa de la bacteria y que si bien las del género *Pseudomonas* muestran una elevada especificidad en el transporte de metabolitos, las identificadas en *E. coli* son menos selectivas para los compuestos transportados (Tamber y Hancock, 2004). Miembros de esta familia han sido identificados igualmente en otros géneros de proteobacterias (Tabla 13).

Tabla 13. Proteínas homólogas a OprD de *P. aeruginosa* detectadas mediante análisis genómicos en diferentes bacterias Gram-negativas. Tomado de (Tamber *et al.*, 2006).

Organismo	No. de homólogos OprD	% similitud con OprD _{PA}
<i>P. aeruginosa</i> PAO1	19	46-59
<i>P. putida</i> KT2440	21	44-63
<i>P. fluorescens</i> PfO-1	14	74-74
<i>P. syringae</i> pv.tomate strain DC3000	10	45-74
<i>Azotobacter vinelandii</i>	29	43-54
<i>Acinetobacter baylyi</i> ADP1	4	40-50
<i>Burkholderia cepacia</i>	1	46-48
<i>Burkholderia pseudomallei</i>	1	49
<i>Xhantomonas campestris</i>	1	46
<i>Bradyrhizobium japonicum</i> USDA 110	1	33
<i>Shigella flexneri</i>	1	36
<i>Yersinia</i> spp.	3	34
<i>E. coli</i>	1	37
<i>Salmonella</i> spp.	1	38

Numerosos homólogos de la proteína OprD han sido identificados mediante estudios de expresión global en distintos miembros del género *Pseudomonas* creciendo a expensas de diferentes fuentes de carbono y en distintas condiciones (Lee y Cooksey, 2000; Conejo *et al.*, 2003; Wagner *et al.*, 2003; Bagge *et al.*, 2004; von Gotz *et al.*, 2004). En base a su localización en operones catabólicos, algunas proteínas homólogas a OprD, i. e., VanP, BenF, PhaK y NicP, han sido implicadas en el transporte de compuestos aromáticos tales como el vanilato, benzoato, fenilacetato y nicotinato, respectivamente (Olivera *et al.*, 1998; Jiménez *et al.*, 2002; Metzgar *et al.*, 2004; Jiménez *et al.*, 2008; Nishikawa *et al.*, 2008).

Un análisis de todos los miembros de la familia OprD en *P. aeruginosa* y *P. putida* ha clasificado a éstos en dos subfamilias distintas, OprD y OpdK (Fig. 84) (Tamber *et al.*, 2006). La clasificación en dos subfamilias de las porinas de la familia OprD no está basada únicamente en aspectos filogenéticos, sino también funcionales. Por un lado los miembros de la subfamilia OprD estarían encargados de transportar aminoácidos o pequeñas moléculas relacionadas como dipéptidos, mientras que los miembros de la subfamilia OpdK se encargarían del transporte de una gran variedad de compuestos carboxílicos incluyendo a los compuestos aromáticos (Tamber *et al.*, 2006). La mayoría de los homólogos en ambos organismos son ortólogos, e. g., 11 de los 19 miembros de la familia OprD en *P. aeruginosa* tienen su correspondiente ortólogo en *P. putida*, implicando este hecho que el evento de duplicación del gen *oprD* correspondiente tuvo lugar antes de la especiación. Por el contrario, algunos miembros tales como OpdJ, OpdI, OpdR, OpdO, OpdD y OpdQ en *P. aeruginosa* o PP_3390, PP_3656, PP_3168, PP_3939 y PP_2517 en *P. putida*, carecen de un ortólogo claro y podrían proceder de un evento de duplicación génica post-especiación, indicando que estas porinas podrían haber evolucionado para transportar compuestos específicos de los nichos ecológicos particulares de *P. aeruginosa* y *P. putida* (Tamber *et al.*, 2006). De hecho, dos las porinas de *P. putida* sin ortólogos claros en *P. aeruginosa*, PP_3390 y PP_2517, se corresponden a las proteínas NicP y GalP implicadas en el metabolismo de nicotinato (Jiménez *et al.*, 2008) y galato, respectivamente, dos rutas de degradación que sólo aparecen en *P. putida* dentro del género *Pseudomonas* y que evidencian una adquisición o duplicación y posterior evolución post-especiación, muy probablemente debida a la adaptación de *P. putida* a un nicho ecológico distinto al colonizado por otras especies de *Pseudomonas*.

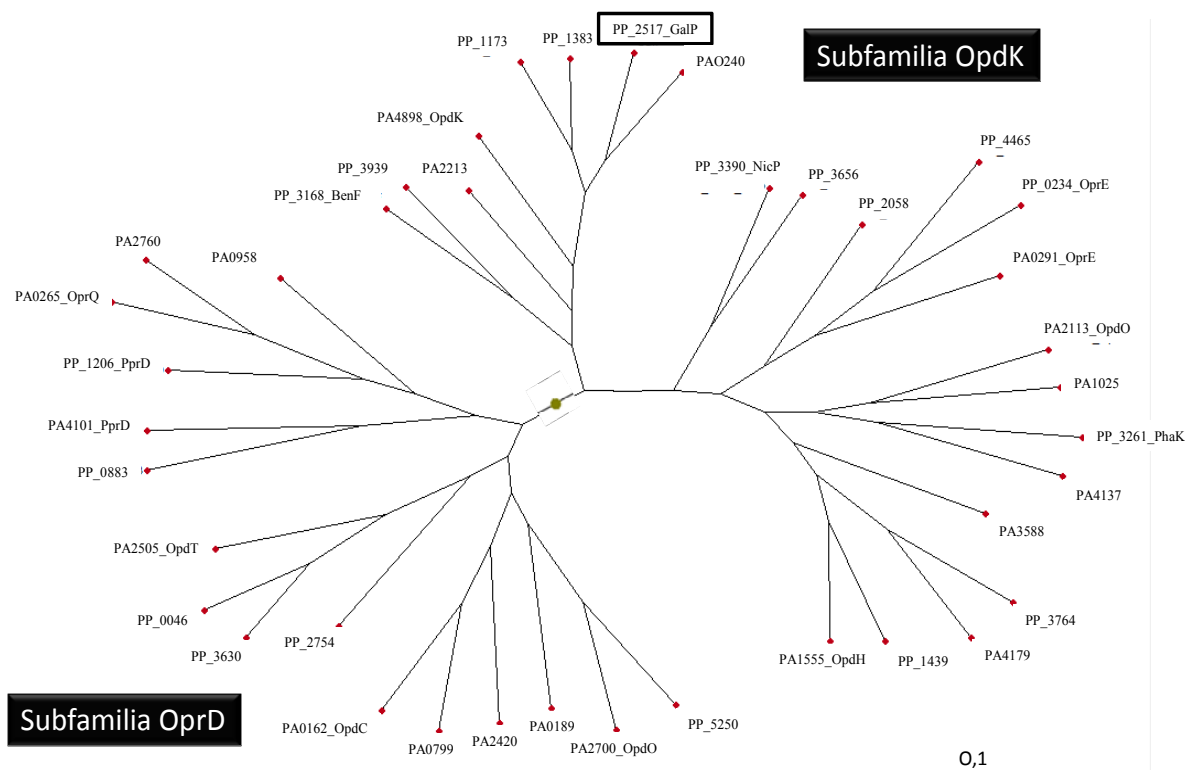


Figura 84. Árbol filogenético de las porinas de la familia OprD en *P. aeruginosa* y sus ortólogos en *P. putida*. Modificado de Tamber et al., 2006. La proteína GalP de *P. putida* se indica en un recuadro. Los homólogos a la proteína OprD tanto de *P. aeruginosa* como de *P. putida* se indican siguiendo su número de marco abierto de lectura, (PA) o (PP), respectivamente. El alineamiento múltiple de las proteínas se realizó con el programa CLUSTALW y el árbol filogenético se ha realizado (según el método de vecino más próximo) y visualizado como se indica en el apartado 16 de Materiales y Métodos. La barra indica una sustitución de un aminoácido por cada 10.

específica de membrana externa perteneciente a la subfamilia OpdK e implicada en el transporte de GA junto con la permeasa GalT. La ausencia de un sistema de transporte específico de GA conlleva la incapacidad de utilizar este ácido aromático como única fuente de carbono, lo que indica el papel capital del transporte de GA al interior celular para su eficaz metabolismo (Fig. 80). En general, las bacterias del género *Pseudomonas* poseen un alto porcentaje de transportadores codificados en sus genomas (20% de las *orfs* en *P. putida* KT2440) (dos Santos *et al.*, 2004), lo cual es bastante indicativo del importante papel que pueden haber desempeñado estas proteínas en el éxito evolutivo de este género, aspecto que ha sido poco valorado hasta ahora y al que debería de prestársele más atención en el futuro ya que podría ser unas de las claves de la amplia distribución del género *Pseudomonas* en la naturaleza.

3. Organización transcripcional del *cluster gal* e identificación del sistema regulador.

Junto al estudio de las reacciones bioquímicas que llevan a cabo la degradación de los compuestos aromáticos y los mecanismos de transporte por los cuales éstos son introducidos al interior celular, el estudio de los mecanismos de regulación de estas rutas de degradación es esencial para conocer en detalle las capacidades biodegradativas de los microorganismos.

La mayor parte de los estudios realizados sobre la regulación de las rutas de degradación de compuestos aromáticos se centran en el control de la transcripción de los correspondientes genes catabólicos (regulación transcripcional) (Díaz y Prieto, 2000; Prieto *et al.*, 2004; Rojo y Dinamarca, 2004; Tropel y van der Meer, 2004). No obstante, existen otros niveles de regulación postranscripcional que son también de gran importancia y que han sido mucho menos estudiados. En este sentido, la posible regulación traducional del gen *galD* basada en el uso de codones poco frecuentes en el extremo 5' (apartado 2.2.1 de resultados) y el control post-traduccional predicho para la enzima GalC por los niveles celulares de ATP-Mg²⁺ y oxalacetato (ver apartado 1.4 de la Discusión), son dos ejemplos de regulación post-transcripcional de la ruta de degradación de GA.

Si bien, los mecanismos mediante los que se controla la expresión de los genes responsables del catabolismo de muchos compuestos aromáticos han sido ampliamente estudiados en bacterias (Díaz *et al.*, 2001; Gerischer, 2002; Prieto *et al.*, 2004; Tropel y van der Meer, 2004; Carmona *et al.*, 2008), hasta la realización de esta tesis no se sabía nada acerca de cómo se regula la expresión de los genes responsables de la degradación aerobia de GA, por lo que su estudio en *P. putida* KTGAL permitía aportar información relevante al respecto, así como el primer análisis sobre la regulación de la ruta central de degradación de OMA en bacterias.

3.1. El sistema regulador GalR/OMA controla la regulación específica del *cluster gal*.

Experimentos iniciales revelaron que los genes *gal* eran inducibles. Así, tanto las actividades enzimáticas, como las actividades de transporte (Figs. 11 y 46), eran específicamente inducidas cuando las células se cultivaban en presencia de GA. Por otro lado, la organización física de los genes *gal* en el cromosoma de *P. putida* sugería la

existencia de, al menos, 3 operones, i.e., dos operones catabólicos *galTAP* y *galBCD* separados por un operón regulador *galR* que se transcribe en orientación contraria (Fig. 10). Experimentos de RT-PCR consistentes en la amplificación de regiones intergénicas del RNA total extraído de *P. putida* creciendo en condiciones de inducción y de no inducción, confirmaron la organización transcripcional sugerida y la inducción de todos los genes *gal* catabólicos en presencia de GA (Fig. 53). Igualmente, el empleo de mutantes polares de *P. putida* KTGAL en distintos genes del *cluster gal* en los estudios de RT-PCR reveló la necesidad del gen *galA* y *galR* para producir la inducción del sistema (Fig. 54), y confirmó que los tres operones, *galTAP*, *galR* y *galBCD*, se transcriben a partir de los promotores P_T , P_R y P_B , respectivamente (Figs. 53, 54). Estos resultados fueron posteriormente corroborados con el estudio de la expresión de las fusiones traduccionales $P_B::lacZ$, $P_T::lacZ$ y $P_R::lacZ$ en *P. putida* KTGAL (Fig. 57).

Por otro lado, la ausencia de actividad de los promotores P_B y P_T en un mutante de *P. putida* KTGAL portador del gen *galA* interrumpido (Fig. 57), indicaba que el inductor del sistema no es el propio GA sino algún metabolito intermediario de su degradación. El hecho de que la proteína GalA sea suficiente para activar el promotor P_B en *E. coli* expresando el gen *galR* (Fig. 58), y que los niveles de actividad de los promotores P_B y P_T en un mutante polar de *P. putida* KTGAL en el gen *galB*, sean muy similares a los detectados en la cepa *P. putida* KTGAL silvestre (Fig. 57), indicaban que el producto de la acción de GalA sobre GA i.e., OMA_{ceto} era, con toda probabilidad, el metabolito inductor del sistema. La participación como inductores de metabolitos intermediarios de una ruta catabólica ya ha sido descrita en la regulación de las rutas de degradación de compuestos aromáticos. (Díaz *et al.*, 2001; Prieto *et al.*, 2004; Tropel y van der Meer, 2004; Carmona *et al.*, 2008) y se podría considerar como un mecanismo adicional para evitar una inducción gratuita de los genes catabólicos por compuestos análogos al sustrato de la ruta, necesitándose siempre una cantidad suficiente del compuesto inicial para producir la transformación de éste en el metabolito inductor y asegurar, de esta forma, que el gasto energético que se va a realizar sintetizando las proteínas encargadas de su degradación no será inútil (Cases y de Lorenzo, 2001; Cases y de Lorenzo, 2005). Merece la pena destacar que si bien la organización transcripcional del *cluster lig* implicado en la degradación *meta* de protocatecuato vía OMA se conocía en *S. paucimobilis* SYK-6 (Hara *et al.*, 2003), la naturaleza del metabolito inductor de un *cluster* de degradación *meta* de compuestos aromáticos vía OMA no se había descrito hasta la fecha en ningún organismo.

Los análisis de comparación de secuencias habían identificado a GalR como un probable regulador transcripcional de la familia LysR (Tabla 5). El hecho de que una cepa *P. putida* KTGAL portadora de una disrupción en el gen *galR* fuera incapaz de expresar los genes *gal* catabólicos en presencia de GA sugería que GalR era un activador transcripcional de éstos (Fig. 54). Los datos obtenidos mediante los ensayos de RT-PCR se confirmaron mediante experimentos de actividad β -galactosidasa con las fusiones $P_B::lacZ$ y $P_T::lacZ$ observándose la ausencia de actividad de estos promotores en células de *P. putida* KTGALd*galR* (Fig. 57), así como la del promotor P_B en células de *E. coli* que no expresaban el gen *galR* (Fig. 58), ambas cultivadas en presencia de GA.

Interesantemente, la fusión $P_R::lacZ$ mostraba un comportamiento totalmente distinto, ya que la presencia del gen *galR* hacía disminuir la actividad β -galactosidasa en células de *P. putida* KTGAL cultivadas en presencia o en ausencia de GA en relación con la actividad detectada en la cepa *P. putida* KTGALd*galR* (Fig. 57). Estos datos tomados en conjunto indican que *galR* codifica un regulador transcripcional, el cual actúa activando los promotores catabólicos P_B y P_T en presencia de OMA, y reprimiendo su propia síntesis independientemente de la presencia del metabolito inductor.

Este comportamiento dual de GalR es típico de los reguladores de la familia LysR. En general, los genes que codifican proteínas de esta familia de reguladores transcripcionales se encuentran en posición 5' del operón que controlan y se transcriben en la dirección opuesta (Tropel y van der Meer, 2004; Maddocks y Oyston, 2008). Por lo general, los reguladores de la familia LysR, también llamados LTTRs, involucrados en rutas de degradación de compuestos aromáticos actúan como activadores transcripcionales del operón catabólico que controlan en presencia de la molécula inductora, la cual suele ser un metabolito intermediario de la ruta, al igual que ocurre en el caso de GalR. Por otro lado, los LTTRs generalmente actúan reprimiendo su propia síntesis, represión que puede no verse influenciada por la presencia del metabolito inductor, como en el caso de la proteína GalR o BenM (Clark *et al.*, 2004), pero también se han descrito casos en los que la presencia de la molécula inductora puede incrementar ligeramente la expresión del gen regulador, como en el caso de las proteínas ClcR o TcbR (van der Meer *et al.*, 1991; Coco *et al.*, 1993).

Las bacterias encuentran en sus diversos hábitats una gran diversidad de compuestos, muchos de los cuales pueden ser utilizados como potenciales fuentes de

carbono, siendo algunos de ellos metabolizados preferentemente sobre otros. Cuando estos compuestos preferentes se encuentran en una concentración suficiente, la asimilación de compuestos no preferentes se ve inhibida como resultado de una compleja red regulatoria, proceso que se denomina control por represión catabólica. Los experimentos llevados a cabo con las fusiones $P_B::lacZ$ y $P_T::lacZ$ en *P. putida* cuando ésta se cultivaba en presencia de GA y otras fuentes de carbono e. g., fenilacetato, succinato, acetato, citrato, piruvato, glucosa o casaminoácidos ponen de manifiesto que si bien, el citrato, glucosa o piruvato no ejercen represión catabólica sobre los promotores *gal* catabólicos, compuestos tales como el fenilacetato y acetato son compuestos de asimilación preferencial al GA en *P. putida* (Fig. 59).

Interesantemente, mientras que la presencia de casaminoácidos o succinato no ejercen represión catabólica sobre el promotor P_B , sí la ejercen sobre el promotor P_T (Fig. 59), sugiriendo que este promotor está sometido a un control global de su actividad más estricto, lo que está de acuerdo con el hecho de que este promotor controla la expresión de los genes que inician la ruta de degradación de GA, i. e., los genes transportadores y el gen *galA*, responsable de la formación de la molécula inductora.

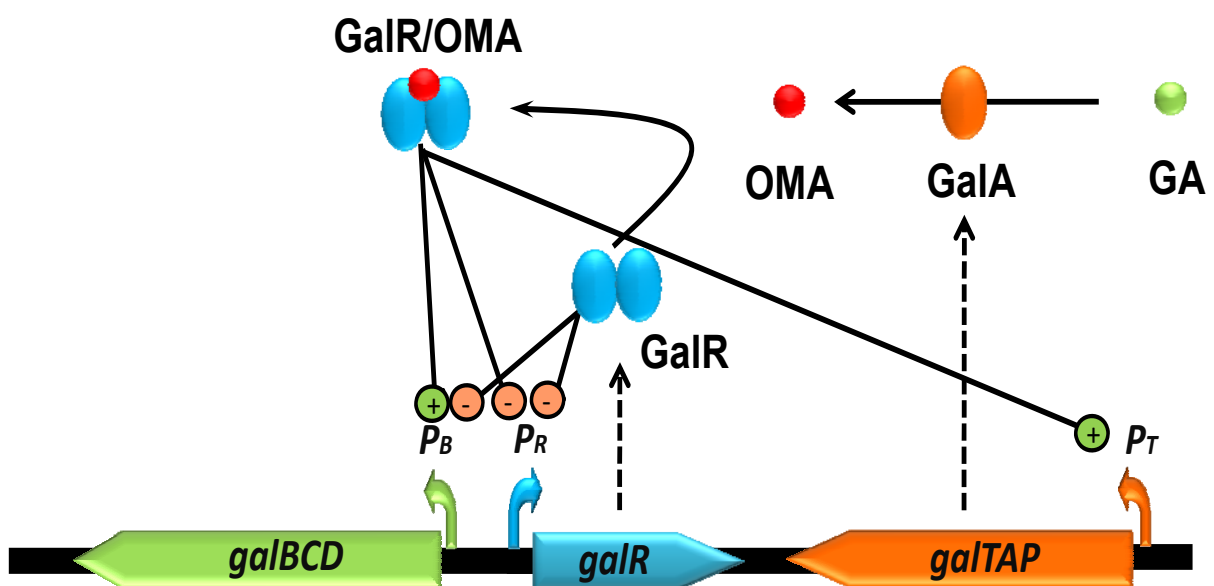


Figura 85. Organización transcripcional de los genes *gal* y control específico de los promotores P_T , P_B y P_R por el sistema GalR/OMA. Los operones *gal* y el promotor que los controla, respectivamente, se muestran mediante el siguiente código de colores: naranja, operón *galTAP* (P_T); azul, operón *galR* (P_R); y verde, operón *galBCD* (P_B). La transcripción y traducción de las proteínas involucradas en el proceso de regulación se indica mediante flechas punteadas. Se indica el control ejercido sobre los promotores *gal* por parte de GalR y GalR/OMA mediante líneas, representando un signo + (verde) activación y - (rosa) represión del promotor indicado.

3.2. GalR es un activador transcripcional de la familia LysR con una novedosa arquitectura modular.

Un análisis detallado de la comparación de la secuencia de GalR con la de otros reguladores de la familia LysR (Fig. 64) mostró que GalR presentaba en su extremo N-terminal no uno sino dos dominios de unión a DNA (DBD), una característica única que no ha sido descrita hasta ahora en ningún otro regulador de la familia LysR (Tropel y van der Meer, 2004; Maddocks y Oyston, 2008). Esta peculiar arquitectura de dominios de GalR hacía interesante el estudio en detalle de este novedoso regulador.

El gen *galR* fue clonado en un vector de hiperexpresión de *E. coli* como una fusión con un tag de 6 His en su extremo 3'. El análisis mediante SDS-PAGE de la proteína purificada mediante cromatografía de afinidad en columnas de Ni muestra un tamaño aproximado de 43 kDa (Fig. 62), en torno a 15 kDa más que la mayoría de los reguladores LysR como consecuencia del segundo dominio de unión a DNA presente en GalR y que le hace tener aproximadamente 100 aminoácidos más que el resto de los reguladores LysR descritos hasta la fecha (Maddocks y Oyston, 2008). La proteína GalR purificada se mostró muy inestable con tendencia a la agregación, por lo que fue necesaria una nueva producción y purificación de proteína cada vez que se utilizó el regulador en experimentos *in vitro*.

