

---

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA

MOLECULAR



ANÁLISIS GENÓMICO DEL CATABOLISMO DE  
COMPUESTOS AROMÁTICOS EN *Pseudomonas putida* KT2440:  
CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LA RUTA DE  
DEGRADACIÓN DEL ÁCIDO NICOTÍNICO

TESIS DOCTORAL

José Ignacio Jiménez Zarco

DIRECTORES:

Eduardo Díaz Fernández

José Luis García López

CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS

CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS

Madrid, 2006

---

*“Quien no espera lo inesperado, no llegará a encontrarlo,  
por no ser ello escrutable ni accesible.”*

*Heráclito (544-484 A.C.)*

*“(...) A Ítaca tenla siempre en la memoria,  
llegar allá es tu meta,  
mas no apresures el regreso.  
Mejor que se dilate largos años  
y en tu vejez, arribes a la isla  
con cuanto hayas llegado en el camino,  
sin esperar que Ítaca te enriquezca.  
Un hermoso viaje te dio Ítaca. Sin ella  
el camino no hubieras emprendido.  
Mas ninguna otra cosa puede darte.*

*Aunque pobre la encuentres, no hubo engaño.  
Rico en saber y en vida como has vuelto, comprendes  
qué significan las Ítacas.”*

*Extraído de “Ítaca”,  
del libro “75 poemas” de Constantino Cavafis.*



*A mis padres  
y a mi hermano*

---

## Agradecimientos

*Siempre pensé que esta sería la parte más fácil de escribir, casi cinco años después de empezar a vivir esta historia me doy cuenta de que han pasado tantas cosas, y de que durante este tiempo me ha ayudado tantas personas, que casi no sé como empezar. Os escribo estas líneas para daros las gracias de todo corazón y perdonad si me olvido de alguien. Empiezo sin más, y aprovecho lo que escribieron otros que lo hacen mucho mejor que yo...*

*A la flor de lis de los laboratorios, que me subió al tren de la ciencia y q0H1H2H3Hue han sido mi segunda familia durante estos años. He tenido el inmenso placer de conocer tres generaciones de "Rubenes". La primera, la de cuando llegué, los que me enseñaron y que han enseñado a tantos otros. Gracias al Dr. Rubén López que ha sabido mantener el mismo espíritu de trabajo durante años en una gran familia. Gracias a los Dres. José Luis García y Eduardo Díaz, por la dirección de la tesis, por la oportunidad de poder trabajar en el grupo, por enseñarme a pensar, a ser crítico y riguroso con mi trabajo y sobre todo, por la inmensa paciencia que han tenido conmigo. A los Dres. Ernesto García, Pedro García, Auxi Prieto y Manuel Carmona, que como buenos jefes saben mucho y siempre han estado dispuestos a echar una mano. Ellos siguen, pero de la vieja guardia que me enseñó en el CIB de Velázquez ya quedan poquitos. Gracias Tere, Bea, Dani, Elo y a los que se fueron marchando Edith, Balta (que me enseñó el oficio), Blanca, Bego, Cris M., Patri, Cris F., Pepa, María José, Marta y Virginia O. La segunda generación ha sido el relevo, y casi coincidiendo con la llegada a Ramiro de Maeztu, gracias Ana, María, Ana D., Violeta, Merche, Isa, Miriam, Irene, Laura, Iria, Valeria, Gonzalo, Blas y Juan. No hace falta que haga distinciones, porque ha sido un auténtico placer trabajar y compartir penas y alegrías con todos vosotros durante estos cinco años. Cada uno a su manera, siempre tuvo un rato para ayudar a quien lo necesitara. Sólo espero que este grupo siga así siempre, porque además de la calidad científica y de ser escuela de investigadores, también sois escuela de buenas personas. La última generación son los que acaban de llegar, y a los que les deseo una vida llena de oportunidades, son Pablo, Sergio, Lucía, Marta, Nerea, Alba y Marcos (bienvenido).*

*A las intrépidas personas que hicieron, de la investigación su vocación y me ayudaron con generosidad y además siempre me enseñaron algo nuevo. Además de los jefes, también me gustaría acordarme de los indios: A Paco, Ildefonso, David, Aitor y Teca, del laboratorio del Dr. Víctor de Lorenzo. A Luis, Ana y Gracia del laboratorio del Dr. Fernando Rojo. A Inés y Ana del laboratorio del Dr. Eduardo Santero. A Euge, Patri, Tesi y Antonio del laboratorio del Dr. Juan Luis Ramos. A Tere, Viki, Julio y David, del laboratorio del Dr. Julián Perera. A los Dres. José Miguel Mancheño, Carlos Alfonso, Germán Rivas, Eduardo Rial, Ángeles Canales, Jesús Jiménez, Antonio Leal, Alicia Prieto, Krzysztof Ginalski y Leszec Richlewski que participaron en la caracterización bioquímica y estructural de la proteína NicX. A la Dra. Diana Stepjandic que me proporcionó los cósmidos de su librería genómica. Al Dr. Norberto Palleroni que nos envió la cepa N9. A los Dres. Kenneth Timmis, Lindsay Eltis, Andrew Miller (que me regaló la primera cita en una taberna del puerto de Spetses) e Isabel de la Mata (mi tutora favorita) por sus comentarios e ideas.*

*A los casquivanos compañeros de centro, que coleccionaban aficiones comunes, y que hicieron un entorno de trabajo fantástico. A los del grupo de teatro, los del fútbol, los del Galaica, a Silvia, Tere, Jimena, Gaizka, Sonia, Emilio, Pedriño, Asier, Isra, Alfredo, Laura, Juan, Chevi, Patricia, Bea, Luque, Mariano, Ernesto, Ángel, Fer, Eva y el montón de gente que se me olvida.*

*Al milagro de la Corredera, que en el diccionario salen como acepción de amistad. La verdad es que no sé como hemos hecho para estar durante tres años viviendo juntos sin problemas y siendo tantos. Es una pena que se acabe, pero nos lo pasamos bien y os lo debo todo porque me habéis aguantado cada día, especialmente en los últimos meses. Gracias a Olga y a Javi, a Andrea, a Checho y a Marta, a Oussama (nunca pasa nada) y a Ana, a Javi Maño, a Bertin y a Elena, al Bicho y a Chema. Suerte y felicidad para todos, ahora que nos separamos, pero antes la penúltima en el Sitting, por supuesto, invito yo.*

---

*A los impúdicos compañeros de correrías,  
que crecimos juntos y que casi sin saberlo, han ayudado más de lo que se piensan. Gracias Pepo, Rafa, y como  
no, Melquiades, de ti es imposible olvidarse. Habéis sido miles entre Madrid y El Provençio, siempre amigos,  
siempre estuvisteis para mí y nunca pedisteis nada, gracias.*

*A mi familia,  
que hiciera lo que hiciera siempre me apoyaron. Nunca tendré tiempo para devolveros todo lo que me habéis  
dado, sólo quiero que sepáis que aunque esté lejos siempre vais a estar conmigo. Siento haber estado un  
poquito disperso estos meses, pero lo tenéis que entender. A mis tíos, a mis primos Jorge y Angélica y a mi  
abuela. Dentro de nada estamos en la cocinilla. A mis padres y a mi hermano Alberto.*

*A Don Joaquín, a Raquel y a Patricia,  
que tuvieron su parte de culpa en que esta tesis quedara así y no de otra manera .*

*Aves de paso,  
como pañuelos cura-fracasos.*

---

**ÍNDICE**

	<b>Pag.</b>
<b>Abreviaturas</b>	1
<b>I. Introducción</b>	5
1. Los compuestos aromáticos en la naturaleza y su metabolismo en bacterias.	7
1.1 Propiedades de los compuestos aromáticos: reactividad de los anillos de benceno y piridina.	8
1.2 Características generales del catabolismo de compuestos aromáticos en bacterias.	12
2. El catabolismo aeróbico de compuestos aromáticos.	14
2.1 Rutas periféricas de hidroxilación de los derivados del benceno.	15
2.1.1 Monooxigenasas.	16
2.1.2 Dioxigenasas de anillo.	20
2.2 Rutas periféricas de hidroxilación de los derivados de la piridina.	23
2.3 Ruptura de los anillos aromáticos.	29
2.4 Rutas aeróbicas híbridas.	35
2.5 Regulación de las rutas catabólicas de compuestos aromáticos.	37
3. Degradación bacteriana del ácido nicotínico (NA).	40
<b>II. Objetivos</b>	47
<b>III. Materiales y Métodos</b>	51
1. Cepas bacterianas.	53
2. Medios y condiciones de cultivo.	54
3. Plásmidos.	56
4. Transformación de células.	58
5. Transferencia de plásmidos por conjugación.	58
6. Técnicas de manipulación de DNA.	59
6.1 Aislamiento de DNA plasmídico.	59

---

6.2	Reacción de amplificación en cadena con DNA polimerasa termorresistente (PCR).	59
6.3	Secuenciación de DNA.	62
6.4	Construcción de cepas mutantes <i>P. putida</i> KT2440dnic mediante mutagénesis insercional.	62
6.5	Mutagénesis dirigida del gen <i>nicX</i> .	63
7.	Técnicas de manipulación de RNA.	63
7.1	Extracción de RNA.	63
7.2	Retrotranscripción seguida de PCR (RT-PCR).	64
8.	Técnicas de manipulación de proteínas.	64
8.1	Obtención de los extractos proteicos	64
8.2	Purificación de la proteína NicX.	65
8.3	Electroforesis en geles de poliacrilamida.	65
8.4	Determinación de la secuencia amino-terminal.	66
8.5	Ensayos enzimáticos.	66
8.5.1	Ensayos de actividad nicotinato hidroxilasa (NicAB).	66
8.5.2	Ensayo de actividad 6-hidroxinicotinato monooxigenasa (NicC).	68
8.5.3	Ensayo de actividad 2,5-dihidroxipiridina dioxigenasa (NicX).	68
8.5.4	Ensayo de actividad <i>N</i> -formilmaleamato desformilasa (NicD).	70
8.5.6	Ensayo de actividad $\beta$ -galactosidasa.	70
8.5.7	Ensayo de actividad aminopeptidasa.	71
8.6	Determinación del contenido en Fe de NicX mediante Espectrometría de Emisión Atómica (ICP).	72
8.7	Ultracentrifugación analítica.	73
8.8	Cristalización de NicX y análisis preliminar de los cristales.	73
8.8.1	Cristalización de NicX.	73
8.8.2	Experimentos de difracción de rayos X.	74
8.8.3	Procesamiento de los datos de difracción.	75
8.9	Modelado tridimensional de proteínas.	75
9.	Análisis de metabolitos mediante Espectrometría de Masas (MS).	76
10.	Caracterización estructural de metabolitos mediante Resonancia Magnética Nuclear (RMN).	76

11. Análisis de los datos de secuencia.	77
<b>IV. Resultados</b>	<b>79</b>
1. Análisis global de las rutas de degradación de compuestos aromáticos en <i>P. putida</i> KT2440.	81
1.1 Identificación de los compuestos aromáticos que son catabolizados por <i>P. putida</i> KT2440.	81
1.2 Localización cromosómica de los genes implicados en las rutas de degradación de compuestos aromáticos en <i>P. putida</i> KT2440.	82
1.3 La ruta central del $\beta$ -cetoacil-CoA.	85
1.4 Rutas periféricas que convergen en la ruta central del $\beta$ -cetoacil-CoA.	89
1.5 El catabolismo del fenilacetil-CoA.	94
1.6 La ruta central del homogentisato y el catabolismo de la fenilalanina y tirosina.	98
1.7 La ruta de degradación del NA.	102
2. Los genes <i>nic</i> son los responsables del catabolismo del NA en <i>P. putida</i> KT2440.	105
2.1 Construcción de mutantes en los genes <i>nic</i> de <i>P. putida</i> KT2440	105
2.2 Caracterización del fenotipo de los mutantes <i>P.putida</i> KT2440 <i>dnic</i>	105
2.3 Construcción de una casete <i>nic</i> movilizable.	109
3. Caracterización molecular de los genes catabólicos <i>nic</i> .	112
3.1 Estudio de los genes <i>nicAB</i> .	112
3.2 Estudio del gen <i>nicC</i> .	117
3.3 Estudio de la proteína NicX.	121
3.3.1 Hiperexpresión del gen <i>nicX</i> y purificación del producto génico.	121
3.3.2 Caracterización bioquímica de la enzima NicX.	125
3.3.3 Caracterización del producto de la reacción catalizada por NicX.	129
3.3.4 Estudios sobre las relaciones entre estructura y función de NicX.	133
3.3.4.1 Conformación nativa de NicX.	133
3.3.4.2 Cristalización de NicX y análisis preliminar de los resultados de difracción.	135



3.3.4.3 Modelado de la estructura tridimensional de NicX.	140
3.3.4.4 Mutagénesis dirigida de residuos conservados en NicX.	143
3.4 Estudio de gen <i>nicD</i> .	144
4. Análisis de la regulación transcripcional de los genes <i>nic</i> .	149
4.1 Análisis de la organización transcripcional del <i>cluster nic</i> .	149
4.2 Estudio de los promotores <i>Pa</i> , <i>Pc</i> y <i>Px</i> del <i>cluster nic</i> .	152
4.2.1 Estudio del promotor <i>Pa</i> .	153
4.2.2 Estudio de los promotores <i>Pc</i> y <i>Px</i> .	155
4.3 Estudio de los inductores del <i>cluster nic</i> .	157
4.4 Estudio del gen regulador <i>nicR</i> .	160
<b>V. Discusión</b>	165
1. Análisis del potencial catabólico frente a compuestos aromáticos de <i>P. putida</i> KT2440.	167
1.1 Mapa catabólico de compuestos aromáticos en <i>P. putida</i> KT2440.	167
1.2 La ruta del $\beta$ -cetoadipato.	169
1.3 Las rutas del fenilacetato y del homogentisato.	172
1.4 Diversidad en el transporte y la regulación.	174
2. Identificación y caracterización de los genes <i>nic</i> implicados en la degradación del NA en <i>P. putida</i> KT2440.	178
2.1 Los genes <i>nicAB</i> codifican la nicotinato 6-hidroxilasa.	178
2.2 El gen <i>nicC</i> codifica la 6HNA 3-monooxigenasa.	185
2.3 NicX es una nueva extradiol dioxigenasa.	187
2.4 NicD es una <i>N</i> -formilmaleamato desformilasa.	196
2.5 Análisis de los productos de los genes <i>nicF</i> y <i>nicE</i> .	200
2.6 Análisis de los productos de los genes <i>nicT</i> y <i>nicP</i> .	201
3. Estudio de la regulación transcripcional de los genes <i>nic</i> .	203
3.1 Análisis de la inducción y organización transcripcional de los genes <i>nic</i> .	203
3.2 La proteína NicR es un regulador transcripcional de la familia MarR.	206
4. Distribución del <i>cluster nic</i> en otras bacterias.	211

<b>VI. Conclusiones</b>	221
<b>VII. Bibliografía</b>	227

**ABREVIATURAS**

<b>2,3-DHP</b>	2,3-Dihidroxipiridina
<b>2,4-DHP</b>	2,4-Dihidroxipiridina
<b>2,5-DHP</b>	2,5-Dihidroxipiridina
<b>6HNA</b>	Ácido 6-hidroxinicotínico
<b>16S rDNA</b>	Gen <i>16S rDNA</i>
<b>A<sub>λ</sub></b>	Absorbancia medida a λ nm
<b>ADP</b>	Adenosina difosfato
<b>Ap<sup>r</sup></b>	Resistencia a ampicilina
<b>ATP</b>	Adenosina trifosfato
<b>BSA</b>	Seroalbúmina bovina
<b>cDNA</b>	DNA complementario
<b>Cm<sup>r</sup></b>	Resistencia a cloranfenicol
<b>CoA</b>	Coenzima A
<b>C-terminal</b>	Carboxilo terminal
<b>d</b>	Singlete
<b>D<sub>2</sub>O</b>	Agua deuterada
<b>Da</b>	Dalton
<b>dd</b>	Doblete
<b>DEAE</b>	Dietilaminoetanol
<b>DEPC</b>	Dietilpirocarbonato
<b>DH</b>	Deshidrogenasa
<b>DMF</b>	Dimetilformamida
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>dNTP</b>	Desoxinucleótido trifosfato
<b>DTT</b>	Ditiotreitol
<b>EDTA</b>	Ácido etilendiaminotetraacético
<b>ESRF</b>	<i>European Synchrotron Radiation Facility</i>
<b>FAD</b>	Dinucleótido de flavina y adenina
<b>FADH<sub>2</sub></b>	Dinucleótido de flavina y adenina reducido
<b>FMN</b>	Mononucleótido de flavina
<b>GC</b>	Cromatografía de gases
<b>Gm<sup>r</sup></b>	Resistencia a gentamicina
<b>GTP</b>	Guanosina trifosfato

<b>HEPES</b>	Ácido 4-(2-hidroxietyl)-1-piperacinetanosulfónico
<b>HPLC</b>	Cromatografía líquida de alta definición
<b>HSQC</b>	<i>Heteronuclear Single Quantum Correlation</i>
<b>HTH</b>	Hélice-giro-hélice
<b>ICP</b>	Espectrometría de Emisión Atómica
<b>IPTG</b>	Isopropil- $\beta$ -D-tiogalactopiranosido
<b>K</b>	Kelvin
<b>kb</b>	1000 pares de bases
$k_{cat}$	Constante catalítica
$k_{cat}/k_M$	Eficacia catalítica
<b>kDa</b>	1000 dalton
$K_M$	Constante de Michaelis-Menten
<b>Km<sup>r</sup></b>	Resistencia a kanamicina
<b>LB</b>	Medio Luria-Bertani
<b>M63</b>	Medio mínimo M63
<b>MC</b>	Medio mínimo MC
<b>MCD</b>	Molibdopteríncitosín-dinucleótido
<b>MCS</b>	Sitio de clonación múltiple
<b>MPD</b>	2-metil-2,4-pentanodiol
<b>MPT</b>	Molibdopterina
<b>mRNA</b>	RNA mensajero
<b>MS</b>	Espectrometría de masas
<b>m/z</b>	Relación masa-intensidad
<b>NA</b>	Ácido nicotínico
<b>NAD</b>	Nicotina-adenina-dinucleótido
<b>NADH</b>	Nicotina-adenina-dinucleótido reducido
<b>NADPH</b>	Fosfato de Nicotina-adenina-dinucleótido reducido
<b>NBS</b>	<i>N</i> -bromosuccinimida
<b>NCBI</b>	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
<b>NFM</b>	Ácido <i>N</i> -formilmaleámico
<b>N-terminal</b>	Amino terminal
$\Omega$	Ohmio
<b>ORF</b>	Marco abierto de lectura
<b>PAGE</b>	Electroforesis en gel de poliacrilamida
<b>pb</b>	Pares de bases
<b>PCR</b>	Reacción de amplificación en cadena con DNA polimerasa termorresistente
<b>PDB</b>	<i>Protein Data Bank</i>

<b>PEG</b>	Polietilenglicol
<b>POB</b>	<i>p</i> -Hidroxibenzoato
<b>p/v</b>	Relación peso/volumen
<b>RBS</b>	Secuencia de unión a ribosoma
<b>REP</b>	Secuencia palindrómica repetitiva extragénica
<b>Rf<sup>r</sup></b>	Resistencia a rifampicina
<b>RMN</b>	Resonancia magnética nuclear
<b>RNA</b>	Ácido ribonucleico
<b>RT-PCR</b>	Reacción de retrotranscripción acoplada a PCR
<b>σ</b>	Factor sigma de la RNA polimerasa
<b>SDS</b>	Dodecilsulfato sódico
<b>Tris</b>	Trihidroximetilaminometano
<b>U</b>	Unidad de actividad enzimática
<b>V<sub>M</sub></b>	Volumen de Matthews
<b>V<sub>max</sub></b>	Velocidad máxima
<b>v/v</b>	Relación volumen-volumen
<b>X-gal</b>	5-Bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosido

---

# ***I INTRODUCCIÓN***





## I INTRODUCCIÓN

### **1 Los compuestos aromáticos en la naturaleza y su metabolismo en bacterias**

Los compuestos aromáticos se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza y su origen es 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, que es el segundo polímero más abundante en la naturaleza después de la celulosa y forma parte de la pared celular vegetal. Su presencia se extiende también a otros ámbitos y se encuentran presentes como componentes de los taninos, de pigmentos, de cofactores, de combustibles fósiles y de las propias estructuras de las proteínas, del DNA y del RNA (Gibson y Harwood, 2002). La degradación de estos compuestos es crítica para mantener el ciclo global del carbono y las bacterias han desarrollado estrategias para su mineralización, pese a la gran estabilidad termodinámica de estas moléculas (Gibson y Harwood, 2002; Vaillancourt *et al.*, 2004). La actividad industrial supone una fuente adicional de compuestos aromáticos que son liberados al medio ambiente y, 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 ocurre con los bifenilos, dioxinas polihalogenadas, compuestos nitroaromáticos, etc. (Reineke, 1998; 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 (Díaz *et al.*, 2004). 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 (Ramos *et al.*, 1994).

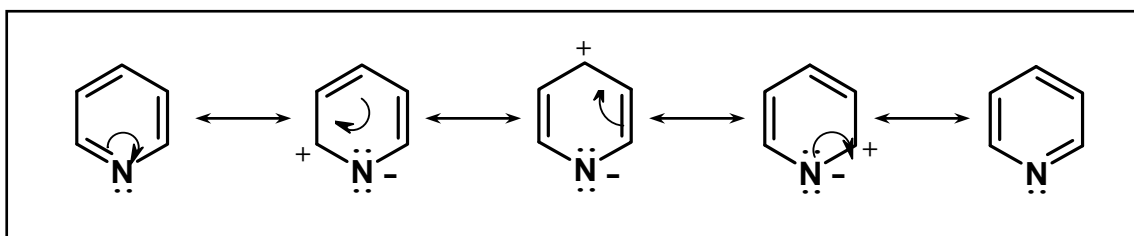
### **1.1 Propiedades de los compuestos aromáticos: reactividad de los anillos de benceno y piridina**

Los compuestos aromáticos son todas aquellas moléculas que poseen estructuras cíclicas, planas, completamente conjugadas y que poseen  $(4n+2)$  electrones  $\pi$  deslocalizados, donde  $n$  es un número entero positivo (Regla de Hückel) (Volhardt 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  $\pi$  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  $\pi$ , 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.

En la naturaleza se encuentra ampliamente distribuida otra estructura aromática similar a la del benceno. Se trata de la piridina, un compuesto *N*-heteroaromático en el que uno de los átomos de carbono es sustituido por un nitrógeno. La configuración de todos los átomos es  $sp^2$ , al igual que en el caso del benceno, pero su estructura electrónica está fuertemente perturbada por la presencia del átomo de nitrógeno, que es más electronegativo que los de carbono y atrae la densidad electrónica del anillo, favoreciendo el desapantallamiento de los carbonos (C2) contiguos al nitrógeno así como del carbono (C4)

situado enfrente de éste. Esta peculiaridad de la molécula condiciona su reactividad (Vollhardt y Schore, 1994) (Fig. 1).



**Fig. 1. Intermedios de resonancia del anillo de piridina.**

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 derivados de la piridina poseen una aromaticidad menor y las reacciones de sustitución electrófila se ven desfavorecidas por lo que únicamente ocurren en condiciones extremas de temperatura o en presencia de compuestos que activen el anillo. Sin embargo, y a diferencia de lo que ocurre con los derivados bencénicos, el desapantallamiento que genera el nitrógeno electronegativo sobre los carbonos C2 y C4, permite las reacciones de sustitución nucleófila en el anillo de piridina, en las que se mantiene la aromaticidad tras la reacción de forma similar a lo que ocurre en las sustituciones electrófilas del benceno. Como se discutirá en apartados posteriores, la diferencia de electronegatividad entre el nitrógeno y el carbono de los anillos de piridina y benceno, respectivamente, y la distorsión que provoca el primero sobre la nube electrónica de los compuestos aromáticos, explican la existencia de mecanismos y enzimas distintos para su degradación en bacterias (Vollhardt y Schore, 1994).

Los compuestos *N*-heterocíclicos son muy abundantes en la naturaleza y participan en una gran variedad de reacciones biológicas, como transportadores de electrones (*e. g.*,

NAD(P)H, nucleótidos de flavina), como elementos constituyentes de los nucleótidos (bases púricas y pirimidínicas) del RNA y del DNA, o como moléculas de almacenamiento de energía como el ATP y el GTP. Otros *N*-heterociclos de origen natural son la piridoxina (vitamina B<sub>6</sub>), algunas porfirinas (derivados tetrapirrólicos), pigmentos, melamina, acridina, etc. y también micotoxinas y numerosos alcaloides (nicotina, anabasina, mimosina, etc.). Su origen también puede ser xenobiótico, puesto que se han empleado como productos farmacéuticos, tintes, disolventes industriales y pesticidas (como las *s*-triazinas, paraquat, diquat, picloram, etc.) (Fetzner, 1998; Fetzner, 2000; Kaiser *et al.* 1996) (Fig.2).

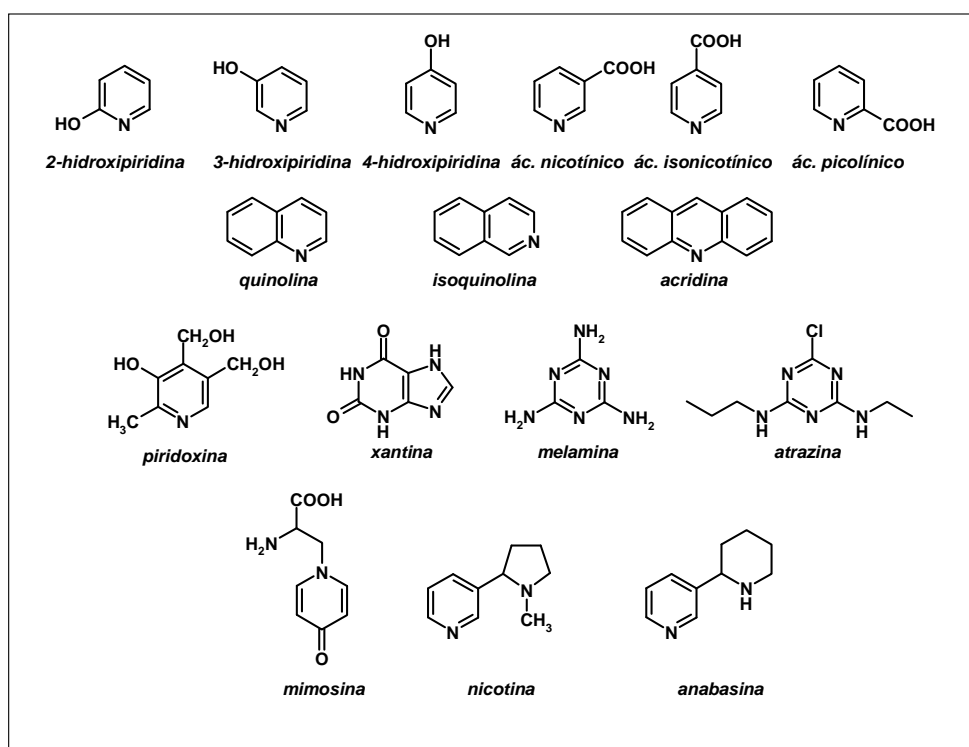
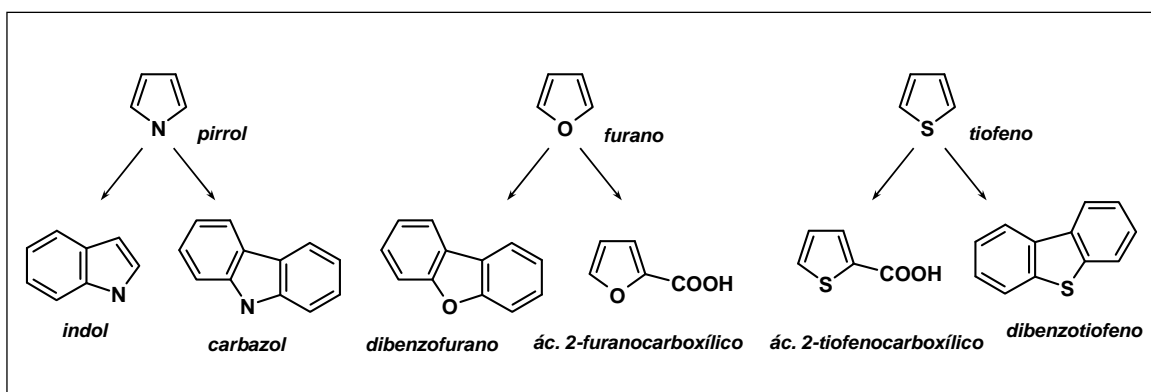


Fig. 2. Estructuras de algunos compuestos *N*-heterocíclicos.

La mayor parte de las emisiones contaminantes de compuestos *N*-heteroaromáticos se debe a los alquitranes y a la gasificación o a la combustión a bajas temperaturas del carbón o de la madera. Su carácter más polar que el de los anillos bencénicos les permite una difusión más rápida hasta aguas subterráneas y, por lo tanto, constituyen un grave problema medioambiental puesto que, dada la gran actividad biológica de este tipo de moléculas

muchas de ellas son tóxicas y en ocasiones mutagénicas o carcinogénicas (La Voie *et al.*, 1988; Willems *et al.*, 1992).

Existen otros compuestos aromáticos en la naturaleza para los que también se han descrito rutas de biodegradación. Se trata de moléculas heteroaromáticas que contienen en su estructura pirrol, furano o tiofeno, todos ellos son dienos cíclicos de 5 eslabones (Fig. 3). El carácter aromático de estos heterociclos es mucho menor que el del benceno o la piridina, lo que condiciona un tipo de catabolismo distinto al de estos últimos y, por lo tanto, su degradación por bacterias tiene características propias. Aunque las rutas de degradación de estos compuestos no están tan estudiadas como las de los derivados de benceno y piridina, algunas sí se han caracterizado, como por ejemplo la del anillo pirrólico del indol y carbazol en *Desulfobacterium indolicum* (Johansen *et al.*, 1997) y *Pseudomonas resinovorans* (Nojiri *et al.*, 2003), respectivamente, la de los derivados carboxílicos de furano y tiofeno (ácidos 2-furanocarboxílico y 2-tiofenocarboxílico) en *Escherichia coli* (Alam y Clark, 1991), la del dibenzofurano en *Sphingomonas* sp. RW1 (Bunz y Cook, 1993; Happe *et al.*, 1993), así como la del dibenzotiofeno en *Brevibacterium* sp. DO. (Bressler *et al.*, 1998).



**Fig. 3.** Heterociclos aromáticos de cinco eslabones y algunos ejemplos de compuestos derivados que son metabolizados por bacterias.

## **1. 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 1.1 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 canalizándolos al metabolismo central (Díaz, 2004; Heider y Fuchs, 1997).

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, la degradación es de tipo anaeróbica. Ambos tipos de catabolismo poseen características muy diferentes como se discutirá a continuación.

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, 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 2.4) (Van der Meer, 1997; Díaz *et al.*, 2001; Jiménez *et al.*, 2002).

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  $\text{NO}_3^-$ , que es reducido a  $\text{NO}_2^-$  o  $\text{N}_2$  (desnitrificación) (Spormann y Widdel, 2000), el  $\text{Fe}^{3+}$  que es reducido a  $\text{Fe}^{2+}$  (Coates *et al.*, 2001), o el  $\text{SO}_4^{2-}$  que es reducido a  $\text{SO}_2^{2-}$  o  $\text{S}_2$  (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 o la hidroxihidroquinona, que posteriormente sufren la reducción directa del anillo (Gibson y Harwood, 2002; Heider y Fuchs, 1997).

ii) Las rutas catabólicas que conducen a la formación de benzoil-coenzima A (CoA) (Schink *et al.*, 2000). A través de este metabolito son canalizados una gran mayoría de los compuestos aromáticos en el metabolismo anaeróbico (Heider y Fuchs, 1997; Harwood *et al.*, 1999; Schink *et al.*, 2000; Gibson y Harwood, 2002). La activación del anillo se logra mediante la formación de tioésteres de CoA catalizada por diferentes CoA-ligasas que requieren para su actividad  $\text{Mg}^{2+}$  y ATP. La tioesterificación con CoA contribuye a la desestabilización del anillo aromático de la misma forma que lo hacen los grupos hidroxilo en el catabolismo aeróbico, de manera que la reducción posterior del anillo y la pérdida de aromaticidad se ven significativamente favorecidas (Heider y Fuchs, 1997). Otras funciones que podría cumplir la activación a derivados de CoA es la de facilitar el transporte de los ácidos aromáticos al interior celular (Harwood y Gibson, 1986), así como favorecer la catálisis de los sustratos mediante el correcto anclaje a las enzimas que participan en la ruta (Heider y Fuchs, 1997). Los productos alicíclicos y alifáticos formados sufren una mineralización posterior similar a la  $\beta$ -oxidación de los ácidos grasos (Gibson y Harwood, 2002; Carmona y Díaz, 2005).

## **2. El catabolismo aeróbico de compuestos aromáticos**

Tal y como se ha mencionado en el apartado 1.2, la estrategia de mineralización aeróbica del anillo aromático se fundamenta en la desestabilización del mismo mediante la incorporación de grupos hidroxilo, de manera que la estructura resultante sea más susceptible de sufrir un proceso de oxidación. En términos generales, se puede afirmar que en las rutas aeróbicas clásicas una vez que el anillo incorpora dos o tres grupos hidroxilos (rutas periféricas) puede ser modificado por una dioxigenasa de ruptura, que cataliza su conversión a un compuesto alifático (rutas centrales).

Si bien la capacidad de catabolizar compuestos aromáticos está ampliamente extendida entre las bacterias (Harayama y Timmis, 1992; Pieper y Reineke, 2000; Ramos *et al.*, 1994), las rutas catabólicas de compuestos aromáticos mejor caracterizadas son las descritas en las bacterias del género *Pseudomonas* (van der Meer *et al.*, 1992; Jiménez *et al.*, 2004). Se trata de microorganismos ubicuos pertenecientes al grupo de las  $\gamma$ -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 tanto saprofitas como patógenos como 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). Del mismo modo, se han descrito cepas de *Pseudomonas* en las que se han identificado rutas para la degradación de heterociclos aromáticos tales como las piridinas y sus derivados hidroxilados, alquilados y carboxilados, quinolinas y sus derivados, tiofenos, furanos y pirroles, triazinas, purinas, etc. (Fetzner, 1998; Kaiser *et al.* 1996).

Aunque existen numerosos estudios acerca de los determinantes génicos responsables del catabolismo de compuestos aromáticos derivados del benceno (Jiménez *et al.*, 2002, 2004; Díaz *et al.*, 2001; Díaz, 2004), la genética de la degradación de compuestos *N*-heteroaromáticos en bacterias no ha sido tan estudiada. Así, hasta la fecha, los únicos

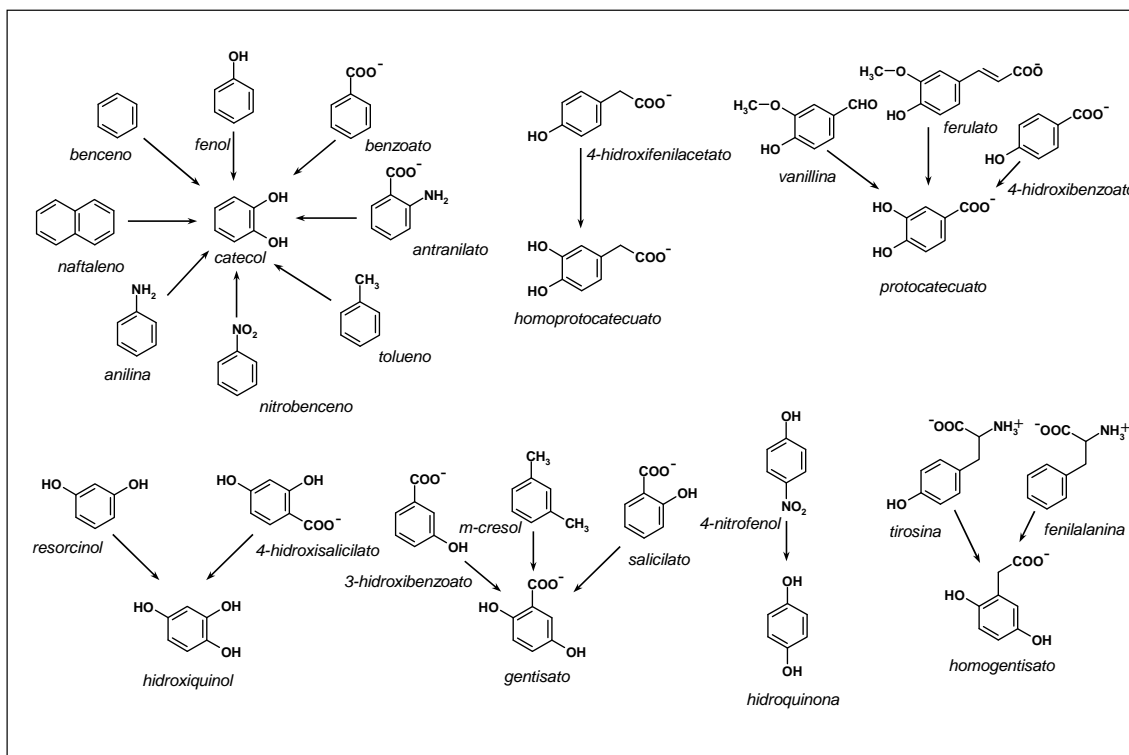


*clusters* génicos descritos para el catabolismo de este tipo de compuestos aromáticos son los implicados en la degradación de la purina (Schultz *et al.*, 2001), de la nicotina (Igloi y Brandsch, 2003), de las *s*-triazinas (Martínez *et al.*, 2001), del carbazol (Urata *et al.*, 2004), de la quinolina (Carl *et al.*, 2004) y de la ruta periférica que conduce a la conversión de quinaldina en antranilato (Parschat *et al.*, 2003).

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

### **2.1 Rutas periféricas de hidroxilación de los derivados del benceno**

Las rutas periféricas implicadas en el catabolismo aeróbico e 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. 4). 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. Las oxigenasas de anillo se pueden clasificar en monooxigenasas o dioxigenasas según introduzcan uno o dos grupos hidroxilo, respectivamente (Mason y Cammack, 1992), y todas ellas emplean oxígeno como co-sustrato y NAD(P)H como fuente de poder reductor (Mason y Cammack, 1992). Estas oxigenasas requieren además de 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 *et al.*, 1992). Los cofactores que emplean las oxigenasas de anillo suelen ser metales de transición como el hierro (éste es el más frecuente), manganeso, cobre y cobalto, aunque en ocasiones en las reacciones de oxigenación pueden actuar grupos prostéticos como las pteridinas o las flavinas (Harayama *et al.*, 1992; Fitzpatrick, 1999).



**Fig. 4. 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, homoprotocatecuato, protocatecuato, hidroxiquinol, gentisato, hidroxiquinona y homogentisato.

### 2.1.1 Monooxigenasas

Las monooxigenasas catalizan la inserción de un solo grupo hidroxilo en el compuesto aromático, generalmente en posición *orto* o *para* con respecto a uno preexistente (Harayama *et al*, 1992), aunque se han descrito monooxigenasas que emplean como sustrato derivados de benceno que no contienen grupos hidroxilo tales como el tolueno o el xileno (Pikus *et al.*, 1997). En el mecanismo de reacción de las oxigenasas, uno de los átomos del oxígeno molecular forma parte del grupo hidroxilo que finalmente se introduce en el anillo aromático, mientras que el otro átomo de oxígeno se utiliza para formar una molécula de agua (Fig. 5) (Butler y Mason, 1997).



hidroxilasa, las cuales no utilizan flavinas sino tetrahydropterinas como cofactor (Tabla 1) (Fitzpatrick, 1999).

Las monooxigenasas de dos componentes constan de dos clases de subunidades. Una de ellas es el componente oxigenasa responsable de la reacción de hidroxilación, en donde se encuentran los motivos de anclaje del sustrato y de la molécula de oxígeno. La otra subunidad es el componente reductasa que participa en la transferencia de electrones desde el NAD(P)H al componente oxigenasa. El componente oxigenasa es generalmente multimérico. Se han descrito monooxigenasas de dos componentes en, por ejemplo, el metabolismo del ácido 4-hidroxifenilacético de *E. coli* W (Prieto *et al.*, 1993; Prieto y García, 1994) y de *P. putida* (Arunachalam *et al.*, 1992). En la 4-hidroxifenilacetato hidroxilasa de *P. putida* uno de los componentes es una flavoproteína homodimérica que cataliza la oxidación del NADH y la hidroxilación del sustrato, mientras que el segundo es una proteína cooperadora que se requiere para que ambas reacciones estén acopladas (Arunachalam *et al.*, 1994; Arunachalam y Massey, 1994). En el caso de la proteína de *E. coli* W, existe un componente de menor tamaño (reductasa) que cataliza la formación de FADH<sub>2</sub> necesario para la reacción de hidroxilación del 4-hidroxifenilacetato que tiene lugar en el componente de mayor tamaño (oxigenasa) (Galán *et al.*, 2000b; Xun y Sandvik, 2000; Louie *et al.*, 2003).

Las monooxigenasas de más de dos componentes poseen una organización que varía de unas enzimas a otras. Son frecuentes las monooxigenasas multicomponentes que poseen un centro catalítico con dos átomos de hierro que no forman parte ni de un grupo hemo ni están coordinados por un cluster hierro-azufre tipo Rieske. Las monooxigenasas di(Fe) solubles que actúan sobre anillos aromáticos pertenecen a los grupos 1 y 2 (Notomista *et al.* 2003; Leahy *et al.* 2003). Así, la fenol hidroxilasa de *Pseudomonas* sp. CF600 (Nordlund *et al.*, 1990), que cataliza la conversión de fenol en catecol, posee cinco componentes que son imprescindibles para su actividad *in vitro*, aunque para el crecimiento de la bacteria en fenol como única fuente de carbono se requiere de un sexto componente adicional (Powlowski y Shingler, 1990; Powlowski y Shingler, 1994). El complejo enzimático está formado por un componente reductasa, que contiene un dominio de interacción con FAD y un centro [2Fe-2S] tipo ferredoxina para la transferencia de electrones desde el NADH; un componente hidroxilasa compuesto por tres polipéptidos y que contiene el centro de hierro binuclear; y una proteína de pequeño tamaño que carece de cofactores y que es necesaria para la actividad

enzimática (Qian *et al.*, 1997). Otro ejemplo de monooxigenasa multicomponente di(Fe) es la tolueno 4-monooxigenasa de *Pseudomonas mendocina* KR1 (Whited y Gibson, 1991). Esta enzima cataliza la conversión de tolueno en *p*-cresol y requiere de seis subunidades para su actividad. En este caso la holoenzima posee un componente hidroxilasa (heterotrímico) con un núcleo de dihierro, una subunidad ferredoxina de tipo Rieske, una proteína efectora y una NADH oxidoreductasa (Pikus *et al.*, 1996). La salicilato 5-hidroxilasa de *Ralstonia* sp. U2 es una monooxigenasa de 4 componentes que comparte la maquinaria de transferencia de electrones desde el NAD(P)H, es decir, la ferredoxina-reductasa y la ferredoxina, con una dioxigenasa de anillo, la naftaleno dioxigenasa (ver más abajo), estando el componente oxigenasa formado por dos subunidades (Zhou *et al.*, 2002).

**Tabla 1. Clasificación de las monooxigenasas de anillo aromático de compuestos derivados del benceno.**

Enzima	Organismo	Tamaño de subunidad, cofactor	Referencia
<b>Monooxigenasas monocomponente</b>			
<i>p</i> -hidroxibenzoato 3-hidroxilasa	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	45 kDa, FAD	Schreuder <i>et al.</i> , 1988
Fenol 2-hidroxilasa	<i>Pseudomonas</i> sp. EST1001	65 kDa, FAD	Nurk <i>et al.</i> , 1991
Fenilalanina hidroxilasa	<i>Pseudomonas</i> sp. (ATCC 11299a)	26 kDa, tetrahidropterina	Letendre <i>et al.</i> , 1975
Aminobenzoil-CoA monooxigenasa/reductasa	<i>Azoarcus evansii</i>	85 kDa, 2NADH	Schüle <i>et al.</i> , 2001
<b>Monooxigenasas de dos componentes</b>			
4-hidroxifenilacetato 3-hidroxilasa	<i>Escherichia coli</i> W	59 kDa, 19 kDa, FAD	Prieto y García, 1994
4-hidroxifenilacetato 3-hidroxilasa	<i>Pseudomonas putida</i>	30 kDa, 38 kDa, FAD	Arunachalam <i>et al.</i> , 1992
3-hidroxifenilacetato 6-hidroxilasa	<i>Pseudomonas putida</i> U	6 kDa, 63 kDa, FAD	Arias-Barrau <i>et al.</i> , 2005

### Monooxigenasas de más de dos componentes

Fenol 2-hidroxilasa	<i>Pseudomonas</i> sp. CF600	38 kDa, 10 kDa, 60 kDa, 13 kDa, 38 kDa, Fe(II)	Nordlund <i>et al.</i> , 1990
Tolueno 4-monooxigenasa	<i>Pseudomonas mendocina</i>	55 kDa, 38 kDa, 36 kDa, 12 kDa, 11 kDa, 9 kDa, Fe(II)	Pikus <i>et al.</i> , 1996
Salicilato 5-hidroxilasa	<i>Ralstonia</i> sp. U2	35 kDa, 12 kDa, 49 kDa, 19 kDa, Fe(II)	Zhou <i>et al.</i> , 2002

### 2.1.2. Dioxigenasas de anillo

Las dioxigenasas de anillo catalizan la reacción de incorporación de dos grupos hidroxilo en el anillo de benceno. En esta reacción, los dos átomos de la molécula de oxígeno son incorporados en el sustrato formando un compuesto *cis*-1,2-dihidroxiciclohexadieno que es transformado en un glicol de benceno espontáneamente o tras sufrir la acción de una dihidrodiol deshidrogenasa (Gibson, 1987) (Fig. 6). Las dioxigenasas de anillo son enzimas multicomponentes que poseen un componente con función oxigenasa, mientras que el resto de las subunidades participan en el transporte de electrones desde el NAD(P)H hasta el componente oxigenasa.

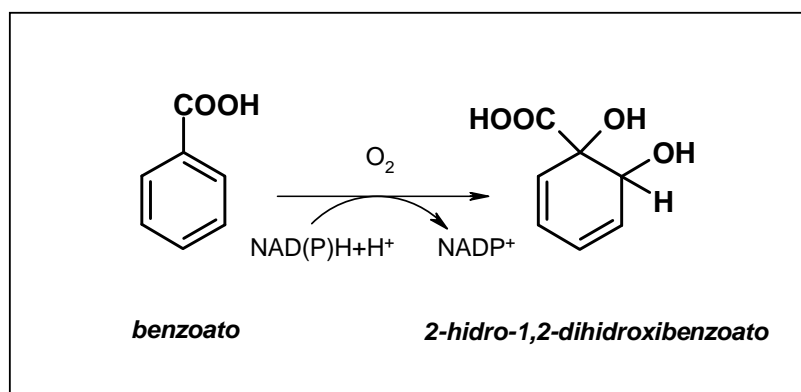


Fig. 6. Reacción catalizada por la benzoato 1,2-dioxigenasa.

Generalmente, los componentes oxigenasa son oligómeros de una o dos subunidades que adquieren siempre una conformación de tipo  $\alpha_n$  o  $(\alpha\beta)_n$ , y poseen dos elementos comunes a la subunidad  $\alpha$ : un centro [2Fe-2S] de tipo Rieske (Mason y Cammack, 1992), y un hierro mononuclear no hemo (Ensley y Gibson, 1983; Subramanian *et al.*, 1985; Yamaguchi y Fujisawa, 1982). Los aminoácidos responsables de la coordinación del centro Rieske se encuentran conservados en la región N-terminal de la subunidad  $\alpha$ , con una secuencia consenso C-X-H-(X)<sub>15-17</sub>-C-X-X-H. La unión del átomo de Fe(II) tiene lugar en una región de la parte central de la subunidad  $\alpha$ , y se encuentra coordinado a dos histidinas y dos tirosinas (Mason y Cammack, 1992).

El sistema de transporte de electrones está constituido por un componente que es una flavoproteína reductasa, que se puede encontrar o no acompañada de un componente ferredoxina (Butler y Mason, 1997). Las reductasas del complejo pueden contener flavinas en forma de FMN o de FAD, y se caracterizan por su capacidad de aceptar dos electrones en forma de hidruros provenientes del NADH, de manera que pasan a un estado semiquinona, y de dirigir la transferencia de los electrones al componente oxigenasa o a otra molécula de transferencia. El componente reductasa puede contener también centros [2Fe-2S] (Butler y Mason, 1997). Por otro lado, las ferredoxinas que participan en este proceso son aceptores de un electrón procedente de las reductasas, que posteriormente donarán al componente oxigenasa. Contienen grupos [2Fe-2S], que en ocasiones pueden ser de tipo Rieske (Butler y Mason, 1997).

Existen numerosas clasificaciones de las dioxigenasas de anillo en función de la naturaleza de los componentes que las forman (Batie *et al.*, 1991), del tipo de sustrato oxidado (tolueno/benceno, naftaleno, benzoato o ftalato), o bien de la filogenia de la subunidad  $\alpha$  del complejo enzimático (Gibson y Parales, 2001; Nam *et al.*, 2001). La Tabla 2 muestra diferentes ejemplos de dioxigenasas y la diversidad entre sus centros rédox.

**Tabla 2. Clasificación de las dioxigenasas de anillo multicomponentes de compuestos derivados del benceno** (Modificado de Batie *et al.*, 1991)

Clase	Componentes y Grupos Prostéticos		Enzima (organismo)	Referencia	
<b>IA</b>	<b>Reductasa</b>	<b>Oxigenasa</b>	Ftalato dioxigenasa	Batie <i>et al.</i> , 1987	
	FMN	Cys <sub>2</sub> His <sub>2</sub> [2Fe-2S]	( <i>Burkholderia cepacia</i> DB01)		
	Cys <sub>4</sub> [2Fe-2S]	Fe <sup>2+</sup>	Fenoxibenzoato dioxigenasa ( <i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i> POB310)	Dehmel <i>et al.</i> , 1995	
<b>IB</b>	<b>Reductasa</b>	<b>Oxigenasa</b>	Benzoato 1,2-dioxigenasa	Neidle <i>et al.</i> , 1991	
	FAD	Cys <sub>2</sub> His <sub>2</sub> [2Fe-2S]	( <i>Acinetobacter</i> sp. ADP1)		
	Cys <sub>4</sub> [2Fe-2S]	Fe <sup>2+</sup>	Toluato 1,2-dioxigenasa ( <i>Pseudomonas putida</i> )	Harayama <i>et al.</i> , 1986	
<b>IIA</b>	<b>Reductasa</b>	<b>Ferredoxina</b>	<b>Oxigenasa</b>	Dibenzofurano 4,4a-dioxigenasa	Bünz y Cook, 1993
	FAD	Cys <sub>4</sub> [2Fe-2S]	Cys <sub>2</sub> His <sub>2</sub> [2Fe-2S] Fe <sup>2+</sup>	( <i>Sphingomonas</i> sp. RW1)	
<b>IIB</b>	<b>Reductasa</b>	<b>Ferredoxina</b>	<b>Oxigenasa</b>	Tolueno dioxigenasa	Subramanian <i>et al.</i> , 1979
	FAD	Cys <sub>2</sub> His <sub>2</sub> [2Fe-2S]	Cys <sub>2</sub> His <sub>2</sub> [2Fe-2S] Fe <sup>2+</sup>	( <i>Pseudomonas putida</i> F1)	
			Benceno 1,2-dioxigenasa ( <i>Pseudomonas putida</i> ML2)	Irie <i>et al.</i> , 1987	
<b>III</b>	<b>Reductasa</b>	<b>Ferredoxina</b>	<b>Oxigenasa</b>	Carbazol 1,9a-dioxigenasa	Sato <i>et al.</i> , 1997
	FAD	Cys <sub>2</sub> His <sub>2</sub> [2Fe-2S]	Cys <sub>2</sub> His <sub>2</sub> [2Fe-2S] Fe <sup>2+</sup>	( <i>Pseudomonas</i> sp. CA10)	
	Cys <sub>4</sub> [2Fe-2S]		Naftaleno dioxigenasa ( <i>Pseudomonas putida</i> NCIB 9816)	Ensley y Haigler, 1990	
<b>IV</b>	<b>Reductasa</b>	<b>Oxigenasa</b>	Benzoil-CoA oxigenasa	Zaar <i>et al.</i> , 2004	
	FAD	2Fe <sup>2+</sup>			
	2[4Fe-4S]				

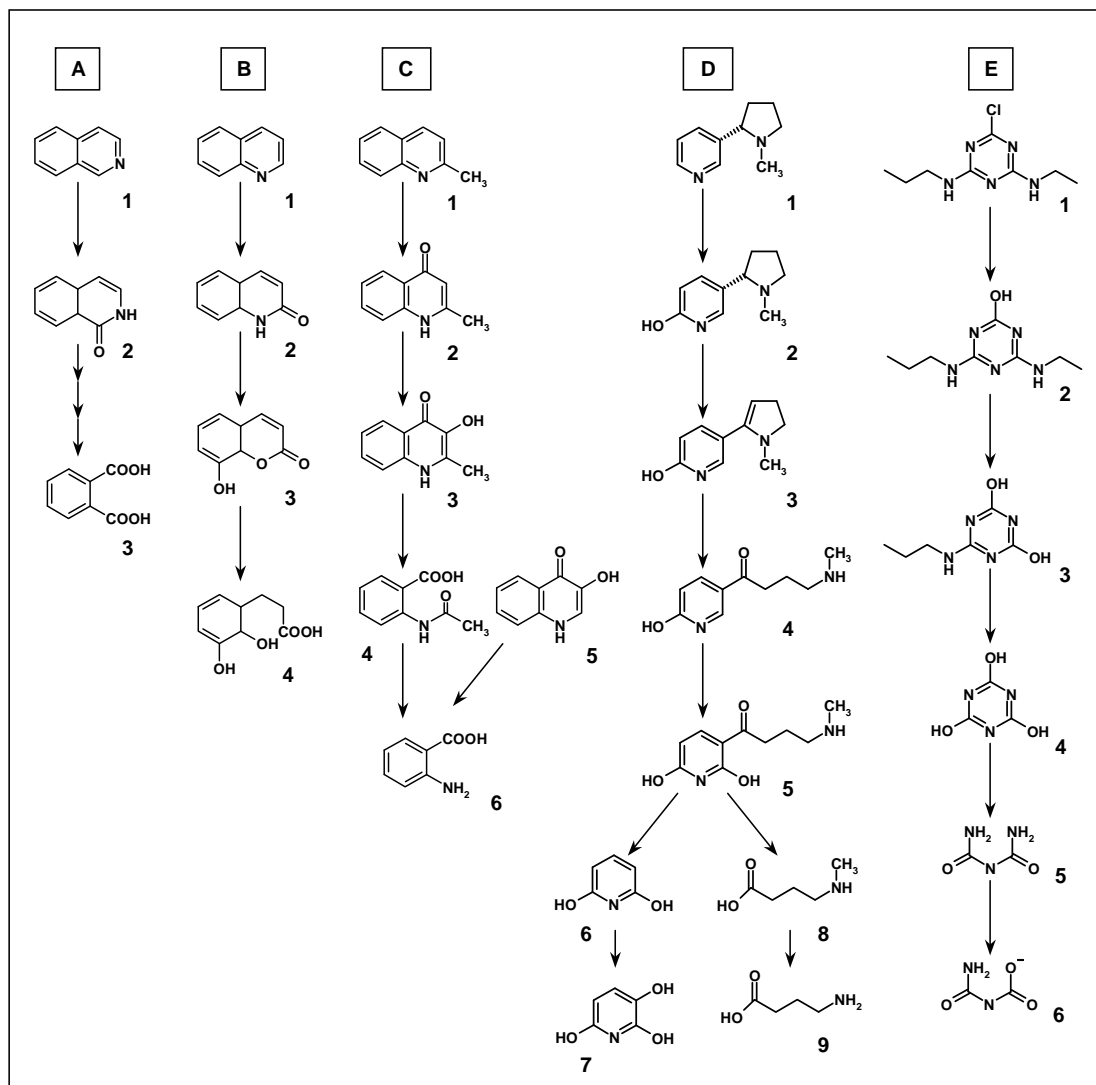
Recientemente se ha caracterizado una nueva clase de dioxigenasas de anillo (clase IV) que tiene como representante a la benzoil-CoA oxigenasa/reductasa (BoxAB) que hidroxila el benzoil-CoA con la formación de 2,3-dihidro-2,3-dihidroxibenzoil-CoA en la segunda etapa de la degradación aeróbica del benzoato en *A. Evansii* (Zaar *et al.*, 2004). BoxA es el componente reductasa, un homodímero que emplea NADPH como donador de electrones, y que los transfiere al FAD y a dos centros [4Fe-4S] que no han sido identificados previamente en el componente reductasa de otras dioxigenasas. BoxB es el componente oxigenasa, y se trata de un monómero que contiene dos repeticiones de motivos EXXH similares a los implicados en la coordinación de los centros de hierro binucleares de la subunidad  $\alpha$  de monooxigenasas solubles di(Fe) (Notomista *et al.* 2003; Leahy *et al.* 2003).



Además de las dioxigenasas de anillo multicomponentes mencionadas anteriormente, se han descrito también dioxigenasas monocomponentes que incorporan una molécula de oxígeno en un anillo aromático y que requieren Fe (II) como cofactor. Así, la 4-hidroxifenilpirúvico dioxigenasa transforma el 4-hidroxifenilpirúvico en homogentisato al mismo tiempo que libera una molécula de CO<sub>2</sub>, mostrando similitud estructural con extradiol dioxigenasas de tipo I (ver más adelante) (Serre *et al.*, 1999). Otras dioxigenasas monocomponentes son las dependientes de  $\alpha$ -cetoglutarato, como por ejemplo la 2,4-diclorofenoxiacético dioxigenasa de *Ralstonia eutropha* que cataliza la introducción de un grupo hidroxilo en el anillo del 2,4-diclorofenoxiacetato con la formación de 2,4-diclorofenol (Fukumori y Hausinger, 1993).

## **2.2. Rutas periféricas de hidroxilación de los derivados de la piridina**

El catabolismo de los compuestos aromáticos *N*-heterocíclicos es similar al de los derivados del benceno dado que se inicia con una serie de reacciones que conducen a la hidroxilación del anillo aromático. Si bien en la degradación del pirrol las oxigenasas que participan utilizan O<sub>2</sub> y son similares a algunas de las descritas para la degradación de anillos bencénicos, las oxigenasas que inician la hidroxilación del anillo aromático de los compuestos derivados de la piridina son distintas a las que se han discutido anteriormente. (Fetzner, 1998; Hille, 2005). Posteriores hidroxilaciones del anillo de la piridina pueden ser catalizadas por monooxigenasas similares a las descritas para los derivados del anillo bencénico.

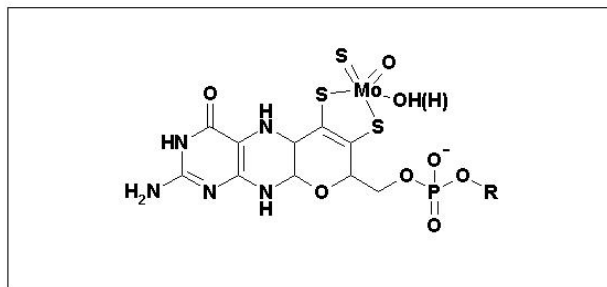


**Fig. 7. Ejemplos de rutas de degradación de N-heterociclos aromáticos.** **A.** Ruta de degradación propuesta para la isoquinolina en *Brevundimonas diminuta* 7 (Röger *et al.*, 1995). 1, isoquinolina; 2, 1(2H)isoquinolinona; 3, ácido ftálico. **B.** Ruta de degradación de la quinolina en *Pseudomonas* sp. (Shukla, 1986, 1989; Schwarz *et al.*, 1989). 1, quinolina; 2, 2(1H)quinolinona; 3, 8-hidroxicumarina; 4, ácido 2,3-dihidroxifenilpropiónico. **C.** Ruta de degradación de la quinaldina en *Arthrobacter ilicis* Rüb1a (Hund *et al.*, 1990; Bauer *et al.*, 1992) y de la 1H-4-oxoquinaldina en *Pseudomonas putida* 33/1 (Bauer *et al.*, 1996). 1, qinaldina; 2, 1H-4-oxoquinaldina; 3, 1H-3-hidroxi-4-oxoquinaldina; 4, ácido N-acetiltranilíco; 5, 1H-4-oxoquinolina; 6, ácido antranílico. **D.** Ruta de degradación de la nicotina en *Arthrobacter nicotinovorans* (Baitsch *et al.*, 2001; Brandsch, 2006). 1, L-nicotina; 2, 6-hidroxi-L-nicotina; 3, 6-hidroxi-N-metilmiosmina; 4, 6-hidroxipseudooxinicotina; 5, 2,6-dihidroxipseudooxinicotina; 6, 2,6-dihidroxipiridina; 7, 2,3,6-trihidroxipiridina; 8,  $\gamma$ -N-metilaminobutirato; 9,  $\gamma$ -aminobutirato. **E.** Ruta de degradación de la atracina en *Pseudomonas* sp. ADP (Mandelbaum *et al.*, 1995; Shapir *et al.*, 2002). 1, atracina; 2, hidroxiatracina; 3, N-isopropilammelida; 4, ácido cianúrico; 5, biuret; 6, alofanato.

La reacción inicial en la degradación bacteriana aeróbica de compuestos aromáticos N-heterocíclicos tales como la xantina, quinaldina, quinolina, isoquinolina, nicotinato,

picolinato y nicotina está catalizada por hidroxilasas dependientes de molibdeno de la familia de las xantina oxidasas que introducen un grupo hidroxilo ya sea en posición *orto*- o *para*- con respecto al *N*-heteroátomo (Hille, 1996; Fetzner, 1998). Estas enzimas actúan como auténticas hidroxilasas aunque, debido a un equilibrio de tautomerización, es frecuente encontrar que el producto de la reacción se encuentra en la forma ceto en lugar de la forma enol (Fig. 7). El oxígeno que se incorpora en el anillo de piridina no procede del oxígeno molecular (como ocurre con las oxigenasas de anillos bencénicos) sino de una molécula de agua, y los equivalentes de reducción necesarios se generan en el transcurso de la reacción. Otras enzimas que también pertenecen a la familia de las xantina oxidasas, como son algunas aldehído oxidoreductasas, emplean de igual forma una molécula de agua para oxidar el aldehído al correspondiente ácido carboxílico (Fetzner, 2000). En la mayor parte de las xantina oxidasas el mecanismo de transferencia de electrones desde el sustrato que se oxida (el *N*-heterociclo o el aldehído) hasta el sustrato que se reduce (el aceptor de electrones) se lleva a cabo a través del átomo de molibdeno, que se encuentra coordinado a un cofactor orgánico, a dos centros [2Fe-2S] (FeSI y FeSII) y a FAD, aunque también se han descrito enzimas de esta familia que no contienen el cofactor de flavina (Canne *et al.*, 1999; Fetzner y Lingens., 1993; Lehmann *et al.*, 1994; Romao *et al.*, 1995). El aceptor de electrones es distinto dependiendo de la enzima de la que se trate, y así se ha identificado  $\text{NAD}^+$  en las xantina deshidrogenasas, y oxígeno molecular en las xantina oxidasas o quinaldina oxidasa (Fetzner, 2000). Sin embargo, hay que resaltar que en algunas molibdeno hidroxilasas que participan en la degradación de compuestos aromáticos *N*-heterocíclicos el aceptor de electrones es distinto de los anteriores, aunque no se ha podido identificar su naturaleza (Fetzner, 2000). El centro activo de las xantina oxidasas está constituido por el ion molibdeno ligado a un cofactor orgánico de piranopterina (Fig. 8). La estructura del cofactor ha sido resuelta mediante el análisis por difracción de rayos X de la aldehído oxidoreductasa de *Desulfovibrio gigas* y la quinolina 2-oxidoreductasa de *P. putida* 86 (Bonin *et al.*, 2004), que poseen la particularidad de que el cofactor de piranopterina se encuentra unido a través de su grupo fosfato a un nucleótido de citosina (molibdopterina citosina dinucleótido, Mo-MCD) (Romao y Huber, 1998; Romao *et al.*, 1995, Schwarz, 2005) (Fig. 8). Generalmente, las hidroxilasas que intervienen en la hidroxilación inicial del anillo de la piridina son dependientes del cofactor Mo-MCD (Fetzner, 2000). La esfera de

coordinación del átomo de molibdeno incluye dos átomos de azufre del cofactor, un ligando oxo, un ligando azufre, y una molécula de agua o un ion hidroxilo (Fig. 8). La síntesis del cofactor de molibdeno a partir de GTP implica toda una serie de enzimas (Moa, Moe, Mog, Mob), así como la participación de chaperonas que intervienen en el ensamblaje del cofactor en el centro activo de la enzima (Schwarz, 2005).



**Fig. 8. Modelo de la estructura del cofactor de piranopterina (“molibdopterina”).** R=H (molibdopterina), en las xantina deshidrogenasas y xantina oxidasas eucariotas, así como en la mayor parte de las xantina deshidrogenasas procariotas (Hille, 1996). R=citidina monofosfato (“molibdopterina citosina dinucleótido”) en la xantina deshidrogenasa de *Veillonella atypica* (Gremer y Meyer, 1996), aldehído oxidorreductasa de *Desulfovibrio gigas* (Romao *et al.*, 1995), CO deshidrogenasas y enzimas que catalizan la hidroxilación de compuestos *N*-heteroaromáticos (Fetzner *et al.*, 1998; Hille, 1996, Fetzner, 2000).

Por el momento, sólo se conoce la estructura tridimensional de cinco proteínas de la familia de las xantina oxidasas, i.e., la aldehído oxidorreductasa de *Desulfovibrio gigas* (Romao *et al.*, 1995) y *Desulfovibrio desulfuricans* ATCC2774 (Rebelo *et al.*, 2000), la xantina oxidorreductasa de *Bos taurus* (Enroth *et al.*, 2000), la xantina deshidrogenasa de *Rhodobacter capsulatus* (Truglio *et al.*, 2002) y la CO deshidrogenasa de *Oligotropha carboxydovorans* (Dobbek, 1999). Las cinco poseen una organización modular en la que los dos centros [2Fe-2S] se encuentran en el dominio N-terminal de la proteína, a los que sigue el dominio de unión a FAD, excepto en el caso de la aldehído oxidorreductasa que no utiliza FAD, y por último, en el extremo C-terminal de la proteína se encuentra la región de anclaje del cofactor MCD (MPT en las xantina oxidasas/deshidrogenasas).

Las molibdeno hidroxilasas que participan en la degradación de compuestos *N*-heteroaromáticos poseen una especificidad de sustrato variable. Así, mientras que la xantina oxidasa de la leche de vaca cataliza la oxidación de un amplio número de heterociclos

aromáticos (Morpeh, 1983), y la quinaldina oxidasa de *Arthrobacter ilicis* R61a hidroxila a varios compuestos derivados de la quinolina y benzodiacina, la isoquinolina 1-oxidoreductasa de *Brevundimonas diminuta* 7 muestra una alta especificidad de sustrato (Stephan *et al.*, 1996). La capacidad de las molibdeno hidroxilasas de catalizar hidroxilaciones regioespecíficas les confiere un gran interés biotecnológico para la síntesis de compuestos *N*-heteroaromáticos sustituidos que se emplean como base para la biosíntesis de insecticidas y otros productos de interés farmacéutico (Yoshida y Nagasawa, 2000).

Mientras que las xantina oxidasas/xantina deshidrogenasas de eucariotas poseen generalmente una estructura homodimérica ( $\alpha_2$ ) en la que se identifican tres dominios implicados en la unión de los dos centros [2Fe-2S] (dominio N-terminal), del FAD (dominio central) y del cofactor de molibdeno (dominio C-terminal), las molibdeno hidroxilasas procariotas que participan en la degradación de compuestos *N*-heteroaromáticos difieren considerablemente en tamaño, composición de subunidades, e incluso en la composición de sus centros redox (Tabla 3) (Parschat *et al.*, 2001; Kretzer *et al.*, 1993; Schultz *et al.*, 2001). Los dominios de las xantina oxidasas eucariotas tienen su análogo funcional en las subunidades de las enzimas bacterianas de tres componentes. Las molibdeno hidroxilasas bacterianas de dos componentes están más alejadas evolutivamente de las molibdo enzimas eucariotas y de las procariotas de tres componentes (Lehmann *et al.*, 1995). Algunas molibdeno hidroxilasas de dos componentes, tales como la xantina deshidrogenasa y la 2-furoil-CoA deshidrogenasa de *P. putida* Fu1 contienen citocromo b, en lugar de FAD, en la subunidad pequeña (Koenig y Andreesen, 1990). Se ha descrito también la existencia de una nicotinato hidroxilasa de 4 componentes, dependiente de NADP y que contiene Mo y Se esenciales para la actividad catalítica, implicada en la degradación anaeróbica del ácido nicotínico en *Clostridium (Eubacterium) barkeri* (Gladyshev *et al.*, 1996).

Tras la hidroxilación inicial del anillo de la piridina, las hidroxilaciones subsecuentes hasta la apertura del anillo aromático pueden estar catalizadas por otras molibdeno hidroxilasas, como ocurre en la degradación del isonicotinato en *Mycobacterium* sp. INA1 (Kretzer *et al.*, 1993), o por oxigenasas similares a las que participan en las rutas periféricas de degradación de compuestos bencénicos. Así, se han descrito flavoprotein monooxigenasas monocomponentes tales como la 6-hidroxi-*L*-nicotina oxidasa (Brandsch, 2006) o monooxigenasas de dos componentes (Clase IB, ver Tabla 2) tales como la 2-oxo-1,2-

dihidroquinolina 8-monooxigenasa (OxoOR) que interviene en el segundo paso de la degradación de la quinolina en *P. putida* 86 (Martins *et al.*, 2005).

**Tabla 3. Ejemplos de hidroxilasas dependientes de molibdeno implicadas en el catabolismo de N-heterociclos.**

Enzima	Tamaño de las subunidades	Clusters Fe-S u otro Flavin cofactor	Tipo de cofactor de molibdeno-piranopterina	Organismo	Referencia
<b>Hidroxilasas monocomponente</b>					
Xantina deshidrogenasa (XDH)	67 kDa	Fe, S <sup>1</sup> , FAD	Mo <sup>1</sup>	<i>Streptomyces cyanogenus</i>	Ohe y Watanabe, 1979
Xantina oxidasa (XO)	147 kDa	[2Fe-2S]I <sup>2</sup> [2Fe-2S]II <sup>3</sup> FAD	Mo-MPT <sup>4</sup>	<i>Drosophila melanogaster</i>	Hughes <i>et al.</i> , 1992
<b>Hidroxilasas de dos componentes</b>					
Isoquinolina 1-oxidoreductasa (IorAB)	16 kDa, 84 kDa	[2Fe-2S]I [2Fe-2S]II	Mo-MCD <sup>5</sup>	<i>Brevundimonas diminuta</i> 7	Lehmann <i>et al.</i> , 1995
Xantina deshidrogenasa (XdhAB)	91 kDa 46 kDa	[2Fe-2S]I [2Fe-2S]II FAD	Mo-MPT	<i>Pseudomonas putida</i> 86	Parschat <i>et al.</i> , 2001
Xantina deshidrogenasa (XdhAB)	83 kDa 49 kDa	[2Fe-2S]I [2Fe-2S]II FAD	Mo-MPT	<i>Rhodococcus capsulatus</i> B10S	Leimkhüler <i>et al.</i> , 1998
Ácido quináldico deshidrogenasa	80 kDa 19 kDa	Fe, S	Mo-MPT	<i>Serratia marcescens</i> 2CC-1	Fetzner y Lingens, 1993
<b>Hidroxilasas de tres componentes</b>					
Quinolina 2-oxidoreductasa (QorMSL)	31 kDa, 18 kDa, 85 kDa	[2Fe-2S]I [2Fe-2S]II FAD	Mo-MCD	<i>Pseudomonas putida</i> 86	Bläse <i>et al.</i> , 1996
Nicotina deshidrogenasa (NdhABC)	30 kDa, 15 kDa, 88 kDa	[2Fe-2S]I [2Fe-2S]II FAD	Mo-MCD	<i>Arthrobacter nicotinovorans</i>	Grether-Beck <i>et al.</i> , 1994
6-hidroxipseudooxicotina deshidrogenasa (KdhABC) <sup>6</sup>	31 kDa, 18 kDa, 86 kDa	[2Fe-2S]I [2Fe-2S]II FAD	Mo-MD <sup>7</sup>	<i>Arthrobacter nicotinovorans</i>	Baitsch <i>et al.</i> , 2001
Quinaldina 4-oxidasa (QoxLMS)	84 kDa, 31 kDa, 19 kDa	[2Fe-2S]I [2Fe-2S]II FAD	Mo-MCD	<i>Arthrobacter ilicis</i> R61a	Parschat <i>et al.</i> , 2003

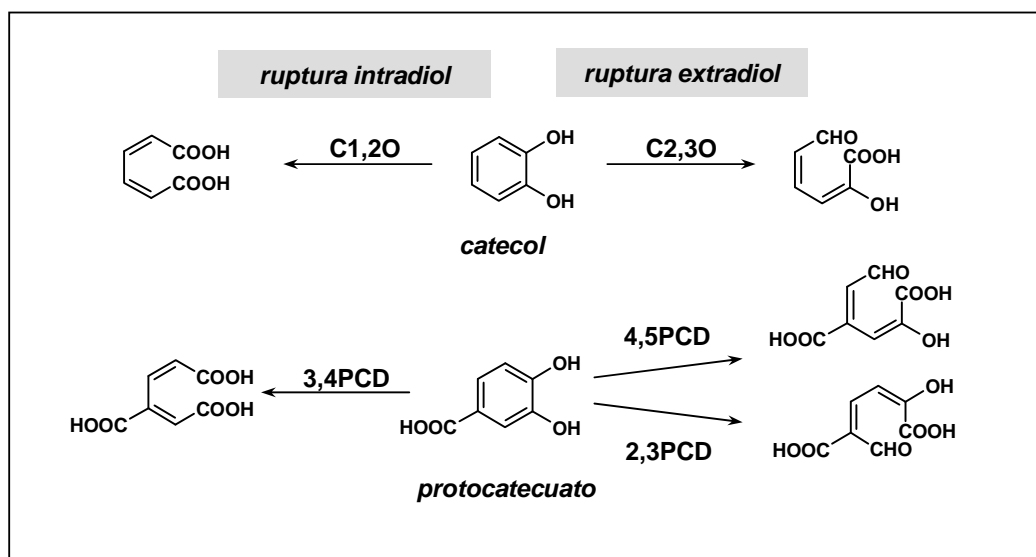
**Tabla 3 (continuación). Ejemplos de hidroxilasas dependientes de molibdeno implicadas en el catabolismo de *N*-heterociclos en bacterias.**

Enzima	Tamaño de subunidades	Clusters Fe-S Flavina u otro cofactor	Tipo de cofactor de molibdeno-piranopterina	Organismo	Referencia
Xantina deshidrogenasa (PucCDE)	30 kDa, 80 kDa, 19 kDa	[2Fe-2S]I [2Fe-2S]II FAD	Mo-MPT	<i>Bacillus subtilis</i>	Schultz <i>et al.</i> , 2001
<b>Hidroxilasas de tres componentes</b>					
Nicotinato deshidrogenasa	85 kDa, 34 kDa, 20 kDa	Fe, S, FAD	Mo-MCD	<i>Bacillus niacini</i>	Nagel y Andreesen, 1990
6-hidroxinicotinato deshidrogenasa	85 kDa, 34 kDa, 15 kDa	n.d <sup>8</sup>	Mo-MCD	<i>Bacillus niacini</i>	Nagel y Andreesen, 1990
Quinolina deshidrogenasa	82 kDa, 32 kDa, 18 kDa	Fe, S, FAD	Mo-MCD	<i>Rhodococcus</i> sp. B1	Peschke y Lingens, 1991
Quinolina 4-carboxilato deshidrogenasa	85 kDa, 35 kDa, 21 kDa	Fe, S, FAD	Mo-MCD	<i>Agrobacterium</i> sp. 1B	Bauer y Lingens, 1992
Isonicotinato deshidrogenasa	83 kDa, 31 kDa, 19 kDa	Fe, S, FAD	Mo-MCD	<i>Mycobacterium</i> sp. INA1	Kretzer <i>et al.</i> , 1993
2-hidroxiisonicotinato deshidrogenasa	97 kDa, 31 kDa, 17 kDa	Fe, S, FAD	Mo-MCD	<i>Mycobacterium</i> sp. INA1	Schrader <i>et al.</i> , 1998
6-metilnicotinato deshidrogenasa	75 kDa, 30 kDa, 16 kDa	Fe, Zn, S, FAD	Mo-MCD	<i>Ralstonia/Burkholderia</i> DSM 6920	Schrader <i>et al.</i> , 2002

### **2.3 Ruptura de los anillos aromáticos**

Una vez activado el anillo aromático, la siguiente etapa en las rutas de degradación aeróbicas 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 eliminan 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. 9).



**Fig. 9. Ejemplos de reacciones catalizadas por dioxigenasas de ruptura.** Se muestran los productos de reacción intra- o extradiol para dioxigenasas que tienen los mismos sustratos. Las dioxigenasas 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 poseen estructuras completamente diferentes y también son distintos sus mecanismos de reacción. Los sustratos descritos para las intradiol dioxigenasas son el catecol, el protocatecuato y el 2-hidroxiquinol, y todos ellos poseen dos grupos hidroxilo contiguos (Fig. 4). 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) (Fig. 4). 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 y extradiol dioxigenasas no comparten similitud de secuencia o de estructura, lo que indica que pertenecen a familias de proteínas con un origen evolutivo diferente. 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 tres familias distintas (Tabla 4). 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  $\beta$  y una hélice  $\alpha$ , que sirve de puente entre la primera y la segunda lámina  $\beta$ . 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 protocatecuato 4,5-dioxigenasa de *Sphingomonas paucimobilis* SYK-6 presenta dos subunidades no relacionadas entre sí (Sugimoto *et al.*, 1999) (Tabla 4). 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 4). Algunos ejemplos de proteínas que pertenecen a este grupo son la gentisato dioxigenasa de *P. testosteroni* (Harpel y Lipscomb, 1990), 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  $\beta$  antiparalelas que forman un barril  $\beta$ . 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).

A pesar de la diversidad filogenética de las extradiol dioxigenasas, todas ellas contienen un motivo estructural de dos histidinas y un grupo carboxilato (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. El centro activo de las enzimas contiene un ion Fe(II) ligado a las dos histidinas y al grupo carboxilato. Estos residuos 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 (Vaillancourt *et al.*, 2004).

Aunque la mayoría de las rutas de degradación de compuestos *N*-heteroaromáticos derivados de la piridina conducen a un compuesto central hidroxilado que sufre ruptura dioxigenolítica del anillo aromático, también se han descrito rutas aeróbicas que implican reacciones de reducción y formación de compuestos cíclicos no aromáticos que sufren la apertura del ciclo mediante amidohidrolasas como ocurre en la degradación del ácido isonicotínico por *Mycobacterium* sp. INA1 (Kretzer *et al.*, 1993). La 2,5-dihidroxipiridina es un intermediario central en la degradación de varios compuestos derivados de la piridina tales como el ácido nicotínico, ácido picolínico, nicotina, 2-hidroxipiridina y 3-hidroxipiridina (Kaiser *et al.*, 1996; Fetzner, 1998; Fetzner, 2002; Brandsch, 2006) (Fig. 10). La 2,5-dihidroxipiridina sufre la acción de una dioxigenasa de ruptura entre los carbonos 5 y 6 que ha sido caracterizada en *P. putida* N-9. Se trata de una enzima que emplea una molécula de oxígeno en la catálisis y requiere Fe(II) para su actividad, por lo que se trata de una extradiol dioxigenasa, aunque no existen datos acerca de su estructura primaria y

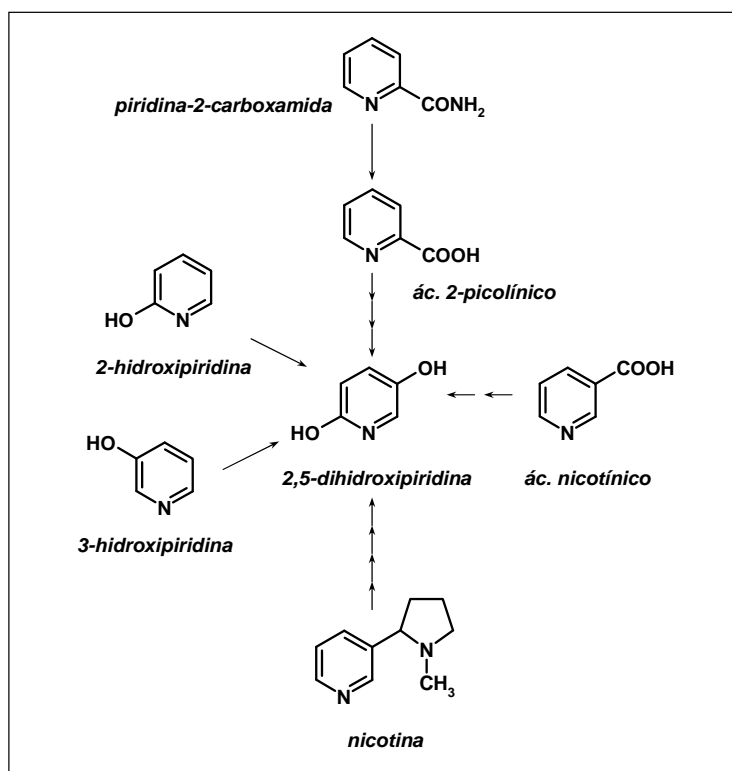
terciaria (Behrman y Stanier, 1957; Gauthier y Rittenberg, 1971a). La 2,5-dihidroxipiridina dioxigenasa de *P. putida* KT2440 ha sido objeto de estudio en esta tesis y distintos aspectos de su bioquímica y estructura serán abordados con detalle en la Discusión.

**Tabla. 4. Clasificación de las dioxigenasas de ruptura de anillos aromáticos.** (Adaptado de Vaillancourt *et al.*, 2004)

Tipo	Ejemplos	Organismo	Subunidades	Referencia
<b>Intradiol</b>	Protocatecuato-3,4-dioxigenasa	<i>Pseudomonas putida</i> B10	$(\alpha\beta)_{12}$	Ohlendorf <i>et al.</i> , 1998
	Catecol-1,2-dioxigenasa	<i>Acinetobacter</i> sp. ADP1	$\alpha_2$	Vetting y Ohlendorf, 2000
<b>Extradiol</b>				
<b>I</b>	2,3-Dihidroxibifenil 1,2-dioxigenasa	<i>Burkholderia</i> sp. LB400	$\alpha_8$	Han <i>et al.</i> , 1995
	Catecol-2,3-dioxigenasa	<i>Pseudomonas putida</i> mt-2	$\alpha_4$	Kita <i>et al.</i> , 1999
	Homoprotocatecuato 2,3-dioxigenasa	<i>Brevibacterium fuscum</i>	$\alpha_8$	Wang y Lipscomb, 1997
<b>II</b>	2,3-Dihidroxifenilpropionato 1,2-dioxigenasa	<i>Escherichia coli</i>	$\alpha_4$	Bugg, 1993
	Protocatecuato 4,5-dioxigenasa	<i>Sphingomonas paucimobilis</i> SYK-6	$\alpha_2\beta_2$	Sugimoto <i>et al.</i> , 1999
	2-Aminofenol 1,6-dioxigenasa	<i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i> JS45	$\alpha_2\beta_2$	Davis <i>et al.</i> , 1999
<b>III (Cupinas)</b>	Gentisato dioxigenasa	<i>Pseudomonas testosteroni</i>	$\alpha_4$	Harpel y Lipscomb, 1990
	1-Hidroxi-2-naftoato dioxigenasa	<i>Nocardioides</i> sp. KP7	$\alpha_6$	Iwabuchi y Harayama, 1998

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* R61a 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, 2002). En la degradación del flavonol quercetina también se ha

identificado una 2,4-dioxigenasa (quercetinasasa). Las 2,4-dioxigenasas catalizan la inserción de O<sub>2</sub> 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  $\alpha/\beta$  hidrolasas (Fetzner, 2002). Estas dioxigenasas han adaptado el centro activo de las  $\alpha/\beta$  hidrolasas (tríada catalítica) para realizar la reacción dioxigenolítica (Frerichs-Deeken y Fetzner, 2005; Frerichs-Deeken *et al.*, 2004). La apertura del anillo de piridina en la quinolina y sus derivados genera finalmente un compuesto aromático, como es el caso del antranilato, ftalato, y 2,3-dihidroxifenilpropionato (Fig. 7), que sufre el ataque de dioxigenasas de ruptura de anillos bencénicos (Kaiser *et al.*, 1996; Fetzner *et al.*, 1998).



**Fig. 10.** Ejemplos de rutas periféricas que convergen en el intermediario central 2,5-dihidroxi-piridina. Las rutas han sido descritas en los siguientes microorganismos: piridina-2-carboxamida y ácido 2-picolínico en *Bacillus* sp. (Shukla y Kaul, 1973); 2-hidroxi-piridina en *Nocardia* sp. (Shukla y Kaul, 1986); 3-hidroxi-piridina en *Achromobacter* spp. (Houghton y Cain, 1972); ácido nicotínico en *P. putida* N9 (Behrman y Stanier, 1957); nicotina en *Pseudomonas* sp. P-34, y JTS-006 (Gerhna y Rittenberg, 1962; Maeda *et al.*, 1978).