Mediante estudios de ultracentrifugación analítica se pudo concluir que GalR formaba un homodímero en solución (Fig. 63). Si bien hasta ahora todos los reguladores LTTRs actúan como homotetrámeros cuando interactúan con el DNA diana, existe variación entre los distintos miembros de la familia respecto a su estructura cuaternaria en solución. Así por ejemplo, y sólo teniendo en cuenta reguladores implicados en rutas de degradación de compuestos aromáticos, las proteínas ClcR y CatR de *P. putida* implicadas en la degradación de clorocatecol y catecol, respectivamente, han sido identificadas como dímeros en solución (Parsek *et al.*, 1992; Coco *et al.*, 1994). Sin embargo, reguladores como CatM o BenM implicados en la degradación de benzoato fueron descritos como tetrámeros en solución (Bundy *et al.*, 2002; Clark *et al.*, 2002), al igual que la proteína NahR involucrada en la degradación de naftaleno en *Pseudomonas* (Schell *et al.*, 1990). La proteína TsaR que controla la ruta de degradación de *p*-toluenosulfonato en *C. testosteroni* T-2 es el único ejemplo que se conoce de reguladores LTTR que es un monómero en solución (Tralau *et al.*, 2003).

La predicción de la estructura secundaria de GalR y su modelado tridimensional basado en la estructura conocida de la proteína CbnR, un regulador LTTR de la ruta de degradación de 3-clorobenzoato de *R. eutropha* NH9 y cuya estructura primaria posee un 38% de identidad con la de GalR (Muraoka *et al.*, 2003), permitió definir en detalle la peculiar arquitectura modular de este regulador. GalR posee dos motivos HTH, el primero (HTH1) se extiende desde el residuo 8 al 66 y junto con una larga α -hélice que se extiende desde el residuo 67 al 92 (α 4) formaría el dominio DBD1 (Fig. 64). El dominio DBD2 está formado por el segundo motivo HTH (HTH2) (aminoácidos 100-157) más la larga α -hélice que se extiende desde el aminoácido 158 al 183 (α 8) (Fig. 64). El dominio regulador se sitúa en el extremo C-terminal de GalR extendiéndose desde el aminoácido 188 al 397 (Fig. 64). Esta disposición de dominios en GalR, si excluimos la presencia del dominio DBD adicional, es similar a la encontrada en otros reguladores LTTR, para alguno de los cuales se ha identificado la función de cada uno de estos dominios. Así, el motivo HTH es una estructura altamente conservada que está directamente involucrada en la unión al DNA (Schell *et al.*, 1990; Schell, 1993). El dominio regulador está involucrado en el reconocimiento de la molécula inductora (Cebolla *et al.*, 1997; Jorgensen y Dandanell, 1999) y el extremo C-terminal de éste juega un papel importante en la multimerización de la proteína (Maddocks y Oyston, 2008), por lo que generalmente a este dominio se le denomina dominio de reconocimiento y multimerización (Stec *et al.*, 2006).

Aunque GalR es el primer regulador de la familia LysR con dos dominios DBD que se estudia en detalle, se han descrito previamente otros dos ortólogos con dos dominios DBD. Así, en el *cluster lig* de *S. paucimobilis* SYK-6, el gen *ligR* codifica una proteína que presenta una identidad del 30% con GalR, y se ha demostrado que la inactivación del gen *ligR* acarrea la falta de expresión de los genes *lig* y la incapacidad de utilizar vanilato o siringato como única fuente de carbono y energía por parte de *S. paucimobilis*, sugiriéndose que se trata de un activador transcripcional (Hara *et al.*, 2003). Otro ortólogo (FldY) ha sido identificado formando parte y probablemente regulando los genes implicados en la degradación de fluoreno vía apertura *meta* del protocatecuato en *Sphingomonas* sp. LB126 (Wattiau *et al.*, 2001). La búsqueda de nuevos ortólogos de GalR en los bancos de secuencias permitió identificar unas 50 proteínas, la mayoría de las cuales están codificadas en posibles *clusters* responsables de la degradación de compuestos aromáticos vía apertura *meta* de protocatecuato o están integrados en hipotéticos *clusters gal* (Fig. 90). Interesantemente, varios ortólogos de

GalR (exhiben un 50% de identidad de secuencia) aparecen codificados en los genomas de distintas especies del género *Yersinia*, y con orientación divergente a un operón que contiene ortólogos de los genes *galB*, *galC* y *galD*, lo que sugiere que podrían estar regulando a este agrupamiento génico posiblemente implicado en el metabolismo de ácidos tricaboxílicos análogos al OMA.

Por otra parte, la secuenciación masiva de genomas, sobre todo bacterianos, ha revelado la gran abundancia de reguladores LTTRs presentes en éstos. Se ha sugerido que los reguladores LTTRs han derivado en la evolución de un ancestro común siendo la transferencia horizontal el proceso que habría guiado su alta distribución en la naturaleza (Maddocks y Oyston, 2008). La teoría del ancestro común se ve avalada por la elevada similitud, tanto estructural como funcional, entre todos los miembros de la familia LysR. Mediante procesos de duplicación génica y las posteriores presiones evolutivas y de divergencia genética se habrían originado la multitud de parálogos LTTRs encontrados en los genomas bacterianos, ocupándose cada uno de ellos de la regulación de procesos muy diversos en la misma célula (Maddocks y Oyston, 2008). Un hecho a destacar cuando se comparan los reguladores de la familia LysR, es que el motivo HTH se encuentra mucho más conservado que el dominio de interacción con el inductor y oligomerización. Esta observación está de acuerdo con el hecho de que el dominio regulador debe adaptarse al reconocimiento de una gran variedad de moléculas inductoras (e.g., compuestos aromáticos, ácidos orgánicos, aminoácidos, iones, etc) manteniendo siempre el motivo HTH su función de interacción con el DNA diana y, por lo tanto, variando sólo ligeramente su estructura para interaccionar con las cajas operadoras de los correspondientes promotores regulados. Un análisis de algunos de los LTTRs mejor estudiados y de algunos LTTRs con dos dominios DBD identificados en esta tesis, muestra que tanto los reguladores GalR encontrados en hipotéticos *clusters gal*, los encontrados en cluster asociados a un operón *galBCD* en el género *Yersinia*, como los encontrados en *clusters* de degradación *meta* de protocatecuato parecen conformar una nueva subfamilia de reguladores LTTRs (subfamilia GalR) (Fig. 86), reflejando así su peculiar arquitectura modular.

El análisis de comparación de secuencias de los dos motivos HTH de la subfamilia GalR así como del único motivo HTH de los LTTRs clásicos sugiere la existencia de dos grupos de motivos HTH, i. e., HTH1 y HTH2 (Fig. 87). Curiosamente, el análisis filogenético de los dos motivos HTH de los reguladores de la subfamilia GalR revela que los HTH ortólogos de diferentes reguladores muestran mayor similitud

de secuencia entre sí que con el segundo motivo HTH del mismo regulador (Fig. 87). Esta observación sugiere que los 2 dominios DBD de los reguladores de la subfamilia GalR tienen un origen evolutivo diferente y no son el resultado de un suceso de duplicación génica del dominio DBD de un regulador LTTR clásico. Por el contrario, los análisis de comparación de secuencias sugieren que los reguladores de la subfamilia GalR se han originado como consecuencia de un suceso de fusión génica entre los dominios DBD únicos de dos LTTRs clásicos ancestrales. Así por ejemplo, el DBD1 y DBD2 de GalR habrían derivado de LTTRs del tipo CatR y NahR, respectivamente (Fig. 87).

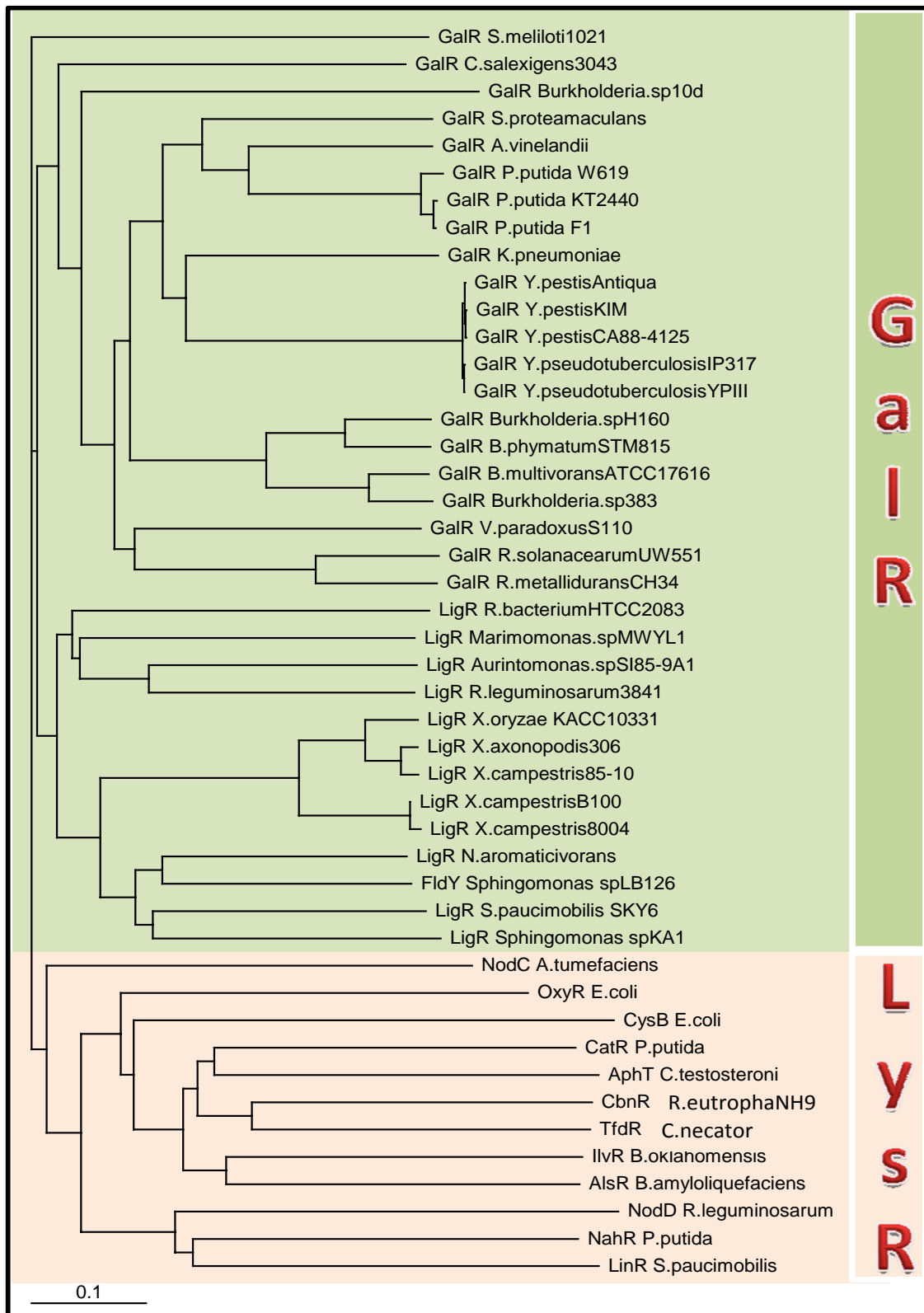


Figura 86. Afiliación filogenética de proteínas reguladoras de la familia LysR. Arbol construido con la secuencia íntegra de las proteínas. En verde y rosa se detallan los reguladores de las subfamilias GalR y LysR, respectivamente. El alineamiento múltiple de las proteínas se realizó con el programa CLUSTALW y el árbol filogenético se ha realizado (según el método de vecino más próximo) y visualizado como se indica en el apartado 16 de Materiales y Métodos. La barra indica una sustitución de un aminoácido por cada 10.

Figura 86. (continuación). Las proteínas empleadas fueron: GalR de *Bordetella* sp. 10d, (BAD08207); GalR de *Sinorhizobium melliloti*, (CAC46342), GalR de BGalR de *Chromohalobacter salexigens* DSM 3043, (YP_572392); GalR de *Serratia proteamaculans* 568, (YP_001478324); GalR de *Azotobacter vinelandii*, (ZP_00416184); GalR de *P. putida* W619, (YP_001748898); GalR de *P. putida* KT2440, (NP_744667); GalR de *P. putida* F1, (YP_001268512); GalR de *Klebsiella pneumonia* 342, (YP_002235928); GalR de *Yersinia pseudotuberculosis* YPIII, (YP_001722831); GalR de *Yersinia pestis Antigua*, (YP_653364); GalR de *Yersinia pestis KIM*, (NP_667397); GalR de *Yersinia pestis CA88-4125*, (ZP_01917582); GalR de *Burkholderia* sp. H160, (ZP_03263967); GalR de *Burkholderia phymatum* STM815, (YP_001862628); GalR de *Burkholderia multivorans* ATCC 17616, (YP_001585992); *Burkholderia* sp. 383, (YP_367263); GalR de *Variovorax paradoxus* S110, (YP00947599); GalR de *Ralstonia solanacearum* UW551, (ZP_00944628); GalR de *Ralstonia metallidurans* CH34, (YP_585848); LigR de *Rhodobacteriales bacterium* HTCC2083, (YP_002691135); LigR de *Marimononas* sp. MWYL1, (YP_001342754); LigR de *Aurantimonas* sp. SI85-9A1, (ZP_01226509); LigR de *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* 3841, (YP_764785); LigR de *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* KACC10331, (YP_203205); LigR de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* str. 306, (NP_644453); LigR de *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* str. 85-10, (YP_365983); LigR de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* str. B100, (YP_001905627); LigR de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* str. 8004, (YP_245177); LigR de *Novosphingobium aromaticivorans* DSM 12444, (YP_498086); FldY de *Sphingomonas* sp. LB126, (CAB87565); LigR de *Sphingomonas paucimobilis* SYK-6, (BAB88739); LigR de *Sphingomonas* sp. KA1, (YP_718042); NodC de *Agrobacterium tumefaciens* str. C58 (NP_356115); OxyR de *E. coli*, (BAE77350); CysB de *E. coli*, (AAA23642); CatR de *P. putida*, (P20667); AphT de *Comamonas testosteroni*, (BA88500); Cbnr de *Ralstonia eutropha* NH9 (1IXC); TfdR de *C. necator*, (AAC44725); IlvR de *Burkholderia oklahomensis* EO147 (ZP_02354827); AlsR de *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42, (YP_001422879); NodD de *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*, (AAO48449); NahR de *P. putida*, (NP_863107); LinR de *Sphingomonas paucimobilis*, (BAA36280);

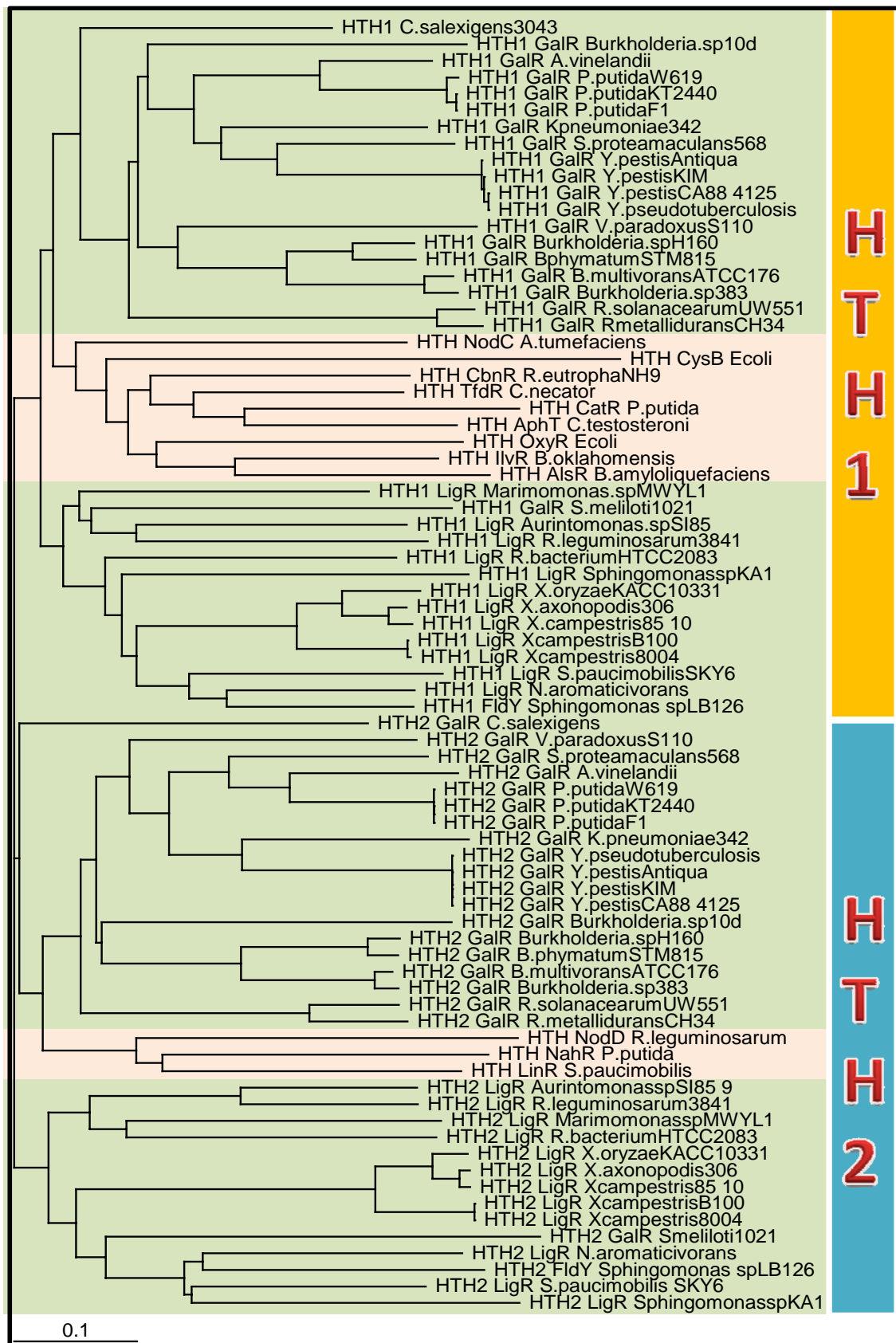


Figura 87. Afiliación filogenética de los motivos HTH de diferentes reguladores de la familia LysR. Arbol filogenético construido con la secuencia de los motivos HTH de varios reguladores LysR clásicos y los motivos HTH1 (naranja) y HTH2 (azul) de los LTRs de la subfamilia GalR. En verde y rosa se detallan los reguladores de la subfamilia GalR. Las proteínas empleadas y la metodología utilizada para el alineamiento y construcción del árbol filogenético se detalla en el pie de la figura 86.

La peculiar arquitectura modular de los LTTRs de la subfamilia GalR presentando dos dominios DBD consecutivos podría explicar que GalR posea una conformación activa homodimérica cuando interacciona con el DNA diana, a diferencia de la conformación activa homotetramérica de los LTTRs típicos (con un único dominio DBD) (ver más adelante). En este sentido, un homodímero de GalR proporciona el mismo número de dominios DBD que un homotetramero de un LTTRs tradicional, sugiriendo un ahorro energético para la célula ya que consigue controlar las mismas cajas operadoras en el promotor correspondiente con la mitad de los dominios reguladores de un LTTR tradicional. Este ahorro en dominios reguladores podría haber actuado como presión selectiva para la evolución y el mantenimiento de los LTTRs de la subfamilia GalR.

El hecho de que el OMA (o un análogo estructural) sea probablemente el sustrato común a todas las rutas controladas por miembros de la subfamilia sugiere que, al igual que se ha demostrado para GalR de *P. putida*, el OMA o un análogo estructural es el ligando que reconocen todos estos reguladores. No obstante, no es evidente y requiere futuros estudios, explicar por qué la evolución ha seleccionado la fusión de un dominio de reconocimiento de OMA (u otro análogo) y un dominio DBD doble en los reguladores de la subfamilia GalR.

3.3. Estudio del mecanismo de regulación específica de los promotores del *cluster gal*.

Para estudiar en detalle la interacción del regulador transcripcional GalR con los promotores P_B , P_T y P_R se realizaron distintos abordajes *in vitro*. Los experimentos de retardo en gel utilizando la proteína GalR purificada con las regiones promotoras $PbPr$ y Pt , mostraron que ésta era capaz de unirse específicamente a estas regiones con alta afinidad aún en ausencia de la molécula inductora, si bien la adición de OMA 100 μ M mejora ligeramente la afinidad de la unión presentando unas K_d en estas condiciones de 30 y 0,65 nM para las regiones $PbPr$ y Pt , respectivamente (Fig. 66 y 67). Interesantemente, una única banda de retardo resultaba de la interacción de GalR tanto con la región intergénica $PbPr$ como con la región Pt , sugiriendo que la unión de GalR a ambas regiones no era cooperativa y generaba únicamente un complejo GalR-DNA. GalR muestra por tanto, las características propias de un regulador de la familia LysR, ya que, en general, los miembros de esta familia de reguladores transcripcionales son capaces de unirse a la región operadora que controlan aún en ausencia de la molécula

inductora, si bien se ha descrito que la presencia de ésta puede incrementar sensiblemente la afinidad por el DNA (Schell, 1993; Tralau *et al.*, 2003; Tropel y van der Meer, 2004; Maddocks y Oyston, 2008).

Como se ha expuesto en el apartado anterior, todos los LTTRs se encuentran formando homotetrámeros en su forma activa pese a poseer una variada estructura cuaternaria en solución (Maddocks y Oyston, 2008). El estado de agregación activo se consigue al interaccionar el regulador con el estímulo inductor, el cual provoca un cambio conformacional permitiendo la agregación y posicionando correctamente al oligómero del regulador junto con la RNAP para permitir la actividad del promotor regulado (Schell, 1993). Todos los LTTRs involucrados en rutas de degradación de compuestos aromáticos utilizan como estímulo inductor un metabolito químico (Schell y Poser, 1989; Rothmel *et al.*, 1990; van der Meer *et al.*, 1991; Coco *et al.*, 1994; Romero-Arroyo *et al.*, 1995). En algunos casos, la molécula inductora es un intermediario de la degradación que ya ha perdido su carácter aromático, como ocurre con el OMA en el caso de la ruta de degradación de GA en *P. putida*, en otros sistemas es un compuesto aromático el que actúa como inductor. No obstante, se han descrito casos en los que más de una única molécula actúan simultáneamente produciendo un efecto sinérgico en la activación. Así, el regulador BenM, el cual controla la degradación de benzoato en *Acinetobacter baylyi* ADP1, responde simultáneamente a la presencia tanto de *cis,cis*-muconato como de benzoato (Bundy *et al.*, 2002). Para conocer si GalR mostraba el mismo estado oligomérico activo que el resto de los LTTRs descritos hasta ahora, se calculó el coeficiente de Hill (CH) para su interacción con las regiones promotoras *PbPr* y *Pt*. El coeficiente de Hill es un parámetro bioquímico que muestra el grado de cooperación en la unión entre moléculas o macromoléculas (Edelstein *et al.*, 1986), y ha sido utilizado para determinar el estado oligomérico de las proteínas reguladoras cuando interaccionan con sus regiones operadoras conocido el estado de agregación del regulador en solución (Wang y Winans, 1995; Schuster *et al.*, 2004; Wilkinson y Grove, 2005; Hiromoto *et al.*, 2006; Semavina *et al.*, 2006). Dado que los valores del coeficiente de Hill calculados eran inferiores a 1, i.e., 0,56 y 0,72 para *PbPr* y *Pt*, respectivamente (Fig. 68), se infería una cooperatividad negativa en la unión, es decir, que una vez unido un dímero de GalR (estado de agregación en solución) a cada una de las regiones promotoras, se impedía la unión de un segundo dímero. La conformación activa homodimérica de GalR contrasta con la conformación homotetramérica del resto de los LTTRs descritos hasta la fecha

(Maddocks y Oyston, 2008) y muy probablemente refleje la peculiar arquitectura modular de GalR con dos dominios DBD en su región N-terminal. Así, si la interacción productiva con el DNA de un regulador LTTR típico implica 4 dominios DBD, es decir, un homotetrámero del regulador, la misma situación se consigue con un homodímero de GalR, lo que explica que sea éste el estado oligomérico activo de este regulador.

La identificación del sitio de inicio de la transcripción de los promotores P_B , P_R , y P_T mediante experimentos de extensión del cebador (Fig. 69) permitió localizar las cajas -10 y -35 que caracterizan los promotores dependientes de la σ_{70} de la RNAP. Éstas no muestran una elevada conservación de la secuencia consenso propuesta para la caja -10 (TATAAT) y -35 (TTGACA) (Dombroski, 1997) (Fig. 70), como cabía esperar para promotores que necesitan de la presencia de una proteína activadora que posicione a la RNAP correctamente para iniciar la transcripción.

Los genes que codifican LTTRs generalmente se transcriben en la dirección opuesta al gen/operón que controlan (Schell, 1993; Maddocks y Oyston, 2008). Como norma general, se unen a una región intergénica localizada entre las posiciones -80 y -50 con respecto al inicio de la transcripción del gen catabólico, región que se llama sitio de unión regulatoria o sitio de unión de represión (RBS) y a una segunda región localizada generalmente entre las posiciones -40 y -20, región llamada sitio de unión de activación (ABS), generando una aparente curvatura en el DNA entre ambas regiones. (Belitsky *et al.*, 1995; Lochowska *et al.*, 2001; Tropel y van der Meer, 2004; Porrúa *et al.*, 2007; Maddocks y Oyston, 2008). La unión al RBS suele ser independiente de la presencia de la molécula inductora y es, de alguna forma, responsable del efecto autorrepresor de la proteína sobre su propia expresión ya que generalmente el RBS solapa las cajas -10 y -35 del promotor del regulador, el cual se dispone divergentemente al promotor activado (Schell, 1993; Maddocks y Oyston, 2008). Aunque en muchos casos, la unión a la región ABS es también independiente de la presencia del inductor, para algunos LTTRs, e. g., CatR, la unión a la región ABS precisa de la presencia de la molécula inductora (Parsek *et al.*, 1992; Chugani *et al.*, 1997).

Para determinar las cajas operadoras de GalR presentes en la región intergénica $PbPr$ se realizaron experimentos de protección frente a la digestión con la DNaseI (Fig. 71). Estos experimentos mostraron una clara región protegida que se extendía desde la posición -54 a -82 en la hebra codificante de *galB* y desde la posición -51 a -77 en la hebra complementaria (Figs. 70 y 71). La posición de la zona protegida por GalR es

compatible con la que ocuparía el RBS de un promotor regulado por un regulador LTTR y contiene la secuencia consenso T-N₁₁-A típica de los RBS flanqueando una región adicional abundante en adeninas entre la T y la A (Figs. 70 y 88), sugiriendo fuertemente que esta zona protegida es el RBS de la región intergénica *PbPr*. La inclusión de OMA en el ensayo de protección a la digestión con la DNasaI identificó una nueva región protegida que se extendía desde la posición -31 hasta la posición -47 (-27 hasta la -47 en la hebra no codificante) del inicio de transcripción del gen *galB*, con la aparición de una intensa banda de hipersensibilidad en la posición -48 y solapando con la caja -35 del promotor *P_B* (Figs. 70, 71), lo que sugiere que esta nueva región protegida constituye la región de activación ABS en los promotores activados por reguladores de la familia LysR.

La secuencia consenso compartida por todos los RBS identificados hasta ahora es T-N₁₁-A, donde la T y la A se encuentran formando parte de un palíndromo imperfecto. Por el contrario, la secuencia de la región ABS es bastante variable dependiendo del promotor (Tropel y van der Meer, 2004; Maddocks y Oyston, 2008). Cuando se comparan las posibles regiones RBS y ABS de los LTTRs con dos dominios DBD (subfamilia GalR) se observa la conservación de la secuencia T-N₁₁-A en los RBS, mostrando adicionalmente una región rica en adeninas entre la T y la A, por otro lado, como cabía esperar, no existe una secuencia consenso para la zona del ABS (Fig. 88).

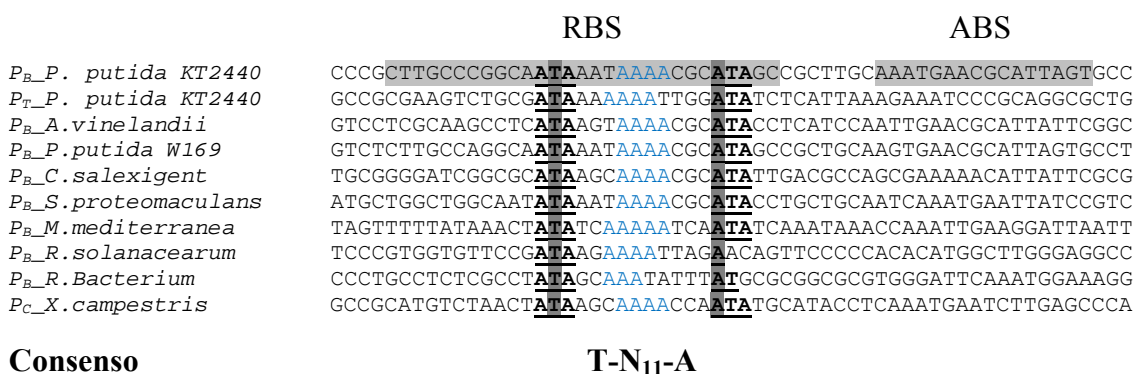


Figura 88. Alineamiento de las posibles regiones operadoras de los promotores controlados por LTTRs de la subfamilia GalR. Se sombrea en gris el RBS y ABS identificados en el promotor *P_B* del *cluster gal* de *P. putida* KT2440. Se indican subrayadas las bases que formarían la repetición directa (ATA) y se sombrea en gris oscuro las bases de la secuencia consenso T-N₁₁-A. Se indican en azul las adeninas conservadas en medio del motivo consenso T-N₁₁-A.

En la forma tetramérica de los LTTRs típicos uno de los dímeros se une al RBS, uniéndose el segundo dímero al ABS (Maddocks y Oyston, 2008). La ocurrencia de un

palíndromo de 15-17 pb en la región RBS en los promotores controlados por LTTRs típicos explica la unión de un dímero del regulador a dicha región, ocupando cada uno de los monómeros integrantes una mitad del palíndromo (Schell, 1993; Maddocks y Oyston, 2008). Interesantemente, en los hipotéticos RBS de los promotores controlados por los reguladores de la subfamilia GalR, si bien se conserva el consenso general T-N₁₁-A no se encuentra éste englobado en un palíndromo sino que la T y la A forman parte de la repetición directa ATA (Fig. 88). Esta observación está de acuerdo con el hecho de que los dos DBD del monómero de GalR no son idénticos, por lo que tampoco reconocerán secuencias operadoras idénticas, lo que explicaría la ausencia de una estructura palindrómica englobando el consenso T-N₁₁-A en el RBS del promotor regulado correspondiente.

La interacción de la forma activa homotetramérica de los LTTRs con el RBS y ABS del promotor y en ausencia de inductor origina una curvatura (*bending*) en el DNA entre dichas regiones que genera posiciones de hipersensibilidad a la DNasaI (Tropel y van der Meer, 2004; Maddocks y Oyston, 2008). La adición del inductor al complejo LTTR-DNA actúa reduciendo la curvatura inducida por el regulador, lo que ocasiona un cambio en el perfil de protección a la DNasaI, y permite la iniciación de la transcripción por la RNAP (Schell, 1993; Tropel y van der Meer, 2004; Maddocks y Oyston, 2008). Un cambio en el perfil de hipersensibilidad a la DNasaI también se observa en la sonda *PbPr* en presencia de GalR cuando se añade OMA con la aparición de una zona de hipersensibilidad localizada en la posición -48 con respecto al sitio +1 del inicio de la transcripción del gen *galB* en ambas hebras (Fig. 71) lo que sugiere que la interacción de GalR en presencia de OMA conlleva además de la unión a la región ABS, un cambio en la curvatura de la región promotora.

En la mayoría de los promotores controlados por LTTR aunque la RNAP se puede unir a la región operadora sin necesidad del regulador, necesita de la presencia de éste en su forma activa para iniciar la transcripción (Tropel y van der Meer, 2004). Cuando se añadió RNAP a la sonda *PbPr* (Fig. 71) se pudo comprobar que esta enzima se unía al promotor P_B y al promotor P_R pese a que ambos carecen de cajas -10 y -35 muy conservadas (Figs. 70 y 71). Cuando se añadía simultáneamente GalR y RNAP se observó una competición entre ellas que reducía la huella de protección causada por ambas sobre la sonda *PbPr*. Sin embargo, GalR parece tener más afinidad por el DNA que la RNAP ya que mientras que la huella atribuida a esta última desaparece, la huella de GalR sobre el RBS se mantiene parcialmente (Fig. 71). La presencia de OMA hace

cambiar por completo el patrón de protección, haciéndose mucho más evidente la protección sobre la región de unión de la RNAP, la cual se solapa en parte con el ABS (Figs. 70, 71). Esta observación coincide con lo descrito para los promotores controlados por LTTRs, en donde como se ha comentado anteriormente, la adición del inductor produce un cambio de la curvatura en el DNA que va a permitir la interacción productiva del regulador con la RNAP como paso previo a la iniciación de la transcripción (Schell, 1993; Tropel y van der Meer, 2004; Maddocks y Oyston, 2008). Se ha propuesto que el dominio C-terminal de la subunidad α (α CTD) de la RNAP interacciona con ciertas regiones del LTTR activo siendo estos contactos importantes para la activación mediada por estos reguladores (Storz *et al.*, 1990; Gussin *et al.*, 1992; Chugani *et al.*, 1997; Park *et al.*, 2002). Se ha sugerido que el complejo proteico LTTR- α CTD es dirigido hacia una región del promotor situado entre el RBS y ABS llamado motivo UP (entorno a la posición -40), lo que incrementa la afinidad de la RNAP por el promotor facilitando la iniciación de la transcripción (Chugani *et al.*, 1997). Los datos obtenidos en los experimentos de protección a la DNasaI con GalR, RNAP y OMA apoyan fuertemente la presencia de esta región UP en el promotor P_B localizándose ésta entre las regiones RBS y ABS, y reflejándose como un incremento en la banda de hipersensibilidad a la DNasaI localizada en la posición -48. No obstante, se hacen necesarios experimentos futuros de medida del grado de curvatura ocasionado por la presencia de GalR, OMA y RNAP en la región promotora $PbPr$ para poder demostrar si como parecen sugerir los experimentos de protección frente a la DNasaI, el desencadenamiento de la transcripción a partir del promotor P_B viene mediado por la inducción de una curvatura en la región promotora $PbPr$ al contrario de lo que ocurre en la mayoría de los promotores controlados por LTTRs.

La necesidad de la presencia de GalR, RNAP y OMA para producir la activación del promotor P_B se puso de manifiesto en los experimentos de transcripción *in vitro* realizados utilizando la sonda $PbPr$ como molde (Fig. 72). Los resultados obtenidos demuestran que estos elementos no sólo son necesarios sino que son suficientes para producir transcrito a partir del promotor P_B , demostrando que la actividad de éste depende críticamente de la cantidad de OMA presente en el ensayo (Fig. 72).

La competencia entre la proteína GalR y la RNAP por su unión a las cajas operadoras del promotor P_B en ausencia del inductor (Fig. 71) junto a la mayor actividad β -galactosidasa encontrada en *E. coli* portando la fusión $P_B::lacZ$ cuando se haya ausente el regulador GalR (Fig. 58), parecen sugerir que éste estaría funcionando

como un represor del promotor P_B en ausencia de inductor. Este mecanismo permitiría un control muy estricto de la actividad del promotor P_B reduciendo la expresión basal del operón *galBCD*. Aunque los LTTRs actúan fundamentalmente como activadores (Maddocks y Oyston, 2008), se conocen ejemplos de LTTRs que actúan como represores del operón catabólico que controlan. Por ejemplo, los reguladores CcpC y GltC de *B. subtilis* actúan como represores transcripcionales (Jourlin-Castelli *et al.*, 2000; Picossi *et al.*, 2007). De la misma forma, el regulador BenM que controla la degradación de benzoato en *Acinetobacter baylyi* ADP1, actúa como represor transcripcional en ausencia del inductor y como activador cuando están presentes los inductores (benzoato y *cis,cis*-muconato) (Bundy *et al.*, 2002).

Cuando se realizaron experimentos de transcripción *in vitro* se pudo ver que la actividad del promotor P_R disminuye en presencia de concentraciones crecientes de GalR, independientemente de la existencia o no de OMA en el ensayo (Fig. 72). Estos resultados están en consonancia con la mayor actividad β -galactosidasa detectada en la cepa *P. putida* KTGALdgalR portando la fusión $P_R::lacZ$ en comparación con la mostrada por la cepa parental portando la misma fusión (Fig. 57C). Además, tampoco se ha podido ver un efecto del inductor (OMA) *in vivo* sobre la actividad del promotor P_R en la cepa parental *P. putida* KTGAL portadora de la fusión $P_R::lacZ$. Todos estos resultados permiten concluir que GalR autoregula su expresión y este efecto es independiente de OMA.

La mayoría de los estudios realizados con LTTRs han ido focalizados al esclarecimiento del mecanismo de activación del operón que están controlando positivamente, dejando de lado el papel represor de los LTTRs sobre su propio promotor. Dado que el gen del regulador generalmente se transcribe divergentemente al promotor que activa, se ha sugerido que la región RBS, situada generalmente entre ambos promotores, estaría desempeñando un papel importante en la autorregulación del propio regulador (Schell, 1993; Tropel y van der Meer, 2004; Maddocks y Oyston, 2008). Como se desprende de los experimentos de protección a la DNasaI realizados utilizando la sonda *PbPr*, el RBS solapa con la caja -35 del promotor P_R (Figs. 70 y 71), sugiriendo que la unión de GalR a esta región estaría impidiendo la accesibilidad de la RNAP a este promotor, impidiendo de esta forma la transcripción del gen *galR*. En ausencia de GalR, la RNAP es capaz de unirse al promotor P_R , originando la correspondiente huella de protección (Fig. 71). Sin embargo, la adición de GalR hace desaparecer completamente la huella originada por la RNAP apareciendo protegida la

región del RBS (Fig. 71), lo que confirma la hipótesis sugerida de que la unión de GalR al RBS de la región intergénica *PbPr* impide la interacción de la RNAP con el promotor P_R , explicando el efecto autorepresor de GalR sobre su propio promotor. Aunque no se han realizado muchos estudios profundizando en los mecanismos que controlan la autorregulación de los LTTRs, se ha demostrado que para el regulador IlvY, considerado como sistema prototipo de regulación de LTTRs, bien estudiado en *E. coli* y en *Salmonella* Spp. (Blazey y Burns, 1980), que la autorrepresión viene mediada por un simple mecanismo de oclusión de la RNAP (Rhee *et al.*, 1998), tal y como ocurre en el sistema GalR/ P_R .

En resumen y con los datos aportados en esta tesis, el mecanismo de regulación propuesto para los promotores P_B y P_R de la ruta *gal* de *P. putida* KTGAL se esquematiza en la figura 89. La confirmación de este mecanismo de regulación, como el estudio de la regulación del promotor P_T dependiente de GalR deberá ser objeto de futuros estudios.

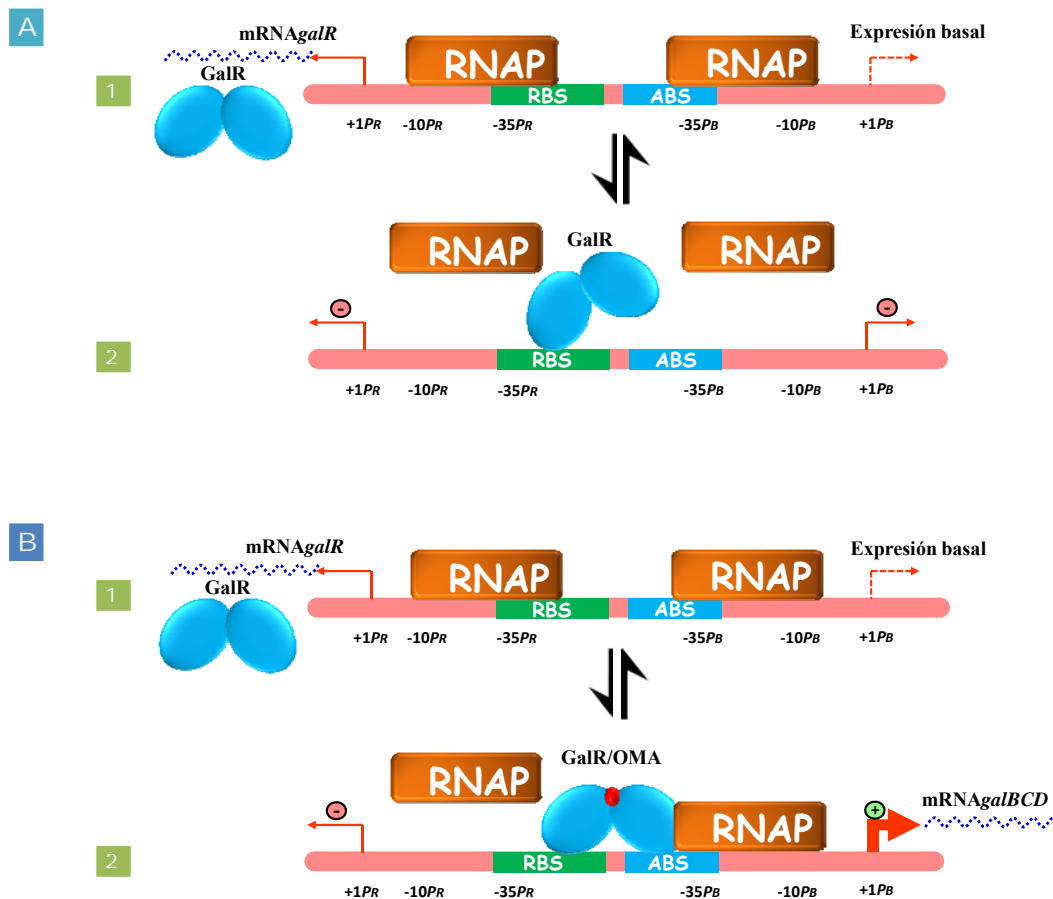


Figura 89. Modelo propuesto de la regulación de los promotores P_R y P_B por GalR. La región intergénica $PbPr$ se muestra como una línea rosa, en ella se indican las cajas operadoras para GalR, RBS (en verde) y ABS (en azul), así como las regiones -10 y -35 de unión a la RNAP de los promotores P_B y P_R . El inicio de transcripción (+1) se indica mediante flechas curvadas, representando con un signo + (verde) una transcripción eficiente dependiente de GalR y con signo - (rojo) que la transcripción está impedida por la acción de GalR, igualmente se indica mediante el grosor de la flecha la cantidad relativa de transcrito producido. La RNAP se representa como un rectángulo naranja, el dímero de GalR como dos óvalos azules y el OMA como un círculo rojo. **A. En ausencia de OMA.** En ausencia de la molécula inductora se establecería un equilibrio entre las situaciones A1 y A2. En unas condiciones sub-óptimas de concentración de GalR (A1), la RNAP es capaz de unirse a las cajas operadoras de los promotores P_R y P_B , permitiendo la iniciación eficaz de la transcripción del operón *galR*, pero no del operón *galBCD*, aunque si ocasionaría una ligerísima expresión basal de éste último (expresada como flecha discontinua). El aumento de los niveles de GalR en la célula (A2), ocasionaría que éste se uniera a la región operadora RBS, promoviendo la represión tanto del promotor P_R como del P_B . La autorrepresión del promotor P_R , haría alcanzar al cabo del tiempo la situación A1 de nuevo, estableciéndose de esta manera el equilibrio entre las situaciones A1 y A2. **B. En presencia OMA.** Puesto que una ligera expresión basal es esperada igualmente a partir del promotor P_T , la aparición del GA en el sistema ocasionaría inmediatamente la presencia de OMA. En presencia de la molécula inductora se establecería un equilibrio entre las situaciones B1 y B2. Si partimos de una situación de concentración sub-óptima de GalR, situación B1, la presencia de OMA no modifica la situación descrita en la condición A1. El aumento consiguiente de los niveles de GalR y la presencia de OMA, B2, ocasionaría un cambio conformacional en el regulador que le haría unirse al RBS y al ABS a la vez.