Finalmente, en la degradación de la vitamina B<sub>6</sub> (piridoxina) por *Pseudomonas* sp. MA-1 se genera ácido 2-metil-3-hidroxi piridina-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.*, 1997; 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).

#### **2.4 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<sup>2+</sup> 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 (apartado 2.1.2.) sufre la introducción de O<sub>2</sub> 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  $\beta$ -ceto adipil-CoA, un intermediario de la ruta aeróbica central clásica del  $\beta$ -ceto adipato (Gescher *et al.*, 2006). La degradación de benzoato a través de una ruta aeróbica híbrida también se ha descrito en otras bacterias tales como *Bacillus stearothermophilus* (Zaar *et al.*, 2001), *Burkholderia xenovorans* LB400 (Denef *et al.*, 2004), Otra ruta aeróbica híbrida que se ha caracterizado parcialmente es la involucrada en la degradación del ácido fenilacético en *P. putida* U (Olivera *et al.*, 1998; Luengo *et al.*, 2001), *Pseudomonas* sp. Y2 (Velasco *et al.*, 1998; Alonso *et al.*, 2003; Bartolomé-Martín *et al.*, 2004), *A. evansii* (Mohamed *et al.*, 2001; Mohamed *et al.*, 2002; Rost *et al.*, 2002), *E. coli* (Ferrández *et al.*, 1998; Díaz *et al.*, 2001; Ismail *et al.*, 2003) y *Rhodococcus* sp. RHA1 (Navarro-Llorens *et al.*, 2005). 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 (apartado 2.1.1) como enzima clave para la pérdida de aromaticidad (Schühle *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). La degradación de compuestos fenilpropenoides tales como el ferulato, cumarato, o cafeato en distintas cepas de *Pseudomonas* también se inicia con la formación de derivados de CoA que finalmente generan protocatecuato (Venturi *et al.*, 1998; Gasson *et al.*, 1998). Algunos compuestos aromáticos sufren dehalogenación mediante la formación previa de un éster de CoA, que posteriormente sufre una reacción de sustitución electrófila en la que el grupo halógeno es reemplazado por un hidroxilo (Dunaway-Mariano y Babbit, 1994), como ocurre en la degradación del 4-clorobenzoato por *Pseudomonas* sp. CBS3 (Scholten *et al.*, 1991).

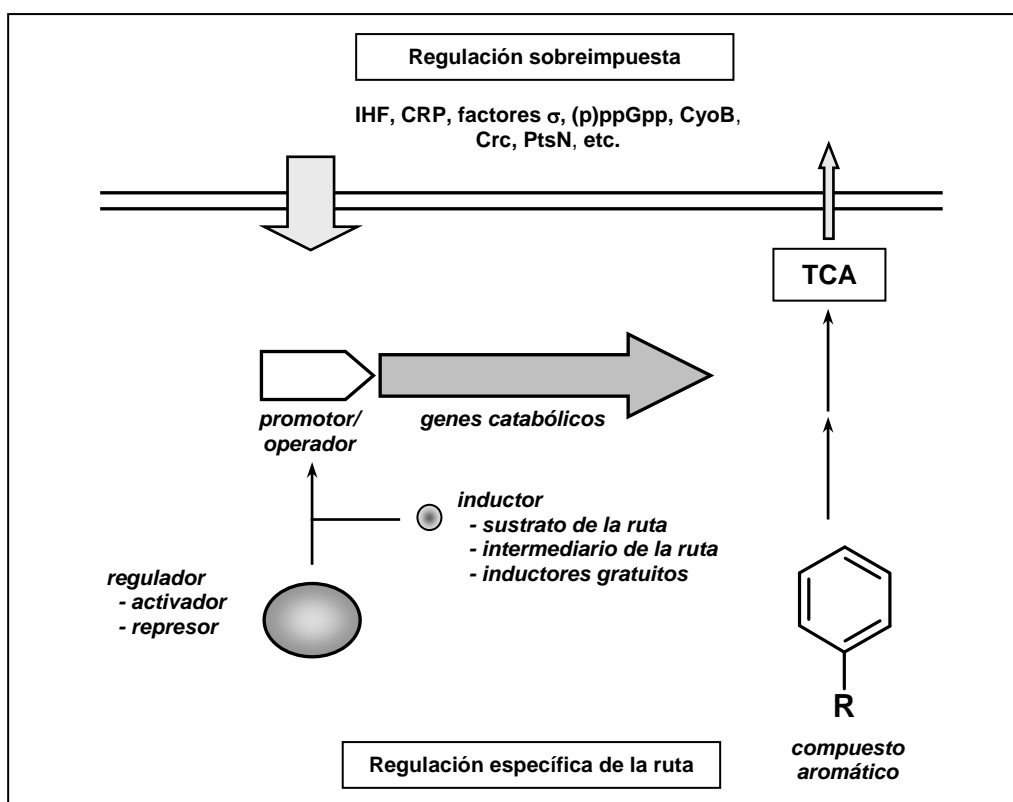
También se han descrito rutas híbridas en el metabolismo de compuestos aromáticos heterocíclicos. Por ejemplo, en la degradación del ácido isonicotínico en *Mycobacterium* sp. INA1, después de dos hidroxilaciones consecutivas del anillo de piridina se requiere la formación de un derivado de CoA (citracil-CoA) que sufre una reducción dependiente de NADPH generando un compuesto no aromático (Kretzer *et al.*, 1993). La degradación aeróbica de los ácidos 2-furano y 2-tiofeno carboxilato en algunas bacterias también implica la formación de derivados de CoA que son posteriormente hidroxilados y presuntamente hidrolizados por una amidohidrolasa (Koenig y Andreesen, 1990; Cripps, 1973).

## **2.5. 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 (Díaz y Prieto, 2000; Rojo, 2001; Tropel y van der Meer, 2004; Cases y de Lorenzo, 2005a y b) (Fig. 11). 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; Marqués *et al.*, 2006). Por último, las rutas catabólicas también se regulan a nivel post-traduccional 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 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 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 2005a y b). 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; Cases y de Lorenzo, 2005a y b).



**Fig. 11. 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 sobrepuesta, 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 (codifica la proteína IIA<sup>Ntr</sup> del sistema fosfoenol piruvato:azúcar fosfotransferasa), etc.

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 (Cases y de Lorenzo, 2005a). 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).

En *Pseudomonas*, la presencia de un ácido orgánico como el lactato, o de un intermediario del ciclo de Krebs, como el citrato o el succinato, es capaz de reprimir la expresión de las rutas catabólicas de distintos compuestos aromáticos tales como la del benceno, estireno, anilina, protocatecuato, fenol o tolueno, a través de un mecanismo que no depende de cAMP (Santos *et al.*, 2000; Suh *et al.*, 2002; Aranda-Olmedo *et al.*, 2005). De hecho, aunque existen análogos de CRP en los genomas de las bacterias del género *Pseudomonas*, esta proteína no parece participar en los procesos de represión catabólica en estas bacterias, y otras redes reguladoras implicadas en el control sobreimpuesto de las rutas de degradación de compuestos aromáticos han sido identificadas (Suh *et al.*, 2002; Aranda-Olmedo *et al.*, 2005; Rojo y Dinamarca, 2004). Así, la proteína Crc forma parte de una cascada de control en respuesta a señales nutricionales y reprime la expresión de rutas de catabolismo de compuestos aromáticos cuando *Pseudomonas* crece en medio rico (Ruiz-Manzano *et al.*, 2005). El mecanismo mediante el que Crc ejerce la represión catabólica es desconocido, pero existen evidencias de que participa en un control post-transcripcional, probablemente interfiriendo en la expresión del mRNA (Hester *et al.*, 2000). Se ha sugerido que Crc actúa también en conexión con el control que ejerce PtsN (IIA<sup>Ntr</sup>), un regulador global que podría coordinar el metabolismo del carbono y nitrógeno en *Pseudomonas* (Marqués *et al.*, 2006). El producto del gen *cyoB*, que codifica la citocromo *o* oxidasa, establece una conexión entre la cadena de transporte de electrones y la represión catabólica de rutas de degradación en *Pseudomonas*, lo que indica que el estado redox de la célula también puede modular la asimilación de ciertas fuentes de carbono (Petruschka *et al.*, 2001; Rojo y Dinamarca, 2004). Finalmente, en ciertas cepas de *Pseudomonas* la alarmona (p)ppGpp también juega un papel esencial en el control de rutas de catabolismo de compuestos aromáticos cuya expresión es dependiente de promotores  $\sigma^{54}$ . La molécula de

(p)ppGpp reduce la estabilidad de la interacción entre la RNA polimerasa y los promotores  $\sigma^{70}$ , de forma que se favorece la interacción con  $\sigma^{54}$  (Marqués *et al.*, 2006, Shingler, 2003).

Dado que los compuestos aromáticos *N*-heterocíclicos constituyen una fuente de nitrógeno para la célula, las rutas de catabolismo de dichos compuestos también estarán sujetas al control general del metabolismo del nitrógeno en la célula. Dicho control activa la expresión de genes implicados en la asimilación de fuentes alternativas de nitrógeno cuando se reduce la disponibilidad de éste en el medio. El control del metabolismo del nitrógeno se ha estudiado en detalle en enterobacterias e implica, entre otros, al sistema de dos componentes NtrB (histidín-quinasa sensora) y NtrC (regulador transcripcional de promotores dependientes del factor  $\sigma^{54}$ ) que responde a los niveles de nitrógeno en la célula (Merrick y Edwards, 1995). En *Pseudomonas* se ha descrito la participación de los genes *rpoN* (codifica el factor  $\sigma^{54}$ ) y *ntrC* en el control de la expresión de genes implicados en el metabolismo de compuestos aromáticos *N*-heterocíclicos tales como las triazinas (García-González *et al.*, 2005).

### **3 Degradación bacteriana del ácido nicotínico (NA)**

El ácido nicotínico o niacina (NA) es un derivado carboxílico de la piridina (3-carboxipiridina) (Fig. 2), que se encuentra ampliamente distribuido en la naturaleza ya que forma parte de los cofactores de piridina (NAD, NADP, NMN) y constituye un factor esencial (vitamina B3) para el crecimiento de aquellos organismos incapaces de sintetizarlo. En mamíferos, una falta de vitamina B3 ocasiona enfermedades tales como la pelagra. Las plantas son la fuente principal de NA y éste se libera al medio bien en forma libre o formando parte de estructuras más complejas como los alcaloides nicotina y anabasina (Fig. 2) que se han usado como pesticidas naturales durante muchos años (Kaiser *et al.*, 1996). El NA sirve también como fuente de carbono y nitrógeno para ciertos microorganismos y constituye el derivado de la piridina cuya degradación se ha investigado en un mayor número de bacterias (Kaiser *et al.*, 1996; Fetzner, 1998) e incluso en algunos hongos como *Emericella nidulans* (Amrani *et al.*, 1999). El estudio de la degradación de NA tiene gran interés no sólo porque constituye un sistema modelo para caracterizar las rutas de catabolismo de compuestos aromáticos *N*-heterocíclicos sino también por el indudable

interés biotecnológico asociado a dicho catabolismo. Así, en el catabolismo bacteriano del NA se forman compuestos sustituidos de manera específica y regioselectiva que difícilmente pueden obtenerse mediante síntesis química y que son de alto valor añadido para la industria farmacéutica y agroquímica (Kulla, 1991; Schmid *et al.*, 2001). Entre estos compuestos destaca el ácido 6-hidroxicotínico que se utiliza como molécula base para la síntesis química de insecticidas nicotinoides tales como el imidachloprid (Hurh *et al.*, 1994a). El NA también forma parte de herbicidas de nueva síntesis tales como el imazapyr (Xuedong *et al.*, 2005). Otro intermediario que se origina en la degradación del NA es la 2,5-dihidroxipiridina, un precursor en la síntesis química del ácido aminolevulínico que se utiliza para la obtención de tetrapirroles universales tales como el grupo hemo y la clorofila (Yoshida y Nagasawa, 2000). La primera enzima que interviene en las rutas de degradación de NA es una molibdeno hidroxilasa que, en algunas bacterias, es capaz de hidroxilar derivados de la pirazina para producir moléculas tales como el ácido 5-hidroxipirazina-2-carboxílico cuyos ésteres son importantes agentes anti-tuberculosis (Yoshida y Nagasawa, 2000). Algunas bacterias que degradan derivados del NA, tales como el ácido 6-metilnicotínico, también contienen enzimas que modifican el NA generando moléculas de gran interés biotecnológico como es el caso del ácido 2-hidroxicotínico que se emplea como molécula base para la síntesis de varios compuestos de interés farmacéutico y agroquímico (Tinschert *et al.*, 2000).

Se han descrito tres rutas aeróbicas diferentes para la degradación de NA en bacterias dependiendo de los organismos estudiados, si bien en los tres casos la etapa inicial consiste en una hidroxilación del anillo de la piridina en posición 6 con la formación del ácido 6-hidroxicotínico (6HNA) como primer intermediario (Fig. 12) (Kaiser *et al.*, 1996; Fetzner, 1998). Se han identificado cepas de *P. fluorescens* (Hurh *et al.*, 1994a; Hunt, 1959), *P. putida* (Berhman y Stanier, 1957; Jones y Hughes, 1972; Thacker *et al.*, 1978), *Micrococcus* (anteriormente *Sarcina*) sp. (Gupta and Shukla, 1978), *Bacillus niacini* (Hirschberg y Ensing, 1972), y *Achromobacter xylosoxidans* (Kulla, 1991) que degradan el 6HNA siguiendo la ruta del maleamato (Fig. 12). La bioquímica de dicha ruta se ha estudiado en algunas cepas de *Pseudomonas* y se inicia, como se ha indicado anteriormente, con la hidroxilación del NA a 6HNA y la posterior descarboxilación oxidativa de éste a 2,5-dihidroxipiridina (2,5-DHP) mediada por una flavín monooxigenasa dependiente de NADH (Berhman y Stanier, 1957;

Nakano et al. 1999). La 2,5-DHP es un intermediario central de varias rutas catabólicas de *N*-heterociclos (ver Fig.10) que sufre una rotura dioxigenolítica del anillo aromático entre los carbonos 5 y 6 originando los ácidos maleámico y fórmico (Berhman y Stanier, 1957; Berhman, 1976; Gauthier y Rittenberg, 1971a). Finalmente, el ácido maleámico sufre una desaminación hidrolítica a ácido maleico que se isomeriza a ácido fumárico, un intermediario del ciclo de Krebs (Berhman y Stanier, 1957). El balance global es la conversión de NA en ácidos fumárico y fórmico, y la liberación de amonio como fuente de nitrógeno (Fig. 12A). En la ruta caracterizada en *Bacillus niacini*, el 6HNA sufre una segunda hidroxilación mediada por una 6HNA molibdeno hidroxilasa que lo transforma en ácido 2,6-dihidroxinicotínico (Nagel y Andreesen, 1990). La posterior degradación del ácido 2,6-dihidroxinicotínico hasta maleamato todavía no se ha caracterizado (Fetzner, 1998; Ensign y Rittenberg, 1964; Hirschberg y Ensign, 1971; Nagel y Andreesen, 1991) (Fig. 12B). Una ruta completamente diferente a las anteriores es la que se ha caracterizado en *Azorhizobium caulinodans* (Kitts et al., 1992), donde el 6HNA formado por hidroxilación del NA es posteriormente reducido a 6-oxo-1,4,5,6-tetrahidronicotinato, que sufre una ruptura hidrolítica (Fig. 12C). Esta ruta implica la formación de ácido glutárico, en lugar de ácido fumárico, que finalmente genera acetyl-CoA.

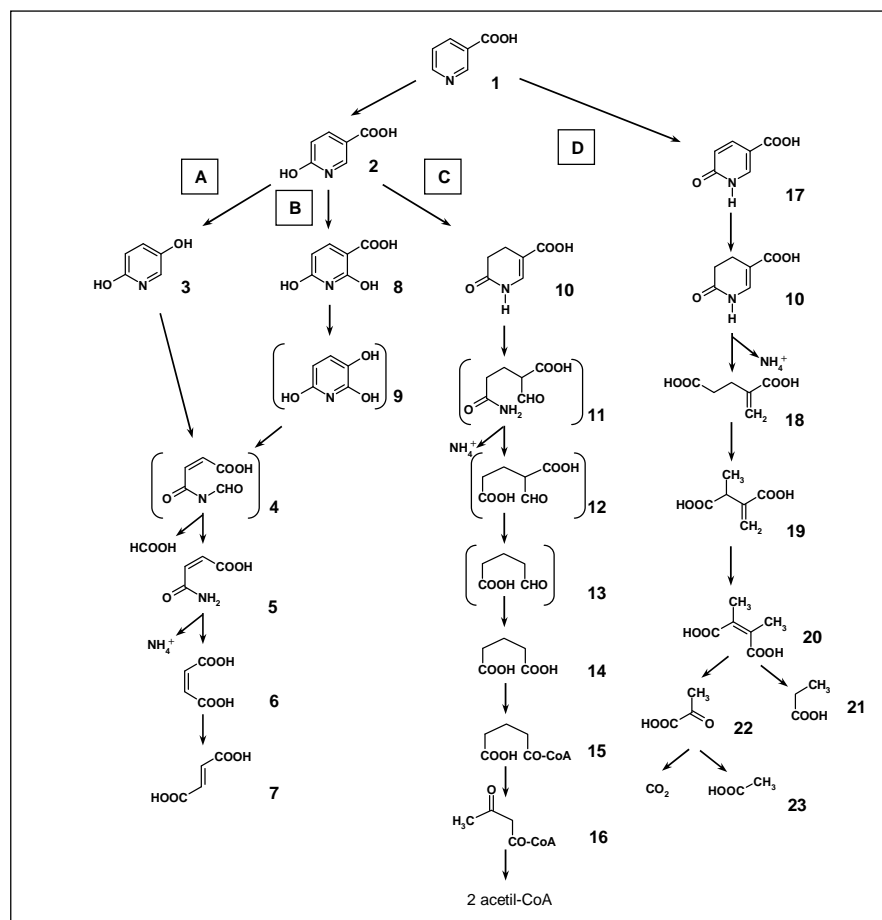
El NA también puede ser mineralizado anaeróbicamente en ciertas bacterias como ocurre en *Eubacterium* (anteriormente *Clostridium*) *barkeri*. Al igual que ocurre en las rutas aeróbicas, la degradación anaeróbica de NA comienza con su hidroxilación a 6HNA con la participación de una molibdeno hidroxilasa (Gladyshev et al., 1996). La posterior degradación de 6HNA requiere una etapa reductiva similar a la descrita en la ruta aeróbica de *A. caulinodans* con la formación de 6-oxo-1,4,5,6-tetrahidronicotinato, el cual se metaboliza a los ácidos pirúvico y propiónico (Kaiser et al., 1996, Fetzner, 1998) (Fig. 12D). También se ha descrito la degradación anaeróbica de NA por bacterias reductoras de azufre, como ocurre con *Desulfococcus niacini*, según una ruta que parece diferir de la descrita para *E. barkeri* (Kaiser et al., 1996; Fetzner, 1998).

Resulta curioso que todas las rutas de degradación de NA caracterizadas hasta la fecha implican una etapa inicial similar que consiste en la hidroxilación del anillo aromático por una NA hidroxilasa con la formación de 6HNA (Fig. 12). Todas las NA hidroxilasas caracterizadas son enzimas dependientes de molibdeno que incorporan en el sustrato

aromático un grupo hidroxilo procedente del agua (ver apartado 2.2). Aunque no se conoce todavía la estructura primaria de ninguna NA hidroxilasa bacteriana, la caracterización bioquímica de estas enzimas procedentes de diferentes bacterias revela diferencias significativas entre ellas (Hurh *et al.*, 1994b; Jones y Hughes, 1972; Kitts *et al.*, 1989; Nagel y Andreesen, 1990; Gladyshev *et al.*, 1996).

Por lo que respecta a la regulación de la degradación de NA, se sabe que en *B. niacini* las dos primeras actividades enzimáticas (NA y 6HNA hidroxilasa) se inducen coordinadamente en presencia de 6HNA. Además, se ha observado represión por catabolito mediada por glucosa cuando no hay limitación de nitrógeno en el medio. Sin embargo, cuando el NA es la única fuente de nitrógeno para la bacteria, la glucosa no ejerce represión catabólica de la ruta de degradación de NA y permite que la bacteria adquiera el nitrógeno que necesita para crecer a partir del amonio que se genera en la degradación del NA (Fig. 12) (Hirschberg y Ensign, 1972). En *P. putida* también se ha descrito que las actividades enzimáticas implicadas en el catabolismo del NA son inducibles cuando las células se cultivan en presencia de este compuesto (Berhman y Stanier, 1957). En *A. caulinodans*, un organismo para el que el NA es tanto una vitamina esencial (no puede sintetizar NA) como una fuente de nitrógeno y carbono, la degradación de NA se ha postulado que está controlada por el sistema de dos componentes NtrB/NtrC (Buckmiller *et al.*, 1991). En *E. nidulans* la actividad NA hidroxilasa se induce en presencia de NA y 6HNA, siendo posiblemente este último el efector real (Sealy-Lewis *et al.*, 1979). El sistema regulador de la expresión del gen *hxnS* consiste en un activador (HxnR) y un represor (AplA) codificados por dos genes ligados (Amrani *et al.*, 1999).

A pesar de que la degradación de NA se considera como un sistema modelo para el estudio de las rutas catabólicas de compuestos *N*-heteroaromáticos, y la bioquímica de esta degradación ha sido estudiada en diferentes bacterias (ver más arriba), hasta la fecha no se conocen los determinantes genéticos implicados en el catabolismo del NA en bacterias. Por ello, en esta tesis se ha llevado a cabo la caracterización molecular de los genes y enzimas que participan en la ruta de degradación del NA en un microorganismo modelo en el catabolismo de compuestos aromáticos, la bacteria *Pseudomonas putida* KT2440.



**Fig. 12. Rutas de degradación aeróbica (A,B, y C) y anaeróbica (D) del ácido nicotínico en bacterias.** A *Pseudomonas putida* (Behrman y Stanier, 1957); B *Bacillus niacini* (Ensign y Rittenberg, 1964; Hirschberg y Ensign, 1971; Nagel y Andreesen, 1991); C *Azorhizobium caulinodans* (Kitts *et al.*, 1992); D. *Eubacterium barkeri* (Stadtman *et al.*, 1972). Las moléculas son: 1, ácido nicotínico; 2, ácido 6-hidroxicotínico; 3, 2,5-dihidroxipiridina; 4, ácido N-formilmaleámico; 5, ácido maleámico; 6, ácido maleico; 7, ácido fumárico; 8, ácido 2,6-dihidroxicotínico; 9, 2,3,6-trihidroxipiridina; 10, ácido 6-oxo-1,4,5,6-tetrahidronicotínico; 11, 2-formilglutaril-5-amida; 12, ácido 2-formilglutárico; 13, semialdehído glutárico; 14, ácido glutárico; 15, glutaril-CoA; 16, acetoacetyl-CoA; 17, ácido 1,6-dihidro-6-oxonicotínico; 18, ácido 2-metilglutárico; 19, ácido metilglutárico; 20, ácido dimetilmaléico; 21, ácido propiónico; 22, ácido pirúvico; 23, ácido acético. Los compuestos entre paréntesis no han sido detectados (figura modificada de Fetzner, 1998).

Las cepas de *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. La única cepa de esta especie cuyo genoma está completamente secuenciado es *P. putida* KT2440 (Nelson *et al.*, 2002), aunque en la actualidad se está completando la secuencia del genoma de la cepa *P. putida* F1 ([http://genome.jgi-psf.org/draft\\_microbes/psepu/psepu.home.html](http://genome.jgi-psf.org/draft_microbes/psepu/psepu.home.html)). La cepa 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) que es el elemento génico responsable de su crecimiento en tolueno y metilbenzoato (Nozaki *et al.*, 1963; Assinder y Williams, 1990). La capacidad de *P. putida* mt-2 para degradar compuestos aromáticos era 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 (116.5 kb; no. acceso AJ344068) ó plásmido TOL (Nozaki *et al.*, 1963; Franklin *et al.*, 1981; Assinder y Williams, 1990).

Sin embargo, el potencial catabólico frente a los compuestos aromáticos de *P. putida* KT2440 era prácticamente desconocido y se restringía a la utilización de benzoato mediante la ruta de degradación tipo *orto* codificada en el cromosoma de la bacteria (Assinder y Williams 1990). Dado que la cepa KT2440 se ha certificado como una cepa no patógena y segura (Federal Register, 1982), es un huésped ideal para la clonación y expresión de genes heterólogos así como para el desarrollo de biocatalizadores recombinantes. Dada su plasticidad genética y metabólica, esta cepa se ha empleado tradicionalmente con fines biotecnológicos de diversa índole, y son múltiples las aplicaciones logradas hasta la fecha (Harayama y Timmis, 1989; Ramos *et al.*, 1994; Timmis, 2002; 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, 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.*, 2000a). *Pseudomonas 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).

El trabajo que se presenta en esta memoria se centra en el estudio del potencial catabólico frente a compuestos aromáticos de la cepa *P. putida* KT2440 y en la caracterización de su ruta de degradación del NA.





## ***II OBJETIVOS***



## II OBJETIVOS

Dado que la bacteria *P. putida* KT2440 es un microorganismo modelo para el estudio del catabolismo aeróbico de compuestos aromáticos, y dado que la secuencia de su genoma se concluyó al inicio de este trabajo, parecía de gran interés abordar la identificación de los determinantes genéticos implicados en el potencial catabólico de esta cepa frente a los compuestos aromáticos para así disponer de un mapa catabólico global.

Por otro lado, dado que *P. putida* KT2440 utiliza NA y todavía no se había caracterizado a nivel genético ninguna ruta de degradación de este *N*-heterociclo, un modelo en catabolismo de compuestos *N*-heteroaromáticos derivados de la piridina y con numerosas aplicaciones biotecnológicas, se planteó su caracterización molecular en este trabajo.

Los objetivos básicos de esta tesis han sido:

1. Determinar el potencial catabólico de *P. putida* KT2440 frente a compuestos aromáticos realizando un análisis de las rutas de degradación codificadas en su genoma así como su comparación con rutas equivalentes de otras bacterias.
2. Identificar y clonar los genes *nic* responsables de la degradación de NA en *P. putida* KT2440.
3. Caracterizar las enzimas responsables de la degradación del NA en *P. putida* KT2440.
4. Realizar un análisis de la regulación transcripcional del agrupamiento génico *nic*.



### ***III MATERIALES Y MÉTODOS***



### III MATERIALES Y MÉTODOS

#### 1 Cepas bacterianas

Las cepas de *Pseudomonas* y de *E. coli* utilizadas en este trabajo se detallan en la Tabla 5.

**Tabla 5. Cepas bacterianas utilizadas en este trabajo.**

<i>Cepa</i>	<i>Genotipo/fenotipo relevante</i>	<i>Referencia</i>
<i>Pseudomonas:</i>		
<i>P. putida</i> KT2440	<i>P. putida</i> mt-2 curada del plásmido TOL	Franklin <i>et al.</i> , 1981
<i>P. putida</i> KT2440 <i>dnicA</i>	<i>P. putida</i> KT2440 mutante en <i>nicA</i> por disrupción insercional. Km <sup>r</sup>	Este trabajo.
<i>P. putida</i> KT2440 <i>dnicB</i>	<i>P. putida</i> KT2440 mutante en <i>nicB</i> por disrupción insercional. Km <sup>r</sup>	Este trabajo.
<i>P. putida</i> KT2440 <i>dnicC</i>	<i>P. putida</i> KT2440 mutante en <i>nicC</i> por disrupción insercional. Km <sup>r</sup>	Este trabajo.
<i>P. putida</i> KT2440 <i>dnicD</i>	<i>P. putida</i> KT2440 mutante en <i>nicD</i> por disrupción insercional. Km <sup>r</sup>	Este trabajo.
<i>P. putida</i> KT2440 <i>dnicR</i>	<i>P. putida</i> KT2440 mutante en <i>nicR</i> por disrupción insercional. Km <sup>r</sup>	Este trabajo.
<i>P. putida</i> KT2440 <i>dnicX</i>	<i>P. putida</i> KT2440 mutante en <i>nicX</i> por disrupción insercional. Km <sup>r</sup>	Este trabajo.
<i>P. putida</i> KT2440 <i>dcatA</i>	<i>P. putida</i> KT2440 mutante en <i>catA</i> por disrupción insercional. Km <sup>r</sup>	Este trabajo.
<i>P. putida</i> N9	Cepa salvaje.	Behrman y Stanier, 1957
<i>P. putida</i> U	Cepa salvaje (Cepa 144, Urbana B) ATCC17514	Martínez-Blanco <i>et al.</i> , 1990
<i>P. putida</i> F1	Cepa salvaje.	Gibson <i>et al.</i> , 1968
<i>Pseudomonas</i> sp. Y2	Cepa salvaje.	Utkin <i>et al.</i> , 1991
<i>Pseudomonas</i> sp. B13Rif	Cepa salvaje. Rf <sup>r</sup>	Dorn <i>et al.</i> , 1974
<i>P. aeruginosa</i> PG201	Cepa salvaje.	Ochsner <i>et al.</i> , 1991
<i>P. stutzeri</i> DK301	Cepa salvaje.	Kloos <i>et al.</i> , 1994
<i>Pseudomonas</i> sp. MT14	Cepa salvaje.	Williams y Worsey, 1976
<i>P. fluorescens</i> R2f	Cepa salvaje.	van Elsas <i>et al.</i> , 1988
<i>Pseudomonas</i> sp. DSM6412	Cepa salvaje.	Blaschke <i>et al.</i> , 1991
<i>E. coli:</i>		
DH10B	F <sup>'</sup> , <i>mcrA</i> $\Delta(mrr\ hsdRMS-mcrBC)$ $\phi 80dlac\Delta M15$ $\Delta lacX74\ deoR\ recA1\ araD139\ \Delta(ara-leu)7697\ galU\ galK\ \lambda\ rpsL\ endA1\ nupG$	Invitrogen
DH5 $\alpha$	( $\phi 80lacZ\Delta M15$ ) <i>endA1\ recA1\ hsdR17 (r<sub>K</sub><sup>-</sup> m<sub>K</sub><sup>-</sup>) supE44</i>	Sambrook y Russell,

CC118	$\Delta lacU169$ $\Delta(ara-leu) araD \Delta lacX74 galE galK phoA20 thi-1 rpsE rpoB argE$ (Am) $recA1 Rf^+ Sp^+$	2001 Manoil y Beckwith, 1985
HB101	$supE44 ara14 galK2 leuB lacY1 \Delta(gpt-proA)62 rpsL20 xyl-5 mtl-1 recA13 \Delta(mcrC-mrr) hsdS20 (r_B^- m_B^-) Sm^+$	Sambrook y Russell, 2001
XL1-Blue	$recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hdsR17 supE44 relA1 lac[F^+ proA^+ B^+ lacI^q \Delta(lacZ)M15 Tn10 (Tc^r)]$	Sambrook y Russell, 2001
BL21 (DE3)	$F^- ompT hsdS_B(r_B^- m_B^-) gal dcm \lambda DE3$ (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

## 2 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- $\beta$ -D-galactopiranosido (X-Gal) a una concentración de 0.08 mM, así como isopropil-1-tio- $\beta$ -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 (Barragán *et al.*, 2004). El medio mínimo M63 fue suplementado con vitaminas y elementos traza a las concentraciones recomendadas previamente ((Bauchop y Elsdén, 1960, Gerhardt *et al.*, 1994). El medio MC se basa en un medio basal (pH 7.5) cuya composición se detalla a continuación:

$KH_2PO_4$	0.33 g
$Na_2HPO_4$	1.2 g
$NH_4Cl$	0.11 g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.1 g
$CaCl_2$	0.04 g
$H_2O$ destilada	Hasta 1 l

Este medio basal fue suplementado con una solución de elementos traza (pH 6.5), cuya composición (1000x) se detalla a continuación:



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

El medio basal MA fue también suplementado 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 <sub>2</sub> 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 <sub>2</sub> O destilada	Hasta 1 l

Los medios M63 y MC fueron suplementados con la fuente de carbono requerida. Las soluciones concentradas de las diferentes fuentes de carbono fueron esterilizadas por filtración y añadidas al medio de cultivo de forma aséptica. La feniletilamina, bencilamina, tiramina, fenilalanina, tirosina, fenilglioxilato, resorcinol, piridoxal HCl, quinato y ftalato (Sigma-Aldrich) se prepararon a una concentración 1 M en agua (con la excepción del quinato y el ftalato que se prepararon a 0.5 M y 0.8 M, respectivamente, y la fenilalanina y tirosina que se prepararon a una concentración 0.05 M). El benzoato, 2-hidroxibenzoato, *p*-hidroxibenzoato, 2,3-dihidroxibenzoato, tropato, atropina, mandelato, antranilato, fenilacetato y fenilpropionato (Sigma-Aldrich); el 3-hidroxifenilpropionato, fenilhexanoato y feniloctanoato (Lancaster); y el 3-hidroxibenzoato (Fluka) se prepararon a una concentración 1 M en 2-propanol (excepto el antranilato y el 2,3-dihidroxibenzoato que se prepararon a una concentración 0.5 M). El cafeato, ferulato, *p*-cumarato, cinamato, vainillato, vanililmandelato, *p*-metoxibenzoato, 3,4-dimetoxibenzoato, *p*-hidroxi-3,5-metoxibenzoato y

el galato (Sigma-Aldrich) se prepararon a una concentración 1 M en *N-N*-dimetilformamida. El nicotinato, *p*-hidroxibenzoato, nicotina, piridoxamina, 2-hidroxi piridina, picolinato y nicotina (Sigma-Aldrich); así como la 3-hidroxi piridina, 4-hidroxi piridina y 2,3-dihidroxi piridina (Fluka) se añadieron directamente al medio de cultivo. El citrato y el succinato se prepararon a una concentración del 0.2% (p/v). Para los crecimientos empleando el ácido nicotínico como fuente de carbono y de nitrógeno, el medio MC se preparó sin añadir NH<sub>4</sub>Cl.

Las células de *E. coli* y *Pseudomonas* se incubaron a 37°C y 30°C, respectivamente, en un agitador orbital a 300 rpm. El crecimiento en medio líquido fue seguido por turbidimetría a 600 nm ( $A_{600}$ ) empleando un espectrofotómetro Beckman DU-520.

Los antibióticos se prepararon en soluciones (1000x), a excepción de la ampicilina, que se preparó en soluciones 250x; el cloranfenicol, que se preparó en etanol al 100% y la rifampicina, que se disolvió en dimetilsulfóxido (DMSO) 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), rifampicina (Rf, 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.

### **3 Plásmidos**

Los plásmidos empleados en este trabajo y sus características más relevantes se muestran en la Tabla 6.

Tabla 6. Plásmidos utilizados en este trabajo.

<b>Plásmido</b>	<b>Descripción</b>	<b>Referencia</b>
pK18mob	Vector de clonación suicida para la construcción de mutantes por recombinación homóloga. Km <sup>r</sup> , oriColE1, Mob <sup>+</sup> , lacZα	Schafer <i>et al.</i> , 1994
pKNicA	Vector pK18mob que contiene un fragmento interno del gen <i>nicA</i> . Km <sup>r</sup>	Este trabajo
pKNicB	Vector pK18mob que contiene un fragmento interno del gen <i>nicB</i> . Km <sup>r</sup>	Este trabajo
pKNicC	Vector pK18mob que contiene un fragmento interno del gen <i>nicC</i> . Km <sup>r</sup>	Este trabajo
pKNicD	Vector pK18mob que contiene un fragmento interno del gen <i>nicD</i> . Km <sup>r</sup>	Este trabajo
pKNicX	Vector pK18mob que contiene un fragmento interno del gen <i>nicX</i> . Km <sup>r</sup>	Este trabajo
pKNicR	Vector pK18mob que contiene un fragmento interno del gen <i>nicR</i> . Km <sup>r</sup>	Este trabajo
pBBR1MCS-5	Vector de clonación de amplio espectro de huésped, Gm <sup>r</sup> <i>ori</i> pBBR1MCS, Mob <sup>+</sup> , lacZα	Kovach <i>et al.</i> , 1995
pNIC	Vector pBBR1MCS-5 que contiene el agrupamiento <i>nic</i> completo. Gm <sup>r</sup>	Este trabajo
pUC19	Vector de clonación, Ap <sup>r</sup> <i>ori</i> ColE1, lacZα	Sambrook y Rusell, 2001
pFUSAB	Vector pUC19 que contiene los genes <i>nicA</i> (incompleto) y <i>nicB</i> . Ap <sup>r</sup>	Este trabajo
pUCNAB	Vector pUC19 que contiene los genes <i>nicA</i> y <i>nicB</i> . Ap <sup>r</sup>	Este trabajo
pNicAB	Vector pBBR1MCS-5 que contiene los genes <i>nicA</i> y <i>nicB</i> . Gm <sup>r</sup>	Este trabajo
pUC18	Vector de clonación, Ap <sup>r</sup> <i>ori</i> ColE1, lacZα	Sambrook y Rusell, 2001
pUCNicC	Vector pUC18 que contiene el gen <i>nicC</i> . Ap <sup>r</sup>	Este trabajo
pIZ1016	Vector de clonación de amplio espectro de huésped, Gm <sup>r</sup> <i>ori</i> pBBR1MCS Mob <sup>+</sup> , lacZα, <i>Ptac/lacI<sup>f</sup></i>	Moreno-Ruiz <i>et al.</i> , 2003
pIZNicC	Vector pIZ1016 que contiene el gen <i>nicC</i> . Gm <sup>r</sup>	Este trabajo
pUCNicXR	Vector pUC18 que contiene los genes <i>nicX</i> y <i>nicR</i> . Ap <sup>r</sup>	Este trabajo.
pGEM-T easy	Vector de clonación de productos de PCR, Ap <sup>r</sup> , <i>ori</i> ColE1, lacZα	Promega
pGEMTNicX	Vector pGEM-T easy que contiene el gen <i>nicX</i> . Ap <sup>r</sup>	Este trabajo
pET-29a(+)	Vector de clonación e hiperexpresión, Km <sup>r</sup> , <i>ori</i> ColE1	Novagen
pETNicX	Vector pET29 que expresa el gen <i>nicX</i> . Km <sup>r</sup>	Este trabajo
pGEMTH189A	Vector pGEMT-easy que contiene el gen <i>nicX</i> con la sustitución H189A. Ap <sup>r</sup>	Este trabajo
pGEMTH240A	Vector pGEMT-easy que contiene el gen <i>nicX</i> con la sustitución H240A. Ap <sup>r</sup>	Este trabajo
pGEMTH265A	Vector pGEMT-easy que contiene el gen <i>nicX</i> con la sustitución H265A. Ap <sup>r</sup>	Este trabajo
pGEMTH318A	Vector pGEMT-easy que contiene el gen <i>nicX</i> con la sustitución H318A. Ap <sup>r</sup>	Este trabajo
pGEMTD320A	Vector pGEMT-easy que contiene el gen <i>nicX</i> con la sustitución D320A. Ap <sup>r</sup>	Este trabajo
pETH189A	Vector pET29 que expresa el gen <i>nicX</i> con la sustitución H189A. Km <sup>r</sup>	Este trabajo
pETH240A	Vector pET29 que expresa el gen <i>nicX</i> con la sustitución H240A. Km <sup>r</sup>	Este trabajo
pETH265A	Vector pET29 que expresa el gen <i>nicX</i> con la sustitución	Este trabajo

pETH318A	H265A. Km <sup>r</sup> Vector pET29 que expresa el gen <i>nicX</i> con la sustitución H318A. Km <sup>r</sup>	Este trabajo
pETD320A	Vector pET29 que expresa el gen <i>nicX</i> con la sustitución D320A. Km <sup>r</sup>	Este trabajo
pGEMTNicD	Vector pGEM-T easy que contiene el gen <i>nicD</i> . Ap <sup>r</sup>	Este trabajo
pETNicD	Vector pET29 que expresa el gen <i>nicD</i> . Km <sup>r</sup>	Este trabajo
pGEMTPa	Vector pGEM-T- easy que contiene el producto de PCR de la región intergénica <i>nicR -nicA</i> . Ap <sup>r</sup>	Este trabajo
pUJ8	Vector de búsqueda de promotores, gen <i>lacZ</i> flanqueado por sitios <i>NotI</i> (fusiones transcripcionales). Ap <sup>r</sup> , <i>oriColE1</i> , ' <i>lacZ</i>	de Lorenzo <i>et al.</i> , 1990
pUJPa	Vector pUJ8 que contiene la fusión transcripcional <i>Pa::lacZ</i> . Ap <sup>r</sup>	Este trabajo
pBPa	Vector pBBR1MCS-5 que contiene la fusión transcripcional <i>Pa::lacZ</i> . Gm <sup>r</sup>	Este trabajo
pBlacZ	Vector pBBR1MCS-5 que contiene el gen <i>lacZ</i> sin promotor de pUJ8. Gm <sup>r</sup>	Este trabajo
pSJ3	Vector de búsqueda de promotores, <i>lacZ</i> flanqueado por sitios <i>NotI</i> (fusiones traduccionales). Ap <sup>r</sup> , <i>oriColE1</i> , ' <i>lacZ</i>	Ferrández <i>et al.</i> , 1998
pSJPa	Vector pSJ3 que contiene la fusión traduccional <i>Pa::lacZ</i> . Ap <sup>r</sup>	Este trabajo
pBSPa	Vector pBBR1MCS-5 que contiene la fusión traduccional <i>Pa::lacZ</i> . Gm <sup>r</sup>	Este trabajo
pSJ Pc	Vector pSJ3 que contiene la fusión traduccional <i>Pc::lacZ</i> . Ap <sup>r</sup>	Este trabajo
pSJ Px	Vector pSJ3 que contiene la fusión traduccional <i>Px::lacZ</i> . Ap <sup>r</sup>	Este trabajo

#### **4 Transformación de las células**

Las células de *E. coli* fueron modificadas genéticamente por transformación tras hacerlas competentes mediante el método de RbCl (Sambrook y Rusell, 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  $\mu$ F, 200  $\Omega$ .

#### **5 Transferencia de plásmidos por conjugación**

Los plásmidos se movilizaron por conjugación bi- o tri-parental siguiendo el método descrito previamente y utilizando la cepa *E. coli* HB101 (pRK600) como *helper* (de Lorenzo y Timmis, 1994). 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 que contiene citrato al 0.2% y el correspondiente antibiótico.

## **6 Técnicas de manipulación de DNA**

Las técnicas utilizadas para la preparación y manipulación del DNA han sido descritas por Sambrook y Rusell (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 la Pfu polimerasa fueron suministradas por Biotools B. M. Labs. Todas las enzimas se emplearon atendiendo a las especificaciones de las diferentes casas comerciales. Los fragmentos de DNA se purificaron empleando geles de agarosa, mediante el kit *GeneClean* (BIO 101) o el *High Pure PCR Product Purification Kit* (Roche).

### **6.1 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.

### **6.2 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 Biotools DNA polimerasa y la Pfu polimerasa, ambas proporcionadas por Biotools B. M. Labs. Las mezclas de reacción contenían MgCl<sub>2</sub> 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 7, 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 7. Oligonucleótidos sintéticos utilizados en este trabajo para la amplificación de productos por PCR.** Las secuencias subrayadas se corresponden con las dianas de restricción creadas.

<u>Oligonucleótido</u>	<u>Secuencia 5'-3'</u>	<u>Descripción</u>
NicAint3	GGG <u>T</u> CGACGTGGGTGCCGAGCG	Empleado para amplificar un fragmento interno de <i>nicA</i> . <i>Sall</i>
NicAint5	CGGAATTCGAAGTCAGCGCCATGCC	Empleado para amplificar un fragmento interno de <i>nicA</i> . <i>EcoRI</i>
NicBint5	CGGAATTCGGCCCATCATGTGCAC	Empleado para amplificar un fragmento interno de <i>nicB</i> . <i>EcoRI</i>
NicBint3	CGAAGCTTGATGGTGACGCGCATG	Empleado para amplificar un fragmento interno de <i>nicB</i> . <i>HindIII</i>
Nih5	GCAAGCTTCATCGGGTGGCAGGCG	Empleado para amplificar la región interna de <i>nicC</i> . <i>HindIII</i>
Nih3	CCGAATTCGCTGGGCGAGTTTGC	Empleado para amplificar la región interna de <i>nicC</i> . <i>EcoRI</i>
NicD25	GCGAATTC AAGCGGCCCGACCTGG	Empleado para amplificar un fragmento interno de <i>nicD</i> . <i>EcoRI</i>
NicD23	GCAAGCTTCGCCGGCTCGTAGCAGGTG	Empleado para amplificar un fragmento interno de <i>nicD</i> . <i>HindIII</i>
Unkint5	GGGAATTC AAGACCGGCACGCGC	Empleado para amplificar un fragmento interno de <i>nicX</i> . <i>EcoRI</i>
Unkint3	GCAAGCTTGAACGGCAGGATGATGTC	Empleado para amplificar un fragmento interno de <i>nicX</i> . <i>HindIII</i>
NicRint33	CGGAATTCCTCAGGCGCTCGACGATG	Empleado para amplificar un fragmento interno de <i>nicR</i> . <i>EcoRI</i>
NicRint35	GCAAGCTTCCACCCCGAGCAGCGCCC	Empleado para amplificar un fragmento interno de <i>nicR</i> . <i>HindIII</i>
NicA5	GGGGATCCGTAACCGTTGCCGCCACCACCG TATTCG	Empleado para amplificar el gen <i>nicA</i> . <i>BamHI</i>
SgrAI	CGCTGTCATGGCCGGCATAGGG	Empleado para amplificar el gen <i>nicA</i>
PnicX5	GGGGATCCAGTTGTGCATTGCTCACCGG	Empleado para clonar el promotor del gen <i>nicX(Px)</i> <i>BamHI</i>
NicC3	GCTCTAGACGAAGGTGCTCATGCCGC	Empleado para amplificar el gen <i>nicC</i> . <i>XbaI</i>
Unk5	GCGAATTC TGGTCAATGTGTGGATAGGTAA CG	Empleado para amplificar el gen <i>nicX</i> . <i>EcoRI</i>
NicR3	GCTCTAGACGGCAATGGCGGCAG	Empleado para amplificar el gen <i>nicR</i> . <i>XbaI</i>
NicX5	GCCATATGCCGGTGAGCAATGCACAAC	Empleado para amplificar el gen <i>nicX</i> . <i>NdeI</i>
NicX3	GCGAATTC TGGGTGGAAAGAGGCTGGCC	Empleado para amplificar el gen <i>nicX</i> . <i>EcoRI</i>
H240A5	CATCACCGGCATAGCTGGCGGCTTCGAGGC	Empleado para la sustitución H240A de <i>NicX</i>
H240A3	GCCTCGAAGCCGCCAGCTATGCCGGTGATG	Empleado para la sustitución

D320A5	CCCCGTGCCACCTGGCCATCCCGCTGCG	H240A de NicX Empleado para la sustitución D320A de NicX
D320A3	CGCAGCGGGATGGCCAGGTGGCACGGGG	Empleado para la sustitución D320A de NicX
H318A5	CAAGACCCCGTGCGCCCTGGACATCCC	Empleado para la sustitución H318A de NicX
H318A3	GGGATGTCCAGGGCGCACGGGGTCTTG	Empleado para la sustitución H318A de NicX
H265A5	GGTATACGGCATCTCGGCAATAGGCTGGG GC	Empleado para la sustitución H265A de NicX
H265A3	GCCCCAGCCTATTGCCGAGATGCCGTATAC C	Empleado para la sustitución H265A de NicX
H189A5	GCATGGCCCAGCGGCTTTCTGTTCACC	Empleado para la sustitución H189A de NicX
H189A3	AACAGAAAGCCGCTGGGCCATGCGTCCCA GCGCCCC	Empleado para la sustitución H189A de NicX
NicD5	CGCATATGAGCACCTTCGTGCGC	Empleado para amplificar el gen <i>nicD</i> . <i>NdeI</i>
NicD3	GCGAATTCTCGTGCTCCGTCAG	Empleado para amplificar el gen <i>nicD</i> . <i>EcoRI</i>
NicTP5	GCAATACAACCGCCGGCCAG	Empleado para amplificar la región intergénica entre <i>nicT</i> y <i>nicP</i>
NicTP3	GCACGCTGCGCTGTGGGTG	Empleado para amplificar la región intergénica entre <i>nicT</i> y <i>nicP</i>
NicTint5	CATAGGCGCTGAGCAGGATCG	Empleado para amplificar un fragmento interno del gen <i>nicT</i>
NicTint3	TTCTGGCTGGATCATGGGGC	Empleado para amplificar un fragmento interno del gen <i>nicT</i>
NicFT5	TGTCACTGTGGACCGTGTTGC	Empleado para amplificar la región intergénica entre <i>nicF</i> y <i>nicT</i>
NicFT3	GATGTCGTCACCCGGCAGGATG	Empleado para amplificar la región intergénica entre <i>nicF</i> y <i>nicT</i>
NicXint3	CGGCAGGATGATGTCACCCACG	Empleado para amplificar un fragmento interno del gen <i>nicX</i>
NicRX3	CGGGTCGCAGGCCTGCTG	Empleado para amplificar la región intergénica entre <i>nicR</i> y <i>nicX</i>
NicR5	CCGAATCCCGCTGCGCAACTG	Empleado para clonar el gen <i>nicR</i> . <i>EcoRI</i>
NicAR5	AAGCATGCTGCGCAAGATGATCGACAG	Empleado para amplificar la región intergénica entre <i>nicR</i> y <i>nicA</i> . <i>SphI</i>
PnicA3	GCGGATCCTGCAGGGAGATGGTTGTTGC	Empleado para amplificar la región intergénica entre <i>nicR</i> y <i>nicA</i> . <i>BamHI</i>
NicAend5	GCTCCTGCGTCATCCCCTTGGC	Empleado para amplificar un fragmento interno de <i>nicA</i>
PnicC5	GGGGATCCCGCATGGGTATGTCTCCTC	Empleado para amplificar el promotor del gen <i>nicC</i> . <i>BamHI</i>
PnicX3	CGCGTCGACAGGTAATCACCGGTATTGCC	Empleado para amplificar el promotor del gen <i>nicX</i> y el gen <i>nicC</i> . <i>Sall</i> .
F24	CGCCAGGGTTTTCCAGTCACGAC	Empleado para analizar las disrupciones insercionales generadas mediante el plásmido pK18 <i>mob</i> .
R24	AGCGGATAACAATTCACACAGGA	Empleado para analizar las disrupciones insercionales generadas

16S1	AAGGAGGTGATCCAGCC	mediante el plásmido pK18 <i>mob</i> . Empleado para amplificar el gen <i>16S rDNA</i>
16S2	GAGA(G/C)TTTGATC(A/C/T)TGGCTCAG	Empleado para amplificar el gen <i>16S rDNA</i>

### **6.3 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 en mediante la técnica de PCR con un termociclador “Gene Amp PCR System 2400” de Perkin-Elmer.

### **6.4 Construcción de cepas mutantes *P. putida* KT2440*dnic* mediante mutagénesis insercional**

Para la construcción de los distintos mutantes *P. putida* KT2440*dnic* se procedió a la disrupción insercional de los genes *nicA*, *nicB*, *nicC*, *nicD*, *nicX* y *nicR* 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 pKNicA, pKNicB, pKNicC, pKNicD, pKNicX y pKNicR (Tabla 6) fueron transferidas de la cepa donadora, *E. coli* DH10B, a la cepa receptora, *P. putida* KT2440, mediante conjugación triparental. Las transconjugantes presentaban una disrupción génica por inserción, mediante recombinación homóloga, de los respectivos derivados del plásmido suicida pK18*mob*, y fueron seleccionados en medio MC suplementado con kanamicina (50 µg/ml) y con 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 7) y



un oligonucleótido externo al fragmento clonado, para confirmar la disrupción de los respectivos genes truncados.

### **6.5 Mutagénesis dirigida del gen *nicX***

La construcción de mutaciones en el gen *nicX* se llevó a cabo mediante mutagénesis dirigida siguiendo un protocolo en el que se emplean dos etapas sucesivas de PCR utilizando DNA genómico de *P. putida* KT2440 como molde y los oligonucleótidos diseñados que incluyen las mutaciones y se resumen en la Tabla 7.

En una primera etapa, se amplificó el gen dividido en dos fragmentos. El primero de ellos comprende desde el codón inicial hasta el codón donde se inserta la mutación. El segundo fragmento comprende el resto del gen, desde 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 amplifican con los oligonucleótidos que hibridan en el inicio (NicX5; Tabla 7) y en el final (NicX3; Tabla 7) del gen *nicX*, regenerando un gen completo que incluye la mutación deseada. 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 *EcoRI* presentes en los oligonucleótidos NicX5 y NicX3, respectivamente.

## **7 Técnicas de manipulación de RNA**

### **7.1 Extracción de RNA**

Para la extracción de RNA se cultivaron 25 ml de *P. putida* KT2440 en medio mínimo MC, empleando NA 5 mM o citrato 0.2 % (condición control), como única fuente de carbono. Los cultivos fueron recogidos a la mitad de su fase exponencial ( $A_{600}$  de 0.35) y se extrajo su RNA siguiendo las indicaciones del kit RNeasy (Qiagen). 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.

## **7.2 Retrotranscripción seguida de reacción de PCR (RT-PCR)**

El cDNA producto de la reacción de retrotranscripción (RT) se obtiene a partir de 1 µg de RNA, empleando 10 U de la transcriptasa reversa AMV (*Avian myeloblastosis virus reverse transcriptase*; Promega), en un volumen final de 30 µl, por incubación de la mezcla 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. En cada una de las reacciones de PCR se incluye 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.

## **8 Técnicas de manipulación de proteínas**

### **8.1 Obtención de los extractos proteicos**

Para la obtención de extractos crudos de *P. putida* KT2440 y sus derivados, se cultivaron las células en medio mínimo con la fuente de carbono apropiada en cada caso hasta alcanzar una  $A_{600}$  de 0.35. 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 14000 rpm durante 15 min, recogiendo el sobrenadante (extracto crudo). Las cepas de *E. coli* y *Pseudomonas* que expresan las distintas proteínas en vectores de expresión 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 alcanzó una  $A_{600}$  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.

## **8.2 Purificación de la proteína NicX**

Se cultivaron 200 ml de células de *E. coli* BLB21 (DE3) (pETNicX) a 30°C, durante 12 h y con agitación constante (200 rpm). Para la expresión de la proteína NicX el cultivo fue inducido desde el inicio con IPTG a una concentración final de 1 mM. Se recogieron las células y se concentraron en un volumen de 10 ml de tampón fosfato 50 mM, pH 7.5. A continuación se lisaron empleando la prensa de French y se obtuvo el extracto proteico como se indica en el apartado 8.1. El extracto crudo se hizo pasar a través de una columna de 3 ml de DEAE-celulosa equilibrada en tampón fosfato 50 mM, pH 7.5. La columna fue conectada a una bomba peristáltica y se lavó con 50 ml de tampón fosfato 50 mM, pH 7.0, más NaCl 0.1 M, empleando un flujo de 0.5 ml/min. A continuación, la proteína NicX fue eluida de la columna utilizando un gradiente lineal de 100 ml de tampón fosfato sódico 20 mM pH 7.0 y concentraciones de NaCl que variaron de 0.1 a 0.3 M. Se registró la  $A_{280}$  de las fracciones recogidas y se comprobó su pureza mediante SDS-PAGE 12.5 %. Las fracciones que contenían la proteína NicX se agruparon (25 ml) y se dializaron durante 12 h frente a un litro de tampón fosfato sódico 20 mM pH 7.5.

El extracto proteico dializado se cargó a continuación en una columna de 3 ml de hidroxiapatito equilibrada en el mismo tampón. La columna fue lavada con 50 ml de fosfato 20 mM pH 7.0 empleando un flujo de 0.5 ml/min. Seguidamente, la proteína fue eluida con un gradiente de 20 mM a 100 mM de fosfato sódico, pH 7.0. Las fracciones que mostraban absorbancia significativa a 280 nm junto con actividad 2,5-dihidroxipiridina dioxigenasa, fueron reunidas (30 ml) y dializadas a 4°C durante 4 h frente a un litro de tampón fosfato sódico 20 mM, pH 7.5. Finalmente, la proteína se concentró mediante centrifugación a 4°C en un Centricon (Amicon) durante de 3 h a 4400 rpm utilizando un rotor SS34 (Sorvall). El grado de pureza de la proteína NicX purificada se comprobó mediante SDS- PAGE 12.5%.

## **8.3 Electroforesis en geles de poliacrilamida**

Las electroforesis analíticas de proteínas se realizaron en todos los casos en condiciones desnaturizantes en presencia de dodecilsulfato sódico (SDS), en geles de poliacrilammida (PAGE), a una concentración del 12.5% según la técnica descrita

previamente (Laemmli, 1970). Las muestras se hirvieron durante 10 min en presencia del tampón de ruptura (Tris-HCl 250 mM a pH 6.8; SDS 2%;  $\beta$ -mercaptoetanol 5%; glicerol 10% y azul de bromofenol 0.05%). Las electroforesis se realizaron a temperatura ambiente, empleando un electrolito de composición: Tris-HCl 25 mM pH 8.0, glicina 192 mM y SDS 0.1%. Las proteínas fueron teñidas con Coomassie Brilliant Blue R250, según se describe previamente (Swank y Munkres, 1971).

Las proteínas empleadas como marcadores de tamaño molecular (miosina, 200 kDa;  $\beta$ -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).

#### **8.4 Determinación de la secuencia amino-terminal**

Para determinar la secuencia N-terminal de la proteína NicX, ésta fue transferida a una membrana de polivinilideno a partir del gel de SDS-PAGE 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.).

#### **8.5 Ensayos enzimáticos**

##### **8.5.1 Ensayos de actividad nicotinato hidroxilasa (NicAB)**

La actividad nicotinato hidroxilasa (NicAB) se ensayó valorando la bioconversión del NA en 6HNA mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). La conversión de NA en 6HNA se realizó utilizando i) células que expresan los genes *nicAB* cultivadas en medio mínimo con citrato como fuente de carbono y en presencia de NA (células en crecimiento), ii) células en suspensión (“resting cells”) en presencia de NA.

Para el ensayo que utiliza células en crecimiento, se inoculó la cepa *P. putida* KT2440*nicC* a una  $A_{600}$  de 0.1 en medio mínimo M63 suplementado con citrato 0.2% (p/v)

y NA (5 mM), y se tomaron alícuotas a lo largo de la curva de crecimiento. Para el ensayo que utiliza células en suspensión, las cepas *P. putida* KT2440*dnicC*, *P. fluorescens* R2f (pNicAB) o *Pseudomonas* sp. DSM 6412 (pNicAB) se cultivaron en 50 ml de medio mínimo M63 suplementado con citrato al 0.2% (p/v) hasta que los cultivos alcanzaron una  $A_{600}$  de 0.8. Para la cepa *P. putida* KT2440*dnicC* fue necesaria la inducción de la actividad nicotinato hidroxilasa añadiendo NA 1 mM al medio de cultivo. Posteriormente, las células fueron lavadas con un volumen de solución salina y se resuspendieron en 10 ml de medio mínimo M63, suplementado con NA 5 mM, incubándose a 30°C con agitación. En ambos ensayos se tomaron alícuotas (0.1 ml) a diferentes tiempos que fueron centrifugadas durante 2 min en una microcentrífuga a 12000 rpm. Los sobrenadantes libres de células se diluyeron 1/100 en agua y 20  $\mu$ l fueron analizados mediante HPLC empleando un equipo Gilson equipado con una columna Phenomenex 5 RP-18 (150x4.60 mm) y un diodo-array. Se utilizaron las condiciones descritas previamente (Hurh *et al.*, 1994a). El eluyente utilizado es una solución de fosfato sódico (10 mM pH 3.0)/acetonitrilo (98/2, v/v) a un flujo de 1 ml/min. Los máximos de absorción se registran espectrofotométricamente a 210 nm. Los tiempos de retención obtenidos fueron 4.9 min para el NA, y 8.1 min para el 6HNA.

Un tercer tipo de ensayo de actividad nicotinato hidroxilasa es el que valora la conversión de NA en 6HNA espectrofotométricamente utilizando células en suspensión y midiendo el aumento de absorbancia del medio de cultivo a 295 nm, longitud de onda a la que el 6HNA posee un máximo de absorbancia. Este ensayo se ha utilizado para valorar la actividad nicotinato hidroxilasa de la cepa *P. putida* KT2440 parental y del mutante *P. putida* KT2440*dnicR*. Para ello, las células se cultivan en medio mínimo MC que contiene *p*-hidroxibenzoato (POB) (5 mM) como fuente de carbono (condiciones de no inducción) o bien la mezcla POB (5 mM) y NA (5 mM) (condiciones de inducción). Cuando los cultivos alcanzan una  $A_{600}$  de 0.4, se concentran a  $A_{600}$  de 3 en un volumen de 1ml de medio MC que contiene NA (5 mM). Las suspensiones celulares se incuban durante 15 min a 30 °C, y transcurrido este tiempo la reacción se detiene calentando a 95°C durante 5 min. Las células son separadas del sobrenadante mediante centrifugación y el 6HNA del caldo de cultivo se determina espectrofotométricamente midiendo la absorbancia a 295 nm (un valor de absorbancia de 1 equivale a 6HNA 0.2 mM).

### **8.5.2 Ensayo de actividad 6-hidroxinicotinato monooxigenasa (NicC)**

Los extractos crudos de *P. fluorescens* R2f (pIZNicC) fueron obtenidos de la forma descrita en el apartado 8.1, resuspendiendo las células en tampón fosfato 25 mM pH 7.5. La actividad 6HNA monooxigenasa (NicC) se valoró en una mezcla de reacción (1 ml) que contenía tampón fosfato sódico 25 mM pH 7.5, 6HNA (0.2 mM), NADH (0.2 mM), FAD (10  $\mu$ M), y 100  $\mu$ l del extracto proteico (contiene 1 mg/ml de proteína total). La reacción se llevó a cabo durante 10 min a 25 °C y fue detenida mediante la congelación de las preparaciones. La formación de 2,5-DHP fue monitorizada mediante HPLC, registrando la absorbancia a 210 nm de una dilución 1/4 en agua destilada, empleando el mismo protocolo que el que se describe en el apartado 8.5.1. En estas condiciones, el tiempo de retención de un patrón comercial de 2,5-DHP es de 5.7 min.

### **8.5.3 Ensayo de actividad 2,5-dihidroxipiridina dioxigenasa (NicX)**

Los ensayos de actividad 2,5-DHP dioxigenasa (NicX) se llevaron a cabo de forma rutinaria espectrofotométricamente valorando la cinética de desaparición de la 2,5-DHP. Dado que la proteína NicX obtenida en el proceso de purificación (ver apartado 8.2) es inactiva, fue necesario reactivarla mediante su preincubación con DTT y FeSO<sub>4</sub>. Para ello, se tomaron 5  $\mu$ g de NicX purificada (alrededor de 50  $\mu$ l) en un volumen de 100  $\mu$ l de tampón fosfato sódico 20 mM pH 7.5, y se añadieron 10  $\mu$ l de DTT (0.1 M) y 10  $\mu$ l de FeSO<sub>4</sub> (5 mM), incubándose durante 15 min a 25°C. Transcurrido este tiempo, se añadieron 880  $\mu$ l de tampón fosfato sódico 20 mM pH 8.0 y se tomaron 680  $\mu$ l de la mezcla para el ensayo de actividad que se inició con la adición del sustrato, 13.6  $\mu$ l de 2,5-DHP 10 mM (200  $\mu$ M concentración final). La desaparición de la 2,5-DHP se registró en un espectrofotómetro a 25°C utilizando una longitud de onda de 320 nm ( $\epsilon$  5200 M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>).

Para comprobar la dependencia de la actividad NicX frente al pH se emplearon tampones fosfato sódico 20 mM (pH 6-9) y Tris-HCl 20 mM (pH 7.5-9). En los ensayos de dependencia con respecto a los iones metálicos, la proteína fue incubada con distintas soluciones de sales metálicas en lugar de FeSO<sub>4</sub>. Las sales empleadas fueron: FeCl<sub>3</sub>, CdCl<sub>2</sub>,

NiCl, CuCl, ZnSO<sub>4</sub>, CaCl<sub>2</sub>, MnCl<sub>2</sub>, MgSO<sub>4</sub>, y CoCl<sub>2</sub>. Todas ellas fueron preparadas en agua a una concentración final de 5 mM. La influencia de la temperatura en la actividad de NicX 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 estudiar la estabilidad térmica de la proteína se realizó la incubación previa de reactivación a diferentes temperaturas (de 20 a 75 °C) durante 5 min, mientras que la actividad de la enzima se registró a la temperatura óptima de la catálisis (25 °C).

Para los estudios de inhibición de la enzima se probó una batería de compuestos que son capaces de unirse covalentemente y de forma específica a determinados aminoácidos, así como otros que participan en la oxidación o en la quelación del hierro necesario para la catálisis. Para ello, la enzima fue incubada a temperatura ambiente durante 15 min con los diferentes compuestos, que se añadieron a la mezcla después de la reactivación de la proteína. Los agentes inhibidores se emplearon a las concentraciones de 5 mM y 0.5 mM. Los inhibidores empleados fueron: fenilgloxal, anhídrido succínico, *p*-hidroximercuribenzoato, DEPC (dietilpirocarbonato), yodoacetamida, agua oxigenada, EDTA (ácido etilendiaminotetraacético), NBS (*N*-bromosuccinimida) y el 2-2-dipiridil.

Los extractos crudos obtenidos inicialmente en el proceso de purificación se ensayaron de la misma manera que en el resto de estudios, aunque se detectó que no era necesario reactivar la proteína. En las siguientes etapas de la purificación, la enzima sólo presentaba actividad después de su incubación con la disolución de reactivación.

Las constantes cinéticas de la enzima se determinaron midiendo el consumo de oxígeno de la reacción cuando se emplean diferentes concentraciones de 2,5-DHP. 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 en la representación de dobles inversas. La actividad de NicX frente a sustratos distintos de la 2,5-DHP se realizó también empleando el electrodo de oxígeno. Los sustratos se disolvieron en agua a una concentración de 10 mM, utilizándose a una concentración final en el ensayo de 200 μM. Los compuestos aromáticos empleados fueron: 2,4-dihidroxiipridina, 2,3-dihidroxiipridina, 2-hidroxiipridina, 3-hidroxiipridina, 4-hidroxiipridina, NA, 6HNA,

picolinato (2-carboxipiridina), piridoxamina, piridoxal, benzoato, catecol, protocatecatecuato, gentisato, hidroquinona, catecol, galato, resorcinol, pirogalol y *p*-hidroxibenzoato.

#### **8.5.4 Ensayo de actividad *N*-formilmaleámico desformilasa (NicD)**

La actividad *N*-formilmaleámico desformilasa tiene como sustrato el ácido *N*-formilmaleámico producto de la catálisis de NicX sobre la 2,5-DHP. Como este producto no es comercial, en primer lugar se llevó a cabo la reacción catalizada por NicX sobre la 2,5-DHP tal y como se describe en el apartado 8.5.3. La concentración empleada de 2,5-DHP fue de 0,2 mM, y se emplearon 5 µg de NicX purificada. Se comprobó que la conversión fue completa midiendo la absorbancia a 320 nm. A continuación, se añadió un extracto de *E. coli* BLB21 (DE3) (pETNicD) (50 µg de proteína total) a la mezcla de reacción y se continuó la incubación durante 15 min a 25°C. La actividad *N*-formilmaleámico desformilasa se comprobó analizando el producto de la reacción mediante HPLC y RMN, y comparando los resultados obtenidos con los que proporciona un patrón comercial de ácido maleámico. Para los análisis mediante HPLC, se prepararon diluciones 1/4 de las soluciones de reacción en agua destilada, y se emplearon las mismas condiciones que las descritas en el apartado 8.5.1.

#### **8.5.5 Ensayo de actividad β-galactosidasa**

Para el ensayo de actividad β-galactosidasa de las fusiones *Pc::lacZ* y *Px::lacZ*, las cepas *E. coli* CC118 (pBPc) y *E. coli* CC118 (pBPx) fueron cultivadas en 20 ml de medio LB. Para el ensayo de la actividad β-galactosidasa de la fusión *Pa::lacZ*, las cepas *P. putida* KT2440 (pBPa) y *P. putida* KT2440*dnicR* (pBPa) fueron cultivadas en medio mínimo MC suplementado con POB (5 mM) como única fuente de carbono en las condiciones de no inducción, y con una mezcla de POB (5 mM) y NA (5 mM) en las condiciones de inducción. Los cultivos fueron recogidos cuando alcanzaron una  $A_{600}$  de 0.5 y 0.35 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).



### **8.5.6 Ensayo de actividad aminopeptidasa**

Se comprobó si NicX poseía actividad aminopeptidasa frente al pentapéptido encefalina. Para ello se incubaron 5 µg de proteína NicX purificada en dos condiciones. La primera fue la descrita para la actividad 2,5-DHP dioxigenasa que se detalla en el apartado 8.5.3, incubando la proteína durante 15 min en la solución de reactivación y realizando el ensayo en 1 ml de solución de reacción. En la segunda se incubaron 5 µl de enzima (1 mg/ml) durante 15 min a 25 °C, en 95 µl de tampón Tris-HCl 20 mM pH 7.5, al que se añadieron 10 µl de DTT (10 mM) y 10 µl de CoCl<sub>2</sub> (5 mM). Transcurrido el tiempo de incubación, a esta solución se le añadieron 880 µl de tampón Tris-HCl 20 mM pH 7.5 y el sustrato (modificado del protocolo descrito en Odintsov *et al.*, 2005b). En ambos casos se empleó como sustrato 20 µl de una disolución de encefalina (Sigma-Aldrich) en agua (10 mM), de manera que el péptido se encuentra a una concentración 0.2 mM final en el volumen de ensayo, que se realizó durante 12 h a 25 °C.

La hidrólisis del péptido se comprobó analizando el peso molecular del producto de reacción mediante la técnica de MALDI, que es un método de ionización/desorción en el que, a partir de una muestra en estado sólido, se forman iones directamente por impacto sobre ella de los fotones generados por un láser. Para ello, las muestras son embebidas en una matriz sólida, presente en gran exceso, formada por moléculas de pequeño tamaño cuyo máximo de absorción está próximo a la longitud de onda del láser utilizado (en nuestro caso, un láser de N de 337 nm). Los iones formados son extraídos de la fuente de iones por el efecto de un campo eléctrico y su relación masa/carga ( $m/z$ ) se determina por tiempo de vuelo (TOF). La matriz empleada fue el ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinámico, que se disolvió a saturación en acetonitrilo:TFA 0,1% (1:2), centrifugando a continuación durante unos segundos. Una dilución 1/100 de la muestra se preparó mezclando directamente sobre el portamuestras 0,5 µl del problema en solución con igual volumen de la disolución saturada de la matriz, dejando secar al aire.

Las muestras se analizaron en un equipo BIFLEX III (Bruker-Franzen Analytik, Bremen, Germany), operado en el modo positivo y calibrado externamente con una mezcla de angiotensina ( $m/z=1046,54$ ) y ACTH ( $m/z=2465,20$ ) con ácido  $\alpha$ -ciano-4-

hidroxycinámico ( $m/z= 379$ ) como matriz. Los espectros se registraron en modo reflectron, sumando 100 acumulaciones para cada experimento. Se comparó el tamaño del producto de la reacción, con el patrón comercial de encefalina, que después de ser tratado en las mismas condiciones sin adición de NicX, presentaba una relación  $m/z$  de 574. Los ensayos fueron realizados en el Servicio de Proteómica del Centro de Investigaciones Biológicas.

### **8.6 Determinación del contenido en Fe de NicX mediante Espectrometría de Emisión Atómica (ICP)**

La espectrometría de emisión atómica 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 de NicX fue un ICP-OES Optima 2000DV (Perkin-Elmer). Los análisis se realizaron en el Servicio Universitario de Instrumentación Científica de la Universidad de Murcia.

Todas las muestras se prepararon en recipientes de plástico utilizando agua MilliQ (18  $\Omega$ ). Se prepararon dos muestras de proteína a una concentración 25  $\mu\text{M}$ . La primera de ellas fue la proteína NicX obtenida del proceso de purificación sin tratamientos adicionales. La segunda consistió en una muestra de la proteína NicX (25  $\mu\text{M}$ ), que fue incubada con Fe (II) (1 mM) durante 2 h en presencia de DTT (10 mM), y posteriormente dializada durante 12 h a 4 °C frente a 1 l de tampón fosfato 20 mM, pH 7.5 con DTT (10 mM).

El blanco del análisis se preparó en el mismo tampón, y también los patrones para la recta patrón, que consistieron en disoluciones de Fe (II) de concentraciones: 0, 1.6, 3.2, 6.25, 12.5, 25, 50 y 100  $\mu\text{M}$ .

## **8.7 Ultracentrifugación analítica**

Los análisis mediante velocidad y equilibrio de sedimentación de NicX 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 NicX purificada se preparó a diferentes concentraciones en un tampón fosfato 20 mM, pH 8.0 al que se le añadió Fe (II) (50  $\mu$ M) y DTT (1 mM). En ensayos puntuales la muestra se preparó sin Fe (II) y/o DTT para estudiar la influencia de estos compuestos en el equilibrio hidrodinámico. El ensayo de velocidad de sedimentación se realizó a una velocidad de 40000 rpm, en un volumen de muestra de aproximadamente 350  $\mu$ l. La distribución de coeficientes de sedimentación se calculó mediante el programa SEDFIT (Schuck y Rossmann, 2000). Posteriormente un volumen menor de la solución de NicX fue centrifugado a diferentes velocidades (6000 y 8000 rpm). La línea base fue determinada a continuación mediante centrifugación a alta velocidad (50000 rpm). La masa molecular aparente de NicX fue determinada mediante el ajuste de los datos experimentales a la ecuación que describe la distribución de concentraciones radiales de un soluto ideal en un equilibrio de sedimentación con el programa EQASSOC (Minton, 1994). El volumen específico parcial de NicX (0.732 ml/g) fue calculado a partir de la secuencia de aminoácidos, usando el programa de acceso público SEDNTERP (<http://www.jphilo.mailway.com/download.htm>).

## **8.8 Cristalización de NicX y análisis preliminar de los cristales**

La cristalización y el análisis preliminar de los cristales de NicX se realizó en colaboración con el Dr. Mancheño del Grupo de Cristalografía Macromolecular y Biología Estructural del Instituto Rocasolano (CSIC) de Madrid.

### **8.8.1 Cristalización de NicX**

La determinación de la estructura tridimensional de proteínas mediante difracción de rayos X requiere el empleo de monocristales de tamaño adecuado (McPherson, 1982). Así,

con objeto de determinar la estructura tridimensional de NicX a alta resolución, se procedió a la producción de monocristales de NicX mediante la técnica de *difusión de vapor en gota colgante*. Sobre un cubre siliconizado, se añadió una alícuota de una disolución concentrada de NicX (10 mg/ml), típicamente 1-2  $\mu$ l, la cual se mezcla con un volumen idéntico de diferentes disoluciones de cristalización. Estas disoluciones de cristalización contenían un agente precipitante (sales, polietilenglicol de distinta masa molecular promedio, compuestos orgánicos no volátiles, etc.), un tampón y diferentes aditivos. Como una primera aproximación, la búsqueda de condiciones de cristalización de NicX se llevó a cabo mediante el empleo de disoluciones de las siguientes casas comerciales: Crystal Screens I y II (Hampton Research), Structure Screens I y II (Molecular Dimensions), y los sistemas de Jena Bioscience (<http://www.jenabioscience.com/>). El cubre se dispuso sobre un pocillo de la caja empleada (Linbro) que contenía 500  $\mu$ l de la misma disolución de cristalización. Todos los experimentos de cristalización se llevaron a cabo a una temperatura constante de 19 °C.

### **8.8.2 Experimentos de difracción de rayos X**

Los experimentos preliminares de difracción se realizaron en un generador de ánodo rotatorio, con radiación X de longitud de onda de  $\text{CuK}\alpha$  ( $\lambda=1,5418 \text{ \AA}$ ). El equipo empleado posee un detector CCD kappa 2000 (Brucker Nonius), así como un sistema de crioprotección de cristales por nitrógeno líquido (100 K; Oxford Cryosystems), de forma que se minimiza el decaimiento de la difracción por exposición a los rayos X. Asimismo, el equipo dispone también de sistemas que aumentan la intensidad del haz generado en el ánodo rotatorio (Brucker-Nonius), lo cual es especialmente relevante para el caso de cristales pequeños de proteínas.

Los cristales que mostraban mejor difracción de rayos X fueron posteriormente analizados en el *European Synchrotron Radiation Facility* (ESRF; Grenoble, Francia), concretamente, en la línea ID23-1 ( $\lambda=1.0675 \text{ \AA}$ ; detector: *CCD ADSC Quantum*), donde se obtuvo el conjunto de datos del que se dispone actualmente (180 imágenes).

El análisis del porcentaje de solvente de acuerdo a Matthews (1968), se ha llevado a cabo mediante el uso del servidor “*Matthews Probability Calculator*” (<http://ruppweb.dyndns.org/mattprob/default.html>) (Kantardjieff y Rupp, 2003).

### **8.8.3 Procesamiento de los datos de difracción**

Todos los datos fueron procesados usando los programas MOSFLM (Leslie, 1999) y SCALA del paquete CCP4 (Collaborative Computational Project, Number 4, 1994). El estudio de la simetría local se llevó a cabo analizando la función de autorrotación que fue calculada con el programa POLARRFN, también del paquete CCP4.

### **8.9 Modelado tridimensional de proteínas**

Para la construcción del modelo tridimensional de NicX se identificaron inicialmente homólogos de esta proteína empleando el programa PSI-BLAST (Altschul *et al.*, 1997) con un umbral de *E-value* de 0.001 en las bases de datos no redundantes de proteínas del *Nacional Center for Biotechnology Information* (NCBI). Las secuencias resultantes incluían dos proteínas relacionadas con NicX de estructura conocida: la aminopeptidasa S (AmpS; código PDB: 1zjc) de *Staphylococcus aureus* (Odintsov *et al.*, 2005b) y la aminopeptidasa T (AmpT; código PDB: 2ayi) de *Thermus thermophilus* (Odintsov *et al.*, 2005a), que fueron alineadas con NicX empleando el programa PCMA (Pei *et al.*, 2003). El resultado de los alineamientos múltiples de secuencia se ajustó manualmente empleando un alineamiento consenso y una asignación tridimensional (Ginalski y Rychlewski, 2003), teniendo en cuenta los resultados de los alineamientos basados en la estructura y los de la predicción para la estructura secundaria y terciaria llevados a cabo en el Meta Server (Bujnicki *et al.*, 2001). La confianza de los modelos para la estructura completa de NicX, así como la de los dominios N-terminal y C-terminal, se analizaron empleando el Meta Server y el método 3D-Jury (Ginalski *et al.*, 2003). El alineamiento final de la secuencia a la estructura fue empleado para construir el modelo definitivo con el programa MODELLER (Sali y Blundell, 1993) utilizando AmpS como molde. Este modelo tridimensional fue realizado en colaboración con los doctores Ginalski y Rychlewski del *Interdisciplinary Centre for Mathematical and Computational Modelling* (Universidad de Varsovia, Polonia).

El modelo tridimensional de la proteína NicD fue construido por homología con proteínas  $\alpha/\beta$ -hidrolasas de estructura conocida, empleando el servidor *3D-JIGSAW Protein Comparative Modelling Server* (<http://www.bmm.icnet.uk/servers/3djigsaw/>; Bates *et al.*,

2001). El programa empleó como modelo, y de forma automática, la subunidad  $\alpha$  de la gamma lactamasa de *Aureobacterium* sp. (1hkh\_A).

### **9 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  $\mu$ l/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.

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.

### **10 Caracterización estructural de metabolitos mediante resonancia magnética nuclear (RMN)**

Para los ensayos de RMN de la reacción catalizada por NicX, ésta se llevó a cabo a 25 °C con 0.1 mg de la proteína purificada en 1 ml de tampón fosfato sódico 20 mM a pH 8.0 y pH 3.0. Se empleó una concentración de 0.2 mM de 2,5-DHP para los ensayos de  $^1\text{H}$ , y de 3 mM del mismo sustrato para los de  $^{13}\text{C}$ . En todos los casos la enzima fue previamente incubada en presencia de  $\text{Fe}^{2+}$  (500  $\mu\text{M}$ ) y DTT (10 mM) durante 15 min. Para favorecer la conversión completa del sustrato, la solución de reacción se mantuvo con agitación continua durante 10 min y se comprobó la desaparición del sustrato midiendo la

absorbancia de la mezcla a 320 nm. Todas las muestras se preparan en 100 % de agua deuterada (D<sub>2</sub>O).

Para los ensayos de RMN de la reacción catalizada por NicD, a la disolución de reacción anterior se le añadieron 50 µg de extracto enzimático de *E. coli* BLB21 (DE3) (pETNicD). Se emplearon cantidades variables de sustrato (0.2 mM y 1 mM) a 25 °C durante 15 min y se comprobó la conversión del sustrato mediante HPLC.

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.

## **11 Análisis de los datos de secuencia**

Los análisis de secuencias de nucleótidos se realizaron en el servidor INFOBIOGEN (<http://www.infobiogen.fr/services/menuserv.html#ANALN>). Las búsquedas de marcos abiertos de lectura (ORF) se realizaron con el programa ORF FINDER del servidor del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>). Las secuencias de aminoácidos de los distintos ORF se compararon con las presentes en las bases de datos de genomas secuenciados o en vías de secuenciación empleando el algoritmo TBLSTN (Altschul *et al.*, 1990) del servidor del NCBI ([http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sutils/genom\\_table.cgi](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sutils/genom_table.cgi)). Las búsquedas de similitudes de secuencia se realizaron utilizando el programa BLAST 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 ALIGN (Wilbur y Lipman, 1983) y CLUSTALW (Thompson *et al.*, 1994), respectivamente, en el servidor de INFOBIOGEN. 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](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/>; Cheng *et al.*, 2005). La búsqueda de dominios conservados se realizó con el programa CD-SEARCH (Marchler-Bauer y Bryant, 2004) del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>).



## ***IV RESULTADOS***



## IV RESULTADOS

### **1 Análisis global de las rutas de degradación de compuestos aromáticos en *P. putida* KT2440**

Con el objetivo de realizar un análisis del potencial de *P. putida* KT2440 para degradar compuestos aromáticos de origen natural, se realizaron estudios de crecimiento de la cepa en presencia de una gran variedad de dichos compuestos. Además, la reciente secuenciación del genoma completo de *P. putida* KT2440 (6181 kb; número de acceso AE015451) (Nelson *et al.*, 2002) proporcionaba una herramienta de gran interés que nos permitía realizar por primera vez un análisis *in silico* del mapa genético global implicado en el catabolismo de compuestos aromáticos.

#### **1.1 Identificación de los compuestos aromáticos que son catabolizados por *P. putida* KT2440.**

*P. putida* KT2440 se cultivó a 30 °C con agitación en medio mínimo MC conteniendo diferentes compuestos aromáticos a una concentración final de 5 mM como única fuente de carbono y energía. En estas condiciones, se comprobó que la bacteria era capaz de crecer con benzoato, *p*-hidroxibenzoato, bencilamina, fenilacetato, fenilalanina, tirosina, feniletilamina, fenilhexanoato, fenilheptanoato, feniloctanoato, coniferil alcohol, *p*-cumarato, ferulato, cafeato, vainillato, nicotinato, galato y quinato (compuesto hidroaromático) como única fuente de carbono y energía (Fig. 13). Además el nicotinato también fue utilizado como única fuente de nitrógeno por *P. putida* KT2440. Otros compuestos aromáticos, tales como el 2-hidroxibenzoato (salicilato), 3-hidroxibenzoato, 2,3-dihidroxibenzoato, 2-aminobenzoato (antranilato), *p*-hidroxifenilacetato, tiramina, anilina, atropina, 2-feniletanol, fenol, mandelato, fenilglioxalato, *p*-metoxibenzoato (*p*-anisato), 3,4-dimetoxibenzoato (veratrato), *p*-hidroxi-3,5-dimetoxibenzoato (siringato), cinamato, fenilpropionato, 3-hidroxifenilpropionato, vanililmandelato, ftalato, piridoxal, piridina, isonicotinato, quinolina, isoquinolina, resorcinol, piridoxamina, nicotina, picolinato, 2-hidroxipiridina, 3-hidroxipiridina y 2,3-dihidroxipiridina no permitieron el crecimiento de la bacteria.

A la vista de los compuestos aromáticos que pueden ser mineralizados por *P. putida* KT2440, se puede afirmar que en esta bacteria existen, al menos, cinco rutas centrales de degradación de compuestos aromáticos: la ruta del catecol (genes *cat*), la ruta del protocatecuato (genes *pca*), la ruta del fenilacetato (genes *pha*), la ruta del homogentisato (genes *hmg*), y la ruta del nicotinato (genes *nic*).