(Figura 89) (Continuación) La unión a esta segunda caja operadora haría posicionar correctamente a la RNAP, ocasionando una unión productiva y produciendo la expresión del operón *galBCD*. La presencia de OMA en el sistema no varía el estado de represión del promotor P_R debido a que GalR se mantiene unida al RBS. Una disminución en los niveles de la proteína GalR debido a esta represión, revertiría el estado B2 al estado B1. Finalmente, la degradación del GA haría desaparecer el OMA del sistema, revertiendo nuevamente a la situación a la mostrada en el panel A.

4. Distribución del cluster gal en otras bacterias.

Dado que los genes *gal* de *P. putida* KT2440 son los primeros que se describen implicados en la utilización aeróbica de GA como única fuente de carbono y energía, constituyen una herramienta de gran interés para identificar genes homólogos en los genomas bacterianos que actualmente están disponibles en las bases de datos. La distribución de los genes *gal* en los diferentes grupos de bacterias podría ser un parámetro a considerar para estudiar lo extendida que está la capacidad para degradar GA en los microorganismos. El análisis *in silico* identificó 17 posibles *clusters gal* (definidos por la presencia del gen *galA*) distribuidos entre α , β y γ -Proteobacterias (Fig. 90). La ausencia de un *cluster gal* fuera del grupo de las proteobacterias sugiere que la degradación aeróbica de GA en otros microorganismos sigue rutas diferentes a la descrita en esta tesis, como por ejemplo la que implica su descaboxilación a pirogalol y posterior degradación vía 2-hidroxiuconato (Kumar *et al.*, 1999) y cuyos determinantes genéticos son todavía desconocidos.

Los *clusters gal* identificados presentan diferencias en cuanto a la organización y contenido génico en función del subgrupo de proteobacterias al que pertenezcan. Como se ha indicado en el apartado 2.3 de Resultados, se han descrito dos genes no homólogos que codifican la enzima encargada de hidratar OMA y producir CHA, el gen *ligJ* (Hara *et al.*, 2000) y el gen *galB*. Mientras que el gen *galB* está presente en todos los *cluster gal* de γ -proteobacterias, el gen *ligJ* es prácticamente exclusivo de β y α -proteobacterias. Cabe destacar como excepciones que el gen *galB* también está presente en el posible *cluster gal* de *R. bacterium* HTCC2654 (α -proteobacteria) y, junto con el gen *ligJ*, en el genoma de *R. metallidurans* CH34 (β -proteobacteria) (Fig. 90). En las γ -proteobacterias todos los hipotéticos genes involucrados en la degradación de GA se disponen en un único *cluster*, presentando una organización génica muy similar a la descrita en *P. putida* KT2440, en donde el gen *galA* y *galT* siempre están ligados (codifican las primeras actividades de la ruta catabólica) y el módulo *galBCD* (responsable de la degradación del OMA) se transcribe de forma divergente al gen

regulador *galR* (Fig. 90). Como se ha destacado anteriormente (apartado 1 de Discusión), dentro del género *Pseudomonas*, sólo se ha encontrado el cluster *gal* en la especie *P. putida*. La cepa *P. putida* F1 presenta un cluster *gal* prácticamente idéntico al identificado en KT2440 (más de un 98% de identidad en todas sus proteínas). La cepa *P. putida* W619 presenta un cluster muy similar al encontrado en otras cepas de *P. putida*, con la peculiaridad de no presentar elementos transportadores (genes *galT* y *galP*). La capacidad de utilizar GA como única fuente de carbono y energía se confirmó experimentalmente en esta tesis con distintas cepas de *P. putida*, e. g., *P. putida* F1, *P. putida* U, *P. putida* GPo1 (resultados no mostrados). En concordancia con estos datos, otras cepas de *P. putida* han sido descritas como capaces de mineralizar GA, así a las cepas de *P. putida* aisladas por Tack y colaboradores en siringato (ver apartado 5 de Introducción) (Tack *et al.*, 1972b), hay que sumarle las cepas de *P. putida* aisladas recientemente en suelos contaminados con taninos y que utilizan GA como fuente de carbono (Chowdhury *et al.*, 2004). Como a excepción a esta generalidad, cabe destacar la ausencia de un cluster *gal* en la cepa *P. putida* GB-1. Todos estos datos sugieren la adquisición del cluster *gal* sucedió en un momento posterior a la especiación del género *Pseudomonas*, habiéndose adquirido por transferencia génica horizontal desde alguna otra bacteria que comparte el nicho ecológico con *P. putida*. Esta transferencia horizontal del cluster *gal* también explicaría su localización en la isla genómica 46 y adyacente a una presunta transposasa en el genoma de *P. putida* KT2440 (Fig. 10).

En los clusters *gal* encontrados en las β -proteobacterias, al igual que ocurre en γ -proteobacterias, el gen *gala* que codifica la galato dioxigenasa suele estar ligado al resto de genes presumiblemente implicados en mineralizar GA (Fig. 90). La excepción la constituye el cluster *gal* de *C. testosteroni*, el cual presenta una organización más parecida a la de α -proteobacterias como se verá más adelante. El hecho de que *B. cepacia* 383 sea capaz de utilizar GA como única fuente de carbono y energía (datos no mostrados), parece confirmar que efectivamente el agrupamiento génico identificado (Fig. 90) está involucrado en la degradación de este compuesto aromático, al menos, en las especies del género *Burkholderia*.

En α -proteobacterias y en *C. testosteroni*, por el contrario, el gen que codifica la galato dioxigenasa no está ligado a los genes involucrados en la degradación de OMA, apareciendo a menudo asociado a genes que codifican distintas *O*-demetilinas. La bacteria *S. paucimobilis* SYK-6 degrada una gran cantidad de compuestos aromáticos derivados de la lignina a través de la ruta *meta* de degradación de protocatecuato (genes

lig), sin embargo no utiliza GA como única fuente de carbono y energía (Kasai *et al.*, 2005; Masai *et al.*, 2007). La presencia de una galato dioxigenasa codificada en su genoma (DesB) se ha relacionado con la degradación de siringato, el cual, mediante la acción consecutiva de las *O*-demetilinas DesA y DesM, generaría GA. Éste es atacado posteriormente por la dioxigenasa DesB produciendo OMA y convergiendo de esta forma con la ruta de degradación *meta* de protocatecuato (Fig. 7) (Kasai *et al.*, 2005). La disposición y composición génica de los *clusters* de las α -proteobacterias parece sugerir, por tanto, que se trata no tanto de un verdadero *cluster* de genes especializado en la degradación de GA, sino más bien de un conjunto de genes involucrados en la ruta *meta* de degradación de protocatecuato vía OMA (Fig. 7), semejante al *cluster* de *S. paucimobilis* SYK-6. La presencia de una galato dioxigenasa ligada a *O*-demetilinas en estas bacterias, parece sugerir que se trata de *clusters* que codifican una ruta periférica de transformación de siringato en GA y posteriormente en OMA parecida a la que presenta *S. paucimobilis*. Interesantemente, no se ha identificado un homólogo al gen *galT* en *S. paucimobilis* SYK-6 lo cual sugiere, vista la importancia que posee el transporte de GA a través de la membrana interna para su utilización como fuente de carbono, que la ausencia de esta permeasa sería responsable de la incapacidad de este microorganismo de crecer en GA como única fuente de carbono. Apoyando esta idea, cabe resaltar que los genes homólogos a *galT* encontrados tanto en *C. testosteroni* como en las α -proteobacterias presentan una mayor identidad de secuencia con el gen *pcaK* (51-55%) que con el gen *galT* (43-48 %), sugiriendo que codifican permeasas para el transporte de protocatecuato.

Por tanto y como conclusión del análisis de los *cluster* génicos identificados, se podría concluir que si bien en γ - y β -proteobacterias se podrían considerar auténticos *clusters gal*, en α -proteobacterias, los *clusters* génicos identificados parecen tratarse de *clusters* de genes implicados en la degradación *meta* de protocatecuato en donde el producto génico del gen *galA*, estaría implicados en la mineralización de compuestos metoxilados como el siringato.

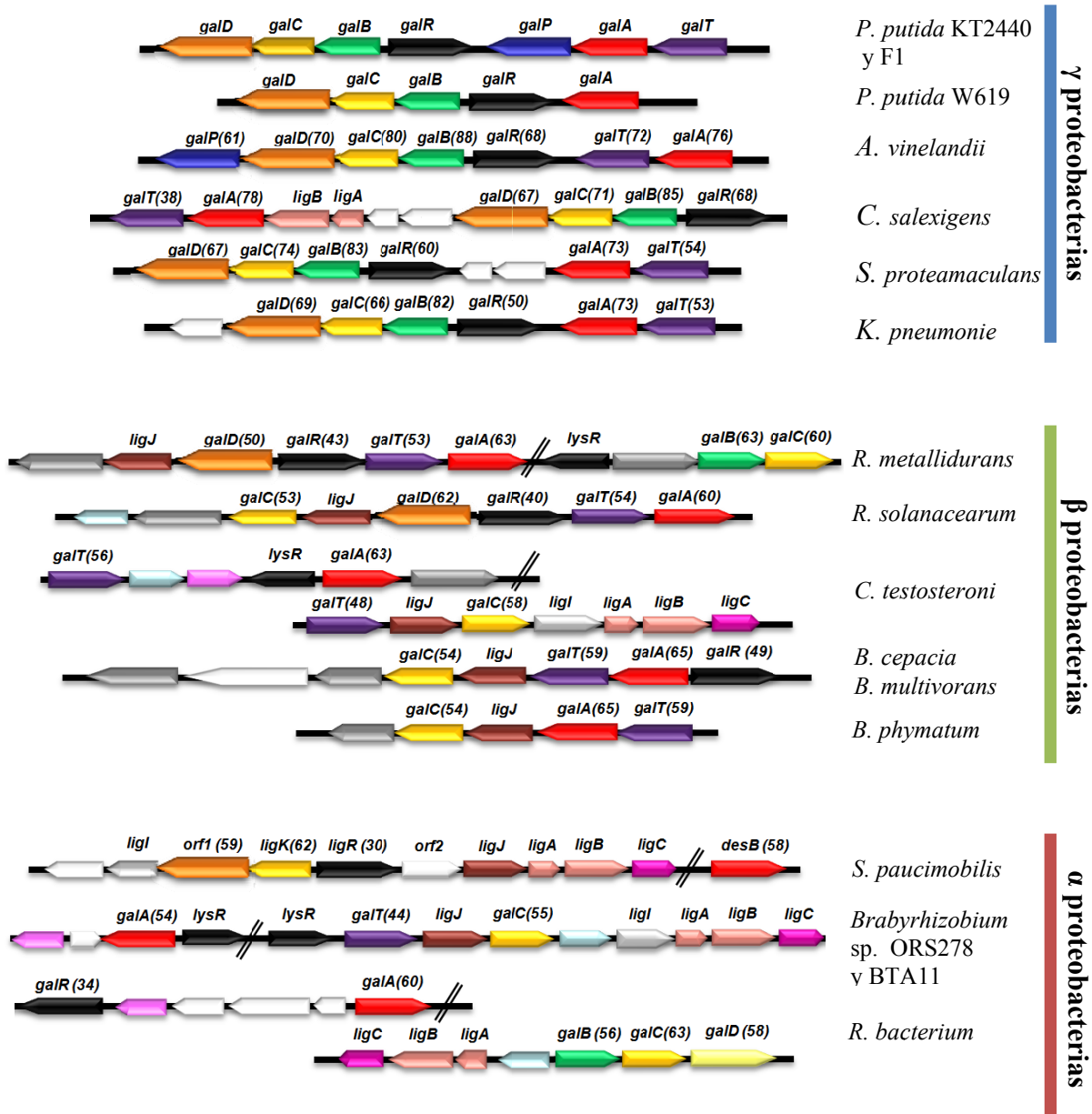


Figura 90. Comparación de los clusters *gal* y *lig* en distintas proteobacterias. Los genes se representan mediante flechas con el siguiente código: en negro, genes reguladores (se nombran como *galR* o *ligR* aquellos genes que codifican LTTRs con dos dominios HTH, nombrándose como *lysR* aquellos que codifican LTTRs tradicionales con un dominio HTH); en morado, genes que codifican permeasas homólogas a GalT; en azul oscuro, genes que codifican porinas homólogas a GalP; en gris oscuro, genes que codifican transportadores de distinto tipo; en rojo, genes que codifican una galato dioxigenasa; en verde, genes que codifican OMA hidratasas homólogas a GalB; en amarillo oscuro, genes que codifican CHA aldolasas; en naranja, genes que codifican OMA ceto-enol isomerases; en marrón claro, genes que codifican las subunidades α y β de la protocatecuato 4,5 dioxigenasa (LigAB); en rosa oscuro, genes que codifican una 4-carbosi-2-hidrosimuconato-6-semialdehido deshidrogenasa (LigC); en azul claro, genes que codifican una posible deshidrogenasa; en gris claro, genes que codifican una PDC hidrolasa (LigI); en marrón oscuro, genes que codifican OMA hidratasas homólogas a LigJ; en rosa claro, genes que codifican posibles O-demetilasas y en blanco se muestran genes de función desconocida. Se muestra entre paréntesis el % de identidad entre los productos de los genes *gal* de *P. putida* y sus homólogos en las diferentes bacterias.

Figura 90. (Continuación). Los números de acceso de los genes mostrados son: *P. putida* KT2440, PP_2513-19; *P.s putida* F1, Pput3195-201; *P. putida* W619, PputW619_2026-30; *Azotobacter vinelandii* DJ, Avin31190-31250; *Chromohalobacter salexigens* DSM3043, Csal_0322-0331; *Serratia proteamaculans* 568, Spro2020-27; *Klebsiella pneumoniae* subs. *pneumoniae* MGH78578, KPN04046-51; *Ralstonia metallidurans* CH34, Rmet_37-09/Rmet_4202-05, *Ralstonia solanacearum* UW551,RSIPO_03319-26; *Comamonas testosteroni* KF-1, CtesDRAFT_PD1610-15/CtesDRAFT_PD1893-99; *Burkholderia multivorans* ATCC 17616, Bmul_6035-42; *Burkholderia cepacia* R383, Bcep18194_C7565-72; *Burkholderia phyatum* STM815, Bphy_6373-6; *Sphingomonas paucimobilis* SYK-6, BAB88735-44/AB190989; *Bradyrhizobium* sp. OR5278, BRADO_1851-54/BRADO_2334-42, *Bradyrhizobium* sp. BTAi1, BBta_2173-75/BBta_2695-704; *Rhodobacterales bacterium* HTCC2654, BB2654_20948-78/23248/73.

Como se ha comentado en el apartado 5 de la Introducción, el protocatecuato es un intermediario central de la degradación de numerosos compuestos aromáticos. (Fig. 1 y Fig. 6). Este compuesto se mineraliza mediante la ruta *ortho* vía β -cetoadipato (Harwood y Parales, 1996) o mediante una ruta *meta* vía OMA (Dagley *et al.*, 1968). La ruta *ortho* se encuentra mucho más extendida entre los microorganismos, sugiriendo que surgió en un momento más temprano de la evolución. El género *Pseudomonas*, con algunas excepciones como ocurre en *P. ochraceae* (Maruyama *et al.*, 1978; Maruyama *et al.*, 2004) degrada protocatecuato vía β -cetoadipato, canalizando hacia esta ruta multitud de compuestos aromáticos (Jiménez *et al.*, 2002; Jiménez *et al.*, 2004) (Fig. 6). Por el contrario, y como acabamos de ver, *S. paucimobilis* SYK-6, utiliza la ruta *meta* para degradar una gran cantidad de compuestos aromáticos que generan protocatecuato o GA mediante diferentes rutas periféricas (Masai *et al.*, 2007) (Fig. 7). Es interesante el hecho de que no se hayan encontrado genes involucrados en la ruta *ortho* de degradación de protocatecuato en ninguna de las α -proteobacterias que presentan un hipotético *cluster gal/lig*, estando esta ruta presente en las β - y γ -proteobacterias que utilizan protocatecuato, a excepción nuevamente de *C. testosteroni*. Dado que no se ha descrito ninguna ruta *ortho* de degradación de GA que converja en la ruta del β -cetoadipato, se explica la adquisición de una ruta (*cluster gal*) exclusiva para la degradación de GA en β - y γ -proteobacterias.

La búsqueda de genes homólogos a *galB* o *galR* en las bases de datos identificó en distintas bacterias agrupaciones génicas con diferente grado de complejidad que los incluían. Así, en el genoma de varias especies del género *Yersinia* se localizan clusters que codifican proteínas homólogas a GalB, GalC o GalR junto a presuntos transportadores de ácidos di- o tricarboxílicos (Fig. 91). Estos agrupamientos génicos podrían estar implicados en la degradación de algún ácido carboxílico estructuralmente relacionado con el OMA y podrían considerarse el equivalente de un cluster ancestral

que derivó en una ruta de degradación de GA (u otro ácido aromático relacionado) mediante la adquisición de nuevos genes por transferencia horizontal. La adquisición, por ejemplo, de un gen homólogo a *galD*, el cual codificaría algún tipo de ceto-enol isomerasa de ácidos tricarboxílicos o un gen que codifique alguna deshidrogenasa, permitiría aumentar el rango de sustratos degradado vía hidratación y rotura aldólica mediada por GalB y GalC en la ruta ancestral. Esta etapa en la evolución sería equivalente al *cluster* identificado en *S. meliloti* (Fig. 91). La adquisición adicional de un gen homólogo a *ligI*, el cual codifica una PDC hidrolasa, permitiría utilizar como fuente de carbono el propio PDC, un compuesto vegetal muy abundante en la naturaleza (Wilkes y Glasl, 2001) y que también es intermediario en la ruta *meta* de degradación de protocatecuato (Fig. 7) (Masai *et al.*, 2007). Un *cluster* de este tipo se ha identificado en *P. putida* F1 (Fig. 91). Finalmente, la adquisición de genes que codifican diferentes tipos de extradiol dioxigenasas, como el caso de la proteína Xyle (catecol 2,3-dioxigenasa) o GalA, completaría el ensamblaje de una nueva ruta de degradación *meta* para el catecol, como podría ser el caso en *R. leguminosarum* (Fig. 91) o la ruta de degradación de GA en *P. putida* estudiada en esta tesis. La optimización de la ruta de degradación de GA en *P. putida* podría haber ocurrido mediante la adquisición de genes de transporte específicos para GA. Así, *galT*, podría haber surgido mediante una duplicación y posterior evolución del gen *pcaK* de la ruta *ortho*, el cual se encuentra involucrado en el transporte de protocatecuato y parece tener un origen evolutivo común con el gen *galT* (Fig. 81). La observación de que la proteína GalT todavía mantenía la capacidad de transportar protocatecuato (Tabla 10), apoya esta hipótesis. Por otra parte, la adquisición del gen *galP* por el *cluster gal* de *P. putida* KT2440 podría explicarse mediante un evento de duplicación génica post-especiación de un gen que codificase una porina y como resultado de la adaptación a un nicho ecológico específico de *P. putida* en el que abundan compuestos aromáticos como el GA.

En este punto, se podría hipotetizar que futuras adquisiciones génicas permitirían continuar con la evolución del *cluster gal*. Así, una futura adquisición de genes que codifican *O*-demetilasas como ha ocurrido en *S. paucimobilis* SYK-6 por parte de *P. putida* KT2440, capacitaría a esta bacteria para crecer a expensas de derivados metoxilados, tales como el siringato, como ya ocurre en los diferentes aislados de *P. putida* descritos (Tack *et al.*, 1972b; Kersten *et al.*, 1982). Por otro lado, la adquisición de un gen que codifique una tanasa, tal y como ocurre en *C. freundii* (Kumar *et al.*,

1999), permitiría a *P. putida* utilizar taninos complejos como fuente de carbono, por ejemplo.

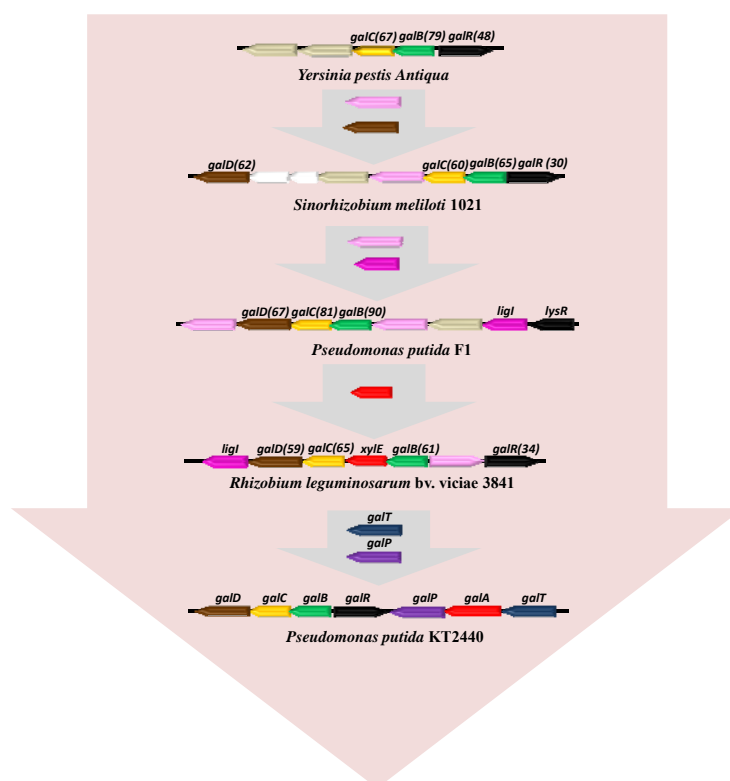


Fig. 91. Posibles etapas en el ensamblaje del *cluster gal* de *P. putida* a partir de un agrupamiento génico implicado en la degradación de un ácido tricarboxílico relacionado con el OMA. Los genes se representan mediante flechas siguiendo el siguiente código de colores: negro, genes reguladores; verde, genes que codifican OMA hidratasa; amarillo, genes que codifican CHA aldolasas; gris, genes que codifican transportadores de ácidos di- o tri-carboxílicos; rosa claro, genes que codifican deshidrogenasas; marrón, genes que codifican ceto-enol isomerasas; rosa oscuro, genes que codifican PDC hidroxilasas y rojo, genes que codifican para extradiol dioxigenasas. Se emplea la nomenclatura del *cluster gal* de *P. putida*. Excepto para *ligI* (codifica una posible PDC hidrolasa) y *xylE* (codifica una posible catecol 2,3-dioxigenasa). La adquisición de genes bien por transferencia génica horizontal o duplicación génica se señala mediante flechas grises. Se muestra entre paréntesis el % de identidad entre los productos de los genes *gal* homólogos a los del *cluster gal* de *P. putida*. Los *clusters* representados se engloban en una flecha rosa que representa la posible dirección de la evolución. Los genes representados son: YP_3457-61 de *Yersinia pestis Antiqua*; SMC0048-54 de *Sinorhizobium meliloti* 1021; Pput_1359-1366 de *Pseudomonas putida* F1; RL_2849-55 de *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* 3841 y PP_2513-19 de *Pseudomonas putida* KT2440.

El *cluster gal* de *P. putida* representa por lo tanto, un interesante sistema modelo para el estudio de la evolución de rutas de degradación de compuestos aromáticos y una fuente inestimable de nuevas enzimas, reguladores y transportadores de gran interés tanto en aspectos de ciencia básica como por sus posibles aplicaciones biotecnológicas (desarrollo de biosensores, síntesis de productos de interés industrial, etc.).

VI. CONCLUSIONES

El trabajo descrito a lo largo de esta Tesis ha dado lugar a las siguientes conclusiones:

1. Se ha identificado y caracterizado el primer *cluster* génico *gal*, responsable de la ruta de degradación aeróbica de ácido gálico (GA) en *Pseudomonas putida* KTGAL, una cepa derivada de *P. putida* KT2440 y adaptada a la utilización de GA como única fuente de carbono y energía. Los genes *gal* confieren la capacidad de degradar GA a otras bacterias Gram-negativas, tales como otras cepas de *Pseudomonas* o *E. coli*.
2. El gen *galA* codifica una dioxigenasa de ruptura de anillo que convierte el GA en la forma ceto del oxalmesaconato (OMA), siendo la primera galato dioxigenasa de estructura primaria conocida que se ha descrito en la literatura. GalA representa el primer miembro de una nueva subfamilia de extradiol dioxigenasas de tipo II con una novedosa arquitectura modular consistente en dos dominios que pueden haber evolucionado de la fusión de la subunidad menor (α) y mayor (β) de las protocatecuato 4,5-dioxigenasas.
3. El gen *galD* codifica una isomerasa que transforma el OMA_{ceto} en su forma OMA_{enol}, siendo la primera vez que se describe una OMA ceto-enol isomerasa en la literatura. La identificación de esta etapa enzimática completa la ruta bioquímica de degradación de GA descrita anteriormente en bacterias. GalD pertenece a una nueva familia de isomerasas bacterianas distinta a las descritas hasta ahora en rutas de catabolismo de compuestos aromáticos y que también se encuentran presentes en rutas de degradación *meta* de protocatecuato vía OMA.
4. El gen *galB* codifica una hidratasa que convierte la forma enol del OMA en oxalcitromalato (CHA), siendo el prototipo de una nueva familia de OMA-hidratasas no relacionada con otras OMA-hidratasas ya caracterizadas y pertenecientes a la familia amidohidrolasa_2. La proteína GalB es una Zn²⁺-hidratasa hexamérica cuya tríada facial de interacción con Zn²⁺ (los residuos His14, Asp17 e H127) podría haber evolucionado a partir del centro activo de ciertas deacetilasas dependientes de Zn²⁺, siendo la primera vez que se describe una actividad hidratasa dentro de la gran superfamilia de las Zn²⁺-hidrolasas.

5. El gen *galC* codifica la aldolasa responsable de la última etapa enzimática en la ruta de degradación de GA, es decir, la rotura aldólica del CHA para formar piruvato y oxalacetato. El modelo de estructura propuesto para GalC la clasifica como una aldolasa que no presenta un plegamiento típico de metiltransferasas, sino de proteínas implicadas en transferencia de grupos fosfatos.
6. El gen *galT* codifica un transportador de la superfamilia MFS que utiliza la fuerza protón motriz para energizar el transporte de GA, y en menor medida de protocatecuato al interior celular. Un gen *galT* funcional es necesario y suficiente para permitir el crecimiento de *P. putida* KT2440 en GA, siendo la causa de la adaptación de esta cepa (*P. putida* KTGAL) a la utilización de GA como única fuente de carbono y energía. Además, la proteína GalT también está implicada en la quimiotaxis de *P. putida* frente al GA.
7. El gen *galP* codifica una porina de membrana externa de la familia OpdK, la cual, si bien no es esencial para el crecimiento de *P. putida* en GA 5 mM, si contribuye al transporte en condiciones de bajas concentraciones de GA (10 μ M).
8. 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. Los promotores catabólicos P_T y P_B son inducibles en presencia de GA, siendo constitutiva la expresión a partir del promotor P_R . El OMA es el metabolito inductor de la ruta, siendo la primera vez que se identifica la molécula inductora de la ruta de degradación de OMA en bacterias.
9. El gen *galR* codifica un regulador transcripcional que activa los promotores catabólicos P_T y P_B en presencia de OMA, reprimiendo en su ausencia al promotor P_B y actuando igualmente como autorrepressor de su propia expresión independientemente de la presencia de OMA. GalR representa el prototipo de una nueva subfamilia de reguladores de la familia LysR (subfamilia GalR) presentando una novedosa arquitectura modular ya que posee dos dominios de unión a DNA consecutivos (DBD1 y DBD2) en su extremo N-terminal, los cuales, muy probablemente se han originado por la fusión de dominios DBD1 y DBD2 de reguladores LysR clásicos diferentes.

10. GalR se une eficazmente a las regiones promotoras *PbPr* y *Pt* en ausencia de inductor. En la región promotora *PbPr*, GalR interacciona con la caja operadora RBS en ausencia de inductor y con ésta y la región operadora ABS en presencia de OMA. La forma activa del regulador GalR es un homodímero, siendo la primera vez que se describe este estado oligomérico en un regulador de la familia LysR interaccionando con su DNA diana, y probablemente sea reflejo de la peculiar duplicación de dominios DBD en los reguladores de la subfamilia GalR.
11. La RNA polimerasa (RNAP) es capaz de unirse a la región promotora *PbPr* pero no es capaz de iniciar la transcripción eficientemente a partir del promotor P_B en ausencia de GalR y OMA. El regulador GalR es capaz de desplazar a la RNAP de la región promotora *PbPr*, lo que explica su función como represor de los promotores P_R y P_B en ausencia de inductor. La presencia del inductor OMA permite que GalR se repositione en el promotor P_B reclutando a la RNAP y permitiendo así la activación de dicho promotor.
12. A la regulación específica dependiente de GalR de los promotores catabólicos P_T y P_B se sobreimpone una regulación global por fuentes de carbono preferenciales (represión catabólica), tales como fenilacetato y acetato. El promotor P_T está sujeto a una represión catabólica adicional por succinato y casaminoácidos.
13. El sistema regulador GalR/ P_B se ha utilizado para el diseño del primer biosensor celular de GA cuyo límite inferior de detección es GA 0,5 μ M.
14. Aunque, dentro del género *Pseudomonas* sólo se han identificado *clusters gal* en la especie *P. putida*, los genes *gal* también se localizan en los géneros de algunas otras γ - y β -proteobacterias. Por el contrario, en α -proteobacterias portadoras del gen *galA*, la ruta central del OMA suele ir ligada a los genes que codifican la ruta meta de degradación de protocatecuato. Un modelo sobre la evolución del *cluster gal* en bacterias ha sido propuesto.

VII. BIBLIOGRAFÍA

- Aguilar, C.N., Rodríguez, R., Gutiérrez-Sánchez, G., Augur, C., Favela-Torres, E., Prado-Barragan, L.A., Ramírez-Coronel, A. y Contreras-Esquivel, J.C.** (2007) Microbial tannases: advances and perspectives. *Appl Microbiol Biotechnol.* **76**: 47-59.
- Alhapel, A., Darley, D.J., Wagener, N., Eckel, E., Elsner, N. y Pierik, A.J.** (2006) Molecular and functional analysis of nicotinate catabolism in *Eubacterium barkeri*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **103**: 12341-12346.
- 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**.
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. y Lipman, D.** (1990) Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* **215**: 403-410.
- Allende, J., Gibello, A., Martin, M. y Garrido-Pertierra, A.** (1992) Transport of 4-hydroxyphenylacetic acid in *Klebsiella pneumoniae*. *Arch Biochem Biophys* **292**: 583-588.
- Aranda-Olmedo, I., Marín, P., Ramos, J.L. 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.
- Arias-Barrau, E., Olivera, E.R., Luengo, J.M., Fernández, C., Galán, B., García, J.L., 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.
- Arias, S., Olivera, E.R., Arcos, M., Naharro, G. y Luengo, J.M.** (2008) Genetic analyses and molecular characterization of the pathways involved in the conversion of 2-phenylethylamine and 2-phenylethanol into phenylacetic acid in *Pseudomonas putida* U. *Environmental Microbiology* **10**: 413-432.
- Armitage, J.** (1999) Bacterial tactic responses. *Adv Microb Physiol.* **41**: 229-289.
- Arnold, K., Bordoli, L., Kopp, J. y Schwede, T.** (2006) The SWISS-MODEL workspace: a web-based environment for protein structure homology modelling. *Bioinformatics* **22**: 195-201.
- Assinder, S.J. y Williams, P.** (1990) The TOL plasmids: determinants of the catabolism of toluene and the xylenes. *Adv Microb Physiol* **31**.
- Asturias, J.A., Eltis, L.D., Prucha, M. y Timmis, K.N.** (1994) Analysis of three 2,3-dihydroxybiphenyl 1,2-dioxygenases found in *Rhodococcus globerulus* P6. Identification of a new family of extradiol dioxygenases. *J. Biol. Chem.* **269**: 7807-7815.
- Auld, D.S.** (2001) Zinc coordination sphere in biochemical zinc sites. *BioMetals* **14**: 271-313.

- Bagge, N., Schuster, M., Hentzer, M., Ciofu, O., Givskov, M., Greenberg, E.P. y Hoiby, N.** (2004) *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms Exposed to Imipenem Exhibit Changes in Global Gene Expression and β -Lactamase and Alginate Production. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**: 1175-1187.
- Barragan, M.J.L., Carmona, M., Zamarro, M.T., Thiele, B., Boll, M., Fuchs, G., Garcia, J.L. y Diaz, E.** (2004) The bzd Gene Cluster, Coding for Anaerobic Benzoate Catabolism, in *Azoarcus* sp. Strain CIB. *J. Bacteriol.* **186**: 5762-5774.
- 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.
- Bauchop, T. y Elsdén, S.R.** (1960) The Growth of Micro-organisms in Relation to their Energy Supply. *J Gen Microbiol* **23**: 457-469.
- Bauer, I., Max, N., Fetzner, S. y Lingens, F.** (1996) 2,4-Dioxygenases Catalyzing N-Heterocyclic-Ring Cleavage and Formation of Carbon Monoxide. *European Journal of Biochemistry* **240**: 576-583.
- Bayley, S.A., Duggleby, C.J., Worsey, M.J., Williams, P.A., Hardy, K.G. y Broda, A.P.** (1977) Two modes of loss of the Tol function from *Pseudomonas putida* mt-2. *Mol Gen Genet* **154**: 203 - 204.
- Belitsky, B.R., Janssen, P.J. y Sonenshein, A.L.** (1995) Sites required for GltC-dependent regulation of *Bacillus subtilis* glutamate synthase expression. *J. Bacteriol.* **177**: 5686-5695.
- Bhat, T.K., Singh, B. y Sharma, O.P.** (1998) Microbial degradation of tannins--a current perspective. *Biodegradation.* **9**: 343-357.
- Bibikov, S.I., Biran, R., Rudd, K.E. y Parkinson, J.S.** (1997) A signal transducer for aerotaxis in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **179**: 4075-4079.
- Blankenfeldt, W., Kuzin, A.P., Skarina, T., Korniyenko, Y., Tong, L., Bayer, P., Janning, P., Thomashow, L.S. y Mavrodi, D.V.** (2004) Structure and function of the phenazine biosynthetic protein PhzF from *Pseudomonas fluorescens*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**: 16431-16436.
- Blazey, D.L. y Burns, R.O.** (1980) Gene ilvY of *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.* **142**: 1015-1018.
- Boll, M.** (2005) Dearomatizing benzene ring reductases. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **10**: 132-142.
- 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.

- Bradford, M.M.** (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**: 248-254.
- Bren, A. y Eisenbach, M.** (2000) How Signals Are Heard during Bacterial Chemotaxis: Protein-Protein Interactions in Sensory Signal Propagation. *J. Bacteriol.* **182**: 6865-6873.
- Brune, A. y Schink, B.** (1992) Phloroglucinol pathway in the strictly an aerobic *Pelobacter acidigallici*: fermentation of trihydroxybenzenes to acetate via triacetic acid. *Arch. Microbiol* **157**: 417-424.
- Brzostowicz, P.C., Reams, A.B., Clark, T.J. y Neidle, E.L.** (2003) Transcriptional Cross-Regulation of the Catechol and Protocatechuate Branches of the β -Ketoadipate Pathway Contributes to Carbon Source-Dependent Expression of the *Acinetobacter* sp. Strain ADP1 *pobA* Gene. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**: 1598-1606.
- Bugg, T.D.** (1993) Overproduction, purification and properties of 2,3-dihydroxyphenylpropionate 1,2-dioxygenase from *Escherichia coli*. *Biochim Biophys Acta.* **1202**: 258-264.
- Bundy, B.M., Collier, L.S., Hoover, T.R. y Neidle, E.L.** (2002) Synergistic transcriptional activation by one regulatory protein in response to two metabolites. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**: 7693-7698.
- Carmona, M., Prieto, M.A., Galán, B., García, J.L. 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.
- Cases, I. y de Lorenzo, V.** (1998) Expression systems and physiological control of promoter activity in bacteria. *Curr Opin Microbiol* **1**: 303 - 310.
- Cases, I. y de Lorenzo, V.** (2001) The black cat/white cat principle of signal integration in bacterial promoters. *The EMBO Journal* **20**.
- Cases, I. y de Lorenzo, V.** (2005) Promoters in the environment: transcriptional regulation in its natural context. *Nat Rev Micro* **3**: 105-118.
- Cebolla, A., Sousa, C. y de Lorenzo, V.** (1997) Effector Specificity Mutants of the Transcriptional Activator NahR of Naphthalene Degrading *Pseudomonas* Define Protein Sites Involved in Binding of Aromatic Inducers. *J. Biol. Chem.* **272**: 3986-3992.
- Cirilli, M., Zheng, R., Scapin, G. y Blanchard, J.S.** (1998) Structural Symmetry: The Three-Dimensional Structure of *Haemophilus Influenzae* Diaminopimelate Epimerase. *Biochemistry* **37**: 16452-16458.

Cisneros, G.A., Liu, H., Zhang, Y. y Yang, W. (2003) Ab Initio QM/MM Study Shows There Is No General Acid in the Reaction Catalyzed by 4-Oxalocrotonate Tautomerase. *J. Am. Chem. Soc.* **125**: 10384-10393.

Clark, T.J., Momany, C. y Neidle, E.L. (2002) The *benPK* operon, proposed to play a role in transport, is part of a regulon for benzoate catabolism in *Acinetobacter* sp. strain ADP1. *Microbiology* **148**: 1213-1223.

Clark, T.J., Phillips, R.S., Bundy, B.M., Momany, C. y Neidle, E.L. (2004) Benzoate Decreases the Binding of cis,cis-Muconate to the BenM Regulator despite the Synergistic Effect of Both Compounds on Transcriptional Activation. *J. Bacteriol.* **186**: 1200-1204.

Coates, J.D., Bhupathiraju, V.K., Achenbach, L.A., McInerney, M.J. y Lovley, D.R. (2001) *Geobacter hydrogenophilus*, *Geobacter chapellei* and *Geobacter grbiciae*, three new, strictly anaerobic, dissimilatory Fe(III)-reducers. *Int J Syst Evol Microbiol* **51**: 581-588.

Coco, W.M., Parsek, M.R. y Chakrabarty, A.M. (1994) Purification of the LysR family regulator, ClcR, and its interaction with the *Pseudomonas putida clcABD* chlorocatechol operon promoter. *J. Bacteriol.* **176**: 5530-5533.

Coco, W.M., Rothmel, R.K., Henikoff, S. y Chakrabarty, A.M. (1993) Nucleotide sequence and initial functional characterization of the *clcR* gene encoding a LysR family activator of the *clcABD* chlorocatechol operon in *Pseudomonas putida*. *J. Bacteriol.* **175**: 417-427.

Coenye, T. y Vandamme, P. (2003) Diversity and significance of *Burkholderia* species occupying diverse ecological niches. *Environ Microbiol* **5**: 719-729.

Coleman, J.E. (1998) Zinc enzymes. *Current Opinion in Chemical Biology* **2**: 222-234.

Collier, L.S., Nichols, N.N. y Neidle, E.L. (1997) *benK* encodes a hydrophobic permease-like protein involved in benzoate degradation by *Acinetobacter* sp. strain ADP1. *J. Bacteriol.* **179**: 5943-5946.

Conejo, M.C., Garcia, I., Martinez-Martinez, L., Picabea, L. y Pascual, A. (2003) Zinc Eluted from Siliconized Latex Urinary Catheters Decreases OprD Expression, Causing Carbapenem Resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **47**: 2313-2315.

Chaiyen, P., Sucharitakul, J., Svasti, J., Entsch, B., Massey, V. y Ballou, D.P. (2004) Use of 8-Substituted-FAD Analogues To Investigate the Hydroxylation Mechanism of the Flavoprotein 2-Methyl-3-hydroxypyridine-5-carboxylic Acid Oxygenase. *Biochemistry* **43**: 3933-3943.

Chen, L.H., Kenyon, G.L., Curtin, F., Harayama, S., Bembenek, M.E., Hajipour, G. y Whitman, C.P. (1992) 4-Oxalocrotonate tautomerase, an enzyme composed of 62 amino acid residues per monomer. *J. Biol. Chem.* **267**: 17716-17721.

- Chowdhury, S.P., Khanna, S., Verma, S.C. y Tripathi, A.K.** (2004) Molecular diversity of tannic acid degrading bacteria isolated from tannery soil. *Journal of Applied Microbiology* **97**: 1210-1219.
- Christianson, D.** (1991) Structural biology of zinc. *Adv Protein Chem* **42**: 281-355.
- Chugani, S.A., Parsek, M.R., Hershberger, C.D., Murakami, K., Ishihama, A. y Chakrabarty, A.M.** (1997) Activation of the catBCA promoter: probing the interaction of CatR and RNA polymerase through in vitro transcription. *J. Bacteriol.* **179**: 2221-2227.
- Dagley, S.** (1981) Degradation of xenobiotics and recalcitrant compounds. In *New perspectives in aromatic catabolism*. Leisinger, T. (ed). New York: Academic Press, pp. 181-186.
- Dagley, S., Geary, P.J. y Wood, J.M.** (1968) The metabolism of protocatechuate by *Pseudomonas testosteroni*. *Biochem J* **109**: 559-568.
- Davis, B.D. y Mingioli, E.S.** (1950) Mutants of *Escherichia coli* requiring methionine or vitamin B12. *J. Bacteriol.* **60**: 17-28.
- Davis, J., He, Z., Somerville, C. y Spain, J.** (1999) Genetic and biochemical comparison of 2-aminophenol 1,6-dioxygenase of *Pseudomonas pseudoalcaligenes* JS45 to meta-cleavage dioxygenases: divergent evolution of 2-aminophenol meta-cleavage pathway. *Arch Microbiol* **172**: 330-339.
- de Lorenzo, V.** (2001) Cleaning up behind us. The potential of genetically modified bacteria to break down toxic pollutants in the environment. *EMBO Rep* **2**: 357-359.
- de Lorenzo, V. y Timmis, K.N.** (1994) Analysis and construction of stable phenotypes in gram-negative bacteria with Tn5- and Tn-10 derived minitransposons. *Methods Enzymol* **235**: 386-405.
- DeLano, W.L.** (2002) The PyMOL Molecular Graphics System. In. Scientific, D. (ed). San Carlos CA.
- Denef, V.J., Klappenbach, J.A., Patrauchan, M.A., Florizone, C., Rodrigues, J.L.M., Tsoi, T.V., Verstraete, W., Eltis, L.D. y Tiedje, J.M.** (2006) Genetic and Genomic Insights into the Role of Benzoate-Catabolic Pathway Redundancy in *Burkholderia xenovorans* LB400. *Appl Environ Microbiol* **72**: 585 - 595.
- Dennis, D.A., Chapman, P.J. y Dagley, S.** (1973) Degradation of Protocatechuate in *Pseudomonas testosteroni* by a Pathway Involving Oxidation of the Product of Meta-Fission. *J. Bacteriol.* **113**: 521-523.
- Díaz, E.** (2004) Bacterial degradation of aromatic pollutants: a paradigm of metabolic versatility. *Int Microbiol* **7**: 173-180.
- Díaz, E. y Prieto, M.** (2000) Bacterial promoters triggering biodegradation of aromatic pollutants. *Curr Opin Biotechnol* **11**: 467-475.