### **1.2 Localización cromosómica de los genes implicados en las rutas de degradación de compuestos aromáticos en *P. putida* KT2440**

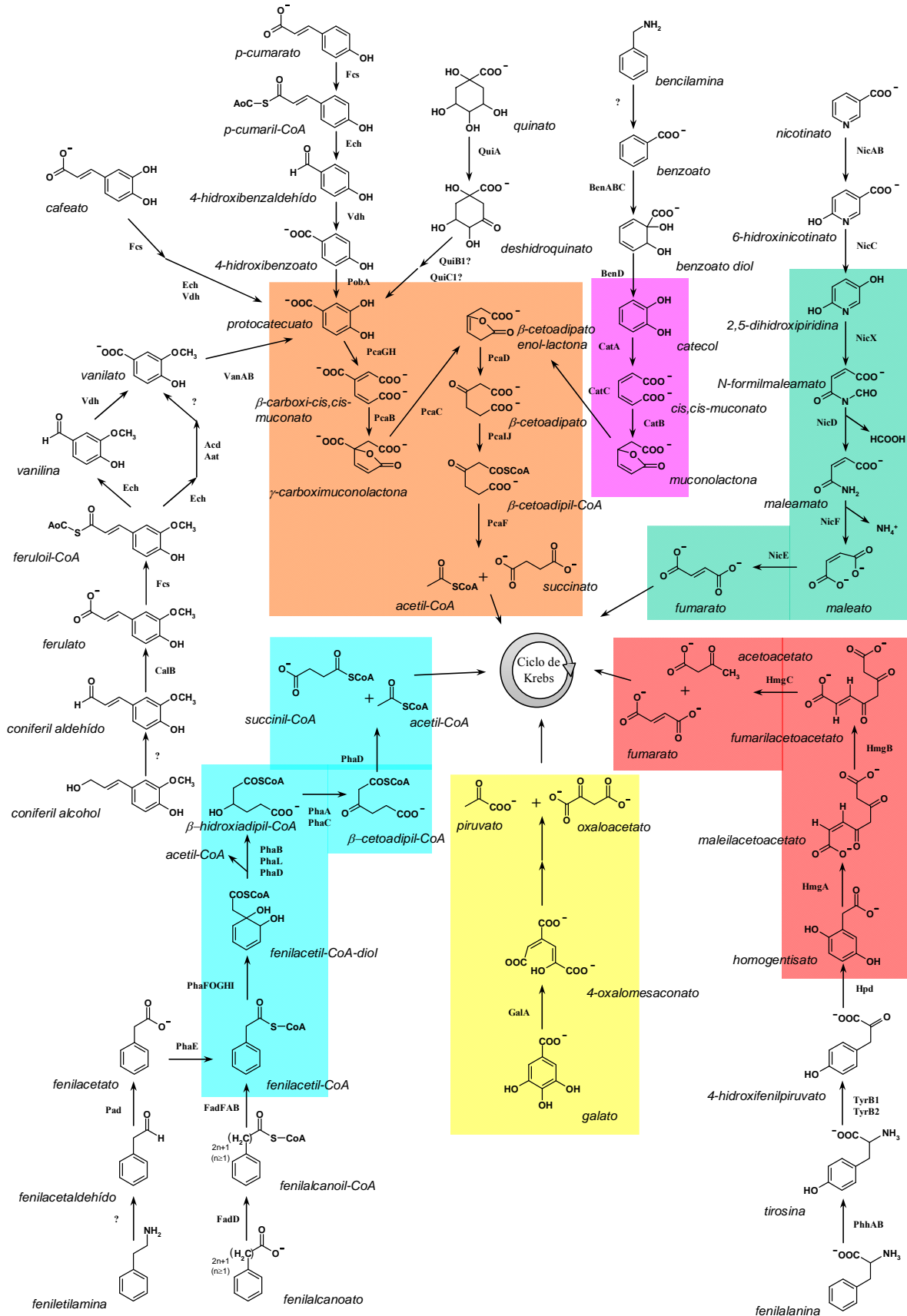
Con la excepción de los genes *nic*, que no han sido caracterizados hasta la fecha en ningún microorganismo, el resto de los genes responsables de las rutas centrales identificadas en *P. putida* KT2440 (genes *cat*, *pca*, *pha*, y *hmg*) ya habían sido descritos en otras bacterias, por lo que se procedió, mediante un análisis de comparación de las secuencias de aminoácidos de los productos génicos, a la localización de los correspondientes genes ortólogos en el cromosoma de *P. putida* KT2440. Como resultado de dicho análisis, se identificaron los genes ortólogos de los genes *cat* y *pca* de las bacterias *Acinetobacter* sp. ADP1 y *P. putida* PRS2000 (Harwood y Parales, 1996), de los genes *pha* de *P. putida* U (Luengo *et al.*, 2001) y del gen *hmgA* que codifica la homogentisato dioxigenasa en *Sinorhizobium meliloti* (Milcamps y de Bruijn, 1999). La localización en el genoma de *P. putida* KT2440 de los agrupamientos (*clusters*) génicos *cat*, *pca*, *pha* y *hmg* se muestra en la figura 14. Además, se localizó un agrupamiento génico entre las posiciones 2861-2867 kb del genoma de *P. putida* KT2440, que contiene 7 genes (genes *gal*) dos de los cuales son similares a los que codifican la protocatecuato-4,5-dioxigenasa (*pcmA*) y la oxalocitromalato aldolasa (*pcmE*) de *Arthrobacter keyseri* (Eaton, 2001), respectivamente. Recientemente, se ha demostrado que el primero de estos genes, denominado *galA*, codifica una galato dioxigenasa (Nogales *et al.*, 2005), por lo que presumiblemente el agrupamiento génico *gal* estará implicado en la degradación del ácido gálico a través de una nueva ruta central no descrita hasta la fecha en *P. putida* KT2440 (Fig. 13). Por otra parte, se identificó otro agrupamiento de 10 genes (*cluster nic*), entre las posiciones 4441-4454 kb del cromosoma de *P. putida* KT2440 (Fig. 14), que contiene algunos genes cuyos productos muestran similitud con enzimas implicados en el metabolismo de compuestos aromáticos *N*-heterocíclicos

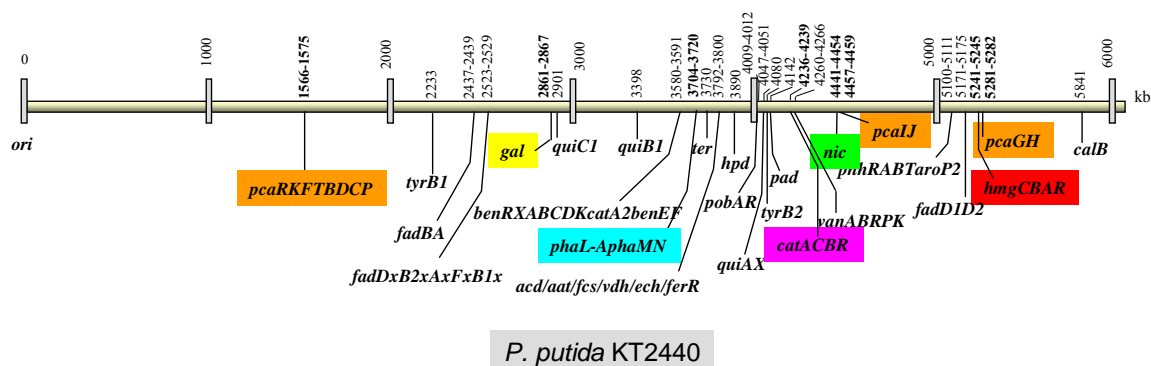
(Lehman *et al.*, 1995), y que son los responsables de una nueva ruta central para la degradación del NA, cuyo estudio detallado es el principal objetivo de esta tesis.

En la figura 14 también se indica la localización cromosómica de los genes implicados en distintas rutas periféricas (*pob*, *ben*, *cal- fcs- ech-vdh- acd-aat*, *van*, *qui*, *phh- tyr- hpd*, *pad*, *fad*) que convergen en alguna de las rutas centrales descritas anteriormente, y que serán analizados más en detalle en los siguientes apartados.

---

**Figura 13. Rutas para el catabolismo de compuestos aromáticos de *P. putida* KT2440.** En la figura se muestran las rutas de degradación de compuestos aromáticos de *P. putida* KT2440, indicando el nombre de los metabolitos y las enzimas responsables de las distintas reacciones (detalladas en las Tablas 8-13). Los interrogantes indican que la enzima que cataliza la reacción es desconocida. Las rutas centrales se muestran sombreadas: en naranja, la ruta central del  $\beta$ -cetoadipato, así como la rama del protocatecuato; en violeta, la rama del catecol de la ruta del  $\beta$ -cetoadipato; en verde, la ruta central de la 2,5-DHP; en azul, la ruta central del fenilacetil-CoA; en amarillo, la ruta central del galato; en rojo, la ruta central del homogentisato. Las rutas del fenilacetato y del galato son propuestas y hasta la fecha tan sólo se ha demostrado la formación del primer intermediario, fenilacetil-CoA y 4-oxalomesaconato, respectivamente. La ruta del nicotinato se ha caracterizado en la presente tesis.





**Figura 14. Localización cromosómica de los genes y agrupamientos génicos que codifican rutas de degradación de compuestos aromáticos en *P. putida* KT2440.** Los genes responsables de las rutas centrales se muestran con el siguiente código de colores: en naranja, genes de la ruta central del  $\beta$ -cetoadipato y de la rama del protocatecuato y de la rama del catecol (*cat*); en amarillo, genes de la ruta del galato (*gal*); en azul, genes de la ruta del fenilacetato (*pha*); en verde, genes de la ruta del nicotinato (*nic*); en rojo, genes de la ruta del homogentisato (*hmg*). También se indica la posición de los genes que codifican las rutas periféricas que finalmente convergen en las rutas centrales. *ori* y *ter*, indican la región de inicio y terminación de la replicación cromosómica, respectivamente.

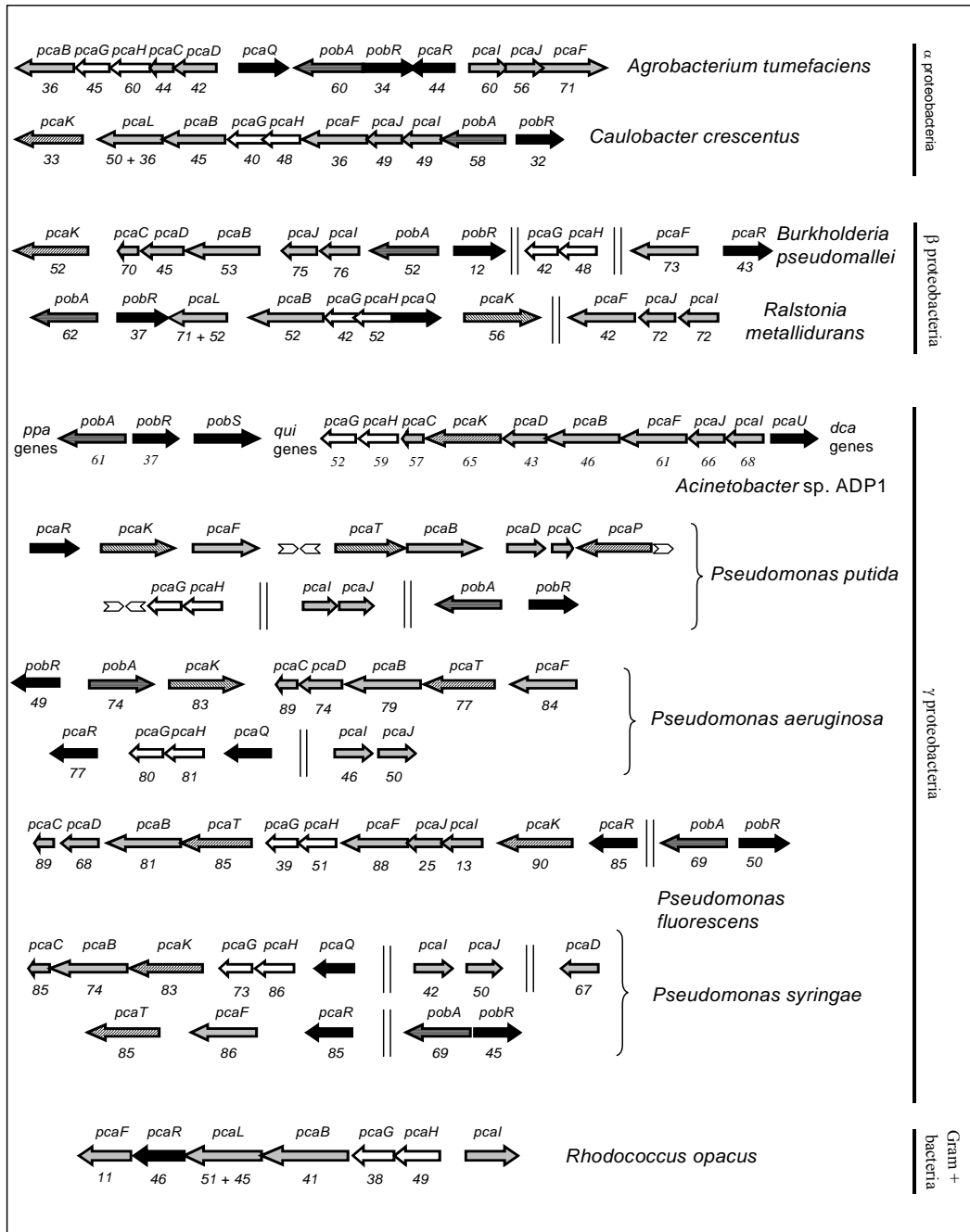
### 1.3. La ruta central del $\beta$ -cetoadipato

Los genes *pca* y *cat* presentes en el cromosoma de *P. putida* KT2440 son significativamente similares a los descritos en otras cepas de *Acinetobacter* y *Pseudomonas* (Harwood y Parales, 1996) (Tablas 8 y 9), por lo que se han asignado a las rutas centrales del protocatecuato y catecol, respectivamente (Fig. 13). En estos organismos cuando el protocatecuato o el catecol sufren una apertura de anillo tipo *orto*, su degradación converge en el intermediario  $\beta$ -cetoadipato enol-lactona, constituyendo así las dos ramas de la ruta central del  $\beta$ -cetoadipato (Harwood y Parales, 1996). La degradación de la  $\beta$ -cetoadipato enol-lactona está catalizada por los productos de los genes *pcaDIJF*, los cuales generan finalmente los intermediarios del ciclo de Krebs, succinato y acetil-CoA (Fig. 13).

Tabla 8. Genes *pca* y *pob* y sus productos en *P. putida* KT2440.

Gen (PP no.)	Producto génico (aa)	Productos génicos relacionados				
		Nombre	Función	Organismo	% identidad/aa	No. acceso
<i>pcaR</i> (PP1375)	PcaR (291)	PcaR	Activador transcripcional (Familia IclR)	<i>P. putida</i> PRS2000	96/291	L33795
<i>pcaK</i> (PP1376)	PcaK (448)	PcaK	Transportador de 4-hidroxibenzoato	<i>P. putida</i> PRS2000	97/448	U10895
<i>pcaF</i> (PP1377)	PcaF (400)	PcaF	$\beta$ -ceto adipil CoA tiolasa	<i>P. putida</i> PRS2000	97/400	U10895
<i>pcaT</i> (PP1378)	PcaT (429)	PcaT	Transportador de $\beta$ -ceto adipato	<i>P. putida</i> PRS2000	98/429	U48776
<i>pcaB</i> (PP1379)	PcaB (450)	PcaB	$\beta$ -carboxi- <i>cis,cis</i> -muconatocicloisomerasa	<i>P. putida</i> PRS2000	81/407	L17082
<i>pcaD</i> (PP1380)	PcaD (260)	PcaD	$\beta$ -ceto adipato enol-lactona hidrolasa I	<i>Acinetobacter</i> sp. ADP1	43/266	L05770
<i>pcaC</i> (PP1381)	PcaC (130)	PcaC	$\gamma$ -carboximuconolactona descarboxilasa	<i>Acinetobacter</i> sp. ADP1	57/134	L05770
<i>pcaP</i> (PP1383)	PcaP (418)	PhaK	Porina	<i>P. putida</i> U	42/417	AF029714
<i>pcaG</i> (PP4655)	PcaG (201)	PcaG	Subunidad $\alpha$ de la protocatecuato 3,4-dioxigenasa	<i>P. putida</i> ATCC23975	98/201	L14836
<i>pcaH</i> (PP4656)	PcaH (239)	PcaH	Subunidad $\beta$ de la protocatecuato 3,4-dioxigenasa	<i>P. putida</i> ATCC23975	97/239	L14836
<i>pcaI</i> (PP3951)	PcaI (231)	PcaI	Subunidad $\alpha$ de la $\beta$ -ceto adipato succinil-CoA transferasa	<i>P. putida</i> PRS2000	98/231	M88763
<i>pcaJ</i> (PP3952)	PcaJ (292)	PcaJ	Subunidad $\beta$ de la $\beta$ -ceto adipato succinil-CoA transferasa	<i>P. putida</i> PRS2000	100/213	M88763
<i>pobR</i> (PP3538)	PobR (292)	PobC	Activador transcripcional (Familia XylS/AraC)	<i>P. putida</i> WCS358	87/293	AJ251792
<i>pobA</i> (PP3537)	PobA (395)	PobA	<i>p</i> -hidroxibenzoato hidroxilasa	<i>P. fluorescens</i>	75/394	X68438





**Figura 15. Organización de los genes *pca* y *pob* en *P. putida* y comparaciones con los genes equivalentes en otras bacterias.** Los genes de la Tabla 8 se representan mediante flechas con el siguiente código: en negro, genes reguladores; con rayado diagonal, genes de transporte; en blanco, genes que codifican la protocatecuato 3,4-dioxigenasa; con rayado horizontal, genes que codifican la *p*-hidroxibenzoato hidroxilasa; en gris, genes catabólicos de la rama del protocatecuato de la ruta del  $\beta$ -cetoadipto. Las puntas de flecha indican secuencias REP de *P. putida*. Dos líneas verticales indican que los genes no están adyacentes en el genoma. Los números debajo de cada gen indican el porcentaje de identidad de secuencia de aminoácidos entre dicho producto génico y el producto equivalente de *P. putida* KT2440. Los dos porcentajes debajo del gen *pcaL* corresponden a los de identidad de secuencia de aminoácidos con los productos de *pcaC* y *pcaD* en *P. putida* KT2440. *pcaQ*, *pobS* y *pcaU* no tienen ortólogos en *P. putida* KT2440. Los genes *ppa*, *qui* y *dca* en *Acinetobacter* sp. ADP1 intervienen en la degradación de los ácidos fenilpropanoides/propenoides, quinato y ácidos dicarboxílicos respectivamente. Las secuencias utilizadas han sido: *A. tumefaciens* C58 (no. acceso AE008232 y AE008233); *C. crescentus* CB15 (no. acceso AE005910); *Acinetobacter* sp. ADP1 (no. acceso L05770); *P. aeruginosa* PAO1 (NC\_002516); *R. opacus* ICP (no. acceso AF003947); *B. pseudomallei* K96243 (NC\_006351); *P. putida* KT2440 (NC\_002947); *P. fluorescens* Pf0-1 (NC\_007492) y *P. syringae* pv. *tomato* DC3000 (NC\_004578); la secuencia de *R. metallidurans* CH34 se analizó a través de la base de datos de genomas microbianos no completos del servidor del NCBI: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sutils/genom\\_table.cgi](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sutils/genom_table.cgi).

Los genes *cat* de *P. putida* KT2440 se encuentran formando parte de un único agrupamiento entre las posiciones 1566-1575 kb del cromosoma, mientras que los genes *pca* están organizados en tres agrupamientos diferentes: el agrupamiento *pcaRKFTBDCP* entre las posiciones 1566-1575 kb, los genes *pcaIJ* entre las posiciones 4457-4459 kb, y los genes *pcaGH* entre las posiciones 5281-5282 kb (Fig. 14). El orden de estos genes en los diferentes agrupamientos se encuentra conservado con respecto al que presenta *P. putida* PRS2000 (Harwood y Parales, 1996). Sin embargo, en los genomas de *P. fluorescens*, *P. syringae* y *P. aeruginosa*, la organización de los operones *pca* es distinta a la observada en *P. putida* (Fig. 15).

Los genes *cat* (Tabla 9) se encuentran generalmente organizados en un único agrupamiento (Harwood y Parales, 1996) (Fig. 16). Por analogía con el agrupamiento génico *cat* de *P. putida* PRS2000, el regulador transcripcional CatR, de la familia de proteínas reguladoras LysR, será el activador de la expresión de los genes *catBCA* en *P. putida* KT2440 en respuesta al inductor *cis,cis*-muconato. Por otra parte, la proteína PcaR, de la familia de reguladores IclR, será la encargada del control de la expresión de los genes *pcaRKFTBDCP* y *pcaIJ* que se requieren para la conversión del  $\beta$ -carboxi-*cis,cis*-muconato a intermediarios del ciclo de Krebs, de forma idéntica a lo que ocurre en *P. putida* PRS2000 (Harwood y Parales, 1996).

A partir de la similitud de secuencia de los productos génicos *pcaK* y *pcaT* con los correspondientes productos de *P. putida* PRS2000, es posible predecir su participación en el transporte de *p*-hidroxibenzoato y  $\beta$ -cetoadipato, respectivamente (Harwood y Parales, 1996; Parke *et al.*, 2000) (Tabla 8). En el extremo 3' del agrupamiento *pcaRKFTBDCP* (Tabla 8, Fig. 15), se localiza el gen *pcaP* cuyo producto presenta similitud de secuencia significativa con porinas que supuestamente intervienen en la entrada de compuestos aromáticos al interior celular.

Tabla 9. Genes *cat* y *ben* y sus productos en *P. putida* KT2440.

Gen (PP no.)	Producto génico (aa)	Productos génicos relacionados				
		Nombre	Función	Organismo	% identidad/aa	No. acceso
<i>catA</i> (PP3713)	CatA (311)	CatA	Catecol 1,2-dioxigenasa	<i>P. putida</i> mt-2	100/311	D37782
<i>catB</i> (PP3714)	CatB (373)	CatB	<i>cis,cis</i> -muconato cicloisomerasa	<i>P. putida</i> PRS2000	96/374	M16236
<i>catC</i> (PP3715)	CatC (96)	CatC	Muconolactona isomerasa	<i>P. putida</i> PRS2000	97/96	U12557
<i>catR</i> (PP3716)	CatR (290)	CatR	Activador transcripcional (Familia LysR)	<i>P. putida</i> PRS2000	92/289	M33817
<i>benR</i> (PP3159)	BenR (318)	BenR	Activador transcripcional (Familia XylS/AraC)	<i>P. putida</i> PRS2000	97/318	AF218267
<i>benX</i> (PP3160)	BenX (313)	ORF589	Desconocida	<i>C. burnetti</i>	42/138	X93204
<i>benA</i> (PP3161)	BenA (452)	BenA	Benzoato dioxigenasa (subunidad grande componente oxigenasa)	<i>P. putida</i> PRS2000	99/452	AF218267
<i>benB</i> (PP3162)	BenB (161)	BenB	Benzoato dioxigenasa (subunidad pequeña componente oxigenasa)	<i>P. putida</i> PRS2000	97/161	AF218267
<i>benC</i> (PP3163)	BenC (336)	BenC	Benzoato dioxigenasa (componente reductasa)	<i>P. putida</i> PRS2000	97/336	AF218267
<i>benD</i> (PP3164)	BenD (253)	BenD	2-hidro-1,2-dihidroxibenzoato deshidrogenasa	<i>P. putida</i> PRS2000	98/253	AF218267
<i>benK</i> (PP3165)	BenK (442)	BenK	Transportador de benzoato	<i>P. putida</i> PRS2000	97/443	AF218267
<i>catA2</i> (PP3166)	CatA2 (304)	CatA	Catecol 1,2-dioxigenasa	<i>P. putida</i> mt-2	77/311	D37782
<i>benE</i> (PP3167)	BenE (399)	BenE	Proteína de membrana de función desconocida	<i>P. putida</i> PRS2000	93/399	AF218267
<i>benF</i> (PP3168)	BenF (416)	BenF	Posible porina	<i>P. putida</i> PRS2000	96/397	AF218267

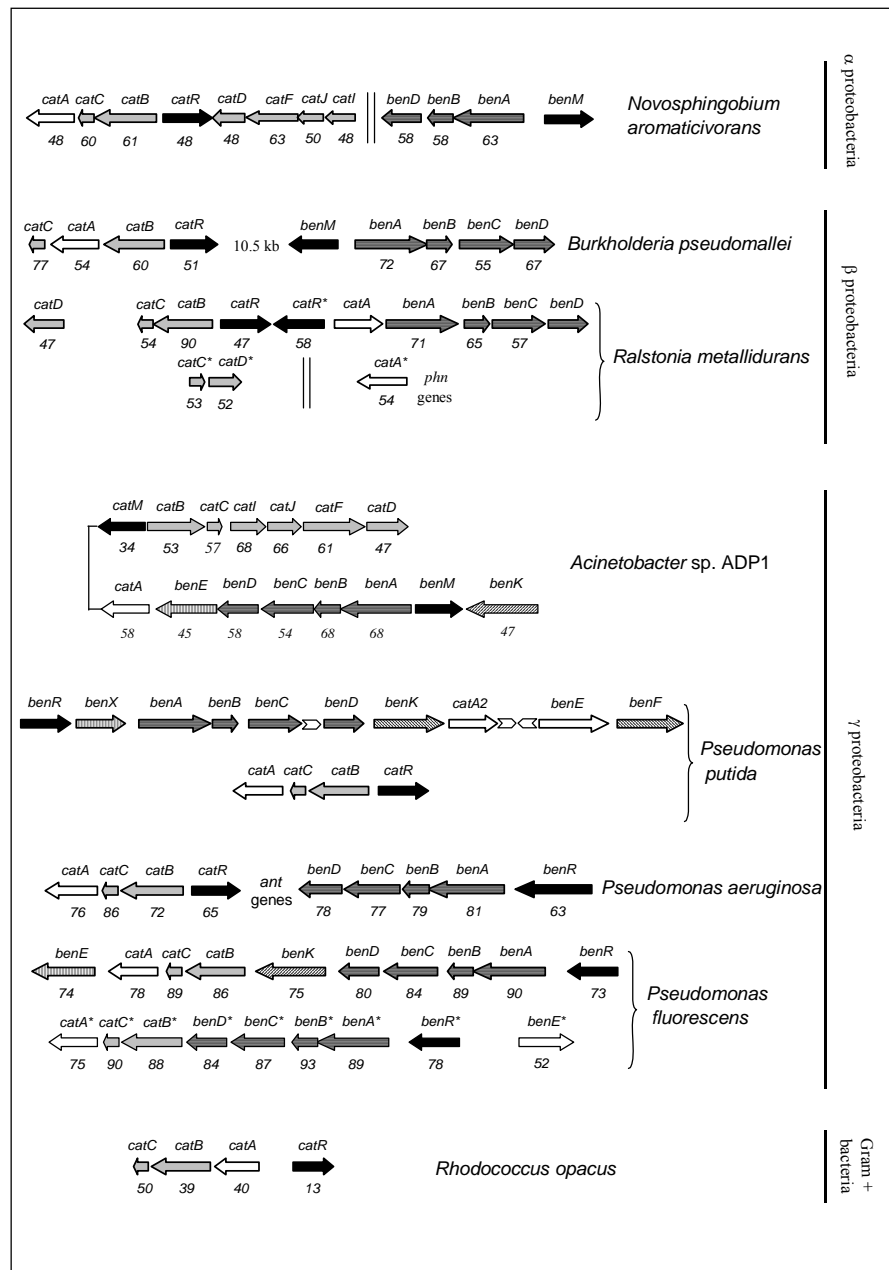
#### **1.4. Rutas periféricas que convergen en la ruta central del $\beta$ -cetoadipato**

Un gran número de compuestos aromáticos (y algunos no aromáticos tales como el quinato) son catabolizados, a través de una serie de rutas periféricas, hasta catecol o protocatecuato y continúan su degradación, por lo tanto, a través de la ruta central del  $\beta$ -cetoadipato.

El benzoato es un compuesto aromático muy frecuente en la naturaleza y su catabolismo, mediante las enzimas codificadas por los genes *ben*, origina catecol. Los genes *ben* ya han sido descritos en *P. putida* PRS2000 y en *Acinetobacter* sp. ADP1 (Collier *et al.*, 1998; Cowles *et al.*, 2000), y los correspondientes ortólogos en *P. putida* KT2440 se localizan en las posiciones 3580-3591 kb (Fig. 14, Tabla 9). El *cluster ben* de *P. putida* KT2440 muestra dos características únicas con respecto al resto de los agrupamientos génicos presentes en otras bacterias del género *Pseudomonas*: (i) además de los genes catabólicos que codifican la benzoato dioxigenasa (*benABC*) y la benzoato dihidrodiol deshidrogenasa (*benD*) necesarias para la conversión del benzoato en catecol (Fig. 13), existe un gen (*catA2*) cuyo producto muestra una elevada identidad con el producto del gen *catA*, que codifica la catecol 1,2-dioxigenasa del agrupamiento *catRBCA* (Fig. 16); (ii) un gen de función desconocida, denominado *benX*, se localiza entre el gen *benR* y el gen *benA*. En el agrupamiento también se encuentra presente el gen *benE*, que codifica una proteína de membrana de función desconocida, y los genes *benK* y *benF* que, en *P. putida* PRS2000, codifican un transportador de benzoato y una porina, respectivamente (Cowles *et al.*, 2000) (Tabla 9). La regulación de la transcripción de estos genes estará mediada por el producto del gen *benR*, un ortólogo del activador transcripcional del *cluster ben* presente en *P. putida* PRS2000 (Cowles *et al.*, 2000).

Aunque existen datos bioquímicos que indican que la bencilamina es transformada en primer lugar en benzaldehído y éste posteriormente en benzoato por algunas cepas de *Pseudomonas* (Cuskey *et al.*, 1987), hasta la fecha los genes responsables de la ruta periférica de la bencilamina en *P. putida* KT2440 no han sido identificados.

Otro sustrato que se metaboliza a través de la ruta del  $\beta$ -cetoadipato es el *p*-hidroxibenzoato (POB), que únicamente requiere de una etapa enzimática para su conversión en protocatecuato, catalizada por la hidroxilasa *PobA*, cuya expresión está controlada por el regulador *PobR* (Harwood y Parales, 1996; Bertani *et al.*, 2001) (Fig. 15). Los genes ortólogos de *pobA* y *pobR* se localizan entre las posiciones 4009-4012 en el cromosoma de *P. putida* KT2440 (Fig. 14). Aunque los genes *pob* no se encuentran ligados a los genes *pca* en *P. putida*, *P. fluorescens* y *P. syringae*, sí se encuentran asociados a esta ruta en *P. aeruginosa* y en otras bacterias (Fig. 15)



**Figura 16. Organización de los genes *cat* y *ben* en *P. putida* y comparaciones con los genes equivalentes en otras bacterias.** Los genes incluidos en la Tabla 9 se representan mediante flechas con el siguiente código: en negro, genes reguladores; con rayado diagonal, genes de transporte; con rayado vertical, genes de función desconocida; en blanco, genes que codifican la catecol 1,2-dioxigenasa; con rayado horizontal, genes que codifican la benzoato dioxigenasa y la dihidrodiol deshidrogenasa; en gris, genes catabólicos de la ruta del catecol. Las puntas de flecha indican secuencias REP de *P. putida*. Dos líneas verticales indican que los genes no están adyacentes en el genoma. Los números debajo de cada gen indican el porcentaje de identidad de secuencia de aminoácidos entre dicho producto génico y el producto equivalente de *P. putida* KT2440. Los porcentajes debajo de los genes *catD*, *catF*, *catI* y *catJ* en *N. aromaticivorans*, *R. metallidurans*, y *Acinetobacter* sp. ADP1 se obtuvieron por comparación con los correspondientes productos génicos *pca* de *P. putida* KT2440. El gen *benM* no tiene ortólogo en *P. putida* KT2440. Los asteriscos indican una segunda copia del gen en el genoma. Los genes *phn* y *ant* en *R. metallidurans* y *P. aeruginosa* corresponden a los genes para la degradación de fenol y antranilato, respectivamente. Las secuencias utilizadas son: *Acinetobacter* sp. ADP1 (no. acceso AF009224); *P. aeruginosa* PAO1 (NC\_002516); *R. opacus* 1CP (no. acceso X99622); *B. pseudomallei* K96243 (NC\_006350); *P. putida* KT2440 (NC\_002947); *P. fluorescens* Pf0-1 (NC\_007492); *P. syringae* pv. *tomato* DC3000 (NC\_004578); *N. aromaticivorans* (NC\_007794); la secuencia de *R. metallidurans* CH34 se analizó a través de la base de datos de genomas microbianos no completados del servidor del NCBI: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sutils/genom\\_table.cgi](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sutils/genom_table.cgi).

El quinato es un compuesto hidroaromático que mediante una serie de reducciones sucesivas catalizadas por las enzimas QuiA (quinato deshidrogenasa), QuiB (deshidroquinato deshidratasa de tipo I) y QuiC (deshidrosiquimato deshidratasa) se transforma en protocatecuato (Elsemore y Ornston, 1995). Los genes necesarios para estas transformaciones se encuentran en un agrupamiento adyacente al de los genes *pca* en *Acinetobacter* sp. ADP1 (Parke *et al.*, 2000; 2001), que contiene además al gen *quiX* cuyo producto es similar a ciertas porinas. La búsqueda de genes ortólogos en el genoma de *P. putida* KT2440 reveló la existencia de una región (entre las posiciones 4047-4051 kb del cromosoma) que contiene un gen similar a *quiA* (63% de identidad en secuencia de aminoácidos con QuiA de *Acinetobacter* sp. ADP1) y otro similar a *quiX* (30% de identidad en secuencia de aminoácidos con QuiX de *Acinetobacter* sp. ADP1) (Fig. 14). Sin embargo, no se localizaron genes homólogos a los genes *quiBC* de *Acinetobacter* sp. ADP1 en el cromosoma de *P. putida* KT2440. No obstante, en la posición 2091 kb del genoma de la cepa KT2440 se localizó un gen, *quiB1*, cuyo producto presenta un 53 % de identidad con la deshidroquinato deshidratasa QutE de *E. nidulans* (Hawkins *et al.*, 1988). Un segundo gen, *quiC1*, cuyo producto muestra un 32% de identidad con el extremo N-terminal de la 3-deshidrosiquimato deshidratasa QutC de *E. nidulans* (Hawkins *et al.*, 1982), se encuentra en la posición 2091 kb del genoma de *P. putida* KT2440 (Fig. 14).

Los compuestos con estructura de fenilpropenoides tales como el cinamato, ferulato, cumarato, etc., se encuentran formando parte de la estructura de la lignina o de la suberina, anclados a la matriz polimérica a través de enlaces éster o éter. La descomposición de estas macromoléculas constituye la mayor fuente de compuestos fenilpropenoides en el medio ambiente (Parke *et al.*, 2000) y, por lo tanto, estas moléculas son una fuente de carbono común para los microorganismos que colonizan la rizosfera, como es el caso de *P. putida*. En algunas bacterias, la degradación del ácido ferúlico se inicia mediante una ruta que requiere la activación del compuesto a un derivado de CoA. Esta ruta está catalizada por las enzimas Fcs (feruloil-CoA sintetasa) y Ech (enoil-CoA hidratasa/aldolasa), que generan vainillina (Overhage *et al.*, 1999; Priefert *et al.*, 2001). La vainillina se transforma en protocatecuato mediante la actuación de una vainillina deshidrogenasa (producto del gen *vdh*) y una vainillato demetilasa (producto de los genes *vanAB*) (Priefert *et al.*, 1997; Segura *et al.*, 1999) (Fig. 13). Los genes homólogos a *fcs*, *ech* y *vdh* han sido localizados entre las

posiciones 3792-3800 kb del genoma de *P. putida* KT2440, en un agrupamiento en el que también se encuentra el gen *ferR* que codifica una proteína reguladora de la familia MarR (Fig. 14 y Tabla 10). Los ortólogos de los genes *vanAB* han sido identificados entre las posiciones 4260-4266 kb del cromosoma de *P. putida* KT2440 y junto a ellos se sitúa un presunto gen regulador de la familia GntR (*vanR*) (Morawski *et al.*, 2000), un transportador (*vanK*) y una porina (*vanP*) (D'Argenio *et al.*, 1999) (Fig. 14 y Tabla 10).

Existe una vía alternativa para la degradación del ácido ferúlico que ha sido descrita en algunos organismos y que consiste en una serie de reacciones de  $\beta$ -oxidación dependiente de CoA (Priefert *et al.*, 2001) (Fig. 13). Esta ruta está constituida por los genes *aat* y *acd*, que codifican una hipotética  $\beta$ -cetotilasa y una acil-CoA deshidrogenasa, respectivamente, que en el genoma de *P. putida* KT2440 se encuentran ligados a los genes *ech*, *vdh* y *fcs* (Tabla 10). Otras moléculas, como el ácido *p*-cumárico y el ácido cafeico también son degradadas a través de la ruta del protocatecuato en *P. putida* KT2440. El ácido *p*-cumárico se transforma en *p*-hidroxibenzoato, mientras que el ácido cafeico es convertido directamente en protocatecuato. En ambos casos la conversión está catalizada por las enzimas Fcs, Ech y Vdh (Fig. 13), como se ha descrito en distintas bacterias del género *Pseudomonas* (Venturi *et al.*, 1998; Mitra *et al.*, 1999) y en la propia *P. putida* KT2440 (Plaggenborg *et al.*, 2003). El catabolismo del coniferil alcohol en *Pseudomonas* sp. HR199 también conlleva una transformación previa en ácido ferúlico y requiere de la participación de una alcohol deshidrogenasa (CalA) y de una aldehído deshidrogenasa (CalB) (Overhage *et al.*, 1999) (Fig. 13). De estos dos genes, se ha identificado el ortólogo del gen *calB* de *Pseudomonas* sp. HR199 en la posición 5841 kb del cromosoma de *P. putida* KT2440, pero hasta la fecha no ha podido localizarse el correspondiente ortólogo del gen *calA*.

**Tabla 10. Genes y sus productos para el catabolismo de compuestos fenilpropenoides en *P. putida* KT2440.**

Gen (PP no.)	Producto génico (aa)	Productos génicos relacionados				
		Nombre	Función	Organismo	% identidad/aa	No. acceso
<i>ferR</i> (PP3359)	FerR (156)	SlyA	Activador transcripcional (familia MarR)	<i>S. typhimurium</i>	29/146	AJ010965
<i>fcs</i> (PP3356)	Fcs (589)	Fcs	Feruloil-CoA sintetasa	<i>Pseudomonas</i> sp. HR199	75/589	AJ238746
<i>ech</i> (PP3358)	Ech (276)	Ech	<i>p</i> -hidroxicinamoil-CoA hidratasa/lasa	<i>P. fluorescens</i> AN103	92/276	Y13067
<i>vdh</i> (PP3357)	Vdh (482)	Vdh	Vainillina deshidrogenasa	<i>Pseudomonas</i> sp. HR199	80/481	Y11520
<i>aat</i> (PP3355)	Aat (431)	Aat	Hipotética 2-cetotilasa	<i>Pseudomonas</i> sp. HR199	65/431	AJ238746
<i>acd</i> (PP3354)	Acd (609)	Rsc0473	Hipotética acil-CoA deshidrogenasa	<i>R. solanacearum</i>	45/595	AL646059
<i>vanR</i> (PP3739)	VanR (237)	VanR	Represor transcripcional (Familia GntR)	<i>Acinetobacter</i> sp. ADP1	50/251	AF009672
<i>vanP</i> (PP3739)	VanP (417)	OpdK	Hipotética porina	<i>P. aeruginosa</i> PAO1	74/417	AE004903
<i>vanK</i> (PP3740)	VanK (446)	VanK	Transportador de compuestos aromáticos	<i>Acinetobacter</i> sp. ADP1	56/448	AF009672
<i>vanA</i> (PP3736)	VanA (355)	VanA	Subunidad oxigenasa de la vainillato- <i>O</i> -demetilasa	<i>P. putida</i> WCS358	87/353	Y14759
<i>vanB</i> (PP3737)	VanB (316)	VanB	Subunidad reductasa de la vainillato- <i>O</i> -demetilasa	<i>P. putida</i> WCS358	85/315	Y14759
<i>calB</i> (PP5120)	CalB (476)	CalB	Coniferil aldehído deshidrogenasa	<i>Pseudomonas</i> sp. HR199	44/481	AJ006231

### **1.5. El catabolón del fenilacetil-CoA**

Los genes *pha* de *P. putida* KT2440 son homólogos a los genes implicados en la degradación del ácido fenilacético en *P. putida* U, y ambos agrupamientos muestran la misma organización (Luengo *et al.*, 2001). El agrupamiento *pha* en las cepas de *P. putida* se organiza en cuatro posibles operones: i) los genes *phaABCPD* y *phaE*; ii) los genes *phaFOGHI*; iii) los genes *phaJK* y *phaL*, y iv) los genes *phaMN* (Fig. 17 y Tabla 11). El catabolismo aeróbico del ácido fenilacético se lleva a cabo mediante una ruta híbrida que no sigue las reglas convencionales de las rutas clásicas de degradación aeróbica de compuestos



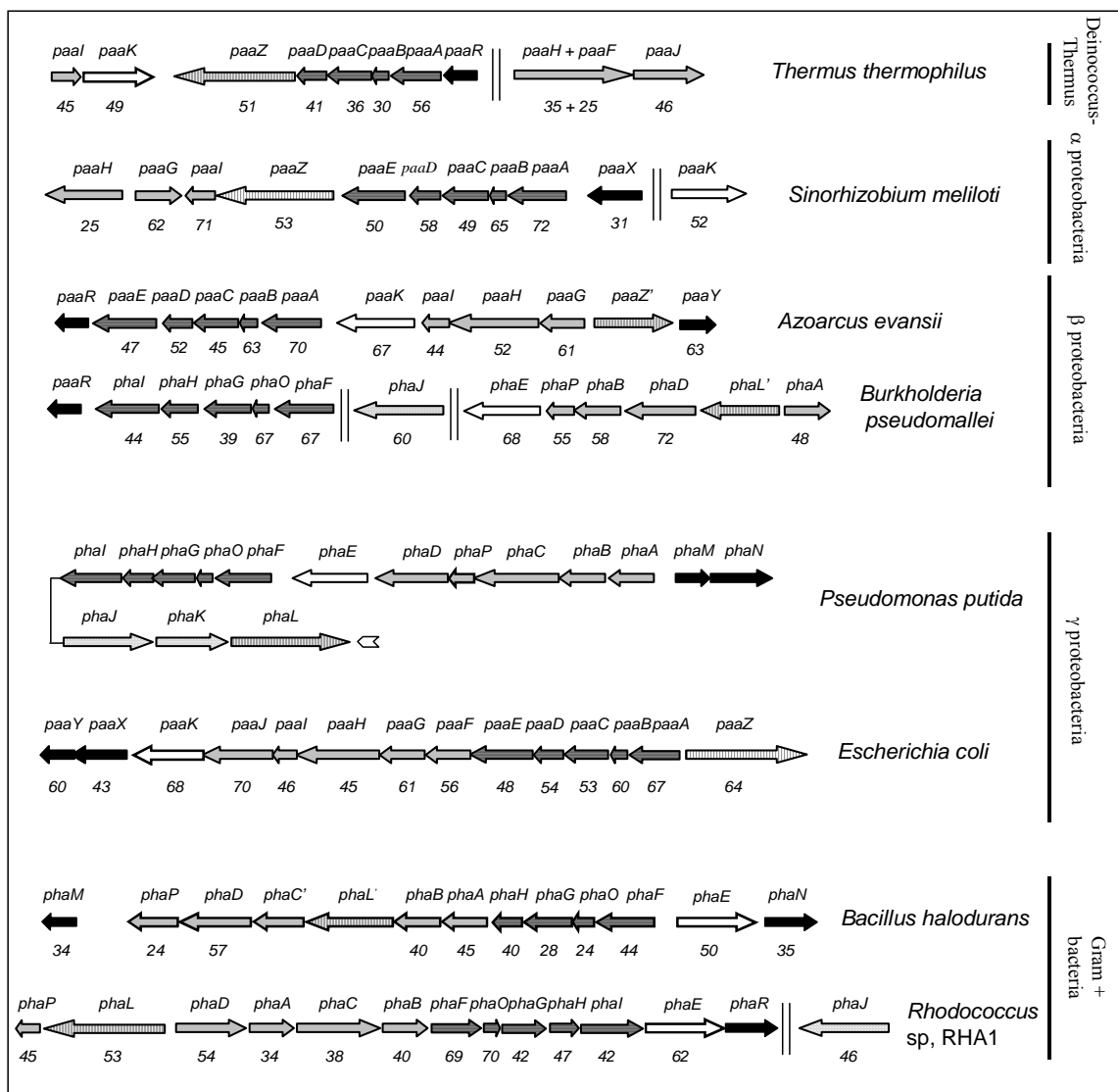
aromáticos (ver apartado 2.4 de la Introducción). Su primera etapa consiste en la conversión del ácido fenilacético a fenilacetil-CoA por la acción de una fenilacetato-CoA ligasa que es el producto del gen *phaE* (Martínez-Blanco *et al.*, 1990). Aunque el resto de las etapas de la degradación no han sido caracterizadas a nivel bioquímico, se ha postulado una ruta catabólica en *E. coli* K-12 analizando mediante RMN los metabolitos que se acumulan en el medio de cultivo de distintos mutantes incapaces de utilizar ácido fenilacético como única fuente de carbono cuando se cultivan en presencia de este aromático y una fuente de carbono adicional (Ismail *et al.*, 2003). De acuerdo a la ruta propuesta, la segunda etapa de la degradación del ácido fenilacético implica una reacción de oxigenación, de la que es responsable la hidroxilasa multicomponente codificada por los genes *phaFOGHI*, que genera el compuesto alicíclico 1,2-dihidro-1,2-dihidroxi-fenilacetil-CoA (Fig. 13). La apertura del compuesto alicíclico y la  $\beta$ -oxidación del mismo estará mediada por los productos de los genes *phaABCD* y *phaL* generando dos moléculas de acetil-CoA y una de succinil-CoA como productos finales (Fig. 13) (Ismail *et al.*, 2003). Los genes *phaJ* y *phaK* codifican una permeasa y un transportador de ácido fenilacético, respectivamente, en *P. putida* U (Olivera *et al.*, 1998). En *P. putida* U, el gen regulador *phaN* codifica un represor transcripcional de la familia GntR, y se encuentra ligado al gen *phaM* de función desconocida (Olivera *et al.*, 1998; García *et al.*, 1999). La organización de los genes *pha* (denominados *paa* en algunas bacterias) difiere entre los genomas de las bacterias estudiadas (Fig. 17), lo que sugiere que en la evolución del cluster *pha* se han producido distintos reordenamientos génicos en distintas bacterias receptoras.

El término catabolón hace referencia a una unidad funcional compleja integrada por diferentes rutas catabólicas que canalizan la transformación de compuestos estructuralmente relacionados hacia un metabolito central común (Luengo *et al.*, 2001). El catabolón del fenilacetil-CoA en *P. putida* KT2440 incluye a las rutas involucradas en la degradación de la 2-feniletilamina, el ácido fenilacético y los ácidos *n*-fenilalcanoicos que contienen un número par de átomos de carbono en su cadena alifática (Fig. 13). La feniletilamina se metaboliza en diferentes microorganismos a través de fenilacetaldehído que, posteriormente, es transformado en ácido fenilacético (Hacisalihoglu *et al.*, 1997; Diaz *et al.*, 2001). Dado que en *P. putida* KT2440 no se han identificado genes homólogos a los que codifican oxidasas de aminas aromáticas que transforman la feniletilamina en fenilacetaldehído, habría

que pensar en la existencia de amino deshidrogenasas que transformasen la feniletilamina en fenilacetaldehído, como se ha descrito previamente para el catabolismo de aminas biógenas en otras cepas de *Pseudomonas* (Durham y Perry, 1978; Iwaki *et al.*, 1983; Cuskey *et al.*, 1987). En cualquier caso, los genes responsables de la degradación de la feniletilamina en *P. putida* KT2440 son aún desconocidos. La transformación del fenilacetaldehído en ácido fenilacético está catalizada por una fenilacetaldehído deshidrogenasa (Pad) (Díaz *et al.*, 2001). Aunque en el cromosoma de *P. putida* KT2440 existen numerosos genes cuyos productos son similares a aril-aldehído deshidrogenasas, el gen localizado en la posición 4142 kb muestra el grado de similitud más elevado con otros genes *pad* presentes en otras bacterias y, por ello, muy probablemente codifique la fenilacetaldehído deshidrogenasa de la cepa KT2440 (Figs. 13 y 14).

**Tabla 11. Genes *pha* y sus productos en *P. putida* KT2440.**

Proteínas homólogas de <i>P. putida</i> U (Acc. No. AF029174)				
Gen (PP no.)	Producto génico (aa)	Nombre	Función	% identidad/aa
<i>phaM</i> (PP3287)	PhaM (199)	PhaM	Hipotética proteína reguladora	97/199
<i>phaN</i> (PP3286)	PhaN (307)	PhaN	Represor transcripcional (Familia GntR)	96/307
<i>phaA</i> (PP3284)	PhaA (257)	PhaA	Hipotética enoil-CoA hidratasa/isomerasa I.	89/257
<i>phaB</i> (PP3283)	PhaB (263)	PhaB	Hipotética enoil-CoA hidratasa/isomerasa II	94/263
<i>phaC</i> (PP3282)	PhaC (505)	PhaC	Hipotética hidroxidipil-CoA deshidrogenasa	91/505
<i>phaP</i> (PP3281)	PhaP (146)	PhaP	Hipotética tioesterasa	93/146
<i>phaD</i> (PP3280)	PhaD (406)	PhaD	Hipotética $\beta$ -cetoacil-CoA tiolasa	96/406
<i>phaE</i> (PP3279)	PhaE (439)	PhaE	Fenilacetato-CoA ligasa	96/439
<i>phaF</i> (PP3278)	PhaF (329)	PhaF	Componente $\alpha$ del presunto complejo de oxigenación	98/329
<i>phaO</i> (PP3277)	PhaO (98)	PhaO	Componente regulador del presunto complejo de oxigenación	99/98
<i>phaG</i> (PP3276)	PhaG (252)	PhaG	Componente $\beta$ del presunto complejo de oxigenación	93/252
<i>phaH</i> (PP3275)	PhaH (177)	PhaH	Componente $\gamma$ del presunto complejo de oxigenación	81/177
<i>phaI</i> (PP3274)	PhaI (358)	PhaI	Componente reductasa del presunto complejo de oxigenación	95/311
<i>phaJ</i> (PP3272)	PhaJ (520)	PhaJ	Transportador de fenilacetato	97/520
<i>phaK</i> (PP3271)	PhaK (417)	PhaK	Porina de fenilacetato	96/417
<i>phaL</i> (PP3270)	PhaL (688)	PhaL	Posible aldehído deshidrogenasa que interviene en la apertura del anillo alicíclico.	96/688



**Figura 17. Organización de los genes *pha* en *P. putida* y comparaciones con los genes equivalentes en otras bacterias.** Los genes incluidos en la Tabla 11 se representan mediante flechas con el siguiente código: en negro, genes reguladores; punteados, genes de transporte; con rayado vertical, genes que codifican una presunta aldehído-deshidrogenasa implicada en la apertura del anillo; en blanco, genes que codifican la fenilacetato-CoA ligasa; con rayado horizontal, genes que codifican el complejo multicomponente fenilacetil-CoA oxigenasa; en gris, genes que implicados en la apertura del anillo y en la posterior  $\beta$ -oxidación del producto alifático. Las puntas de flecha indican secuencias REP de *P. putida*. Dos líneas verticales indican que los genes no están adyacentes en el genoma. Los números debajo de cada gen indican el porcentaje de identidad de secuencia de aminoácidos entre dicho producto génico y el producto equivalente de *P. putida* KT2440. En la figura se muestran las dos diferentes nomenclaturas (genes *pha* y *paa*): *phaE* corresponde a *paaK*, *phaFOGHI* corresponde a *paaABCDE*, *phaL* corresponde a *paaZ*, *phaABCDP* corresponde a *paaFGHIJ*, y *phaMN* corresponde a *paaYX* respectivamente. Los genes *paaZ'*, *phaL'* y *phaC'* poseen el extremo 3' truncado. Los genes *paaR* y *phaR* no tienen ortólogos en *P. putida* KT2440. Las secuencias utilizadas son: *T. thermophilus* HB8 (no. acceso NC\_006461); *S. meliloti* 1021 (no. acceso AL603647); *A. evansii* KB740 (no. acceso AF176259, AJ278756); *E. coli* W (no. acceso X97452); *B. halodurans* C-125 (no. acceso AP001507); *B. pseudomallei* K96243 (NC\_006450) y *P. putida* KT2440 (NC\_002947). La secuencia de *Rhodococcus* sp. RHA1 fue analizada a través del servidor <http://www.rhodococcus.ca/>.

La degradación de ácidos *n*-fenilalcanoicos en *P. putida* requiere de su activación a través de tioésteres de CoA catalizada por una acil-CoA sintetasa codificada por el gen *fadD*.

En una siguiente reacción, una acil-CoA deshidrogenasa (producto del gen *fadF*) cataliza la formación de un doble enlace en la posición 2 de la cadena alifática, y finalmente un complejo de proteínas (FadAB) que posee cinco actividades enzimáticas cataliza la liberación de moléculas de acetil-CoA (Olivera *et al.*, 2001). Aunque el complejo de FadAB cataliza la formación de fenilacetil-CoA a partir de fenilalcanoatos con un número par de átomos de carbono en su cadena alifática, la degradación de fenilalcanoatos con un número impar de átomos de carbono produce *trans*-cinamoil-CoA que no puede seguir la ruta de degradación y es finalmente secretado al medio como ácido cinámico (Olivera *et al.*, 2001). El catabolismo de los ácidos *n*-fenilalcanoicos en *P. putida* U se lleva a cabo por dos complejos de  $\beta$ -oxidación: el primer complejo ( $\beta_I$ ) está codificado por los genes *fadBA* y *fadD1fadD2* que se expresan de forma constitutiva; el segundo complejo ( $\beta_{II}$ ) está codificado por los genes *fadDxfadB2fadAxfadFxfadB1x* y sólo se expresa cuando se mutan algunos de los genes del complejo  $\beta_I$ , además este complejo cataliza la conversión de *n*-fenilalcanoatos con una cadena alifática superior a cuatro carbonos (Olivera *et al.*, 2001). Recientemente, se ha demostrado que la proteína producto del gen *fadFx*, presente en el complejo  $\beta_{II}$  de *P. putida* KT2440 homólogo al de *P. putida* U, no participa en la degradación de fenilalcanoatos, sino que tiene como sustratos ésteres de CoA de ácidos alifáticos como el butiril-CoA, el valeril-CoA o el hexanoil-CoA (McMahon *et al.*, 2005), por lo que este complejo podría estar implicado en la degradación de alcanos alifáticos y, ocasionalmente, en la de fenilalcanoatos. Los genes homólogos a *fadBA*, *fadD1fadD2* y *fadDxfadB2fadAxfadFxfadB1x* han sido identificados entre las posiciones 2437-2439 kb, 5171-5175 kb y 2523-2529 kb, respectivamente, del genoma de *P. putida* KT2440 (Fig. 14), y muy probablemente serán los implicados en el catabolismo de *n*-fenilalcanoatos en esta bacteria (Fig. 13).

### **1.6 La ruta central del homogentisato y el catabolismo de la fenilalanina y tirosina**

Si bien al comienzo de esta tesis los genes implicados en la degradación de homogentisato no habían sido todavía identificados en bacterias del género *Pseudomonas*, en el transcurso de la misma se ha caracterizado la degradación del ácido homogentísico en las cepas *P. putida* KT2440 y *P. putida* U (Arias-Barrau *et al.*, 2004). Los genes responsables de

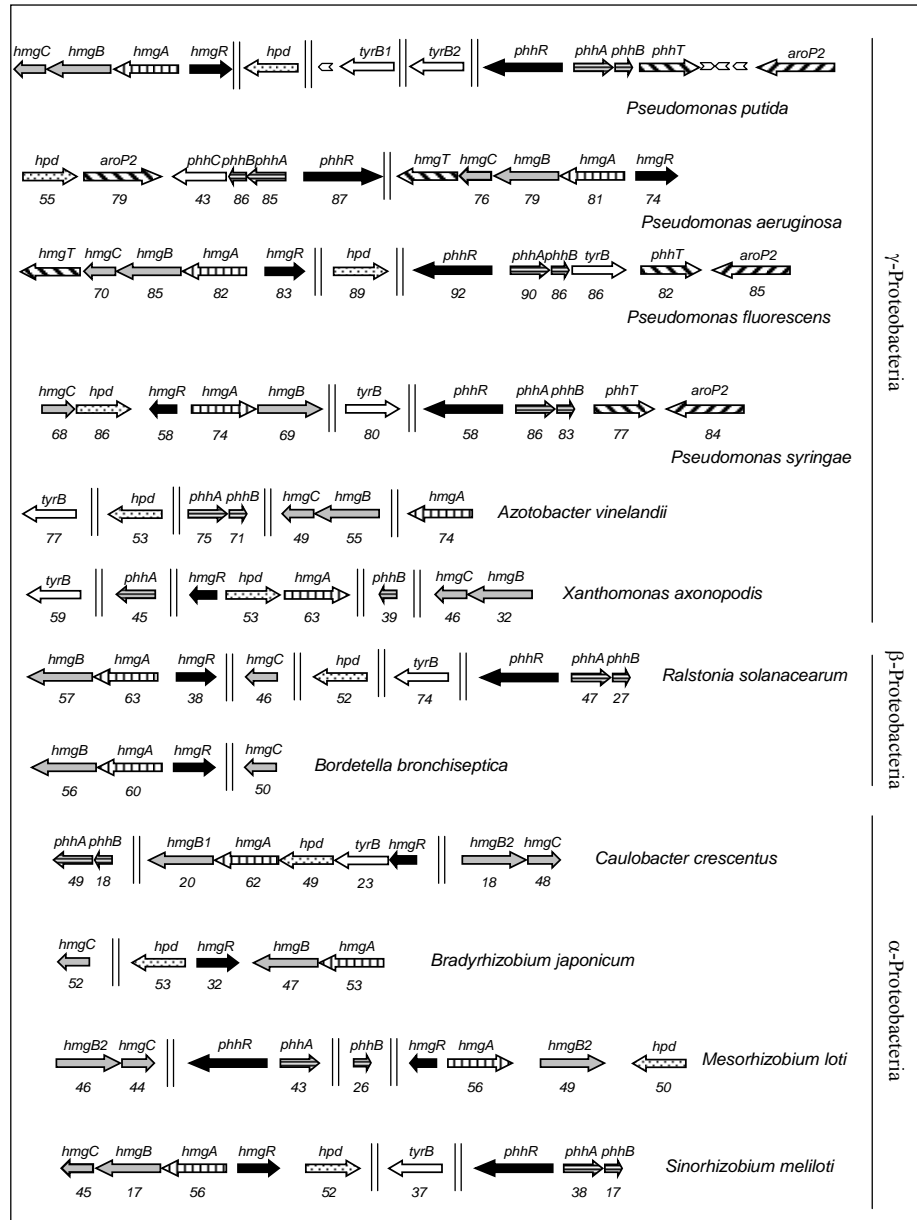
la mineralización del homogentisato se localizan entre las posiciones 5241-5245 del genoma de *P. putida* KT2440, y son similares a los descritos previamente en *S. meliloti* (Milcamps y de Bruijn, 1999) y *E. nidulans* (Fernández-Cañón y Peñalva, 1998). Los genes *hmgABC* codifican las actividades homogentisato dioxigenasa, maleilacetoacetato isomerasa y fumarilacetoacetato hidrolasa, respectivamente, que convierten el homogentisato en fumarato y acetoacetato (Fig. 13 y Tabla 12). El gen *hmgR* se transcribe de forma divergente a los genes catabólicos *hmgABC* y codifica un represor transcripcional perteneciente a la familia IclR de reguladores transcripcionales (Fig. 18 y Tabla 12), siendo el homogentisato la molécula inductora (Arias-Barrau *et al.*, 2004). Estudios de comparación de secuencias han permitido identificar el *cluster hmg* en otras bacterias (Fig. 18).

**Tabla 12. Genes y sus productos para el catabolismo del homogentisato, fenilalanina y tirosina en *P. putida* KT2440.**

Gen (PP no.)	Producto génico (aa)	Productos génicos relacionados				
		Nombre	Función	Organismo	% identidad/aa	No. acceso
<i>hmgR</i> (PP4622)	HmgR (277)	PA2010	Hipotético regulador transcripcional (Familia IclR)	<i>P. aeruginosa</i> PAO1	74/267	AE004627
<i>hmgA</i> (PP4621)	HmgA (433)	HmgA	Homogentisato dioxigenasa	<i>S. meliloti</i> 1021	56/453	AF109131
<i>hmgB</i> (PP4620)	HmgB (430)	Pha	Fumarilacetoacetato hidrolasa	<i>H. sapiens</i>	47/419	M55150
<i>hmgC</i> (PP4619)	HmgC (210)	Mai	Maleilacetoacetato isomerasa	<i>M. musculus</i>	43/216	AF093418
<i>phhR</i> (PP4489)	PhhR (519)	PhhR	Activador transcripcional (Familia NtrC)	<i>P. aeruginosa</i> PAO1	86/518	U62481
<i>phhA</i> (PP4490)	PhhA (262)	PhhA	Fenilalanina hidroxilasa	<i>P. aeruginosa</i> PAO1	84/262	M88627
<i>phhB</i> (PP4491)	PhhB (118)	PhhB	Pterín 4a-carbinolamina hidratasa	<i>P. aeruginosa</i> PAO1	86/118	M88627
<i>phhT</i> (PP4495)	PhhT (400)	PA1993	Hipotética proteína de transporte	<i>P. aeruginosa</i> PAO1	71/402	AE004625
<i>aroP2</i> (PP4499)	AroP2 (478)	AroP	Permeasa de aminoácidos aromáticos	<i>E. coli</i> K-12	65/457	U87285
<i>hpd</i> (PP3433)	Hpd (358)	HPPD	<i>p</i> -hidroxifenilpiruvato dioxigenasa	<i>P. fluorescens</i> A32	88/357	1CJX_A-D
<i>tyrB1</i> (PP1972)	TyrB1 (398)	TyrB	Aminotransferasa de aminoácidos aromáticos	<i>E. coli</i> K-12	50/397	AF029714
<i>tyrB2</i> (PP3590)	TyrB2 (398)	TyrB	Aminotransferasa de aminoácidos aromáticos	<i>E. coli</i> K-12	70/397	AF029714

La ruta del homogentisato es la vía a través de la cual se metabolizan los aminoácidos tirosina y fenilalanina en numerosas bacterias. Los genes responsables de la ruta periférica para la degradación de tirosina y fenilalanina, genes *phh*, también han sido caracterizados en las dos cepas de *P. putida* mencionadas previamente, así como en *P. aeruginosa* (Song *et al.*, 1999). El *cluster phh* se localiza entre las posiciones 5100-5110 kb del genoma de *P. putida* KT2440 y codifica: i) la actividad fenilalanina hidroxilasa (*phhA*) dependiente de pterina y que convierte la fenilalanina en tirosina, ii) la actividad carbinolamina deshidratasa (*phhB*) que participa en la regeneración del cofactor de pterina; iii) un hipotético activador transcripcional dependiente de  $\sigma^{54}$  (*phhR*) (Song y Jensen, 1996), y iv) una presumible proteína de transporte (*phhT*) que es similar a una permeasa de transporte general de aminoácidos aromáticos (*aroP2*) (Figs. 13 y 18; Tabla 12).

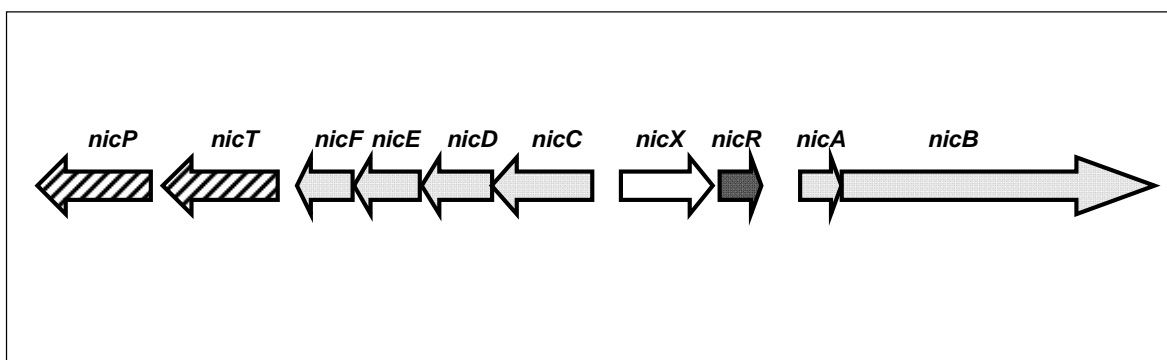
Para la conversión de tirosina en 4-hidroxifenilpiruvato se requiere de una actividad tirosina aminotransferasa (Fig. 13) que en el caso de *P. aeruginosa* y *P. fluorescens* se encuentra codificada por el gen *phhC* presente en el agrupamiento *phh*. Sin embargo, no sucede lo mismo en *P. putida* KT2440 y en *P. syringae*, en las que el gen responsable de la conversión (*tyrB1*) (Arias-Barrau *et al.*, 2004) no se encuentra ligado al resto de los genes *phh* (se localiza en la posición 2233 kb en el genoma de *P. putida* KT2440) (Fig. 14). Aunque no se ha demostrado su implicación en la conversión de tirosina en 4-hidroxifenilpiruvato, en el cromosoma de *P. putida* KT2440 existe un segundo gen (*tyrB2*) localizado en la posición 4080 kb (Fig. 14) y cuyo producto presenta identidad significativa con el del gen *tyrB1*. La última etapa de la ruta periférica para el metabolismo de la fenilalanina y tirosina se encuentra catalizada por la *p*-hidroxifenilpiruvato dioxigenasa, una enzima codificada por el gen *hpd* y que transforma el *p*-hidroxifenilpiruvato en homogentisato (Serre *et al.*, 1999) (Fig. 13 y Tabla 12). En el genoma de *P. putida* KT2440 el gen *hpd* se encuentra situado en la posición 3890 kb (Fig. 14).



**Figura 18. Organización de los genes que codifican las rutas catabólicas del homogentisato y de la fenilalanina y tirosina en *P. putida*, y comparaciones con los genes equivalentes en otras bacterias.** Los genes incluidos en la Tabla 12 se representan mediante flechas con el siguiente código: en negro, genes reguladores; con rayado diagonal, genes de transporte; con rayado vertical, genes que codifican la homocitocromo dioxigenasa; con rayado horizontal, genes que codifican la fenilalanina hidroxilasa; en gris, genes catabólicos de la ruta del homogentisato; con punteado, genes que codifican la *p*-hidroxifenilpiruvato dioxigenasa; en blanco, genes que codifican la aminotransferasa de aminoácidos aromáticos. Las puntas de flecha indican secuencias REP de *P. putida*. Dos líneas verticales indican que los genes no están adyacentes en el genoma. Los números debajo de cada gen indican el porcentaje de identidad de secuencia de aminoácidos entre dicho producto génico y el producto equivalente de *P. putida* KT2440. Los valores de identidad de secuencia para los productos de los genes *tyrB* y *phhC* se obtuvieron por comparación con el producto del gen *tyrB1* de *P. putida* KT2440. Los valores de identidad para los productos génicos de *hmgR* que no pertenecen a la familia IclR de reguladores transcripcionales no se muestran. Las secuencias utilizadas son: *P. aeruginosa* PAO1 (NC\_002516); *P. putida* KT2440 (NC\_002947); *P. fluorescens* Pf0-1 (NC\_007493), *P. syringae* pv. *tomato* DC3000 (NC\_004578), *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* XV101, 306 (NC\_003919), *Ralstonia solanacearum* GMI1000 (NC\_003295), *Bordetella bronchiseptica* RB50 (NC\_002927), *Caulobacter crescentus* CB15 (NC\_002696), *Bradyrhizobium japonicum* USDA110 (NC\_004463), *Mesorhizobium loti* MAFF303099 (NC\_002678), *Sinorhizobium meliloti* 1021 (NC\_003047); la secuencia de *A. vinelandii* se analizó a través de la base de datos de genomas microbianos no completos del servidor del NCBI: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sutils/genom\\_table.cgi](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sutils/genom_table.cgi). Figura adaptada de Arias-Barrau *et al.*, 2005.

### 1.7 La ruta de degradación del NA

Tal y como se indicó en el apartado 1.2 de Resultados, el análisis *in silico* del genoma de *P. putida* KT2440 reveló la presencia de un grupo de genes (*cluster nic*) entre las posiciones 4441-4454 kb (Fig. 14), algunos de los cuales eran homólogos a genes implicados en el metabolismo de heterociclos aromáticos y que, por tanto, podrían estar relacionados con el metabolismo del NA en la cepa KT2440 (Tabla 13). En la figura 19 se esquematiza la organización génica del *cluster nic*.



**Figura 19. Organización de los genes que codifican la ruta catabólica del NA en *P. putida* KT2440.** El agrupamiento *nic* corresponde a los genes comprendidos entre las posiciones 4441-4454 kb del cromosoma de *P. putida* KT2440 (No. Acceso NC\_002947). En gris se muestran los genes que codifican proteínas a las que es posible asignar una función catabólica; en negro se muestra el gen cuyo producto es similar a reguladores transcripcionales; con rayado diagonal se indican los genes que codifican un sistema de transporte y en blanco el gen que codifica una proteína de función desconocida.

Como se indicó en el apartado 3 de la Introducción, Behrman y Stanier (1957) habían descrito la ruta bioquímica para la degradación de NA en el género *Pseudomonas* (Fig. 12). La primera etapa consiste en la formación de 6HNA a partir de NA a través de una actividad nicotinato hidroxilasa. En el agrupamiento *nic* existen dos genes, *nicAB*, que podrían codificar la nicotinato hidroxilasa ya que sus productos génicos muestran similitud de secuencia con los de los genes *iorAB* de *Brevundimonas diminuta* 7 (Lehmann *et al.*, 1995) (Tabla 13). La hidroxilasa IorAB cataliza la conversión de otro heterociclo, la isoquinolina, en 1-oxo-1,2-dihidroisoquinolina mediante la hidroxilación de su anillo heterocíclico (Fig. 7). Las proteínas IorA y IorB son similares a las subunidades pequeñas y grandes,



respectivamente, de otras hidroxilasas que poseen como cofactor molibdopterina (ver apartado 2.2 de la Introducción) (Tabla 13).

La segunda etapa de la degradación de NA consiste en la formación de 2,5-DHP a partir de 6HNA (Fig. 9), reacción que ha sido caracterizada en *P. fluorescens* TN5 y en la que participa una 6-hidroxinicotinato 3-monooxigenasa (Nakano *et al.*, 1999), que presenta una elevada similitud de secuencia con el producto del gen *nicC* (Tabla 13).

**Tabla 13. Genes *nic* y sus productos en *P. putida* KT2440.**

Gen (PP no.)	Producto génico (aa)	Productos génicos relacionados				
		Nombre	Función	Organismo	% identidad/aa	No. acceso
<i>nicA</i> (PP3947)	NicA (157)	IorA	Isoquinolina 1-oxidoreductasa (subunidad A)	<i>B. diminuta</i> 7	53/152	Z48918
<i>nicB</i> (PP3948)	NicB (1187)	CoxL	Proteína de la familia aldehído deshidrogenasa/citocromo C	<i>P. aeruginosa</i> PAO1	61/748	A83445
		Mop	Aldehído oxidoreductasa (proteína de unión a molibdeno/hierro/azufre)	<i>D. gigas</i>	20/907	Q46509
		IorB	Isoquinolina 1-oxidoreductasa (subunidad B)	<i>B. diminuta</i> 7	26/781	Z48918
<i>nicC</i> (PP3944)	NicC (382)		6-hidroxinicotinato 3-monooxigenasa	<i>P. fluorescens</i> TN5	60/385	E130001
<i>nicD</i> (PP3943)	NicD (268)	EstA	Lipasa/esterasa	<i>P. aeruginosa</i>	25/315	AAF89744
		BB0273	Proteína de la familia $\alpha/\beta$ hidrolasas	<i>B. bronchiseptica</i>	63/273	NP_CA632277
<i>nicE</i> (PP3942)	NicE (250)	MaiA	Maleato <i>cis/trans</i> -isomerasa	<i>S. marcescens</i>	82/250	AB035810
<i>nicF</i> (PP3941)	NicF (213)	CsHase	N-carbamoilsarcosina amidohidrolasa	<i>Arthrobacter</i> sp.	34/264	AAB23138
		CsHase	Isocorismatasa hidrolasa	<i>C. aurantiacus</i> J-10-F1	53/214	CA058150
<i>nicP</i> (PP3939)	NicP (430)	BenF	Porina específica de benzoato	<i>P. putida</i>	59/443	AF218267
<i>nicR</i> (PP3946)	NicR (158)	MarR	Regulador transcripcional de resistencia múltiple a antibióticos	<i>E. coli</i>	27/138	P27245
<i>nicT</i> (PP3940)	NicT (488)	TtuB	Transportador de tartrato	<i>A. vitis</i>	59/433	Q44470
<i>nicX</i> (PP3945)	NicX (350)	ReutB3788	Proteína conservada (familia de aminopeptidasas AmpS)	<i>R. eutropha</i> JMP134	41/350	ZP_00166515

La ruptura del anillo aromático de la 2,5-DHP está catalizada por una 2,5-dihidroxipiridina dioxigenasa que había sido purificada y caracterizada previamente en *P. putida* N9 (Gauthier y Rittenberg, 1971a), pero no existe información sobre el gen que la codifica. En el agrupamiento *nic* tampoco existe ningún gen que a priori presente similitud de secuencia con dioxigenasas de ruptura de anillo que se hayan descrito previamente (ver apartado 2.3 de la Introducción). De acuerdo con la ruta postulada y los estudios realizados con la 2,5-DHP dioxigenasa (Behrman y Stanier, 1957; Gauthier y Rittenberg, 1971a), la apertura del anillo conlleva la eliminación del grupo formilo del ácido *N*-formilmaleámico como ácido fórmico así como la formación de ácido maleámico (Fig. 12). El ácido maleámico se transforma en ácido maleico tras la acción de una amidohidrolasa (Fig. 12) que, en base a la comparación de secuencias, estaría codificada por el gen *nicF* (Tabla 13). Por último, la conversión del ácido maleico en ácido fumárico está catalizada por una maleato *cis-trans* isomerasa (Fig. 12) (Behrman y Stanier, 1957), que estaría codificada por el gen *nicE* cuyo producto muestra una elevada identidad de secuencia con la proteína MaiA de *Serratia marcescens*, una isomerasa que cataliza la misma reacción (Hatakeyama *et al.*, 2000) (Tabla 13).

En el agrupamiento *nic* existe un presunto gen regulador, *nicR*, que codifica una proteína perteneciente a la familia MarR de reguladores transcripcionales (Tabla 13). Por último, los genes *nicT* y *nicP* estarían implicados en el transporte de NA al interior celular ya que sus correspondientes productos muestran similitud significativa con transportadores de membrana citoplasmática y con porinas de membrana externa, respectivamente (Tabla 13).

Por lo que se refiere a las regiones que flanquean al *cluster nic*, mientras que en el extremo 5' del *cluster* no es posible localizar ninguna ORF que pudiera codificar alguna proteína relacionada con el metabolismo del NA, en el extremo 3' del *cluster* existen diversos genes que podrían estar relacionados con aspectos de regulación y quimiotaxis, así como los genes *pcaIJ* que intervienen en la penúltima etapa de la ruta del  $\beta$ -cetoadipato (Fig. 13). Sin embargo, en la cepa *P. putida* F1, cuyo genoma está siendo secuenciado actualmente ([http://genome.jgi-psf.org/draft\\_microbes/psepu/psepu.home.html](http://genome.jgi-psf.org/draft_microbes/psepu/psepu.home.html)) y que posee un *cluster nic* idéntico al de la cepa KT2440, la región que flanquea el extremo 3' del *cluster* no se corresponde con la identificada en la cepa KT2440, lo que sugiere que sólo los genes *nicABCDEFPRTX* constituyen el *cluster nic* de *Pseudomonas*.

En los siguientes apartados de Resultados se procederá a confirmar experimentalmente la implicación de los genes *nic* en el catabolismo del NA en *P. putida* KT2440, así como a la caracterización molecular de los distintos genes *nic*.

## **2 Los genes *nic* son los responsables del catabolismo del NA en *P. putida* KT2440**

Los resultados de la comparación de secuencias que se muestran en la tabla 13 sugieren que los genes *nic* localizados entre las posiciones 4441239-4453956 del cromosoma de *P. putida* KT2440 están relacionados con el metabolismo del NA. Más aún, a través de esta comparación es posible inferir el papel de alguno de estos productos génicos. Sin embargo, para poder correlacionar estos genes con el catabolismo de este heterociclo, es necesario establecer una relación directa entre su funcionalidad y la capacidad de la bacteria para utilizar este compuesto como fuente de carbono, nitrógeno y energía. Para ello, se inactivaron mediante mutagénesis insercional varios genes *nic*, y se comprobó el fenotipo de las cepas mutantes mediante ensayos de crecimiento utilizando NA como única fuente de carbono, y valorando alguna de las actividades enzimáticas implicadas.

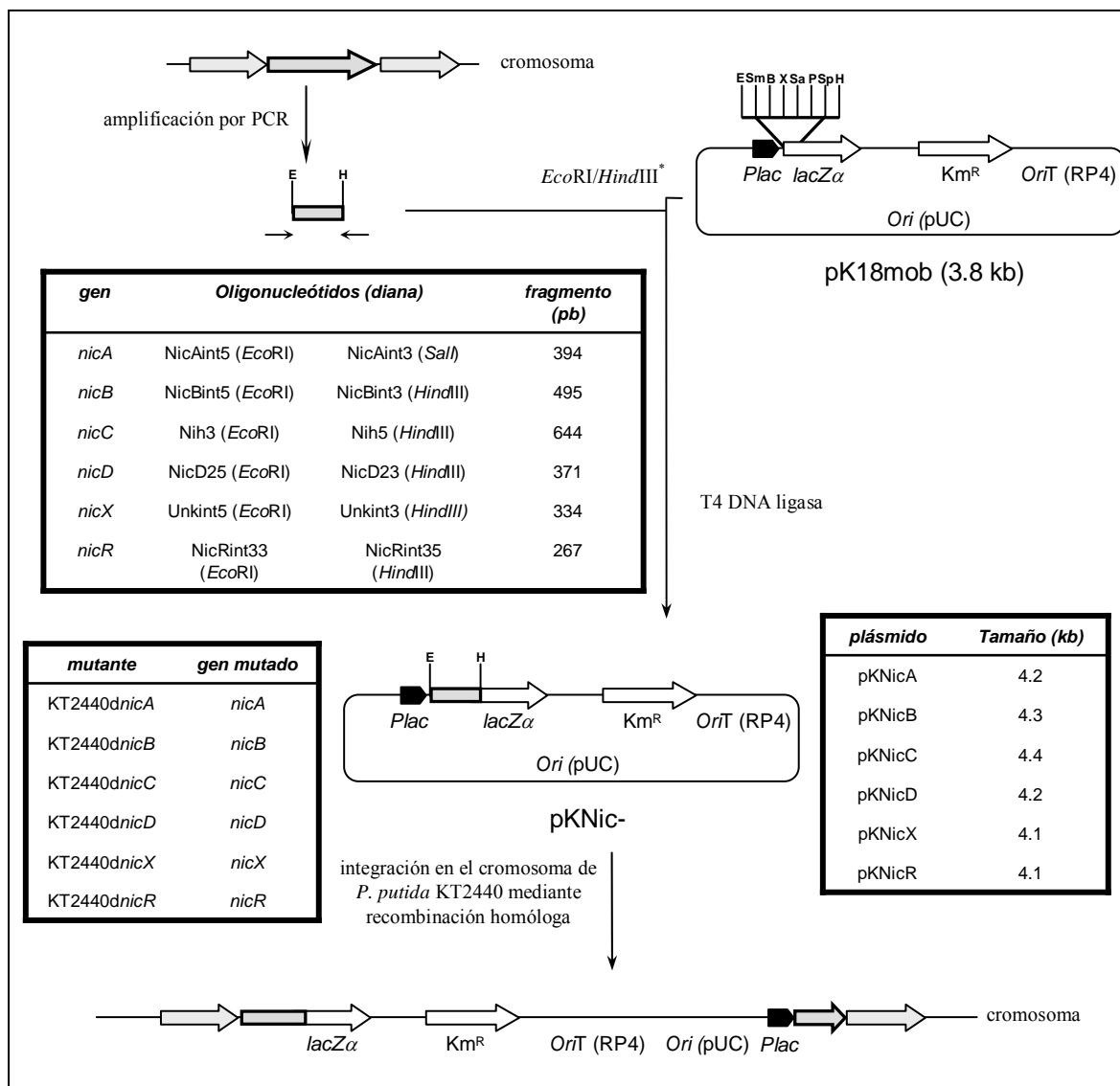
### **2.1 Construcción de mutantes en los genes *nic* de *P. putida* KT2440**

Los distintos mutantes de *P. putida* KT2440 en los genes *nic* se construyeron mediante disrupción insercional de dichos genes siguiendo el procedimiento que se detalla en el apartado 6.4 de Materiales y Métodos. Un esquema del proceso de mutación, junto con los distintos mutantes generados, se muestra en la figura 20.

### **2.2 Caracterización del fenotipo de los mutantes *P. putida* KT2440*dnic***

Para caracterizar los mutantes de inserción en los genes *nic* de *P. putida* KT2440 se comprobó, en primer lugar, si los mutantes generados tenían alterada su capacidad de crecer

en NA o 6HNA como única fuente de carbono y energía. Los resultados se resumen en la tabla 14.



**Figura 20. Representación esquemática de la construcción de los mutantes de inserción en los genes *nic* de *P. putida* KT2440.** Se amplificaron fragmentos internos de distintos genes *nic* por PCR utilizando los oligonucleótidos que se indican (su secuencia se detalla en la Tabla 7) y DNA genómico de *P. putida* KT2440 como molde, generando los fragmentos indicados. Posteriormente, los fragmentos resultantes se clonaron mediante digestión previa con las enzimas de restricción *EcoRI* y *HindIII*, con la excepción del fragmento interno de *nicA* que se clonó mediante digestión con *EcoRI* y *SalI*, en el plásmido pK18mob generando los plásmidos pKNic que se detallan. Los plásmidos fueron transferidos por conjugación triparental a *P. putida* KT2440 dando lugar a los mutantes indicados. Las abreviaturas utilizadas son: *Plac*, promotor *lac*; *lacZα*, fragmento que codifica la subunidad  $\alpha$  de la  $\beta$ -galactosidasa;  $Km^R$ , gen que confiere resistencia a kanamicina; *ori*pUC, origen de replicación *colE1* de los plásmidos pUC; *oriT* RP4, origen de transferencia conjugativa del replicón RP4. Las dianas de restricción señaladas son: B, *BamHI*; E, *EcoRI*; H, *HindIII*; P, *PstI*; Sa, *SalI*; Sm, *SmaI*; Sp, *SphI*; X, *XbaI*.

**Tabla 14. Crecimiento en NA o 6HNA de *P. putida* KT2440 y de los distintos mutantes en los genes *nic***

Cepa	Crecimiento en	
	NA	6HNA
KT2440 wt	+	+
KT2440 <i>dnicA</i>	-	+
KT2440 <i>dnicB</i>	-	+
KT2440 <i>dnicC</i>	-	-
KT2440 <i>dnicD</i>	-	-
KT2440 <i>dnicX</i>	-	-
KT2440 <i>dnicR</i>	+/-	+

Como fuente de carbono se empleó NA o 6HNA (ambos a 5 mM) en medio mínimo MC. Los signos + indican que la cepa era capaz de crecer en la fuente de carbono que se indica, mientras que los signos - reflejan la ausencia de crecimiento. En el caso del mutante en el gen *nicR*, el símbolo +/- refleja un crecimiento más lento que el de la cepa parental (ver apartado 4.4 de los Resultados).

A partir de los resultados obtenidos resulta interesante constatar que los únicos mutantes que pierden completamente la capacidad de crecer en NA pero conservan la capacidad de crecer en 6HNA son las cepas KT2440*dnicA* y KT2440*dnicB*. Teniendo en cuenta estos resultados y los análisis de comparación de secuencias (Tabla 13), los genes *nicA* y *nicB*, que se encuentran localizados en el extremo 3' del cluster *nic*, podrían codificar las dos subunidades de la enzima nicotinato hidroxilasa que catalizaría la primera reacción de la ruta, es decir, la hidroxilación del NA a 6HNA.

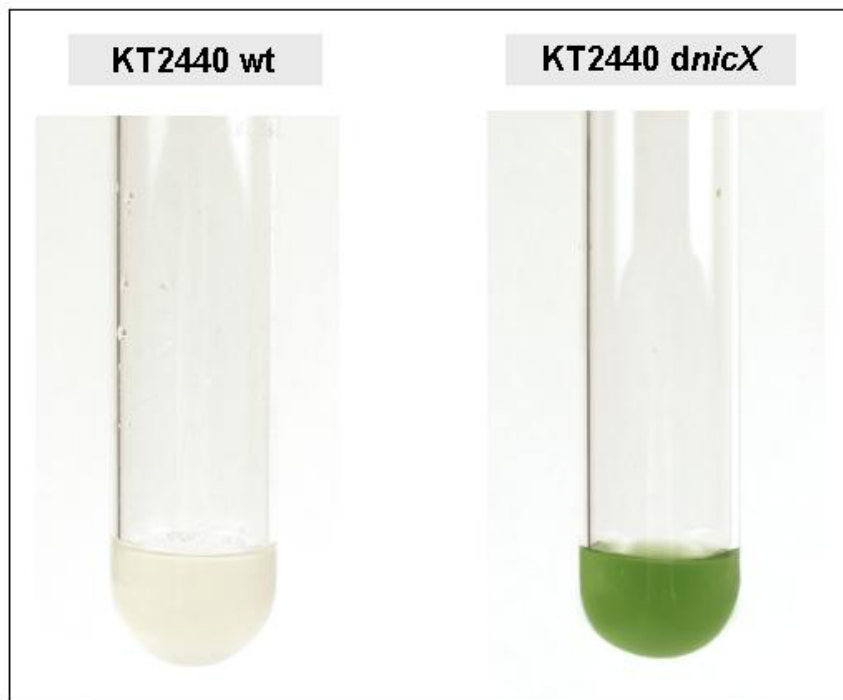
El resto de mutantes *nic* deben de estar afectados en etapas posteriores de la degradación, puesto que no son capaces de degradar ni NA ni 6HNA, a excepción del mutante afectado en el gen *nicR*, que podría codificar un regulador transcripcional (Tabla 13) y cuyo fenotipo se discutirá en el apartado 4.4.