Díaz, E., Ferrández, A., Prieto, M.A. y García, J.L. (2001) Biodegradation of Aromatic Compounds by *Escherichia coli*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **65**: 523-569.

Ditty, J.L. y Harwood, C.S. (1999) Conserved Cytoplasmic Loops Are Important for both the Transport and Chemotaxis Functions of PcaK, a Protein from *Pseudomonas putida* with 12 Membrane-Spanning Regions. *J. Bacteriol.* **181**: 5068-5074.

Ditty, J.L. y Harwood, C.S. (2002) Charged Amino Acids Conserved in the Aromatic Acid/H⁺ Symporter Family of Permeases Are Required for 4-Hydroxybenzoate Transport by PcaK from *Pseudomonas putida*. *J. Bacteriol.* **184**: 1444-1448.

Dombroski, A.J. (1997) Recognition of the -10 Promoter Sequence by a Partial Polypeptide of sigma 70 in Vitro. *J. Biol. Chem.* **272**: 3487-3494.

dos Santos, V., Heim, S., Moore, E.R.B., Stratz, M. y Timmis, K.N. (2004) Insights into the genomic basis of niche specificity of *Pseudomonas putida* KT2440. *Environmental Microbiology* **6**: 1264 - 1286.

Dunwell, J.M., Culham, A., Carter, C.E., Sosa-Aguirre, C.R. y Goodenough, P.W. (2001) Evolution of functional diversity in the cupin superfamily. *Trends Biochem. Sci.* **26**: 740-746.

Eaton, R.W. (2001) Plasmid-Encoded Phthalate Catabolic Pathway in *Arthrobacter keyseri* 12B. *J. Bacteriol.* **183**: 3689-3703.

Edelstein, S., Poyart, C., Blouquit, Y. y Kister, J. (1986) Self-association of haemoglobin Olympia (alpha 2 beta 2 20 (B2) Val---Met). A human haemoglobin bearing a substitution at the surface of the molecule. *J Mol Biol* **187**: 277-289.

Erb, R.W., Eichner, C.A., Wagner-Dobler, I. y Timmis, K.N. (1997) Bioprotection of microbial communities from toxic phenol mixtures by a genetically designed *Pseudomonad*. *Nat. Biotechnol* **15**: 378-382.

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

Fernández, C., Ferrández, A., Minambres, B., Díaz, E. y García, J.L. (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.

Ferrández, A., García, J.L. 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.

Ferrández, A., Miñambres, B., García, B., Olivera, E.R., Luengo, J.M., García, J.L. y Díaz, E. (1998) Catabolism of Phenylacetic Acid in *Escherichia coli*. CHARACTERIZATION OF A NEW AEROBIC HYBRID PATHWAY. *J. Biol. Chem.* **273**: 25974-25986.

- Fetzner, S.** (2000) Enzymes involved in the aerobic bacterial degradation of N-heteroaromatic compounds: molybdenum hydroxylases and ring-opening 2,4-dioxygenases. *Naturwissenschaften* **87**: 59-69.
- Fetzner, S.** (2002) Oxygenases without requirement for cofactors or metal ions. *Appl Microbiol Biotechnol* **60**: 243-257.
- Fitzpatrick, P.** (1999) Tetrahydropterin-dependent amino acid hydroxylases. *Annu Rev Biochem* **68**: 355-381.
- Franco, A.R., Calheiros, C.S., Pacheco, C.C., De Marco, P., Manaia, C.M. y Castro, P.M.** (2005) Isolation and characterization of polymeric galloyl-ester-degrading bacteria from a tannery discharge place. *Microb Ecol* **50**: 550-556.
- Franklin, F.C., Bagdasarian, M., Bagdasarian, M.M. 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.
- 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.
- Fu, H.-W., Beese, L.S. y Casey, P.J.** (1998) Kinetic Analysis of Zinc Ligand Mutants of Mammalian Protein Farnesyltransferase. *Biochemistry* **37**: 4465-4472.
- Fuchs, G.** (2008) Anaerobic metabolism of aromatic compounds. *Ann N Y Acad Sci* **1125**: 82-99.
- Galán, B., Díaz, E. y García, J.L.** (2000) Enhancing desulphurization by engineering a flavin reductase-encoding gene cassette in recombinant biocatalysts. *Environ Microbiol* **2**: 687 - 669.
- Gamella, M., Campuzano, S., Reviejo, A.J. y Pingarron, J.M.** (2006) Electrochemical Estimation of the Polyphenol Index in Wines Using a Laccase Biosensor. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **54**: 7960-7967.
- Garvey, G.S., Rocco, C.J., Escalante-Semerena, J.C. y Rayment, I.** (2007) The three-dimensional crystal structure of the PrpF protein of *Shewanella oneidensis* complexed with trans-aconitate: Insights into its biological function. *Protein Sci* **16**: 1274-1284.
- Gerischer, U.** (2002) Specific and global regulation of genes associated with the degradation of aromatic compounds in bacteria. *J Mol Microbiol Biotechnol.* **4**: 111-121.

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.

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-Dehydroadipyl-CoA Semialdehyde Dehydrogenase. *J. Bacteriol.* **188**: 2919-2927.

Gibson, D.T., Koch, J.R. y Kallio, R.E. (1968) Oxidative degradation of aromatic hydrocarbons by microorganisms. I. Enzymatic formation of catechol from benzene. *Biochemistry* **7**: 2653-2662.

Gibson, J. y Harwood, S.C. (2002) METABOLIC DIVERSITY IN AROMATIC COMPOUND UTILIZATION BY ANAEROBIC MICROBES. *Annual Review of Microbiology* **56**: 345-369.

Giddens, S.R., Feng, Y. y Mahanty, H.K. (2002) Characterization of a novel phenazine antibiotic gene cluster in *Erwinia herbicola* Eh1087. *Mol Microbiol* **45**.

Goldstein, F.B. (1959) Biosynthesis of N-Acetyl-l-aspartic Acid. *J. Biol. Chem.* **234**: 2702-2706.

Grassick, A., Sulzenbacher, G., Roig-Zamboni, V., Campanacci, V., Cambillau, C. y Bourne, Y. (2004) Crystal structure of *Escherichia coli* *yddE* protein reveals a striking homology with diaminopimelate epimerase. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* **55**: 764-767.

Greer-Phillips, S.E., Alexandre, G., Taylor, B.L. y Zhulin, I.B. (2003) Aer and Tsr guide *Escherichia coli* in spatial gradients of oxidizable substrates. *Microbiology* **149**: 2661-2667.

Griffith, J., Baker, M., Rouch, D., Page, M., Skurray, R., Paulsen, I., Chater, K., Baldwin, S. y Henderson, P. (1992) Membrane transport proteins: implications of sequence comparisons. *Curr Opin Cell Biol* **4**: 684-695.

Grimm, A.C. y Harwood, C.S. (1997) Chemotaxis of *Pseudomonas* spp. to the polyaromatic hydrocarbon naphthalene. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**: 4111-4115.

Groenewegen, P.E., Driessen, A.J., Konings, W.N. y de Bont, J.A. (1990) Energy-dependent uptake of 4-chlorobenzoate in the coryneform bacterium NTB-1. *J. Bacteriol.* **172**: 419-423.

Groseclose, E.E. y Ribbons, D.W. (1981) Metabolism of resorcinylic compounds by bacteria: new pathway for resorcinol catabolism in *Azotobacter vinelandii*. *J. Bacteriol.* **146**: 460-466.

Grund, E., Denecke, B. y Eichenlaub, R. (1992) Naphthalene degradation via salicylate and gentisate by *Rhodococcus* sp. strain B4. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**: 1874-1877.

- Gussin, G.N., Olson, C., Igarashi, K. y Ishihama, A.** (1992) Activation defects caused by mutations in *Escherichia coli rpoA* are promoter specific. *J. Bacteriol.* **174**: 5156-5160.
- Haddock, J.D. y Ferry, J.G.** (1989) Purification and properties of phloroglucinol reductase from *Eubacterium oxidoreducens* G-41. *J. Biol. Chem.* **264**: 4423-4427.
- Han, S., Eltis, L.D., Timmis, K.N., Muchmore, S.W. y Bolin, J.T.** (1995) Crystal structure of the biphenyl-cleaving extradiol dioxygenase from a PCB-degrading *Pseudomonads*. *Science* **270**: 976-980.
- Hancock, R.** (1997) The bacterial outer membrane as a drug barrier. *Trends Microbiol* **5**: 37-42.
- Hancock, R.E. y Benz, R.** (1986) Demonstration and chemical modification of a specific phosphate binding site in the phosphate-starvation-inducible outer membrane porin protein P of *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochim Biophys Acta.* **860**: 699-707.
- Handa, N., Terada, T., Kamewari, Y., Hamana, H., Tame, J.R.H., Park, S.-Y., Kinoshita, K., Ota, M., Nakamura, H., Kuramitsu, S., Shirouzu, M. y Yokoyama, S.** (2003) Crystal structure of the conserved protein TT1542 from *Thermus thermophilus* HB8. *Protein Sci* **12**: 1621-1632.
- Hara, H., Masai, E., Katayama, Y. y Fukuda, M.** (2000) The 4-Oxalomesaconate Hydratase Gene, Involved in the Protocatechuate 4,5-Cleavage Pathway, Is Essential to Vanillate and Syringate Degradation in *Sphingomonas paucimobilis* SYK-6. *J. Bacteriol.* **182**: 6950-6957.
- Hara, H., Masai, E., Miyauchi, K., Katayama, Y. y Fukuda, M.** (2003) Characterization of the 4-Carboxy-4-Hydroxy-2-Oxo adipate Aldolase Gene and Operon Structure of the Protocatechuate 4,5-Cleavage Pathway Genes in *Sphingomonas paucimobilis* SYK-6. *J. Bacteriol.* **185**: 41-50.
- Harayama, S. y Timmis, K.N.** (1989) Catabolism of aromatic hydrocarbons by *Pseudomonas*. In *Genetics of bacterial diversity*. Hopwood, D.A. (ed). N.Y.: Academic Press Inc., pp. 151-174.
- 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.
- Harayama, S., Lehrbach, P.R. y Timmis, K.N.** (1984) Transposon mutagenesis analysis of meta-cleavage pathway operon genes of the TOL plasmid of *Pseudomonas putida* mt-2. *J. Bacteriol.* **160**: 251-255.
- Harayama, S., Rekik, M., Ngai, K.L. y Ornston, L.N.** (1989) Physically associated enzymes produce and metabolize 2-hydroxy-2,4-dienoate, a chemically unstable intermediate formed in catechol metabolism via *meta* cleavage in *Pseudomonas putida*. *J. Bacteriol.* **171**: 6251-6258.

Harpel, M.R. y Lipscomb, J.D. (1990a) Gentisate 1,2-dioxygenase from pseudomonas. Purification, characterization, and comparison of the enzymes from *Pseudomonas testosteroni* and *Pseudomonas acidovorans*. *J. Biol. Chem.* **265**: 6301-6311.

Harpel, M.R. y Lipscomb, J.D. (1990b) Gentisate 1,2-dioxygenase from *Pseudomonas*. Substrate coordination to active site Fe²⁺ and mechanism of turnover. *J. Biol. Chem.* **265**: 22187-22196.

Harris, T.K., Czerwinski, R.M., Johnson, W.H., Legler, P.M., Abeygunawardana, C., Massiah, M.A., Stivers, J.T., Whitman, C.P. y Mildvan, A.S. (1999) Kinetic, Stereochemical, and Structural Effects of Mutations of the Active Site Arginine Residues in 4-Oxalocrotonate Tautomerase. *Biochemistry* **38**: 12343-12357.

Harwood, C.S. y Parales, R.E. (1996) THE β -KETOADIPATE PATHWAY AND THE BIOLOGY OF SELF-IDENTITY. *Annual Review of Microbiology* **50**: 553-590.

Harwood, C.S., Rivelli, M. y Ornston, L.N. (1984) Aromatic acids are chemoattractants for *Pseudomonas putida*. *J. Bacteriol.* **160**: 622-628.

Harwood, C.S., Burchhardt, H., Herrmann, H. y Fuchs, G. (1998) Anaerobic metabolism of aromatic compounds via the benzoyl-CoA pathway. *FEMS Microbiol. Rev.* **22**: 439-458.

Harwood, C.S., Nichols, N.N., Kim, M.K., Ditty, J.L. y Parales, R.E. (1994) Identification of the *pcaRKF* gene cluster from *Pseudomonas putida*: involvement in chemotaxis, biodegradation, and transport of 4-hydroxybenzoate. *J. Bacteriol.* **176**: 6479-6488.

Hawkins, A.C. y Harwood, C.S. (2002) Chemotaxis of *Ralstonia eutropha* JMP134(pJP4) to the Herbicide 2,4-Dichlorophenoxyacetate. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**: 968-972.

Hearn, E.M., Patel, D.R. y van den Berg, B. (2008) Outer-membrane transport of aromatic hydrocarbons as a first step in biodegradation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **105**: 8601-8606.

Hegg, E.L. y Que, L. (1997) The 2-His-1-Carboxylate Facial Triad; An Emerging Structural Motif in Mononuclear Non-Heme Iron(II) Enzymes. *European Journal of Biochemistry* **250**: 625-629.

Heider, J. y Fuchs, G. (1997) Anaerobic Metabolism of Aromatic Compounds. *European Journal of Biochemistry* **243**: 577-596.

Heider, J., Boll, M., Breese, K., Breinig, S., Ebenau-Jehle, C., Feil, U., Gad'on, N., Laempe, D., Leuthner, B., Mohamed, M.E., Schneider, S., G. Burchhardt 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.

- Heiss, G. y Knackmuss, H.** (2002) Bioelimination of trinitroaromatic compounds: immobilization versus mineralization. *Curr Opin Microbiol* **5**: 282-287.
- Hernick, M. y Fierke, C.A.** (2005) Zinc hydrolases: the mechanisms of zinc-dependent deacetylases. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **433** 71-84.
- Hernick, M., Gennadios, H.A., Whittington, D.A., Rusche, K.M., Christianson, D.W. y Fierke, C.A.** (2005) UDP-3-O-((R)-3-hydroxymyristoyl)-N-acetylglucosamine Deacetylase Functions through a General Acid-Base Catalyst Pair Mechanism. *J. Biol. Chem.* **280**: 16969-16978.
- Hintner, J.-P., Lechner, C., Riegert, U., Kuhm, A.E., 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.
- Hiroto, T., Matsue, H., Yoshida, M., Tanaka, T., Higashibata, H., Hosokawa, K., Yamaguchi, H. y Fujiwara, S.** (2006) Characterization of MobR, the 3-hydroxybenzoate-responsive transcriptional regulator for the 3-hydroxybenzoate hydroxylase gene of *Comamonas testosteroni* KH122-3s *J Mol Biol* **364**: 863-877.
- Holm, L. y Sander, C.** (1997) An evolutionary treasure: unification of a broad set of amidohydrolases related to urease. *Proteins: Structure, Function, and Genetics* **28**: 72-82.
- Holm, R.H., Kennepohl, P. y Solomon, E.I.** (1996) Structural and Functional Aspects of Metal Sites in Biology. *Chem Rev* **96**: 2239-2314.
- Huang, H. y Hancock, R.E.** (1993) Genetic definition of the substrate selectivity of outer membrane porin protein OprD of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **175**: 7793-7800.
- Hunt, J.B., Neece, S.H. y Ginsburg, A.** (1985) The use of 4-(2-pyridylazo) resorcinol in studies of zinc release from *Escherichia coli* aspartate transcarbamoylase. *Anal Biochem* **146**: 150-157.
- Ishiyama, D., Vujaklija, D. y Davies, J.** (2004) Novel Pathway of Salicylate Degradation by *Streptomyces* sp. Strain WA46. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**: 1297-1306.
- Ismail, W., Mohamed, M.E.-S., Wanner, B.L., Datsenko, K.A., 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.
- 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.

Jackman, J.E., Raetz, C.R.H. y Fierke, C.A. (1999) UDP-3-O-(R-3-Hydroxymyristoyl)-*N*-acetylglucosamine Deacetylase of *Escherichia coli* Is a Zinc Metalloenzyme. *Biochemistry* **38**: 1902-1911.

Jackman, J.E., Raetz, C.R.H. y Fierke, C.A. (2001) Site-Directed Mutagenesis of the Bacterial Metalloamidase UDP-(3-O-acyl)-*N*-acetylglucosamine Deacetylase (LpxC). Identification of the Zinc Binding Site. *Biochemistry* **40**: 514-523.

Jain, R.K., Dreisbach, J.H. y Spain, J.C. (1994) Biodegradation of p-nitrophenol via 1,2,4-benzenetriol by an *Arthrobacter* sp. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**: 3030-3032.

Jiménez, J.I. (2006) Análisis genómico del catabolismo de compuestos aromáticos en *Pseudomonas putida* KT2440: Caracterización molecular de la ruta de degradación del ácido nicotínico. *Tesis Doctoral*. Universidad Complutense de Madrid.

Jiménez, J.I., Miñambres, B., García, J.L. y Díaz, E. (2002) Genomic analysis of the aromatic catabolic pathways from *Pseudomonas putida* KT2440. *Environmental Microbiology* **4**: 824 - 841.

Jiménez, J.I., Miñambres, B., García, J.L. 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.

Jiménez, J.I., Nogales, J., García, J.L. y Díaz, E. (2009) A Genomic View of the Catabolism of Aromatic Compounds in *Pseudomonas*. In *Handbook of Hydrocarbon*. Berlin Heidelberg Springer-Verlag.

Jiménez, J.I., Canales, Á., Jiménez-Barbero, J., Ginalska, K., Rychlewski, L., García, J.L. 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.

Johnston, J.M., Arcus, V.L., Morton, C.J., Parker, M.W. y Baker, E.N. (2003) Crystal Structure of a Putative Methyltransferase from *Mycobacterium tuberculosis*: Misannotation of a Genome Clarified by Protein Structural Analysis. *J. Bacteriol.* **185**: 4057-4065.

Jorgensen, C. y Dandanell, G. (1999) Isolation and Characterization of Mutations in the *Escherichia coli* Regulatory Protein XapR. *J. Bacteriol.* **181**: 4397-4403.

Jourlin-Castelli, C., Mani, N., Nakano, M. y Sonenshein, A. (2000) CcpC, a novel regulator of the LysR family required for glucose repression of the citB gene in *Bacillus subtilis*. *J Mol Biol* **295**: 865-878.

Kaback, H. (1992) The lactose permease of *Escherichia coli*: a paradigm for membrane transport proteins. *Biochim Biophys Acta.* **1101**: 210-213.

Kaback, H.R. (2005) Structure and mechanism of the lactose permease. *Comptes Rendus Biologies* **328**: 557-567.

- Kabisch, M. y Fortnagel, P.** (1990) Nucleotide sequence of metapyrocatechase I (catechol 2,3-oxygenase I) gene *mpcl* from *Alcaligenes eutrophus* JMP222. *Nucl. Acids Res.* **18**: 3405-3406.
- Kasai, D., Masai, E., Miyauchi, K., Katayama, Y. y Fukuda, M.** (2004) Characterization of the 3-O-Methylgallate Dioxygenase Gene and Evidence of Multiple 3-O-Methylgallate Catabolic Pathways in *Sphingomonas paucimobilis* SYK-6. *J. Bacteriol.* **186**: 4951-4959.
- Kasai, D., Masai, E., Miyauchi, K., Katayama, Y. y Fukuda, M.** (2005) Characterization of the Gallate Dioxygenase Gene: Three Distinct Ring Cleavage Dioxygenases Are Involved in Syringate Degradation by *Sphingomonas paucimobilis* SYK-6. *J. Bacteriol.* **187**: 5067-5074.
- Kashket, E.R.** (1985) The Proton Motive Force in Bacteria: A Critical Assessment of Methods. *Annual Review of Microbiology* **39**: 219-242.
- Kersten, P.J., Dagley, S., Whittaker, J.W., Arciero, D.M. y Lipscomb, J.D.** (1982) 2-pyrone-4,6-dicarboxylic acid, a catabolite of gallic acids in *Pseudomonas* species. *J. Bacteriol.* **152**: 1154-1162.
- Kiefer, L. y Fierke, C.** (1994) Functional characterization of human carbonic anhydrase II variants with altered zinc binding sites. *Biochemistry* **33**: 15233-15240.
- Kim, Y., Sung-Ho, K., Young, Y., Kyung-Hoon, K., Shin, K. y Ysi, K.** (2006) Analysis of aromatic catabolic pathways in *Pseudomonas putida* KT2440 using a combined proteomic approach: 2-DE/MS and cleavable isotope-coded affinity tag analysis. *PROTEOMICS* **6**: 1301 - 1318.
- Kita, A., Kita, S., Fujisawa, I., Inaka, K., Ishida, T., Horiike, K., Nozaki, M. y Miki, K.** (1999) An archetypical extradiol-cleaving catecholic dioxygenase: the crystal structure of catechol 2,3-dioxygenase (metapyrocatechase) from *Pseudomonas putida* mt-2. *Structure* **7**: 25-34.
- Kluge, C.A., 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.
- Koebnik, R., Locher, K.P. y Van Gelder, P.** (2000) Structure and function of bacterial outer membrane proteins: barrels in a nutshell. *Molecular Microbiology* **37**: 239-253.
- Kovach, M.E., Elzer, P.H., Hill, D.S., Roberson, G.T., Farris, M.A., Roop, R.M. y Peterson, K.M.** (1995) Four new derivatives of the broad-host-range cloning vector pBBR1MCS, carrying different antibiotic-resistance cassettes. *Gene* **166**: 175-176.
- Krumholz, L.R. y Bryant, M.P.** (1988) Characterization of the pyrogallol-phloroglucinol isomerase of *Eubacterium oxidoreducens*. *J. Bacteriol.* **170**: 2472-2479.