Hay que señalar que el mutante en el gen *nicX*, un gen que no posee similitud significativa con ningún otro gen de función conocida, proporciona un fenotipo muy característico cuando se crece en presencia de NA y una fuente adicional de carbono, como

por ejemplo POB. El mutante acumula en el sobrenadante un pigmento verde (Fig. 21), que podría ser un producto de la oxidación de la 2,5-DHP y cuya formación ya ha sido descrita tanto en el metabolismo del NA (Behrman y Stanier, 1957) como en el de otros derivados de la piridina en los que se ha caracterizado como 4,5,4',5'-tetrahidroxi-3,3'-diazadifenoquinona (Kaiser *et al.*, 1996). La acumulación de este pigmento en *P. putida* KT2440*nicX* sugería que NicX actuaba sobre la 2,5-DHP y, atendiendo a la ruta descrita en la literatura (Behrman y Stanier, 1957; Gauthier y Rittenberg, 1971a), podría tratarse de una 2,5-DHP dioxigenasa, por lo que se procedió a medir esta actividad en la cepa parental *P. putida* KT2440, y en las cepas mutantes *P. putida* KT2440*nicX* y *P. putida* KT2440*nicD*. La cepa *P. putida* KT2440*nicD* posee interrumpido el gen *nicD*, un gen cuyo producto posee una baja identidad de secuencia con proteínas de función conocida (Tabla 13), y que constituye, también, otro candidato que podría codificar la dioxigenasa de ruptura. Para ello, las tres cepas se cultivaron en medio MC suplementado con POB (5 mM) como fuente de carbono, y NA (5 mM) como inductor de los genes *nic*, y se determinó la actividad 2,5-DHP dioxigenasa en los extractos crudos (ver apartado 8.5.3 de Materiales y Métodos). Se observaron niveles de actividad dioxigenasa significativos ( $0.3 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$  proteína) y similares en los cultivos de la cepa salvaje y del mutante en el gen *nicD*, mientras que el mutante en el gen *nicX* no mostró actividad 2,5-DHP dioxigenasa detectable. Estos resultados sugieren, por lo tanto, que el gen *nicX* es responsable de la actividad 2,5-DHP dioxigenasa.

Como conclusión del estudio de los mutantes se deduce, por lo tanto, que los genes *nic* están implicados en el catabolismo del NA en *P. putida* KT2440.

Los experimentos descritos y el estudio *in silico* del *cluster nic* no permiten conocer a priori 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 del NA, así como si se incluyen todos los elementos de transporte y regulación necesarios para su correcta funcionalidad. Con el objetivo de confirmar si el *cluster nic* contiene todos los determinantes genéticos necesarios para el catabolismo del NA, se procedió a la construcción de un casete de DNA que contenía todos los genes *nic*.



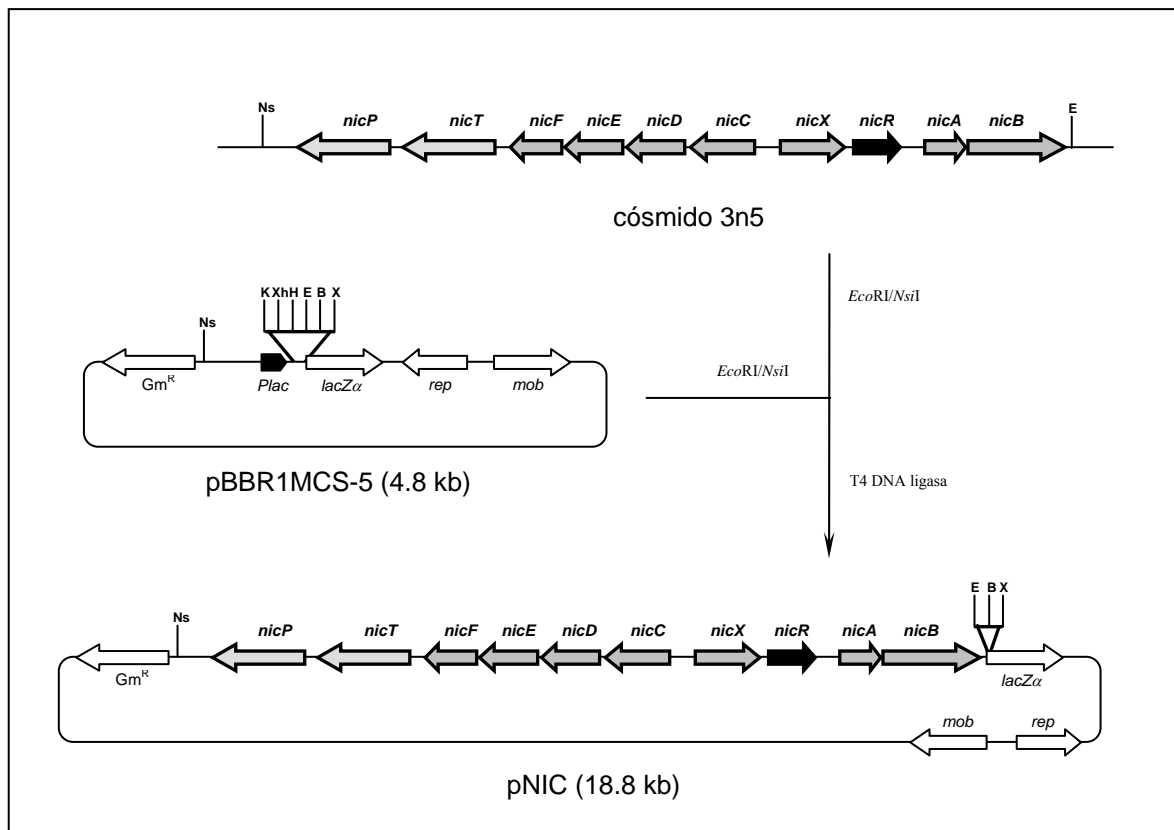
**Figura 21.** Sobrenadantes de la cepa *P. putida* KT2440 y del mutante *P. putida* KT2440*dnicX* cuando se cultivan en medio MC suplementado con POB (5 mM) y NA (5 mM). En las fotografías se muestran los sobrenadantes de los cultivos después de 12 h de incubación a 30°C

### **2.3. Construcción de una casete *nic* movilizable**

El *cluster nic* se aisló de una librería genómica de *P. putida* KT2440 construida sobre el vector Lawrist-7 y amablemente cedida por D. Stjepandic/J.D. Hoheisel. El cósmido 3n5 comprende una región del genoma de KT2440 de alrededor de 40 kb que contiene los genes *nic*. Utilizando dicho cósmido, se aisló el fragmento *NsiI-EcoRI* (14 kb) contenía todos los genes *nic* y se clonó en el vector de amplio espectro de huésped pBBR1MCS-5 (Tabla 6), generando el plásmido pNIC (Fig. 22).

Para comprobar la funcionalidad de los genes *nic* en el plásmido pNIC se analizó su capacidad para complementar el crecimiento en NA de los distintos mutantes *P. putida* KT2440*dnic*. Para ello, el plásmido pNIC fue transferido mediante conjugación triparental de *E. coli* XL1-Blue a los mutantes KT2440*dnicA*, KT2440*dnicB*, KT2440*dnicC* y KT2440*dnicD*. Los exconjugantes se seleccionaron en medio LB suplementado con Km y Gm, y se comprobó que todos ellos habían incorporado el plásmido. Los clones seleccionados se cultivaron en medio mínimo MC que contenía los antibióticos apropiados

(Km y Gm) y NA como única fuente de carbono. En todos los casos, el plásmido pNIC restableció la capacidad de crecimiento en NA, demostrándose así que la casete *nic* era funcional en *P. putida* KT2440.



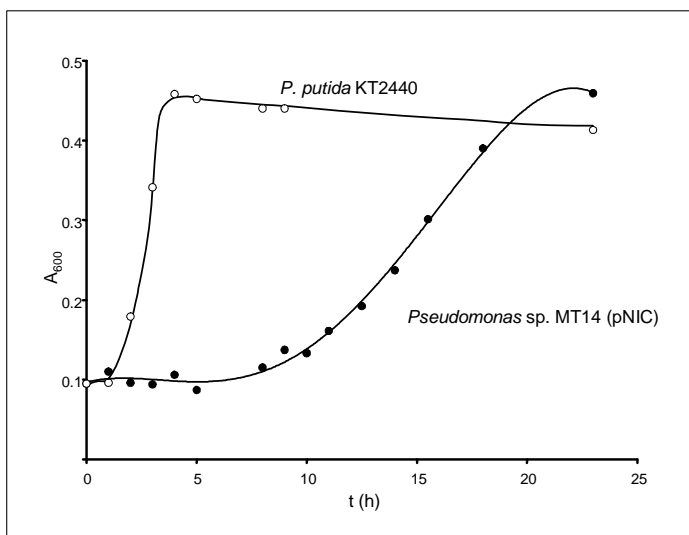
**Figura 22. Representación esquemática de la construcción del plásmido pNIC.** El cósmido 3n5 fue digerido con las enzimas de restricción *EcoRI* y *NsiI* y el fragmento generado de 14 kb se subclonó en pBBR1MCS-5. Las abreviaturas utilizadas son: *lacZα*, fragmento que codifica la subunidad  $\alpha$  de la  $\beta$ -galactosidasa; *Gm<sup>R</sup>*, 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: B, *Bam*HI; E, *Eco*RI; H, *Hind*III; K, *Kpn*I; Ns, *Nsi*I; X, *Xba*I; Xh, *Xho*I. Los genes *nic* aparecen con distintos sombreados. En gris oscuro se muestran los genes catabólicos; en gris claro se muestran los genes transportadores, y en negro el gen regulador.

Para determinar si en la casete *nic* se encontraban presentes todos los genes necesarios y suficientes para la degradación de NA, el plásmido pNIC se transfirió a otras bacterias incapaces de utilizar este ácido heteroaromático como fuente de carbono. En primer lugar, se comprobó si *E. coli* XL1-Blue (pNIC) era capaz de crecer en medio mínimo MC suplementado con NA (5 mM), observándose ausencia de crecimiento. Posteriormente, el



plásmido pNIC fue transferido a otra bacteria más próxima filogenéticamente a *P. putida* para conocer si en un entorno de expresión más similar al de la cepa KT2440 la casete *nic* era capaz de conferir crecimiento en NA a la cepa huésped. Primeramente, se analizó el crecimiento en NA (5 mM) de distintas cepas del género *Pseudomonas* y se comprobó que las cepas *P. putida* N9, *P. putida* U y *P. putida* F1 (Tabla 5) eran capaces de degradarlo, mientras que las cepas *P. fluorescens* R2f, *P. aeruginosa* PG201, *P. stutzeri* DK301, *Pseudomonas* sp. Y2, *Pseudomonas* sp. B13Rif, *Pseudomonas* sp. DSM6412 y *Pseudomonas* sp. MT14 (Tabla 5) no eran capaces de utilizarlo como única fuente de carbono. Se escogió *Pseudomonas* sp. MT14, una cepa que de acuerdo con su secuencia de *16S rDNA* (no. acceso DQ647192; este trabajo) muy probablemente pertenece a la especie *Pseudomonas frederiksbergensis* (Andersen *et al.*, 2000), y se le transfirió mediante electroporación el plásmido pNIC. Los transformantes se seleccionaron primero en medio MC suplementado con Gm y succinato (0.2 %) como única fuente de carbono, y después se transfirieron a medio MC-Gm que contenía NA (5 mM) como sustrato, aislándose clones al cabo de una semana de incubación a 30 °C que contenían el plásmido pNIC. Se comprobó mediante sucesivas inoculaciones en medio MC suplementado con NA (5 mM) que los clones recombinantes no perdían la capacidad de crecer en NA como única fuente de carbono. Cuando se comparó la curva de crecimiento de *Pseudomonas* sp. MT14 (pNIC) con la de *P. putida* KT2440, se observó que la cepa recombinante presentaba una fase de latencia considerablemente más larga que la de la cepa parental (Fig. 23). El hecho de que el crecimiento de *Pseudomonas* sp. MT14 (pNIC) sea sensiblemente más lento que el de la cepa salvaje KT2440 sugiere que aunque la casete *nic* contenga todos los genes necesarios para que la cepa MT14 pueda mineralizar el NA, existe alguna limitación en esta última (niveles de expresión génica, actividades enzimáticas, etc.) que reduce la eficiencia de la ruta.

En resumen, los experimentos realizados con la casete *nic* confirman la implicación de los genes *nic* en la degradación de NA, si bien un catabolismo eficiente de este heterociclo parece requerir una cepa receptora adecuada y podría involucrar genes adicionales que no estén presentes en el *cluster nic*.



**Figura 23. Crecimiento de *P. putida* KT2440 y *Pseudomonas* sp. MT14 (pNIC) en NA.** *P. putida* KT2440 (círculos blancos) y *Pseudomonas* sp. MT14 (pNIC) (círculos negros) se cultivaron a 30 °C en medio mínimo MC suplementado con NA (5 mM). Los dos cultivos provenían de preinóculos crecidos en NA (5 mM). Se registró el aumento de absorbancia a 600 nm ( $A_{600}$ ).

### **3 Caracterización molecular de los genes catabólicos nic**

En el apartado 1 y mediante una aproximación *in silico* se postuló la función de la mayor parte de las enzimas codificadas por los genes *nic* (Tabla 13). En este apartado se demostrarán algunas de esas funciones y se caracterizarán los dos genes *nic* de función desconocida, mediante la clonación y expresión de dichos genes en huéspedes heterólogos que no poseen la ruta de degradación del NA.

#### **3.1 Estudio de los genes nicAB**

Gracias al estudio del crecimiento de los mutantes *P. putida* KT2440 $nicA$  y KT2440 $nicB$  en NA y 6HNA (apartado 2.2) y teniendo en cuenta el análisis de comparación de secuencias de los productos génicos NicA y NicB (Tabla 13), parece lógico asumir que el primer paso de la ruta de degradación de NA en la cepa KT2440 está catalizado por una nicotinato hidroxilasa de dos componentes (NicAB) que transforma el NA en 6HNA, una actividad enzimática que ya se había descrito previamente para la ruta del NA en otros organismos como se ha indicado en el apartado 3 de la Introducción (Fig. 12)

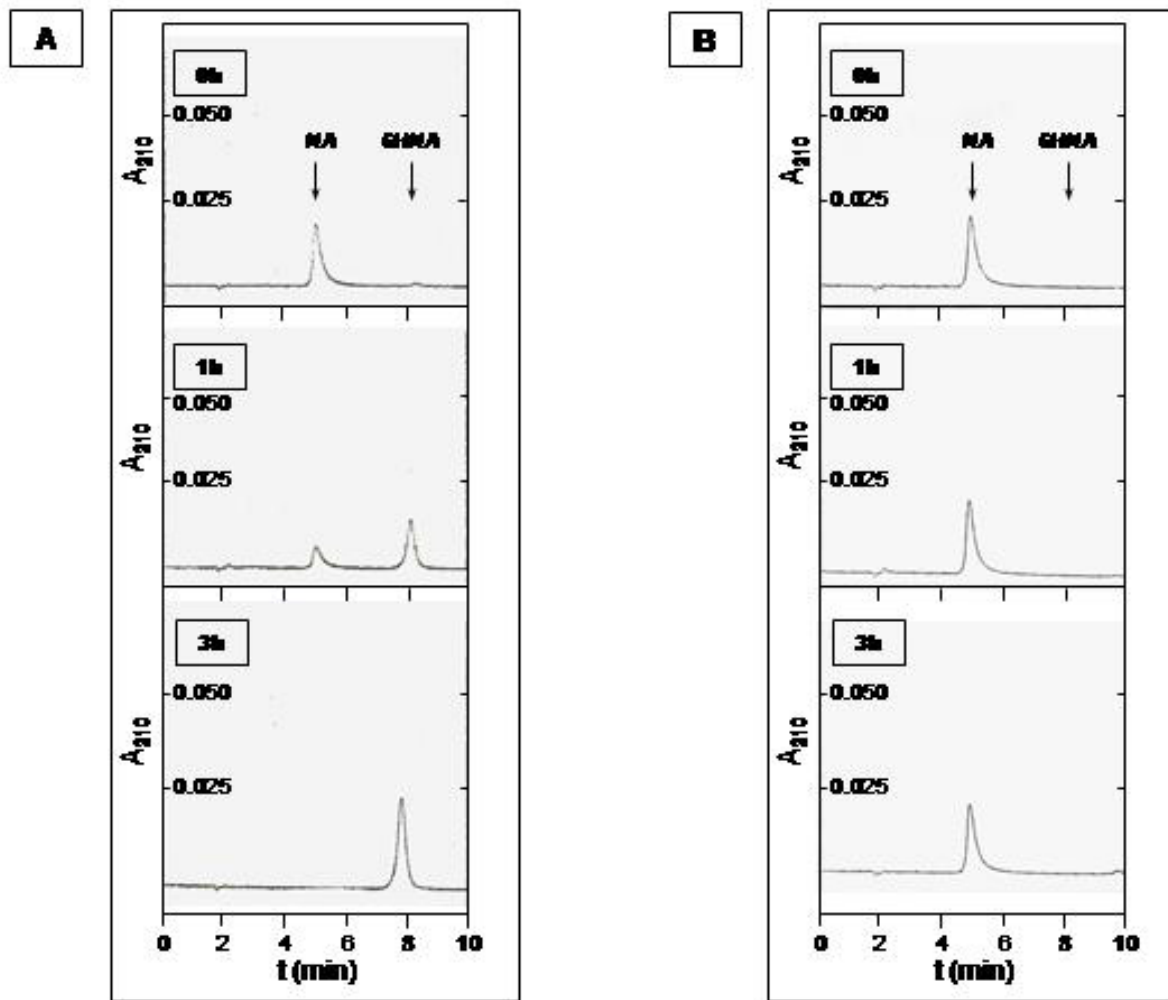
(Behrman y Stanier, 1957; Hunt, 1959; Hirschberg y Ensign, 1971; Jones y Hughes, 1972; Gladyshev *et al.*, 1994).

Una opción para demostrar la funcionalidad de los genes *nicAB* es eliminar por mutación la función de la etapa siguiente de la ruta y analizar el producto que se acumula en el mutante cuando se le proporciona NA en el medio de cultivo. En este sentido y de acuerdo con el análisis de comparación de secuencias (Tabla 13) y la ruta bioquímica descrita en otras *Pseudomonas* (Behrman y Stanier, 1957; Nakano *et al.*, 1999), la segunda actividad enzimática de la degradación de NA estaría codificada por el gen *nicC*, el cual codificaría la 6HNA monooxigenasa responsable de la transformación del 6HNA en 2,5-DH (Fig. 12). Como se ha demostrado anteriormente, la disrupción del gen *nicC* en *P. putida* KT2440*dnicC* impide el crecimiento de la bacteria tanto en NA como en 6HNA (Tabla 14), lo cual está de acuerdo con el hecho de que NicC intervenga en la degradación de 6HNA.

Para confirmar la conversión de NA en 6HNA por el mutante *P. putida* KT2440*dnicC* se realizaron dos tipos de ensayos. En primer lugar, se analizó mediante HPLC el NA y el producto acumulado en el sobrenadante de un cultivo de células creciendo en medio MC con citrato como fuente carbono y en presencia de NA, según el protocolo que se detalla en el apartado 8.5.1 de Materiales y Métodos. En estas condiciones, al cabo de 12 horas, el cultivo alcanzó una  $A_{600}$  de 0.8, y una conversión de NA en 6HNA del 85%.

En un segundo tipo de ensayo, se cultivaron células de *P. putida* KT2440*dnicC* en medio MC con citrato como fuente de carbono en ausencia o en presencia de NA (1 mM) como inductor de los genes *nic*, para posteriormente resuspender las células lavadas en presencia de NA y utilizar una suspensión de éstas (*resting cells*) en un ensayo de conversión de NA siguiendo el protocolo que se detalla en el apartado 8.5.1 de Materiales y Métodos. El proceso de bioconversión del NA se monitorizó mediante HPLC tomando muestras del sobrenadante de las células en suspensión a lo largo del tiempo. Los cromatogramas de los ensayos realizados con células inducidas con NA muestran la existencia de dos picos cuyos espectros de absorción y tiempos de retención coinciden con los de los patrones empleados, es decir, el pico de 4.9 min corresponde al NA (sustrato) y el de 8.1 min al 6HNA (producto) (Fig. 24). En las condiciones de ensayo utilizadas, al cabo de 40 min el 50% del NA se transformó en 6HNA, completándose la conversión de todo el NA a las 3 h. Por el

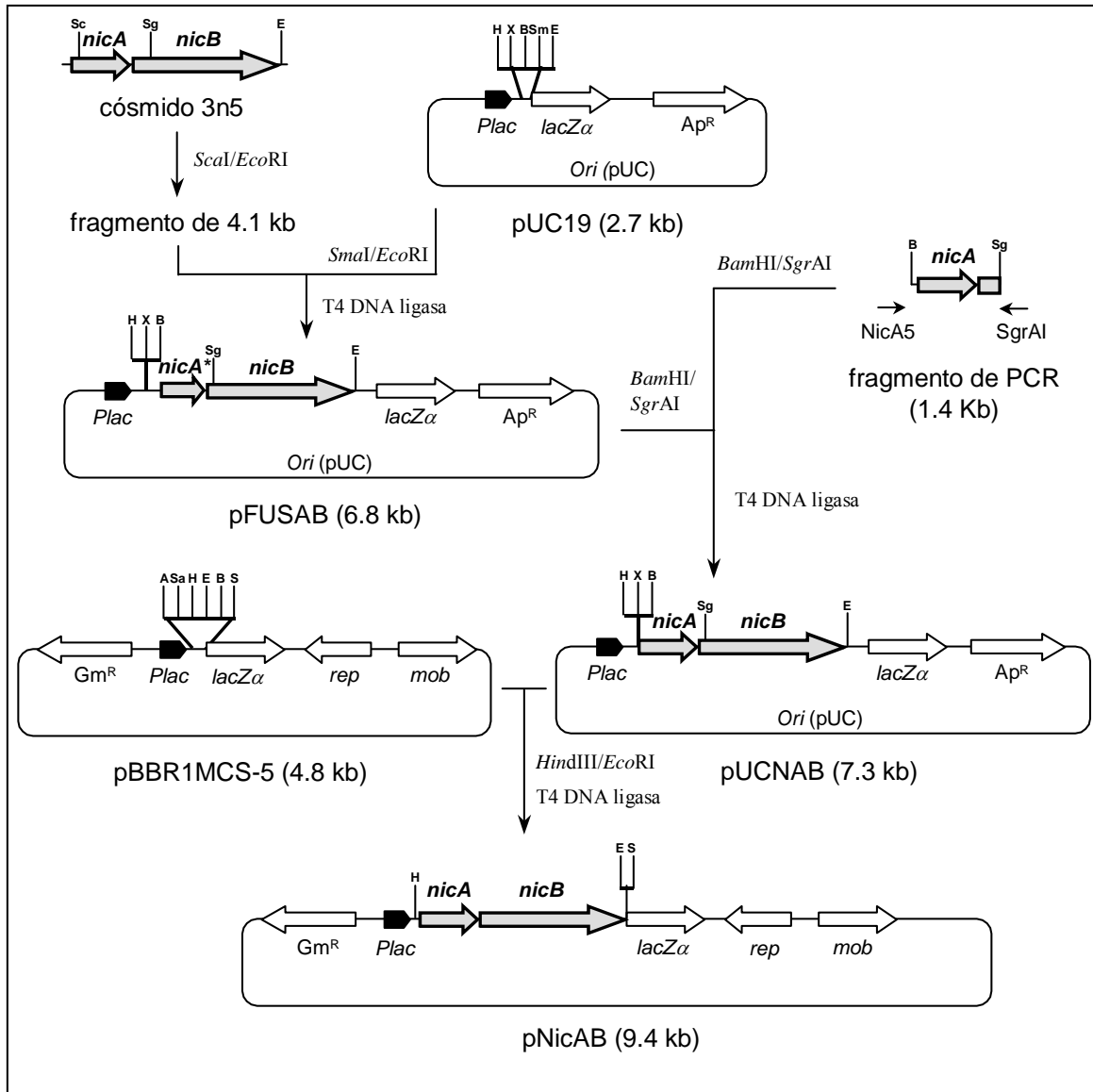
contrario, las células que no habían sido inducidas con NA no mostraron conversión de éste ni siquiera al cabo de 6 h de ensayo.



**Figura 24. Proceso de conversión de NA en 6HNA por células en suspensión de *P. putida* KT2440dnicC.** Las células en suspensión de *P. putida* KT2440dnicC se obtuvieron como se indica en el apartado 8.5.1 de Materiales y Métodos. Se tomaron alícuotas a diferentes tiempos de incubación en presencia de NA (5 mM) y se analizaron mediante HPLC registrando la absorbancia a 210 nm. En el panel A se muestra el proceso de conversión de células de *P. putida* KT2440dnicC cultivadas en medio MC en presencia de citrato 0.2% y NA (1 mM) como inductor. En el panel B se muestra el proceso de conversión de células de *P. putida* KT2440dnicC cultivadas en medio MC en presencia de citrato 0.2% y en ausencia de inductor. Con flechas se indica la posición de los picos de retención correspondientes a los patrones NA y 6HNA.

Los resultados obtenidos con la cepa *P. putida* KT2440dnicC demuestran que la ruta de degradación de NA es inducible cuando las células se cultivan en presencia de este compuesto y que el catabolismo de NA genera 6HNA, el cual se acumula en el medio de cultivo cuando el producto del gen *nicC* no es funcional. Por lo tanto, estos resultados están

de acuerdo con el hecho de que los genes *nicAB* sean los responsables de la actividad NA hidroxilasa que inicia la ruta de degradación de NA en *P. putida* KT2440.



**Figura 25. Representación esquemática de la construcción del plásmido pNicAB.** El cósmido 3n5 fue digerido con las enzimas *ScaI* y *EcoRI*. Se aisló un fragmento de 4.1 kb que comprende el extremo 3' del gen *nicA* (*nicA\**) y el gen *nicB* completo, y se clonó en el vector pUC19 que previamente había sido digerido con *SmaI* y *EcoRI*, generando el plásmido pFUSAB. El gen *nicA\** fue sustituido por el gen *nicA* completo obtenido por PCR a partir de DNA cromosómico de *P. putida* KT2440 empleando la pareja de oligonucleótidos NicA5/SgrAI (Tabla 7), generándose el plásmido pUCNAB. Finalmente, los genes *nicAB* se subclonaron en el vector de amplio espectro de huésped pBBR1MCS-5 como un fragmento *HindIII-EcoRI* de 4.6 kb. Las abreviaturas utilizadas son: *lacZα*, fragmento que codifica la subunidad  $\alpha$  de la  $\beta$ -galactosidasa; *Plac*, promotor *lac*; *Ap<sup>R</sup>*, gen que confiere resistencia a ampicilina; *ori* (pUC), origen de replicación de los plásmidos pUC; *Gm<sup>R</sup>*, gen que confiere resistencia a gentamicina; *rep* y *mob*, genes de replicación y movilización, respectivamente, del plásmido pBBR1MCS-5. Las dianas de restricción señaladas son: A, *ApaI*; B, *BamHI*; E, *EcoRI*; H, *HindIII*; S, *SacI*; Sa, *SalI*; Sc, *ScaI*; Sg, *SgrAI*; Sm, *SmaI*; X, *XbaI*.

Para aportar una demostración experimental directa de que los genes *nicAB* codifican la nicotinato hidroxilasa, éstos se clonaron bajo el control del promotor *Plac* en un vector de amplio espectro de huésped pBBR1MCS-5 (Tabla 6), obteniéndose el plásmido pNicAB (Fig. 25).

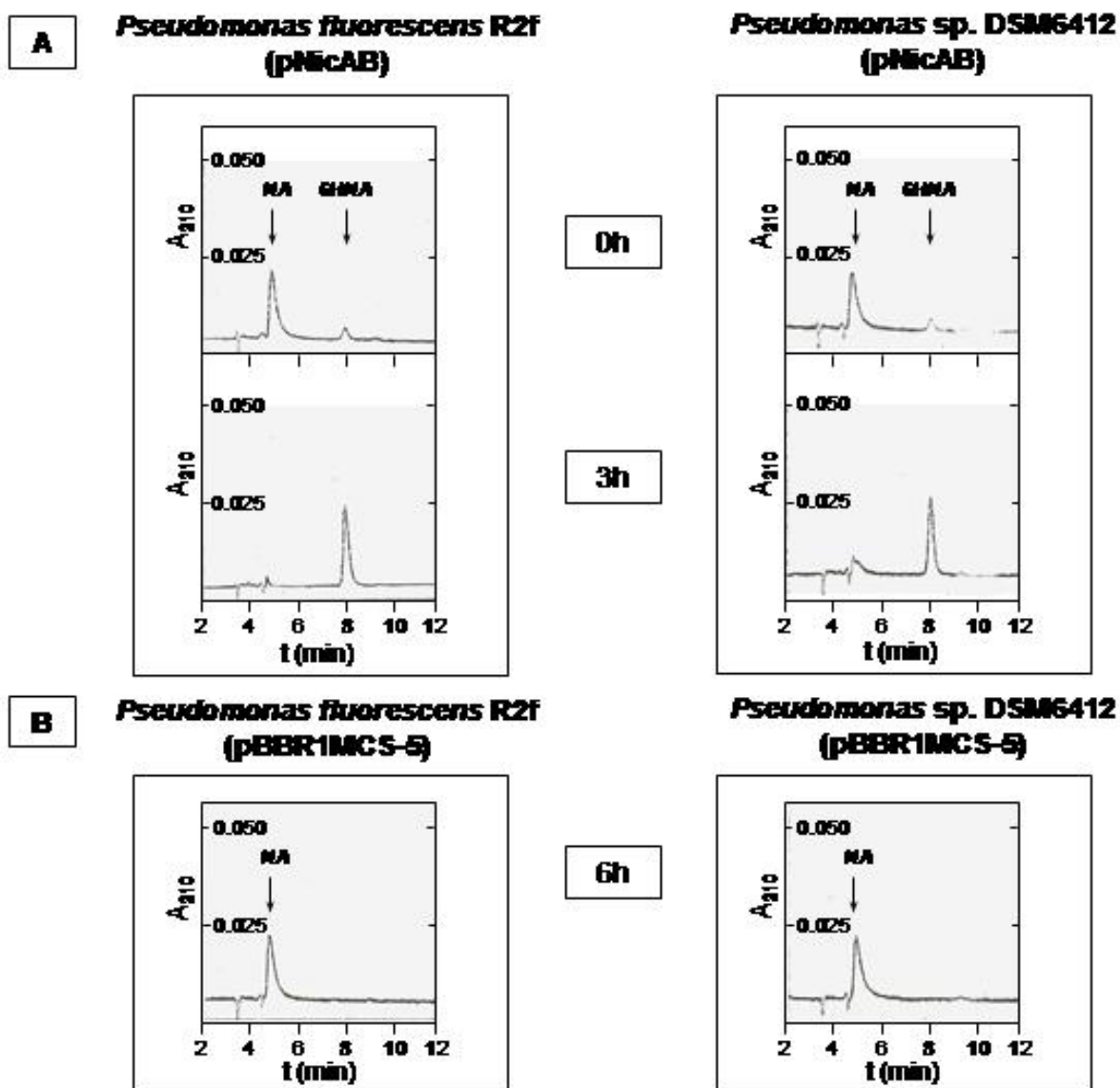


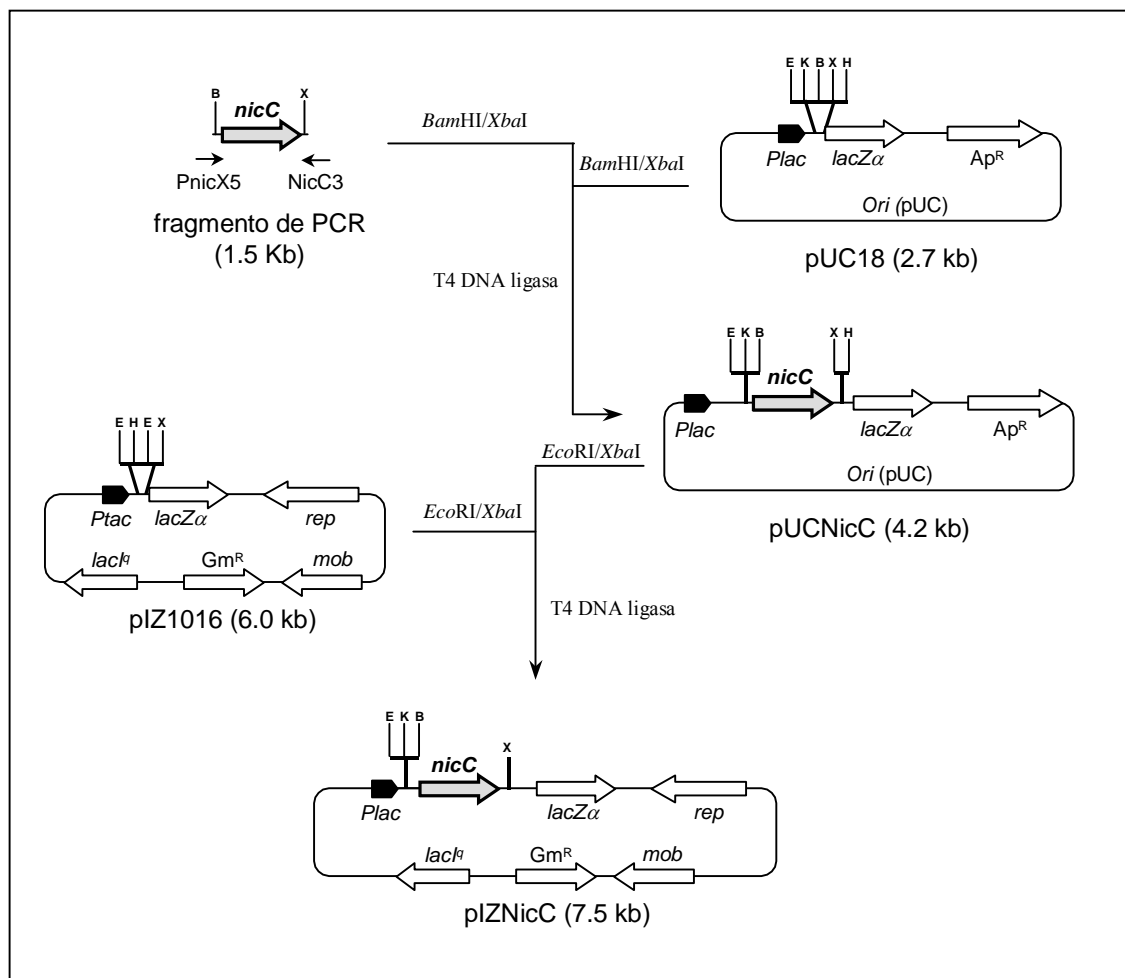
Figura 26. Proceso de conversión de NA en 6HNA mediante células en suspensión de *P. fluorescens* R2f y *Pseudomonas* sp. DSM6412 conteniendo el plásmido pNicAB (Panel A) o el plásmido control pBBR1MCS-5 (Panel B). Las células en suspensión se obtuvieron como se indica en el apartado 8.5.1 de Materiales y Métodos. Se tomaron alícuotas a diferentes tiempos de incubación en presencia de NA (5 mM) y se analizaron mediante HPLC registrando la absorbancia a 210 nm. Con flechas se indica la posición de los picos de retención correspondientes a los patrones NA y 6HNA.

El plásmido pNicAB no fue funcional en *E. coli*, por lo que se transfirió a otras bacterias pertenecientes al género *Pseudomonas*, *P. fluorescens* R2f y *Pseudomonas* sp. DSM6412 (Tabla 5), que son incapaces de utilizar el NA como única fuente de carbono y energía. Cuando estos microorganismos se transformaron con el plásmido pNicAB, las cepas recombinantes fueron capaces de realizar la bioconversión de NA en 6HNA. En la figura 26 se muestra el proceso de conversión a lo largo del tiempo para las dos cepas recombinantes, *P. fluorescens* R2f (pNicAB) y *Pseudomonas* sp. DSM6412 (pNicAB), en un ensayo en células en suspensión idéntico al descrito anteriormente para el mutante *P. putida* KT2440 $\Delta$ nicC. Al cabo de tres horas, la conversión de NA en 6HNA es prácticamente completa.

Por el contrario, las cepas control que portan el plásmido pBBR1MCS-5 no mostraron conversión alguna al cabo de 6 h de incubación (Fig. 26). Por lo tanto, estos resultados demuestran que los productos de los genes *nicAB* son los responsables de la hidroxilación del NA a 6HNA, y que dichos genes se pueden transferir y son funcionales en otras *Pseudomonas* distintas a *P. putida*.

### **3.2 Estudio del gen *nicC***

El análisis de comparación de secuencias (Tabla 13) y los resultados de conversión de NA a 6HNA obtenidos con el mutante *P. putida* KT2440 $\Delta$ nicC (apartado 3.1) sugieren que el gen *nicC* codifica la enzima implicada en la transformación del 6HNA generado en la primera etapa enzimática de la degradación de NA en *P. putida* KT2440. Para confirmar esta hipótesis y demostrar el tipo de actividad enzimática codificada por el gen *nicC*, éste fue inicialmente clonado bajo el control del promotor *Plac* en el vector pUC18 (Tabla 6) generando el plásmido pUCNicC (Fig. 27). Sin embargo, pese a que células de *E. coli* DH10B (pUCNicC) producen una cantidad apreciable de proteína NicC soluble, extractos crudos de dicha cepa no mostraron desaparición del 6HNA en un ensayo de actividad enzimática como el que se detalla en el apartado 8.5.2 de Materiales y Métodos, sugiriendo que la enzima NicC es inactiva en *E. coli*. Con el objeto de expresar el gen *nicC* en huéspedes alternativos, éste se subclonó en el vector de amplio espectro de huésped pIZ1016 (Tabla 6) obteniéndose el plásmido pIZNicC (Fig. 27).

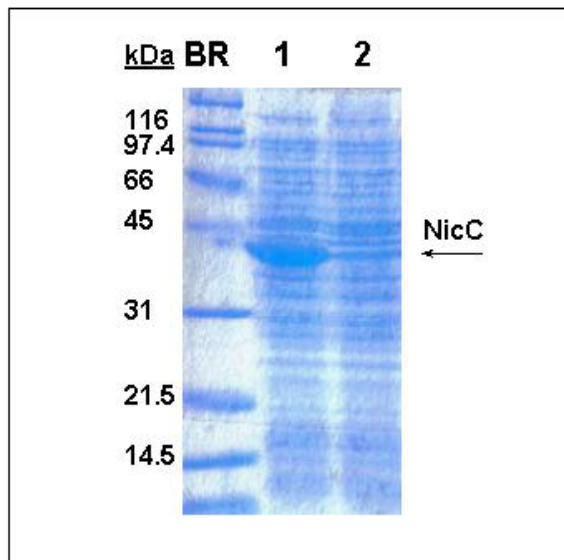


**Figura 27. Representación esquemática de la construcción de los plásmidos pUCNicC y pIZNicC.** El gen *nicC* fue amplificado por PCR utilizando los oligonucleótidos PnicX5/NicC3 (Tabla 7) y DNA genómico de *P. putida* KT2440 como molde. Posteriormente, el fragmento generado se clonó en el plásmido pUC18 empleando las dianas de restricción *Bam*HI y *Xba*I, obteniéndose el plásmido pUCNicC. En una siguiente etapa, el gen *nicC* se subclonó en el plásmido pIZ1016 empleando las enzimas de restricción *Eco*RI y *Xba*I. Las abreviaturas utilizadas son: *Plac*, promotor *lac*; *Ptac*, promotor *tac*; *lacZα*, subunidad α de la β-galactosidasa; *lacI<sup>q</sup>*, codifica el represor LacI del operón *lac* de *E. coli*; *Ap<sup>R</sup>*, gen que confiere resistencia a ampicilina; *Gm<sup>R</sup>*, gen que confiere resistencia a gentamicina; *ori* (pUC), origen de replicación de los plásmidos pUC; *rep* y *mob*, genes de replicación y movilización, respectivamente, del plásmido pIZ1016. Las dianas de restricción señaladas son: B, *Bam*HI; E, *Eco*RI; H, *Hind*III; K, *Kpn*I; X, *Xba*I.

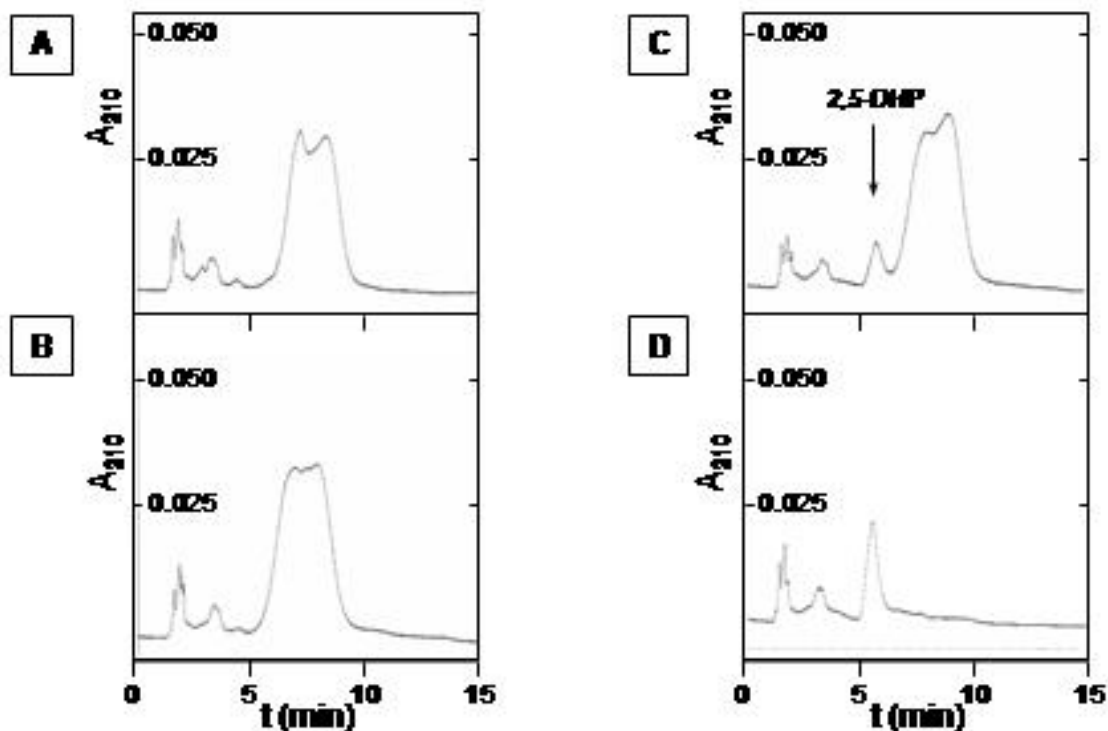
El plásmido pIZNicC fue transferido mediante conjugación triparental desde *E. coli* DH10B (pIZNicC) a la cepa *P. fluorescens* R2f, que no posee la capacidad de metabolizar NA. La cepa recombinante *P. fluorescens* R2f (pIZNicC) fue capaz de expresar el gen *nicC* eficientemente como lo demuestra el hecho de que extractos crudos de dicha cepa mostrasen en SDS-PAGE una banda de hiperproducción de una proteína con una masa molecular aparente de 42 kDa y correspondiente a la masa molecular predicha para el producto del gen *nicC* (42.7 kDa, 382 aa) (Fig. 28).



Aunque se ha descrito un ensayo de actividad 6-hidroxinicotínico monooxigenasa en extractos celulares valorando el consumo de NADH, que proporciona el poder reductor necesario para la hidroxilación del 6HNA, a 340 nm en presencia de FAD como cofactor (Nakano *et al.*, 1999), los extractos de las cepas de *Pseudomonas* que contienen el plásmido pIZNicC mostraban un consumo basal de NADH que no permitía valorar diferencias entre la presencia o ausencia de 6HNA en el ensayo. Por este motivo, se diseñó un ensayo de actividad que consistía en monitorizar mediante HPLC la aparición del pico correspondiente al producto de la reacción (apartado 8.5.2 de Materiales y Métodos). Así, el extracto de *P. fluorescens* R2f (pIZNicC) generó, en presencia del sustrato de la reacción (6HNA), un nuevo pico cuyo espectro de absorción y tiempo de retención (5.7 min) coincidía con el del patrón 2,5-DHP (Fig. 29, paneles C y D). Por el contrario, extractos de la cepa control *P. fluorescens* R2f (pIZ1016) no fueron capaces de transformar el 6HNA a 2,5-DHP (Fig. 29, panel B), y tampoco se observó la aparición del pico de 2,5-DHP en la mezcla de reacción que contiene un extracto de *P. fluorescens* R2f (pIZNicC) en ausencia del sustrato 6HNA (Fig. 29, panel A). Por lo tanto, estos resultados demuestran que la proteína NicC actúa sobre el 6HNA y genera 2,5-DHP, confirmando que se trata de una 6HNA monooxigenasa responsable del segundo paso enzimático de la degradación de NA en *P. putida* KT2440. Sin embargo, en este ensayo no fue posible detectar el 6HNA ya que eluye con el mismo tiempo de retención que el NADH/FAD, por lo que no se pudo monitorizar su desaparición. Dado que la concentración de 2,5-DHP formada, calculada en base al área del pico de un patrón de 2,5-DHP de concentración conocida, corresponde a 40  $\mu\text{M}$ , la conversión de 6HNA en 2,5-DHP es del 23 % en 10 min. de ensayo.



**Figura 28. Hiperproducción de NicC en extractos de *P. fluorescens* R2f (pIZNicC).** SDS-PAGE al 12.5 % en el que se muestra la hiperproducción de la proteína NicC (señalada con una flecha) en extractos crudos (10  $\mu$ g proteína total) de *P. fluorescens* R2f (pIZNicC) (calle 1). En la calle 2 se muestra un extracto crudo de la cepa control *P. fluorescens* R2f (pIZ1016). BR, marcadores de peso molecular “Broad-Range” de BioRad.



**Figura 29. Conversión del 6HNA en 2,5-DHP por extractos de *P. fluorescens* R2f (pIZNicC).** La figura muestra los cromatogramas de HPLC en los que se registra la absorbancia a 210 nm de las distintas mezclas de reacción. **Panel A:** Extracto de *P. fluorescens* R2f (pIZNicC) sin 6HNA. **Panel B:** Extracto de *P. fluorescens* R2f (pIZ1016) en presencia de 6HNA (0.2 mM). **Panel C:** Extracto de *P. fluorescens* R2f (pIZNicC) en presencia de 6HNA (0.2 mM). **Panel D:** Patrón comercial de 2,5-DHP 20  $\mu$ M. Todas las reacciones se llevaron a cabo a 25°C durante 10 min en presencia de NADH (0.2 mM) y FAD (10  $\mu$ M) tal y como se detalla en el apartado 8.5.2 de Materiales y Métodos. Las muestras de los paneles A, B y C se diluyeron 4 veces en agua destilada previamente a su aplicación en la columna de HPLC.

### **3.3 Estudio de la proteína NicX.**

El producto del gen *nicX* no presenta similitud de secuencia con proteínas implicadas en la degradación de compuestos aromáticos (Tabla 13). Sin embargo, la cepa *P. putida* KT2440*dnicX* era incapaz de crecer en NA o 6HNA como única fuente de carbono (Tabla 14), y acumulaba un pigmento verde en el medio de cultivo cuando se cultivaba en presencia de NA (Fig. 21) lo que era indicativo de una oxidación espontánea de la 2,5-DHP (apartado 2.2). Además, la mutación en el gen *nicX* tenía como consecuencia la desaparición de la actividad 2,5-DHP dioxigenasa en *P. putida* KT2440*dnicX* (apartado 2.2). De acuerdo con esos resultados, si el gen *nicX* codifica la enzima necesaria para la ruptura del anillo aromático del heterociclo dihidroxilado que se origina en la degradación de NA, se trataría del primer miembro de una nueva familia de dioxigenasas de ruptura de anillo no descritas hasta la fecha.

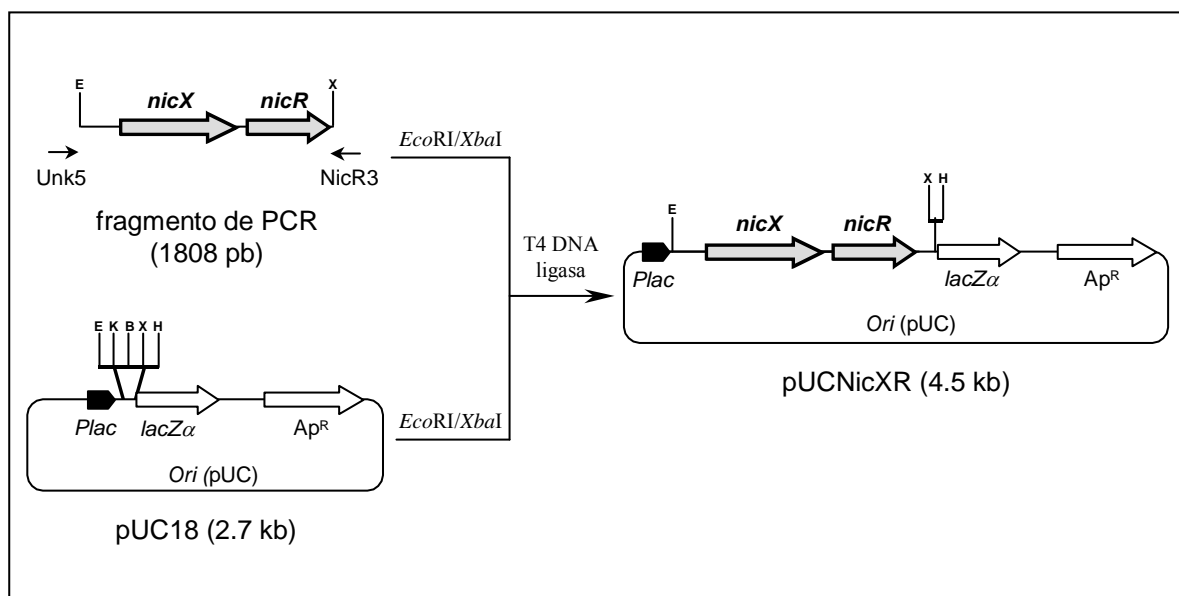
#### **3.3.1 Hiperexpresión del gen *nicX* y purificación del producto génico**

El gen *nicX* fue inicialmente clonado en el vector pUC18 como un fragmento de PCR obtenido a partir del DNA cromosómico de *P. putida* KT2440 empleando los oligonucleótidos Unk5 y NicR3 (Fig. 30). El plásmido resultante, pUCNicXR, contiene el gen *nicX*, incluyendo su sitio de unión al ribosoma (RBS), bajo el control del promotor *Plac* (Fig. 30). Los extractos crudos obtenidos de la cepa *E. coli* DH10B (pUCNicXR) se analizaron mediante SDS-PAGE observándose una intensa banda con una masa molecular aparente de 39 kDa que no aparecía en extractos de la cepa control *E. coli* DH10B (pUC18) (Fig. 31), y que coincidía con la masa molecular predicha para el producto del gen *nicX* (39 kDa, 350 aa). Para confirmar que la banda de 39 kDa se trataba de la proteína NicX, ésta se transfirió a una membrana de difluoro-polivinilideno y se determinó la secuencia N-terminal de la proteína correspondiente mediante la reacción de degradación de “Edman” (apartado 8.4 de Materiales y Métodos). Como resultado se obtuvo la secuencia PVSNAQLT, que coincide con la secuencia de aminoácidos deducida del gen *nicX* (PP3945) en la anotación del genoma de *P. putida* KT2440 después del procesamiento de la metionina inicial. Además, el extracto celular de la cepa *E. coli* DH10B (pUCNicXR) presentaba actividad 2,5-

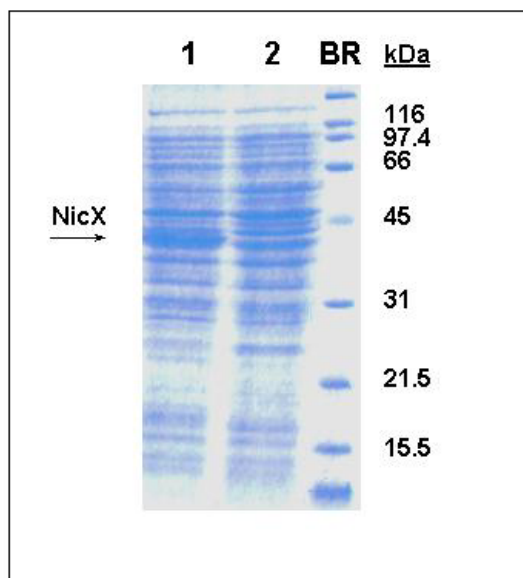
DHP dioxigenasa ( $0.4 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ ), lo que confirmaba que el gen *nicX* era el responsable de dicha actividad enzimática.

Para aumentar la cantidad de proteína producida en los extractos, el gen *nicX* se amplificó por PCR a partir del DNA cromosómico de *P. putida* KT2440 empleando la pareja de oligonucleótidos NicX5 y NicX3 (Tabla 7). El fragmento resultante fue inicialmente clonado en el plásmido pGEM-T easy y después fue transferido al vector de hiperexpresión pET-29a(+), generando el plásmido pETNicX que expresa el gen *nicX* bajo el control de un promotor fuerte, el promotor del gen 10 del fago T7, y con un RBS heterólogo consenso que permite una eficiente traducción (Fig. 32).

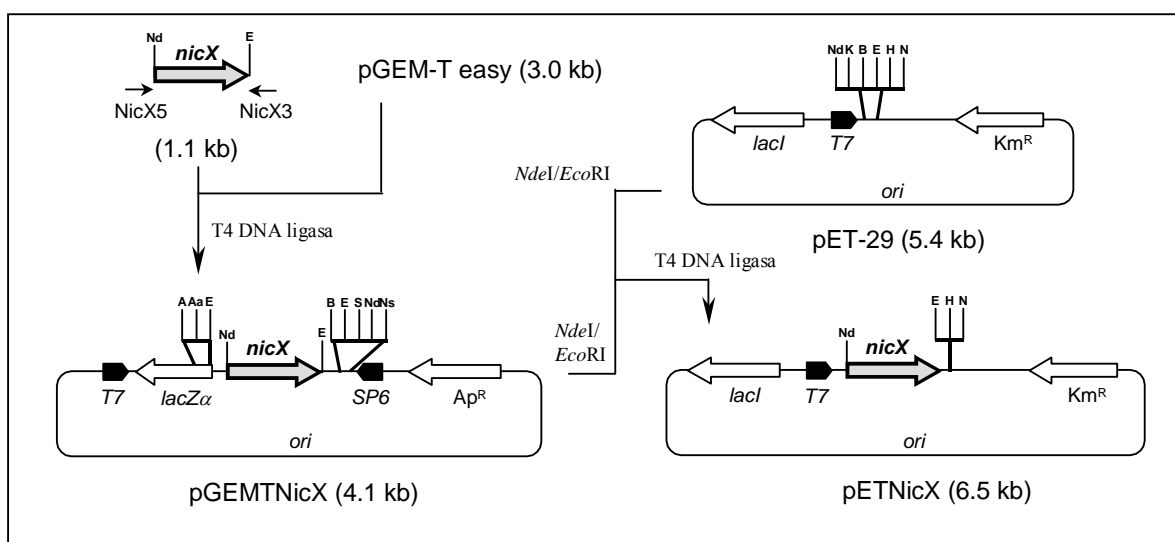
Los extractos crudos obtenidos de la cepa *E. coli* BLB21(DE3) (pETNicX), cultivada como se indica en el apartado 8.2 de Materiales y Métodos, se analizaron mediante SDS-PAGE, observándose una intensa banda de hiperexpresión cuya masa molecular aparente (39 kDa) se corresponde con el valor esperado para el producto del gen *nicX* (Fig. 33).



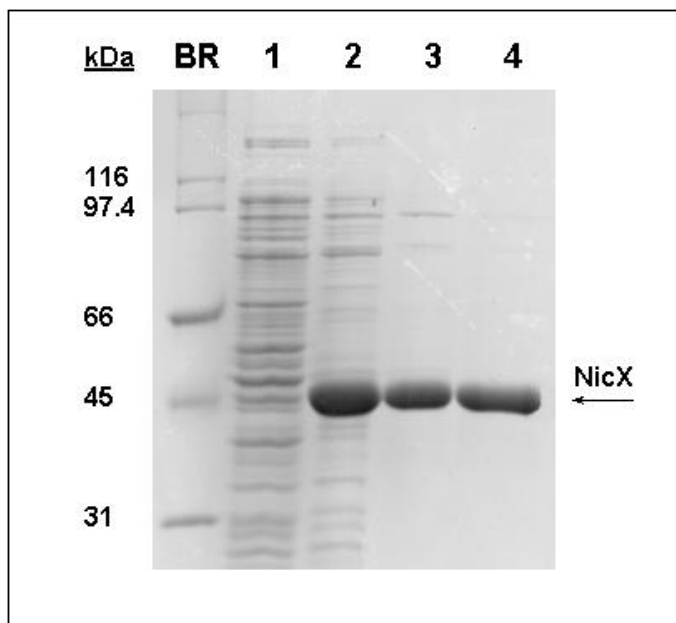
**Figura 30. Representación esquemática de la construcción del plásmido pUCNicXR.** Los genes *nicX* y *nicR* fueron amplificados por PCR utilizando los oligonucleótidos Unk5/NicR3 (Tabla 7) y DNA genómico de *P. putida* KT2440 como molde. Posteriormente, el fragmento generado se clonó en el plásmido pUC18 empleando las dianas de restricción *EcoRI* y *XbaI*. Las abreviaturas utilizadas son: *Plac*, promotor *lac*; *lacZα*, subunidad  $\alpha$  de la  $\beta$ -galactosidasa;  $\text{Ap}^{\text{R}}$ , gen que confiere resistencia a ampicilina; *ori* (pUC), origen de replicación de los plásmidos pUC. Las dianas de restricción señaladas son: B, *BamHI*; E, *EcoRI*; H, *HindIII*; K, *KpnI*; X, *XbaI*.



**Figura 31. Hiperproducción de NicX en extractos de *E. coli* DH10B (pUCNicXR).** SDS-PAGE al 12.5 % en el que se muestra la hiperproducción de la proteína NicX (señalada con una flecha) en extractos crudos (5  $\mu$ g proteína total) de *E. coli* DH10B (pUCNicXR) (calle 1). En la calle 2 se muestra un extracto crudo (5  $\mu$ g proteína total) de la cepa control *E. coli* DH10B (pUC18). BR, marcadores de peso molecular “Broad-Range” de BioRad.



**Figura 32. Representación esquemática de la construcción del plásmido pETNicX.** El gen *nicX* fue amplificado por PCR utilizando la pareja de oligonucleótidos NicX5 y NicX3 (Tabla 7). Como molde se empleó DNA genómico de *P. putida* KT2440. 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 *EcoRI*. Las abreviaturas utilizadas son: *lacZ $\alpha$* , subunidad  $\alpha$  de la  $\beta$ -galactosidasa; *Ap<sup>R</sup>*, gen que confiere resistencia a ampicilina; *Km<sup>R</sup>*, gen que confiere resistencia a kanamicina; *lacI*, gen que codifica el represor LacI; *ori*, origen de replicación del plásmido pBR322; T7, promotor del gen 10 del fago T7. Las dianas de restricción señaladas son: Aa, *AatII*; A, *ApaI*; B, *BamHI*; E, *EcoRI*; H, *HindIII*; K, *KpnI*; Nd, *NdeI*; N, *NorI*; Ns, *NsiI*.



**Figura 33. Purificación de NicX a partir de extractos de *E. coli* BLB21(DE3) (pETNicX).** SDS-PAGE al 12.5 %. Calle 1, extracto control de células de *E. coli* BLB21(DE3) (pET-29a(+)); calle 2, extracto de células de *E. coli* BLB21(DE3) (pETNicX); calle 3, fracción de la purificación después de la cromatografía en DEAE-celulosa; calle 4, fracción de la purificación después de la cromatografía en hidroxiapatito. La proteína NicX se indica con una flecha. En las calles 1 y 2 se cargaron 5  $\mu\text{g}$  de proteína total, mientras que en las calles 3 y 4 se cargaron 3  $\mu\text{g}$ . BR, marcadores de peso molecular “Broad-Range” de BioRad.

**Tabla 15. Proceso de purificación de NicX.**

<b>Etapas</b>	<b>Proteína (mg)</b>	<b>Actividad total (<math>\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}</math>)</b>	<b>Actividad específica (<math>\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}</math>)</b>	<b>Recuperación (%)</b>	<b>Factor de purificación</b>
Extracto crudo	1600	10096	6	100	1
DEAE celulosa	210	7176	34	71	5
Hidroxiapatito	74	4016	55	40	9

La actividad dioxigenasa de las diferentes alícuotas se midió espectrofotométricamente valorando la desaparición de 2,5-DHP a 320 nm como se indica en el apartado 8.5.3 de Materiales y Métodos.

La purificación de NicX se realizó mediante dos etapas cromatográficas, la primera en DEAE-celulosa, y la segunda en hidroxiapatito como se describe en el apartado 8.2 de Materiales y Métodos. La evolución del proceso de purificación se comprobó por SDS-PAGE como se muestra en la figura 32. El rendimiento del proceso se recoge en la Tabla 15.

La proteína NicX purificada, tras un paso previo de concentración, es soluble a una concentración de 10 mg/ml y conserva su actividad cuando se almacena a -20 °C.

### **3.3.2 Caracterización bioquímica de la enzima NicX**

Utilizando la enzima NicX purificada se procedió a su caracterización bioquímica, utilizando el ensayo espectrofotométrico descrito en el apartado 8.5.3 de Materiales y Métodos. La actividad 2,5-DHP dioxigenasa es absolutamente dependiente de la incubación previa de NicX con  $\text{Fe}^{2+}$  en un ambiente reductor generado por la adición de DTT (1 mM), como lo demuestra el hecho de que sólo con este metal se puede observar actividad enzimática (Tabla 16). La actividad que presenta NicX en presencia de  $\text{Fe}^{3+}$  (Tabla 16) tiene su origen en la reducción de este último a  $\text{Fe}^{2+}$  en el medio de reacción en presencia de DTT, tal y como se ha descrito previamente para la enzima purificada de *P. putida* N9 (Gauthier y Rittenberg, 1971a). La dependencia de la actividad de NicX por  $\text{Fe}^{2+}$  se pone de manifiesto con la inhibición que se produce cuando la reacción se realiza en presencia de agentes oxidantes como el agua oxigenada, de quelantes específicos, como el 2,2-dipiridil, o de quelantes generales de iones divalentes, como el EDTA (Tabla 17). Cuando se analizó mediante ICP el contenido en Fe de una muestra de proteína NicX purificada (ver apartado 8.6 de Materiales y Métodos) no se detectó la presencia de dicho metal, lo que indica que el metal se pierde en el proceso de purificación y explica el motivo por el que se requiere la incubación previa (reactivación) con  $\text{Fe}^{2+}$  para poder detectar la actividad dioxigenasa. Sin embargo, cuando la proteína NicX purificada (25  $\mu\text{M}$ ) se preincubó con  $\text{Fe}^{2+}$ , se detectó la presencia de 19.8  $\mu\text{M}$  de Fe en la solución (ver apartado 8.6 de Materiales y Métodos), lo que sugiere que existe un átomo de hierro unido a cada molécula de proteína, y que esta unión es reversible puesto que el metal se pierde en el proceso de purificación.

**Tabla 16. Actividad 2,5-DHP dioxigenasa en presencia de diferentes iones metálicos.**

Ion metálico	% actividad
Fe <sup>2+</sup>	100
Fe <sup>3+</sup>	76
Cd <sup>2+</sup>	N.d.
Mn <sup>2+</sup>	N.d.
Mg <sup>2+</sup>	N.d.
Ni <sup>2+</sup>	N.d.
Co <sup>2+</sup>	N.d.
Zn <sup>2+</sup>	N.d.
Ca <sup>2+</sup>	N.d.
Cu <sup>2+</sup>	N.d.
Cu <sup>+</sup>	N.d.

Los metales se emplearon a una concentración de 50  $\mu$ M (en el volumen final del ensayo) tal y como se describe en el apartado 8.5.3 de Materiales y Métodos. N.d. indica no detectado.

**Tabla 17. Actividad 2,5-DHP dioxigenasa tras la preincubación con diferentes inhibidores enzimáticos**

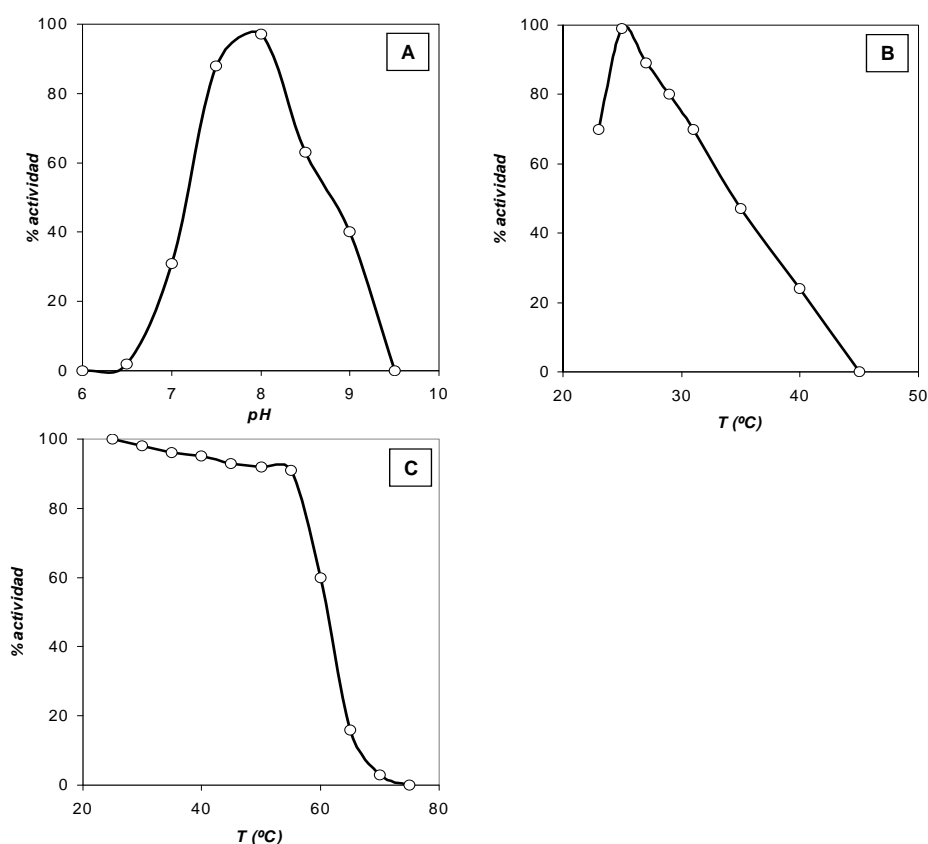
Inhibidor	% Actividad	
	0.5 mM	5 mM
Fenilglioxal	100	100
Anhídrido succínico	100	34
NBS	100	N.d.
Yodoacetamida	100	39
<i>p</i> -hidroximercuribenzoato	100	N.d.
$\alpha,\alpha$ -dipiridil	88	2
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	100	2
EDTA	18	N.d.
DEPC	90	N.d.

Los distintos inhibidores se emplearon a las dos concentraciones que se indican, tal y como se describe en el apartado 8.5.3 de Materiales y Métodos. El símbolo – indica que no se detectó actividad. N.d. indica no detectado.

El tratamiento con inhibidores enzimáticos que modifican específicamente algunas de las cadenas laterales de determinados aminoácidos revela que tanto el *p*-



hidroximercuribenzoato y, en menor medida, la yodoacetamida, son capaces de inhibir la actividad de NicX. Ambos inhibidores reaccionan específicamente con cisteínas, por lo que cabe esperar que alguno de los 4 residuos de cisteína presentes en NicX sea esencial para la catálisis. La *N*-bromosuccinimida (NBS), que produce la oxidación de los triptófanos, y el anhídrido succínico, que modifica las lisinas, afectan también a la actividad de la enzima NicX. La proteína NicX también es sensible al dietilpicrocarbonato (DEPC), que acila irreversiblemente las cadenas laterales de las histidinas. Sin embargo, el fenilgloxal, que reacciona con argininas, no tiene ningún efecto sobre la actividad de NicX (Tabla 17).

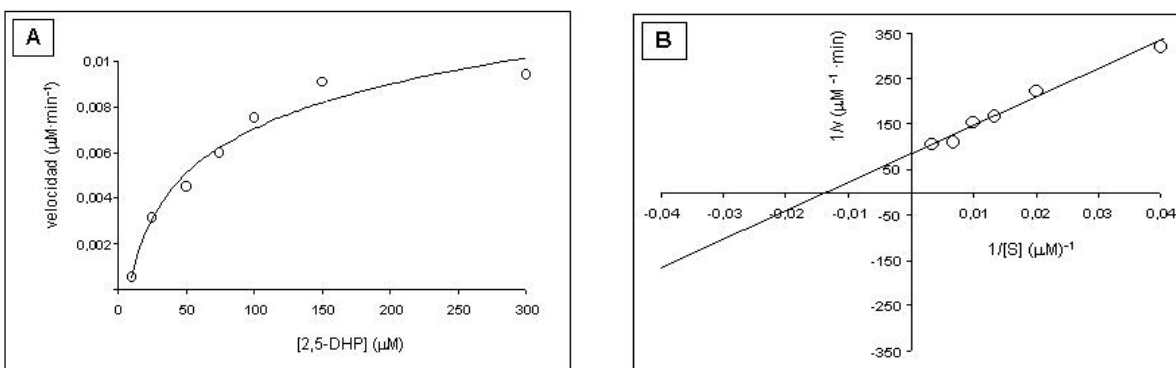


**Figura 34. Actividad 2,5-DHP dioxigenasa en función del pH y de la temperatura.** En el panel A, se muestra la dependencia de la actividad de NicX frente al pH. En el panel B, se muestra la actividad de la enzima en función de la temperatura a la que se lleva a cabo la reacción. En el panel C, se muestra la actividad de NicX después de su preincubación a distintas temperaturas durante 5 min; la actividad se valoró a 25 °C. El porcentaje de actividad se refiere a las condiciones óptimas de reacción que son 25°C y pH 8.0 (100% actividad), según el ensayo que se detalla en el apartado 8.5.3 de Materiales y Métodos.

La proteína NicX muestra una actividad máxima a pH 8.0 (Fig. 34A) y 25 °C (Fig. 34B). La inhibición observada a pHs más altos puede estar motivada por la baja estabilidad del  $\text{Fe}^{2+}$  en disolución en esas condiciones, ya que precipita en forma de  $\text{Fe}(\text{OH})_3$ .

En lo que se refiere a su termoestabilidad, la proteína NicX es capaz de soportar preincubaciones de hasta 55 °C durante 5 minutos sin sufrir una pérdida significativa de su actividad enzimática. Preincubaciones a 62 °C ocasionan una reducción del 50% de la actividad máxima, y a 75 °C la enzima se inactiva completamente (Fig. 34C).

La actividad 2,5-DHP dioxigenasa también se ensayó valorando el consumo de oxígeno con un electrodo de oxígeno (apartado 8.5.3 de Materiales y Métodos). A diferencia del ensayo espectrofotométrico, el ensayo basado en el consumo de oxígeno permite realizar una cinética enzimática en un intervalo muy amplio de concentraciones de sustrato y, por ello, fue el empleado para calcular los parámetros cinéticos de NicX. Las constantes cinéticas determinadas para NicX fueron una  $K_m$  y  $V_{\max}$  de 70  $\mu\text{M}$  y 2.33  $\mu\text{M}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ , respectivamente (Fig. 35).



**Figura 35. Determinación de los parámetros cinéticos de la enzima NicX.** En el panel A se muestra la dependencia de la velocidad de reacción frente a la concentración de sustrato. La velocidad se midió empleando un electrodo de oxígeno y las concentraciones de sustrato empleadas fueron 10, 25, 50, 75, 100, 150 y 300  $\mu\text{M}$ , en las condiciones que se describen en el apartado 8.5.3 de Materiales y Métodos. En el panel B se muestra la representación de dobles inversas de los resultados obtenidos para el cálculo de las constantes cinéticas  $K_m$  y  $V_{\max}$ .

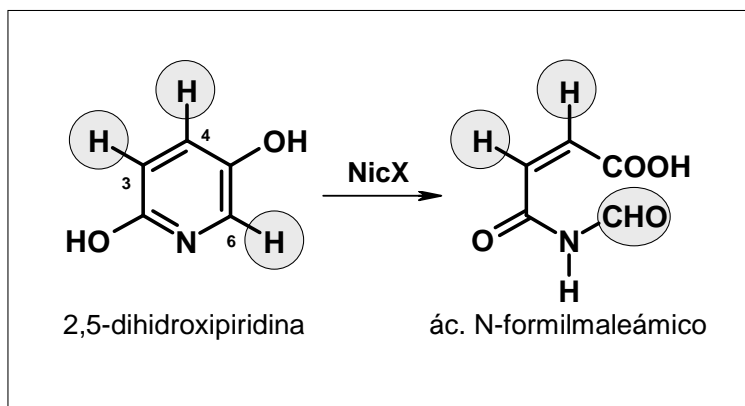
La enzima NicX posee una elevada especificidad de sustrato, ya que sólo es capaz de reconocer como tal a la 2,5-DHP dentro del amplio abanico de compuestos aromáticos que se probaron como sustratos alternativos, entre los que se encuentran isómeros estructurales como la 2,3 y la 2,4-DHP, heterociclos monohidroxilados como la 2-hidroxipiridina, 3-hidroxipiridina y 4-hidroxipiridina, otras moléculas aromáticas de la ruta nic tales como el

NA o el 6HNA, y derivados como el picolinato (2-carboxipiridina), piridoxamina y piridoxal. Ninguno de los compuestos aromáticos (homocíclicos) di(tri)hidroxilados habituales que son sustratos de otras dioxigenasas tales como el catecol (1,2-dihidroxibenceno), protocatecuato (3,4-dihidroxibenzoato), gentisato (2,5-dihidroxibenzoato), galato (3,4,5-trihidroxibenzoato), resorcinol (1,3-dihidroxibenceno), hidroquinona (2,5-dihidroxibenceno) o pirogalol (3,4,5-trihidroxibenceno) fueron reconocidos por NicX.

### 3.3.3. Caracterización del producto de la reacción catalizada por NicX.

Para determinar la estructura del producto de la actividad de NicX sobre la 2,5-DHP, se realizaron técnicas de RMN y de MS. Los espectros de RMN se registraron a pH 8.0 y pH 3.0, en las condiciones que se detallan en el apartado 10 de Materiales y Métodos.

En primer lugar se recogieron los espectros de protón (espectros  $^1\text{H}$ ), y finalmente estos datos se correlacionaron con los espectros de carbono (espectros  $^{13}\text{C}$ ). En ambos casos, 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 36 se muestra el esquema de la reacción y los protones susceptibles de dar una señal en RMN.



**Figura 36. Reacción catalizada por NicX.** Los círculos grises destacan aquellos protones que pueden ser detectados en un espectro de RMN en las condiciones del ensayo.

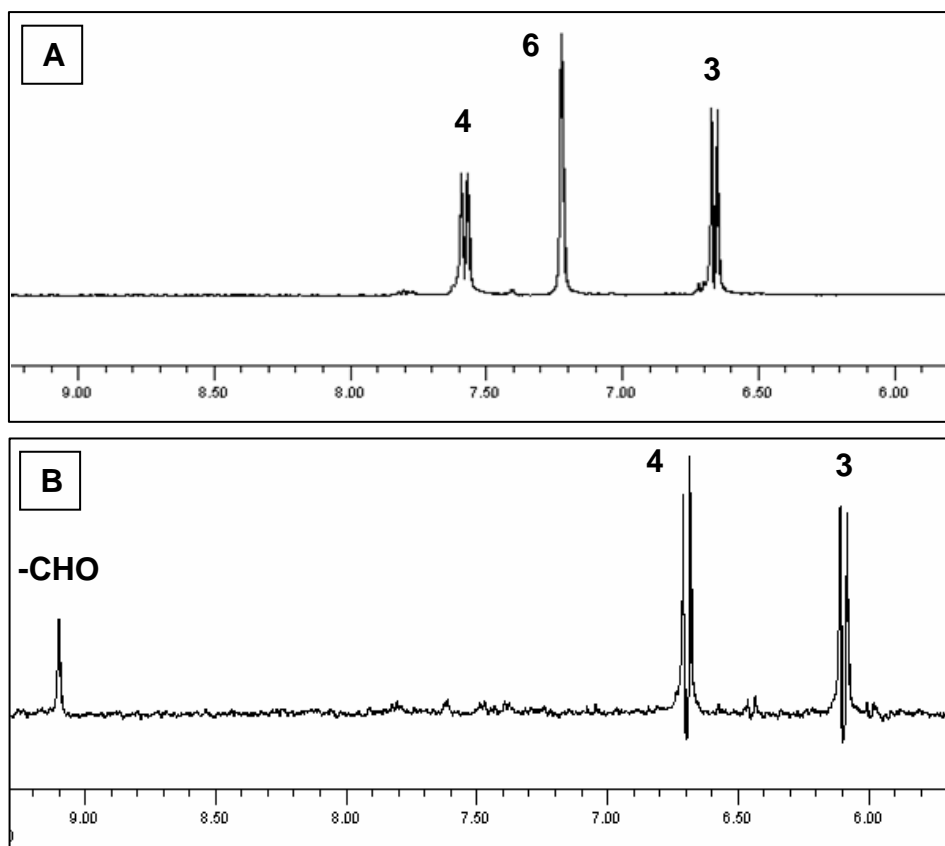
En la 2,5-DHP se encuentran tres señales diferenciadas debido a la existencia de tres protones no intercambiables en el anillo aromático de piridina, que son aquellos correspondientes a los carbonos 3 (H-3), 4 (H-4) y 6 (H-6). Si el producto de reacción fuera el ácido *N*-formilmaleámico (NFM), se deberían mantener las señales correspondientes a los carbonos 3 y 4 de la 2,5-DHP, mientras que la asociada al carbono 6 debería ser reemplazada por la correspondiente al grupo aldehído del producto de apertura, que tendría un desplazamiento químico característico. En la figura 37 se representan los espectros de  $^1\text{H}$  de la 2,5-DHP y del producto de la reacción en  $\text{D}_2\text{O}$ . En el espectro del sustrato se pueden apreciar tres señales de resonancia con unos desplazamientos químicos de 7.59 ppm (d, correspondiente al H-4), 7.22 ppm (d, correspondiente al H-6), y 6.65 ppm (d, correspondiente al H-3). Después de la incubación con NicX, el producto de la reacción muestra un espectro con una única especie química, en el que se mantienen dos señales de dobletes mutuamente acoplados con unos desplazamientos de 6.18 ppm y 6.74 ppm, que corresponderían a los protones H-3 y H-4 del sustrato (con una constante de acoplamiento de 14 Hz), mientras que la señal del H-6 que presentaba la 2,5-DHP desaparece y se transforma en un singlete con un desplazamiento de 9.18 ppm, que es característico de los grupos aldehídos (-CHO).

El espectro  $^{13}\text{C}$  obtenido por HSQC (Fig. 38) de la 2,5-DHP ofrece para cada carbono unas señales de 137.0 ppm (C-4), 119.1 ppm (C-6) y 119.2 ppm (C-3). Después de la reacción con NicX, los desplazamientos químicos del producto pasan a ser 144.0 ppm y 120.6 ppm para los carbonos que inicialmente se encontraban en las posiciones 4 y 3 de la 2,5-DHP, mientras que la tercera señal, la del carbono en la posición 6, pasa a tener un desplazamiento de 211.0 ppm (fuera de escala en la figura).

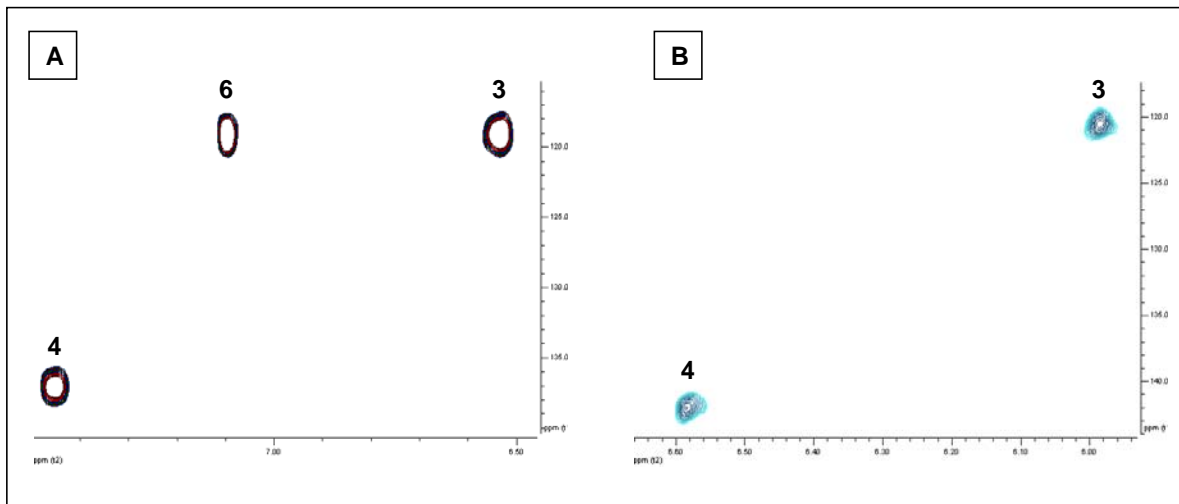
Todos los datos de RMN concuerdan con que el producto de la reacción catalizada por NicX es una molécula en la que los carbonos 3 y 4 de la 2,5-DHP siguen formando un doble enlace con conformación *-cis* disustituido, mientras que el carbono de la posición 6 del heterociclo pasa a formar parte de un grupo aldehído.

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. El sustrato de partida, la 2,5-DHP, poseía un espectro en el que aparecía un único ion  $[\text{M}-\text{H}]^-$  caracterizado por un cociente  $m/z$  de 110 unidades. Este pico desaparecía

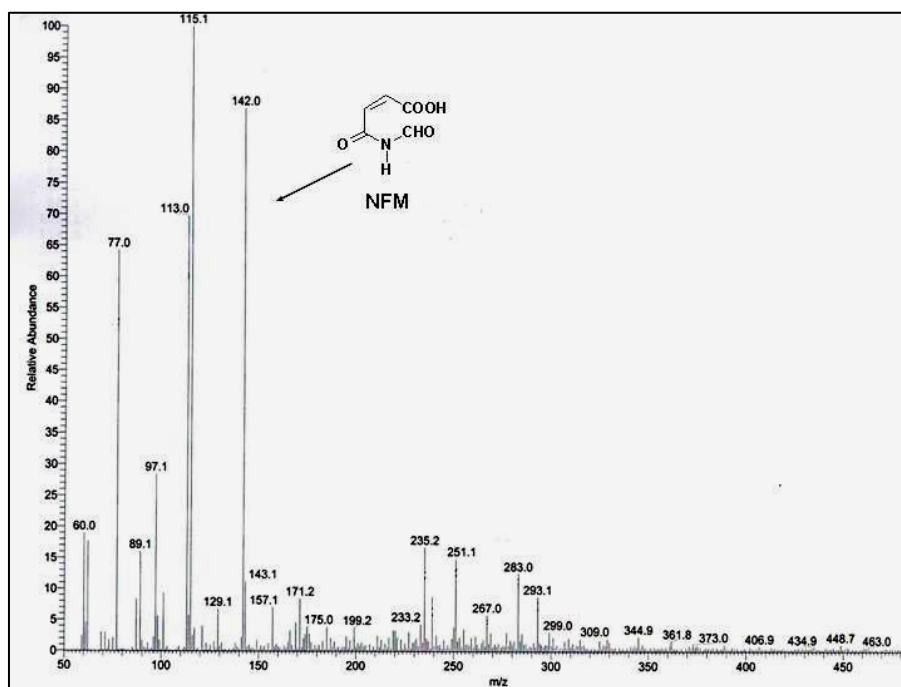
completamente cuando la 2,5 DHP reaccionaba con la enzima NicX, y en su lugar aparecía una especie química mayoritaria, que poseía una masa atómica  $m/z$  de 142 (Fig. 39). El aumento de masa asociado al producto de apertura concuerda con la adición de dos átomos de oxígeno al sustrato de partida, tal y como se espera del resultado de una actividad dioxigenasa.



**Figura 37. Espectros de protón (<sup>1</sup>H) del sustrato y producto de la reacción catalizada por NicX.** En el panel A, se muestra el espectro de protón de la 2,5-DHP. En el panel B, se muestra el espectro de protón del producto de la actividad NicX sobre la 2,5-DHP. Los números identifican a los protones en relación con la posición que ocupan en la 2,5-DHP (Fig. 35). -CHO indica la señal de resonancia del protón del grupo aldehído.



**Figura 38.** Espectros  $^{13}\text{C}$  del sustrato y producto de la reacción catalizada por NicX. En el panel A, se muestra el espectro  $^{13}\text{C}$  de la 2,5-DHP. En el panel B, se muestra el espectro  $^{13}\text{C}$  del producto de la actividad NicX sobre la 2,5-DHP. Los números identifican a los protones en relación con la posición que ocupan en la 2,5-DHP (Fig. 35).



**Figura 39.** Análisis mediante espectrometría de masas del producto de ruptura de la 2,5-DHP. El producto de ruptura de la 2,5-DHP generado tras la reacción con la dioxigenasa NicX fue analizado por espectrometría de masas tal y como se indica en el apartado 9 de Materiales y Métodos. En la figura se muestra la estructura del ácido *N*-formilmaleámico (NFM) generado en la reacción.

En conclusión, la actividad de la dioxigenasa NicX sobre la 2,5-DHP supone la apertura del anillo aromático y la adquisición de un grupo formilo asociado al átomo de

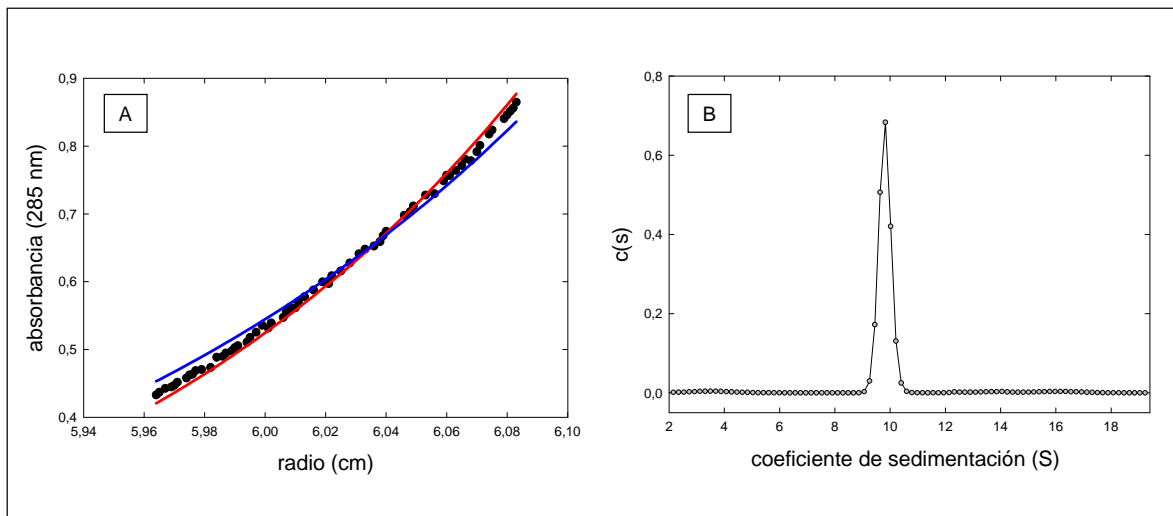
nitrógeno de la molécula, indicando claramente que el producto de la reacción es el ácido *N*-formilmaleámico (NFM). El producto de la reacción es estable en disolución y no sufre modificaciones adicionales por acción de la enzima NicX.

### **3.3.4 Estudios sobre las relaciones entre estructura y función de NicX**

#### **3.3.4.1 Conformación nativa de NicX**

Con objeto de identificar la masa molecular del multímero de NicX se realizó un análisis mediante ultracentrifugación analítica de equilibrio de sedimentación, cuyo resultado no está influenciado por la forma de la macromolécula sometida a estudio. La Figura 40A muestra un gradiente de equilibrio de sedimentación representativo de la proteína NicX (círculos negros) junto con el comportamiento teórico predicho según el programa EQASSOC (Minton, 1994; ver apartado 8.7 de Materiales y Métodos) para una especie hexamérica (línea roja) y para una especie pentamérica (línea azul). El gradiente de equilibrio de sedimentación teórico de un pentámero de NicX (línea azul de la figura 40) difiere del obtenido experimentalmente, que se asemeja más al gradiente de sedimentación teórico del hexámero.

El análisis mediante velocidad de sedimentación mostró que la especie correspondiente al hexámero era la especie mayoritaria presente en la disolución, en las condiciones del ensayo, en el que la proteína se encontraba a una concentración de 30  $\mu$ M. La distribución de coeficientes de sedimentación (Figura 40B) muestra como la totalidad de NicX sedimenta como una especie molecular con un coeficiente de sedimentación de 9.5 S, compatible con un hexámero de la proteína. El análisis hidrodinámico indicó que la relación friccional del pico era 1,2, lo que sugiere que la proteína posee forma globular en disolución.

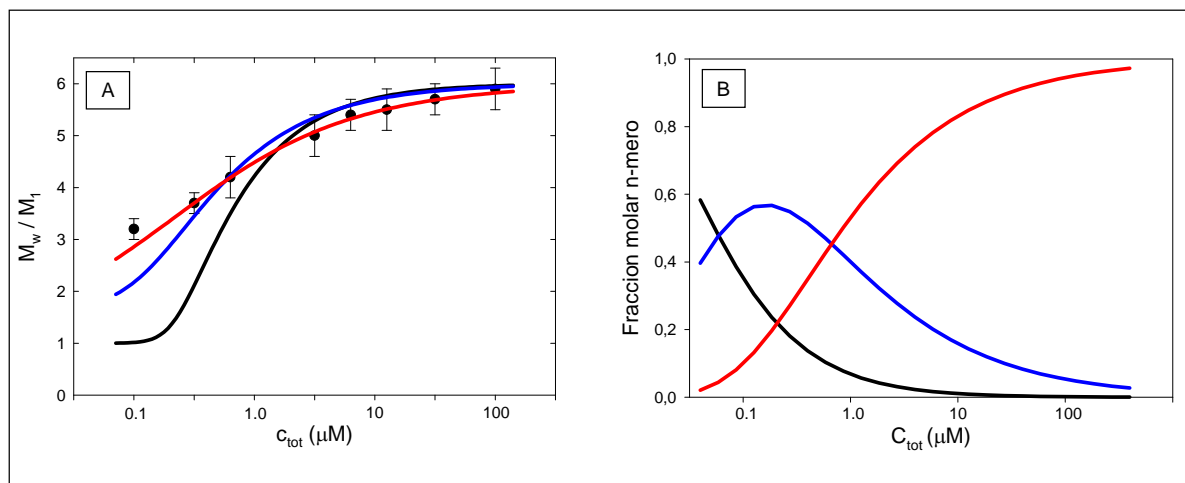


**Figura 40. Ultracentrifugación analítica de la proteína NicX.** (A) Valores de absorbancia para los diferentes radios de la cubeta una vez alcanzado el equilibrio de sedimentación. Los datos experimentales se representan con círculos negros. Se muestra el mejor ajuste para un soluto ideal correspondiente con la masa de un hexámero (línea roja) y un pentámero (línea azul). (B) 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 8.7 de los Materiales y Métodos.

Se realizaron análisis de equilibrio de sedimentación empleando diferentes concentraciones de proteína (Fig. 41A). Como resultado de los experimentos, se observó un equilibrio de disociación de la proteína desde la forma hexamérica a especies oligoméricas de menor tamaño a medida que disminuía la concentración de proteína en los ensayos. En la Fig. 41A se incluyen los modelos de distintos equilibrios hidrodinámicos de asociación que tienen la forma hexamérica como estado final. Como se puede apreciar en la figura, el modelo para un equilibrio monómero-trímero-hexámero es el que mejor se ajusta a los resultados experimentales determinados en el ensayo. Se determinaron las constantes de equilibrio para el proceso, que fueron  $K_3=10^{15.1}$  M y  $K_6=10^{36.72}$  M, para la asociación monómero-trímero y trímero-hexámero, respectivamente. A partir de estos resultados, fue posible determinar las fracciones de cada especie presentes en la disolución (Fig. 41B). A concentraciones altas de proteína, superiores a 10  $\mu$ M, la especie predominante es la hexamérica. En las condiciones normales de ensayo, en las que se emplea una concentración de alrededor de 0.15  $\mu$ M, la predicción del modelo de asociación indica que la especie más abundante, con cerca del 50 % de la proteína total, es la trimérica, que coexiste en la



disolución con alrededor de un 40 % de la proteína total en su forma monomérica, y sólo un 10 % de la hexamérica.



**Figura 41. Equilibrio de sedimentación de NicX en función de la concentración de proteína.** En el panel A se muestra el cociente entre la masa molecular del promedio de las especies en disolución y la masa molecular del monómero para las distintas concentraciones de proteína ensayadas. Los resultados experimentales se representan mediante puntos negros, incluyendo la desviación típica de las medidas. También se representan los modelos de equilibrio de sedimentación para los procesos ideales de asociación monómero-hexamero (línea negra), monómero-dímero-hexamero (línea azul) y monómero-trímero-hexamero (línea roja). En el panel B se muestra la fracción molar en disolución de las especies monómero (línea negra), trímero (línea azul) y hexámero (línea roja), en función de la concentración total de proteína de los ensayos. Las fracciones molares de las especies se calcularon en base a las constantes de equilibrio del ensayo anterior, cuando el proceso de oligomerización se ajusta al equilibrio de asociación monómero-trímero-hexamero.

### **3.3.4.2 Cristalización de la proteína NicX y análisis preliminar de los resultados de difracción**

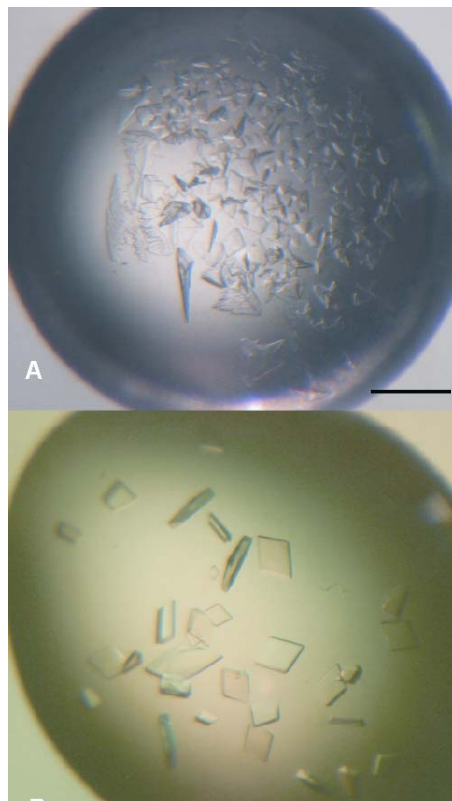
Considerando el protocolo experimental descrito en el apartado 8.8.1 de Materiales y Métodos, a los cuatro días de comenzado los experimentos de cristalización se obtuvieron pequeños cristales de NicX en la condición 22 de *Crystal Screen I* de Hampton Research (PEG 4000 30% (p/v), acetato sódico 0.2 M, Tris-HCl 0.1 M, pH 8.5). Similares resultados se obtuvieron con la condición análoga del *Structure Screen I* de Molecular Dimensions (condición 37). El subsiguiente uso de distintas soluciones de cristalización empleando PEG 4000 como agente precipitante permitió finalmente optimizar las condiciones de cristalización, obteniéndose cristales útiles para estudios de difracción en las condiciones C1 de *JBScreen 2* (PEG 4000 22 % (p/v), acetato sódico 0.1 M, Hepes 0.1 M, pH 7.5) y en la

condición B% de *JBScreen 3* (PEG 4000 20 % (p/v), sulfato de litio 0.2 M, 0.1 M Tris-HCl, pH 8.5) (Fig. 42).

Teniendo en cuenta que los estudios de difracción se realizaron a 100 K, la crioprotección de los cristales de NicX demandó la optimización de la solución crioprotectora. Se han empleado como agentes crioprotectores los siguientes compuestos: glicerol, etilenglicol, PEG 400 y 2-metil-2,4-pentanodiol. Las condiciones más satisfactorias se obtuvieron empleando la solución de cristalización conteniendo glicerol al 15% (v/v).

**Tabla 18. Parámetros de celdilla y características de la recogida y procesamiento de datos para los cristales de la proteína NicX nativa y para los de la proteína NicX obtenidos en presencia de osmio (NicX-Os).** Los valores entre corchetes son los de la concha de mayor resolución: 2.42-2.30 Å y 2.53-2.40 Å para los cristales de las proteínas NicX y NicX-Os, respectivamente

	NicX	NicX-Os
Fuente de radiación	ID23-1 ESRF (Grenoble, Francia)	ID29ESRF (Grenoble, Francia)
Longitud de onda (Å)	1.06	1.1367
Detector	ADSC	ADSC
Grupo espacial	$P2_1$	$C222_1$
Parámetros de celdilla		
$A$ (Å)	87.7	106.4
$B$ (Å)	142.4	139.1
$C$ (Å)	88.5	141.2
$\beta$	105.3	
Rango de resolución (Å)	50.0-2.3	50.0-2.4
No. de reflexiones medidas	313164	281950
No. de reflexiones únicas	89999	41281
$R_{\text{sym}}$ (%)	11.0[51.5]	19.8[51.0]
Completitud (%)	99[99]	99[99]
Redundancia	3.4[3.3]	6.8[6.8]
$I/\sigma(I)$ promedio	10.8[3.6]	10.0[2.9]

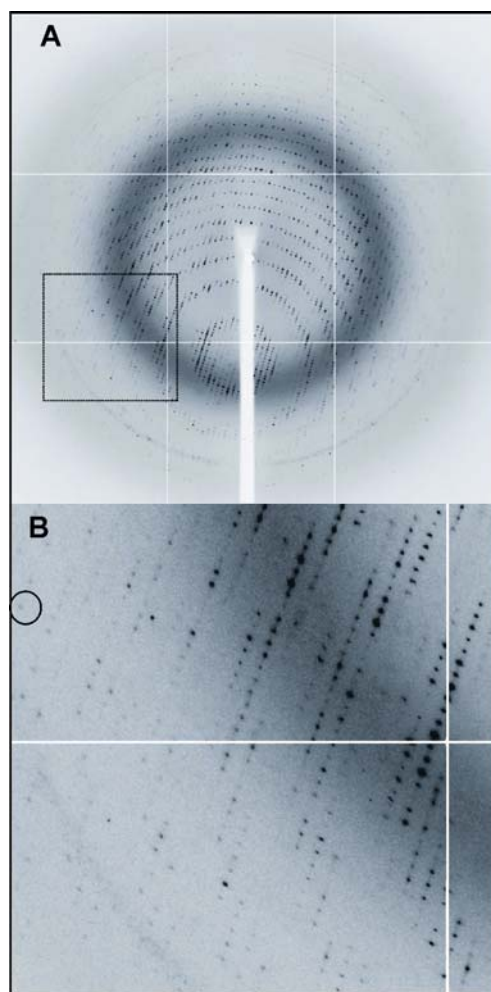


**Figura 42. Cristales de la proteína NicX nativa.** La concentración de proteína empleada fue de 10 mg/ml, y el volumen final de la gota de 2  $\mu$ l. (A) Cristales de la proteína NicX obtenidos en la condición 22 de *Crystal Screen I* de Hampton Research (PEG 4000 30% (p/v), acetato sódico 0.2 M, Tris-HCl 0.1 M, pH 8.5), junto con cristales acompañantes de fosfato sódico. (B) Cristales obtenidos en la condición *JBScreen 3* de Jena Bioscience (PEG 4000 20%(w/v)), sulfato de litio 0.2 M, 0.1 M Tris-HCl, pH 8.5). En ambos casos, la barra equivale a 0.2 mm.

El conjunto de datos del que se dispone actualmente (180 imágenes;  $\Delta\phi = 1^\circ$ ) se ha obtenido en el *European Synchrotron Radiation Facility* (ESRF; Grenoble, Francia), concretamente, en la línea ID23-1 ( $\lambda = 1.0675 \text{ \AA}$ ; detector: *CCD ADSC Quantum*). En la Fig. 43 aparece una imagen de difracción, así como un detalle de una región, en donde se pueden observar reflexiones a 2.3  $\text{\AA}$  de resolución. Asimismo, en la tabla 18 aparece un resumen de los resultados obtenidos. En la actualidad se están llevando a cabo experimentos encaminados a la obtención de derivados de átomo pesado para la resolución de la estructura de NicX.

Los cristales de la proteína NicX nativa (sin adición de metales pesados) son monoclinicos y, de acuerdo al patrón de extinciones sistemáticas, pertenecen al grupo espacial  $P2_1$ . Por lo tanto, la celdilla presenta dos posiciones equivalentes. Las probabilidades más altas del porcentaje del solvente se obtuvieron para 5 (0.34) ó 6 (0.44) moléculas en la unidad asimétrica. Los correspondientes volúmenes de Matthews ( $V_M$ ) y

porcentajes de solvente son:  $2.7 \text{ \AA}^3 \text{ Da}^{-1}$  y  $2.3 \text{ \AA}^3 \text{ Da}^{-1}$ , y 55% y 46%, respectivamente. Teniendo en cuenta que NicX muestra un comportamiento asociativo en donde se originan especies hexaméricas, es razonable considerar la existencia de un hexámero en la unidad asimétrica, por lo que el porcentaje de solvente sería del 46%.

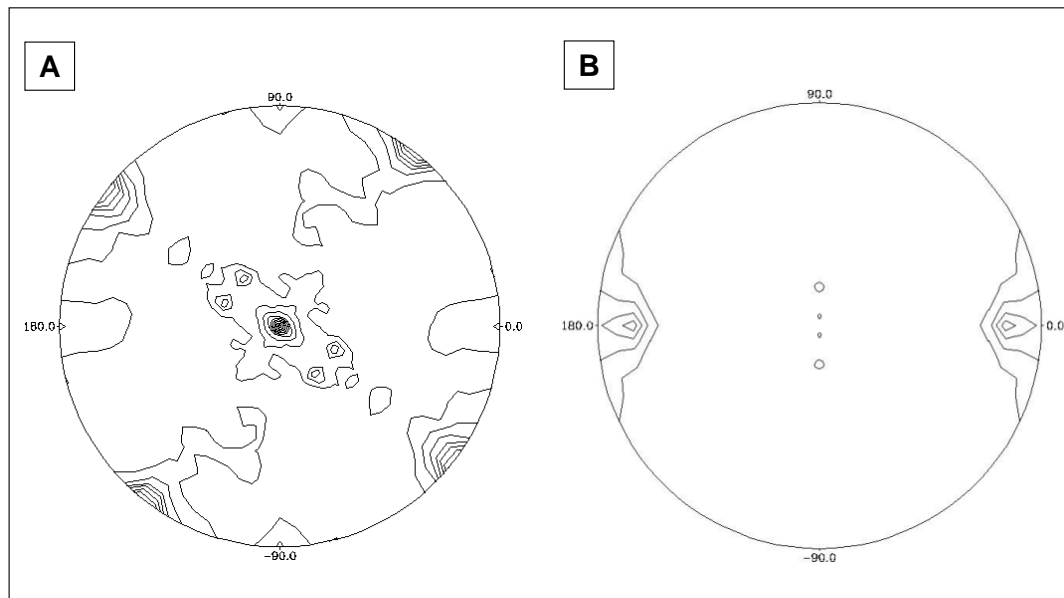


**Figura 43. Experimentos de difracción en fuente de radiación sincrotrón para los cristales de la proteína NicX nativa.** (A) Imagen de difracción recogida en la línea ID23-1 del ESRF (Grenoble, Francia). Las condiciones experimentales fueron:  $\lambda=1.0675 \text{ \AA}$ ; distancia cristal-detector: 250 mm;  $\Delta\phi= 1^\circ$ ; exposición: 1 segundo. (B) Detalle de la región indicada con un cuadrado en el panel A. Se indica con un círculo, a modo de ejemplo, una reflexión a  $2.30 \text{ \AA}$  de

El análisis de la simetría no cristalográfica se ha realizado mediante el cálculo de la función de autorrotación, empleando datos en el rango de resolución  $10.0 - 3.0 \text{ \AA}$ , con un radio de integración del espacio de Patterson de  $20 \text{ \AA}$ . Los picos  $\omega$ ,  $\phi$ ,  $\kappa$  (ángulos polares) de

esta función revelan la existencia de ejes de simetría, tanto cristalográficos (normalizados a un valor de 100), como no cristalográficos.

En la figura 44A aparece una proyección estereográfica de la sección  $\kappa=180$ , en donde aparece claramente un eje binario no cristalográfico ( $\omega=90$ ,  $\phi=152$ ,  $\kappa=180$ ; perpendicular al plano de la figura se dirige el eje binario cristalográfico).



**Figura 44. Simetría no cristalográfica. Panel A.** Proyección estereográfica de la sección  $\kappa=180$  de los cristales de la proteína **NicX nativa**, en donde aparece un pico correspondiente a un eje binario no cristalográfico ( $\omega=90$ ,  $\phi=152$ ,  $\kappa=180$ ). **Panel B.** Proyección estereográfica de la sección  $\kappa=120$ , de los cristales de la proteína **NicX en presencia de osmio**, donde aparece un pico correspondiente a un eje ternario no cristalográfico ( $\omega=81$ ,  $\phi=0$ ,  $\kappa=120$ )

Además de los cristales de la proteína NicX nativa obtenidos en las condiciones descritas, fue posible obtener cristales de la proteína en presencia de  $\text{Fe}^{2+}$  ( $\text{FeSO}_4$  50  $\mu\text{M}$ ) en condiciones reductoras (presencia de DTT), aunque estos cristales eran más sensibles a las condiciones de crioprotección y no permitieron la obtención de un conjunto de datos de difracción. Para mejorar la estabilidad de estos cristales se incluyeron diferentes aditivos en las condiciones de cristalización y se lograron cristales estables en presencia de 2-metil-2,4-pentanodiol (7.5% v/v), de forma que se lograron de forma sistemática datos en torno a 2.8 Å de resolución.

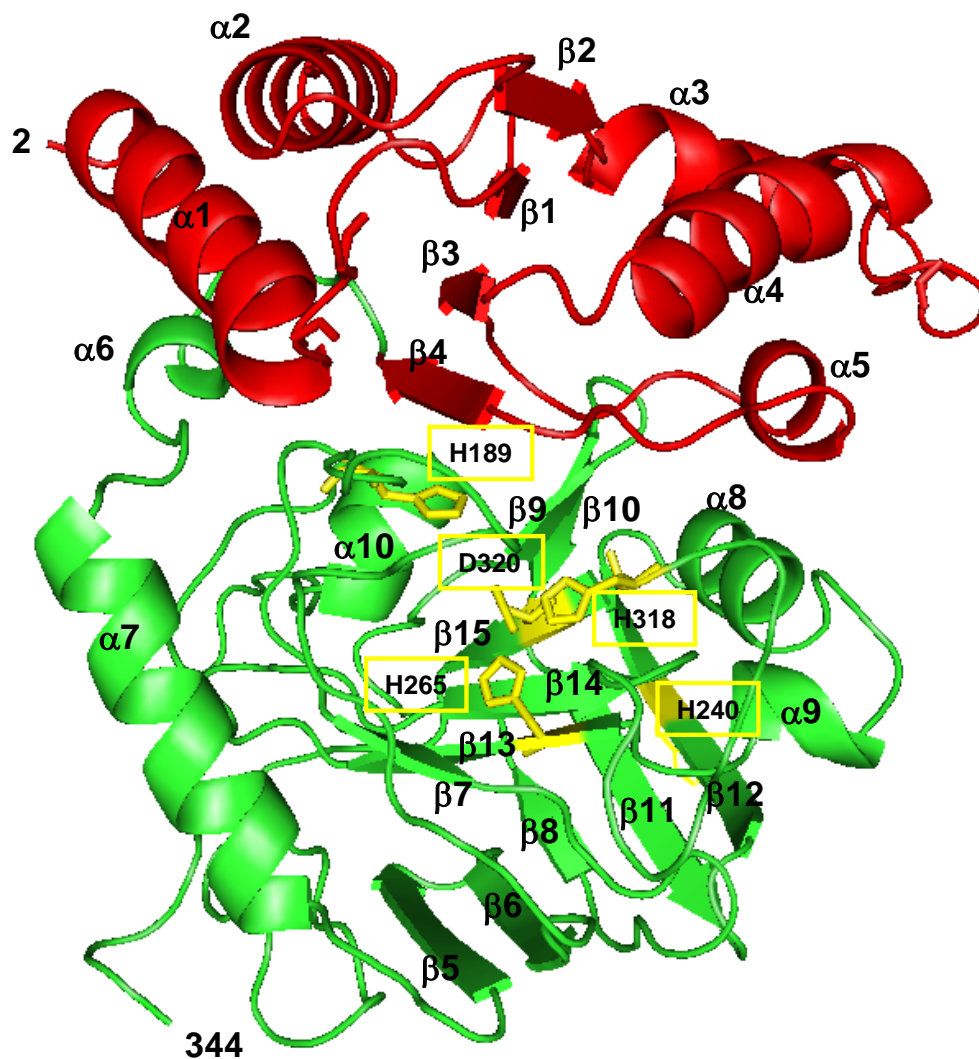
Durante el proceso de obtención de derivados de átomo pesado fue posible la cristalización de la proteína NicX en presencia de osmio ( $K_2OsCl_6$  50  $\mu M$ ), también en condiciones reductoras generadas por la adición de DTT, aunque el osmio no fue incorporado en la estructura ordenada del cristal. Los cristales obtenidos fueron analizados en la línea ID29 del *ESRF*, y mostraron una naturaleza ortorrómbica centrada (grupo espacial  $C222_1$ ) (Tabla 18). El análisis del contenido de solvente indica que, con mayor probabilidad (0.87), existen tres monómeros de la proteína NicX por unidad asimétrica. Los correspondientes  $V_M$  y porcentaje de solvente de esta estructura son 2.3  $\text{\AA}^3 \text{ Da}^{-1}$  y 46% respectivamente, idénticos a los de mayor probabilidad del cristal de la proteína NicX nativa, correspondientes a seis monómeros de proteína por unidad asimétrica. Asimismo, el análisis de la simetría no cristalográfica mediante la función de autorrotación con MOLREP, revela claramente la existencia de un eje ternario (Fig. 44B), lo que parece indicar que los tres monómeros de la unidad asimétrica se encuentran relacionados por un eje ternario, por lo que la forma hexamérica podría describirse como un dímero de trímeros.

### **3.3.4.3 Modelado de la estructura tridimensional de NicX**

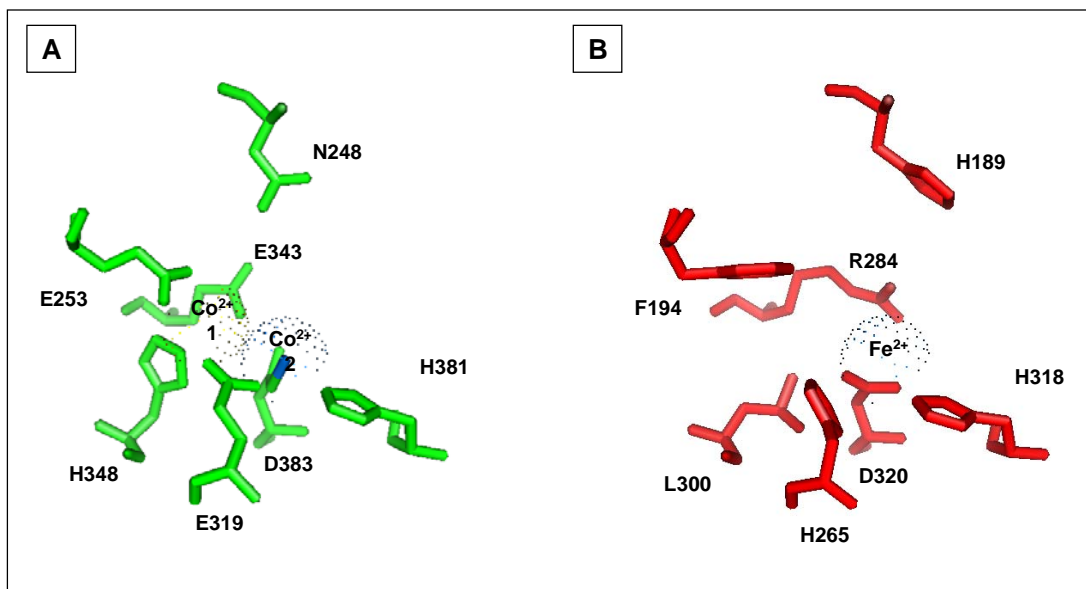
El análisis de la secuencia de aminoácidos de la proteína NicX no refleja una identidad significativa con otras dioxigenasas, aunque muestra una baja identidad (25 %) con las aminopeptidasas AmpS de *Staphylococcus aureus* (Odintsov *et al.*, 2005b) y AmpT de *Thermus thermophilus* (Odintsov *et al.*, 2005a), que poseen una estructura tridimensional conocida y fueron empleadas para generar un modelo estructural de NicX (ver apartado 8.9 de Materiales y Métodos).

En el modelo tridimensional propuesto para la proteína NicX, ésta aparece organizada en dos dominios globulares bien diferenciados. El dominio N-terminal comprende los primeros 123 aminoácidos y muestra un plegamiento en lámina  $\beta$  paralela compuesta por cuatro cadenas  $\beta$  que se encuentran unidas por hélices  $\alpha$  en una disposición  $\beta_1$ - $\alpha_2$ - $\beta_2$ - $\alpha_3$ - $\alpha_4$ - $\beta_3$ - $\alpha_5$ - $\beta_4$ , característico de un *Rossmann fold* (Fig. 45). El dominio C-terminal, por su parte, se encuentra organizado como dos láminas  $\beta$  antiparalelas ( $\beta_5$ - $\beta_6$ - $\beta_8$ - $\beta_{11}$ - $\beta_{12}$  y  $\beta_7$ - $\beta_{13}$ - $\beta_{14}$ - $\beta_{15}$ - $\beta_9$ - $\beta_{10}$ , respectivamente) que se encajan entre sí y se encuentran unidas por las hélices  $\alpha_8$  y  $\alpha_9$  (Fig. 45). En la superficie de una de las láminas  $\beta$  del dominio C-terminal se localizan los

residuos que presumiblemente conforman el centro activo de la enzima, puesto que ocupan la misma posición en el modelo que los del centro activo de la aminopeptidasa AmpS (Fig. 45).



**Figura 45. Modelo tridimensional propuesto para la proteína NicX.** En rojo se muestra el dominio N-terminal mientras que el dominio C-terminal aparece en verde. Se detalla la numeración de las hélices  $\alpha$  ( $\alpha 1$ – $\alpha 10$ ) y las cadenas  $\beta$  ( $\beta 1$ – $\beta 15$ ). En amarillo se muestran los residuos H189, H240, H265, H318, y D320, que fueron objeto de mutagénesis dirigida en este trabajo. La figura fue generada mediante el programa PyMol (DeLano, 2002).



**Figura 46. Representación de los centros activos de las proteínas AmpS (A) y NicX (B).** En la figura se representan los residuos implicados en la coordinación de los dos iones de cobalto (II) en AmpS (en verde), y los residuos que ocupan la posición espacial correspondiente y presuntamente implicados en la coordinación del Fe(II) en el modelo tridimensional de NicX (en rojo). La figura fue generada mediante el programa PyMol (DeLano, 2002).

En el centro activo de AmpS existen dos sitios de unión de Co (II) de alta afinidad, el primero de ellos (Co<sub>1</sub>) está definido por los residuos E253 y H348, y el segundo (Co<sub>2</sub>) lo constituyen los aminoácidos E319, D383 y H381 (Odintsov *et al.*, 2005b). Un análisis detallado del modelo estructural de NicX muestra que el sitio Co<sub>2</sub> de AmpS equivale a los residuos H265, H318 y D320 de NicX, los cuales podrían así estar implicados en la coordinación del ion metálico (Fe<sup>2+</sup>) en la 2,5-DHP dioxigenasa. Sin embargo, el sitio Co<sub>1</sub> de AmpS no se encuentra conservado en NicX (Fig 46). De hecho, cuando se analizó la posible actividad aminopeptidasa de NicX (ver apartado 8.5.6 de Materiales y Métodos), no se observó degradación de encefalina, ya que en el espectro obteniendo empleando la técnica de MALDI-TOF no se observó la aparición de ningún pico correspondiente a péptidos de menor tamaño que la encefalina. Este resultado sugiere que NicX carece de dicha actividad aminopeptidasa, y está de acuerdo con la ausencia del sitio Co<sub>2</sub> en esta enzima.



### **3.3.4.4 Mutagénesis dirigida de residuos conservados en NicX**

La comparación de la estructura tridimensional de la aminopeptidasa AmpS de *S. aureus* (Odintsov *et al.*, 2005b) con el modelo estructural de la proteína NicX revela la existencia de un motivo de unión a metales divalentes conservado en el dominio C-terminal de las dos proteínas. En el caso de NicX, los residuos H265, H318 y D320 formarían la tríada facial que coordina el átomo de Fe (II) que participa en la catálisis (Fig. 46), y se encuentran conservados en todo el conjunto de proteínas homólogas a NicX identificadas en otros organismos (ver apartado 4 de Discusión). Para confirmar esta hipótesis, se procedió a la mutagénesis dirigida de dichos residuos en NicX, sustituyéndolos por alanina tal y como se describe en el apartado 6.4 de Materiales y Métodos. Los estudios de mutagénesis dirigida se completaron con la sustitución por alanina del residuo H189, localizado en la otra cara de la esfera de coordinación del ion metálico, y del residuo H240, que en el modelo se encuentra en la superficie de la proteína alejado del centro activo y cuya modificación no debería afectar a la catálisis enzimática (Figs. 45 y 46). Los ensayos enzimáticos se realizaron con extractos crudos de células de *E. coli* BLB21 (DE3) que contienen los distintos plásmidos (pETNicX, pETH189A, pETH240A, pETH265A, pETH318A y pETD320A; Tabla 6). Las proteínas se produjeron al mismo nivel ya que se observaron, mediante SDS-PAGE, cantidades similares de proteína hiperexpresada en el sobrenadante de los extractos que contenían NicX o las distintas enzimas mutantes. A continuación, se valoró la actividad específica 2,5-DHP dioxigenasa en los extractos obtenidos, y se comparó con la actividad específica que muestran los extractos que contienen la proteína NicX nativa (Tabla 19). Los resultados obtenidos sugieren que los residuos H265, H318 y D320 podrían constituir la tríada facial encargada de coordinar el ion metálico en el centro activo de la enzima NicX, puesto que las distintas proteínas mutantes pierden completamente la actividad. Como era de esperar, la mutación control H240A no afecta significativamente a la actividad. Sin embargo, la sustitución H189A tiene como consecuencia la pérdida del 90% de la actividad específica de la enzima, lo que indica que pese a que este residuo no forme parte del centro activo, sí que podría tener importancia en la estabilidad conformacional de éste, o podría estar implicado en la unión del sustrato o de algún intermedio de reacción.

**Tabla 19. Actividad 2,5-DHP dioxigenasa de las proteínas NicX mutantes**

NicX Mutante	% actividad específica <sup>a</sup>
H265A	N.d.
H318A	N.d.
D320A	N.d.
H189A	10
H240A	95

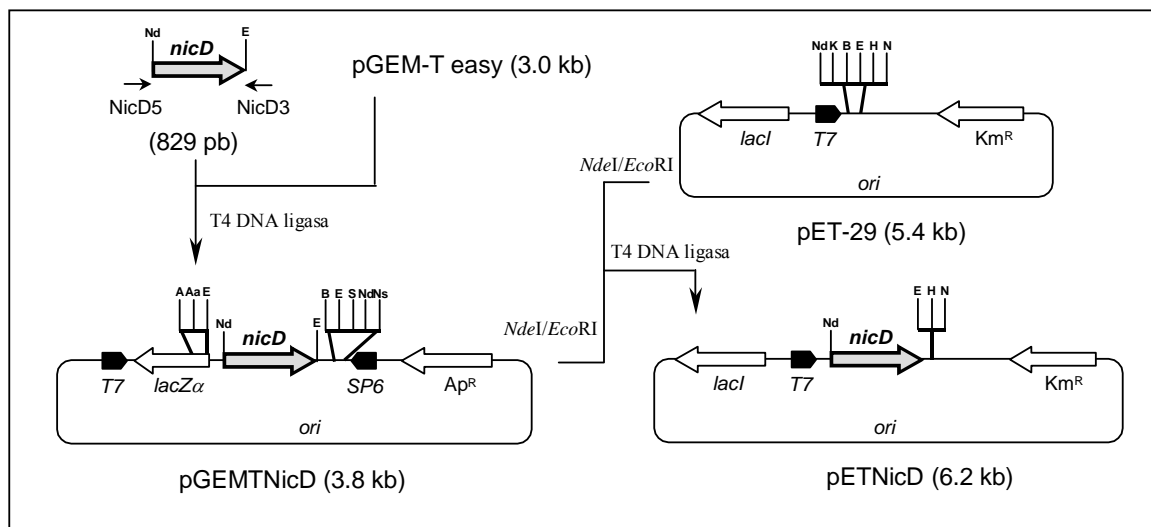
<sup>a</sup>La actividad 2,5-DHP dioxigenasa se ensayó en extractos crudos de *E. coli* BL21 (DE3) conteniendo el plásmido pETNicX o sus derivados (pETH265A, pETH318A, pETH320A, pETH189A y pETH240A), como se describe en el apartado 8.5.3 de Materiales y Métodos. 100% ( $6 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ ) se refiere a la actividad que presentan los extractos que contienen la proteína NicX parental. N.d., indica que no se detectó actividad.

### **3.4 Estudio del gen *nicD***

Una vez demostrada la formación del ácido *N*-formilmaleámico y que éste es estable en disolución, cabría esperar que la siguiente actividad en la ruta de degradación del NA fuese la desformilación del producto de apertura para proporcionar ácido maleámico (Fig. 13). El gen *nicD* podría estar implicado en ese proceso dado que la proteína NicD presenta similitud de secuencia con  $\alpha/\beta$ -hidrolasas, una gran familia de enzimas que catalizan diferentes reacciones como la hidrólisis de ésteres de ácidos carboxílicos, lípidos, tioésteres, péptidos, epóxidos y enzimas como haloperoxidasas y deshalogenasas (Holmquist, 2000).

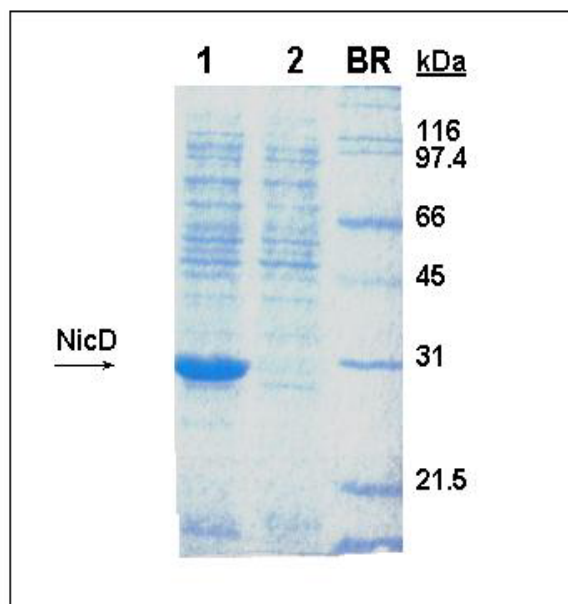
Para estudiar el papel del gen *nicD* en la ruta NA se procedió primeramente a su clonación e hiperexpresión en *E. coli*. Para ello, el gen *nicD* fue amplificado por PCR y clonado en el vector pGEM-T easy, generando el plásmido pGEMTNicD (Fig. 47). Posteriormente, el gen *nicD* se subclonó con las enzimas de restricción *NdeI* y *EcoRI* en el vector de hiperexpresión pET-29a(+) bajo el control del promotor 10 del fago T7, resultando en el plásmido pETNicD (Fig. 47). Los extractos celulares de cultivos de *E. coli* BL21 (DE3) (pETNicD) obtenidos como se detalla en el apartado 8.1 de Materiales y Métodos muestran en SDS-PAGE una intensa banda correspondiente a una proteína de 29 kDa (Fig. 48), lo que

coincide con el tamaño predicho para NicD (29.1 kDa, 268 aa) según se deduce de la secuencia codificante del gen *nicD* (Tabla 13).



**Figura 47. Representación esquemática de la construcción del plásmido pETNicD.** El gen *nicD* fue amplificado por PCR utilizando la pareja de oligonucleótidos NicD5 y NicD3 (Tabla 7) y DNA genómico de *P. putida* KT2440. 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 *EcoRI*. Las abreviaturas utilizadas son: *lacZα*, subunidad  $\alpha$  de la  $\beta$ -galactosidasa;  $Ap^R$ , 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; T7, promotor del gen *10* del fago T7. Las dianas de restricción señaladas son: Aa, *AatII*; A, *Apal*; B, *BamHI*; E, *EcoRI*; H, *HindIII*; K, *KpnI*; Nd, *NdeI*; N, *Not I*; Ns, *NsiI*.

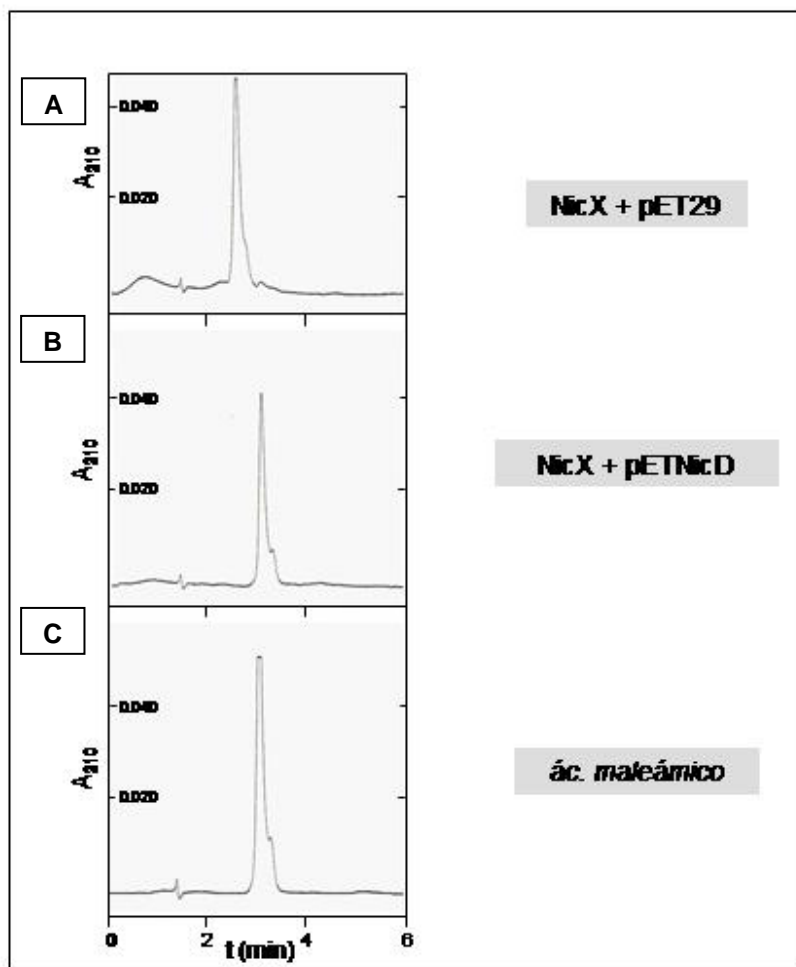
Para confirmar si NicD es una desformilasa que actúa sobre el ácido *N*-formilmaleámico, primeramente se generó este compuesto mediante la reacción de la 2,5-DHP con NicX, y posteriormente se añadió NicD en un extracto crudo de la cepa *E. coli* BLB21 (DE3) (pETNicD) (ver apartado 8.5.4 de Materiales y Métodos). Mediante HPLC se observó que la adición de NicD ocasionaba la desaparición del sustrato (ácido *N*-formilmaleámico; tiempo de retención de 2.6 min) y la aparición de un nuevo pico con un tiempo de retención ligeramente superior (3.0 min) y que correspondía al de un patrón de ácido maleámico (Fig. 49).



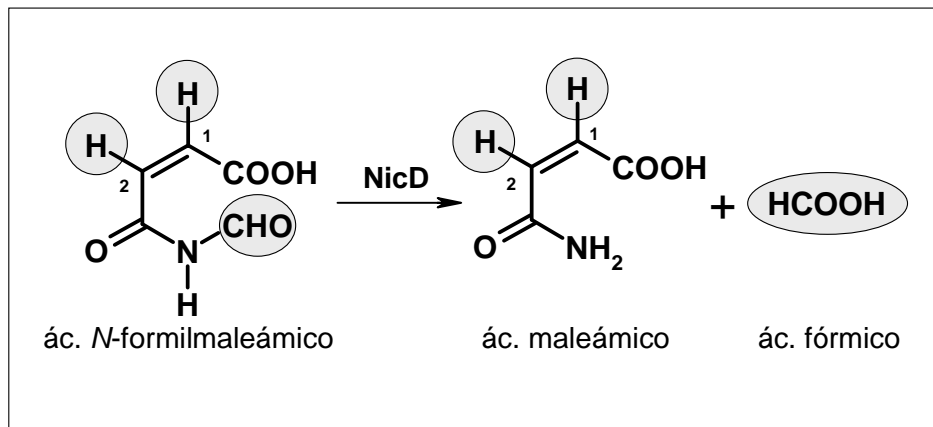
**Figura 48. Hiperproducción de la proteína NicD en extractos de *E. coli* BL21 (DE3) (pETNicD).** SDS-PAGE al 12.5 % en el que se muestra la hiperproducción de la proteína NicD (señalada con una flecha) en extractos crudos (5  $\mu$ g proteína total) de *E. coli* BL21 (DE3) (pETNicD) (calle 1). En la calle 2 se muestra un extracto crudo de la cepa control *E. coli* BL21 (DE3) (pET-29a(+)). BR, marcadores de peso molecular “Broad-Range” de BioRad.

La desaparición del grupo formilo del ácido *N*-formilmaleámico y la formación de los ácidos maleámico y fórmico como consecuencia de la reacción catalizada por NicD se comprobó también registrando los espectros  $^1\text{H}$  RMN. El esquema de reacción propuesto se muestra en la Fig. 50, en la que se destacan los hidrógenos del sustrato y los de los productos que proporcionan señales en RMN. El producto obtenido tras el tratamiento del ácido *N*-formilmaleámico con NicD posee dos señales de dos dobletes mutuamente acoplados, con una constante de acoplamiento de 15 Hz, similar a la constante de acoplamiento de los del sustrato de la reacción, pero con unos desplazamientos químicos de 6.30 ppm y 5.83 ppm, mientras que las señales equivalentes del sustrato eran 6.52 ppm y 6.06 ppm (Fig. 51). En ambos casos, estas dos señales se corresponden a los hidrógenos de los carbonos 1 y 2 que conforman el doble enlace, tanto en el sustrato como en el producto de la reacción (Fig. 50). Además, en el producto de la reacción desaparece el pico adicional con un desplazamiento de 8.59 ppm correspondiente al grupo aldehído del ácido *N*-formilmaleámico, y aparece un nuevo pico a 8.35 ppm que se puede adscribir al ácido fórmico cuando se compara con los

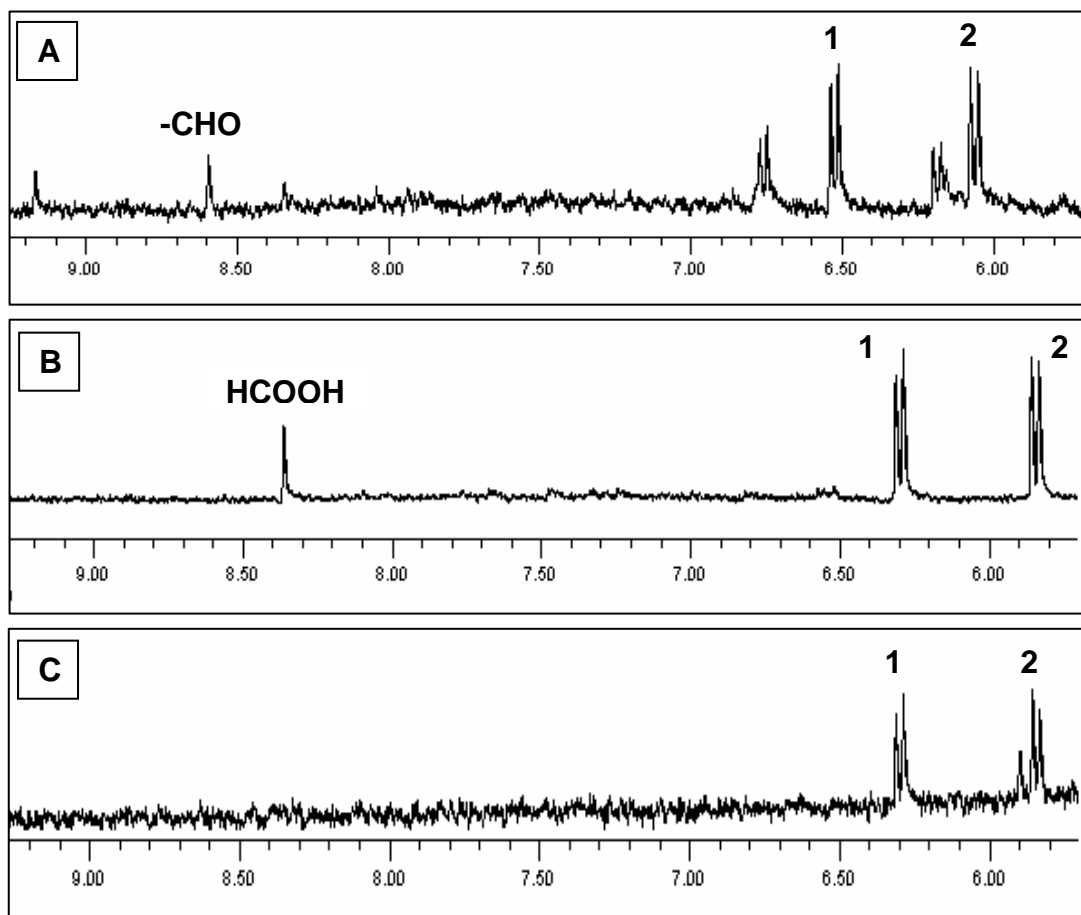
desplazamientos químicos tabulados para esta especie en función del pH. Cuando se compara el espectro  $^1\text{H}$  de la reacción (Fig. 51B) con el del ácido maleámico patrón (Fig. 51C), se observa que los desplazamientos de 6.30 ppm y 5.83 ppm son coincidentes.



**Figura 49. Conversión del ácido *N*-formilmaleámico en ácido maleámico mediada por la proteína NicD.** Se muestran los cromatogramas de HPLC ( $A_{210\text{nm}}$ ) de la reacción del ácido *N*-formilmaleámico (0.2 mM) con un extracto control de *E. coli* BLB21 (DE3) (pET-29) (Panel A) y un extracto de *E. coli* BLB21 (DE3) (pETNicD) (Panel B). En ambos casos se emplearon 50  $\mu\text{g}$  proteína total en el extracto y la reacción se realizó durante 15 min a 25°C según el protocolo que se detalla en el apartado 8.5.4 de Materiales y Métodos. En el panel C, se muestra el cromatograma de un patrón comercial de ácido maleámico (50  $\mu\text{M}$ ). Las muestras de los paneles A y B se diluyeron 4 veces en agua destilada previamente a su aplicación en la columna de HPLC.



**Figura 50. Reacción catalizada por NicD.** Los círculos grises destacan aquellos protones que pueden ser detectados en un espectro de RMN en las condiciones del ensayo.



**Figura 51. Espectros  $^1\text{H}$  RMN del sustrato y de los productos de la reacción catalizada por NicD.** En el panel A, se muestra el espectro de protón del ácido *N*-formilmaleámico en el tampón de la reacción. En el panel B, se muestra el espectro de protón de la reacción tras la adición de un extracto que contiene NicD (0.1 mg proteína total) e incubación a 25°C durante 15 min. En el panel C, se muestra el espectro de protón correspondiente al ácido maleámico patrón (0.5 mM) a pH 3.0. -CHO indica la señal del protón presente en el grupo aldehído del ácido *N*-formilmaleámico, mientras que HCOOH indica la señal del protón presente en el ácido fórmico. Las muestras se trataron como se indica en el apartado 10 de Materiales y Métodos.

Por lo tanto, todos estos resultados demuestran que NicD es una desformilasa que cataliza la cuarta etapa de la degradación de NA en *P. putida* KT2440 con la formación de ácido maleámico y fórmico (Fig. 13).

Por lo que respecta a las dos últimas etapas de la degradación de NA, es decir, la transformación del ácido maleámico en ácido maleico y la conversión de éste en ácido fumárico (Fig. 13), estarán codificadas por los productos de los genes *nicF* y *nicE*, respectivamente, tal y como se infiere del correspondiente análisis de comparación de secuencias (Tabla 13).

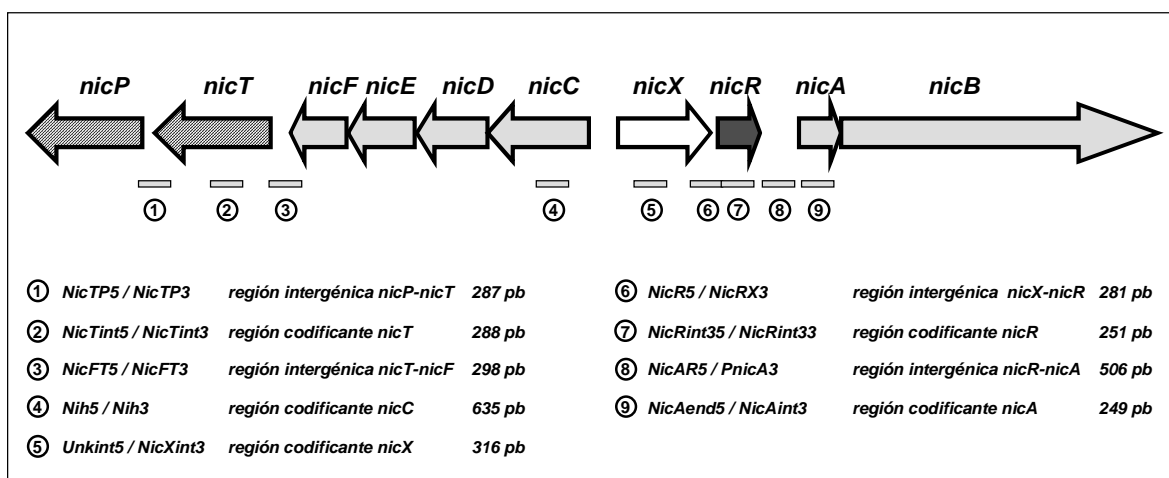
#### **4. Análisis de la regulación transcripcional de los genes *nic***

Una vez identificados los genes catabólicos de la ruta de degradación de NA en *P. putida* KT2440, se planteó el estudio de la regulación de la expresión de dichos genes. Para ello, se procedió a realizar un análisis transcripcional del *cluster nic*, identificando los promotores y los reguladores implicados.

##### **4.1 Análisis de la organización transcripcional del *cluster nic***

La organización génica del *cluster nic* revela dos grupos de genes con orientaciones opuestas (Fig. 52) lo que permite presumir la existencia de, al menos, dos promotores divergentes: el promotor *Pc* que expresaría el gen *nicC* y, posiblemente, la hipotética agrupación transcripcional *nicDEFTP*, y el promotor *Px* que expresaría el gen *nicX* y, en el caso de constituir una unidad transcripcional, los genes *nicRAB*. Un análisis más detallado de la secuencia del *cluster nic* permite comprobar que existen otras regiones intergénicas, como las que se localizan entre los genes *nicT* y *nicP* (140 pb), *nicF* y *nicT* (209 pb), *nicX* y *nicR* (72 pb), y *nicR* y *nicA* (249 pb) que, por su longitud, también podrían contener promotores de la transcripción. El resto de regiones intergénicas del *cluster nic* poseen una longitud inferior a 15 pb, lo que sugiere la ausencia de promotores y, por consiguiente, la co-transcripción de los correspondientes genes.

Para determinar la organización transcripcional de los genes *nic*, se realizó un estudio de la expresión de distintas regiones del *cluster nic* (Fig. 52) mediante experimentos de RT-PCR. Para ello se aisló el RNA total de cultivos de *P. putida* KT2440 crecidos en NA (condiciones de inducción) o en citrato (condiciones de no inducción) como únicas fuentes de carbono y energía. Los experimentos de RT-PCR se realizaron como se indica en el apartado 7 de Materiales y Métodos, utilizando los oligonucleótidos que se muestran en la Fig. 52. Los resultados obtenidos revelan que los genes *nic* que codifican enzimas de la ruta (*nicA*, *nicC* y *nicX*) únicamente se expresan cuando las células se cultivan en NA como única fuente de carbono y energía, no apreciándose su expresión cuando las células se cultivan en citrato (Fig. 53). Sin embargo, el mRNA de los genes *nicT*, *nicP* y *nicR* se detecta tanto en células creciendo en NA como en citrato (Fig. 53). Por lo tanto, estos estudios indican que si bien los genes *nic* catabólicos son inducibles en presencia de NA, los genes *nic* presuntamente implicados en transporte (*nicT* y *nicP*) y en regulación transcripcional (*nicR*) (Tabla 13) poseen una expresión constitutiva.

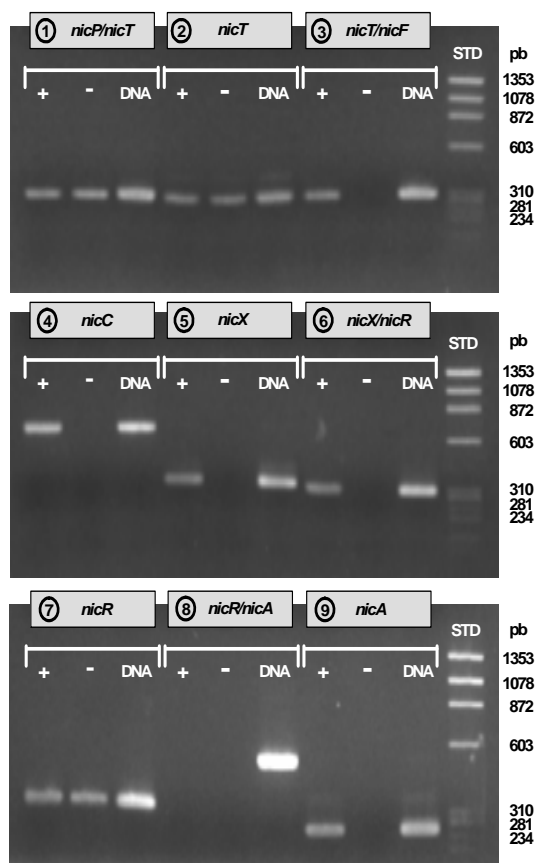


**Figura 52. Regiones del *cluster nic* cuya expresión se ha estudiado mediante RT-PCR.** Las flechas indican el ordenamiento génico del “cluster” *nic*. En la parte inferior se incluyen las parejas de oligonucleótidos empleadas (la secuencia de los oligonucleótidos se detalla en la Tabla 7) y el tamaño y la localización de los fragmentos amplificados (barras horizontales).

Los experimentos de RT-PCR realizados con regiones intergénicas permiten identificar las unidades transcripcionales del “cluster” *nic*. Estos análisis muestran que la región intergénica *nicR-nicA* no pudo ser amplificada en ninguna de las condiciones

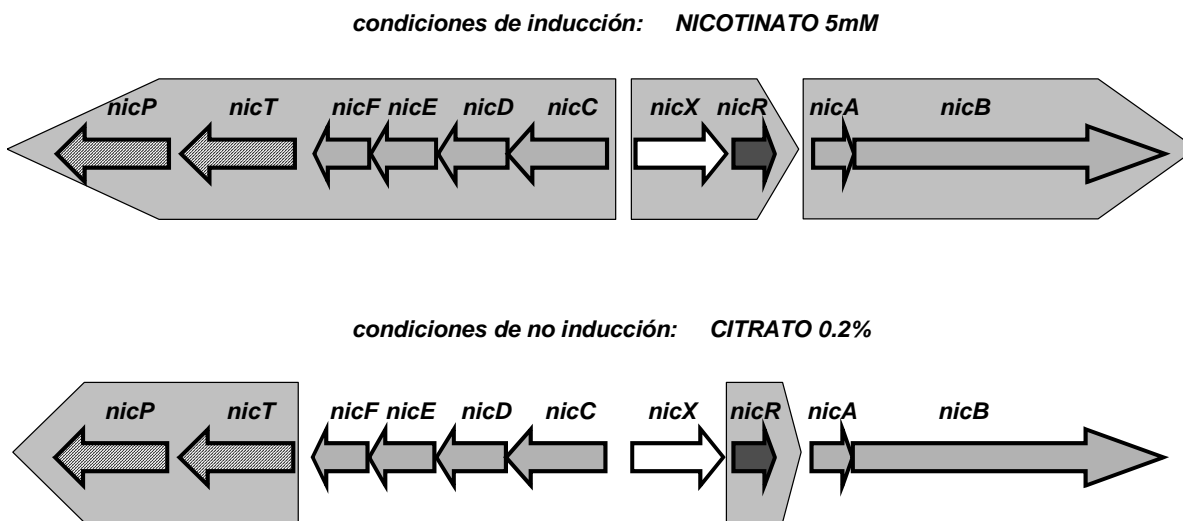


ensayadas (Fig. 53), lo que sugiere que dichos genes no forman parte del mismo operón. La presencia de un producto de amplificación del tamaño esperado indica la co-transcripción de los genes *nicX* y *nicR*, así como la de los genes *nicF-nicT*, y *nicT-nicP*, cuando las células se cultivan en presencia de NA. Por el contrario, en condiciones de no inducción, sólo se observa co-transcripción de los genes *nicT* y *nicP* (además de la ya mencionada expresión del gen *nicR*) (Fig. 53).



**Figura 53. Electroforesis en geles de agarosa de los productos de RT-PCR obtenidos a partir del RNA aislado de *P. putida* KT2440 creciendo en presencia o ausencia de NA.** En la parte superior de los geles se indica el fragmento del *cluster nic* analizado según se esquematiza en la figura 51. Las calles marcadas como (+) corresponden a la condición de inducción (crecimiento en NA 5 mM), mientras que las marcadas como (-) corresponden a la condición de no inducción (crecimiento en citrato 0.2%). Las calles marcadas como DNA corresponden al fragmento generado por PCR utilizando DNA cromosómico de *P. putida* KT2440 como molde y los mismos oligonucleótidos que los utilizados en la reacción de RT-PCR correspondiente. Como marcadores de peso molecular (STD) se emplearon los fragmentos generados tras la digestión del DNA del fago  $\phi$ X174 con *Hae*III (New England Biolabs).

En su conjunto, los experimentos de RT-PCR revelan que cuando *P. putida* KT2440 utiliza NA como única fuente de carbono, la expresión de los genes *nic* responde a la existencia de, al menos, tres operones: *nicAB*, *nicXR* y *nicCDEFTP*. Por el contrario, cuando *P. putida* KT2440 no utiliza NA como fuente de carbono, sólo se observa la expresión de dos unidades transcripcionales: *nicTP* y *nicR* (Fig. 54).



**Figura 54.** Esquema de la organización transcripcional de los genes *nic* en condiciones de inducción o de no inducción. Los genes englobados dentro de una misma flecha sombreada se encuentran formando parte del mismo operón y su expresión se encuentra inducida en la condición indicada.

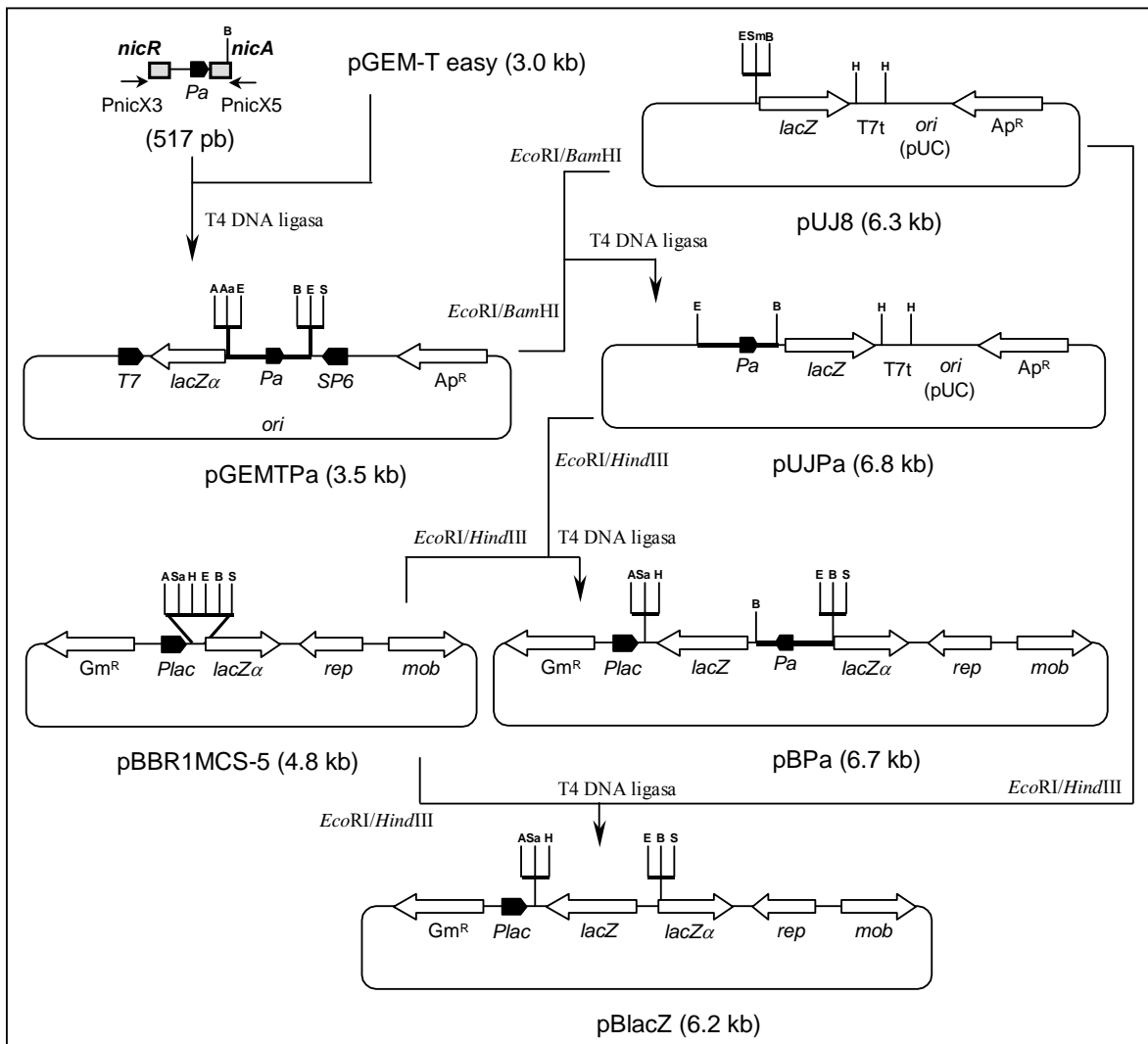
#### **4.2 Estudio de los promotores *Pa*, *Pc* y *Px* del cluster *nic***

El análisis transcripcional de los genes de la ruta de degradación del NA demostró la presencia de varios operones. Así, en condiciones de inducción existen al menos tres agrupaciones génicas que deberían ser transcritas a partir de tres regiones promotoras situadas en los extremos 5' de los genes *nicA* (promotor *Pa*), *nicC* (promotor *Pc*), y *nicX* (promotor *Px*). Para determinar la actividad promotora de estas regiones, se realizaron fusiones génicas con el gen testigo *lacZ* que codifica la  $\beta$ -galactosidasa de *E. coli*. Para ello, se emplearon plásmidos de búsqueda de promotores tales como pSJ3 y pUJ8 que permiten la construcción de fusiones traduccionales y transcripcionales, respectivamente, con el gen *lacZ* (Tabla 6).

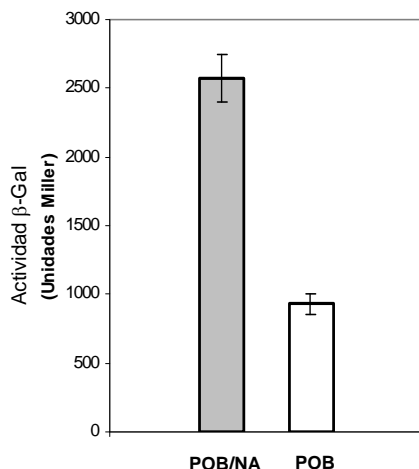
#### 4.2.1 Estudio del promotor Pa

Para confirmar la actividad del promotor *Pa*, inicialmente se amplificó por PCR la región intergénica *nicR-nicA* (506 pb) utilizando los oligonucleótidos NicAR5 y PnicA3 (Tabla 7), y el producto resultante se clonó con las enzimas de restricción *SphI/BamHI* en el vector de búsqueda de promotores pSJ3 originando el plásmido pSJPa (Tabla 6). Sin embargo, la fusión traduccional *Pa::lacZ* generada (contiene los 8 primeros presuntos aminoácidos de NicA) no era activa en *E. coli* CC118, por lo que fue subclonada como un fragmento *SphI/BamHI* en el vector de amplio espectro de huésped pBBR1MCS-5, generando el plásmido pBSPa. Cuando *P. putida* KT2440 (pBSPa) se cultivó en un medio que contenía NA como única fuente de carbono, tampoco se observó actividad  $\beta$ -galactosidasa, lo que sugería que la fusión N-terminal de los primeros aminoácidos de NicA a la proteína LacZ muy probablemente condujese a la inactivación de esta última. A raíz de este resultado, se planteó la construcción de una fusión transcripcional *Pa::lacZ* evitando así la obtención de una enzima quimérica NicA-LacZ. Para ello, se utilizó el plásmido de búsqueda de promotores pUJ8 (Tabla 6) siguiendo el esquema que se detalla en la Fig. 55. Dado que el plásmido pUJPa tampoco permitió observar actividad  $\beta$ -galactosidasa en *E. coli* CC118, la fusión transcripcional *Pa::lacZ* se subclonó en el plásmido promiscuo pBBR1MCS-5, originando el plásmido pBPa (Fig. 55). También se construyó el plásmido control pBlacZ que contiene el gen *lacZ* sin promotor clonado en el vector pBBR1MCS-5 (Fig. 55).

*P. putida* KT2440 (pBPa) y *P. putida* KT2440 (pBlacZ) fueron cultivadas en POB como fuente de carbono, o en POB y NA para favorecer la inducción de los genes *nic*. En ambas condiciones de cultivo se realizaron ensayos de actividad  $\beta$ -galactosidasa cuando las células se encontraban en la fase exponencial de crecimiento (Fig. 56). Los resultados obtenidos mostraron que la actividad de la fusión transcripcional *Pa::lacZ* (plásmido pBPa) era significativamente superior a la del gen *lacZ* sin promotor (plásmido pBlacZ), lo que confirmaba la existencia del promotor *Pa* en el plásmido pBPa. Por otro lado, la actividad del promotor *Pa* se incrementa 2.5 veces cuando las células crecen en presencia de NA respecto a cuando crecen sólo en presencia de POB (Fig. 56), lo que indica que dicho promotor es inducible cuando se metaboliza el NA.



**Figura 55. Representación esquemática de la construcción de los plásmidos pBPa y pBlacZ.** La región intergénica *nicR-nicA* fue amplificada por PCR utilizando la pareja de oligonucleótidos PnicA3 y NicAR5 (Tabla 7) y DNA genómico de *P. putida* KT2440 como molde. El producto de PCR se clonó en el plásmido pGEM-T easy y fue subclonado en el vector pUJ8 empleando las dianas de restricción *EcoRI* y *BamHI*. Posteriormente, la fusión *Pa::lacZ* generada se subclonó en pBBR1MCS-5 empleando las dianas *HindIII* y *EcoRI*, generando el plásmido pBPa. Un esquema similar se siguió para clonar el gen *lacZ* sin promotor, generando el plásmido control pBlacZ. Las abreviaturas utilizadas son: T7t, terminador de la transcripción del fago T7; *lacZ*, gen que codifica la  $\beta$ -galactosidasa; *lacZ $\alpha$* , fragmento génico que codifica la subunidad  $\alpha$  de la  $\beta$ -galactosidasa; *Ap<sup>R</sup>*, gen que confiere resistencia a ampicilina; *Gm<sup>R</sup>*, gen que confiere resistencia a gentamicina; *ori* (pUC), origen de replicación del plásmido pUC; T7, promotor del gen 10 del fago T7; SP6, promotor del fago SP6; *rep* y *mob*, genes de replicación y movilización del plásmido pBBR1MCS. Las dianas de restricción señaladas son: A, *ApaI*; Aa, *AatII*; B, *BamHI*; E, *EcoRI*; H, *HindIII*; S, *SacI*; Sa, *SaII*; Sm, *SmaI*.

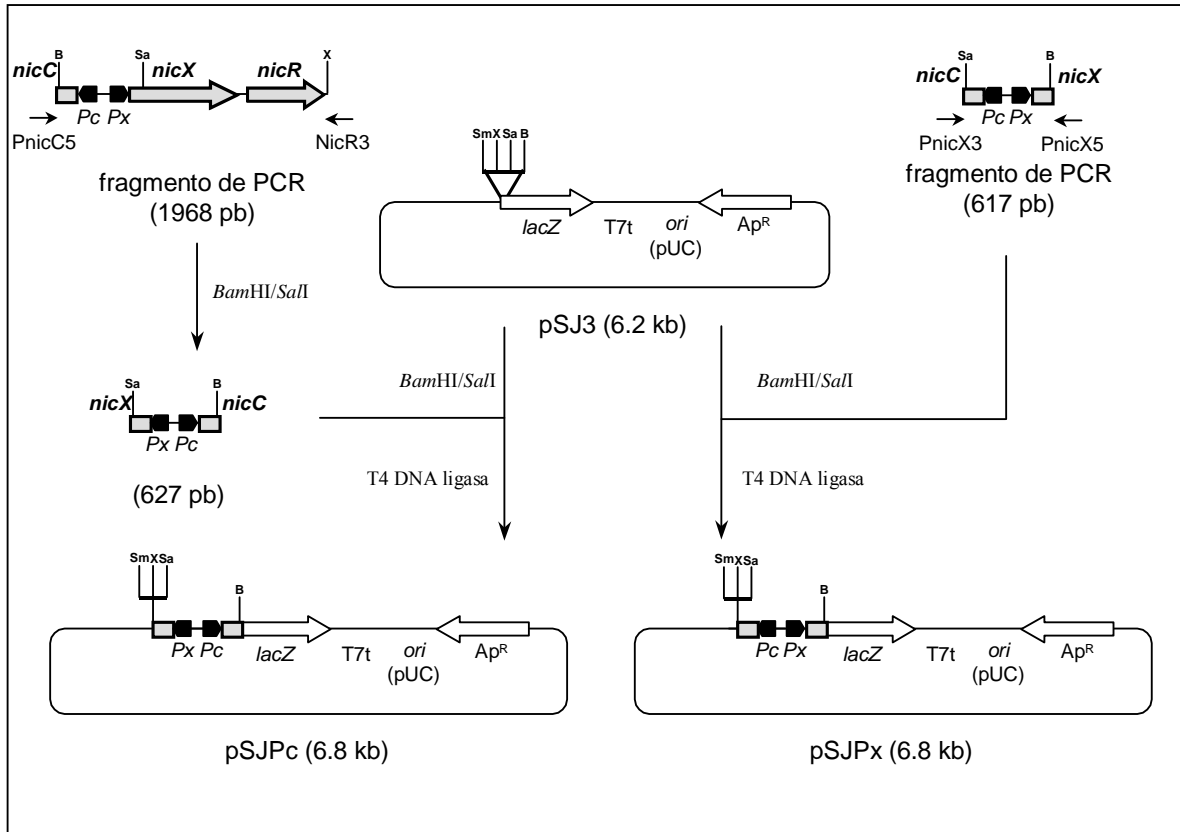


**Figura 56. Actividad  $\beta$ -galactosidasa en *P. putida* KT2440 (pBP $\alpha$ ).** La cepa se cultivó hasta una  $A_{600}$  de 0.35 en medio MC con POB (5 mM) como única fuente de carbono (barra blanca), o en presencia de POB (5 mM) y NA (5 mM) como fuentes de carbono (barra gris). Los ensayos de actividad  $\beta$ -galactosidasa (en unidades Miller) se realizaron con células permeabilizadas como se indica en el apartado 8.5.5 de Materiales y Métodos. A los resultados obtenidos se les sustrajo el valor basal de actividad (800 unidades Miller) obtenido con la cepa control *P. putida* KT2440 (pBlacZ). Los valores representados son la media de tres experimentos independientes con una desviación estándar que se indica en la figura.

#### **4.2.2 Estudio de los promotores *Pc* y *Px***

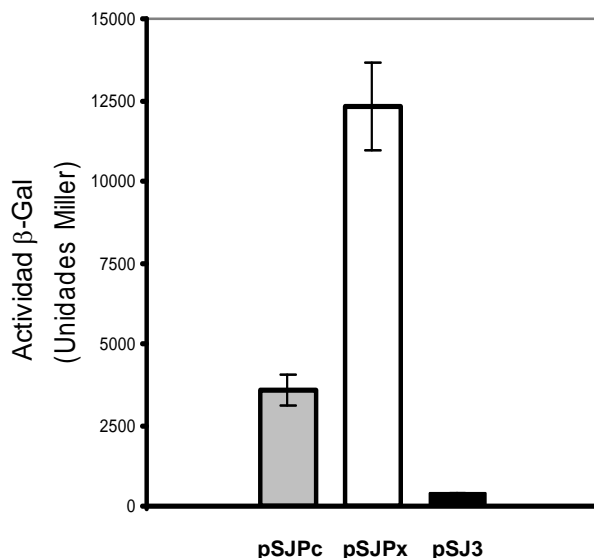
Para confirmar la actividad de los promotores divergentes *Pc* y *Px* se realizaron fusiones traduccionales con el gen reportero *lacZ* en el plásmido de búsqueda de promotores pSJ3. Los oligonucleótidos diseñados para amplificar por PCR los promotores *Pc* y *Px* permiten realizar una fusión traduccional de los codones iniciales de los genes *nicC* y *nicX* al codón 9 del gen *lacZ* utilizando la enzima de restricción *Bam*HI, obteniéndose los plásmidos pSJ*Pc* y pSJ*Px* que contienen las fusiones traduccionales *Pc*::*lacZ* y *Px*::*lacZ*, respectivamente (Fig. 57).

Los plásmidos pSJ*Pc* y pSJ*Px* confieren color azul intenso a las colonias transformantes de la cepa *E. coli* CC118 cuando se cultivan en placas de medio LB conteniendo el sustrato cromogénico (X-Gal) de la enzima  $\beta$ -galactosidasa, lo que indica que tanto el promotor *Pc* como el promotor *Px* son funcionales en *E. coli*. Cuando se realizaron ensayos  $\beta$ -galactosidasa con células permeabilizadas de *E. coli* CC118 (pSJ*Pc*) y *E. coli* CC118 (pSJ*Px*), se observó que el promotor *Px* presentaba una actividad 3.5 veces superior a la del promotor *Pc* (Fig. 58).



**Figura 57. Representación esquemática de la construcción de los plásmidos pSJPC y pSJPx.** La región intergénica comprendida entre los genes *nicC* y *nicX* fue amplificada por PCR utilizando como molde el DNA genómico de *P. putida* KT2440 y la pareja de oligonucleótidos PnicC5 y NicR3 (Tabla 7) para la construcción de la fusión *Pc::lacZ* (expresa la proteína LacZ con una fusión N-terminal que contiene los 3 primeros aminoácidos de NicC). La pareja de oligonucleótidos PnicX5 y PnicX3 (Tabla 7) se utilizó para la construcción de la fusión *Px::lacZ* (expresa la proteína LacZ con una fusión N-terminal que contiene los 8 primeros aminoácidos de NicX). Los dos productos de PCR se clonaron en el plásmido pSJ3 tras digestión con las enzimas de restricción *SalI* y *BamHI*. Las abreviaturas utilizadas son: T7t, terminador de la transcripción del fago T7; *lacZ*, gen que codifica la  $\beta$ -galactosidasa; Ap<sup>R</sup>, gen que confiere resistencia a ampicilina; *ori* (pUC), origen de replicación del plásmido pUC. Las dianas de restricción indicadas son: B, *BamHI*; Sa, *SalI*; Sm, *SmaI*; X, *XbaI*.

Por lo tanto, los resultados obtenidos demuestran que los promotores divergentes *Pc* y *Px* son funcionales en *E. coli* en ausencia de elementos reguladores adicionales, lo que sugiere que la inducción de los genes *nicC* y *nicX* observada cuando *P. putida* KT2440 se cultiva en presencia de NA (Fig. 54) probablemente sea el resultado de la inactivación de un sistema de control negativo.

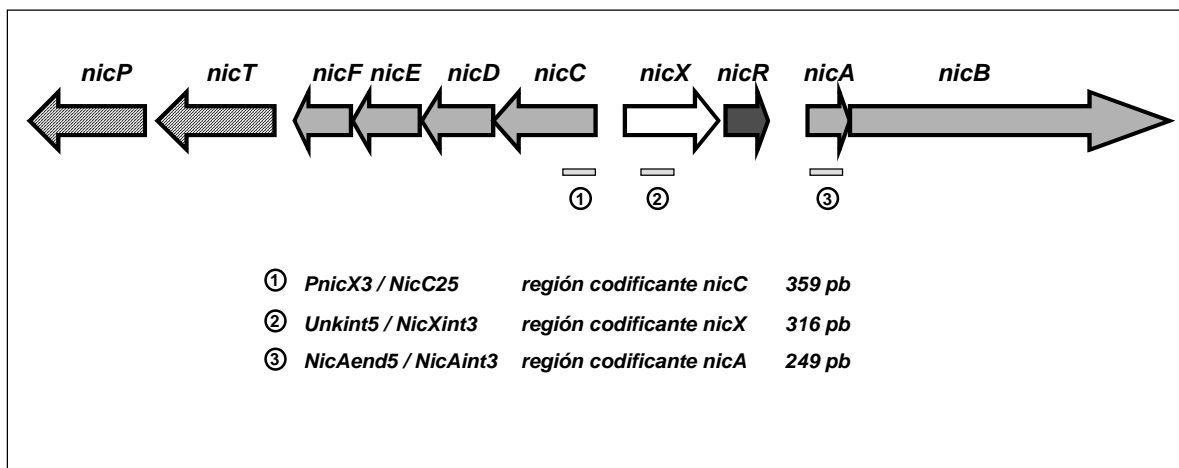


**Figura 58. Expresión de las fusiones traduccionales *Pc::lacZ* y *Px::lacZ* en células de *E. coli* CC118.** Las cepas *E. coli* CC118 (pSJPC) (*Pc::lacZ*) (barra gris), *E. coli* CC118 (pSJPx) (*Px::lacZ*) (barra blanca) y la cepa control *E. coli* CC118 (pSJ3) (barra negra) se cultivaron en medio LB hasta alcanzar una  $A_{600}$  de 0.5. Los ensayos de actividad β-galactosidasa (en unidades Miller) se realizaron con células permeabilizadas como se indica en el apartado 8.5.5 de Materiales y Métodos. Los valores representados son la media de tres experimentos independientes con una desviación estándar que se indica en la figura

### 4.3 Estudio de los inductores del cluster *nic*

En los apartados 4.1 y 4.2 se ha demostrado que los genes catabólicos *nic* son inducibles cuando *P. putida* KT2440 se cultiva en presencia de NA, y su expresión está controlada por los promotores *Pa*, *Pc* y *Px*. Para determinar la molécula(s) inductora(s), se analizó la expresión de dichos genes utilizando cepas mutantes de *P. putida* KT2440 que tienen bloqueada la ruta *nic* en distintas etapas enzimáticas.

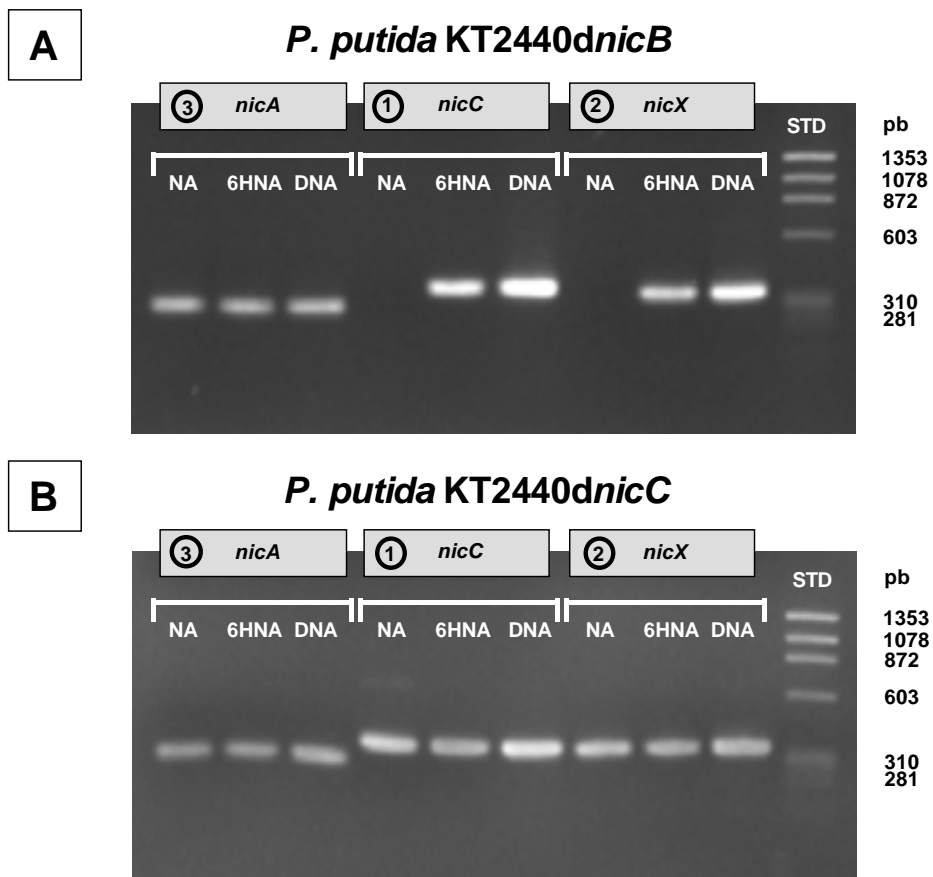
Así, las cepas mutantes *P. putida* KT2440 $\Delta$ *nicB* y *P. putida* KT2440 $\Delta$ *nicC* (Fig. 20) fueron cultivadas en medio mínimo MC con POB como fuente de carbono, y NA o 6HNA como posibles inductores de los genes *nic*. La expresión de los genes *nicA*, *nicC* y *nicX* se analizó mediante experimentos de RT-PCR realizados con los oligonucleótidos que se detallan en la figura 59. Los resultados de la inducción diferencial de los operones *nic* catabólicos en presencia de NA o 6HNA se muestran en la figura 60.