Krumholz, L.R., Crawford, R.L., Hemling, M.E. y Bryant, M.P. (1987) Metabolism of gallate and phloroglucinol in *Eubacterium oxidoreducens* via 3-hydroxy-5-oxohexanoate. *J. Bacteriol.* **169**: 1886-1890.

Kumar, R.A., Gunasekaran, P. y Lakshmanan, M. (1999) Biodegradation of tannic acid by *Citrobacter freundii* isolated from a tannery effluent. *J. Basic Microbiol.* **39**: 161-168.

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 Paal. *J Mol Biol* **352**: 212-228.

Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.

Larsen, K. y Auld, D. (1989) Carboxypeptidase A: mechanism of zinc inhibition. *Biochemistry* **28**: 9620-9625.

Laue, T.M., Shah, B. D., Ridgeway, T. M. and Pelletier, S. L. (1992) *Analytical ultracentrifugation in biochemistry and polymer science*. Cambridge, UK: Royal Society of Chemistry.

Laurie, A.D., Bernardo, L.M.D., Sze, C.C., 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.

Lee, S.-W. y Cooksey, D.A. (2000) Genes Expressed in *Pseudomonas putida* during Colonization of a Plant-Pathogenic Fungus. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**: 2764-2772.

Leveau, J.H.J., Zehnder, A.J.B. y van der Meer, J.R. (1998) The *tfdK* Gene Product Facilitates Uptake of 2,4-Dichlorophenoxyacetate by *Ralstonia eutropha* JMP134(pJP4). *J. Bacteriol.* **180**: 2237-2243.

Li, S., Kimura, M., Takashima, T., Hayashi, K., Inoue, K., Ishiguro, R., Sugisaki, H. y Maruyama, K. (2007) Role of cysteine residues in 4-oxalomesaconate hydratase from *Pseudomonas ochraceae* NGJ1. *Biosci Biotechnol Biochem* **71**: 449-457.

Liaw, S.H., Chen, S.J., Ko, T.P., Hsu, C.S., Chen, C.J., Wang, A.H.J. y Tsai, Y.C. (2003) Crystal Structure of D-Aminoacylase from *Alcaligenes faecalis* DA1. A NOVEL SUBSET OF AMIDOHYDROLASES AND INSIGHTS INTO THE ENZYME MECHANISM. *J. Biol. Chem.* **278**: 4957-4962.

Locher, H.H., Poolman, B., Cook, A.M. y Konings, W.N. (1993) Uptake of 4-toluene sulfonate by *Comamonas testosteroni* T-2. *J. Bacteriol.* **175**: 1075-1080.

Lochowska, A., Iwanicka-Nowicka, R., Plochocka, D. y Hryniewicz, M.M. (2001) Functional Dissection of the LysR-type CysB Transcriptional Regulator. REGIONS IMPORTANT FOR DNA BINDING, INDUCER RESPONSE, OLIGOMERIZATION, AND POSITIVE CONTROL. *J. Biol. Chem.* **276**: 2098-2107.

- Maddocks, S.E. y Oyston, P.C.F.** (2008) Structure and function of the LysR-type transcriptional regulator (LTTR) family proteins. *Microbiology* **154**: 3609-3623.
- Maiden, M.C.J., Davis, E.O., Baldwin, S.A., Moore, D.C.M. y Henderson, P.J.F.** (1987) Mammalian and bacterial sugar transport proteins are homologous. *Nature* **325**: 641-643.
- Marger, M. y Saier, M.J.** (1993) A major superfamily of transmembrane facilitators that catalyse uniport, symport and antiport. *Trends Biochem Sci.* **18**: 13-20.
- Marschall, C., Labrousse, V., Kreimer, M., Weichart, D., Kolb, A. y Hengge-Aronis, R.** (1998) Molecular analysis of the regulation of *csiD*, a carbon starvation-inducible gene in *Escherichia coli* that is exclusively dependent on sigma s and requires activation by cAMP-CRP. *Journal of molecular biology* **276**: 339-353.
- Maruyama, K.** (1979) Isolation and Identification of the Reaction Product of α -Hydroxy- γ -Carboxymuconic ϵ -Semialdehyde Dehydrogenase. *J Biochem* **86**: 1671-1677.
- Maruyama, K.** (1983a) Enzymes Responsible for Degradation of 4-Oxalomesaconic Acid in *Pseudomonas ochraceae*. *J Biochem* **93**: 567-574.
- Maruyama, K.** (1983b) Purification and Properties of 2-Pyrone-4,6-Dicarboxylate Hydrolase. *J Biochem* **93**: 557-565.
- Maruyama, K.** (1985) Purification and properties of gamma-oxalomesaconate hydratase from *Pseudomonas ochraceae* grown with phthalate. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **128**: 271-277.
- Maruyama, K.** (1990a) Activation of *Pseudomonas ochraceae* 4-Hydroxy-4-Methyl-2-Oxoglutarate Aldolase by Inorganic Phosphate. *J Biochem* **108**: 334-340.
- Maruyama, K.** (1990b) Purification and Properties of 4-Hydroxy-4-Methyl-2-Oxoglutarate Aldolase from *Pseudomonas ochraceae* Grown on Phthalate. *J Biochem* **108**: 327-333.
- Maruyama, K., Ariga, N., Tsuda, M. y Deguchi, K.** (1978) Purification and Properties of α -Hydroxy- γ -Carboxymuconic ϵ -Semialdehyde Dehydrogenase. *J Biochem* **83**: 1125-1134.
- Maruyama, K., Shibayama, T., Ichikawa, A., Sakou, Y., Yamada, S.a. y Sugisaki, H.** (2004) Cloning and Characterization of the Genes Encoding Enzymes for the Protocatechuate *Meta*-degradation Pathway of *Pseudomonas ochraceae* NGJ1. *Biosci. Biotechnol. Biochem* **68**: 1434-1441.
- Maruyama, K., Miwa, M., Tsujii, N., Nagai, T., Tomita, N., Harada, T., Sobijama, H. y Sugisaki, H.** (2001) Cloning, Sequencing, and Expression of the Gene Encoding 4-Hydroxy-4-methyl-2-oxoglutarate Aldolase from *Pseudomonas ochraceae* NGJ1. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* **65**: 2701-2709.

Masai, E., Katayama, Y. y Fukuda, M. (2007) Genetic and Biochemical Investigations on Bacterial Catabolic Pathways for Lignin-Derived Aromatic Compounds. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **71**: 1-15.

Masai, E., Shinohara, S., Hara, H., Nishikawa, S., Katayama, Y. y Fukuda, M. (1999) Genetic and Biochemical Characterization of a 2-Pyrone-4,6-Dicarboxylic Acid Hydrolase Involved in the Protocatechuate 4,5-Cleavage Pathway of *Sphingomonas paucimobilis* SYK-6. *J. Bacteriol.* **181**: 55-62.

Mason, J.R. y Cammack, R. (1992) The electron-transport proteins of hydroxylating bacterial dioxygenases. *Annu Rev Microbiol* **46**: 277-305.

Massey, V. (1953) Studies on fumarase. 2. The effects of inorganic anions on fumarase activity. *Biochem J* **53**: 67-71.

Maxam, A.M. y Gilbert, W. (1980) Sequencing end-labeled DNA with base-specific chemical cleavages. *Methods Enzymol* **65**: 499-560.

Maynes, J.T., Garen, C., Cherney, M.M., Newton, G., Arad, D., Av-Gay, Y., Fahey, R.C. y James, M.N.G. (2003) The Crystal Structure of 1-*D*-myo-Inosityl 2-Acetamido-2-deoxy- α -*D*-glucopyranoside Deacetylase (MshB) from *Mycobacterium tuberculosis* Reveals a Zinc Hydrolase with a Lactate Dehydrogenase Fold. *J. Biol. Chem.* **278**: 47166-47170.

McCafferty, D.G., Lessard, I.A.D. y Walsh, C.T. (1997) Mutational Analysis of Potential Zinc-Binding Residues in the Active Site of the Enterococcal d-Ala-d-Ala Dipeptidase VanX. *Biochemistry* **36**: 10498-10505.

Medina, J.F., Wetterholm, A., Radmark, O., Shapiro, R., Haeggström, J.Z., Vallee, B.L. y Samuelsson, B. (1991) Leukotriene A4 hydrolase: determination of the three zinc-binding ligands by site-directed mutagenesis and zinc analysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **88**: 7620-7624.

Messerschmidt, A., Niessen, H., Abt, D., Einsle, O., Schink, B. y Kroneck, P.M.H. (2004) Crystal structure of pyrogallol-phloroglucinol transhydroxylase, an Mo enzyme capable of intermolecular hydroxyl transfer between phenols. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**: 11571-11576.

Metzgar, D., Bacher, J.M., Pezo, V., Reader, J., Doring, V., Schimmel, P., Marliere, P. y de Crecy-Lagard, V. (2004) *Acinetobacter* sp. ADP1: an ideal model organism for genetic analysis and genome engineering. *Nucl. Acids Res.* **32**: 5780-5790.

Miguez, C.B., Greer, C.W., Ingram, J.M. y MacLeod, R.A. (1995) Uptake of Benzoic Acid and Chloro-Substituted Benzoic Acids by *Alcaligenes denitrificans* BRI 3010 and BRI 6011. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**: 4152-4159.

Miller, J.H. (1972) *Experiments in molecular genetics* Cold Spring Harbord Laboratory, Cold Sprin Harbor. New York.

- Mingshu, L., Kai, Y., Qiang, H. y Dongying, J.** (2006) Biodegradation of gallotannins and ellagitannins. *Journal of Basic Microbiology* **46**: 68-84.
- Mohamed, M., Ismail, W., Heider, J. y Fuchs, G.** (2002) Aerobic metabolism of phenylacetic acids in *Azoarcus Evansii*. *Arch Microbiol* **178**: 180-192.
- Mondal, K.C., Banerjee, R. y Pati, R.B.** (2000) Tannase production by *Bacillus licheniformis*. *Biotechnol. Lett.* **8**: 767-769.
- Mooney, A., O'Leary, N.D. y Dobson, A.D.W.** (2006) Cloning and Functional Characterization of the *styE* Gene, Involved in Styrene Transport in *Pseudomonas putida* CA-3. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**: 1302-1309.
- Morasch, B., Schink, B., Tebbe, C.C. y Meckenstock, R.U.** (2004) Degradation of o-xylene and m-xylene by a novel sulfate-reducer belonging to the genus *Desulfotomaculum*. *Arch Microbiol.* **181**: 407-417.
- Moreno-Ruiz, E., Hernáez, M.J., Martínez-Pérez, O. y Santero, E.** (2003) Identification and functional characterization of *Sphingomonas macrogolita* strain TFA genes involved in the first two steps of the tetralin catabolic pathway. *J Bacteriol* **185**: 2026-2030.
- 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.
- Morgenstern, B., Dress, A. y Werner, T.** (1996) Multiple DNA and protein sequence alignment based on segment-to-segment comparison. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**: 12098-12103.
- Muraoka, S., Okumura, R., Ogawa, N., Nonaka, T., Miyashita, K. y Senda, T.** (2003) Crystal Structure of a Full-length LysR-type Transcriptional Regulator, CbnR: Unusual Combination of Two Subunit Forms and Molecular Bases for Causing and Changing DNA Bend. *Journal of Molecular Biology* **328**: 555-566.
- Navarro-Llorens, J.M., Drzyzga, O. y Perera, J.** (2008) Genetic analysis of phenylacetic acid catabolism in *Arthrobacter oxydans* CECT386. *Arch Microbiol* **190**: 89-100.
- Navarro-Llorens, J.M., Patrauchan, M.A., Stewart, G.R., Davies, J.E., Eltis, L.D. y Mohn, W.W.** (2005) Phenylacetate Catabolism in *Rhodococcus* sp. Strain RHA1: a Central Pathway for Degradation of Aromatic Compounds. *J. Bacteriol.* **187**: 4497-4504.
- Nelson, K.E., Weinl, C., Paulsen, I.T., Dodson, R.J., Hilbert, H., Martins dos Santos, V.A.P., Fouts, D.E., Gill, S.R., Pop, M., Holmes, M., Brinkac, L., Beanan, M., DeBoy, R.T., 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, K.N., Düsterhöft, A., Tümmler, B. y Fraser, C.M. (2002) Complete genome sequence and comparative analysis of the metabolically versatile *Pseudomonas putida* KT2440. *Environmental Microbiology* **4**: 799-808.

Nelson, M.J. y Snell, E.E. (1986) Enzymes of vitamin B6 degradation. Purification and properties of 5- pyridoxic-acid oxygenase from *Arthrobacter* sp. *J. Biol. Chem.* **261**: 15115-15120.

Newton, G.L., Av-gay, Y. y Fahey, R.C. (2000) *N*-Acetyl-1-*D*-myo-Inositol-2-Amino-2-Deoxy- α -*D*-Glucopyranoside Deacetylase (MshB) Is a Key Enzyme in Mycothiol Biosynthesis. *J. Bacteriol.* **182**: 6958-6963.

Nichols, N.N. y Harwood, C.S. (1997a) PcaK, a high-affinity permease for the aromatic compounds 4-hydroxybenzoate and protocatechuate from *Pseudomonas putida*. *J. Bacteriol.* **179**: 5056-5061.

Nichols, N.N. y Harwood, C.S. (1997b) PcaK, a high-affinity permease for the aromatic compounds 4- hydroxybenzoate and protocatechuate from *Pseudomonas putida*. *J. Bacteriol.* **179**: 5056-5061.

Niehaus, J.U. y Gross, G.G. (1997) A gallotannin degrading esterase from leaves of pedunculate oak. *Phytochemistry* **45**: 1555-1560.

Nikaido, H. y Vaara, M. (1985) Molecular basis of bacterial outer membrane permeability. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **49**: 1-32.

Nishikawa, Y., Yasumi, Y., Noguchi, S., Sakamoto, H. y Nikawa, J.-i. (2008) Functional Analyses of *Pseudomonas putida* Benzoate Transporters Expressed in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biosci. Biotechnol. Biochem* **72**: 2034-2038.

Nogales, J., Palsson, B. y Thiele, I. (2008) A genome-scale metabolic reconstruction of *Pseudomonas putida* KT2440: iJN746 as a cell factory. *BMC Systems Biology* **2**: 79.

Nogales, J., Canales, A., Jiménez-Barbero, J., García, J.L. y Díaz, E. (2005) Molecular Characterization of the Gallate Dioxygenase from *Pseudomonas putida* KT2440: The prototype of a new subgroup of extradiol dioxygenases. *J Biol Chem* **280**: 35382 - 35390.

Nogales, J., Macchi, R., Franchi, F., Barzaghi, D., Fernández, C., García, J.L., Bertoni, G. y Díaz, E. (2007) Characterization of the last step of the aerobic phenylacetic acid degradation pathway. *Microbiology* **153**: 357-365.

Odenyo, A.A., Bishop, R., Asefa, G., Jamnadass, R., Odongo, D. y Osuji, P.O. (2001) Characterization of tannin-tolerant bacterial isolates from east African ruminants. *Anaerobe* **7**: 5-15.

Ohlendorf, D.H., Lipscomb, J.D. y Weber, P.C. (1988) Structure and assembly of protocatechuate 3,4-dioxygenase. *Nature* **336**: 403-405.

- 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.
- Olivera, E.R., Miñambres, B., García, B., Muñiz, C., Moreno, M.A., Ferrández, A., Díaz, E., García, J.L. y Luengo, J.M.** (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.
- Palleroni, N.J.** (1984) *Pseudomonas*. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Kreig, N.R. y Holt, J.G. (eds). Baltimore: Williams and Wilkins Co., pp. 141-203.
- Pao, S.S., Paulsen, I.T. y Saier, M.H., Jr.** (1998) Major Facilitator Superfamily. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**: 1-34.
- Parales, R.E.** (2004) Nitrobenzoates and Aminobenzoates Are Chemoattractants for *Pseudomonas* Strains. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**: 285-292.
- Parales, R.E. y Harwood, C.S.** (2002) Bacterial chemotaxis to pollutants and plant-derived aromatic molecules. *Curr Opin Microbiol* **3**: 266-273.
- Parales, R.E., Ditty, J.L. y Harwood, C.S.** (2000) Toluene-Degrading Bacteria Are Chemotactic towards the Environmental Pollutants Benzene, Toluene, and Trichloroethylene. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**: 4098-4104.
- Park, W., Jeon, C. y Madsen, E.** (2002) Interaction of NahR, a LysR-type transcriptional regulator, with the alpha subunit of RNA polymerase in the naphthalene degrading bacterium, *Pseudomonas putida* NCIB 9816-4. *FEMS Microbiol Lett* **213**: 159-165.
- Parke, D., Rivelli, M. y Ornston, L.N.** (1985) Chemotaxis to aromatic and hydroaromatic acids: comparison of *Bradyrhizobium japonicum* and *Rhizobium trifolii*. *J. Bacteriol.* **163**: 417-422.
- Parsek, M.R., Shinabarger, D.L., Rothmel, R.K. y Chakrabarty, A.M.** (1992) Roles of CatR and cis,cis-muconate in activation of the *catBC* operon, which is involved in benzoate degradation in *Pseudomonas putida*. *J. Bacteriol.* **174**: 7798-7806.
- Paulsen, I.T., Brown, M.H. y Skurray, R.A.** (1996) Proton-dependent multidrug efflux systems. *Microbiol. Rev.* **60**: 575-608.
- Perry, L.L. y Zylstra, G.J.** (2007) Cloning of a Gene Cluster Involved in the Catabolism of p-Nitrophenol by *Arthrobacter* sp. Strain JS443 and Characterization of the p-Nitrophenol Monooxygenase. *J. Bacteriol.* **189**: 7563-7572.
- Peters, F., Rother, M. y Boll, M.** (2004) Selenocysteine-Containing Proteins in Anaerobic Benzoate Metabolism of *Desulfococcus multivorans*. *J. Bacteriol.* **186**: 2156-2163.

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.

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.

Phale, P.S., Basu, A., Majhi, P.D., 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.

Picossi, S., Belitsky, B.R. y Sonenshein, A.L. (2007) Molecular mechanism of the regulation of *Bacillus subtilis* *gltAB* expression by GltC. *J Mol Biol* **365**: 1298-1313.

Pieper, D. y Reineke, W. (2000) Engineering bacteria for bioremediation. *Curr Opin Biotechnol* **11**: 262-270.

Pillai, B., Cherney, M.M., Diaper, C.M., Sutherland, A., Blanchard, J.S., Vederas, J.C. y James, M.N.G. (2006) Structural insights into stereochemical inversion by diaminopimelate epimerase: An antibacterial drug target. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **103**: 8668-8673.

Pollard, J.R. y Bugg, T.D.H. (1998) Purification, characterisation and reaction mechanism of monofunctional 2-hydroxypentadienoic acid hydratase from *Escherichia coli*. *European Journal of Biochemistry* **251**: 98-106.

Porrúa, O., García-Jaramillo, M., Santero, E. y Govantes, F. (2007) The LysR-type regulator AtzR binding site: DNA sequences involved in activation, repression and cyanuric acid-dependent repositioning. *Molecular Microbiology* **66**: 410-427.

Prieto, M.A. y García, J.L. (1997) Identification of the 4-hydroxyphenylacetate transport gene of *Escherichia coli* W : construction of a highly sensitive cellular biosensor. *FEBS letters* **414**: 293-297.

Prieto, M.A., Díaz, E. y García, J.L. (1996) Molecular characterization of the 4-hydroxyphenylacetate catabolic pathway of *Escherichia coli* W: engineering a mobile aromatic degradative cluster. *J. Bacteriol.* **178**: 111-120.

Prieto, M.A., 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.

Providenti, M.A., Mampel, J., MacSween, S., Cook, A.M. y Wyndham, R.C. (2001) *Comamonas testosteroni* BR6020 possesses a single genetic locus for extradiol cleavage of protocatechuate. *Microbiology* **147**: 2157-2167.

Que, L. (2000) One motif many different reactions. *Nat Struct Mol Biol* **7**: 182-184.