**Figura 59.** Regiones del *cluster nic* cuya expresión en respuesta a NA y 6HNA se ha estudiado mediante RT-PCR. Las flechas indican el ordenamiento génico del “cluster” *nic*. En la parte inferior se incluyen las parejas de oligonucleótidos empleadas (la secuencia de los oligonucleótidos se detalla en la Tabla 7) y el tamaño y la localización de los fragmentos amplificados (barras horizontales).

Dado que el mutante *P. putida* KT2440*dnicB* tiene bloqueada la primera actividad de la ruta de degradación de NA, no es capaz de convertir NA en ningún otro metabolito y sí es capaz de catabolizar 6HNA (Tabla 14). Utilizando dicho mutante cultivado en presencia de NA, sólo se observa un producto de amplificación del mRNA correspondiente a *nicA*, y no aparecen los productos correspondientes a los mRNAs de los genes *nicC* o *nicX* (Fig. 60A). Sin embargo, cuando la inducción se realiza con 6HNA, se observan los tres productos de amplificación correspondientes a los mRNAs de los genes *nicA*, *nicC* y *nicX* (Fig. 60A). Estos resultados sugieren que el NA es el inductor del operón *nicAB*, siendo el propio 6HNA, o alguno de los metabolitos generados en su degradación, el inductor de los tres operones *nic* (*nicAB*, *nicXR*, y *niCDEFTP*). Para confirmar si el inductor de los tres operones *nic* era el 6HNA o, por el contrario, se trataba de algún intermediario de su degradación, se realizaron experimentos de RT-PCR utilizando el mutante *P. putida* KT2440*dnicC* que no puede metabolizar el 6HNA ya que carece de la actividad 6HNA 3-monooxigenasa (ver apartado 3.2). Los resultados obtenidos (Fig. 60B) revelaron que los mRNAs aislados de *P. putida* KT2440*dnicC*, cultivada tanto en presencia de NA como de 6HNA, permiten la amplificación de los tres fragmentos analizados indicando, por lo tanto, que el 6HNA es un inductor directo de los tres operones *nic*.

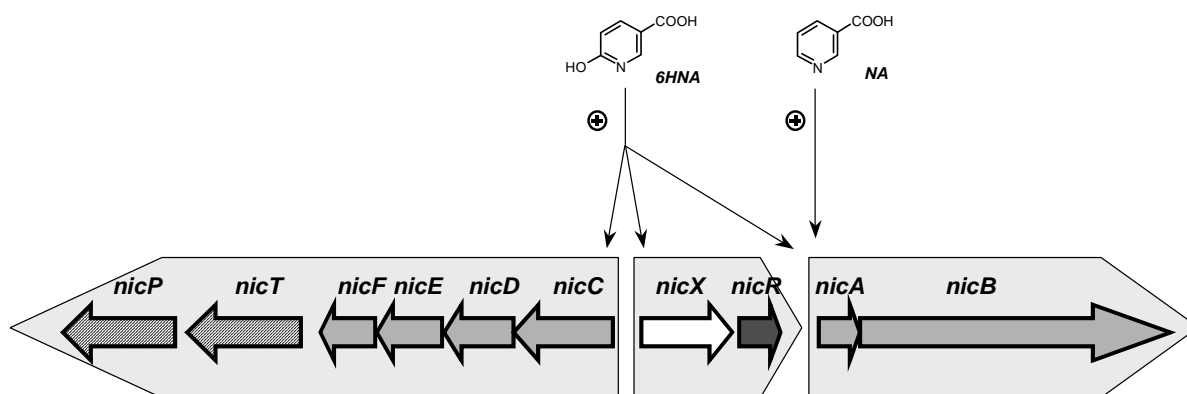




**Figura 60.** Electroforesis en geles de agarosa de los productos de RT-PCR generados a partir del RNA aislado de células de *P. putida* KT2440dnicB (panel A) y *P. putida* KT2440dnicC (panel B) cultivadas en presencia de NA o 6HNA. En la parte superior de los geles se indica el fragmento del cluster *nic* analizado según se esquematiza en la figura 56. Las calles marcadas como (NA) corresponden a la condición de crecimiento en medio MC con POB (5mM) y NA (5 mM), mientras que las marcadas como (6HNA) corresponden a la condición de crecimiento en POB (5mM) con 6HNA (5 mM). Las calles marcadas como (DNA) corresponden al fragmento generado por PCR utilizando DNA cromosómico de *P. putida* KT2440 como molde y los mismos oligonucleótidos que los utilizados en la reacción de RT-PCR correspondiente. Como marcadores de peso molecular (STD) se emplearon los fragmentos generados tras la digestión del DNA del fago  $\phi$ X174 con *Hae*III (New England Biolabs).

Finalmente, se aisló RNA de células de *P. putida* KT2440dnicC cultivadas en medio mínimo MC con POB (5 mM) como fuente de carbono y 2,5-DHP (5 mM) como posible molécula inductora de los genes *nic*. Los experimentos de RT-PCR realizados revelaron que no existía producto de amplificación de ninguna de las regiones *nic* analizadas (resultados no mostrados), lo que permite sugerir que es el 6HNA, y no el siguiente intermediario de la ruta catabólica (2,5-DHP), la molécula inductora.

En la figura 61 se esquematizan los resultados de la expresión diferencial de los operones *nicAB*, *nicCDEFTP* y *nicXR* en respuesta a NA y 6HNA.

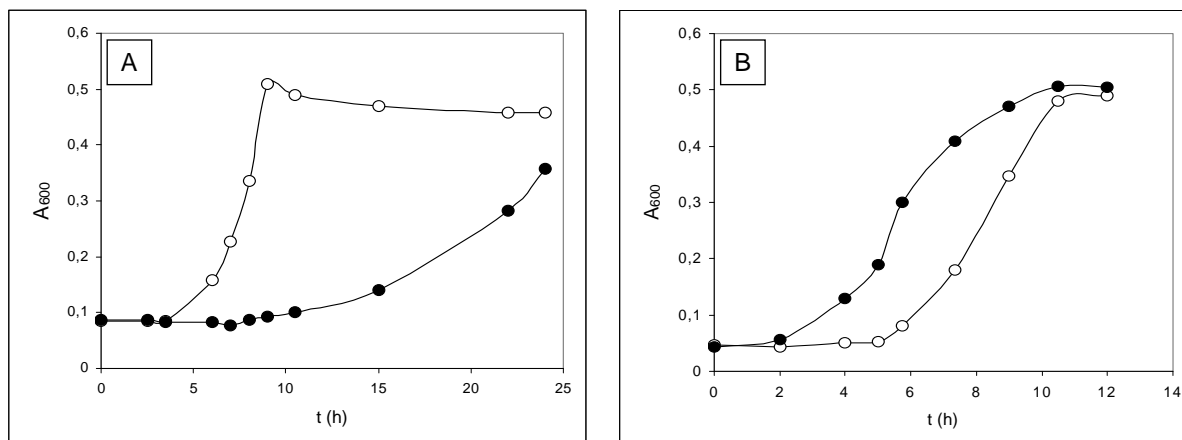


**Figura 61.** Esquema de la inducción diferencial de los genes *nic* en respuesta a NA y 6HNA. Los genes englobados dentro de una misma flecha sombreada se encuentran formando parte del mismo operón y su expresión se encuentra inducida (+) por el compuesto indicado mediante flechas.

#### **4.4 Estudio del gen regulador *nicR***

Los análisis de comparación de secuencias sugieren que el producto del gen *nicR* es un regulador transcripcional (Tabla 13). Para estudiar el papel que desempeña el gen *nicR* en la ruta *nic*, se utilizó el mutante *P. putida* KT2440*dnicR* que contiene el gen *nicR* inactivo (Fig. 20).

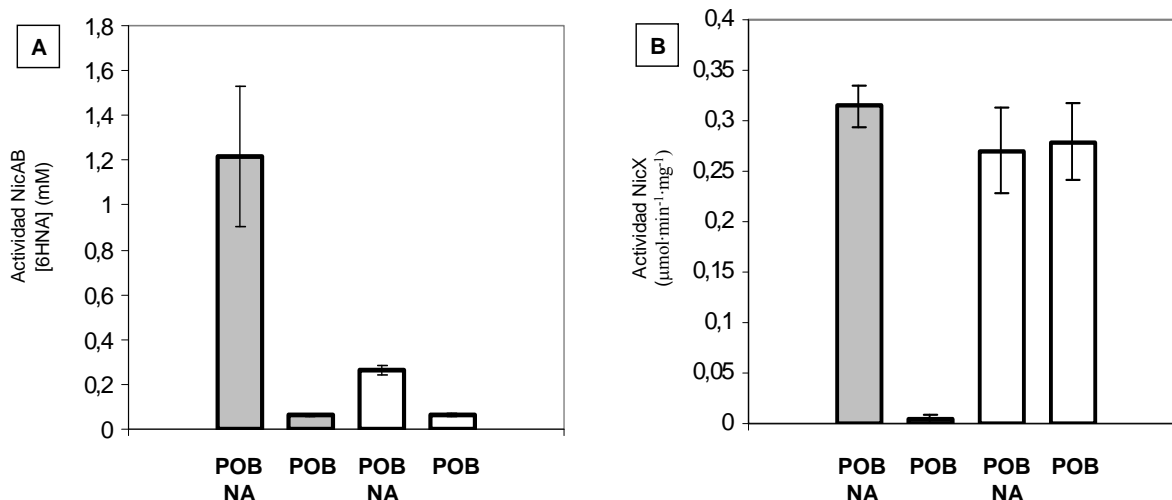
Primeramente, se comparó el crecimiento de la cepa mutante *P. putida* KT2440*dnicR* con el de una cepa control, *P. putida* KT2440*dcatA* (Tabla 5), que contiene una disrupción insercional de un gen cromosómico (gen *catA*) mediante la integración de un derivado del plásmido pK18*mob* y, por lo tanto, también es resistente a kanamicina pero su crecimiento en NA o 6HNA no se ve afectado si se compara con el de la cepa salvaje. Las cepas *P. putida* KT2440*dcatA* y *P. putida* KT2440*dnicR* se cultivaron previamente en medio mínimo MC conteniendo POB como fuente de carbono, es decir, en condiciones que no inducen la expresión de los genes *nic*. Posteriormente, se inocularon en medio MC conteniendo NA o 6HNA como únicas fuentes de carbono, y se monitorizó el crecimiento de los cultivos registrando el aumento de absorbancia a 600 nm (Fig. 62).



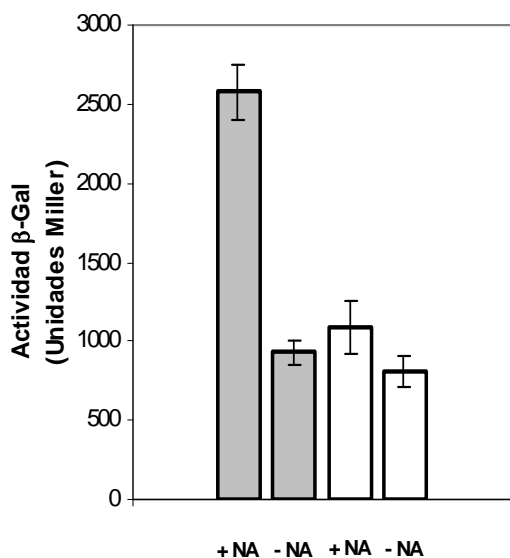
**Figura 62.** Curvas de crecimiento de las cepas *P. putida* KT2440dcatA y *P. putida* KT2440dnicR. Las cepas *P. putida* KT2440dcatA (puntos blancos) y *P. putida* KT2440dnicR (puntos negros) se cultivaron en medio MC con kanamicina (50  $\mu\text{g/ml}$ ) y NA (5 mM) (panel A) o 6HNA (5 mM) (panel B). El crecimiento se monitorizó a lo largo del tiempo valorando el incremento de absorbancia a 600 nm.

Mientras que la cepa mutante *P. putida* KT2440dnicR muestra un retraso de más de diez horas y un menor crecimiento en NA que la cepa control, la cepa mutante muestra una fase de latencia significativamente más corta que la de la cepa control en 6HNA. Estas diferencias sugieren que NicR podría estar involucrado en la activación transcripcional del operón *nicAB*, puesto que su ausencia retrasa el crecimiento en NA, así como en la represión de los operones *nicCDEF* y *nicXR*, dado que el mutante crece más rápido en 6HNA que la cepa salvaje.

Los estudios de crecimiento se complementaron posteriormente con el análisis de las actividades enzimáticas codificadas por los genes *nicAB* (nicotinato hidroxilasa) y *nicX* (2,5-DHP dioxigenasa) empleando la cepa parental *P. putida* KT2440 y el mutante *P. putida* KT2440dnicR cultivados en medio MC con POB o con POB y NA. Los resultados obtenidos cuando las células se cultivan en presencia de NA revelan que una mutación en el gen *nicR* ocasiona una disminución significativa de los niveles de actividad NicAB respecto a los niveles observados con la cepa parental (Fig. 63A), si bien los valores de actividad son más altos que los obtenidos con células no inducidas, lo que está de acuerdo con la existencia de un efecto activador de NicR sobre la expresión de los genes *nicAB*.



**Figura 63. Actividad NA hidroxilasa (panel A) y 2,5-DHP dioxigenasa (panel B) en la cepa parental *P. putida* KT2440 y en el mutante *P. putida* KT2440*dnicR*.** Las cepa parental *P. putida* KT2440 (barras grises) y la cepa mutante *P. putida* KT2440*dnicR* (barras blancas) se cultivaron en medio MC con POB (5 mM) o con POB (5 mM) y NA (5 mM) hasta alcanzar una  $A_{600}$  de 0.35. La actividad NA hidroxilasa (NicAB) se valoró midiendo espectrofotométricamente a 295 nm la concentración de 6HNA acumulado en el caldo de cultivo tras 15 min de un ensayo con células en suspensión (ver apartado 8.5.1 de Materiales y Métodos). La actividad 2,5-DHP dioxigenasa (NicX) se valoró utilizando extractos celulares obtenidos de cultivos recogidos en fase exponencial y registrando espectrofotométricamente a 320 nm la desaparición de la 2,5-DHP según se indica en el apartado 8.5.3 de Materiales y Métodos. Los valores representados corresponden a la media de tres experimentos independientes con la desviación estándar que se indica en la figura.



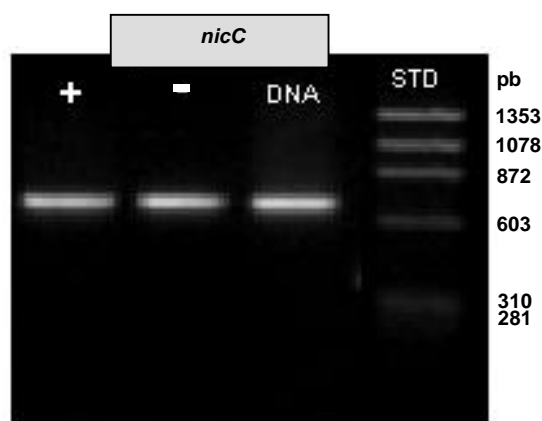
**Figura 64. Expresión de la fusión transcripcional *Pa::lacZ* en *P. putida* KT2440 (pBP<sub>a</sub>) y *P. putida* KT2440*dnicR*(pBP<sub>a</sub>).** *P. putida* KT2440(pBP<sub>a</sub>) (barras grises) y *P. putida* KT2440*dnicR*(pBP<sub>a</sub>) (barras blancas) se cultivaron hasta una  $A_{600}$  de 0.5 en medio MC con POB 5 mM como única fuente de carbono (-NA) o en presencia de POB 5 mM y NA 5 mM (+NA). Los ensayos de actividad β-galactosidasa (en unidades Miller) se realizaron con células permeabilizadas como se indica en el apartado 8.5.5 de Materiales y Métodos. Los valores representados son la media de tres experimentos independientes con una desviación estándar que se indica en la figura. A todos los valores de actividad les fue sustraído el valor basal obtenido con la cepa control *P. putida* (pBlacZ) (ver Fig. 55).

Por el contrario, la actividad 2,5-DHP dioxigenasa (NicX) pasa de ser inducible en la cepa parental cuando las células se cultivan en presencia de NA a ser constitutiva en la cepa

que contiene un gen *nicR* inactivo (Fig. 63B), lo que está de acuerdo con el hecho de que NicR actúe como un represor del gen *nicX*.

El posible efecto activador de NicR sobre la expresión de los genes *nicAB* también se confirmó analizando la expresión de la fusión transcripcional *Pa::lacZ* (Fig. 64) en células de la cepa parental *P. putida* KT2440 y de la cepa mutante *P. putida* KT2440*dnicR* portadoras del plásmido pBPa (*Pa::lacZ*). Ambas cepas se cultivaron en medio mínimo MC con POB o con POB y NA para facilitar la inducción de los genes *nic*.

Los resultados obtenidos indican que la interrupción del gen *nicR* anula la activación del promotor *Pa* en presencia de NA, manteniéndose su actividad en los niveles basales observados cuando las células se cultivan en ausencia de NA (Fig. 64), lo que está de acuerdo con el papel activador de NicR sobre *Pa* cuando está presente el NA.



**Figura 64. Electroforesis en gels de agarosa del producto de RT-PCR del gen *nicC* generado a partir del RNA aislado de células de *P. putida* KT2440*dnicR* cultivadas en presencia o ausencia de NA.** Los oligonucleótidos utilizados y el tamaño esperado del fragmento amplificado se detallan en la figura 52 (número 4). Las calles marcadas como (+) corresponden a la condición de crecimiento en POB (5 mM) con NA (5 mM), mientras que las marcadas como (-) corresponden a la condición de crecimiento en POB (5 mM). Las calles marcadas como (DNA) corresponden al fragmento generado por PCR utilizando DNA cromosómico de *P. putida* KT2440 como molde y los mismos oligonucleótidos que los utilizados en la reacción de RT-PCR correspondiente. Como marcadores de peso molecular (STD) se emplearon los fragmentos generados tras la digestión del DNA del fago  $\phi$ X174 con *Hae*III (New England Biolabs).

Para caracterizar el efecto de la mutación del gen *nicR* sobre la transcripción del operón *nicCDEFTP*, se realizó mediante RT-PCR un estudio de la expresión del gen *nicC* en la cepa mutante *P. putida* KT2440*dnicR*. Para ello, se comparó la expresión del gen *nicC* en condiciones de inducción (crecimiento en NA) y en ausencia de inducción (crecimiento

en POB). Los resultados del experimento se muestran la figura 65, donde se puede apreciar la expresión del gen *nicC* tanto en condiciones de inducción como de ausencia de inducción. La expresión constitutiva del gen *nicC* en ausencia del gen *nicR* confirma, por lo tanto, el efecto represor del segundo sobre la expresión del primero.

Todos estos resultados sugieren, por lo tanto, que el gen *nicR* codifica un regulador de los operones catabólicos *nic*, actuando como un activador de los genes *nicAB* y como un represor de los operones *nicXR* y *nicCDEFTP*.

## ***V DISCUSIÓN***





## V DISCUSIÓN

### **1 Análisis del potencial catabólico frente a compuestos aromáticos de *P. putida* KT2440**

Las bacterias del género *Pseudomonas* son un sistema modelo muy útil para estudiar aspectos bioquímicos, genéticos, ecológicos y evolutivos del metabolismo bacteriano. La secuenciación y anotación de genomas completos de distintas especies del género *Pseudomonas* que presentan distintos estilos de vida ha sido fundamental para el conocimiento de las bases moleculares que explican la versatilidad metabólica de estos microorganismos y sus estrategias de adaptación frente a los cambios medioambientales (Van der Meer *et al.*, 1992; Spiers *et al.*, 2000). En ese sentido, el primer objetivo de esta tesis fue el análisis *in silico* del genoma de *P. putida* KT2440, una bacteria saprofita capaz de metabolizar una gran variedad de compuestos orgánicos y que ha sido ampliamente utilizada con fines biotecnológicos (Pieper y Reineke, 2000; Wackett, 2003), para determinar su mapa catabólico global frente a los compuestos aromáticos que puede utilizar como única fuente de carbono y energía.

#### **1.1 El mapa catabólico de compuestos aromáticos en *P. putida* KT2440**

Los estudios realizados en esta tesis han revelado la existencia de seis *clusters* génicos implicados en otras tantas rutas centrales de degradación de compuestos aromáticos. Cuatro de estos *clusters* génicos han sido previamente descritos en otros microorganismos: i) *cluster cat* (degradación de catecol); ii) *cluster pca* (degradación de protocatecuato); iii) *cluster pha* (degradación de fenilacetato), y iv) *cluster hmg* (degradación de homogentisato). Recientemente, la implicación de estos cuatro *clusters* en la degradación de los correspondientes compuestos aromáticos se ha confirmado mediante la caracterización molecular del *cluster hmg* (Arias-Barrau *et al.*, 2004) y del proteoma de *P. putida* KT2440 cultivada en presencia de distintos compuestos aromáticos (Kim *et al.*, 2006). Además, el análisis *in silico* del genoma de *P. putida* KT2440 ha permitido identificar dos nuevos *clusters* génicos responsables de sendas rutas centrales de degradación de compuestos

aromáticos trihidroxilados (*cluster gal*) y *N*-heterocíclicos (*cluster nic*), que no habían sido caracterizados hasta la fecha en bacterias. Si bien el *cluster nic* implicado en la degradación de NA ha sido objeto de estudio en esta tesis y se discutirá en detalle en el apartado 2, la caracterización molecular del *cluster gal* implicado en la degradación de ácido gálico es el tema de estudio de la tesis doctoral de Juan Nogales y, por ello, no se discutirá en la presente Memoria. A las cuatro rutas centrales codificadas por los *clusters cat*, *pca*, *pha* y *hmg* convergen, a su vez, diferentes rutas periféricas implicadas en la degradación de diferentes compuestos aromáticos tales como benzoato (genes *ben*)/bencilamina, protocatecuato (genes *pob*)/fenilpropenoides (genes *fcs-ech-vdh-van*), feniletilamina/fenilalcanoatos (genes *fad*), y fenilalanina (genes *phh*)/tirosina (genes *tyr* y *hpd*), respectivamente (Fig. 13).

El contenido en G+C promedio de los *clusters cat*, *pca*, *pha* y *hmg* es del 64.2%, 63.1%, 63.5% y 64.6%, respectivamente. Los agrupamientos génicos que codifican sus respectivas rutas periféricas también muestran un contenido en G+C que oscila entre el 60-65%. Todos estos valores se encuentran próximos al contenido G+C promedio (63 %) del genoma de *P. putida* KT2440 (Nelson *et al.*, 2002), lo que sugiere que los *clusters* génicos implicados en el catabolismo de compuestos aromáticos en la cepa KT2440 han adaptado su contenido G+C al de la bacteria huésped y, por ello, han debido de permanecer en el cromosoma de esta bacteria durante un largo periodo evolutivo.

Cuando se analiza la distribución de los agrupamientos génicos implicados en el catabolismo de compuestos aromáticos en el cromosoma de *P. putida* KT2440 se observa que en las 2400 kb de la región flanqueante al origen de replicación cromosómica (*ori*), no existen genes relacionados con dicho catabolismo (Fig. 14). Esta situación contrasta con la que se observa en otras bacterias como *E. coli* (Díaz *et al.*, 2001) o *P. aeruginosa* (Jiménez *et al.*, 2004) en la que los genes del catabolismo de compuestos aromáticos se encuentran repartidos por todo el cromosoma. Sin embargo, no se ha observado la presencia de agrupamientos supraoperónicos de los genes catabólicos (islas catabólicas) que canalicen la mineralización de distintos compuestos aromáticos a través de una ruta central común, como sucede, por ejemplo, en el caso de los genes *pca-qui-pob-ppa* en *Acinetobacter* sp. ADP1 (Parke *et al.*, 2001) (Fig. 15). De hecho, *P. putida* KT2440 muestra un bajo nivel de agrupamiento de los genes que participan en la misma ruta metabólica. Así, por ejemplo, en *P. putida* KT2440 los genes *ben* y *cat* no se encuentran asociados (Fig. 16); los genes *pca* se

encuentran dispuestos en tres *clusters* diferentes, y ninguno de ellos está asociado con los genes *pob* (Fig. 15); los genes *phh* implicados en la transformación de fenilalanina en tirosina no están asociados con los genes *tyr* y *hpd* responsables de la conversión de tirosina en homogentisato, y estos últimos tampoco están asociados a los genes *hmg* que codifican la ruta central de la degradación de homogentisato (Fig. 18).

Cuando se compara la organización génica de los *clusters* catabólicos de *P. putida* KT2440 con la de los *clusters* equivalentes de otras especies de *Pseudomonas* y con la de bacterias de otros géneros, se pueden apreciar una serie de características comunes a todos ellos así como de particularidades específicas de cada *cluster* que se comentan a continuación. Habría que mencionar aquí que el genoma de una segunda cepa de *P. putida*, *P. putida* F1, está siendo secuenciado actualmente ([http://genome.jgi-psf.org/draft\\_microbes/psepu/psepu.home.html](http://genome.jgi-psf.org/draft_microbes/psepu/psepu.home.html)) y que los *clusters* catabólicos de la cepa F1 son prácticamente idénticos en secuencia y organización génica a los que comparte con la cepa KT2440.

## **1.2. La ruta del $\beta$ -cetoadipato**

Dado que la degradación de un gran número de compuestos aromáticos naturales genera protocatecuato o catecol como intermediarios centrales, la ruta del  $\beta$ -cetoadipato se encuentra ampliamente distribuída entre las bacterias (Harwood y Parales, 1996), siendo los genes *cat* (implicados en la rama del catecol) y los genes *pca* (implicados en la rama del protocatecuato) los genes de catabolismo de compuestos aromáticos que presentan un mayor número de ortólogos.

Los genes *pca* de *P. putida*, *P. aeruginosa* y *P. syringae* se encuentran organizados en tres y cuatro agrupamientos, respectivamente, mientras que los de *P. fluorescens* se encuentran localizados en la misma región del genoma (Fig. 15). Esto último también sucede en *Acinetobacter* sp. ADP1 (Harwood y Parales, 1996), en las  $\alpha$ -proteobacterias *A. tumefaciens* y *C. crescentus*, y en el actinomiceto *R. opacus* (Eulberg *et al.*, 1998) (Fig. 15). Existen otros tipos de organización de los genes *pca* como los que presentan ciertas  $\beta$ -proteobacterias tales como *B. pseudomallei* y *R. metallidurans* (Fig. 15). Cabe destacar que las parejas de genes *pcaGH* y *pcaIJ* codifican las dos subunidades de las enzimas

protocatecuato-3,4-dioxigenasa y  $\beta$ -ceto adipato succinil-CoA transferasa, respectivamente (Tabla 8), y son cotranscritos en diferentes bacterias (Harwood y Parales, 1996) (Fig. 15). En *P. fluorescens* las proteínas PcaIJ muestran una similitud de secuencia con proteínas equivalentes de otras cepas de *Pseudomonas* significativamente más baja que la observada entre otros productos génicos *pca* (Fig. 15), lo que podría evidenciar un origen evolutivo distinto para estos genes en *P. fluorescens*. Aunque el orden de los genes *pcaIJF* está conservado en la mayoría de los agrupamientos *pca*, el gen *pcaF* no se encuentra ligado a los genes *pcaIJ* en *P. putida*, *P. syringae* o *P. aeruginosa* (Fig. 15). Otra diferencia dentro del género *Pseudomonas* la constituye el hecho de que el gen *pcaD* no se encuentra ligado al gen *pcaC* en *P. syringae*, mientras que en otras bacterias ambos genes suelen estar contiguos o incluso, como ocurre en *C. crescentus*, *A. eutropha* y *R. opacus* (Eulberg *et al.*, 1998), fusionados formando el gen *pcaL* (Fig. 15). El gen *pobA* codifica la *p*-hidroxibenzoato hidroxilasa de la ruta periférica encargada de transformar el POB en protocatecuato (Fig. 13). Si bien en la mayoría de los organismos analizados el gen *pobA* está ligado al *cluster* de la ruta central *pca*, en *P. putida* y *P. syringae* el gen *pobA* no está asociado a los genes *pca* (Fig. 15).

En el *cluster cat* responsable de la degradación del catecol, el orden génico *catRcatBCA* se mantiene en los genomas de *P. putida* y *P. aeruginosa*, mientras que en *P. fluorescens* existen dos conjuntos de genes *cat* asociados a los genes *benABCD*, responsables de la ruta periférica de degradación del benzoato, y ambos carecen del gen regulador *catR* (Fig. 16). En *P. putida*, a diferencia de lo que ocurre en *P. aeruginosa* y *P. fluorescens*, los genes *ben* de la ruta periférica no están ligados a los genes *cat* de la ruta central (Fig. 16). Por el contrario, *P. syringae* carece de los *clusters cat* y *ben*. La  $\beta$ -ceto adipato enol-lactona constituye el metabolito en el que convergen las ramas del catecol (genes *cat*) y protocatecuato (genes *pca*) de la ruta central del  $\beta$ -ceto adipato en *Pseudomonas* (Harwood y Parales, 1996). Otras bacterias, como *R. metallidurans*, poseen dos  $\beta$ -ceto adipato enol-lactona hidrolasas isofuncionales, los productos de los genes *catD* y *pcaL* (Figs. 15 y 16), ya que el  $\beta$ -ceto adipato es el metabolito en el que convergen las dos ramas de la ruta central en este organismo (Harwood y Parales, 1996). La rama del catecol de la ruta del  $\beta$ -ceto adipato es la única que se encuentra presente en algunas  $\alpha$ -proteobacterias tales como *N. aromaticivorans* (Fig. 16). Por el contrario, en *Acinetobacter* sp. ADP1 las dos ramas de la

ruta del  $\beta$ -cetoadipato nunca confluyen ya que existen un *cluster cat* y un *cluster pca* con regulación independiente y que contienen todos los genes necesarios para la transformación del catecol y protocatecuato, respectivamente, en intermediarios del ciclo de Krebs (Harwood y Parales, 1996) (Fig. 16).

También existen particularidades entre las distintas cepas analizadas en lo referente a los sistemas de regulación transcripcional que controlan las rutas centrales *pca* y *cat*, y las correspondientes rutas periféricas *pob* y *ben*. Por analogía con el *cluster cat* de *P. putida* PRS2000, la proteína CatR (regulador transcripcional de la familia LysR) podría activar la expresión de los genes *cat* en *P. putida* KT2440 en respuesta al inductor *cis,cis*-muconato. De la misma forma, la proteína PcaR, un regulador de la familia IclR, podría controlar la inducción dependiente de  $\beta$ -cetoadipato de los genes *pcaRKFTBDCP* y *pcaIJ* (Harwood y Parales, 1996). Aunque todavía no se ha identificado el regulador de los genes *pcaGH* en *P. putida*, las cepas *P. aeruginosa* y *P. syringae* poseen en las proximidades de los genes *pcaGH* un gen (*pcaQ*) que codifica un hipotético regulador de la familia LysR homólogo al activador PcaQ de *A. tumefaciens* (Parke, 1996) (Fig. 15). El gen *pobA*, responsable de la hidroxilación del POB, está controlado por el regulador PobR en *Acinetobacter* sp. ADP1. Si bien esta proteína pertenece a la familia IclR, el regulador PobR presente en el *cluster pob* de *P. putida* KT2440 presenta una elevada identidad con reguladores de la familia XylS/AraC, como por ejemplo con el regulador PobC de *P. putida* WCS358 (Tabla 8) que responde eficientemente a POB y, en menor medida, a protocatecuato (Bertani *et al.*, 2001). Las proteínas PobR presentes en otras cepas de *Pseudomonas* también pertenecen a la familia XylS/AraC (Quinn *et al.*, 2001) (Fig. 15). La regulación de la ruta periférica *ben* también está controlada por un regulador de la familia XylS/AraC en las bacterias del género *Pseudomonas* (proteína BenR) y por un regulador de la familia LysR en *Acinetobacter* (proteína BenM) (Collier *et al.*, 1998). Curiosamente, los genes *benR* y *benM* se transcriben en la misma dirección o en la contraria, respectivamente, a los genes catabólicos *benABCD* (Fig. 16). Todas estas observaciones permiten concluir que las proteínas reguladoras de rutas catabólicas equivalentes en distintos organismos pueden pertenecer indistintamente a distintas familias de reguladores transcripcionales, y sugieren un origen evolutivo diferente para los genes catabólicos y reguladores de una misma ruta catabólica (Cases y de Lorenzo, 2001).

Otra ruta periférica de *P. putida* KT2440 que converge en protocatecuato es la de degradación de compuestos fenilpropenoides, e.g., ferulato, *p*-cumarato, ácido cafeico y coniferil-alcohol (Fig. 13). En todas las cepas de *Pseudomonas* analizadas, i. e., *P. putida* KT2440, *P. putida* WCS358 (Venturi *et al.*, 1998), *P. syringae* y *Pseudomonas* sp. HR199 (Overhage *et al.*, 1999), el agrupamiento de genes *fcs/ech/vdh* no se encuentra ligado a los genes *van* implicados en la degradación de vainillato. Una situación similar se ha observado en *Acinetobacter* sp. ADP1, en donde se ha especulado que la localización independiente de los genes *van* posibilita la aparición de mutantes espontáneos en dichos genes, lo que permite la producción de vainillato a partir de ferulato como una señal química entre plantas y bacterias (Segura *et al.*, 1999).

El quinato también genera protocatecuato en su catabolismo, tal y como se ha demostrado con el estudio de los genes *qui* de *Acinetobacter* sp. ADP1 (Parke *et al.*, 2000; 2001). En el genoma de *P. putida* KT2440 se han identificado genes similares a *quiA* y a *quiX* y dos homólogos (*quiB1* y *quiC1*) a los genes *qutE* y *qutC* de *E. nidulans* (Hawkins *et al.*, 1982; 1988) (Fig. 14). Los correspondientes genes *quiB1* y *quiC1* aparecen en un único agrupamiento génico contiguo a los genes *pca* en *P. aeruginosa* (Jiménez *et al.*, 2002), lo que sugiere que en el género *Pseudomonas* esos dos genes participan en el catabolismo del quinato. Estos resultados están de acuerdo con estudios previos que reflejan diferencias en el metabolismo del quinato en distintos organismos (Ingledeew y Tai, 1972).

### **1.3. Las rutas del fenilacetato y del homogentisato**

Los agrupamientos génicos que codifican la ruta aeróbica híbrida del ácido fenilacético (*clusters paa* o *pha*) en distintas bacterias muestran una significativa similitud (Fig. 17). Así, el gen *phaE* (*paaK*), que codifica la fenilacetato CoA-ligasa, y los genes *phaFOGHI* (*paaABCDE*), que codifican la oxigenasa multicomponente que hidroxila el fenilacetil-CoA, se encuentran presentes en casi todas las especies bacterianas que poseen la ruta. Sin embargo, los genes *phaJ* y *phaK* de *P. putida*, que codifican una porina y una proteína transportadora de ácido fenilacético, respectivamente, están ausentes en los agrupamientos *pha* (*paa*) de numerosas bacterias (Fig. 17). El gen regulador *phaN* (*paaX*) codifica un represor transcripcional de la familia GntR, y se encuentra ligado al gen *phaM*

(*paaY*), de función desconocida, una disposición que también se observa en bacterias entéricas (Díaz *et al.*, 2001). Sin embargo, el sistema de regulación no se conserva en otras bacterias como *A. evansii* y *B. pseudomallei* ( $\beta$ -proteobacterias), o *T. thermophilus* que presentan como posible regulador una proteína de la familia TetR (producto del gen *paaR*) (Mohamed *et al.*, 2002) (Fig. 17). La mayor diversidad se encuentra en los genes *phaABCPDL*, que codifican las enzimas implicadas en la apertura del anillo aromático y en las posteriores reacciones de  $\beta$ -oxidación (Fig. 13), lo que sugiere que en algunas bacterias los productos génicos ausentes son reemplazados por enzimas similares de otras rutas de  $\beta$ -oxidación existentes en la célula. Los genes *phaA* y *phaC* se encuentran fusionados en un único ORF en *T. thermophilus* HB8. Por otra parte, cabe destacar que el producto del gen *phaL* (*paaZ*) de *A. evansii*, *B. pseudomallei* y *B. halodurans* tiene el extremo C-terminal truncado cuando se compara su secuencia con los ortólogos de otras bacterias (Mohamed *et al.*, 2001) (Fig. 17). El gen *phaP* codifica una tioesterasa que libera el grupo CoA del fenilacetil-CoA y de derivados hidroxilados de este último, tal y como se ha demostrado con los correspondientes ortólogos *paaI* de *E. coli* (Song *et al.*, 2006) y *T. thermophilus* HB8 (Kunishima *et al.* 2005). La función propuesta para la tioesterasa de la ruta de degradación del ácido fenilacético es la de servir de salvaguarda de los niveles de CoA en la célula cuando la ruta sufre el bloqueo en alguna de sus etapas iniciales y, como consecuencia, se produce el acúmulo de derivados de CoA que no pueden ser degradados (Ismael *et al.*, 2003; Song *et al.*, 2006).

El análisis de los agrupamientos génicos responsables de la degradación del homogentisato en *P. putida*, *P. fluorescens* y *P. aeruginosa* refleja la misma disposición *hmgABC* con el gen regulador, *hmgR*, en posición divergente. Sin embargo, en *P. syringae* el gen *hmgC* se encuentra separado de los genes *hmgAB* (Fig. 18). En *P. fluorescens* y *P. aeruginosa*, en posición 3' al gen *hmgC* se localiza un gen (*hmgT*) que codifica un presunto transportador. En los agrupamientos *hmg* identificados en bacterias de otros géneros existe una mayor diversidad en la organización de los genes. Así, mientras que en *S. meliloti* los genes *hmg* se organizan de forma similar a como lo hacen en *P. putida*, en *R. solanacearum*, *B. bronchiseptica* y *B. japonicum* el gen *hmgC* se encuentra separado del agrupamiento *hmgRAB*, tal y como se observa en *P. syringae* (Fig. 18). En otras bacterias, como *A. vinelandii* y *X. axonopodis*, el gen *hmgA* no aparece asociado a los genes *hmgBC*. En *C.*

*crescentus* y *M. loti*, el gen *hmgB* se encuentra duplicado y una de las copias (*hmgB1*) se sitúa junto a los genes *hmgRA*, mientras que la otra (*hmgB2*) se encuentra ligada al gen *hmgC* (Fig. 18).

Los genes *phh*, *tyrB* y *hpd* codifican las actividades necesarias para la conversión de fenilalanina y tirosina en homogentisato en *P. putida* KT2440 (Arias-Barrau *et al.*, 2004) y se encuentran conservados en otras bacterias del género *Pseudomonas* en los que se han identificado, aunque muestran dos tipos de agrupamientos génicos. Mientras que en *P. fluorescens* y *P. aeruginosa* los genes *phh* y *tyrB* se encuentran agrupados, en *P. putida* y *P. syringae* los genes *tyrB* no se encuentran asociados al operón *phhRAB* (Fig. 18). Esta organización es similar a la que muestran otras bacterias como *A. vinelandii*, *X. axonopodis* y *R. solanacearum*. Además, en *P. putida*, *P. fluorescens*, *A. vinelandii* y *R. solanacearum*, el gen *hpd* no se encuentra ligado a otros genes implicados en el metabolismo de la fenilalanina y tirosina, mientras que éste se encuentra asociado al agrupamiento *phh* en *P. aeruginosa* y a los genes *hmg* en *P. syringae*, *X. axonopodis*, *C. crescentus*, *B. japonicum*, *M. loti* y *S. meliloti* (Fig. 18).

#### **1.4. Diversidad en el transporte y la regulación**

La mayor parte de los agrupamientos génicos implicados en el catabolismo de compuestos aromáticos en *P. putida* KT2440 contienen genes relacionados con el transporte y la regulación transcripcional, lo que sugiere que la entrada de los sustratos aromáticos y la expresión inducible de los genes catabólicos son mecanismos de control importantes para una eficaz degradación. La mayoría de las proteínas de transporte codificadas en los *clusters* catabólicos pertenecen a la superfamilia MFS (*Major Facilitator Superfamily*) de transportadores, como es el caso de PcaK, PcaT, BenK, VanK, PhhT (Figs. 15, 16 y 18; Tablas 8, 9, 10 y 12) y NicT (ver más adelante), mientras que PhaJ (Fig. 17; Tabla 20) y AroP2 (Fig. 18; Tabla 20) pertenecerían a la familia de transportadores SSS (*Solute:Sodium Symporter*) y APC (*Acid-Polyamine-Choline*), respectivamente (Saier, 2000). Los transportadores de compuestos aromáticos pueden estar acompañados de porinas de membrana externa como en el caso de las rutas codificadas por los genes *pca*, *ben*, *van*, *pha* y *nic* (Tablas 8 a 13). Aunque generalmente los sustratos aromáticos pueden penetrar en las



células por difusión pasiva cuando se encuentran presentes a altas concentraciones, el transporte activo incrementa la eficiencia de su incorporación en ambientes naturales, donde estos compuestos se encuentran normalmente a bajas concentraciones (Nichols y Harwood, 1997). Los transportadores pueden tener además una función adicional en bacterias con un estilo de vida móvil como ocurre con las del género *Pseudomonas*. Así, se ha demostrado que el transportador PcaK de *P. putida* PRS2000 también está implicado en la quimiotaxis de la bacteria hacia POB (Harwood *et al.*, 1994; Harwood y Parales, 1996; Parales y Harwood, 2002).

**Tabla 20. Proteínas transportadoras codificadas en los *clusters* responsables de la degradación de compuestos aromáticos de *P. putida* KT2440.**

<i>Proteína</i>	<i>No. acceso</i>	<i>No. aminoácidos</i>	<i>Posible metabolito transportado</i>	<i>Familia de transportadores</i>
PcaK	PP1377	448	4-hidroxibenzoato	MFS
PcaT	PP1378	429	$\beta$ -cetoadipato	MFS
BenK	PP3165	442	benzoato	MFS
VanK	PP3740	446	vainillato	MFS
PhhT	PP4495	400	fenilalanina, tirosina	MFS
NicT	PP3940	488	nicotinato, 6-hidroxicotinato	MFS
PhaJ	PP3272	520	fenilacetato	SSS
AroP2	PP4499	478	fenilalanina, tirosina	APC

Los mecanismos de regulación específica que controlan la expresión de los genes responsables para el catabolismo de los compuestos aromáticos muestran una gran diversidad en *P. putida* KT2440. El análisis global del genoma de esta cepa permite predecir la existencia de activadores transcripcionales de las familias XylS/AraC (BenR y PobR), IclR (PcaR), LysR (CatR), NtrC (PhhR) y MarR (FerR), así como de represores transcripcionales de las familias GntR (VanR y PhaN), IclR (HmgR) (Arias-Barrau *et al.*, 2004) y MarR (NicR; ver más adelante) (Tabla 21). La existencia de una amplia gama de reguladores transcripcionales diferentes controlando el catabolismo global frente a compuestos aromáticos es una característica que también se ha observado en otras bacterias capaces de degradar este tipo de compuestos (Díaz *et al.*, 2001), y refleja la complejidad y la diversidad

funcional y evolutiva del circuito regulador que permite la expresión controlada de la maquinaria catabólica.

**Tabla 21. Reguladores transcripcionales codificados en los *clusters* responsables de la degradación de compuestos aromáticos de *P. putida* KT2440.**

<i>Proteína</i>	<i>No. acceso</i>	<i>No. aminoácidos</i>	<i>Ruta de degradación</i>	<i>Familia de reguladores</i>
BenR	PP3159	318	benzoato	XylS/AraC
PobR	PP3538	292	4-hidroxibenzoato	XylS/AraC
PcaR	PP1375	291	protocatecuato	IclR
HmgR	PP4622	277	homogentisato	IclR
CatR	PP3716	290	catecol	LysR
PhhR	PP4489	519	fenilalanina	NtrC
VanR	PP3739	237	vainillato	GntR
PhaN	PP3286	307	fenilacetato	GntR
FerR	PP3359	156	ferulato	MarR
NicR	PP3946	158	nicotinato	MarR

Algunos de los agrupamientos génicos implicados en el catabolismo de compuestos aromáticos en *P. putida* KT2440 contienen una secuencia extragénica repetitiva palindrómica (REP) que se ha detectado en distintas cepas de *P. putida* (Houghton *et al.*, 1995; Aranda-Olmedo *et al.*, 2002). Las secuencias REP (35 pb) asociadas a los *clusters* catabólicos de compuestos aromáticos se disponen como: i) un elemento único ya sea en el extremo 3' de los genes *benC*, *phaL*, *aroP2* y *tyrB1*, o en el extremo 5' del gen *pcaP* (Figs. 16 a 18); ii) parejas de elementos convergentes en el extremo 3' de los genes *pcaG*, *pcaF*, *phhT* y en la región intergénica entre *nicR* y *nicA*, así como en el extremo 5' del gen *benE* (Figs. 15, 16 y 19); iii) parejas de elementos divergentes en la región intergénica de los genes *vanR* y *vanP*. Recientemente se ha demostrado que la secuencia REP en *P. putida* es reconocida específicamente por la secuencia de inserción ISPpu10 (Ramos-González *et al.*, 2006) que codifica una proteína homóloga a transposasas y recombinasas específicas de la familia Piv/Moov (Tobiason *et al.*, 2001). La presencia de secuencias REP asociadas a los genes del catabolismo de compuestos aromáticos es específica para cada cepa de *P. putida*. Así, por ejemplo, el agrupamiento *pha* de *P. putida* KT2440 contiene una única REP en el extremo 3' del gen *phaL*, mientras que el *cluster pha* de *P. putida* U contiene dos elementos

REP convergentes en la región intergénica entre *phal* y *phaJ* (resultados no mostrados). Otro ejemplo lo constituyen las dos secuencias REP invertidas presentes en el extremo 5' del gen *benE* en *P. putida* KT2440 y que no existen en *P. putida* PRS2000, cepa que sin embargo posee un elemento REP en el extremo 3' del gen *catR* que no aparece en el agrupamiento *cat* de *P. putida* KT2440. Una cepa diferente de las anteriores, *P. putida* RB1, posee una secuencia REP en la región intergénica de los genes *catB* y *catC* (Houghton *et al.*, 1995). Por el contrario, la secuencia REP no aparece en los agrupamientos *cat* o *ben* de *P. putida* F1. Estos resultados sugieren que, aunque los genes del catabolismo de compuestos aromáticos se encuentran altamente conservados en las distintas cepas de *P. putida*, las secuencias REP contribuyen significativamente a la diversidad genómica de la especie.

Como se desprende de todo lo comentado anteriormente, *P. putida* KT2440 posee un variado arsenal de rutas catabólicas para la degradación de compuestos aromáticos. Sin embargo, esta plasticidad metabólica es extensiva a otras cepas de *P. putida*, como *P. putida* F1, que además de mineralizar ácidos aromáticos es capaz de degradar benceno, etilbenceno, tolueno y *p*-cimeno (Wackett y Gibson, 1988; Eaton, 1997; Parales *et al.*, 2000). No obstante, el potencial catabólico codificado en el cromosoma de *P. putida* KT2440 se incrementa significativamente cuando la bacteria es portadora del plásmido pWW0, un megaplásmido aislado inicialmente de la cepa parental *P. putida* mt-2 y que es responsable de una ruta *meta* catecólica implicada en la degradación de tolueno, *p*-xileno, 3-etiltolueno y pseudocumeno (Assinder y Williams, 1990). Otra forma de incrementar el potencial catabólico de *P. putida* KT2440 es la clonación y expresión en esta bacteria de nuevas rutas de degradación procedentes de otros microorganismos. Esta estrategia se ha utilizado con éxito para diseñar biocatalizadores con interés biotecnológico tanto en el campo de la biorremediación, si la bacteria es capaz de mineralizar un compuesto contaminante, como en el de la biotransformación, en el caso de que la bacteria no mineralice el compuesto sino que lo transforma en otro de interés industrial. Así por ejemplo, cuando *P. putida* KT2440 es transformada con una casete que contiene los genes *styABCD* de *Pseudomonas* sp. Y2, implicados en la conversión del estireno a fenilacetato, la cepa recombinante es capaz de emplear estireno como única fuente de carbono y energía (Lorenzo *et al.*, 2003). La expresión en *P. putida* KT2440 de los genes *hpaBC* de *E. coli*, implicados en la hidroxilación de un gran número de compuestos fenólicos, le confiere la capacidad de

mineralizar fenol utilizando la ruta catabólica cat (Prieto *et al.*, 1996). La expresión de rutas relacionadas con el metabolismo de compuestos aromáticos heterocíclicos también es posible en *P. putida* KT2440, como lo refleja el hecho de que puede ser transformada con los genes *qoxLMS* de *A. ilicis* Ru61a y adquirir la capacidad de transformar la quinaldina en antranilato (Parschat *et al.*, 2003), o con los genes *dszABC* de *Rhodococcus* sp. IGTS8 y convertir así el dibenzotiofeno en sulfito e hidroxibifenilo, constituyendo un interesante biocatalizador para procesos de biodesulfuración de petróleo (Galán *et al.*, 2000a).

## **2 Identificación y caracterización de los genes *nic* implicados en la degradación del NA en *P. putida* KT2440**

El análisis *in silico* del genoma de *P. putida* KT2440 reveló la existencia de un agrupamiento de 10 genes, *cluster nic*, localizado entre las posiciones 4441-4454 kb del cromosoma de dicha bacteria (Fig. 14) y que presuntamente estaría implicado en el catabolismo del NA (Tabla 13). La construcción de mutantes de *P. putida* KT2440 en distintos genes *nic* y la incapacidad de estos de utilizar NA como fuente de carbono (Tabla 14), junto con la clonación del *cluster nic* en un plásmido promiscuo (pNIC) que confería la capacidad de degradar NA a los anteriores mutantes y a una bacteria (*Pseudomonas* sp. MT14) incapaz de utilizar este heterociclo como fuente de carbono (Fig. 23), indicaban que los genes *nic* estaban, efectivamente, implicados en la mineralización de NA en *P. putida* KT2440.

Mediante abordajes genéticos y bioquímicos se han analizado la mayor parte de los genes *nic* y sus correspondientes productos. A continuación se exponen y discuten los resultados obtenidos y la implicación de los productos génicos *nic* en la ruta de degradación de NA en *P. putida* KT2440.

### **2.1 Los genes *nicAB* codifican la nicotinato 6-hidroxilasa**

Como se indicó en el apartado 3 de la Introducción, en *P. putida* se había descrito que la primera etapa de la degradación de NA es la hidroxilación de este compuesto a 6HNA (Behrman y Stanier, 1957). Existen diversas enzimas descritas en la literatura que catalizan

la hidroxilación inicial de compuestos *N*-heteroaromáticos tales como la isoquinolina-1-oxidoreductasa (Lehmann *et al.*, 1994), la quinolina 2-oxidoreductasa (Frerichs-Deeken *et al.*, 2003), la quinaldina-4-oxidasa (Stephan *et al.*, 1996), la nicotina deshidrogenasa (Grether-Beck *et al.*, 1994), y las isonicotinato y 2-hidroxi-isonicotinato deshidrogenasas (Kretzer *et al.*, 1993; Schröder *et al.*, 1998). Todas estas hidroxilasas de anillos heterocíclicos derivados de piridina son enzimas dependientes de molibdeno que pertenecen a la familia de las xantina oxidasas/deshidrogenasas, y catalizan la incorporación de un átomo de oxígeno a la molécula del sustrato a partir de una molécula de agua (Fetzner, 2000). Todas ellas contienen un centro rédox, implicado en la transferencia de electrones desde el sustrato al aceptor correspondiente, que está formado por un ion de molibdeno coordinado a un cofactor orgánico (MCD), dos centros [2Fe-2S] y, generalmente, FAD, como se ha detallado en el apartado 2.2 de la Introducción (Fetzner, 2000; Hille, 2005). Estas hidroxilasas pueden ser monocomponentes, como la xantina deshidrogenasa/oxidasa (Xdh) de *S. cyanogenus* (Ohe y Watanabe, 1979), de dos componentes, como es el caso de la enzima IorAB responsable de la hidroxilación de isoquinolina (Lehmann *et al.*, 1995), o de tres componentes, como sucede con la enzima QorSML implicada en la degradación de quinolina (Blase *et al.*, 1996) (Tabla 3).

Las dos regiones de unión de los dos centros [2Fe-2S] de las hidroxilasas de la familia de las xantina oxidasas/deshidrogenasas son diferentes. Mientras que el primer centro [2Fe-2S] es similar a los de las ferredoxinas bacterianas y de plantas, el segundo centro [2Fe-2S] es específico de las molibdeno hidroxilasas y fue caracterizado por primera vez en la aldehído deshidrogenasa de *D. gigas* (Romao *et al.*, 1995). Los dos centros [2Fe-2S] se encuentran presentes en el extremo N-terminal de las enzimas monocomponentes o bien en la subunidad pequeña de las hidroxilasas multicomponentes (Dobbek *et al.*, 1999; Rebelo *et al.*, 2000; Enroth *et al.*, 2000; Truglio *et al.*, 2002, Fetzner *et al.*, 2000) (Fig. 66). El dominio de unión a FAD también se puede subdividir en dos regiones conservadas. La primera de ellas es un motivo de unión a FAD consenso típico (dominio FAD) de las flavoproteínas pertenecientes a la familia de las vanilil alcohol oxidasas, mientras que la segunda región (dominio CODH) fue inicialmente caracterizada en la subunidad CoxM de la CO-deshidrogenasa de *O. carboxidovorans* (Dobbek *et al.*, 1999). Estas dos regiones se encuentran conservadas en las regiones centrales de las molibdo-enzimas monocomponentes,

y conforman la subunidad mediana de las multicomponente (Fig. 66). Por último, el dominio de unión al cofactor de molibdeno es donde se sitúa el centro activo y donde se ancla el sustrato (Romao *et al.*, 1995) y se localiza en la región C-terminal de las enzimas monocomponentes y en la subunidad grande de las enzimas multicomponentes (Fig. 66). En todas las proteínas de esta familia se organiza como dos grandes dominios: i) el primero de ellos (MPT<sub>1</sub>) contiene dos regiones de unión para el anillo de molibdopterina del cofactor y generalmente se sitúa en el extremo N-terminal de las subunidades grandes de las enzimas multicomponentes; ii) el segundo de ellos (MPT<sub>2</sub> y MPT<sub>3</sub>) contiene una región adicional para la unión del anillo de molibdopterina así como el bolsillo de unión al dinucleótido del cofactor, situándose generalmente en el extremo C-terminal de las enzimas monocomponentes y de las subunidades grandes de las enzimas multicomponentes (Romao *et al.*, 1995) (Fig. 66).

Dado que en el *cluster nic* los genes *nicAB* son los únicos que codifican proteínas que muestran una similitud de secuencia significativa con algunos miembros de la familia de las xantina oxidasas/deshidrogenasas (Tabla 13), parecía lógico asumir que NicA (157 aa) y NicB (1187 aa) constituyen la subunidad pequeña y grande, respectivamente, de la nicotinato hidroxilasa de *P. putida* KT2440. Los estudios de conversión de NA en 6HNA realizados con un mutante de *P. putida* KT2440 en el gen *nicC*, *P. putida* KT2440*dnicC* (Fig. 24), así como en dos cepas de *Pseudomonas* que expresaban los genes *nicAB*, *P. fluorescens* R2f (pNicAB) y *Pseudomonas* sp. DSM6412 (pNicAB) (Fig. 26), permitieron confirmar que NicAB es la enzima que origina 6HNA en la primera etapa enzimática de la degradación de NA. El hecho de que la inactivación del gen *nicA* o *nicB* impida el crecimiento de las correspondientes cepas mutantes, *P. putida* KT2440*dnicA* y *P. putida* KT2440*dnicB*, en NA pero no afecte al crecimiento en 6HNA (Tabla 14), está de acuerdo con el hecho de que tanto NicA como NicB son necesarias para la actividad hidroxilasa, y sugiere que la enzima NicAB no interviene en posteriores hidroxilaciones en la ruta catabólica del 6HNA.

Aunque se han caracterizado bioquímicamente varias NA hidroxilasas (ver apartado 3 de la Introducción), todavía no se conoce la estructura primaria de ninguna de ellas. Algunas NA hidroxilasas, como por ejemplo la de *B. niacini*, son enzimas solubles que están constituidas por tres subunidades (grande-85 kDa, mediana-34kDa, y pequeña-20kDa) y contienen flavina como cofactor (Nagel y Andreesen, 1990). Una estructura similar

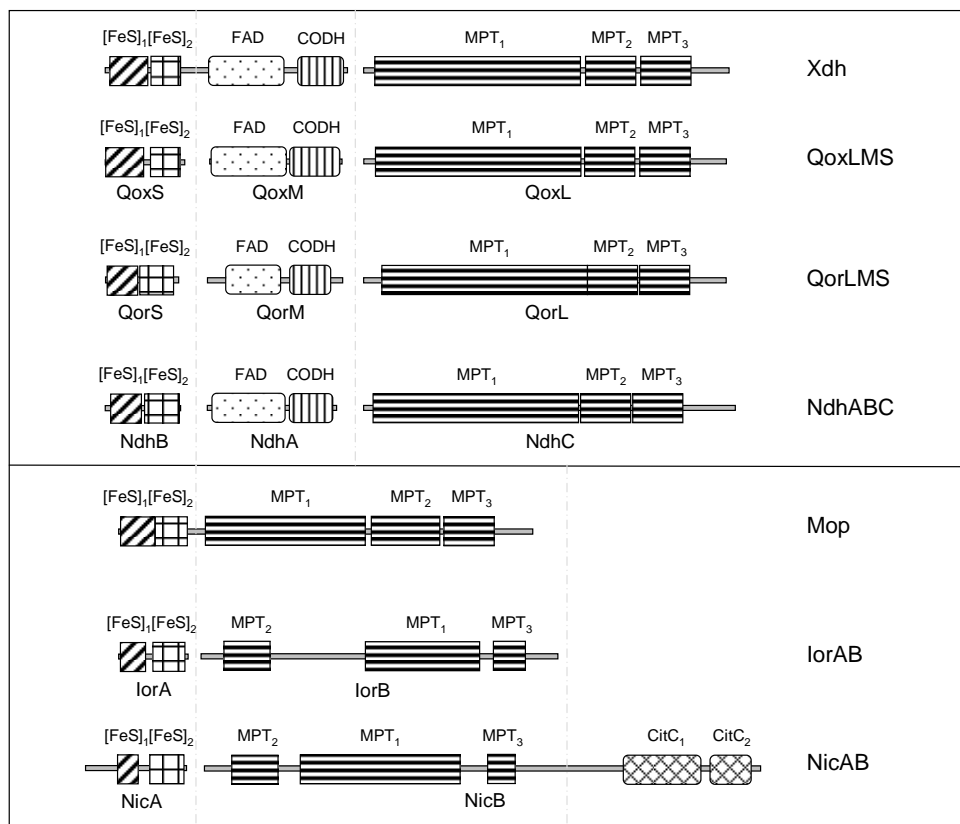
(heterohexámero  $\alpha_2\beta_2\gamma_2$ ) se ha descrito para la NA hidroxilasa que cataliza la hidroxilación del NA a ácido 2-hidroxinicotínico en *Ralstonia/Burkholderia* DSM 6920 (Schräder *et al.*, 2002). La NA hidroxilasa de *E. barkeri* posee una serie de características que la distinguen claramente de otras enzimas análogas ya que es una flavoproteína soluble que, además de Mo, requiere Se para su actividad, utiliza NADP como aceptor de los electrones, y parece estar constituida por 4 subunidades distintas (Gladyshev *et al.*, 1996). La única NA hidroxilasa que se ha caracterizado en eucariotas es la de *E. nidulans*. Al igual que ocurre con otras molibdeno hidroxilasas eucariotas de la familia de las xantina oxidasas (ver apartado 2.2), la NA hidroxilasa (purina hidroxilasa II, HxnS) de *E. nidulans* es un homodímero constituido por una subunidad de 153 kDa que contiene FAD (Coughlan *et al.*, 1984). A diferencia de las anteriores NA hidroxilasas, las de las cepas del género *Pseudomonas* son enzimas de membrana que van asociadas a citocromos que intervienen en la transferencia de los electrones al correspondiente aceptor final, generalmente O<sub>2</sub> (Hurh *et al.*, 1994b; Hunt, 1959; Jones y Hughes, 1972; Berhman y Stanier, 1957), siendo la enzima de *P. fluorescens* TN5, aparentemente un oligómero de una única subunidad que no contiene citocromo, la mejor caracterizada (Hurh *et al.*, 1994b). *P. putida* posee una cadena respiratoria asociada a la hidroxilación del NA que involucra un citocromo c y una citocromo oxidasa que no se reducen con los electrones procedentes del NADH o del succinato (Jones y Hughes, 1972). Una cadena de transporte de electrones similar parece estar involucrada en la hidroxilación del NA por la correspondiente enzima de membrana de *A. caulinodans* (Kitts *et al.*, 1989).

La enzima NicAB de *P. putida* KT2440 constituye, por lo tanto, la primera NA hidroxilasa cuya estructura primaria es conocida y presenta una serie de características que la distinguen de otras molibdeno hidroxilasas que actúan sobre compuestos *N*-heteroaromáticos. Así, a diferencia a las enzimas Xdh, Qor, Qox y Ndh, la nicotinato hidroxilasa de *P. putida* KT2440 posee tan sólo dos componentes y no contiene el motivo de unión a FAD (Fig. 66). De todas las proteínas de estructura primaria conocida de la familia de las xantina oxidasas/deshidrogenasas, las únicas que no contienen una región de anclaje a FAD son Mop, IorAB y NicAB (Fig. 66). El dominio de unión a FAD tiene como finalidad la transferencia de los electrones generados en la reacción al aceptor final, que puede ser NAD o bien un átomo de oxígeno (Fetzner, 2000). En las enzimas de esta familia en las que

no existe el dominio de unión a FAD, el aceptor final de electrones es otra proteína, como sucede con Mop que forma parte de una cadena de transporte electrónico en la que participa una proteína de tipo citocromo (Romao *et al.*, 1995), mientras que para IorB se sugiere la posibilidad de que la proteína se encuentre asociada a la membrana de la bacteria, de manera que sea posible la cesión de electrones a quinonas o citocromos (Lehmann *et al.*, 1994). Curiosamente, el análisis de los dominios conservados presentes en la proteína NicB de *P. putida* KT2440 refleja una región adicional de cerca de 360 aminoácidos que no se encuentra presente en ninguna de las proteínas de esta familia, y que es similar a un dominio de tipo citocromo C (Fig. 66). En este sentido, la NA hidroxilasa de la cepa KT2440 es la primera que se describe conteniendo un elemento de la cadena de transporte de electrones como parte de su estructura. Habría que destacar aquí que el gen *nicB* de los presuntos *clusters nic* presentes en  $\beta$ -proteobacterias aparece como dos genes independientes, *nicB1* y *nicB2* (ver apartado 4). Mientras que el gen *nicB2* codifica aproximadamente los primeros 740 aa de NicB, y su producto muestra similitud con IorB, el gen *nicB1* codifica los últimos 360 aa de NicB y, por lo tanto, sería el equivalente a la subunidad intermedia de molibdeno hidroxilasas de tres componentes pero conteniendo un dominio citocromo C en vez de un dominio FAD.

Otra característica distintiva de la subunidad NicB, y que hasta la fecha tan sólo se ha descrito para la proteína IorB (Lehmann *et al.*, 1995), es que los motivos MPT<sub>2</sub> y MPT<sub>3</sub> se encuentran separados por el motivo MPT<sub>1</sub>, ocupando el MPT<sub>2</sub> la posición N-terminal de las correspondientes subunidades grandes NicB e IorB (Fig. 66). Los tres sitios conservados de unión al cofactor de NicB son 394-AGCYRN-400 (MoI), 512-RASWMRGV-519 (MoII) y 68-GTG-70 (MoIII), mientras que los dos sitios conservados y propuestos para la unión del dinucleótido del cofactor son 102-NQGATIASAT-111 (MoIV) y 700-PPMGSGES-707 (MoV).





**Figura 66. Organización modular de diferentes oxidorreductas dependientes de molibdeno.** Los dominios conservados son: [FeS]<sub>1</sub>, sitio de unión del primer complejo [2Fe-2S] (tipo ferredoxina); [FeS]<sub>2</sub>, sitio de unión del segundo complejo [2Fe-2S]; FAD, sitio de unión a FAD consenso; CODH, sitio de unión a FAD similar al presente en la CO-deshidrogenasa de *O. carboxidovorans*; MPT, dominio de unión al cofactor MCD (o MPT en la xantina deshidrogenasa), este dominio se encuentra subdividido en tres motivos (MPT<sub>1</sub>, MPT<sub>2</sub> y MPT<sub>3</sub>); CitC, dominio tipo Citocromo C (subdividido en dos motivos, CitC<sub>1</sub> y CitC<sub>2</sub>). Las secuencias proteicas se obtuvieron de los siguientes números de acceso: Xdh (xantina deshidrogenasa; *R. capsulatus*), AJ001013; QoxLMS (quinaldina 4-oxidasa; *A. ilicis* Ru61a), AJ537472; QorLMS (quinolina 2-oxidorreductasa; *P. putida* 86), X98131; NdhABC (nicotina deshidrogenasa; *A. nicotinovorans*), X75338; Mop (aldehído oxidorreductasa; *D. gigas*), Q46509; IorAB (isoquinolina 1-oxidorreductasa; *B. diminuta* 7), Z48918; NicAB (nicotinato hidroxilasa; *P. putida* KT2440) NC\_002947 (PP3947 y PP3948). El análisis se llevó a cabo empleando el programa CD-Search (Marchler-Bauer y Bryant, 2004) del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>).

Como se indica en la tabla 13, la proteína NicA presenta una similitud de secuencia significativa con la subunidad pequeña (IorA) de la isoquinolina 1-oxidorreductasa de *B. diminuta* (Lehmann *et al.*, 1995). Al igual que la proteína IorA, muestra una identidad de secuencia del 30%-40% con la subunidad CutC de la CO deshidrogenasa de *Pseudomonas thermocarboxydovorans* C2 (Pearson *et al.*, 1994), con NdhB de la nicotina deshidrogenasa de *A. nicotinovorans* (Grether-Beck *et al.*, 1994), con el dominio N-terminal de Mop (aldehído oxidorreductasa) de *D. gigas* (Thoenes *et al.*, 1994) y de las xantina

deshidrogenasas eucarióticas (Enroth *et al.*, 2000), así como con las subunidades pequeñas de las molibdo-hidroxilasas de tres componentes QorLMS y QoxLMS (Bläse *et al.*, 1996; Parschat *et al.*, 2003). Un alineamiento de la secuencia de todas estas proteínas revela la existencia de 8 cisteínas conservadas que se organizan en dos regiones diferentes. La primera de estas regiones de NicA comprende los residuos de cisteína situados en las posiciones 41, 46, 49 y 51 y es homóloga a los sitios de unión [2Fe-2S] de las ferredoxinas bacterianas y de plantas, que poseen un motivo consenso C-X<sub>r</sub>-C-G-X-C-X<sub>n</sub>-C (Wooton *et al.*, 1991; Hughes *et al.*, 1992; Tshisuaka *et al.*, 1993). La segunda región de cisteínas conservadas de NicA (posiciones 100, 103, 135 y 137) muestra la secuencia consenso (C-G-X-C-X<sub>3l</sub>-C-X-C) que caracteriza al segundo centro [2Fe-2S] específico de las molibdeno hidroxilasas (Bray *et al.*, 1991; Tshisuaka *et al.*, 1993; Blase *et al.*, 1996).

La necesidad del cofactor MCD para la actividad de la enzima NicAB podría explicar el resultado observado de ausencia de actividad NA hidroxilasa cuando los genes *nicAB* se expresan en *E. coli* (apartado 2.1 de Resultados). En este sentido, se ha descrito que *E. coli* es capaz de producir de forma activa enzimas que contienen molibdopterina unida a guanina (Garrett y Rajagopalan, 1994; Pollock y Barber, 1997), pero todos los intentos de producción de enzimas activas que contienen molibdopterina unida a citosina han fracasado (Blase *et al.*, 1996; Canne *et al.*, 1997; Canne *et al.*, 1999). Para la biosíntesis del cofactor se requiere una etapa de incorporación a la molibdopterina de dos guaninas a partir de Mg<sup>2+</sup>-GTP, una reacción catalizada por la enzima MobA que ha sido caracterizada tanto en *E. coli* como en *Rhodobacter sphaeroides* WS8 (Lake *et al.*, 2000; Buchanan *et al.*, 2001). Se ha propuesto que en *E. coli* la ausencia de actividad de las enzimas que requieren el cofactor MCD se debe a que la bacteria carece de la enzima necesaria para la incorporación de las citosinas en el cofactor, o bien a que no es capaz de incorporar el cofactor maduro en la estructura de la apoproteína (Frerichs-Deeken *et al.*, 2003). Por lo tanto, uno de los cuellos de botella a la hora de producir de forma activa molibdeno hidroxilasas de compuestos *N*-heterocíclicos es el empleo de células huésped que sean capaces de sintetizar el cofactor MCD. *P. putida* KT2440 ya se había empleado con éxito como cepa huésped para expresar molibdeno hidroxilasas tales como la quinolina 2-oxidoreductasa codificada por los genes *qorMSL* de *P. putida* 86-1 (Blase *et al.*, 1996; Frerichs-Deeken *et al.*, 2003) o la quinaldina 4-oxidasa codificada por los genes *qoxLMS* de *A. ilicis* Rñ61a (Parschat *et al.*, 2003). La

caracterización de una NA hidroxilasa en la cepa *P. putida* KT2440 aporta una explicación plausible de la facultad que tiene esta bacteria para sintetizar el cofactor MCD y permitir la expresión funcional de molibdeno hidroxilasas heterólogas. Además, el trabajo realizado en esta tesis revela que otras cepas de *Pseudomonas*, tales como *P. fluorescens* R2f y *Pseudomonas* sp. DSM6412, son también candidatos óptimos para la expresión heteróloga de molibdeno hidroxilasas de compuestos *N*-heteroaromáticos, unas enzimas de gran interés biotecnológico.

En resumen, los resultados presentados en esta tesis indican que los genes *nicAB* codifican una NA hidroxilasa, siendo la primera vez que se describe en la literatura la estructura primaria de una hidroxilasa que reconoce NA. La enzima de dos componentes NicAB representa el primer miembro de una nueva subfamilia de hidroxilasas de anillos aromáticos *N*-heterocíclicos que, muy probablemente, utilizan el cofactor MCD y citocromo C en la cadena de transporte de electrones.

La conversión del NA en 6HNA es de gran importancia industrial, puesto que el 6HNA se emplea para la síntesis de insecticidas modernos como el imidacloprid (Hurh *et al.*, 1994b; Schmid *et al.*, 2001). La hidroxilación regioselectiva de NA mediante el uso de biocatalizadores bacterianos es la forma habitual de obtención de 6HNA, que es difícil de conseguir mediante procedimientos químicos de síntesis (Hurh *et al.*, 1994b). El mutante *P. putida* KT2440 $\Delta$ *nicC* y las cepas *P. fluorescens* R2f (pNicAB) y *Pseudomonas* sp. DSM6412 (pNicAB) son los primeros ejemplos de organismos modificados genéticamente capaces de llevar a cabo una eficiente conversión de NA en 6HNA (Figs. 24 y 26), y han sido objeto de una patente nacional sobre producción de 6HNA con microorganismos recombinantes (Jiménez *et al.*, 2005).

## **2.2 El gen *nicC* codifica la 6HNA 3-monooxigenasa**

La segunda etapa enzimática de la ruta de degradación del NA en *Pseudomonas* consiste en la descarboxilación oxidativa del 6HNA para formar el intermediario dihidroxilado 2,5-DHP (Behrman y Stanier, 1957). La reacción está catalizada por la 6HNA 3-monooxigenasa, que ha sido caracterizada en la bacteria *P. fluorescens* TN5 (Nakano *et al.*, 1999) y que presenta un 60% de identidad de secuencia con el producto del gen *nicC*

(Tabla 13). Se trata de una enzima monomérica asociada a membrana que requiere para su actividad oxígeno molecular, NADH (5 veces más efectivo que el NADPH) y FAD, e introduce un grupo hidroxilo en el sustrato liberando CO<sub>2</sub>. La enzima de *P. fluorescens* TN5 es específica de 6HNA y sólo con el compuesto análogo homocíclico 4-hidroxibenzoato muestra un 6% de la actividad observada con su sustrato natural (Nakano *et al.*, 1999). Una descarboxilación oxidativa análoga está catalizada por la 4-hidroxibenzoato 1-hidroxilasa del hongo ascomiceto *Candida parapsilosis* CBS604, una flavoproteína monomérica de 50 kDa dependiente de NADH y que transforma el 4-hidroxibenzoato en 1,4-dihidroxibenceno (hidroquinona) pero que no es capaz de reconocer 6HNA (Eppink *et al.*, 1997). Otras hidroxilasas/decarboxilasas de ácidos aromáticos homocíclicos son las salicilato 1-monooxigenasas (NahG), flavoproteínas que han sido identificadas en diversos organismos incluyendo diferentes cepas de *P. putida* (Suzuki *et al.*, 1996; Lee *et al.*, 1996; You *et al.*, 1990; Yamamoto *et al.*, 1965), *P. fluorescens* (Chung *et al.*, 2001), *P. cepacia* (Ramsay *et al.*, 1992) y *P. stutzeri* (Bosch *et al.*, 1999). Estas enzimas catalizan la transformación del salicilato (2-hidroxibenzoato) en catecol. Las enzimas NahG de *P. putida* S-1, *P. putida* PpG7 y *P. putida* KF715 poseen un 25% de identidad de secuencia con NicC y todas ellas muestran los dominios conservados de unión a FAD y a NADH identificados en la flavoproteína 4-hidroxibenzoato monooxigenasa (Schreuder *et al.*, 1989; 1990). En NicC el motivo conservado para la unión de NADH se corresponde con la secuencia 152-DIVIGADGIHSKI-166, donde el residuo de lisina conservado en salicilato hidroxilasas e implicado en la unión de NADH (Suzuki *et al.*, 1996), ha sido sustituido por la H162 en NicC. Por otra parte, el dominio de unión a FAD de NicC se corresponde con los residuos 284-SRGRLVLLGD-295.

Como cabría esperar si el producto del gen *nicC* es la 6HNA 3-monooxigenasa, la inactivación de éste en la cepa mutante *P. putida* KT2440 $\Delta$ *nicC* originaba la acumulación de 6HNA en el caldo de cultivo cuando la cepa se cultivaba en presencia de citrato y NA (Fig. 24). Cuando se clonó y expresó en *Pseudomonas* el gen *nicC* en un plásmido promiscuo (pIZNicC), se confirmó que codifica una proteína de 42 kDa que cataliza la conversión de 6HNA en 2,5-DHP tras la incubación con NADH y FAD (Fig. 29). Habría que destacar aquí que cuando la proteína NicC se produce en una cepa de *E. coli* que contiene el gen *nicC* clonado en un plásmido multicopia (pUCNicC), no fue posible detectar actividad 6HNA

monooxigenasa en esta cepa. Un resultado similar se había observado previamente cuando se hiperexpresaba la 6HNA monooxigenasa de *P. fluorescens* TN5 en *E. coli* BL21(DE3), si bien se obtenían niveles de actividad específica similares a los de la cepa parental cuando se empleaba un sistema con un menor nivel de expresión en *E. coli* (Nakano *et al.*, 1999). Estos resultados sugieren que la hiperexpresión del gen *nicC* no permite la producción de enzima activa y, por consiguiente, será necesario reducir los niveles de expresión del gen para detectar actividad 6HNA monooxigenasa en *E. coli*. La producción de proteína NicC activa tiene interés biotecnológico ya que el producto de la reacción, la 2,5-DHP, se emplea como producto de partida para la síntesis de ácido 5-aminolevulínico que es el precursor universal de la síntesis de tetrapirroles como el grupo hemo y la clorofila, moléculas que tienen diversas aplicaciones como hormonas de plantas, así como en el diagnóstico y terapia del cáncer (Nakano *et al.*, 1999).

### **2.3 NicX es una nueva extradiol dioxigenasa**

La tercera etapa en la degradación de NA está catalizada por la 2,5-DHP dioxigenasa (Fig. 13), una actividad que había sido identificada en los estudios iniciales de degradación del NA en *P. putida* N9, cuando se comprobó que los extractos celulares procedentes de la cepa cultivada en presencia de NA eran capaces de oxidar la 2,5-DHP (Behrman y Stanier, 1957). En este trabajo fue posible determinar que la conversión requería un mol de oxígeno molecular por cada mol de sustrato, y que tras el proceso se obtenía 1 mol de ácido fórmico y amonio, detectándose también la formación de ácido maleámico. Estos resultados permitieron establecer que la ruptura del anillo aromático de la 2,5-DHP se producía entre los carbonos de las posiciones 2 y 5, proponiendo como producto de la reacción el ácido *N*-formilmaleámico, aunque no fue posible su aislamiento (Behrman y Stanier, 1957). También se caracterizaron algunas propiedades bioquímicas de la enzima, como su dependencia de hierro (II), puesto que la enzima era inhibida por  $\alpha,\alpha'$ -dipiridil y se requería la incubación con este metal tras la diálisis del extracto para la recuperación de la actividad (Behrman y Stanier, 1957). Estudios posteriores permitieron la purificación de la enzima 2,5-DHP dioxigenasa a partir de células de *P. putida* N9 cultivadas en NA como única fuente de carbono y energía (Gauthier y Rittenberg, 1971a). La enzima era un hexámero en disolución,

con una masa molecular de 39.5 kDa para el monómero, y su actividad dependía exclusivamente de hierro (II), mostrando un máximo a pH 8.0. Además, la enzima requería un ambiente reductor y mostraba una alta especificidad de sustrato, reconociendo únicamente 2,5-DHP. Mediante el uso de O<sup>18</sup> se demostró el consumo de un mol de oxígeno molecular y la formación de un mol de ácido fórmico por cada mol de sustrato empleado (Gauthier y Rittenberg, 1971b). Sin embargo, en esta ocasión tampoco se pudo observar ácido *N*-formilmaleámico como producto de la reacción, proponiendo como posibles causas que: i) la enzima 2,5-DHP dioxigenasa estaba contaminada con una *N*-formilhidrolasa, ii) la propia dioxigenasa catalizaba la hidrólisis del grupo *N*-formilo del ácido *N*-formilmaleámico; iii) se produjera una hidrólisis no enzimática del producto de reacción (Behrman, 1976). Para tratar de determinar la causa de que no se observase ácido *N*-formilmaleámico como producto de la reacción catalizada por la 2,5-DHP dioxigenasa, se sintetizó este compuesto y se observó que no era sustrato de la enzima, lo que llevó a concluir a Gauthier y Rittenberg (1971b) que no existía una actividad *N*-formilhidrolasa contaminando la preparación de la 2,5-DHP dioxigenasa, sino que esta enzima además de la reacción de dioxigenación de la 2,5-DHP también catalizaba la liberación de ácido fórmico y la formación de ácido maleámico. No obstante, posteriormente se determinó que el ácido *N*-formilmaleámico sintetizado por Gauthier and Rittenberg era realmente el isómero *N*-formilfumarámico. Se comprobó que mediante fotoisomerización era posible la interconversión entre ambos isómeros, y que se producía una hidrólisis espontánea de ambos liberando en los dos casos ácido fórmico, así como el correspondiente ácido fumarámico o maleámico (Behrman, 1976). La estabilidad en disolución del ácido *N*-formilmaleámico (100 min) era superior a la del ácido *N*-formilfumarámico (30 min) a 35 °C y pH 8.2. Si el pH disminuye a 3, el tiempo de vida media de ambos compuestos supera los 1000 min (Behrman, 1976). En cualquier caso, la hidrólisis no parecía ser tan rápida como para no poder detectar el intermedio de la reacción, lo que permitía descartar la hipótesis de la hidrólisis no enzimática del producto de la reacción catalizada por la 2,5-DHP dioxigenasa.

En esta tesis se demuestra que el gen *nicX* clonado y expresado en *E. coli* codifica la 2,5-DHP dioxigenasa. Para determinar de forma inequívoca el producto de la reacción catalizada por NicX, la enzima se purificó de la cepa hiperproductora *E. coli* BLB21 (DE3) que contenía el plásmido pETNicX (Fig. 33), lo que permitía descartar cualquier tipo de

contaminación con otra enzima relacionada con el metabolismo del NA y, por lo tanto, cualquier proceso enzimático posterior que modifique el producto de la reacción. Por otra parte, y para evitar la posible hidrólisis espontánea del producto de la reacción, ésta se acidificó a pH 2.0 una vez finalizada la catálisis, lo que permitió analizar la estructura del producto de la reacción en condiciones de máxima estabilidad. Los resultados obtenidos por RMN muestran que el producto de la reacción catalizada por NicX contiene un doble enlace en conformación *-cis* disustituido así como un grupo formilo. Los experimentos de espectrometría de masas muestran un aumento de 32 unidades en la masa del producto con respecto a la del sustrato, lo que indica la incorporación de dos átomos de oxígeno en la molécula de 2,5-DHP. El producto de la reacción permanecía estable en disolución al menos durante 12 horas. Teniendo en cuenta los resultados anteriores, y que tras la siguiente reacción catalizada por NicD se generan ácido maleámico y ácido fórmico (ver más abajo), se concluye que el grupo aldehído del producto de la reacción catalizada por NicX se encuentra unido al nitrógeno de la molécula y se puede afirmar que la reacción de ruptura del anillo heterocíclico ocurre entre los carbonos 5 y 6, generando ácido *N*-formilmaleámico (Fig. 36). Estos resultados sugieren que las preparaciones de 2,5-DHP dioxigenasa obtenidas de *P. putida* N9 se encontraban contaminadas por una *N*-formilmaleámico desformilasa, lo que explicaría la formación de ácido maleámico y el hecho de que no se pudiese detectar ácido *N*-formilmaleámico como producto final de la reacción.

Las propiedades bioquímicas de la proteína NicX purificada son similares a las descritas para la 2,5-DHP dioxigenasa de *P. putida* N9 (Gauthier y Rittenberg, 1971). La enzima muestra una alta especificidad de sustrato dado que de todos los sustratos aromáticos empleados (2,3-DHP, 2,4-DHP, 2-hidroxipiridina, 3-hidroxipiridina, 4-hidroxipiridina, NA, 6HNA, picolinato, piridoxamina, piridoxal, catecol, protocatecuato, gentisato, galato, resorcinol, 2,5-dihidroxibenceno, 3,4,5-trihidroxibenceno) únicamente reconoce a la 2,5-DHP. Cuando se determinaron los parámetros cinéticos de la 2,5-DHP dioxigenasa se observó que esta enzima poseía una  $K_m$  de 70  $\mu\text{M}$  para la 2,5-DHP y una  $V_{max}$  de 2.33  $\mu\text{M}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ , valores similares a los descritos para otras dioxigenasas previamente caracterizadas (Frazee *et al.*, 1993; Harpel y Lipscomb, 1990). Al igual que la enzima procedente de *P. putida* N9, NicX muestra una actividad máxima a valores de pH entre 7.5-8.0, y se inhibe a un pH superior a 9.0 (Fig. 34A). Por otra parte, la velocidad de la catálisis

enzimática es máxima a 25°C, y los ensayos de estabilidad térmica muestran que la proteína se desnaturaliza irreversiblemente a 60°C (Fig. 34B y C). Aunque los extractos crudos de *E. coli* BLB21 (DE3) (pETNicX) poseen actividad 2,5-DHP dioxigenasa, la proteína obtenida tras el proceso de purificación es inactiva. Si la enzima NicX purificada se preincuba en presencia de distintos metales, únicamente el Fe<sup>2+</sup> es capaz de restaurar la actividad enzimática (Tabla 16). Además, los agentes quelantes de metales divalentes, como el EDTA, y los inhibidores de Fe<sup>2+</sup>, como el  $\alpha,\alpha'$ -dipiridil y el agua oxigenada, inhibían significativamente la catálisis (Tabla 17). La dependencia de hierro (II) para la ruptura del anillo aromático de la 2,5-DHP mediada por NicX se confirma con los resultados del análisis por ICP del contenido en metales, en el que se demuestra que la proteína NicX pierde el metal en el proceso de purificación, y que tras la incubación con Fe<sup>2+</sup> se detecta la incorporación de aproximadamente un mol de hierro por mol de proteína. Por otra parte, la sensibilidad de la enzima a compuestos que modifican covalentemente la cadena lateral de residuos de cisteína (yodoacetamida y *p*-hidroximercuribenzoato) (Tabla 17) hacen presuponer que la presencia de uno de estos residuos en su estado reducido es fundamental para la catálisis, como ya había sido descrito para la enzima procedente de *P. putida* N9 (Gauthier y Rittenberg, 1971a).

Los experimentos de ultracentrifugación analítica muestran la existencia de un equilibrio de oligomerización entre las formas monomérica, trimérica y hexamérica de la enzima, equilibrio que depende únicamente de la concentración de NicX (Fig. 41). La proteína purificada de *P. putida* N9 muestra un estado de agregación que corresponde a un hexámero a elevadas concentraciones, y estados de oligomerización menores cuando disminuye la concentración de proteína, según se observa en geles de acrilamida no desnaturalizantes (Gauthier y Rittenberg, 1971a). En las condiciones del ensayo de actividad empleadas en esta tesis la concentración de NicX es de 0.15  $\mu$ M (4.5 ng/ $\mu$ l), lo que corresponde a la coexistencia del estado trimérico y monomérico de la enzima en disolución. La simetría obtenida en el cristal de NicX (Fig. 44) para la proteína nativa y para el derivado de osmio, indica la existencia de una reorganización en el oligómero de la proteína en presencia de osmio y condiciones reductoras. Sin embargo, otra hipótesis plausible es que los dos cristales posean el mismo oligómero, un dímero de las formas triméricas, aunque los ejes de simetría ternarios no cristalográficos presentes en el cristal de la proteína nativa, no hayan



sido identificados. De hecho, la altura de los picos binarios obtenidos en el análisis de la simetría local del cristal de la proteína nativa es muy superior a la de los ternarios, que existen, aunque aparecen enmascarados por el ruido del análisis. Los resultados de ultracentrifugación analítica y de difracción de rayos X, sugieren que la conformación nativa en disolución de la proteína corresponde a un trímero, que puede dimerizar a concentraciones elevadas de la proteína.

A la luz de los resultados obtenidos se puede afirmar que NicX es una extradiol dioxigenasa que rompe anillos aromáticos *N*-heterocíclicos. Como se ha indicado en la Introducción (apartado 2.3), se han descrito tres familias (Tipos) de extradiol dioxigenasas atendiendo a su origen evolutivo (Tabla 4). El Tipo I comprende enzimas que presentan uno o dos dominios con un origen evolutivo común (Vaillancourt *et al.*, 2004). Algunos miembros de esta familia son la catecol 2,3-dioxigenasa (Xyle) de *P. putida* mt-2 (Kita *et al.*, 1999) y la 2,3-dihidroxibifenil 1,2-dioxigenasa de *Burkholderia* sp. LB400 (Han *et al.*, 1995). El Tipo II comprende extradiol dioxigenasas que presentan una baja similitud de secuencia entre sí como ocurre con la 2,3-dihidroxifenilpropionato 1,2-dioxigenasa (MhpB) de *E. coli* (Spence *et al.*, 1996) y la galato dioxigenasa (GalA) de la propia *P. putida* KT2440 (Nogales *et al.*, 2005). El Tipo III agrupa a las dioxigenasas pertenecientes a la superfamilia de las cupinas (Dunwell *et al.*, 2001), como la gentisato dioxigenasa de *C. acidovorans* (Harpel y Lipscomb, 1990) o la homogentisato dioxigenasa de *H. sapiens* (Titus *et al.*, 2000). Dado que NicX no presenta similitud de secuencia significativa con ninguna otra extradiol dioxigenasa descrita hasta la fecha sino que su relación filogenética más próxima es con aminopeptidasas de la familia MQ (Tabla 13), parece razonable postular que se trata del primer miembro de una nueva familia de extradiol dioxigenasas.

A pesar de la diversidad filogenética de las extradiol dioxigenasas, todas ellas poseen un motivo responsable de la catálisis compuesto por dos histidinas y un grupo carboxilato (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 ion de Fe (II) que no se encuentra asociado a grupos hemo. El centro activo de la enzima contiene 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. La tríada facial que coordina el ión metálico no sólo se encuentra en las tres familias de extradiol dioxigenasas sino que también está presente en otras tres familias de proteínas tales como las oxigenasas de anillos aromáticos, hidroxilasas dependientes de pterina o en las enzimas dependientes de  $\alpha$ -cetoglutarato (Vaillancourt *et al.*, 2004; Hegg y Que, 1997; Que, 2000). La presencia de histidinas necesarias para la catálisis mediada por NicX se pone de manifiesto por los estudios de mutagénesis dirigida que se discutirán posteriormente, y por el hecho de que un reactivo como el DEPC, que modifica irreversiblemente las cadenas laterales de las histidinas, inhiba completamente la actividad enzimática (Tabla 17).

Pese a no poseer datos de la estructura tridimensional de la proteína NicX, fue posible realizar un modelado de la proteína considerando su similitud con dos aminopeptidasas de la familia M29, la aminopeptidasa AmpS de *S. aureus* y la aminopeptidasa AmpT de *T. thermophilus*, cuyas estructuras tridimensionales se han publicado recientemente (Odintsov *et al.*, 2005a; Odintsov *et al.*, 2005b). Ambas son enzimas cuyo sustrato natural se desconoce y, por lo tanto, tampoco se conoce su función biológica, aunque se sabe que hidrolizan el pentapéptido encefalina. Estas proteínas difieren de las metalopeptidasas más comunes al no poseer en su centro activo motivos H-E-X-X-H o H-X-X-E-H, por lo que se las agrupa como una nueva familia denominada MQ. Ambas forman dímeros en solución mediante puentes salinos entre los dominios N-terminales, mientras que los centros activos se encuentran en los dominios C-terminales. Las dos enzimas requieren de la presencia de dos iones metálicos en su centro activo. En el caso de AmpS se requieren dos iones de cobalto (Odintsov *et al.*, 2005a), mientras que en el caso de AmpT el cristal parece contener una mezcla de átomos de zinc y de cobalto, aunque la enzima es activa en presencia de cualquiera de ellos (Odintsov *et al.*, 2005b).

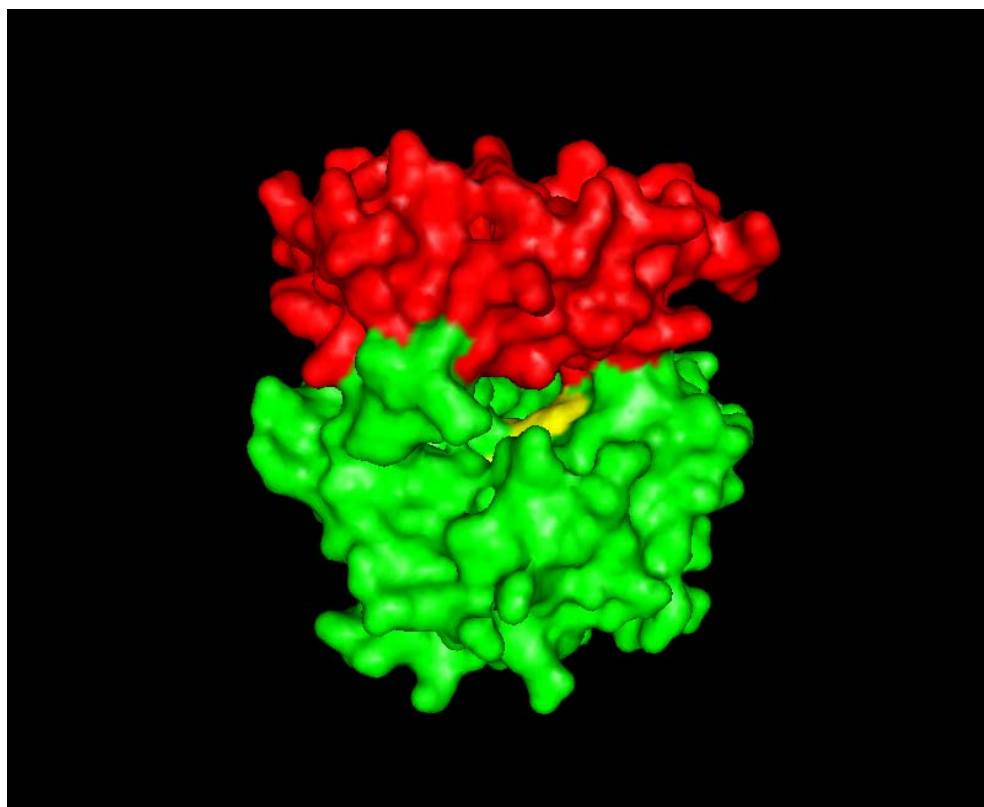
El modelo tridimensional y el análisis de los posibles residuos del centro activo de la enzima NicX fue realizado utilizando como molde el dominio C-terminal de AmpS. Este dominio de la proteína AmpS se organiza en dos láminas  $\beta$ , que se encajan entre sí de manera que las direcciones de las cadenas que las forman son casi perpendiculares, formando una estructura similar a un barril  $\beta$  imperfecto ya que una de las láminas es mayor que la

otra. Las dos láminas  $\beta$  tienen una conformación antiparalela, y es en la lámina más pequeña donde se encuentran algunos de los residuos implicados en la unión de los iones metálicos del centro activo: i) E319 en la cadena II; ii) E343 y H348, en la cadena III; iii) H381 y D383 en la cadena IV. El centro activo de AmpS contiene dos sitios de unión a metal (Co) de alta afinidad (sitio 1 y 2) y además un tercer sitio (sitio 3) que se encuentra parcialmente ocupado en las moléculas del cristal. Los dos iones metálicos que se encuentran en el centro activo están enlazados mediante una molécula de agua y por el grupo carboxilo de la cadena lateral del residuo E319. Los residuos implicados en la unión del metal en el sitio 1 son el E253, que no se encuentra en la lámina  $\beta$  mencionada anteriormente, y la H348. El segundo ión metálico se encuentra coordinado en el sitio 2 por la H381, el D383 y el E319. Por último, el tercer ión metálico, que ocupa el sitio 3 de baja afinidad, se encuentra coordinado por el D383, el E343 y una molécula de agua (Odintsov *et al.*, 2005b). El modelo propuesto para el dominio C-terminal de NicX predice una estructura formada por dos láminas  $\beta$  antiparalelas (Fig. 45). Un examen más detallado de la menor de las láminas  $\beta$  de NicX permite apreciar que los residuos implicados en la unión del ión metálico en el sitio equivalente (sitio 1) de AmpS se encuentran sustituidos por los residuos hidrofóbicos F194 y L300 en NicX, por lo que en esta dioxigenasa estos residuos no estarían implicados en la unión al metal. Por el contrario, el sitio 2 de unión a cobalto que en AmpS está conformado por los residuos E319, D383 y H381, se corresponde en la estructura de NicX al conformado por los aminoácidos H265, D320 y H318, respectivamente (Fig. 46). Curiosamente, se trata de dos histidinas y un grupo carboxilato, que es el motivo común de unión a Fe (II) de las extradiol dioxigenasas y que se encuentra conservado en las proteínas ortólogas a NicX identificadas en los *clusters nic* de otras bacterias (ver apartado 4). Esta observación sugiere que parte del centro activo de AmpS se mantiene en NicX, si bien los residuos catalíticos de la metalopeptidasa han sido reemplazados por los del centro activo de una extradiol dioxigenasa. Para comprobar esta hipótesis, se procedió a la mutagénesis dirigida de los residuos H265, H318, y D320. También se mutagenizó el residuo H189 que en el modelo aparece situado al otro lado de la esfera de coordinación del Fe (II) que ocupa la tríada facial (Fig. 46). Finalmente, y como control positivo, se mutagenizó el residuo H240 que, según el modelo (Fig. 45), se encuentra expuesta al solvente en la superficie de la proteína y su sustitución no debería alterar significativamente la actividad enzimática. Todos los residuos fueron reemplazados por

alanina, un residuo de pequeño tamaño que normalmente no ocasiona impedimentos estéricos con los residuos vecinos y que permite la conservación sin grandes distorsiones de la conformación de la cadena  $\alpha$  de los enlaces peptídicos. Tal y como se refleja en el apartado 3.3.4.4 de Resultados, mientras que las sustituciones H265A, H318A y D320A implicaron la pérdida completa de la actividad de la enzima, la mutación H189A reduce la actividad a un 10% de la de la enzima nativa, y la mutación control H240A apenas afecta a la catálisis (Tabla 19). Estos resultados sugieren que, efectivamente, los residuos H265, H318 y D320 están implicados en la catálisis de NicX y, según el modelo propuesto, constituyen la tríada facial que une Fe (II) en esta extradiol dioxigenasa. El residuo H189 se encuentra al otro lado de la esfera de coordinación del metal y parece cerrar la cavidad del centro activo. Aunque todavía no existen evidencias experimentales, este residuo podría estar involucrado en la unión del sustrato, o bien participar en la estabilización de los intermedios de reacción. Así, en el mecanismo propuesto para las reacciones catalizadas por extradiol dioxigenasas, se requiere un residuo His en el centro activo, adicional a los dos residuos His de la tríada facial, y cuya función puede ser la desprotonación de uno de los hidroxilos del sustrato (Sato *et al.*, 2002), o bien la de ceder un protón al oxoanión generado en la catálisis a partir de la molécula de oxígeno, y formar un grupo hidroxilo que finalmente rompe la lactona cíclica que se forma como intermediario de la reacción y libera el producto (Vaillancourt *et al.*, 2004).

Los resultados basados en el modelo del dominio C-terminal de NicX permiten postular que la estructura de unión a Co y que caracteriza a las enzimas pertenecientes a la familia MQ de metaloproteasas es capaz de albergar también centros activos basados en la tríada de dos histidinas y un carboxilato quelantes de Fe (II) en extradiol dioxigenasas que rompen anillos aromáticos *N*-heterocíclicos. Aunque la 2,5-DHP no es un sustrato peptídico como los de las aminopeptidasas AmpS y AmpT, este derivado dihidroxilado de la piridina podría formar un enlace amida como consecuencia de su equilibrio de tautomería ceto-enólica (5-hidroxi 2-piridona), de forma que el centro activo de la enzima estaría reconociendo una estructura similar a un enlace peptídico. Se comprobó, no obstante, que NicX no tenía actividad aminopeptidasa cuando se empleaba como sustrato encefalina, bien fuera en presencia de Fe (II) o de Co (II). Este resultado está de acuerdo con el hecho de que NicX carezca de uno de los dos sitios de unión a metal que caracterizan a AmpS. Existen

otras peptidasas que requieren la presencia de dos iones metálicos en su centro activo. Una de ellas es la proteína FrvX de *Pyrococcus horikoshii*, perteneciente a la familia de aminopeptidasas MH (Russo y Baumann, 2004). Aunque la estructura de FrvX no es similar a la de AmpS, existe un residuo ácido en ambas, Glu343 de AmpS y Glu212 de FrvX, para los que se postula como papel fisiológico el de unión del sustrato peptídico (Odintsov *et al.*, 2005a). En el modelo de NicX el residuo que ocupa el lugar equivalente al Glu343 de AmpS es R284 (Fig. 46), un residuo que podría estar implicado en la unión del grupo carbonilo de la forma ceto de la 2,5-dihidroxipiridina (5-hidroxi 2-piridona), aunque de momento no poseemos una evidencia experimental que soporte esta hipótesis.



**Figura 67. Modelo tridimensional propuesto para la proteína NicX.** En la figura se muestra la representación correspondiente a la densidad electrónica de superficie. En rojo aparece el dominio N-terminal, mientras que el dominio C-terminal se muestra en verde. La región en amarillo corresponde a los residuos que podrían formar la tríada facial de unión a un ion de Fe(II) y se sitúan en una cavidad de la molécula delimitada por los dominios N- y C-terminal. La figura fue generada mediante el programa PyMol (DeLano, 2002)

El dominio N-terminal de NicX posee un motivo *Rossmann fold*. Existen distintas enzimas que poseen este dominio implicadas en la unión de nucleótidos, y, por lo tanto, en el

reconocimiento de *N*-heterociclos (Oppermann *et al.*, 2003), aunque no podemos determinar si este motivo cumple el mismo papel en NicX. En la proteína AmpS, el dominio N-terminal posee una arquitectura distinta, y parece conformar un canal para el acceso del péptido al centro activo, además de servir de soporte para la correcta conformación del dominio C-terminal (Odintsov *et al.*, 2005b). Además, en la estructura resuelta en los cristales de AmpS la proteína aparece como un dímero, siendo el dominio N-terminal el responsable de la dimerización, aunque se desconoce si la forma dimérica tiene significado biológico (Odintsov *et al.*, 2005b). El dominio N-terminal de NicX podría tener funciones similares, como la de mantener la conformación del centro activo, conformar el canal de acceso del sustrato (Fig. 67), o la de estar implicado en la oligomerización de la proteína, lo que será objeto de estudio en el futuro.

NicX constituye, pues, la primera extradiol dioxigenasa que se describe capaz de romper el anillo aromático de un compuesto *N*-heterocíclico y representa una nueva familia de extradiol dioxigenasas cuya tríada facial de interacción con Fe (II) habría evolucionado a partir del centro activo de ciertas metaloproteasas tales como las aminopeptidasas de la familia MQ.

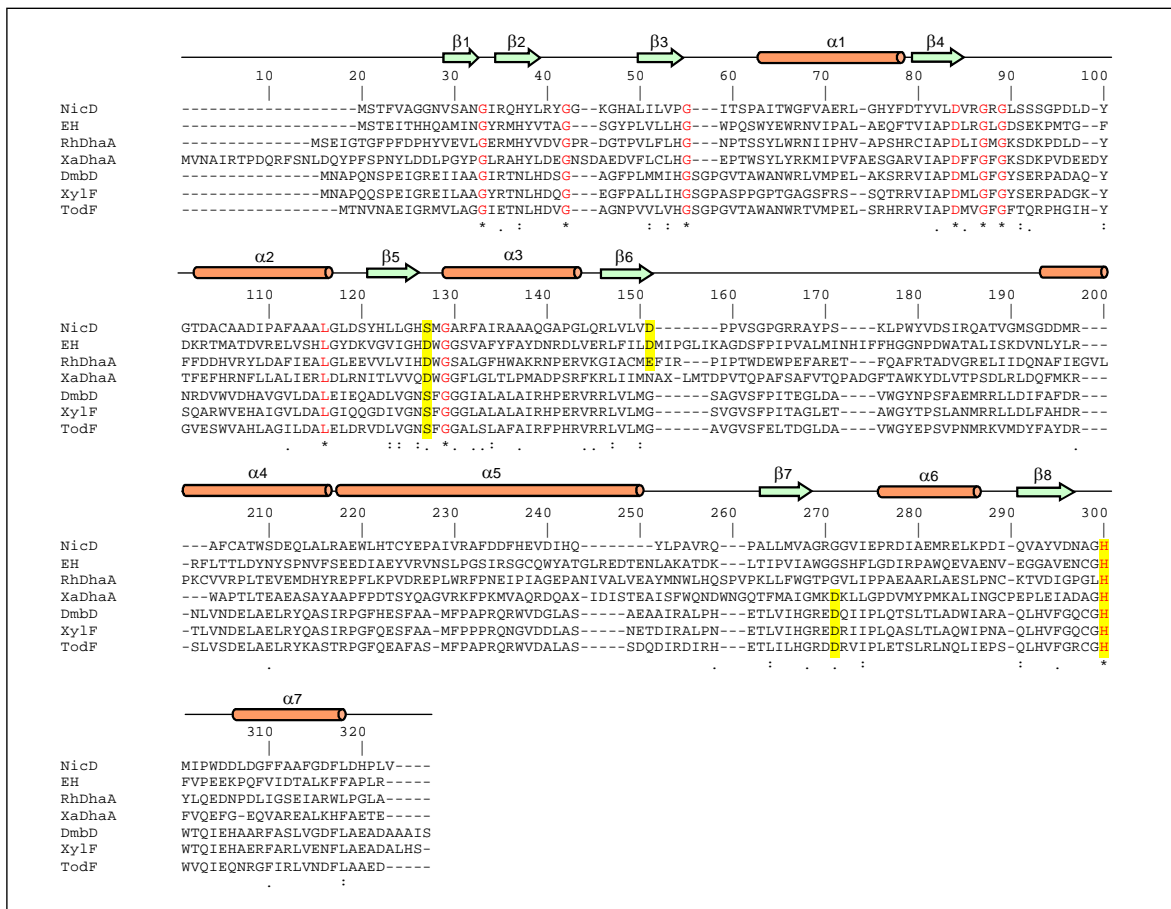
#### **2.4. NicD es una N-formilmaleámico desformilasa**

El gen *nicD* se ha clonado e hiperexpresado en *E. coli*, mostrando que codifica una proteína del tamaño predicho (29 kDa) (Fig. 48) según se deduce de la secuencia génica. Los análisis mediante HPLC (Fig. 49) y RMN (Fig. 51) de ensayos enzimáticos que contienen ácido *N*-formilmaleámico y extractos celulares portadores de la proteína NicD hiperproducida, revelaron la hidrólisis del enlace C-N del ácido *N*-formilmaleámico con la consiguiente formación de los ácidos maleámico y fórmico. Estos resultados demuestran, por lo tanto, que NicD es una *N*-formilmaleámico desformilasa que cataliza la cuarta etapa enzimática en la degradación del NA en *P. putida* KT2440 (Figs. 13 y 50).

El análisis de la secuencia de aminoácidos del producto del gen *nicD* refleja que se trata de una enzima perteneciente a la familia de las  $\alpha/\beta$ -hidrolasas (Tabla 13), la cual engloba a proteínas con una gran diversidad funcional pero que comparten un mismo tipo de plegamiento. Se han caracterizado miembros de esta familia con actividad hidrolasa de

ésteres de ácidos carboxílicos, de lípidos, de tioésteres, de péptidos, y de epóxidos, así como haloperoxidasas, deshalogenasas, y enzimas de ruptura de enlaces C-C (Holmquist, 2000). El plegamiento canónico de estas proteínas consiste en una lámina  $\beta$  paralela compuesta por ocho cadenas  $\beta$ , de las que únicamente una (la cadena  $\beta_2$ ) es antiparalela, y que se encuentran unidas por hélices  $\alpha$ . La lámina se encuentra curvada formando la mitad de un barril  $\beta$ , de manera que la primera y la última cadena forman un ángulo de  $90^\circ$  (Ollis *et al.*, 1992). Las enzimas de esta familia no requieren cofactores para su función y su mecanismo de hidrólisis se basa en la presencia de una tríada catalítica compuesta por un residuo nucleófilo, una histidina y un residuo ácido. El residuo nucleófilo puede ser una serina, una citosina o un ácido aspártico, mientras que el residuo ácido puede ser ácido aspártico o glutámico. El residuo nucleófilo (Nuc) se ubica en una región que posee una secuencia consenso G-X-Nuc-X-G, situada en un giro entre la cadena  $\beta_5$  y la siguiente hélice  $\alpha$ . El residuo ácido se sitúa en el bucle que sigue a la cadena  $\beta_7$ , mientras que la histidina se localiza en el bucle situado tras la cadena  $\beta_8$  (Ollis *et al.*, 1992). El plegamiento de las  $\alpha/\beta$ -hidrolasas proporciona una arquitectura apropiada para la conservación de la tríada catalítica necesaria para la hidrólisis así como para la disposición de numerosos sitios de unión al sustrato, lo que explica que las reacciones catalizadas por estas enzimas sean muy diversas (Holmquist, 2000).

La estructura secundaria predicha para NicD (Fig. 68), al igual que un modelo tridimensional de la proteína realizado mediante homología con otras  $\alpha/\beta$ -hidrolasas (Fig. 69), revelan la existencia de ocho cadenas  $\beta$ , todas ellas, a partir de la cadena  $\beta_3$ , unidas por hélices  $\alpha$ . En la región que existe tras la cadena  $\beta_5$  se localiza el motivo 98-G-H-S-M-G-104 que se encuentra conservado en todas las proteínas homólogas a NicD en otras bacterias (Fig. 68), y que responde al motivo consenso que incluye el residuo nucleófilo (S101 en NicD) que participa en la catálisis de las  $\alpha/\beta$ -hidrolasas (Hecht *et al.*, 1994; Sanishvili *et al.*, 2003). El estudio *in silico* refleja además que el residuo H245, conservado en todas las proteínas homólogas a NicD y localizado entre la octava cadena  $\beta$  y la última hélice- $\alpha$  de NicD, podría ser el residuo básico de la tríada catalítica.

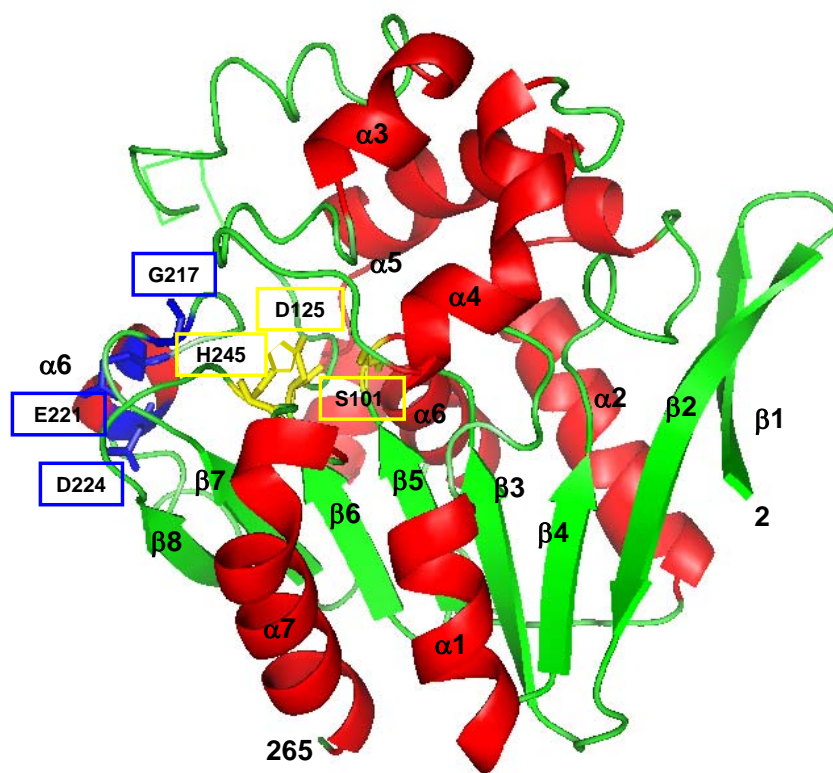


**Figura 68. Comparación de la secuencia de la proteína NicD con las de otras  $\alpha/\beta$ -hidrolasas.** En la figura se muestran los alineamientos de las secuencias de la proteína NicD de *P. putida* KT2440 (PP3943), y de diferentes proteínas pertenecientes a la familia de las  $\alpha/\beta$  hidrolasas. Las secuencias empleadas son: EH, epóxido hidrolasa de *Corynebacterium* sp. C12 (O52866); RhDhaA, haloalcano deshalogenasa de *Rhodococcus* sp. (P59336); XaDhaA, haloalcano deshalogenasa de *Xanthobacter autotrophicus* GJ10 (1CIJ); DmbD, 2-hidroxiimucónicosemialdehído hidrolasa de *Pseudomonas* sp. CF600 (P19076); XylF, semialdehído 2-hidroxiimucónico hidrolasa de *P. putida* mt-2 (P23105); TodF, 2-hidroxi-6-oxo-2,4-heptadieno hidrolasa de *P. putida* F1 (P23133). Los residuos conservados se indican en rojo, mientras que los cambios conservativos se indican con dos puntos, y los residuos que poseen una cierta similitud en su estructura y/o propiedades fisicoquímicas, se indican con un punto. Los aminoácidos que podrían conformar la tríada catalítica de NicD (S100, H245 y D125), así como los de las tríadas catalíticas del resto de proteínas se muestran resaltados en amarillo. También se muestra la predicción de estructura secundaria de NicD de *P. putida* KT2440 generada con el software Scratch (<http://www.igb.uci.edu/tools/scratch/>; Cheng *et al.*, 2005). Las hélices  $\alpha$  se indican como cilindros rojos, mientras que las cadenas  $\beta$  están representadas por flechas verdes. Los alineamientos se generaron con el programa CLUSTAWL ([http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa\\_automat.pl?page=npsa\\_clustalw.html](http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_clustalw.html))

El residuo ácido que completaría la terna de aminoácidos requeridos para la catálisis podría ser el E221 o el D224 que se encuentran después de la cadena  $\beta_7$ , ya que el residuo que ocupa la posición equivalente al residuo ácido canónico dentro de las  $\alpha/\beta$ -hidrolasas es la G217 en la proteína NicD (Figs. 68 y 69). Sin embargo, ni el residuo E221 ni el D224 parecen estar próximos a los otros residuos de la tríada catalítica en el modelo postulado para NicD (Fig. 69). No obstante, se han descrito  $\alpha/\beta$ -hidrolasas como la haloalcano



deshalogenasa de *Rhodococcus* sp. cuya estructura tridimensional es conocida (Newman *et al.*, 1999), o las enzimas epóxido hidrolasa de *Corynebacterium* sp. C12 (Misawa *et al.*, 1998) y *Agrobacterium radiobacter* AD1 (Rink *et al.*, 1997), en las que el residuo ácido de la tríada catalítica es un aspártico que se localiza después de la cadena  $\beta_6$  (Fig. 68). La diversidad en la posición del residuo ácido ha sido objeto de estudio en las lipasas pancreáticas, donde es posible identificar proteínas con cada una de las dos disposiciones (Winkler *et al.*, 1990; Schrag *et al.*, 1992). Curiosamente, el residuo ácido de la tríada catalítica que se localiza después de la cadena  $\beta_6$  en algunas  $\alpha/\beta$ -hidrolasas se encuentra conservado en idéntica posición (D125) en la proteína NicD (Fig. 68), y en el modelo tridimensional se encuentra próximo a los residuos H245 y S101 (Fig. 69). Todos estos datos sugieren que la tríada catalítica de NicD está constituida por los residuos S101, D125 e H245.



**Figura 69. Modelo tridimensional propuesto para la proteína NicD.** En rojo se muestran las hélices  $\alpha$  y en verde las cadenas  $\beta$ . Se detalla la numeración de las hélices  $\alpha$  ( $\alpha_1$ – $\alpha_7$ ) y las cadenas  $\beta$  ( $\beta_1$ – $\beta_8$ ). En amarillo se muestran los residuos S101, D125, y H245 que podrían conformar la tríada catalítica de la proteína. En azul se muestra el residuo G217 que ocupa la posición equivalente a la del residuo ácido de la tríada catalítica de la mayoría de las  $\alpha/\beta$ -hidrolasas, así como los residuos E221 y D224, que se encuentran conservados en ortólogos de NicD en otros organismos (ver apartado 4) y que se localizan a continuación de la cadena  $\beta_7$ . El modelo se generó mediante el servidor *3D-JIGSAW Protein Comparative Modelling Server* (<http://www.bmm.icnet.uk/servers/3djigsaw/>). El programa empleó como modelo la lactamasa de *Aureobacterium* sp. (1hkh\_A). La figura fue generada mediante el programa PyMol (DeLano, 2002).

Aunque se han descrito otras enzimas de la familia de las  $\alpha/\beta$ -hidrolasas que rompen enlaces C-N tales como la serín-carboxipeptidasa (Liao y Remington, 1990) y la prolilimino-oligopeptidasa (Sarid *et al.*, 1959), la ruptura siempre se produce en un enlace peptídico. Así pues, NicD constituye la primera desformilasa que se describe dentro de la familia de las  $\alpha/\beta$ -hidrolasas, y amplía aún más el perfil de actividades catalíticas asociado a esta superfamilia de enzimas.

### **2.5 Análisis de los productos de los genes *nicF* y *nicE***

El producto del gen *nicF* (213 aa) posee una secuencia de aminoácidos similar a la de la *N*-carbamoilsarcosina amidohidrolasa de *Arthrobacter* sp. (Romao *et al.*, 1992) (Tabla 13). Otra amidohidrolasa perteneciente a la superfamilia de las isocorismatasas (Du *et al.*, 2001) es la pirazinamidasa (nicotinamidasa) de *Pyrococcus horikoshii* (Du *et al.*, 2001) cuya estructura, al igual que la de la *N*-carbamoilsarcosina hidrolasa, ha sido determinada por difracción de rayos X. Las dos poseen un único dominio  $\alpha/\beta$ , que cataliza la sustitución del grupo amino de un enlace amida por un grupo hidroxilo. En el mecanismo catalítico propuesto para estas enzimas participan tres aminoácidos, una cisteína que actuaría como residuo nucleófilo, un ácido aspártico y una lisina (Du *et al.*, 2001; Zajc *et al.*, 1996). En los alineamientos de NicF con estas proteínas, esos tres residuos se encuentran conservados y se corresponden con la C154, D31 y K121. Así pues, los resultados derivados del análisis de la estructura primaria de NicF sugieren que esta proteína es la maleamato amidohidrolasa responsable de la penúltima etapa de la degradación de NA en *P. putida* KT2440 (Fig. 13). La liberación de un grupo amino en el catabolismo del NA explica que este compuesto aromático también sea utilizado como única fuente de nitrógeno por *P. putida* KT2440. En la ruta de degradación de la quinolina se requiere también la participación de una amidasa, que podría estar codificada por el orf2 del *cluster* descrito en *P. putida* 86 (Carl *et al.*, 2004; no. acceso AJ583091). Sin embargo, esta amidasa no pertenece a la familia de proteínas de las isocorismatasas, como NicF, sino que presenta similitud con las amido hidrolasas de ácidos grasos descritas en *Rattus norvegicus* (Bracey *et al.*, 2002).

La última etapa de la ruta catabólica del NA consiste en la isomerización del ácido maleico que es transformado en ácido fumárico, un intermediario del ciclo de Krebs. La

actividad maleato isomerasa ya había sido descrita previamente en la bacteria *P. putida* N9 cuando ésta se cultivaba en NA (Behrman y Stanier, 1957). El producto del gen *nicE*, una proteína de peso molecular estimado 29.3 kDa, muestra una elevada similitud de secuencia con las maleato *cis/trans*-isomerasas (Tabla 13), por lo que muy probablemente será la responsable de la formación de fumarato en la ruta nic (Fig. 13). Dado que la conversión de maleato en fumarato es un proceso de gran interés biotecnológico (Hatakeyama *et al.*, 2000), se han caracterizado varias maleato *cis/trans* isomerasas procedentes de diferentes organismos tales como *Pseudomonas* (Scher y Jakoby, 1969), *Alcaligenes* (Hatakeyama *et al.*, 1997; Kimura *et al.*, 1986), *Arthrobacter* (Kato *et al.*, 1995), *Bacillus* y *Serratia* (Hatakeyama *et al.*, 2000). En todos ellos, la actividad maleato isomerasa se detectó cultivándolos en presencia de NA. La maleato isomerasa caracterizada en *P. fluorescens* está asociada a la última etapa de degradación del NA (Scher y Jakoby, 1969). Aunque no se conoce la estructura tridimensional de ninguna de estas proteínas, sí se conoce la estructura de otro miembro de la misma familia, la aspartato racemasa de *P. horikoshii*. Esta proteína posee dos dominios homólogos  $\alpha/\beta$  y el mecanismo de catálisis propuesto implica dos cisteínas que están muy conservadas en otras aspartato racemasas (Liu *et al.*, 2002). En este sentido, las maleato isomerasas son sensibles a compuestos que inhiben irreversiblemente los grupos -SH de las cisteínas (Scher y Jakoby, 1969; Hatakeyama *et al.*, 1997) y la sustitución de cualquiera de los dos residuos conservados de cisteína conlleva la pérdida completa de actividad (Hatakeyama *et al.*, 2000). Como cabría esperar, las dos cisteínas conservadas en las maleato isomerasas también se encuentran presentes en NicE (Cys104 y Cys222), lo que refuerza la hipótesis de que esta enzima cataliza la última etapa en la degradación del NA.

## **2.6 Análisis de los productos de los genes *nicT* y *nicP***

Los genes *nicT* y *nicP* codifican dos proteínas que poseen una identidad de secuencia significativa con transportadores de la familia MFS (*Major Facilitator Superfamily*) y con porinas de la familia OprD, respectivamente (Tabla 13), por lo que presuntamente estarán implicadas en la entrada del NA a la célula.

La familia MFS engloba a un gran número de proteínas transportadoras que se caracterizan por poseer doce hélices transmembrana que conforman un canal para la entrada

del sustrato. Algunos de los bucles citosólicos que enlazan los segmentos transmembrana son esenciales para el transporte del sustrato, como se ha demostrado para el bucle hidrofílico que une las hélices 2 y 3 en la permeasa de lactosa (LacY) y en el transportador de tetraciclina (TetA) de *E. coli* (Kaback, 1992; Yamaguchi *et al.*, 1993). En ese bucle existe un motivo conservado que corresponde a la secuencia consenso GXXD(R/K)XGR(R/K). En las rutas de catabolismo de compuestos aromáticos se han descrito numerosos transportadores de la familia MFS, siendo PcaK de *P. putida* PRS200 el mejor estudiado. Se trata de un transportador de 4-hidroxibenzoato, que además de permitir la entrada del sustrato al citoplasma de la bacteria, tiene la particularidad de actuar como sensor de quimiotaxis en respuesta a dicho compuesto aromático (Ditty y Harwood, 1999; Harwood *et al.*, 1994). El análisis de la estructura primaria de NicT también revela la existencia de 12 posibles segmentos transmembrana, si bien carece del motivo conservado en el bucle hidrofílico situado entre las hélices 2 y 3.

OprD es el prototipo de una familia de porinas que fue inicialmente identificada en *P. aeruginosa* PA01 (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 *et al.*, 2006). Existen varias porinas en *P. putida* KT2440 que pertenecen a la familia OprD, y algunas de éstas, tales como BenF y PhaK, están relacionadas con el catabolismo de compuestos aromáticos (Tablas 9 y 11). NicP es otro parálogo de OprD en *P. putida* KT2440 y estará presuntamente implicado en el transporte de NA.

Si bien los compuestos aromáticos dado su carácter hidrofóbico podrían atravesar la envuelta bacteriana de forma espontánea, la presencia de elementos de transporte específicos incrementa significativamente la velocidad de entrada de estos compuestos al interior celular. La importancia de los transportadores en el catabolismo de compuestos aromáticos se hace patente cuando la concentración de dichos compuestos no es muy elevada, situación frecuente en el medio ambiente (Díaz *et al.*, 2001). No obstante, también se han descrito casos en los que la inactivación por mutación del transportador y/o la correspondiente permeasa impiden el crecimiento de la cepa mutante incluso en presencia de elevadas concentraciones del compuesto aromático. Así, por ejemplo, mutantes de *P. putida* U en los

genes *phaJ* (codifica un transportador de la familia MFS) y *phaK* (codifica una porina de la familia OprD) de la ruta de degradación del fenilacetato son incapaces de utilizar este compuesto como única fuente de carbono, mientras que el crecimiento en otros sustratos aromáticos que no son degradados vía fenilacetato no se ve afectado, lo que demuestra que PhaJ y PhaK son necesarias y específicas para el transporte del fenilacetato en *P. putida* U (Olivera *et al.*, 1998). La importancia de los productos de los genes *nicT* y *nicP* en la eficiencia de la ruta nic en *P. putida* KT2440, y su implicación en una posible quimiotaxis de este organismo frente al NA, son temas de gran interés que están pendientes de estudio.

### **3 Estudio de la regulación transcripcional de los genes nic**

Los mecanismos mediante los que se controla la expresión de los genes responsables del catabolismo aeróbico de compuestos aromáticos han sido ampliamente estudiados en bacterias, como se ha comentado en el apartado 3 de la Introducción (Díaz y Prieto, 2000; Tropel y van der Meer, 2004). La mayor parte de los estudios se centran en el control transcripcional de rutas de degradación de compuestos aromáticos derivados del benceno pero también existen algunos trabajos sobre la regulación transcripcional de rutas de degradación de compuestos derivados de la piridina (Sandu *et al.*, 2003; Chiribau *et al.*, 2005; Carl y Fetzner, 2005). El fenómeno de inducción de las actividades enzimáticas implicadas en la degradación del NA ya había sido referido previamente para *P. putida* N9 (Behrman y Stanier, 1957), *B. niacini* (Hirschberg y Ensign, 1972), *A. caulinodans* (Buckmiller *et al.*, 1991) y *E. nidulans* (Sealy-Lewis *et al.*, 1979). Sin embargo, el mecanismo molecular de esta regulación era desconocido, por lo que se consideró relevante estudiar la expresión de los genes *nic* en *P. putida* KT2440.

#### **3.1 Análisis de la inducción y organización transcripcional de los genes nic**

Como se demuestra en los apartados 2 y 4 de Resultados, las actividades enzimáticas NA hidroxilasa y 2,5-DHP dioxigenasa sólo se detectan en extractos celulares cuando *P.*

*putida* KT2440 se cultiva en NA, lo que sugiere que los genes *nic* son inducibles en presencia de NA. Un resultado similar había sido previamente descrito en *P. putida* N9 donde las dos actividades citadas, además de la 6HNA monooxigenasa, la maleamato hidrolasa y la maleato isomerasa, sólo se podían detectar si las células se exponían a NA (Behrman y Stanier, 1957). Para demostrar de forma directa la inducción de los genes *nic*, se analizó mediante RT-PCR la presencia de los correspondientes mRNAs en células de *P. putida* KT2440 que utilizan citrato o NA como única fuente de carbono. Mientras que todos los genes *nic* analizados se expresan en presencia de NA, el crecimiento en citrato sólo permite la expresión de los genes transportadores *nicTP* y del gen regulador *nicR* (Fig. 53).

La organización transcripcional de los genes *nic* deducida de los experimentos de RT-PCR analizando regiones intergénicas (Fig. 53) revela que en presencia de NA existen tres operones: *nicAB*, *nicXR* y *nicCDEFTP*. La existencia del operón *nicCDEFTP* está de acuerdo con el hecho de que *P. putida* KT2440dnicC, una cepa que contiene una mutación en el gen *nicC* con efectos polares, no sea capaz de crecer en NA cuando se complementa con el gen *nicC* clonado en el plásmido pIZNicC y sí cuando se complementa con el plásmido pNIC portador del *cluster nic* completo. El hecho de que la cepa mutante en el gen *nicR* siga manteniendo cierta actividad NA hidroxilasa (Fig. 63) indica que los genes *nicAB* continúan expresándose y, por lo tanto, está de acuerdo con el resultado de RT-PCR que revela la no co-transcripción de los genes *nicR* y *nicA* (Fig. 53) sugiriendo así la existencia de un promotor independiente para los genes *nicAB*.

A diferencia de lo que ocurre cuando *P. putida* KT2440 se cultiva en presencia de NA, la ausencia de este compuesto en el medio de cultivo revela la existencia de tan sólo dos operones *nic*, *nicR* y *nicTP* (Fig. 53), lo que indica la existencia de al menos dos promotores adicionales a los detectados en condiciones de inducción.

Para demostrar la funcionalidad de los promotores *Pa* (controla el operón *nicAB*), *Pc* (controla el operón *nicCDEFTP*) y *Px* (controla el operón *nicXR*), se realizaron fusiones de las correspondientes regiones promotoras al gen reportero *lacZ* y se confirmó la producción de  $\beta$ -galactosidasa en *E. coli* (fusiones traduccionales *Pc::lacZ* y *Px::lacZ*) (Fig. 58) y en *P. putida* (fusión transcripcional *Pa::lacZ*) (Fig. 56).

En resumen, los genes *nic* se organizan en cinco transcritos constituidos por los genes *nicAB*, *nicXR*, *nicCDEFTP*, *nicR* y *nicTP* (Fig. 54). Los tres primeros se expresan cuando el

sistema se encuentra inducido por NA, mientras que los dos últimos lo hacen de forma constitutiva. La inducción de los genes catabólicos pertenecientes a una ruta de degradación de compuestos aromáticos cuando las células se encuentran en presencia de los metabolitos de la ruta es un fenómeno general y ampliamente estudiado, que facilita el aprovechamiento de los sustratos y evita el gasto energético innecesario cuando estos no se encuentran presentes (Cases y de Lorenzo, 2001; Cases y de Lorenzo 2005a). Por el contrario, la expresión en ausencia de NA de los genes *nicTP* y *nicR* sugiere que estos poseen un mecanismo de regulación independiente o adicional al que controla los genes catabólicos, una característica habitual en otras rutas de catabolismo de compuestos aromáticos (Díaz y Prieto, 2000; Tropel y van der Meer, 2004). Unos niveles de expresión significativos de los genes reguladores y de transporte de compuestos aromáticos en ausencia de la molécula inductora de los genes catabólicos facilitará una inducción rápida y eficaz de la ruta de degradación cuando la célula se encuentre en presencia de la correspondiente fuente de carbono.

Para determinar la naturaleza de la molécula(s) inductora(s) de los genes *nic*, se realizaron ensayos de RT-PCR con RNA extraído de diferentes cepas mutantes cultivadas en POB y en presencia de distintos metabolitos de la ruta de degradación de NA tales como NA, 6HNA ó 2,5-DHP. En el mutante *P. putida* KT2440*dnicB*, que no puede metabolizar el NA, el crecimiento en presencia de NA sólo permitió detectar la expresión de los genes *nicAB*. Por el contrario, los tres operones *nic* inducibles pudieron ser detectados cuando *P. putida* KT2440*dnicB* se cultivó en presencia de 6HNA (Fig. 60). Si se repite el mismo ensayo con el mutante *P. putida* KT2440*dnicC*, que no puede metabolizar el 6HNA y por lo tanto acumulará esta molécula tanto si se cultiva en presencia de NA como en presencia de 6HNA, se detecta la inducción de los tres operones *nic* cuando se utiliza NA o 6HNA como inductor (Fig. 60). Por el contrario, ninguno de los mutantes analizados mostró expresión de los operones *nic* inducibles cuando las células eran cultivadas en presencia de 2,5-DHP. Estos resultados permiten concluir que el NA es responsable de la inducción de los genes *nicAB*, mientras que el 6HNA es responsable de la inducción de los operones *nicAB*, *nicCDEFTP* y *nicXR*. La inducción coordinada de los operones en respuesta a 6HNA puede ser de vital importancia para la bacteria, puesto que en la naturaleza cuando la concentración de NA no es muy elevada como para permitir su uso como única fuente de carbono y energía, la célula

lo canalizará fundamentalmente para ser incorporado en los anillos de piridina de cofactores como el NAD. Sin embargo, cuando las cantidades de NA son elevadas, la formación de 6HNA como consecuencia de los niveles basales de actividad NA hidroxilasa permitirán la inducción de todas las actividades de la ruta para facilitar el crecimiento de la bacteria empleando NA como sustrato. La inducción de las actividades de la ruta mediada por 6HNA es un fenómeno común a otras especies, como ocurre en *B. niacini* donde se ha demostrado que el 6HNA es el inductor más eficiente para las actividades NA hidroxilasa y 6HNA hidroxilasa (Hirschberg y Ensign, 1972).

Aunque no se puede descartar que la 2,5-DHP no pueda penetrar la membrana citoplásmica de *P. putida*, los resultados obtenidos sugieren que este derivado dihidroxilado no es inductor de los genes *nic*. En los estudios previos sobre la ruta de degradación del NA se había comprobado que *P. putida* N9 y otras cepas de *Pseudomonas* capaces de degradar NA no eran capaces de crecer en 2,5-DHP, ácido maleámico o ácido maleico como únicas fuentes de carbono y energía, fenómeno que se atribuyó a la impermeabilidad de la membrana de la bacteria a la entrada de estos compuestos (Behrman y Stanier, 1957). Sin embargo, se ha demostrado en *B. niacini* que el ácido maleámico y maleico sí atraviesan la envuelta bacteriana (Hirschberg y Ensign, 1972), y compuestos muy similares a la 2,5-DHP, tales como el gentisato, también son capaces de penetrar al interior celular en numerosos bacterias. Por todo ello, y a la luz de los resultados de la inducción de los genes *nic* de *P. putida* KT2440, muy probablemente la ausencia de crecimiento de *Pseudomonas* en 2,5-DHP, ácido maleámico o ácido maleico sea debida a la ausencia de inducción de las enzimas requeridas para su degradación. En este sentido, habría que destacar aquí que los ácidos maleámico y maleico son dos metabolitos que no se han encontrado en otras rutas metabólicas y parecen ser específicos de la ruta de degradación de NA, lo que está de acuerdo con el hecho de que la expresión de los genes implicados en su degradación sea específicamente inducida en presencia de los inductores de la ruta *nic*.

### **3.2 La proteína NicR es un regulador transcripcional de la familia MarR**

El análisis *in silico* del *cluster nic* sugiere que el gen *nicR* podría estar implicado en la regulación transcripcional específica de dicho *cluster* (Tabla 13). La secuencia de



aminoácidos de la proteína NicR presenta una identidad del 27% con el regulador transcripcional MarR de *E. coli* (Sulavik *et al.*, 1995; Alekshun *et al.*, 2001). Las proteínas de la familia MarR son reguladores implicados en diferentes procesos biológicos, como la resistencia a múltiples antibióticos, a solventes orgánicos o a agentes de estrés oxidativo (Alekshun y Levy, 1999). Existen varios reguladores pertenecientes a esta familia que participan en el control transcripcional de las rutas de degradación de compuestos aromáticos, de entre ellos destacan NbzR en la degradación del aminofenol en *P. putida* HS12 (Park y Kim, 2001); HpaR (o HpcR) en la degradación de los ácidos 3- y 4-hidroxifenilacético así como del ácido 3,4-dihidroxifenilacético en *E. coli* W (Galán *et al.*, 2003) y *E. coli* C (Roper *et al.*, 1993); CbaR en el catabolismo del 3-clorobenzoato en *C. testosteroni* BR60 (Providenti y Wyndham, 2001); HcaR en el catabolismo del ácido hidroxicinámico en *Acinetobacter* sp. ADP1 (Parke and Orston, 2003), y BadR en la degradación anaeróbica del benzoato en *R. palustris* (Egland y Harwood, 1999). Las proteínas de la familia MarR son relativamente pequeñas, con una masa molecular que oscila entre 17 y 22 kDa (17.3 kDa para NicR), y la forma activa de las mismas es un dímero, mediante el cual interaccionan con dos surcos mayores adyacentes del DNA (Alekshun *et al.*, 2001; Galán *et al.*, 2003).

La estructura tridimensional del regulador MarR ha sido determinada y en el centro de la molécula posee un motivo hélice-giro-hélice (HTH) alada mediante el que interacciona con el DNA a través de la hélice de reconocimiento  $\alpha 4$  (Alekshun *et al.*, 2001). Ese motivo se encuentra conservado en la mayoría de las proteínas pertenecientes a la familia MarR y, por lo tanto, también está presente en NicR cuando se analiza su estructura secundaria predicha (Fig. 70). Las regiones N- y C-terminal de cada monómero de MarR están implicadas en la formación del dímero, localizándose dos sitios de unión al efector (salicilato) a ambos lados de la hélice de reconocimiento ( $\alpha 4$ ) del DNA en cada monómero (Alekshun *et al.*, 2001). También se ha sugerido la existencia de dos sitios de interacción con el efector, 4-hidroxifenilacetato, a ambos lados de la hélice de interacción con el DNA en la molécula del regulador HpaR (Galán *et al.*, 2003). El análisis de comparación de secuencias permite postular la existencia de dos motivos de interacción con el efector (NA o 6HNA), similares a los descritos en MarR y HpaR, a ambos lados de la posible hélice de interacción con el DNA en el regulador NicR (Fig. 70).



mutante cuando se cultiva en 6HNA (Fig. 62). Estos resultados sugieren que el gen *nicR* podría estar implicado en una regulación positiva del operón *nicAB*, ejerciendo un efecto represor sobre los operones *nicCDEFTP* y *nicXR*. En segundo lugar, cuando se compara la actividad NA hidroxilasa (NicAB) y 2,5-DHP dioxigenasa (NicX) de la cepa parental y del mutante *P. putida* KT2440*dnicR*, mientras que la primera está significativamente reducida en el mutante cultivado tanto en presencia como en ausencia de NA, los niveles de actividad dioxigenasa que presenta la cepa parental cultivada en NA (en ausencia de NA sólo se detectan niveles basales de actividad dioxigenasa) son similares a los de la cepa mutante crecida tanto en presencia como en ausencia de NA (Fig. 63). Estos resultados vuelven a sugerir que NicR actúa como un activador de los genes *nicAB* y como un represor del gen *nicX*. Finalmente, para demostrar que el efecto de NicR se ejerce a nivel transcripcional, se valoró la actividad del promotor *Pa* utilizando la fusión transcripcional *Pa::lacZ* (plásmido pBPa) tanto en la cepa parental *P. putida* KT2440 como en la cepa mutante *P. putida* KT2440*dnicR*, observándose que si bien *Pa* es un promotor inducible por NA en la cepa parental, en ausencia de NicR el promotor conserva exclusivamente la actividad basal que presenta en la cepa parental en ausencia de NA (Fig. 64). La actividad basal del promotor *Pa* explica que la cepa mutante *P. putida* KT2440*dnicR* sea capaz de crecer en NA como única fuente de carbono (ver más arriba). El efecto de NicR sobre la transcripción del operón *nicCDEFTP* se analizó mediante RT-PCR, observándose que si bien la expresión del gen *nicC* era inducible por NA en la cepa parental, ésta era constitutiva, y similar a la de la cepa parental inducida, en la cepa mutante *P. putida* KT2440*dnicR* (Fig. 65). Todos estos resultados sugieren que NicR actúa como un activador del operón *nicAB* y como un represor de los operones *nicCDEFTP* y *nicXR*. Mientras que el NA o 6HNA es necesario para la activación del promotor *Pa* mediada por NicR, la presencia de 6HNA impide el efecto represor de NicR sobre *Pc* y *Px* (Fig. 61). No obstante, no se puede descartar que el efecto regulador de NicR sobre los correspondientes promotores sea indirecto o requiera de algún otro regulador adicional, como parece ser el caso en la degradación del aminofenol en *P. putida* HS12 donde el regulador específico NbzR (también de la familia MarR) parece precisar de un segundo elemento regulador (Park y Kim, 2001). El abordaje *in vitro* de la actividad e interacción de NicR con los promotores correspondientes permitirá un conocimiento más preciso de la regulación del *cluster nic*.

Los reguladores transcripcionales de la familia MarR relacionados con el catabolismo de compuestos aromáticos pueden actuar como represores, tal y como sucede con los mencionados NbzR, HpaR o CbaR, o como activadores, como sucede con el regulador BadR. En este sentido, NicR es el primer regulador de la familia MarR relacionado con el catabolismo de compuestos aromáticos que, dependiendo del promotor regulado, funciona como un activador o como un represor. Si bien el funcionamiento de un mismo regulador como activador y represor es relativamente frecuente en otras familias de reguladores transcripcionales (Tropel y van der Meer, 2004), dentro de la familia MarR hasta la fecha sólo MexR de *P. aeruginosa*, un regulador que participa en el control de operones relacionados con la resistencia a antibióticos, se ha descrito que pueda funcionar tanto de activador como de represor (Poole *et al.*, 1996).

Los estudios de regulación transcripcional en las rutas de degradación de heterociclos derivados de la piridina se han centrado fundamentalmente en los reguladores PmfR (Chiribau *et al.*, 2005) y HdnR (Sandu *et al.*, 2003), que participan en el control transcripcional de la ruta de degradación de la nicotina codificada en el plásmido pAO1 de *A. nicotinovorans* (Baitsch *et al.*, 2001). El regulador HdnR pertenece a la familia de reguladores transcripcionales TetR, y actúa como represor de los genes que codifican la 6-hidroxi-L-nicotina oxidasa que rompe el anillo de pirrolidina del alcaloide. Este regulador reconoce como efector tanto a la 6-hidroxi-L-nicotina como a la 6-hidroxi-D-nicotina (Sandu *et al.*, 2003). El regulador PmfR es un activador transcripcional de la familia XylR/NtrC que induce la expresión de los genes responsables de la degradación del  $\gamma$ -N-metilaminobutirato que se forma en la degradación de la nicotina a partir de su anillo de pirrolidina (Chiribau *et al.*, 2005) (Fig. 7). Recientemente se ha caracterizado el activador transcripcional OxoS de la ruta de degradación de quinolina en *P. putida* 86, un miembro de la familia de reguladores AraC/XylS que responde a la presencia de quinolina (Carl y Fetzner, 2005). Otros reguladores transcripcionales que se han caracterizado en el catabolismo de compuestos aromáticos N-heterocíclicos son PucR (implicado en la degradación de purinas en *B. subtilis*) (Schultz *et al.*, 2001), AtzR (un activador de la familia LysR que controla el operón de la degradación de ácido cianúrico en *Pseudomonas* sp. ADP) (García-González *et al.*, 2005) y AntR (un activador de la familia XylS/AraC que controla el catabolismo del carbazol en *P. resinovorans*) (Urata *et al.*, 2004). Por lo tanto, NicR es el primer regulador transcripcional

perteneciente a la familia MarR que se describe en el catabolismo de compuestos aromáticos *N*-heterocíclicos.

Además de la regulación específica mediada por NicR debe existir una regulación sobrepuesta que, muy probablemente, implique represión catabólica mediada por otras fuentes de carbono cuando no existe una limitación de nitrógeno en el medio. En la ruta de degradación del NA de *B. niacini* (Hirschberg y Ensign, 1972) se ha demostrado que en las bacterias cultivadas en un medio que contiene glucosa y NA como fuentes de carbono, no es posible detectar las actividades NA hidroxilasa y 6HNA hidroxilasa hasta que no se ha consumido toda la glucosa del medio. Sin embargo, en un medio que contiene los dos sustratos y no contiene nitrógeno, se detectaron las dos actividades cuando aún no se había consumido la mitad de la glucosa. La regulación global mediada por nitrógeno también ha sido estudiada en *A. caulinodans*, donde se ha postulado que se encuentra controlada por el sistema de dos componentes NtrB/NtrC (Buckmiller *et al.*, 1991). Las bases moleculares que controlen la regulación sobrepuesta de la ruta *nic* en *P. putida* KT2440 deberán ser objeto de estudio detallado en el futuro.

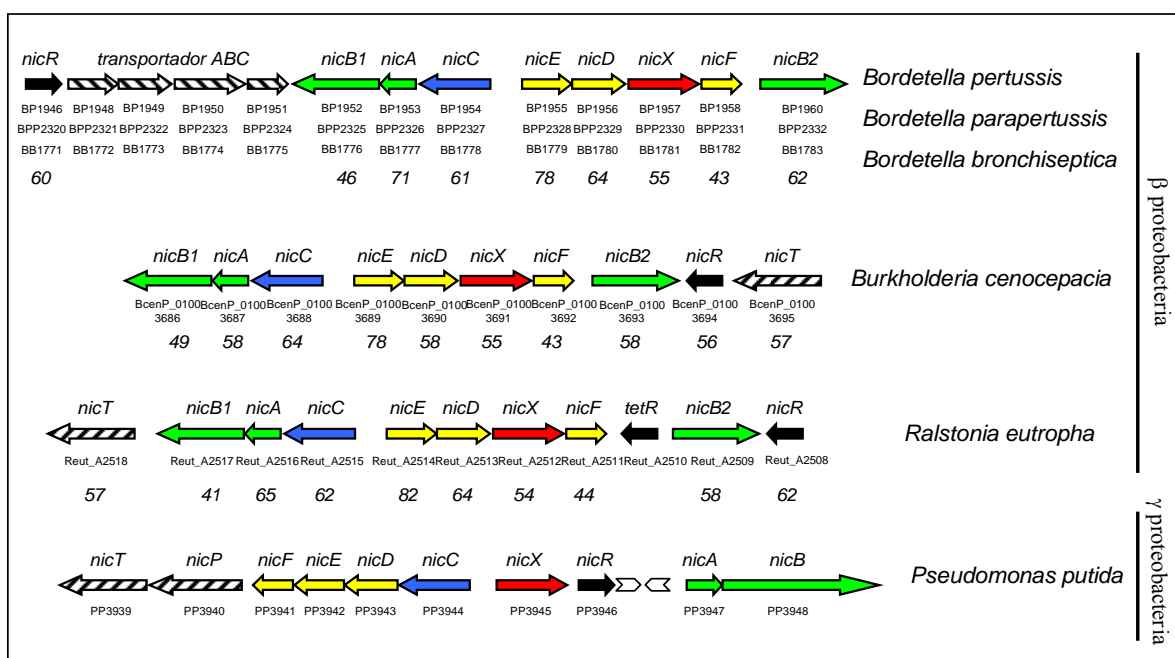
#### **4 Distribución del cluster *nic* en otras bacterias**

Dado que los genes *nic* de *P. putida* KT2440 son los primeros que se describen implicados en la degradación aeróbica de NA, 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 *nic* en los diferentes grupos de bacterias podría ser un parámetro a considerar para estudiar lo extendida que está la capacidad para degradar NA en los microorganismos.

Dentro del género *Pseudomonas*, el análisis de comparación de secuencias sólo permitió identificar genes ortólogos a los genes *nic* en la cepa *P. putida* F1 ([http://genome.jgi-psf.org/draft\\_microbes/psepu/psepu.home.html](http://genome.jgi-psf.org/draft_microbes/psepu/psepu.home.html)). Las dos cepas de *P. putida* analizadas (KT2440 y F1) poseen genes *nic* prácticamente idénticos (>95 % de identidad de secuencia) y no existen diferencias en la organización génica de los correspondientes operones *nic*. Es interesante destacar que los genes *nic* no se han identificado en ninguna otra cepa de *Pseudomonas* cuyo genoma es conocido en la

actualidad ([http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sutils/genom\\_table.cgi](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sutils/genom_table.cgi)). Así, no existen homólogos en ninguna de las cepas de *P. aeruginosa* (2192, C3719, PAO1 y UCBPP-PA14), *P. fluorescens* (Pf-5 y PfO-1) y *P. syringae* (pv. *phaseolicola* 1448A, pv. *syringae* B728a y pv. *tomato* str. DC3000) analizadas. Cuando se comprobó la capacidad de utilizar NA como única fuente de carbono en distintas cepas de *Pseudomonas*, las cepas *P. fluorescens* R2f, *P. aeruginosa* PG201, *P. stutzeri* DK301, *Pseudomonas* sp. Y2, *Pseudomonas* sp. B13Rif, *Pseudomonas* sp. DSM6412 y *Pseudomonas* sp. MT14 (Tabla 5), no mostraron crecimiento (apartado 2.3 de los Resultados), mientras que las cepas *P. putida* U y *P. putida* F1 (Tabla 5), sí fueron capaces de emplear el NA como única fuente de carbono y energía. Otras cepas del género *Pseudomonas* que tradicionalmente se refieren en la literatura como bacterias degradadoras del NA, *P. ovalis* (Jones y Hughes, 1972) y *P. convexa* (Thacker *et al.*, 1978), en la actualidad se han reclasificado como pertenecientes a la especie *P. putida*. Todos estos resultados sugieren que dentro del género *Pseudomonas* la degradación de NA es una característica distintiva de *P. putida*. La única excepción hasta la fecha la constituye la cepa degradadora de NA *P. fluorescens* TN5 (Hurh *et al.*, 1994b). Dado que no se dispone de la secuencia del gen *16SrDNA* de esta cepa, no se puede descartar que, en realidad, pertenezca a la especie *P. putida*. De hecho, la propia *P. putida* N9 en la que se caracterizó la bioquímica de la ruta del NA se clasificó inicialmente como *P. fluorescens* (Behrman y Stanier, 1957) y posteriormente como *P. putida* (Gauthier y Rittenberg, 1971a). En esta tesis se ha determinado la secuencia del gen *16SrDNA* de la cepa N9 y se ha confirmado que es 99% idéntica a la de *P. putida* KT2440, lo que de nuevo confirma la clasificación de la cepa N9 dentro de la especie *P. putida*. Los estudios metabólicos clásicos realizados con más de 260 cepas pertenecientes, en su mayoría, al género *Pseudomonas* revelaron que tan sólo las cepas de *P. putida* (biotipo A) eran capaces de utilizar NA como fuente de carbono, con la única excepción de 7 cepas del biotipo G de *P. fluorescens* que sí mostraron crecimiento en NA (Stanier *et al.*, 1966). Dado que el biotipo G está formado por cepas que presentan características nutricionales atípicas para *P. fluorescens*, y que ninguna de ellas se ha caracterizado con criterios modernos de taxonomía molecular tales como el análisis del gen *16SrDNA*, hibridación DNA-DNA, etc., no se puede descartar que dichas cepas no sean realmente *P. putida* o que ni siquiera sean *Pseudomonas*, un género que ha sufrido grandes reorganizaciones taxonómicas a lo largo de los últimos años (Palleroni y Moore, 2004). Otra

posibilidad es que dichas cepas de *P. fluorescens* hayan adquirido un plásmido que codifique la capacidad de degradar NA, como ocurre con el plásmido NIC aislado de la cepa 1 de *P. convexa* (actualmente *P. putida*) y que permite la transferencia de la capacidad de degradar nicotina y NA a otras cepas de *Pseudomonas* (Thacker *et al.*, 1978). No obstante, el contenido en G+C del agrupamiento *nic* de *P. putida* KT2440 es del 63.1%, próximo al contenido G+C promedio (63%) de la cepa (Nelson *et al.*, 2002), lo que sugiere que el *cluster nic* ha permanecido durante largo tiempo en el cromosoma de la bacteria. Tampoco existen elementos móviles como transposasas en las proximidades de los genes *nic*, por lo que cabe descartar su adquisición reciente. La existencia de la secuencia REP (Houghton *et al.*, 1995; Aranda-Olmedo *et al.*, 2002) en la región intergénica *nicR-nicA* (Fig. 71) podría estar relacionada con la regulación diferencial que se ha observado para los genes *nicAB* (ver apartado 3).



**Figura 71. Comparación de los clusters *nic* en diferentes bacterias.** Los genes se representan mediante flechas con el siguiente código: en negro, genes reguladores; con rayado diagonal, genes de transporte; en verde, genes que codifican la NA hidroxilasa; en azul, genes que codifican la 6HNA monooxigenasa; en rojo, genes que codifican la 2,5-DHP dioxigenasa; en amarillo, genes catabólicos implicados en la degradación del intermediario alifático (ácido *N*-formilmaleámico). Las puntas de flecha indican secuencias REP de *P. putida*. Debajo de cada gen se indica el número de acceso en la anotación de su genoma, así como el porcentaje de identidad en secuencia de aminoácidos entre el producto del gen y el producto equivalente en *P. putida* KT2440. Los genes que codifican el presunto transportador ABC de *Bordetella* no tienen homólogos en otros clusters *nic*. Los números de acceso de las secuencias analizadas son: *Bordetella pertussis* Tohamal (NC\_002929), *Bordetella parapertussis* (NC\_002928); *Bordetella bronchiseptica* RB50 (NC\_002927); *Burkholderia cenocepacia* PC184 (AAKX01000106); *Ralstonia eutropha* JMP134 (NC\_007347); *P. putida* KT2440 (NC\_002947).

Fuera del género *Pseudomonas*, el análisis de comparación de secuencias sólo permitió identificar genes ortólogos a los genes *nic* en las  $\beta$ -proteobacterias *Bordetella*, *Burkholderia* y *Ralstonia*. Sin embargo, los *clusters nic* identificados en estas  $\beta$ -proteobacterias poseen una organización génica similar entre sí y distinta a la de los *clusters nic* de *Pseudomonas* (Fig. 70). Así, destaca el hecho de que en las  $\beta$ -proteobacterias el gen *nicB* se presenta como dos genes independientes, *nicB2* y *nicB1*, que codifican dos proteínas que muestran una similitud significativa con los primeros 740 y los últimos 480 aminoácidos de la proteína NicB de *Pseudomonas*, respectivamente. Esta observación sugiere que la subunidad NicB de la nicotinato hidroxilasa posee una estructura modular consistente en dos dominios que, en las  $\beta$ -proteobacterias, constituyen dos proteínas independientes. Según se comentó en el apartado 2.1, el dominio N-terminal de NicB (y por lo tanto NicB2) estaría implicado en la unión del cofactor MCD y los centros [Fe-S], mientras que el dominio C-terminal de NicB (y por lo tanto, NicB1) posee similitud con citocromos *c* y estaría implicado en el final de la cadena de transferencia de electrones a la molécula aceptora. Si bien el gen *nicB1* aparece asociado al gen *nicA* y al gen *nicC*, el gen *nicB2* está asociado al resto de los genes *nic* en  $\beta$ -proteobacterias. Si la proteína NicB evolucionó hacia la separación de sus dos dominios como dos proteínas independientes (situación que se observa en  $\beta$ -proteobacterias) o si éstas evolucionaron hacia su fusión en una única proteína (situación que se observa en *Pseudomonas*) no se conoce, pero podría pensarse que la fusión de los dos dominios en un único polipéptido y bajo la misma regulación transcripcional podría permitir una más eficaz actividad hidroxilasa. El gen *nicX*, que se transcribe de forma independiente al resto de los genes catabólicos *nic* en *Pseudomonas*, parece formar parte del operón *nicEDXF* en  $\beta$ -proteobacterias, una organización que está de acuerdo con el hecho de que el producto del gen *nicX* constituya, junto con los productos génicos *nicEDF*, la maquinaria enzimática de la ruta central de la 2,5-DHP (Fig. 13). Al igual que ocurre en *Pseudomonas*, el presunto transportador de NA (y/o algún otro metabolito de la ruta) en *B. cenocepacia* y *R. eutropha* estará codificado por el gen *nicT*, mientras que en las bacterias del género *Bordetella* analizadas la entrada de NA estaría mediada por un sistema de transporte de tipo ABC (Holland y Blight, 1999). Tan sólo se ha detectado la existencia de una porina (*nicP*) en el cluster *nic* de *Pseudomonas*. En todos los *clusters nic* analizados se ha identificado un presunto regulador transcripcional, gen *nicR*, que pertenece a la familia de



reguladores MarR, detectándose en *R. eutropha* un segundo gen regulador que codifica una presunta proteína reguladora de la familia TetR (Fig. 71).

El contenido G+C de los genes *nic* de las cepas de *Bordetella*, *Burkholderia* y *Ralstonia* es similar al valor G+C promedio del genoma de dichas cepas, lo que sugiere que no han sido adquiridos recientemente sino que forman parte del acervo genético de estos microorganismos durante un largo período evolutivo. Dado que las plantas son la fuente principal de NA y éste es frecuente en el medio ambiente, no resulta difícil explicarse la existencia de la ruta *nic* en bacterias que habitan la rizosfera de las plantas y/o que son frecuentes en suelos y aguas, como ocurre con *P. putida*, *Burkholderia* o *Ralstonia*. Además, la capacidad de utilizar NA como fuente de carbono por distintas cepas de *Burkholderia* (antiguo grupo *Pseudomallei*) y *Ralstonia* (antiguo grupo *Alcaligenes*) ya había sido descrita (Stanier *et al.*, 1966). Sin embargo, la existencia del cluster *nic* en el género *Bordetella* era, a priori, más difícil de esperar. Las bacterias del género *Bordetella* son microorganismos patógenos capaces de colonizar el tracto respiratorio de mamíferos y requieren NA y nicotinamida como suplemento nutricional para su crecimiento en medio líquido (Goodnow, 1980; Schneider y Parker, 1982). Se ha descrito que *B. pertussis* es capaz de consumir el NA de un medio de cultivo (McPheat y Wardlaw, 1982), aunque no se ha descrito la mineralización de éste y tampoco se conoce el mecanismo que utiliza *Bordetella* para metabolizarlo. Sin embargo, sí se ha estudiado en detalle el efecto del NA como modulador de la patogenicidad de la bacteria *in vitro* (McPheat *et al.*, 1983; Melton y Weiss, 1989, 1993). Cuando el microorganismo se cultiva en presencia de altas concentraciones de NA se observan cambios fenotípicos que llevan a la disminución de la capacidad infectiva de la bacteria (McPheat *et al.*, 1983). El mecanismo de regulación inducido por el NA se conoce en detalle y afecta a distintos operones relacionados con la virulencia de la bacteria (Hot *et al.*, 2003), aunque se desconoce cuáles son los determinantes de estos mecanismos *in vivo*. La presencia de los genes *nic* en el genoma de distintas especies del género *Bordetella* permite, por primera vez, dar una explicación molecular a la capacidad que tienen estas bacterias de metabolizar NA, y sugiere la mineralización completa de este compuesto *N*-heteroaromático que estará presente en el suplemento vitamínico del organismo huésped. La presencia de los genes *nic* en los cromosomas de las bacterias del género *Bordetella* podría estar relacionada con el mantenimiento de los niveles de NA que regulan el fenotipo

infectivo de estos microorganismos, una hipótesis que, por supuesto, requiere confirmación experimental. La participación de elementos génicos relacionados con procesos metabólicos de bacterias saprofitas, en procesos relacionados con la virulencia de bacterias patógenas no es un mecanismo infrecuente en la naturaleza, y está íntimamente relacionado con el modo de vida y los nichos ecológicos de los microorganismos. En ese sentido, se han descrito ejemplos en la literatura en los que regulones implicados en la resistencia a estrés producido por frío en la propia *P. putida* KT2440, como los controlados por BipA y PhoPQ, son los responsables de la activación de factores de virulencia en enterobacterias patógenas pertenecientes al género *Salmonella* o *Bordetella* (Reva *et al.*, 2006).

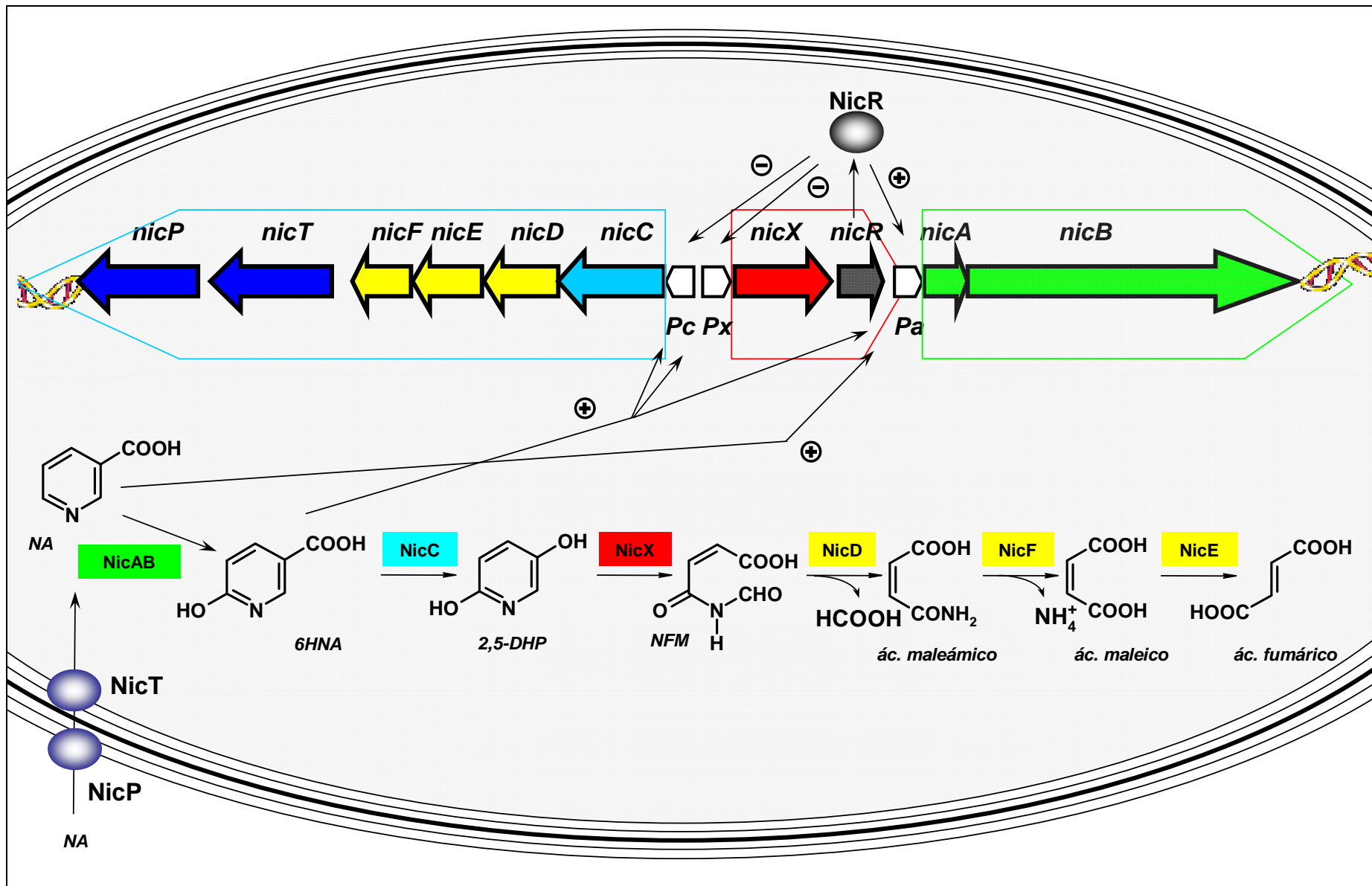
La posibilidad de que el *cluster nic* típico de bacterias del suelo haya podido ser transferido a bacterias patógenas de animales superiores, tales como *Bordetella*, a través de organismos patógenos oportunistas que habitan ambos ambientes, como *B. cenocepacia*, es totalmente plausible. En este sentido, el *cluster nic* de *B. pertussis* contiene una transposasa de secuencias de inserción IS481 (BP1947) entre los genes *nicR* (BP1946) y el primer gen que codifica el el transportador de tipo ABC (BP1948), además de otra para secuencias IS1663 (BP1959) entre los genes *nicF* (BP1958) y *nicB2* (BP1960), lo que sugiere la existencia de reordenamientos génicos y, probablemente, un origen evolutivo basado en sucesos de transferencia horizontal.

No obstante, y como se indicó en el apartado 4 de la Introducción, se han descrito microorganismos que degradan NA a través de una ruta catabólica distinta a la ruta *nic*, como ocurre en *B. niacini*, *A. caulinodans* y *E. barkeri*. Por lo tanto, los resultados de comparación de secuencias utilizando las proteínas Nic como marcadores de ruta de degradación de NA sólo reflejan una parte del potencial que tienen las bacterias para degradar este compuesto heterocíclico.

Como resumen de los estudios realizados sobre el catabolismo del NA en *P. putida* KT2440, se puede concluir que los genes *nic* son los primeros identificados en bacterias responsables de la degradación de este derivado de la piridina. El catabolismo del NA comprende una ruta consta de una ruta periférica en la que se dan dos hidroxilaciones sucesivas, la primera de ellas es la conversión de NA en 6HNA y se encuentra catalizada por el producto de los genes *nicAB*, una molibdohidroxilasa con una arquitectura muy peculiar. La segunda hidroxilación está catalizada por la monooxigenasa (flavoproteína) NicC que

convierte el 6HNA en 2,5-DHP, el intermediario central de la ruta. En una siguiente etapa, la 2,5-DHP pierde su aromaticidad después de la catálisis mediada por la dioxigenasa NicX, el primer miembro de una nueva familia de extradiol dioxigenasas y el compuesto alifático resultante, el ácido *N*-formilmaleámico es desformilado por la acción de NicD, generando ácido maleámico. Los productos de los genes *nicF* y *nicD* catalizan la hidrólisis del enlace amida del ácido maleámico generando ácido maleico y amonio, y la isomerización del ácido maleico en ácido fumárico, respectivamente. Los genes que codifican la ruta se encuentran agrupados en tres operones, *nicAB*, que es inducido por NA y 6HNA, y los operones *nicXR* y *nicCDEFTP*, que son inducidos por 6HNA. El gen *nicR* codifica un regulador transcripcional de la familia de reguladores MarR, y se encuentra implicado en la represión de los operones *nicXR* y *nicCDEFTP*, mientras que participa en la activación del operón *nicAB* (Fig. 72). Además de los conocimientos generados en este trabajo sobre aspectos básicos del catabolismo de compuestos *N*-heteroaromáticos y, en general, del metabolismo bacteriano de compuestos aromáticos, la ruta *nic* caracterizada tiene importantes aplicaciones biotecnológicas. Así, aunque el NA no es un compuesto contaminante sería posible expandir el potencial catabólico de esta ruta mediante la inclusión de genes que permitan la conversión de otros derivados de la piridina y alcaloides hasta 2,5-DHP. Además, algunos de los metabolitos generados en la degradación del NA son de gran interés biotecnológico ya que se pueden emplear como bloques de síntesis de otras moléculas más complejas, tales como insecticidas o agentes antitumorales. Varias de las actividades enzimáticas de la ruta *nic* resultan de gran interés industrial ya que constituyen una forma eficaz y regioselectiva de obtención de derivados de la piridina. Finalmente, el conocimiento de los elementos reguladores de la ruta *nic* podría tener también gran interés en el estudio de la respuesta de virulencia condicionada por los niveles de NA en ciertas bacterias patógenas como *Bordetella*.





---

**Figura 71. Resumen de los resultados obtenidos en la caracterización molecular de los genes *nic* responsables del metabolismo del NA en *P. putida* KT2440.** En la figura se muestra la organización de los genes *nic* con el siguiente código de colores: en verde, los genes que codifican la NA hidroxilasa (*nicAB*); en azul, el gen que codifica la 6HNA monooxigenasa (*nicC*); en rojo, el gen que codifica la 2,5-DHP dioxigenasa (*nicX*); en amarillo, el resto de genes catabólicos (*nicD*, *nicE* y *nicF*); en negro, el gen que codifica el regulador transcripcional (*nicR*) y en azul oscuro, los genes que codifican el sistema de transporte (*nicT* y *nicP*). También se muestran los promotores caracterizados *Pa*, *Pc* y *Px*, el control transcripcional ejercido por el regulador NicR sobre los distintos operones, y la respuesta de éstos a los inductores de la ruta NA y 6HNA. Los signos (+) indican activación/inducción de la expresión génica, mientras que los signos (-) indican represión. Los genes que se transcriben en un mismo operón aparecen englobados en una misma flecha: en verde se muestra el operón *nicAB*, en azul, el operón *nicCDEFTP* y en rojo, el operón *nicXR*. También se muestran las distintas etapas enzimáticas de la ruta y el hipotético mecanismo de transporte del NA desde el exterior celular al citoplasma de la bacteria.

## **VI CONCLUSIONES**





## VI CONCLUSIONES

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

1. El genoma de *P. putida* KT2440 codifica al menos cinco rutas centrales de catabolismo de derivados bencénicos, *i.e.*, la rama del protocatecuato (genes *pca*) y del catecol (genes *cat*) de la ruta del  $\beta$ -ceto adipato, la del fenilacetato (genes *pha*), homogentisato (genes *hmg*) y galato (genes *gal*), así como los de las rutas periféricas para la degradación de benzoato (genes *ben*), *p*-hidroxibenzoato (genes *pob*), quinato (genes *qui*), compuestos fenilpropenoides (genes *fcs*, *ech*, *vdh*, *cal*, *van*, *acd*, y *acs*), fenilalanina/tirosina, (genes *phh*, *tyr* y *hpd*), fenilacetaldehído (gen *pad*) y fenilalcanoatos (genes *fad*), que convergen en las correspondiente rutas centrales. Los diferentes agrupamientos génicos no constituyen islas catabólicas en el genoma de la bacteria, tienen un contenido G+C típico de *P. putida* y muchos de ellos van asociados a secuencias REP.

2. El genoma de *P. putida* KT2440 codifica la ruta de degradación del ácido nicotínico (NA) siendo la primera que se describe a nivel genético en un organismo. Los genes *nic* pueden conferir la capacidad de degradar NA a otras cepas de *Pseudomonas* incapaces de utilizar NA como fuente de carbono.

3. Los genes *nicAB* codifican la nicotinato hidroxilasa que cataliza la primera etapa de la ruta de degradación de NA con la formación del ácido 6-hidroxinicotínico (6HNA). La enzima de dos componentes NicAB es la primera de estructura primaria conocida capaz de hidroxilar NA. Pertenece a la familia de las molibdeno hidroxilasas pero, a diferencia del resto de proteínas de esta familia la subunidad NicB cuenta con un dominio adicional de tipo citocromo c. La actividad NA hidroxilasa puede ser utilizada para diseñar biocatalizadores para la producción de 6HNA, un importante precursor en la síntesis de insecticidas.

4. El gen *nicC* codifica la 6HNA monooxigenasa, una flavoproteína que cataliza la descarboxilación oxidativa del 6HNA generando el metabolito central 2,5-dihidroxipiridina (2,5-DHP).

5. El gen *nicX* codifica una dioxigenasa que convierte la 2,5-DHP en ácido *N*-formilmaleámico, siendo la primera extradiol dioxigenasa de estructura primaria conocida que se describe en degradación de compuestos derivados de la piridina. NicX representa el primer miembro de una nueva familia de extradiol dioxigenasas con un plegamiento claramente diferente al del resto de las extradiol dioxigenasas caracterizadas y cuya tríada facial de interacción con Fe (II) habría evolucionado a partir del centro activo de ciertas metaloproteasas tales como las aminopeptidasas de la familia MQ.

6. El gen *nicD* codifica la *N*-formilmaleámico desformilasa que genera ácido maleámico y fórmico en la ruta de degradación de NA. NicD constituye la primera desformilasa que se describe perteneciente a la superfamilia de proteínas  $\alpha/\beta$ -hidrolasas.

7. Los genes *nicF* y *nicE* codifican las dos últimas actividades enzimáticas de la ruta de degradación de NA, es decir, la transformación de ácido maleámico en maleico (con liberación de amonio) y la isomerización de éste a ácido fumárico, respectivamente. Los genes *nicT* y *nicP* codifican un presunto transportador de la familia MFS y una porina, respectivamente, que estarán implicados en el transporte de metabolitos de la ruta.

8. Los genes *nic* se encuentran organizados en tres operones, *nicAB*, *nicXR* y *nicCDEFTP*, inducibles en presencia de 6HNA. El operón *nicAB* es inducible también por NA. En condiciones de no inducción, los genes *nicR* y *nicTP* se expresan también constitutivamente.

9. El producto del gen *nicR*, un regulador transcripcional de la familia de proteínas MarR, está implicado en la represión (en ausencia de inductor) de los operones *nicXR* y *nicCDEFTP* así como en la activación (en presencia de inductor) del operón *nicAB*.

10. Los genes *nic* parecen ser específicos de *P. putida* ya que no se han detectado en otras especies de *Pseudomonas*. La existencia de ortólogos de los genes *nic* en distintas cepas de *Bordetella* sugiere la posibilidad de que la ruta *nic* se haya podido originar en bacterias típicas de suelo para obtener carbono y nitrógeno a partir de NA, y luego haya sido transferida a otros organismos con diferentes estilos de vida y en los que la verdadera función de la degradación de NA todavía no es conocida.