- Ramos, J., Wasserfallen, A., Rose, K. y Timmis, K.** (1987) Redesigning metabolic routes: manipulation of TOL plasmid pathway for catabolism of alkylbenzoates. *Science* **235**: 593 - 596.
- 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.
- Ramos, J.L., Stolz, A., Reineke, W. y Timmis, K.N.** (1986) Altered effector specificities in regulators of gene expression: TOL plasmid *xylS* mutants and their use to engineer expansion of the range of aromatics degraded by bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **83**: 8467-8471.
- Reineke, W. y Knackmuss, H.J.** (1988) Microbial Degradation of Haloaromatics. *Annual Review of Microbiology* **42**: 263-287.
- Rhee, K.Y., Senear, D.F. y Hatfield, G.W.** (1998) Activation of Gene Expression by a Ligand-induced Conformational Change of a Protein-DNA Complex. *J. Biol. Chem.* **273**: 11257-11266.
- Roepe, P., Consler, T., Menezes, M. y Kaback, H.** (1990) The lac permease of *Escherichia coli*: site-directed mutagenesis studies on the mechanism of beta-galactoside/H⁺ symport. *Res Microbiol.* **141**: 290-308.
- Rojo, F. y Dinamarca, A.** (2004) Catabolite repression and physiological control. In *Pseudomonas*. Ramos, J.L. (ed). New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers.
- Rojo, F., Pieper, D.H., Engesser, K.H., Knackmuss, H.J. y Timmis, K.N.** (1987) Assemblage of *ortho* cleavage route for simultaneous degradation of chloro and methylaromatics. *Science* **238**: 1395-1398.
- Romero-Arroyo, C.E., Schell, M.A., Gaines, G.L., 3rd y Neidle, E.L.** (1995) *catM* encodes a LysR-type transcriptional activator regulating catechol degradation in *Acinetobacter calcoaceticus*. *J. Bacteriol.* **177**: 5891-5898.
- Romine, M.F., Stillwell, L.C., Wong, K.-K., Thurston, S.J., Sisk, E.C., Sensen, C., Gaasterland, T., Fredrickson, J.K. y Saffer, J.D.** (1999) Complete Sequence of a 184-Kilobase Catabolic Plasmid from *Sphingomonas aromaticivorans* F199. *J. Bacteriol.* **181**: 1585-1602.
- Roper, D., Stringfellow, J. y Cooper, R.** (1995) Sequence of the *hpcC* and *hpcG* genes of the *meta*-fission homoprotocatechuic acid pathway of *Escherichia coli* C: nearly 40% amino-acid identity with the analogous enzymes of the catechol pathway. *Gene* **156**: 47-51.
- Roper, D.I. y Cooper, R.A.** (1990) Purification, some properties and nucleotide sequence of 5-carboxymethyl-2-hydroxymuconate isomerase of *Escherichia coli* C. *FEBS letters* **266**: 63-66.

Roper, D.I., Subramanya, H.S., Shingler, V. y Wigley, D.B. (1994) Preliminary crystallographic analysis of 4-oxalocrotonate tautomerase reveals the oligomeric structure of the enzyme. *Journal of Molecular Biology* **243**: 799-801.

Rothmel, R.K., Aldrich, T.L., Houghton, J.E., Coco, W.M., Ornston, L.N. y Chakrabarty, A.M. (1990) Nucleotide sequencing and characterization of *Pseudomonas putida catR*: a positive regulator of the *catBC* operon is a member of the LysR family. *J. Bacteriol.* **172**: 922-931.

Saeki, Y., Nozaki, M. y Senoh, S. (1980) Cleavage of pyrogallol by non-heme iron-containing dioxygenases. *J. Biol. Chem.* **255**: 8465-8471.

Sahin-Toth, M., Karlin, A. y Kaback, H.R. (2000) Unraveling the mechanism of the lactose permease of *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**: 10729-10732.

Saier, M.J., Beatty, J., Goffeau, A., Harley, K., Heijne, W., Huang, S., Jack, D., Jähn, P., Lew, K., Liu, J., Pao, S., Paulsen, I., Tseng, T. y Virk, P. (1999) The major facilitator superfamily. *J Mol Microbiol Biotechnol.* **1**: 257-279.

Saint, C. y Romas, P. (1996) 4-Methylphthalate catabolism in *Burkholderia* (*Pseudomonas*) cepacia Pc701: a gene encoding a phthalate-specific permease forms part of a novel gene cluster. *Microbiology* **142**: 2407-2418.

Sala-Trepat, J. y Evans, W. (1971) The meta cleavage of catechol by *Azotobacter* species. 4-Oxalocrotonate pathway. *Eur J Biochem* **20**: 400-413.

Samanta, S. y Jain, R. (2000) Evidence for plasmid-mediated chemotaxis of *Pseudomonas putida* towards naphthalene and salicylate. *Can J Microbiol.* **46**: 1-6.

Sambrook, J. y Russell, D.W. (2001) *Molecular Cloning: A laboratory manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Sanger, F., Nicklen, S. y Coulson, A.R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* **74**: 5463-5467.

Santoro, J. y King, C.G. (1992) A constant-time 2d overbodengausen experiment for inverse correlation of isotopically enriched species. *J. Magn. Reson.* **97**.

Sarand, I., Österberg, S., Holmqvist, S., Holmfeldt, P., Skärfstad, E., Parales, R.E. y Shingler, V. (2008) Metabolism-dependent taxis towards (methyl)phenols is coupled through the most abundant of three polar localized Aer-like proteins of *Pseudomonas putida*. *Environmental Microbiology* **10**: 1320-1334.

Schafer, 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 pK18: selection of defined deletions in the chromosome of *Corynebacterium glutamicum*. *Gene* **145**: 69-73.

- Schell, M.** (1993) Molecular biology of the LysR family of transcriptional regulators. *Annu Rev Microbiol* **47**: 597-626.
- Schell, M., Brown, P. y Raju, S.** (1990) Use of saturation mutagenesis to localize probable functional domains in the NahR protein, a LysR-type transcription activator. *J. Biol. Chem.* **265**: 3844-3850.
- Schell, M.A. y Poser, E.F.** (1989) Demonstration, characterization, and mutational analysis of NahR protein binding to *nah* and *sal* promoters. *J. Bacteriol.* **171**: 837-846.
- Schink, B. y Friedrich, M.** (2000) Bacterial metabolism: Phosphite oxidation by sulphate reduction. *Nature* **406**: 37-37.
- Schirmer, T., Keller, T.A., Wang, Y.F. y Rosenbusch, J.P.** (1995) Structural basis for sugar translocation through maltoporin channels at 3.1 Å resolution. *Science* **267**: 512-514.
- Schmid, A., Dordick, J.S., Hauer, B., Kiener, A., Wubbolts, M. y Witholt, B.** (2001) Industrial biocatalysis today and tomorrow. *Nature* **409**: 258 - 268.
- Schuck, P. y Rossmanith, P.** (2000) Determination of the sedimentation coefficient distribution by least-squares boundary modeling. *Biopolymers* **54**: 328-341.
- 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.
- Schuster, M., Urbanowski, M.L. y Greenberg, E.P.** (2004) Promoter specificity in *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing revealed by DNA binding of purified LasR. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**: 15833-15839.
- Schwartz, R.D.** (1973) Octene epoxidation by a cold-stable alkane-oxidizing isolate of *Pseudomonas oleovorans*. *Appl Microbiol* **25**: 574-577.
- Semavina, M., Beckett, D. y Logan, T.M.** (2006) Metal-Linked Dimerization in the Iron-Dependent Regulator from *Mycobacterium tuberculosis*. *Biochemistry* **45**: 12480-12490.
- Siehnel, R., Egli, C. y Hancock, R.** (1992) Polyphosphate-selective porin OprO of *Pseudomonas aeruginosa*: expression, purification and sequence. *Mol Microbiol* **6**: 2319-2326.
- Somoza, J.R., Skene, R.J., Katz, B.A., Mol, C., Ho, J.D., Jennings, A.J., Luong, C., Arvai, A., Buggy, J.J., Chi, E., Tang, J., Sang, B.-C., Verner, E., Wynands, R., Leahy, E.M., Dougan, D.R., Snell, G., Navre, M., Knuth, M.W., Swanson, R.V., McRee, D.E. y Tari, L.W.** (2004) Structural Snapshots of Human HDAC8 Provide Insights into the Class I Histone Deacetylases. *Structure* **12**: 1325-1334.

Song, F., Zhuang, Z., Finci, L., Dunaway-Mariano, D., Kniewel, R., Buglino, J.A., Solorzano, V., Wu, J. y Lima, C.D. (2006) Structure, Function, and Mechanism of the Phenylacetate Pathway Hot Dog-fold Thioesterase PaaI. *J. Biol. Chem.* **281**: 11028-11038.

Sparnins, V.L. y Dagley, S. (1975) Alternative routes of aromatic catabolism in *Pseudomonas acidovorans* and *Pseudomonas putida*: gallic acid as a substrate and inhibitor of dioxygenases. *J. Bacteriol.* **124**: 1374-1381.

Speicher, D.W. (1994) Methods and strategies for sequence analysis of protein on PVDF membranes. *Methods* **6**: 262-273.

Spence, E.L., Kawamukai, M., Sanvoisin, J., Braven, H. y Bugg, T.D. (1996) Catechol dioxygenases from *Escherichia coli* (MhpB) and *Alcaligenes eutrophus* (MpcI): sequence analysis and biochemical properties of a third family of extradiol dioxygenases. *J. Bacteriol.* **178**: 5249-5256.

Spormann, A. y Widdel, F. (2000) Metabolism of alkylbenzenes, alkanes, and other hydrocarbons in anaerobic bacteria. *Biodegradation* **11**: 85-105.

Stanier, R.Y., Palleroni, N. y Doudoroff, M. (1966) The aerobic *Pseudomonads*: a taxonomic study. *J Gen Microbiol* **43**: 159 - 271.

Stec, E., Witkowska-Zimny, M., Hryniewicz, M., Neumann, P., Wilkinson, A., Brzozowski, A., Verma, C., Zaim, J., Wysocki, S. y Bujacz, G. (2006) Structural basis of the sulphate starvation response in *Escherichia coli*: crystal structure and mutational analysis of the cofactor-binding domain of the CblR transcriptional regulator. *J Mol Biol* **364**: 309-322.

Storz, G., Tartaglia, L. y Ames, B. (1990) Transcriptional regulator of oxidative stress-inducible genes: direct activation by oxidation. *Science* **248**: 189-194.

Stover, C.K., Pham, X.Q., Erwin, A.L., Mizoguchi, S.D., Warrenner, P., Hickey, M.J., Brinkman, F.S.L., Hufnagle, W.O., Kowalik, D.J., Lagrou, M., Garber, R.L., Goltry, L., Tolentino, E., Westbrook-Wadman, S., Yuan, Y., Brody, L.L., Coulter, S.N., Folger, K.R., Kas, A., Larbig, K., Lim, R., Smith, K., Spencer, D., Wong, G.K.S., Wu, Z., Paulsen, I.T., Reizer, J., Saier, M.H., Hancock, R.E.W., Lory, S. y Olson, M.V. (2000) Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature* **406**: 959-964.

Subramanya, H.S., Roper, D.I., Dauter, Z., Dodson, E.J., Davies, G.J., Wilson, K.S. y Wigley, D.B. (1996) Enzymatic Ketonization of 2-Hydroxymuconate: Specificity and Mechanism Investigated by the Crystal Structures of Two Isomerases. *Biochemistry* **35**: 792-802.

Sugimoto, K., Senda, T., Aoshima, H., Masai, E., Fukuda, M. y Mitsui, Y. (1999) Crystal structure of an aromatic ring opening dioxygenase LigAB, a protocatechuate 4,5-dioxygenase, under aerobic conditions. *Structure* **7**: 953-965.

- Swank, R.T. y Munkres, K.D.** (1971) Molecular weight analysis of oligopeptides by electrophoresis in polyacrylamide gel with sodium dodecyl sulfate. *Anal. Biochem.* **39**: 462-477.
- Tack, B.F., Chapman, P.J. y Dagley, S.** (1972a) Purification and Properties of 4-Hydroxy-4-methyl-2-oxoglutarate Aldolase. *J. Biol. Chem.* **247**: 6444-6449.
- Tack, B.F., Chapman, P.J. y Dagley, S.** (1972b) Metabolism of Gallic Acid and Syringic Acid by *Pseudomonas putida*. *J. Biol. Chem.* **247**: 6438-6443.
- 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.
- Tamber, S. y Hancock, R.E.W.** (2004) The outer membranes of *pseudomonads*. In *Pseudomonas*. Ramos, J.L. (ed). New York: Kluwer Academic, pp. 575-601.
- Tamber, S., Ochs, M.M. y Hancock, R.E.W.** (2006) Role of the Novel OprD Family of Porins in Nutrient Uptake in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **188**: 45-54.
- Taylor, A.B., Czerwinski, R.M., Johnson, W.H., Whitman, C.P. y Hackert, M.L.** (1998) Crystal Structure of 4-Oxalocrotonate Tautomerase Inactivated by 2-Oxo-3-pentynoate at 2.4 Å Resolution: Analysis and Implications for the Mechanism of Inactivation and Catalysis. *Biochemistry* **37**: 14692-14700.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G. y J, G.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**: 4673-4680.
- Tralau, T., Mampel, J., Cook, A.M. y Ruff, J.** (2003) Characterization of TsaR, an Oxygen-Sensitive LysR-Type Regulator for the Degradation of p-Toluenesulfonate in *Comamonas testosteroni* T-2. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**: 2298-2305.
- Trias, J. y Nikaido, H.** (1990a) Outer membrane protein D2 catalyzes facilitated diffusion of carbapenems and penems through the outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **34**: 52-57.
- Trias, J. y Nikaido, H.** (1990b) Protein D2 channel of the *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane has a binding site for basic amino acids and peptides. *J. Biol. Chem.* **265**: 15680-15684.
- Tropel, D. y van der Meer, J.R.** (2004) Bacterial Transcriptional Regulators for Degradation Pathways of Aromatic Compounds. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **68**: 474-500.
- Urbaniak, M.D., Crossman, A., Chang, T., Smith, T.K., van Aalten, D.M.F. y Ferguson, M.A.J.** (2005) The N-Acetyl-D-glucosaminylphosphatidylinositol De-N-

acetylase of Glycosylphosphatidylinositol Biosynthesis Is a Zinc Metalloenzyme. *J. Biol. Chem.* **280**: 22831-22838.

Vaillancourt, F., Bolin, J.T. y Eltis, L.D. (2004) Ring-cleavage dioxygenases. In *Pseudomonas*. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers, pp. 359-395.

Vaillancourt, F.d.r.H., Bolin, J.T. y Eltis, L.D. (2006) The Ins and Outs of Ring-Cleaving Dioxygenases. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* **41**: 241-267.

van der Meer, J.R., Frijters, A.C., Leveau, J.H., Eggen, R.I., Zehnder, A.J. y de Vos, W.M. (1991) Characterization of the *Pseudomonas* sp. strain P51 gene *tcbR*, a LysR-type transcriptional activator of the *tcbCDEF* chlorocatechol oxidative operon, and analysis of the regulatory region. *J. Bacteriol.* **173**: 3700-3708.

Velasco, A., Alonso, S., García, J.L., Perera, J. y Díaz, E. (1998) Genetic and Functional Analysis of the Styrene Catabolic Cluster of *Pseudomonas* sp. Strain Y2. *J. Bacteriol.* **180**: 1063-1071.

Vetting, M.W. y Ohlendorf, D.H. (2000) The 1.8 Å crystal structure of catechol 1,2-dioxygenase reveals a novel hydrophobic helical zipper as a subunit linker. *Structure* **8**: 429-440.

Vollhardt, K.P. y Schore, N.E. (1994) *Organic Chemistry*. New York: Freeman and co.

von Gotz, F., Haussler, S., Jordan, D., Saravanamuthu, S.S., Wehmhoner, D., Strussmann, A., Lauber, J., Attree, I., Buer, J., Tummler, B. y Steinmetz, I. (2004) Expression Analysis of a Highly Adherent and Cytotoxic Small Colony Variant of *Pseudomonas aeruginosa* Isolated from a Lung of a Patient with Cystic Fibrosis. *J. Bacteriol.* **186**: 3837-3847.

Wagner, V.E., Bushnell, D., Passador, L., Brooks, A.I. y Iglewski, B.H. (2003) Microarray Analysis of *Pseudomonas aeruginosa* Quorum-Sensing Regulons: Effects of Growth Phase and Environment. *J. Bacteriol.* **185**: 2080-2095.

Wang, L. y Winans, S. (1995) The sixty nucleotide OccR operator contains a subsite essential and sufficient for OccR binding and a second subsite required for ligand-responsive DNA bending. *J Mol Biol* **253**: 691-702.

Wang, Y.Z. y Lipscomb, J.D. (1997) Cloning, overexpression, and mutagenesis of the gene for homoprotocatechuate 2,3-dioxygenase from *Brevibacterium fuscum*. *Protein Expr Purif* **10**: 1-9.

Wattiau, P., Bastiaens, L., van Herwijnen, R., Daal, L., Parsons, J.R., Renard, M.-E., Springael, D. y Cornelis, G.R. (2001) Fluorene degradation by *Sphingomonas* sp. LB126 proceeds through protocatechuic acid: a genetic analysis. *Research in Microbiology* **152**: 861-872.

- Webb, E.C. y Morrow, P.F.W.** (1959) The activation of an arylsulphatase from ox liver by chloride and other anions. *Biochem J* **73**: 7-15.
- Weinel, C., Nelson, K.E. y Tümmler, B.** (2002) Global features of the *Pseudomonas putida* KT2440 genome sequence. *Environmental Microbiology* **4**: 809-818.
- Whitfield, C.D., Steers, E.J., Jr. y Weissbach, H.** (1970) Purification and Properties of 5-Methyltetrahydropteroyltriglutamate-Homocysteine Transmethylase. *J. Biol. Chem.* **245**: 390-401.
- Whitman, C.P.** (2002) The 4-oxalocrotonate tautomerase family of enzymes: how nature makes new enzymes using a [beta]-[alpha]-[beta] structural motif. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **402**: 1-13.
- Whitman, C.P., Aird, B.A., Gillespie, W.R. y Stolowich, N.J.** (1991) Chemical and enzymic ketonization of 2-hydroxyomuconate, a conjugated enol. *J. Am. Chem. Soc.* **113**: 3154-3162.
- Whittington, D.A., Rusche, K.M., Shin, H., Fierke, C.A. y Christianson, D.W.** (2003) Crystal structure of LpxC, a zinc-dependent deacetylase essential for endotoxin biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**: 8146-8150.
- Widdel, F. y Rabus, R.** (2001) Anaerobic biodegradation of saturated and aromatic hydrocarbons. *Curr Opin Biotechnol.* **12**: 259-276.
- Wilkes, S. y Glasl, H.** (2001) Isolation, characterization, and systematic significance of 2-pyrone-4,6-dicarboxylic acid in *Rosaceae* *Phytochemistry* **58**: 441-449.
- Wilkinson, S. y Grove, A.** (2005) Negative cooperativity of uric acid binding to the transcriptional regulator HucR from *Deinococcus radiodurans*. *J Mol Biol* **350**: 617-630.
- Williams, P.A. y Worsey, M.J.** (1976) Ubiquity of plasmids in coding for toluene and xylene metabolism in soil bacteria: evidence for the existence of new TOL plasmids. *J Bacteriol* **125**: 818-828.
- Williams, P.A. y Shaw, L.E.** (1997) *mucK*, a gene in *Acinetobacter calcoaceticus* ADP1 (BD413), encodes the ability to grow on exogenous cis,cis-muconate as the sole carbon source. *J. Bacteriol.* **179**: 5935-5942.
- Wirth, R., Friesenegger, A. y Fieldler, S.** (1989) Transformation of various species of gram-negative bacteria belonging to 11 different genera by electroporation. *Mol Gen Genet* **216**: 175-177.
- Wouter, M.A. y Husain, A.** (2001) Changes in zinc ligation promote remodeling of the active site in the zinc hydrolase superfamily. *Journal of Molecular Biology* **314**: 1191-1207.

Wylie, J.L. y Worobec, E.A. (1995) The OprB porin plays a central role in carbohydrate uptake in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **177**: 3021-3026.

Xia, Z., Yoshida, T. y Funaoka, M. (2003) Enzymatic degradation of highly phenolic lignin-based polymers (lignophenols). *Eur. Poly J.* **39**: 909-914.

Yamaguchi, A., Someya, Y. y Sawai, T. (1992) Metal-tetracycline/H⁺ antiporter of *Escherichia coli* encoded by transposon Tn10. The role of a conserved sequence motif, GXXXXRXGRR, in a putative cytoplasmic loop between helices 2 and 3. *J. Biol. Chem.* **267**: 19155-19162.

Yamaguchi, A., Kimura, T., Someya, Y. y Sawai, T. (1993) Metal-tetracycline/H⁺ antiporter of *Escherichia coli* encoded by transposon Tn10. The structural resemblance and functional difference in the role of the duplicated sequence motif between hydrophobic segments 2 and 3 and segments 8 and 9. *J. Biol. Chem.* **268**: 6496-6504.

Yamaguchi, A., Ono, N., Akasaka, T., Noumi, T. y Sawai, T. (1990) Metal-tetracycline/H⁺ antiporter of *Escherichia coli* encoded by a transposon, Tn10. The role of the conserved dipeptide, Ser65-Asp66, in tetracycline transport. *J. Biol. Chem.* **265**: 15525-15530.

Ye, J. y van den Berg, B. (2004) Crystal structure of the bacterial nucleoside transporter Tsx. *EMBO J.* **23**: 3187-3195.

Yoshida, M., Oikawa, T., Obata, H., Abe, K., Mihara, H. y Esaki, N. (2007) Biochemical and Genetic Analysis of the γ -Resorcyate (2,6-Dihydroxybenzoate) Catabolic Pathway in *Rhizobium* sp. Strain MTP-10005: Identification and Functional Analysis of Its Gene Cluster. *J. Bacteriol.* **189**: 1573-1581.

Yoshimura, F. y Nikaido, H. (1982) Permeability of *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane to hydrophilic solutes. *J. Bacteriol.* **152**: 636-642.

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.

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.

Zabinski, R., Münck, E., Champion, P.M. y Wood, J.M. (1972) Kinetic and Mössbauer studies on the mechanism of protocatechuic acid 4,5-oxygenase. *Biochemistry* **11**.

Zhulin, I.B., Rowsell, E.H., Johnson, M.S. y Taylor, B.L. (1997) Glycerol elicits energy taxis of *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.* **179**: 3196-3201.