## **VII BIBLIOGRAFÍA**



## VII BIBLIOGRAFÍA

- Alam, K.Y. y Clark, D.P. (1991) Molecular cloning and sequence of the *thdF* gene, which is involved in thiophene and furan oxidation by *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **173**: 6018-6024.
- Alder, E. (1977) Lignin chemistry-past, present and future. *Wood. Sci. Technol.* **11**: 169-218.
- Alekshun, M.N. y Levy, S.B. (1999) Characterization of MarR superrepressor mutants. *J. Bacteriol.* **181**: 3303-3306.
- Alekshun, M.N., Levy, S.B., Mealy, T.R., Seaton, B.A. y Head, J.F. (2001) The crystal structure of MarR, a regulator of multiple antibiotic resistance, at 2.3 Å resolution. *Nat. Struct. Biol.* **8**: 710-714.
- Alonso, S., Bartolomé-Martín, D., del Álamo, M., Díaz, E., García, J.L. y Perera, J. (2003) Genetic characterization of the styrene lower catabolic pathway of *Pseudomonas* sp. strain Y2. *Gene* **319**: 71-83.
- Altschul, S., Madden, T., Schaffer, A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. y Lipman, D. (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucl. Acids Res.* **25**: 3389-3402.
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Meyers, E.W. y Lipman, D.J. (1990) Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* **215**: 403-410.
- Amrani, L., Cecchetto, G., Scazzocchio, C. y Glatigny, A. (1999) The *hxB* gene, necessary for the post-translational activation of purine hydroxylases in *Aspergillus nidulans*, is independently controlled by the purine utilization and the nicotinate utilization transcriptional activating systems. *Mol. Microbiol.* **31**: 1065-1073.
- Andersen, S., Johnsen, K., Sorensen, J., Nielsen, P. y Jacobsen, C. (2000) *Pseudomonas frederiksbergensis* sp. nov., isolated from soil at a coal gasification site. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **50**: 1957-1964.
- Aranda-Olmedo, I., Tobes, R., Manzanera, M., Ramos, J.L. y Marqués, S. (2002) Species-specific repetitive extragenic palindromic (REP) sequences in *Pseudomonas putida*. *Nucl. Acids Res.* **30**: 1826-1833.
- Aranda-Olmedo, I., Ramos, J.L. y Marqués, S. (2005) Integration of signals through Crc and PtsN in catabolite repression of *Pseudomonas putida* TOL plasmid pWW0. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**: 4191-4198.
- 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-Barrau, E., Sandoval, A., Naharro, G., Olivera, E.R. y Luengo, J.M. (2005) A two-component hydroxylase involved in the assimilation of 3-hydroxyphenyl acetate in *Pseudomonas putida*. *J. Biol. Chem.* **280**: 26435-26447.
- Arunachalam, U., Massey, V. y Vaidyanathan, C. (1992) *p*-Hydroxyphenylacetate-3-hydroxylase. A two-protein component enzyme. *J. Biol. Chem.* **267**: 25848-25855.
- Arunachalam, U. y Massey, V. (1994) Studies on the oxidative half-reaction of *p*-hydroxyphenylacetate 3-hydroxylase. *J. Biol. Chem.* **269**: 11795-11801.
- Arunachalam, U., Massey, V. y Miller, S. (1994) Mechanism of *p*-hydroxyphenylacetate-3-hydroxylase. A two-protein enzyme. *J. Biol. Chem.* **269**: 150-155.

- Assinder, S.J. y Williams, P.A. (1990) The TOL plasmids: Determinants of the catabolism of toluene and the xylenes. *Adv. Microbiol. Physiol.* **31**: 1-69.
- Asturias, J., Eltis, L., Prucha, M. y Timmis, K. (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.
- Baitsch, D., Sandu, C., Brandsch, R. e Igloi, G.L. (2001) Gene cluster on pAO1 of *Arthrobacter nicotinovorans* involved in degradation of the plant alkaloid nicotine: cloning, purification, and characterization of 2,6-dihydroxypyridine 3-hydroxylase. *J. Bacteriol.* **183**: 5262-5267.
- Barragán, M.J.L., Carmona, M., Zamorro, M.T., Thiele, B., Boll, M., Fuchs, G., García, J.L. y Díaz, 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.
- Bates, P.A., Kelley, L.A., MacCallum, R.M. y Sternberg, M.J.E. (2001) Enhancement of protein modeling by human intervention in applying the automatic programs 3D-JIGSAW and 3D-PSSM. *Proteins.* **45**: 39-46.
- Batie, C., LaHaie, E. y Ballou, D. (1987) Purification and characterization of phthalate oxygenase and phthalate oxygenase reductase from *Pseudomonas cepacia*. *J. Biol. Chem.* **262**: 1510-1518.
- Batie, C.J., Ballou, D.P. y Correll, C.J. (1991) Phthalate dioxygenase reductase and related flavin-iron-sulfur containing electron transferases. In *Chemistry and biochemistry of flavoenzymes*. Muller, F. (ed). Boca Raton, Fla: CRC Press, pp. 544-554.
- 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, G. y Lingens, F. (1992) Microbial metabolism of quinoline and related compounds. XV. Quinoline-4-carboxylic acid oxidoreductase from *Agrobacterium* spec.1B: a molybdenum-containing enzyme. *Biol. Chem. Hoppe Seyler.* **363**: 699-705.
- Bauer, I., Max, N., Fetzner, S. y Lingens, F. (1996) 2,4-dioxygenases catalyzing N-heterocyclic-ring cleavage and formation of carbon monoxide. Purification and some properties of 1H-3-hydroxy-4-oxoquinoline 2,4-dioxygenase from *Arthrobacter* sp. Ru61a and comparison with 1H-3-hydroxy-4-oxoquinoline 2,4-dioxygenase from *Pseudomonas putida* 33/1. *Eur. J. Biochem.* **240**: 576-583.
- Bayley, S.A., Duggleby, C.J., Worsey, M.J., Williams, P.A., Hardy, K.G. y Broda, P. (1977) Two modes of loss of the Tol function from *Pseudomonas putida* mt-2. *Mol. Gen. Genet.* **154**: 203-204.
- Behrman, E.J. y Stanier, R.Y. (1957) The bacterial oxidation of nicotinic acid. *J. Biol. Chem.* **228**: 923-945.
- Behrman, E.J. (1976) The bacterial oxidation of nicotinic acid. *Arch. Microbiol.* **110**: 87-90.
- Bertani, I., Kojic, M. y Venturi, V. (2001) Regulation of the *p*-hydroxybenzoic acid hydroxylase gene (*pobA*) in plant-growth-promoting *Pseudomonas putida* WCS358. *Microbiology* **147**: 1611-1620.
- Blaschke, M., Kretzer, A., Schäfer, C., Nagel, M. y Andreesen, J.R. (1991) Molybdenum-dependent degradation of quinoline by *Pseudomonas putida* Chin IK and other aerobic bacteria. *Arch. Microbiol.* **155**: 164-169.



- Blase, M., Bruntner, C., Tshisuaka, B., Fetzner, S. y Lingens, F. (1996) Cloning, expression, and sequence analysis of the three genes encoding quinoline 2-oxidoreductase, a molybdenum-containing hydroxylase from *Pseudomonas putida* 86. *J. Biol. Chem.* **271**: 23068-23079.
- Boll, M. y Fuchs, G. (1995) Benzoyl-coenzyme A reductase (dearomatizing), a key enzyme of anaerobic aromatic metabolism. ATP dependence of the reaction, purification and some properties of the enzyme from *Thauera aromatica* strain K172. *Eur. J. Biochem.* **234**: 921-933.
- Bonin, I., Martins, B.M., Purvanov, V., Fetzner, S., Huber, R. y Dobbek, H. (2004) Active site geometry and substrate recognition of the molybdenum hydroxylase quinoline 2-oxidoreductase. *Structure* **12**: 1425-1435.
- Bosch, R., Moore, E.R.B., García-Valdés, E. y Pieper, D.H. (1999) NahW, a novel, inducible salicylate hydroxylase involved in mineralization of naphthalene by *Pseudomonas stutzeri* AN10. *J. Bacteriol.* **181**: 2315-2322.
- Bracey, M.H., Hanson, M.A., Masuda, K.R., Stevens, R.C. y Cravatt, B.F. (2002) Structural adaptations in a membrane enzyme that terminates endocannabinoid signaling. *Science* **298**: 1793-1796.
- Brandsch, R. (2006) Microbiology and biochemistry of nicotine degradation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **69**: 493-498.
- Bressler, D.C., Norman, J.A. y Fedorak, P.M. (1998) Ring cleavage of sulfur heterocycles: How does it happen? *Biodegradation* **8**: 297-311.
- 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  $\beta$ -ketoadipate pathway contributes to carbon source-dependent expression of the *Acinetobacter* sp. strain ADP1 *pobA* gene. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**: 1598-1606.
- Buchanan, G., Kuper, J., Mendel, R., Schwarz, G.N. y Palmer, T. (2001) Characterisation of the *mob* locus of *Rhodobacter sphaeroides* WS8: *mobA* is the only gene required for molybdopterin guanine dinucleotide synthesis. *Arch. Microbiol.* **176**: 62-68.
- Buckmiller, L.M., Lapointe, J.P. y Ludwig, R.A. (1991) Cloning of *Azorhizobium caulinodans* nicotinate catabolism genes and characterization of their importance in  $N_2$  fixation. *J. Bacteriol.* **173**: 2017-2025.
- Bugg, T.D. (1993) Overproduction, purification and properties of 2,3-dihydroxyphenylpropionate 1,2-dioxygenase from *Escherichia coli*. *Biochim. Biophys. Acta.* **1202**: 258-264.
- Bujnicki, J.M., Elofsson, A., Fischer, D. y Rychlewski, L. (2001) Structure prediction meta server. *Bioinformatics* **17**: 750-751.
- Bunz, P.V. y Cook, A.M. (1993) Dibenzofuran 4,4a-dioxygenase from *Sphingomonas* sp. strain RW1: angular dioxygenation by a three-component enzyme system. *J. Bacteriol.* **175**: 6467-6475.
- Butler, C.S. y Mason, J.R. (1997) Structure-function analysis of the bacterial aromatic ring-hydroxylating dioxygenases. *Adv. Microb. Physiol.* **38**: 47-84.
- Canne, C., Stephan, I., Finsterbusch, J., Lingens, F., Kappl, R., Fetzner, S. y J., H. (1997) Comparative EPR and redox studies of three prokaryotic enzymes of the xanthine oxidase family: quinoline 2-oxidoreductase, quinaldine 4-oxidase, and isoquinoline 1-oxidoreductase. *Biochemistry* **36**: 9780-9790.
- Canne, C., Lowe, D.J., Fetzner, S., Adams, B., Smith, A.T., Kappl, R., Bray, R.C. y Huttermann, J. (1999) Kinetics and interactions of molybdenum and iron-sulfur

- centers in bacterial enzymes of the xanthine oxidase family: mechanistic implications. *Biochemistry* **38**: 14077-14087.
- Carl, B., Arnold, A., Hauer, B. y Fetzner, S. (2004) Sequence and transcriptional analysis of a gene cluster of *Pseudomonas putida* 86 involved in quinoline degradation. *Gene* **331**: 177-188.
- Carl, B., y Fetzner, S. (2005) Transcriptional activation of quinoline degradation operons of *Pseudomonas putida* 86 by the AraC/XylS-type regulator OxoS and cross-regulation of the PqorM promoter by XylS. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**: 8618-8626.
- Carmona, M. y Diaz, E. (2005) Iron-reducing bacteria unravel novel strategies for the anaerobic catabolism of aromatic compounds. *Mol. Microbiol.* **58**: 1210-1215.
- 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. *EMBO J.* **20**: 1-11.
- Cases, I. y de Lorenzo, V. (2005a) Promoters in the environment: Transcriptional regulation in its natural context. *Nat. Rev. Micro.* **3**: 105-118.
- Cases, I. y de Lorenzo, V. (2005b) Genetically modified organisms for the environment: stories of success and failure and what we have learned from them. *Int. Microbiol.* **8**: 213-222.
- Chaiyen, P., Ballou, D.P. y Massey, V. (1997) Gene cloning, sequence analysis, and expression of 2-methyl-3-hydroxypyridine-5-carboxylic acid oxygenase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **94**: 7233-7238.
- 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.
- Cheng, J., Randall, A.Z., Sweredoski, M.J. y Baldi, P. (2005) SCRATCH: a protein structure and structural feature prediction server. *Nucl. Acids Res.* **33**: W72-76.
- Chiribau, C.B., Sandu, C., Igloi, G.L. y Brandsch, R. (2005) Characterization of PmfR, the transcriptional activator of the pAO1-borne *purU-mabO-fold* operon of *Arthrobacter nicotinovorans*. *J. Bacteriol.* **187**: 3062-3070.
- Chung, Y.S., Lee, N.R., Cheon, C.L., Song, E.S., Lee, M.S., Kim, Y. y Min, K.H. (2001) Molecular cloning of the *nahG* gene encoding salicylate hydroxylase from *Pseudomonas fluorescens*. *Mol. Cells.* **11**: 105-109.
- Coates, J., Bhupathiraju, V., Achenbach, L., McInerney, M. y Lovley, D. (2001) *Geobacter hydrogenophilus*, *Geobacter chapellei* and *Geobacter grbiciae*, three new, strictly anaerobic, dissimilatory Fe(III)-reducers. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **51**: 581-588.
- Collaborative (1994) The CCP4 suite: programs for protein crystallography. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **50**: 760-763.
- Collier, L.S., Gaines, G.L., III y Neidle, E.L. (1998) Regulation of benzoate degradation in *Acinetobacter* sp. strain ADP1 by BenM, a LysR-type transcriptional activator. *J. Bacteriol.* **180**: 2493-2501.
- Coughlan, M.P., Mehra, R.K., Barber, M.J. y Siegel, L.M. (1984) Optical and electron paramagnetic resonance spectroscopic studies on purine hydroxylase II from *Aspergillus nidulans*. *Arch. Biochem. Biophys.* **229**: 596-603.

- Cowles, C.E., Nichols, N.N. y Harwood, C.S. (2000) BenR, a XylS homologue, regulates three different pathways of aromatic acid degradation in *Pseudomonas putida*. *J. Bacteriol.* **182**: 6339-6346.
- Cripps, R.E. (1973) The microbial metabolism of thiophen-2-carboxylate. *Biochem. J.* **134**: 353-366.
- Cuskey, S.M., Peccoraro, V. y Olsen, R.H. (1987) Initial catabolism of aromatic biogenic amines by *Pseudomonas aeruginosa* PAO: pathway description, mapping of mutations, and cloning of essential genes. *J. Bacteriol.* **169**: 2398-2404.
- D'Argenio, D.A., Segura, A., Coco, W.M., Bunz, P.V. y Ornston, L.N. (1999) The physiological contribution of *Acinetobacter* PcaK, a transport system that acts upon protocatechuate, can be masked by the overlapping specificity of VanK. *J. Bacteriol.* **181**: 3505-3515.
- Davis, J.K., He, Z., Somerville, C.C. y Spain, J.C. (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., Herrero, M., Jakubzik, U. y Timmis, K.N. (1990) Mini-Tn5 transposon derivatives for insertion mutagenesis, promoter probing, and chromosomal insertion of cloned DNA in gram-negative eubacteria. *J. Bacteriol.* **172**: 6568-6572.
- de Lorenzo, V. y Timmis, K.N. (1994) Analysis and construction of stable phenotypes in gram-negative bacteria with Tn5- and Tn10-derived minitransposons. *Methods Enzymol.* **235**: 386-405.
- Dehmel, U., Engesser, K.H., Timmis, K.N. y Dwyer, D.F. (1995) Cloning, nucleotide sequence, and expression of the gene encoding a novel dioxygenase involved in metabolism of carboxydiphenyl ethers in *Pseudomonas pseudoalcaligenes* POB310. *Arch. Microbiol.* **163**: 35-41.
- De Lano, W.L. (2002) The PyMOL Molecular graphics system. DeLano Scientific, San Carlos, CA.
- Denef, V.J., Park, J., Tsoi, T.V., Rouillard, J.-M., Zhang, H., Wibbenmeyer, J.A., Verstraete, W., Gulari, E., Hashsham, S.A. y Tiedje, J.M. (2004) Biphenyl and benzoate metabolism in a genomic context: outlining genome-wide metabolic networks in *Burkholderia xenovorans* LB400. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**: 4961-4970.
- Díaz, E. (2004) Bacterial degradation of aromatic pollutants: a paradigm of metabolic versatility. *Int. Microbiol.* **7**: 173-180.
- Díaz, E. y Prieto, M.A. (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.
- Dobbek, H., Gremer, L., Meyer, O. y Huber, R. (1999) Crystal structure and mechanism of CO dehydrogenase, a molybdo iron-sulfur flavoprotein containing S-selanyl cysteine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **96**: 8884-8889.
- Dorn, E., Hellwig, M., Reineke, W. y Knackmuss, H.-J. (1974) Isolation and characterization of a 3-chlorobenzoate degrading *Pseudomonads*. *Arch. Microbiol.* **99**: 61-70.

- Dos Santos, V.A., 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. *Environ. Microbiol.* **6**: 1264-1286.
- Du, X., Wang, W., Kim, R., Yakota, H., Nguyen, H. y Kim, S.-H. (2001) Crystal structure and mechanism of catalysis of a pyrazinamidase from *Pyrococcus horikoshii*. *Biochemistry* **40**: 14166-14172.
- Dunaway-Mariano, D. y Babbitt, P.C. (1994) On the origins and functions of the enzymes of the 4-chlorobenzoate to 4-hydroxybenzoate converting pathway. *Biodegradation* **5**: 259-276.
- 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.
- Durham, D.R. y Perry, J.J. (1978) Purification and characterization of a heme-containing amine dehydrogenase from *Pseudomonas putida*. *J. Bacteriol.* **134**: 837-843.
- Eaton, R. (1997) *p*-Cymene catabolic pathway in *Pseudomonas putida* F1: cloning and characterization of DNA encoding conversion of *p*-cymene to *p*-cumate. *J. Bacteriol.* **179**: 3171-3180.
- Eaton, R.W. (2001) Plasmid-encoded phthalate catabolic pathway in *Arthrobacter keyseri* 12B. *J. Bacteriol.* **183**: 3689-3703.
- Egland, P.G. y Harwood, C.S. (1999) BadR, a new MarR family member, regulates anaerobic benzoate degradation by *Rhodopseudomonas palustris* in concert with AadR, an Fnr family member. *J. Bacteriol.* **181**: 2102-2109.
- Elsemore, D. y Ornston, L. (1995) Unusual ancestry of dehydratases associated with quinate catabolism in *Acinetobacter calcoaceticus*. *J. Bacteriol.* **177**: 5971-5978.
- Enroth, C., Eger, B.T., Okamoto, K., Nishino, T., Nishino, T. y Pai, E.F. (2000) Crystal structures of bovine milk xanthine dehydrogenase and xanthine oxidase: Structure-based mechanism of conversion. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **97**: 10723-10728.
- Ensign, J.C. y Rittenberg, S.C. (1964) The pathway of nicotinic acid oxidation by a *Bacillus* species. *J. Biol. Chem.* **239**: 2285-2291.
- Ensley, B.D. y Gibson, D.T. (1983) Naphthalene dioxygenase: purification and properties of a terminal oxygenase component. *J. Bacteriol.* **155**: 505-511.
- Ensley, B.D. y Haigler, B.E. (1990) Naphthalene dioxygenase from *Pseudomonas* NCIB 9816. *Methods Enzymol.* **188**: 46-52.
- Entsch, B. y van Berkel, W. (1995) Structure and mechanism of *p*-hydroxybenzoate hydroxylase. *FASEB J.* **9**: 476-483.
- Eppink, M., Boeren, S., Vervoort, J. y van Berkel, W. (1997) Purification and properties of 4-hydroxybenzoate 1-hydroxylase (decarboxylating), a novel flavin adenine dinucleotide-dependent monooxygenase from *Candida parapsilosis* CBS604. *J. Bacteriol.* **179**: 6680-6687.
- 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.
- Eulberg, D., Lakner, S., Golovleva, L.A. y Schlomann, M. (1998) Characterization of a protocatechuate catabolic gene cluster from *Rhodococcus opacus* 1CP: Evidence for

- a merged enzyme with 4-carboxymuconolactone-decarboxylating and 3-oxoadipate enol-lactone-hydrolyzing activity. *J. Bacteriol.* **180**: 1072-1081.
- Federal Register, 1982. Appendix E. Certified host-vector systems. Fed. Regist. **47**:17197.
- Fernández-Cañón, J.M. y Peñalva, M.A. (1998) Characterization of a fungal maleylacetoacetate isomerase gene and identification of its human homologue. *J. Biol. Chem.* **273**: 329-337.
- 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 (2002) Oxygenases without requirement for cofactors or metal ions. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **60**: 243-257.
- Fetzner, S. (1998) Bacterial degradation of pyridine, indole, quinoline, and their derivatives under different redox conditions. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **49**: 237-250.
- 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. y Lingens, F. (1993) Microbial metabolism of quinoline and related compounds. XVIII. Purification and some properties of the molybdenum- and iron-containing quinaldic acid 4-oxidoreductase from *Serratia marcescens* 2CC-1. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler.* **374**: 363-376.
- Fitzpatrick, P.F. (1999) Tetrahydropterin-dependent amino acid hydroxylases. *Annu. Rev. Biochem.* **68**: 355-381.
- Franklin, F.C., Bagdasarian, M., Bagdasarian, M.M. y Timmis, K.N. (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. U.S.A.* **78**: 7458-7462.
- Fraee, R.W., Livingston, D.M., LaPorte, D.C. y Lipscomb, J.D. (1993) Cloning, sequencing, and expression of the *Pseudomonas putida* protocatechuate 3,4-dioxygenase genes. *J. Bacteriol.* **175**: 6194-6202.
- Frerichs-Deeken, U., Goldenstedt, B., Gahl-Janssen, R., Kappl, R., Huttermann, J. y Fetzner, S. (2003) Functional expression of the quinoline 2-oxidoreductase genes (*qorMSL*) in *Pseudomonas putida* KT2440 pUF1 and in *P. putida* 86  $\Delta$ *qor* pUF1 and analysis of the Qor proteins. *Eur. J. Biochem.* **270**: 1567-1577.
- Frerichs-Deeken, U., Rangelova, K., Kappl, R., Huttermann, J. y Fetzner, S. (2004) Dioxygenases without requirement for cofactors and their chemical model reaction: compulsory order ternary complex mechanism of 1*H*-3-hydroxy-4-oxoquinaldine 2,4-dioxygenase involving general base catalysis by histidine 251 and single-electron oxidation of the substrate dianion. *Biochemistry* **43**: 14485-14499.
- 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 1*H*-3-hydroxy-4-oxoquinaldine 2,4-dioxygenase. *Curr. Microbiol.* **51**: 344-352.
- Fukumori, F. y Hausinger, R. (1993) Purification and characterization of 2,4-dichlorophenoxyacetate/alpha-ketoglutarate dioxygenase. *J. Biol. Chem.* **268**: 24311-24317.

- Galán, B., Díaz, E. y García, J.L. (2000a) Enhancing desulphurization by engineering a flavin reductase-encoding gene cassette in recombinant biocatalysts. *Environ. Microbiol.* **2**: 687-694.
- Galán, B., Díaz, E., Prieto, M.A. y García, J.L. (2000b) Functional analysis of the small component of the 4-hydroxyphenylacetate 3-monooxygenase of *Escherichia coli* W: a prototype of a new flavin:NAD(P)H reductase subfamily. *J. Bacteriol.* **182**: 627-636.
- Galán, B., Kolb, A., Sanz, J.M., García, J.L. y Prieto, M.A. (2003) Molecular determinants of the *hpa* regulatory system of *Escherichia coli*: the HpaR repressor. *Nucl. Acids Res.* **31**: 6598-6609.
- García, B., Olivera, E.R., Miñambres, B., Fernández-Valverde, M., Canedo, L.M., Prieto, M.A., García, J.L., Martínez, M. y Luengo, J.M. (1999) Novel biodegradable aromatic plastics from a bacterial source. Genetic and biochemical studies on a route of the phenylacetyl-CoA catabolon. *J. Biol. Chem.* **274**: 29228-29241.
- García-González, V., Govantes, F., Porrúa, O. y Santero, E. (2005) Regulation of the *Pseudomonas* sp. strain ADP cyanuric acid degradation operon. *J. Bacteriol.* **187**: 155-167.
- Garrett, R. y Rajagopalan, K. (1994) Molecular cloning of rat liver sulfite oxidase. Expression of a eukaryotic Mo-pterin-containing enzyme in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **269**: 272-276.
- Gasson, M.J., Kitamura, Y., McLauchlan, W.R., Narbad, A., Parr, A.J., Parsons, E.L.H., Payne, J., Rhodes, M.J.C. y Walton, N.J. (1998) Metabolism of ferulic acid to vanillin. A bacterial gene of the enoyl-SCoA hydratase/isomerase superfamily encodes an enzyme for the hydration and cleavage of an hydroxycinnamic acid SCoA thioester. *J. Biol. Chem.* **273**: 4163-4170.
- Gauthier, J.J. y Rittenberg, S.C. (1971a) The metabolism of nicotinic acid. I. Purification and properties of 2,5-dihydroxypyridine oxygenase from *Pseudomonas putida* N-9. *J. Biol. Chem.* **246**: 3737-3742.
- Gauthier, J.J. y Rittenberg, S.C. (1971b) The metabolism of nicotinic acid. II. 2,5-dihydroxypyridine oxidation, product formation, and oxygen 18 incorporation. *J. Biol. Chem.* **246**: 3743-3748.
- Gerhardt, P., Morroy, R.G.E., Woody, W.A. y Krieg, N.R. (1994) *Methods for General and Molecular Bacteriology*. Washington D.C.
- Gescher, J., Eisenreich, W., Worth, J., Bacher, A. y Fuchs, G. (2005) Aerobic benzoyl-CoA catabolic pathway in *Azoarcus evansii*: studies on the non-oxygenolytic ring cleavage enzyme. *Mol. Microbiol.* **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.
- Ghera, R. y Rittenberg, S.C. (1962) Alternate pathways in nicotine degradation. *Bacteriol. Proc.* p. 27.
- Gibson, D.T. (1987) In *Microbial metabolism and the carbon cycle*. Hanson, R.S., Kunz, D.A. (ed). Chur, Switzerland: Harwood. Academic Press.
- 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, D.T. y Parales, R.E. (2000) Aromatic hydrocarbon dioxygenases in environmental biotechnology. *Curr. Opin. Biotechnol.* **11**: 236-243.
- Gibson, J. y Harwood, C.S. (2002) Metabolic diversity in aromatic compound utilization by anaerobic microbes. *Annu. Rev. Microbiol.* **56**: 345-369.
- Ginalski, K., Elofsson, A., Fischer, D. y Rychlewski, L. (2003) 3D-Jury: a simple approach to improve protein structure predictions. *Bioinformatics* **19**: 1015-1018.
- Ginalski, K. y Rychlewski, L. (2003) Protein structure prediction of CASP5 comparative modeling and fold recognition targets using consensus alignment approach and 3D assessment. *Proteins: Structure, Function, and Genetics* **53**: 410-417.
- Gladyshev, V.N., Khangulov, S.V. y Stadtman, T.C. (1994) Nicotinic acid hydroxylase from *Clostridium barkeri*: Electron paramagnetic resonance studies show that selenium is coordinated with molybdenum in the catalytically active selenium-dependent enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **91**: 232-236.
- Gladyshev, V.N., Khangulov, S.V. y Stadtman, T.C. (1996) Properties of the selenium- and molybdenum-containing nicotinic acid hydroxylase from *Clostridium barkeri*. *Biochemistry* **35**: 212-223.
- Goodnow, R.A. (1980) Biology of *Bordetella bronchiseptica*. *Microbiol. Rev.* **44**: 722-738.
- Greated, A., Lambertsen, L., Williams, P.A. y Thomas, C.M. (2002) Complete sequence of the IncP-9 TOL plasmid pWW0 from *Pseudomonas putida*. *Environ. Microbiol.* **4**: 856-871.
- Gremer, L. y Meyer, O. (1996) Characterization of xanthine dehydrogenase from the anaerobic bacterium *Veillonella atypica* and identification of a molybdopterin-cytosine-dinucleotide-containing molybdenum cofactor. *Eur. J. Biochem.* **238**: 862-866.
- Grether-Beck, S., Igloi, G.L., Pust, S., Schilz, E., Decker, K. y Brandsch, R. (1994) Structural analysis and molybdenum-dependent expression of the pAO1-encoded nicotine dehydrogenase genes of *Arthrobacter nicotinovorans*. *Mol. Microbiol.* **13**: 929-936.
- 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.
- Gupta, R.C. y Shukla, O.P. (1978) Metabolism of nicotinic acid by *Sarcina* sp. *Indian. J. Biochem. Biophys.* **15**: 462-464.
- Hacisalihoglu, A., Jongejan, J. y Duine, J. (1997) Distribution of amine oxidases and amine dehydrogenases in bacteria grown on primary amines and characterization of the amine oxidase from *Klebsiella oxytoca*. *Microbiology* **143**: 505-512.
- 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 *pseudomonad*. *Science* **270**: 976-980.
- Happe, B., Eltis, L.D., Poth, H., Hedderich, R. y Timmis, K.N. (1993) Characterization of 2,2',3-trihydroxybiphenyl dioxygenase, an extradiol dioxygenase from the dibenzofuran- and dibenzo-*p*-dioxin-degrading bacterium *Sphingomonas* sp. strain RW1. *J. Bacteriol.* **175**: 7313-7320.
- Harayama, S. y Timmis, K.N. (1989) Catabolism of aromatic hydrocarbons by *Pseudomonas*. In *Genetics of bacterial diversity*. Hopwood, A. and Chater, K.F. (eds). London: Academic Press.

- Harayama, S., Rekik, M. y Timmis, K.N. (1986) Genetic analysis of a relaxed substrate specificity aromatic ring dioxygenase, toluate 1,2-dioxygenase, encoded by TOL plasmid pWW0 of *Pseudomonas putida*. *Mol. Gen. Genet.* **202**: 226-234.
- Harayama, S., Kok, M. y Neidle, E.L. (1992) Functional and evolutionary relationships among diverse oxygenases. *Annu. Rev. Microbiol.* **46**.
- Harayama, S. y Timmis, K.N. (1992) Aerobic biodegradation of aromatic hydrocarbons by bacteria. En: *Metal Ions in Biological Systems*. Sigel, H. y Sigel, A. (eds.). New York: Marcell Dekker, Inc., pp. 99-156.
- Harpel, M. y Lipscomb, J. (1990) 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.
- Harwood, C.S. y Gibson, J. (1986) Uptake of benzoate by *Rhodopseudomonas palustris* grown anaerobically in light. *J. Bacteriol.* **165**: 504-509.
- 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.
- Harwood, C.S. y Parales, R.E. (1996) The  $\beta$ -ketoadipate pathway and the biology of self-identity. *Annu. Rev. Microbiol.* **50**: 553-590.
- Harwood, C.S., Burchhardt, H., Herrmann, H. y Fuchs, G. (1999) Anaerobic metabolism of aromatic compounds via the benzoyl-CoA pathway. *FEMS Microbiol. Rev.* **22**: 439-458.
- Hatakeyama, K., Asai, Y., Uchida, Y., Kobayashi, M., Terasawa, M. y Yukawa, H. (1997) Gene cloning and characterization of maleate *cis-trans* isomerase from *Alcaligenes faecalis*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **239**: 74-79.
- Hatakeyama, K., Goto, M., Kobayashi, M., Terasawa, M. y Yukawa, H. (2000) Analysis of oxidation sensitivity of maleate *cis-trans* isomerase from *Serratia marcescens*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **64**: 1477-1485.
- Hawkins, A.R., Giles, N.H. y Kinghorn, J.R. (1982) Genetical and biochemical aspects of quinate breakdown in the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*. *Mol. Gen. Genet.* **20**: 271-286.
- Hawkins, A.R., Lamb, H.K., Smith, M., Keyte, J.W. y Roberts, C.F. (1988) Molecular organisation of the quinic acid utilization (QUT) gene cluster in *Aspergillus nidulans*. *Mol. Gen. Genet.* **214**: 224-231.
- Hecht, H.J., Sobek, H., Haag, T., Pfeifer, O. y van Pee, K.H. (1994) The metal-ion-free oxidoreductase from *Streptomyces aureofaciens* has an alpha/beta hydrolase fold. *Nat. Struct. Biol.* **1**: 532-537.
- Hegg, E.L. y Que, L.J. (1997) The 2-His-1-carboxylate facial triad--an emerging structural motif in mononuclear non-heme iron(II) enzymes. *Eur. J. Biochem.* **250**: 625-629.
- Heider, J. y Fuchs, G. (1997) Anaerobic metabolism of aromatic compounds. *Eur. J. Biochem.* **243**: 577-596.
- Heiss, G. y Knackmuss, H.-J. (2002) Bioelimination of trinitroaromatic compounds: immobilization versus mineralization. *Curr. Opin. Microbiol.* **5**: 282-287.
- Hester, K.L., Madhusudhan, K.T. y Sokatch, J.R. (2000) Catabolite repression control by Crc in 2xYT medium is mediated by posttranscriptional regulation of *bkdR* expression in *Pseudomonas putida*. *J. Bacteriol.* **182**: 1150-1153.
- Hille, R. (1996) The mononuclear molybdenum enzymes. *Chem. Rev.* **96**: 2757-2816.



- Hille, R. (2005) Molybdenum-containing hydroxylases. *Arch. Biochem. Biophys.* **433**: 107-116.
- 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.
- Hirschberg, R. y Ensign, J.C. (1971) Oxidation of nicotinic acid by a *Bacillus* species: purification and properties of nicotinic acid and 6-hydroxynicotinic acid hydroxylases. *J. Bacteriol.* **108**: 751-756.
- Hirschberg, R. y Ensign, J.C. (1972) Oxidation of nicotinic acid by a *Bacillus* species: regulation of nicotinic acid and 6-hydroxynicotinic acid hydroxylases. *J. Bacteriol.* **112**: 392-397.
- Holland, I.B. y A. Blight, M. (1999) ABC-ATPases, adaptable energy generators fuelling transmembrane movement of a variety of molecules in organisms from bacteria to humans. *J. Mol. Biol.* **293**: 381-399.
- Holmquist, M. (2000) Alpha/Beta-hydrolase fold enzymes: structures, functions and mechanisms. *Curr. Protein. Pept. Sci.* **1**: 209-235.
- Hot, D., Antoine, R., Renauld-Mongenie, G., Caro, V., Hennuy, B., Levillain, E., Huot, L., Wittmann, G., Poncet, D., Jacob-Dubuisson, F., Guyard, C., Rimlinger, F., Aujame, L., Godfroid, E., Guiso, N., Quentin-Millet, M.-J., Lemoine, Y. y Loch, C. (2003) Differential modulation of *Bordetella pertussis* virulence genes as evidenced by DNA microarray analysis. *Mol. Genet. Genomics* **269**: 475-486.
- Houghton, C. y Cain, R.B. (1972) Microbial metabolism of the pyridine ring. Formation of pyridinediols (dihydroxypyridines) as intermediates in the degradation of pyridine compounds by micro-organisms. *Biochem. J.* **130**: 879-893.
- Houghton, J., Brown, T., Appel, A., Hughes, E. y Ornston, L. (1995) Discontinuities in the evolution of *Pseudomonas putida* cat genes. *J. Bacteriol.* **177**: 401-412.
- Hughes, R.K., Doyle, W.A., Chovnick, A., Whittle, J.R., Burke, J.F. y Bray, R.C. (1992) Use of rosy mutant strains of *Drosophila melanogaster* to probe the structure and function of xanthine dehydrogenase. *Biochem. J.* **285**: 507-513.
- Hund, H.K., de Beyer, A. y Lingens, F. (1990) Degradation of quinaldine by *Arthrobacter* sp. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler.* **371**: 1005-1008.
- Hunt, A.L. (1959) Purification of the nicotinic acid hydroxylase system of *Pseudomonas fluorescens* KB1. *Biochemistry* **72**: 1-7.
- Hurh, B., Ohshima, M., Yamane, T. y Nagasawa, T. (1994a) Microbial production of 6-hydroxynicotinic acid, an important building block for the synthesis of modern insecticides. *J. Ferment. Bioeng.* **77**: 382-385.
- Hurh, B., Yamane, T. y Nagasawa, T. (1994b) Purification and characterization of nicotinic acid dehydrogenase from *Pseudomonas fluorescens* TN5. *J. Ferment. Bioeng.* **78**: 19-26.
- Igloi, G.L. y Brandsch, R. (2003) Sequence of the 165-kilobase catabolic plasmid pAO1 from *Arthrobacter nicotinovorans* and identification of a pAO1-dependent nicotine uptake system. *J. Bacteriol.* **185**: 1976-1986.
- Ingledeu, W.M. y Tai, C.C. (1972) Quinate metabolism in *Pseudomonas aeruginosa*. *Can. J. Microbiol.* **18**: 1817-1824.
- Irie, S., Doi, S., Yorifuji, T., Takagi, M. y Yano, K. (1987) Nucleotide sequencing and characterization of the genes encoding benzene oxidation enzymes of *Pseudomonas putida*. *J. Bacteriol.* **169**: 5174-5179.

- 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., El-Said M., 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*. *Eur. J. Biochem.* **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.
- Iwaki, M., Yagi, T., Horiike, K., Saeki, Y., Ushijima, T. y Nozaki, M. (1983) Crystallization and properties of aromatic amine dehydrogenase from *Pseudomonas* sp. *Arch. Biochem. Biophys.* **220**: 253-262.
- Jiménez, J.I., García, J.L. y Díaz, E. (2005) Un procedimiento para la biotransformación del ácido nicotínico en ácido 6-hidroxinicotínico. Patente española. P200400650.
- Jiménez, J.I., Miñambres, B., García, J.L. y Díaz, E. (2002) Genomic analysis of the aromatic catabolic pathways from *Pseudomonas putida* KT2440. *Environ. Microbiol.* **4**: 824-841.
- Jiménez, J.I., Miñambres, B., García, J.L. y Díaz, E. (2004) Genomic insights in the catabolism of aromatic compounds in *Pseudomonas*. In *Pseudomonas*. Vol. 3. Ramos, J.L. (ed). New York: Kluwer Academic / Plenum Publishers, pp. 425-462.
- Johansen, S.S., Licht, D., Arvin, E., Mosbaek, H. y Hansen, A.B. (1997) Metabolic pathways of quinoline, indole and their methylated analogs by *Desulfobacterium indolicum* (DSM 3383). *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **47**: 292-300.
- Jones, M.V. y Hughes, D.E. (1972) The oxidation of nicotinic acid by *Pseudomonas ovalis* Chester. The terminal oxidase. *Biochem. J.* **129**: 755-761.
- Kaback, H.R. (1992) The lactose permease of *Escherichia coli*: a paradigm for membrane transport proteins. *Biochim. Biophys. Acta* **1101**: 210-213.
- Kaiser, J.P., Feng, Y. y Bollag, J.M. (1996) Microbial metabolism of pyridine, quinoline, acridine, and their derivatives under aerobic and anaerobic conditions. *Microbiol. Rev.* **60**: 483-498.
- Kantardjieff, K.A. y Rupp, B. (2003) Matthews coefficient probabilities: Improved estimates for unit cell contents of proteins, DNA, and protein-nucleic acid complex crystals. *Protein Sci* **12**: 1865-1871.
- Kato, Y., Yamagishi, J. y Asano, Y. (1995) Maleate *cis-trans* isomerase from *Arthrobacter* sp. TPU 5446. *J. Ferment. Bioeng.* **80**: 610-612.
- Kim, Y.H., Cho, K., Yun, S.H., Kim, J.Y., Kwon, K.H., Yoo, J.S. y Kim, S.I. (2006) Analysis of aromatic catabolic pathways in *Pseudomonas putida* KT 2440 using a combined proteomic approach: 2-DE/MS and cleavable isotope-coded affinity tag analysis. *Proteomics* **6**: 1301-1318.
- Kimura, T., Kawabata, Y. y Sato, E. (1986) Enzymatic production of L-malate by *Alcaligenes* sp. *Agric. Biol. Chem.* **50**: 89-94.
- 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.
- Kitts, C.L., Schaechter, L.E., Rabin, R.S. y Ludwig, R.A. (1989) Identification of cyclic intermediates in *Azorhizobium caulinodans* nicotinate catabolism. *J. Bacteriol.* **171**: 3406-3411.

- Kitts, C.L., Lapointe, J.P., Lam, V.T. y Ludwig, R.A. (1992) Elucidation of the complete *Azorhizobium* nicotinate catabolism pathway. *J. Bacteriol.* **174**: 7791-7797.
- Kloos, D.U., Stratz, M., Guttler, A., Steffan, R.J. y Timmis, K.N. (1994) Inducible cell lysis system for the study of natural transformation and environmental fate of DNA released by cell death. *J. Bacteriol.* **176**: 7352-7361.
- Koenig, K. y Andreesen, J.R. (1990) Xanthine dehydrogenase and 2-furoyl-coenzyme A dehydrogenase from *Pseudomonas putida* Fu1: two molybdenum-containing dehydrogenases of novel structural composition. *J. Bacteriol.* **172**: 5999-6009.
- Kovach, M.E., Elzer, P.H., Hill, D.S., Robertson, G.T., Farris, M.A., Roop, R.M.II 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.
- Kretzer, A., Frunzke, K. y Andreesen, J.R. (1993) Catabolism of isonicotinate by *Mycobacterium* sp. INA1: extended description of the pathway and purification of the molybdoenzyme isonicotinate dehydrogenase. *J. Gen. Microbiol.* **139**: 2763-2772.
- Kulla, H. (1991) Enzymatic hydroxylation in industrial application. *Chimia* **45**: 81-85.
- Kunishima, N., Asada, Y., Sugahara, M., Ishijima, J., Nodake, Y., Sugahara, M., Miyano, M., Kuramitsu, S., Yokoyama, S. y Sugahara, M. (2005) A novel induced-fit reaction mechanism of asymmetric hot dog thioesterase PaaI. *J. Mol. Biol.* **352**: 212-228.
- La Voie, E.J., Dolan, S., Little, P., Wang, C.X., Sugie, S. y Rivenson, A. (1988) Carcinogenicity of quinoline, 4- and 8-methylquinoline and benzoquinolines in newborn mice and rats. *Food. Chem. Toxicol.* **26**: 625-629.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
- Lake, M.W., Temple, C.A., Rajagopalan, K.V. y Schindelin, H. (2000) The crystal structure of the *Escherichia coli* MobA protein provides insight into molybdopterin guanine dinucleotide biosynthesis. *J. Biol. Chem.* **275**: 40211-40217.
- 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.
- Leahy, J.G., Batchelor, P.J. y Morcomb, S.M. (2003) Evolution of the soluble diiron monooxygenases. *FEMS Microbiol. Rev.* **27**: 449-479.
- Lee, J., Oh, J., Min, K.R. y Kim, Y. (1996) Nucleotide sequence of salicylate hydroxylase gene and its 5'-flanking region of *Pseudomonas putida* KF715. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **218**: 544-548.
- Lehmann, M., Tshisuaka, B., Fetzner, S., Roger, P. y Lingens, F. (1994) Purification and characterization of isoquinoline 1-oxidoreductase from *Pseudomonas diminuta* 7, a novel molybdenum-containing hydroxylase. *J. Biol. Chem.* **269**: 11254-11260.
- Lehmann, M., Tshisuaka, B., Fetzner, S. y Lingens, F. (1995) Molecular cloning of the isoquinoline 1-oxidoreductase genes from *Pseudomonas diminuta* 7, structural analysis of IorA and IorB, and sequence comparisons with other molybdenum-containing hydroxylases. *J. Biol. Chem.* **270**: 14420-14429.
- Leimkuhler, S., Kern, M., Solomon, P.S., McEwan, A.G., Schwarz, G., Mendel, R.R. y Klipp, W. (1998) Xanthine dehydrogenase from the phototrophic purple bacterium *Rhodobacter capsulatus* is more similar to its eukaryotic counterparts than to prokaryotic molybdenum enzymes. *Mol. Microbiol.* **27**: 853-869.
- Leslie, A. (1999) Integration of macromolecular diffraction data. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **55**: 1696-1702.

- Letendre, C.H., Dickens, G. y Guroff, G. (1975) Phenylalanine hydroxylase from *Pseudomonas* sp. (ATCC 11299a). Purification, molecular weight, and influence of tyrosine metabolites on activation and hydroxylation. *J. Biol. Chem.* **250**: 6672-6678.
- Liao, D. y Remington, S. (1990) Structure of wheat serine carboxypeptidase II at 3.5-Å resolution. A new class of serine proteinase. *J. Biol. Chem.* **265**: 6528-6531.
- Liu, L., Iwata, K., Kita, A., Kawarabayasi, Y., Yohda, M. y Miki, K. (2002) Crystal structure of aspartate racemase from *Pyrococcus horikoshii* OT3 and its implications for molecular mechanism of PLP-independent racemization. *J. Mol. Biol.* **319**: 479-489.
- Lorenzo, P., Alonso, S., Velasco, A., Díaz, E., García, J.L. y Perera, J. (2003) Design of catabolic cassettes for styrene biodegradation. *Antonie van Leeuwenhoek* **84**: 17-24.
- Louie, T.M., Xie, X.S. y Xun, L. (2003) Coordinated production and utilization of FADH<sub>2</sub> by NAD(P)H-flavin oxidoreductase and 4-hydroxyphenylacetate 3-monooxygenase. *Biochemistry* **42**: 7509-7517.
- Luengo, J.M., García, J.L. y Olivera, E.R. (2001) The phenylacetyl-CoA catabolon: a complex catabolic unit with broad biotechnological applications. *Mol. Microbiol.* **39**: 1434-1442.
- Maeda, S., Uchida, S. y Kisaki, T. (1978) Microbial degradation of nicotine-*N'*-oxide degradation products. *Agric. Biol. Chem.* **42**: 1455-1460.
- Mandelbaum, R.T., Allan, D.L. y Wackett, L.P. (1995) Isolation and characterization of a *Pseudomonas* sp. That mineralizes the s-triazine herbicide atrazine. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**: 1451-1457.
- Manoil, C. y Beckwith, J. (1985) TnpA: A transposon probe for protein export signals. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**: 8129-8133.
- Marchler-Bauer, A. y Bryant, S.H. (2004) CD-Search: protein domain annotations on the fly. *Nucl. Acids Res.* **32**: W327-331.
- Marqués, S., Aranda-Olmedo, I. y Ramos, J.L. (2006) Controlling bacterial physiology for optimal expression of gene reporter constructs. *Curr. Opin. Biotechnol.* **17**: 50-56.
- Martínez, B., Tomkins, J., Wackett, L.P., Wing, R. y Sadowsky, M.J. (2001) Complete nucleotide sequence and organization of the atrazine catabolic plasmid pADP-1 from *Pseudomonas* sp. strain ADP. *J. Bacteriol.* **183**: 5684-5697.
- Martínez-Blanco, H., Reglero, A., Rodríguez-Aparicio, L. y Luengo, J. (1990) Purification and biochemical characterization of phenylacetyl-CoA ligase from *Pseudomonas putida*. A specific enzyme for the catabolism of phenylacetic acid. *J. Biol. Chem.* **265**: 7084-7090.
- Martins, B.M., Svetlitchnaia, T. y Dobbek, H. (2005) 2-oxoquinoline 8-monooxygenase oxygenase component: Active site modulation by Rieske-[2Fe-2S] center oxidation/reduction. *Structure* **13**: 817-824.
- Mason, J.R. y Cammack, R. (1992) The electron-transport proteins of hydroxylating bacterial dioxygenases. *Annu. Rev. Microbiol.* **46**: 277-305.
- Matthews, B.W. (1968) Solvent content of protein crystals. *J. Mol. Biol.* **33**: 491-497.
- McMahon, B., Gallagher, M.E. y Mayhew, S.G. (2005) The protein coded by the PP2216 gene of *Pseudomonas putida* KT2440 is an acyl-CoA dehydrogenase that oxidises only short-chain aliphatic substrates. *FEMS Microbiol. Lett.* **250**: 121-127.
- McPheat, W.L. y Wardlaw, A.C. (1982) Inhibition of nicotinic acid and nicotinamide uptake into *Bordetella pertussis* by structural analogues. *J. Gen. Microbiol.* **128**: 2681-2685.
- McPheat, W.L., Wardlaw, A.C. y Novotny, P. (1983) Modulation of *Bordetella pertussis* by nicotinic acid. *Infect. Immun.* **41**: 516-522.

- McPherson, A. (1982) Preparation and analysis of protein crystals. Wiley-Interscience Publications, pp. 82-159.
- Melton, A.R. y Weiss, A.A. (1989) Environmental regulation of expression of virulence determinants in *Bordetella pertussis*. *J. Bacteriol.* **171**: 6206-6212.
- Melton, A.R. y Weiss, A.A. (1993) Characterization of environmental regulators of *Bordetella pertussis*. *Infect. Immun.* **61**: 807-815.
- Merrick, M.J. y Edwards, R.A. (1995) Nitrogen control in bacteria. *Microbiol. Rev.* **59**: 604-622.
- Milcamps, A. y de Bruijn, F. (1999) Identification of a novel nutrient-deprivation-induced *Sinorhizobium meliloti* gene (*hmgA*) involved in the degradation of tyrosine. *Microbiology* **145**: 935-947.
- Miller, J.H. (1972) *Experiments in molecular genetics*. New York: Cold Spring Harbor Press.
- Minton, A.P. (1994) In *Modern Analytical Ultracentrifugation*. Schuster, T.M. and Laue, T.M. (eds). Boston (MA): Birkhäuser, pp. 81-93.
- Misawa, E., Chan Kwo Chion, C.K., Archer, I.V., Woodland, M.P., Zhou, N.-Y., Carter, S.F., Widdowson, D.A. y Leak, D.J. (1998) Characterisation of a catabolic epoxide hydrolase from a *Corynebacterium* sp. *Eur. J. Biochem.* **253**: 173-183.
- Mitra, A., Kitamura, Y., Gasson, M.J., Narbad, A., Parr, A.J., Payne, J., Rhodes, M.J.C., Sewter, C. y Walton, N.J. (1999) 4-Hydroxycinnamoyl-CoA hydratase/lyase (HCHL). An enzyme of phenylpropanoid chain cleavage from *Pseudomonas*. *Arch. Biochem. Biophys.* **365**: 10-16.
- Mohamed, M., Ismail, W., Heider, J. y Fuchs, G. (2002) Aerobic metabolism of phenylacetic acids in *Azoarcus evansii*. *Arch. Microbiol.* **178**: 180-192.
- Mohamed, M., Zaar, A., Ebenau-Jehle, C. y Fuchs, G. (2001) Reinvestigation of a new type of aerobic benzoate metabolism in the proteobacterium *Azoarcus evansii*. *J. Bacteriol.* **183**: 1899-1908.
- Morasch, B., Schink, B., Tebbe, C. y Meckenstock, R. (2004) Degradation of *o*-xylene and *m*-xylene by a novel sulfate-reducer belonging to the genus *Desulfotomaculum*. *Arch. Microbiol.* **181**: 407-417.
- Morawski, B., Segura, A. y Ornston, L.N. (2000) Repression of *Acinetobacter* vanillate demethylase synthesis by VanR, a member of the GntR family of transcriptional regulators. *FEMS Microbiol. Lett.* **187**: 65-68.
- Moreno-Ruiz, E., Hernáez, M.J., Martínez-Perez, 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.
- Morpeth, F.F. (1983) Studies on the specificity toward aldehyde substrates and steady-state kinetics of xanthine oxidase. *Biochim. Biophys. Acta* **744**: 328-334.
- Nagel, M. y Andreesen, J.R. (1990) Purification and characterization of the molybdoenzymes nicotinate dehydrogenase and 6-hydroxynicotinate dehydrogenase from *Bacillus niacini*. *Arch. Microbiol.* **154**: 605-613.
- Nagel, M. y Andreesen, J.R. (1991) *Bacillus niacini* sp. nov., a nicotinate-metabolizing mesophile isolated from soil. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **41**: 134-139.
- Nakano, H., Wieser, M., Hurh, B., Kawai, T., Yoshida, T., Yamane, T. y Nagasawa, T. (1999) Purification, characterization and gene cloning of 6-hydroxynicotinate 3-monooxygenase from *Pseudomonas fluorescens* TN5. *Eur. J. Biochem.* **260**: 120-126.

- Nam, J.W., Nojiri, H., Yoshida, T., Habe, H., Yamane, H. y Omori, T. (2001) New classification system for oxygenase components involved in ring-hydroxylating oxygenations. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **65**: 254-263.
- 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.
- Neidle, E.L., Hartnett, C., Ornston, L.N., Bairoch, A., Rekik, M. y Harayama, S. (1991) Nucleotide sequences of the *Acinetobacter calcoaceticus* *benABC* genes for benzoate 1,2-dioxygenase reveal evolutionary relationships among multicomponent oxygenases. *J. Bacteriol.* **173**: 5385-5395.
- Nelson, K.E., Weinel, 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., Lee, P.C., 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. y Timmis, K.N. (2002) Complete genome sequence and comparative analysis of the metabolically versatile *Pseudomonas putida* KT2440. *Environ. Microbiol.* **4**: 799-808.
- Nelson, M. y Snell, E. (1986) Enzymes of vitamin B6 degradation. Purification and properties of 5- pyridoxic-acid oxygenase from *Arthrobacter* sp. *J. Biol. Chem.* **261**: 15115-15120.
- Newman, J., Peat, T.S., Richard, R., Kan, L., Swanson, P.E., Affholter, J.A., Holmes, I.H., Schindler, J.F., Unkefer, C.J. y Terwilliger, T.C. (1999) Haloalkane dehalogenases: structure of a *Rhodococcus* enzyme. *Biochemistry* **38**: 16105-16114.
- Nichols, N. y Harwood, C. (1997) PcaK, a high-affinity permease for the aromatic compounds 4- hydroxybenzoate and protocatechuate from *Pseudomonas putida*. *J. Bacteriol.* **179**: 5056-5061.
- 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.
- Nojiri, H., Taira, H., Iwata, K., Morii, K., Nam, J., Yoshida, T., Habe, H., Nakamura, S., Shimizu, K., Yamane, H. y Omori, T. (2003) Purification and characterization of *meta*-cleavage compound hydrolase from a carbazole degrader *Pseudomonas resinovorans* strain CA10. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **67**, 36-45.
- Nordlund, I., Powlowski, J. y Shingler, V. (1990) Complete nucleotide sequence and polypeptide analysis of multicomponent phenol hydroxylase from *Pseudomonas* sp. strain CF600. *J. Bacteriol.* **172**: 6826-6833.
- Notomista, E., Lahm, A., Di Donato, A. y Tramontano, A. (2003) Evolution of bacterial and archaeal multicomponent monooxygenases. *J. Mol. Evol.* **56**: 435-445.
- Nozaki, M., Kagamiyama, H. y Hayaishi, O. (1963) Crystallization and some properties of metapyrocatechase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **11**: 65-69.
- Nurk, A., Kasak, L. y Kivisaar, M. (1991) Sequence of the gene (*pheA*) encoding phenol monooxygenase from *Pseudomonas* sp. EST1001: expression in *Escherichia coli* and *Pseudomonas putida*. *Gene* **102**: 13-18.

- Ochsner, U.A., Reiser, J., Fiechter, A., and Witholt, B. (1995) Production of *Pseudomonas aeruginosa* rhamnolipid biosurfactants in heterologous hosts. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**: 3503-3506.
- Odintsov, S.G., Sabala, I., Bourenkov, G., Rybin, V. y Bochtler, M. (2005a) Substrate access to the active sites in aminopeptidase T, a representative of a new metallopeptidase clan. *J. Mol. Biol.* **354**: 403-412.
- Odintsov, S.G., Sabala, I., Bourenkov, G., Rybin, V. y Bochtler, M. (2005b) *Staphylococcus aureus* aminopeptidase S is a founding member of a new peptidase clan. *J. Biol. Chem.* **280**: 27792-27799.
- Ohe, T. y Watanabe, Y. (1979) Purification and properties of xanthine dehydrogenase from *Streptomyces cyanogenus*. *J. Biochem. (Tokyo)*. **86**: 45-53.
- Ohlendorf, D.H., Lipscomb, J.D. y Weber, P.C. (1988) Structure and assembly of protocatechuate 3,4-dioxygenase. *Nature*. **336**: 403-405.
- Olivera, E.R., Miñambres, B., García, B., Muñoz, 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. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **95**: 6419-6424.
- Olivera, E.R., Carnicero, D., García, B., Miñambres, B., Moreno, M.A., Canedo, L., DiRusso, C.C., Naharro, G. y Luengo, J.M. (2001) Two different pathways are involved in the  $\beta$ -oxidation of n-alkanoic and n-phenylalkanoic acids in *Pseudomonas putida* U: genetic studies and biotechnological applications. *Mol. Microbiol.* **39**: 863-874.
- Ollis, D.L., Cheah, E., Cygler, M., Dijkstra, B., Frolow, F., Franken, S.M., Harel, M., Remington, S.J., Silman, I. y Schrag, J.E.A. (1992) The alpha/beta hydrolase fold. *Protein Eng.* **5**: 197-211.
- Oppermann, U., Filling, C., Hult, M., Shafqat, N., Wu, X., Lindh, M., Shafqat, J., Nordling, E., Kallberg, Y., Persson, B. y Jornvall, H. (2003) Short-chain dehydrogenases/reductases (SDR): the 2002 update. *Chem. Biol. Interact.* **143-144**: 247-253.
- Overhage, J., Priefert, H. y Steinbuchel, A. (1999) Biochemical and genetic analyses of ferulic acid catabolism in *Pseudomonas* sp. strain HR199. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 4837-4847.
- Palleroni, N.J. (1984) *Pseudomonas*. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Vol. 1. Kreig, N.R. y Holt, J.G. (eds). Baltimore: Williams and Wilkins Co., pp. 141-203.
- Palleroni, N.J. y Moore, E.R.B. (2004) Taxonomy of *Pseudomonads*: Experimental approaches. In *Pseudomonas*. Vol. 1. Ramos, J.L. (ed). New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers, pp. 3-44.
- 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.
- Parales, R.E. y Harwood, C.S. (2002) Bacterial chemotaxis to pollutants and plant-derived aromatic molecules. *Curr. Opin. Microbiol.* **5**: 266-273.
- Park, H.-S. y Kim, H.-S. (2001) Genetic and structural organization of the aminophenol catabolic operon and its implication for evolutionary process. *J. Bacteriol.* **183**: 5074-5081.

- Parke, D. (1996) Characterization of PcaQ, a LysR-type transcriptional activator required for catabolism of phenolic compounds, from *Agrobacterium tumefaciens*. *J. Bacteriol.* **178**: 266-272.
- Parke, D., D'Argenio, D.A. y Ornston, L.N. (2000) Bacteria are not what they eat: That is why they are so diverse. *J. Bacteriol.* **182**: 257-263.
- Parke, D., García, M.A. y Ornston, L.N. (2001) Cloning and genetic characterization of *dca* genes required for  $\beta$ -oxidation of straight-chain dicarboxylic acids in *Acinetobacter* sp. strain ADP1. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**: 4817-4827.
- Parke, D. y Ornston, L.N. (2003) Hydroxycinnamate (*hca*) catabolic genes from *Acinetobacter* sp. strain ADP1 are repressed by HcaR and are induced by hydroxycinnamoyl-coenzyme A thioesters. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**: 5398-5409.
- Parschat, K., Canne, C., Huttermann, J., Kappl, R. y Fetzner, S. (2001) Xanthine dehydrogenase from *Pseudomonas putida* 86: specificity, oxidation-reduction potentials of its redox-active centers, and first EPR characterization. *Biochim. Biophys. Acta.* **1544**: 151-165.
- Parschat, K., Hauer, B., Kappl, R., Kraft, R., Huttermann, J. y Fetzner, S. (2003) Gene cluster of *Arthrobacter ilicis* Ru61a involved in the degradation of quinaldine to anthranilate: characterization and functional expression of the quinaldine 4-oxidase *qoxLMS* genes. *J. Biol. Chem.* **278**: 27483-27494.
- Pearson, D.M., O'Reilly, C., Colby, J. y Black, G.W. (1994) DNA sequence of the *cutA*, *B* and *C* genes, encoding the molybdenum containing hydroxylase carbon monoxide dehydrogenase, from *Pseudomonas thermocarboxydovorans* strain C2. *Biochim. Biophys. Acta.* **1188**: 432-438.
- Pei, J., Sadreyev, R. y Grishin, N.V. (2003) PCMA: fast and accurate multiple sequence alignment based on profile consistency. *Bioinformatics* **19**: 427-428.
- Peschke, B. y Lingens, F. (1991) Microbial metabolism of quinoline and related compounds. XII. Isolation and characterization of the quinoline oxidoreductase from *Rhodococcus* spec. B1 compared with the quinoline oxidoreductase from *Pseudomonas putida* 86. *Biol. Chem. Hoppe Seyler.* **372**: 1081-1088.
- 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.
- Pieper, D.H. y Reineke, W. (2000) Engineering bacteria for bioremediation. *Curr. Opin. Biotechnol.* **11**: 262-270.
- Pikus, J.D., Studts, J.M., Achim, C., Kauffmann, K.E., Munck, E., Steffan, R.J., McClay, K. y Fox, B.G. (1996) Recombinant toluene-4-monooxygenase: catalytic and Mössbauer studies of the purified diiron and Rieske components of a four-protein complex. *Biochemistry* **35**: 9106-9119.
- Pikus, J.D., Studts, J.M., McClay, K., Steffan, R.J. y Fox, B.G. (1997) Changes in the regiospecificity of aromatic hydroxylation produced by active site engineering in the diiron enzyme toluene 4-monooxygenase. *Biochemistry* **36**: 9283-9289.
- Plaggenborg, R., Overhage, J., Steinbühel, A. y Priefert, H. (2003) Functional analyses of genes involved in the metabolism of ferulic acid in *Pseudomonas putida* KT2440. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **61**: 528-535.



- Pollock, V.V. y Barber, M.J. (1997) Biotin sulfoxide reductase. Heterologous expression and characterization of a functional molybdopterin guanine dinucleotide-containing Enzyme. *J. Biol. Chem.* **272**: 3355-3362.
- Poole, K., Tetro, K., Zhao, Q., Neshat, S., Heinrichs, D. y Bianco, N. (1996) Expression of the multidrug resistance operon *mexA-mexB-oprM* in *Pseudomonas aeruginosa*: *mexR* encodes a regulator of operon expression. *Antimicrob. Agents Chemother.* **40**: 2021-2028.
- Powlowski, J. y Shingler, V. (1990) In vitro analysis of polypeptide requirements of multicomponent phenol hydroxylase from *Pseudomonas* sp. strain CF600. *J. Bacteriol.* **172**: 6834-6840.
- Powlowski, J. y Shingler, V. (1994) Genetics and biochemistry of phenol degradation by *Pseudomonas* sp. CF600. *Biodegradation* **5**: 219-236.
- Priefert, H., Rabenhorst, J. y Steinbüchel, A. (2001) Biotechnological production of vanillin. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **56**: 296-314.
- Priefert, H., Rabenhorst, J. y Steinbüchel, A. (1997) Molecular characterization of genes of *Pseudomonas* sp. strain HR199 involved in bioconversion of vanillin to protocatechuate. *J. Bacteriol.* **179**: 2595-2607.
- Prieto, M. y García, J.L. (1994) Molecular characterization of 4-hydroxyphenylacetate 3-hydroxylase of *Escherichia coli*. A two-protein component enzyme. *J. Biol. Chem.* **269**: 22823-22829.
- Prieto, M.A., Díaz, E. y García, J. (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., Pérez-Aranda, A. y García, J.L. (1993) Characterization of an *Escherichia coli* aromatic hydroxylase with a broad substrate range. *J. Bacteriol.* **175**: 2162-2167.
- Prieto, M.A., Galán, B., Torres, B., Ferrández, A., Fernández, C., Miñambres, B., García, J.L. 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. y Wyndham, R.C. (2001) Identification and functional characterization of CbaR, a MarR-like modulator of the *cbaABC*-encoded chlorobenzoate catabolism pathway. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**: 3530-3541.
- Qian, H., Edlund, U., Powlowski, J., Shingler, V. y Sethson, I. (1997) Solution structure of phenol hydroxylase protein component P2 determined by NMR spectroscopy. *Biochemistry* **36**: 495-504.
- Que, L. (2000) One motif--many different reactions. *Nat. Struct. Biol.* **7**: 182-184.
- Quinn, J.A., McKay, D.B. y Entsch, B. (2001) Analysis of the *pobA* and *pobR* genes controlling expression of *p*-hydroxybenzoate hydroxylase in *Azotobacter chroococcum*. *Gene* **264**: 77-85.
- 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. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **83**: 8467-8471.
- Ramos, J.L., Wasserfallen, A., Rose, K. y Timmis, K.N. (1987) Redesigning metabolic routes: manipulation of TOL plasmid pathway for catabolism of alkylbenzoates. *Science* **235**: 593-596.

- Ramos, J.L., Díaz, E., Dowling, D., de Lorenzo, V., Molin, S., O'Gara, F., Ramos, C. y Timmis, K.N. (1994) The behavior of bacteria designed for biodegradation. *Biotechnology* **12**: 1349-1356.
- Ramos-González, M.I., Campos, M.J., Ramos, J.L. y Espinosa-Urgel, M. (2006) Characterization of the *Pseudomonas putida* mobile genetic element ISPpu10: an occupant of repetitive extragenic palindromic sequences. *J. Bacteriol.* **188**: 37-44.
- Ramsay, J.R., McEntee, I.D. y Hammond, P.M. (1992) Production and purification of salicylate monooxygenase from *Pseudomonas cepacia* ATCC 29351. *Bioseparation* **2**: 375-383.
- Rebelo, J., Macieira, S., Dias, J.M., Huber, R., Ascenso, C.S., Rusnak, F., Moura, J.J.G., Moura, I. y Romao, M.J. (2000) Gene sequence and crystal structure of the aldehyde oxidoreductase from *Desulfovibrio desulfuricans* ATCC 27774. *J. Mol. Biol.* **297**: 135-146.
- Reineke, W. (1998) Development of hybrid strains for the mineralization of chloroaromatics by patchwork assembly. *Annu. Rev. Microbiol.* **52**: 287-331.
- Reva, O.N., Weinel, C., Weinel, M., Bohm, K., Stjepandic, D., Hoheisel, J.D. y Tumbler, B. (2006) Functional genomics of stress response in *Pseudomonas putida* KT2440. *J. Bacteriol.* **188**: 4079-4092.
- Rink, R., Fennema, M., Smids, M., Dehmel, U. y Janssen, D.B. (1997) Primary structure and catalytic mechanism of the epoxide hydrolase from *Agrobacterium radiobacter* AD1. *J. Biol. Chem.* **272**: 14650-14657.
- Röger, P., Bar, G. y Lingens, F. (1995) Two novel metabolites in the degradation of pathway of isoquinoline by *Pseudomonas diminuta* 7. *FEMS Microbiol. Lett.* **129**: 281-286.
- 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.
- Rojo, F. (2001) Mechanisms of transcriptional repression. *Curr. Opin. Microbiol.* **4**: 145-151.
- Rojo, F. y Dinamarca, A. (2004) Catabolite repression and physiological control. In *Pseudomonas*. Vol. 2. Ramos, J.L. (ed). New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers.
- Romao, M.J., Archer, M., Moura, I., Moura, J.J., LeGall, J., Engh, R., Schneider, M., Hof, P. y Huber, R. (1995) Crystal structure of the xanthine oxidase-related aldehyde oxidoreductase from *D. gigas*. *Science* **270**: 1170-1176.
- Romao, M.J., Turk, D., Gomis-Ruth, F.X., Huber, R., Schumacher, G., Mollering, H. y Russmann, L. (1992) Crystal structure analysis, refinement and enzymatic reaction mechanism of *N*-carbamoylsarcosine amidohydrolase from *Arthrobacter* sp. at 2.0 Å resolution. *J. Mol. Biol.* **226**: 1111-1130.
- Romao, M.J. y Huber, R. (1998) Structure and function of the xanthine-oxydase family of molybdenum enzymes. *Structure and Bonding* **90**: 69-95.
- Roper, D.I., Fawcett, T. y Cooper, R.A. (1993) The *Escherichia coli* C homoprotocatechuate degradative operon: *hpc* gene order, direction of transcription and control of expression. *Mol. Gen. Genet.* **237**: 241-250.
- Rost, R., Haas, S., Hammer, E., Herrmann, H. y Burchhardt, G. (2002) Molecular analysis of aerobic phenylacetate degradation in *Azoarcus evansii*. *Mol. Genet. Genomics* **267**: 656-663.

- Ruiz-Manzano, A., Yuste, L. y Rojo, F. (2005) Levels and activity of the *Pseudomonas putida* global regulatory protein Crc vary according to growth conditions. *J. Bacteriol.* **187**: 3678-3686.
- Russo, S. y Baumann, U. (2004) Crystal structure of a dodecameric tetrahedral-shaped aminopeptidase. *J. Biol. Chem.* **279**: 51275-51281.
- Saier, M.H.Jr. (2000) A functional-phylogenetic classification system for transmembrane solute transporters. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **64**: 354-411.
- Sali, A. y Blundell, T.L. (1993) Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints. *J. Mol. Biol.* **234**: 779-815.
- Sambrook, J. y Russell, D.W. (2001) *Molecular Cloning: A laboratory manual. Volume 1-3*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sandu, C., Chiribau, C.B. y Brandsch, R. (2003) Characterization of HdnR, the transcriptional repressor of the 6-Hydroxy-D-nicotine oxidase gene of *Arthrobacter nicotinovorans* pAO1, and its DNA-binding activity in response to L- and D-nicotine derivatives. *J. Biol. Chem.* **278**: 51307-51315.
- Sanishvili, R., Yakunin, A.F., Laskowski, R.A., Skarina, T., Evdokimova, E., Doherty-Kirby, A., Lajoie, G.A., Thornton, J.M., Arrowsmith, C.H., Savchenko, A., Joachimiak, A. y Edwards, A.M. (2003) Integrating structure, bioinformatics, and enzymology to discover function: BioH, A new carboxylesterase from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **278**: 26039-26045.
- Santoro, J. y King, C.G. (1992). A constant-time 2d overbodengausen experiment for inverse correlation of isotopically enriched species. *J. Magn. Reson.* **97**.
- Santos, P.M., Blatny, J.M., Di Bartolo, I., Valla, S. y Zennaro, E. (2000) Physiological analysis of the expression of the styrene degradation gene cluster in *Pseudomonas fluorescens* ST. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**: 1305-1310.
- Sarid, S., Berger, A. y Katchalski, E. (1959) Proline iminopeptidase. *J. Biol. Chem.* **234**: 1740-1746.
- Sato, N., Uragami, Y., Nishizaki, T., Takahashi, Y., Sazaki, G., Sugimoto, K., Nonaka, T., Masai, E., Fukuda, M. y Senda, T. (2002) Crystal structures of the reaction intermediate and its homologue of an extradiol-cleaving catecholic dioxygenase. *J. Mol. Biol.* **321**: 621-636.
- Sato, S., Ouchiyama, N., Kimura, T., Nojiri, H., Yamane, H. y Omori, T. (1997) Cloning of genes involved in carbazole degradation of *Pseudomonas* sp. strain CA10: nucleotide sequences of genes and characterization of *meta*- cleavage enzymes and hydrolase. *J. Bacteriol.* **179**: 4841-4849.
- Schafer, A., Tauch, A., Jager, W., Kalinowski, J., Thierbach, G. y Puhler, A. (1994) Small mobilizable multi-purpose cloning vectors derived from the *Escherichia coli* plasmids pK18 and pK19: selection of defined deletions in the chromosome of *Corynebacterium glutamicum*. *Gene* **145**: 69-73.
- Scher, W. y Jakoby, W.B. (1969) Maleate isomerase. *J. Biol. Chem.* **244**: 1878-1882.
- Schink, B., Philipp, B. y Müller, J. (2000) Anaerobic degradation of phenolic compounds. *Naturwissenschaften* **87**: 12-23.
- Schmid, A., Dordick, J.S., Hauer, B., Kiener, A., Wubbolts, M. y Witholt, B. (2001) Industrial biocatalysis today and tomorrow **409**: 258-268.
- Schneider, D.R. y Parker, C.D. (1982) Effect of pyridines on phenotypic properties of *Bordetella pertussis*. *Infect. Immun.* **38**: 548-553.

- Scholten, J.D., Chang, K.H., Babbitt, P.C., Charest, H., Sylvestre, M. y Dunaway-Mariano, D. (1991) Novel enzymic hydrolytic dehalogenation of a chlorinated aromatic. *Science* **253**: 182-185.
- Schräder, T., Thiemer, B. y Andreesen, J. (2002) A molybdenum-containing dehydrogenase catalyzing an unusual 2-hydroxylation of nicotinic acid. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **58**: 612-617.
- Schräder, T., Hillebrand, C. y Andreesen, J.R. (1998) 2-Hydroxyisonicotinate dehydrogenase isolated from *Mycobacterium* sp. INA1. *FEMS Microbiol. Lett.* **164**: 311-316.
- Schrag, J., Winkler, F. y Cygler, M. (1992) Pancreatic lipases: evolutionary intermediates in a positional change of catalytic carboxylates? *J. Biol. Chem.* **267**: 4300-4303.
- Schreuder, H.A., van der Laan, J.M., Hol, W.G.J. y Drenth, J. (1988) Crystal structure of *p*-hydroxybenzoate hydroxylase complexed with its reaction product 3,4-dihydroxybenzoate. *J. Mol. Biol.* **199**: 637-648.
- Schreuder, H.A., Prick, P.A.J., Wierenga, R.K., Vriend, G., Wilson, K.S., Hol, W.G.J. y Drenth, J. (1989) Crystal structure of the *p*-hydroxybenzoate hydroxylase-substrate complex refined at 1.9 Å resolution : Analysis of the enzyme-substrate and enzyme-product complexes. *J. Mol. Biol.* **208**: 679-696.
- Schreuder, H.A., Hol, W.G. y Drenth, J. (1990) Analysis of the active site of the flavoprotein *p*-hydroxybenzoate hydroxylase and some ideas with respect to its reaction mechanism. *Biochemistry* **29**: 3101-3108.
- Schuck, P. y Rossmann, P. (2000) Determination of the sedimentation coefficient distribution by least-squares boundary modeling. *Biopolymers* **54**: 328-341.
- Schühle, 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.
- Schultz, A.C., Nygaard, P. y Saxild, H.H. (2001) Functional analysis of 14 genes that constitute the purine catabolic pathway in *Bacillus subtilis* and evidence for a novel regulon controlled by the PucR transcription activator. *J. Bacteriol.* **183**: 3293-3302.
- Schwarz, G., Bauder, R., Speer, M., Rommel, T.O. y Lingens, F. (1989) Microbial metabolism of quinoline and related compounds. II. Degradation of quinoline by *Pseudomonas fluorescens* 3, *Pseudomonas putida* 86 and *Rhodococcus* spec. B1. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler.* **370**: 1183-1189.
- Schwarz, G. (2005) Molybdenum cofactor biosynthesis and deficiency. *Cell. Mol. Life Sci.* **62**: 2792-2810.
- Sealy-Lewis, H.M., Lycan, D. y Scazzocchio, C. (1979) Product induction of purine hydroxylase II in *Asperigillus nidulans*. *Mol. Gen. Genet.* **175**: 105-106.
- Segura, A., Bunz, P.V., D'Argenio, D.A. y Ornston, L.N. (1999) Genetic analysis of a chromosomal region containing *vanA* and *vanB*, genes required for conversion of either ferulate or vanillate to protocatechuate in *Acinetobacter*. *J. Bacteriol.* **181**: 3494-3504.
- Serre, L., Sailland, A., Sy, D., Boudec, P., Rolland, A., Pebay-Peyroula, E. y Cohen-Addad, C. (1999) Crystal structure of *Pseudomonas fluorescens* 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase: an enzyme involved in the tyrosine degradation pathway. *Structure* **7**: 977-988.
- Shapir, N., Osborne, J.P., Johnson, G., Sadowsky, M.J. y Wackett, L.P. (2002) Purification, substrate range, and metal center of AtzC: the *N*-isopropylammelide aminohydrolase involved in bacterial atrazine metabolism. *J. Bacteriol.* **184**: 5376-5384.

- Shingler, V. (2003) Integrated regulation in response to aromatic compounds: from signal sensing to attractive behaviour. *Environ. Microbiol.* **5**: 1226-1241.
- Shukla, O.P. (1986) Microbial transformation of quinoline by a *Pseudomonas* sp. *Appl. Environ. Microbiol.* **51**: 1332-1342.
- Shukla, O.P. (1989) Microbiological degradation of quinoline by *Pseudomonas stutzeri*: the coumarin pathway of quinoline catabolism. *Microbios* **59**: 47-63.
- Shukla, O.P. y Kaul, S.M. (1973) Microbial transformation of 2-picoline by *Bacillus* sp. *Indian. J. Biochem. Biophys.* **10**: 176-178.
- Shukla, O.P. y Kaul, S.M. (1986) Microbial transformation of pyridine *N*-oxyde and pyridine by *Nocardia* sp. *Can. J. Microbiol.* **32**: 330-341.
- 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.
- Song, J. y Jensen, R.A. (1996) PhhR, a divergently transcribed activator of the phenylalanine hydroxylase gene cluster of *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol. Microbiol.* **22**: 497-507.
- Song, J., Xia, T. y Jensen, R.A. (1999) PhhB, a *Pseudomonas aeruginosa* homolog of mammalian pterin 4a-carbinolamine dehydratase/DChH, does not regulate expression of phenylalanine hydroxylase at the transcriptional level. *J. Bacteriol.* **181**: 2789-2796.
- Speicher, D.W. (1994) Methods and strategies for sequence analysis of proteins on PVDF membranes. *Methods* **6**: 262-273.
- Spence, E., Kawamukai, M., Sanvoisin, J., Braven, H. y Bugg, T. (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.
- Spiers, A.J., Buckling, A. y Rainey, P.B. (2000) The causes of *Pseudomonas* diversity. *Microbiology* **146**: 2345-2350.
- Spormann, A.M. y Widdel, F. (2000) Metabolism of alkylbenzenes, alkanes, and other hydrocarbons in anaerobic bacteria. *Biodegradation* **11**: 85-105.
- Stadtman, E.R., Stadtman, T.C., Pastan, I. y Smith, L.D. (1972) *Clostridium barkeri* sp. n. *J. Bacteriol.* **110**: 758-760.
- Stanier, R.Y., Palleroni, N.J. y Doudoroff, M. (1966) The aerobic *pseudomonads*: a taxonomic study. *J Gen Microbiol.* **43**: 159-271.
- Stephan, I., Tshisuaka, B., Fetzner, S. y Lingens, F. (1996) Quinaldine 4-oxidase from *Arthrobacter* sp. Ru61a, a versatile procaryotic molybdenum-containing hydroxylase active towards *N*-containing heterocyclic compounds and aromatic aldehydes. *Eur. J. Biochem.* **236**: 155-162.
- Stover, C.K., Pham, X.Q., Erwin, A.L., Mizoguchi, S.D., Warrenner, P., Hickey, M.J., Brinkman, F.S., Hufnagle, W.O., Kowalik, D.J., Lagrou, M., Garber, R.L., Goltry, L., Tolentino, E., Westbrock-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., Wu, Z., Paulsen, I.T., Reizer, J., Saier, M.H., Hancock, R.E., Lory, S. y Olson, M.V. (2000) Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PA01, an opportunistic pathogen. *Nature* **406**: 959-964.

- Subramanian, V., Liu, T.-N., Yeh, W.K. y Gibson, D.T. (1979) Toluene dioxygenase: Purification of an iron-sulfur protein by affinity chromatography. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **91**: 1131-1139.
- Subramanian, V., Liu, T., Yeh, W., Serdar, C., Wackett, L. y Gibson, D. (1985) Purification and properties of ferredoxinTOL. A component of toluene dioxygenase from *Pseudomonas putida* F1. *J. Biol. Chem.* **260**: 2355-2363.
- Subramanian, V., Liu, T.-N., Yeh, W.K. y Gibson, D.T. (1979) Toluene dioxygenase: Purification of an iron-sulfur protein by affinity chromatography. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **91**: 1131-1139.
- 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.
- Suh, S.J., Runyen-Janecky, L.J., Maleniak, T.C., Hager, P., MacGregor, C.H., Zielinski-Mozny, N.A., Phibbs, P.V., Jr, and West, S.E.H. (2002) Effect of *vfr* mutation on global gene expression and catabolite repression control of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology.* **148**: 1561-1569.
- Sulavik, M.C., Gambino, L.F. y Miller, P.F. (1995) The MarR repressor of the multiple antibiotic resistance (*mar*) operon in *Escherichia coli*: prototypic member of a family of bacterial regulatory proteins involved in sensing phenolic compounds. *Mol. Med.* **1**: 436-446.
- Suzuki, K., Mizuguchi, M., Ohnishi, K. y Itagaki, E. (1996) Structure of chromosomal DNA coding for *Pseudomonas putida* S-1 salicylate hydroxylase. *Biochim. Biophys. Acta.* **1275**: 154-156.
- 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.
- Takenaka, S., Murakami, S., Shinke, R., Hatakeyama, K., Yukawa, H. y Aoki, K. (1997) Novel genes encoding 2-aminophenol 1,6-dioxygenase from *Pseudomonas Species* AP-3 growing on 2-aminophenol and catalytic properties of the purified enzyme. *J. Biol. Chem.* **272**: 14727-14732.
- 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.
- Thacker, R., Rorvig, O., Kahlon, P. y Gunsalus, I.C. (1978) NIC, a conjugative nicotine-nicotinate degradative plasmid in *Pseudomonas convexa*. *J. Bacteriol.* **135**: 289-290.
- Thoenes, U., Flores, O.L., Neves, A., Devreese, B., Van Beeumen, J.J., Huber, R., Romao, M.J., LeGall, J., Moura, J.J. y Rodrigues-Pousada, C. (1994) Molecular cloning and sequence analysis of the gene of the molybdenum-containing aldehyde oxidoreductase of *Desulfovibrio gigas*. The deduced amino acid sequence shows similarity to xanthine dehydrogenase. *Eur. J. Biochem.* **220**: 901-910.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G. y Gibson, T.J. (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucl. Acids Res.* **22**.
- Timmis, K.N. (2002) *Pseudomonas putida*: a cosmopolitan opportunist par excellence. *Environ. Microbiol.* **4**: 779-781.
- Tinschert, A., Tschech, A., Heinzmann, K. y Kiener, A. (2000) Novel regioselective hydroxylations of pyridine carboxylic acids at position C2 and pyrazine carboxylic acids at position C3. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **53**: 185-195.

- Titus, G.P., Mueller, H.A., Burgner, J., Rodríguez de Córdoba, S., Peñalva, M.A. y Timm, D.E. (2000) Crystal structure of human homogentisate dioxygenase. *Nat. Struct. Biol.* **7**: 542-546.
- Tobiason, D.M., Buchner, J.M., Thiel, W.H., Gernert, K.M. y Karls, A.C.G. (2001) Conserved amino acid motifs from the novel Piv/MooV family of transposases and site-specific recombinases are required for catalysis of DNA inversion by Piv. *Mol. Microbiol.* **39**: 641-651.
- 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.
- Truglio, J.J., Theis, K., Leimkuhler, S., Rappa, R., Rajagopalan, K.V. y Kisker, C. (2002) Crystal structures of the active and alloxanthine-inhibited forms of xanthine dehydrogenase from *Rhodobacter capsulatus*. *Structure* **10**: 115-125.
- Tshisuaka, B., Kappl, R., Huttermann, J. y Lingens, F. (1993) Quinoline oxidoreductase from *Pseudomonas putida* 86: an improved purification procedure and electron paramagnetic resonance spectroscopy. *Biochemistry* **32**: 12928-12934.
- Urata, M., Miyakoshi, M., Kai, S., Maeda, K., Habe, H., Omori, T., Yamane, H. y Nojiri, H. (2004) Transcriptional regulation of the *ant* operon, encoding two-component anthranilate 1,2-dioxygenase, on the carbazole-degradative plasmid pCAR1 of *Pseudomonas resinovorans* Strain CA10. *J. Bacteriol.* **186**: 6815-6823.
- Utkin, I.B., Yakimov, M.M., Matveeva, L.N., Kozlyak, E.I., Rogozhin, I.S., Solomon, Z.G. y Bezborodov, A.M. (1991) Degradation of styrene and ethylbenzene by *Pseudomonas* species Y2. *FEMS Microbiol. Lett.* **77**: 237-242.
- Vaillancourt, F.H., Bolin, J.T. y Eltis, L.D. (2004) Ring-cleavage dioxygenases. In *Pseudomonas*. Vol. 3. Ramos, J.L. (ed). New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers, pp. 359-395.
- van der Meer, J.R., de Vos, W.M., Harayama, S. y Zehnder, A.J. (1992) Molecular mechanisms of genetic adaptation to xenobiotic compounds. *Microbiol. Rev.* **56**: 677-694.
- van der Meer, J.R. (1997) Evolution of novel metabolic pathways for the degradation of chloroaromatic compounds. *Antonie van Leeuwenhoek* **71**: 159-178.
- van Elsas, J.D., Trevors, J.T. y Starodub, M.E. (1988) Bacterial conjugation between *Pseudomonads* in the rhizosphere of wheat. *FEMS Microbiol. Ecol.* **53**: 299-306.
- 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.
- Venturi, V., Zennaro, F., Degrassi, G., Okeke, B. y Bruschi, C. (1998) Genetics of ferulic acid bioconversion to protocatechuic acid in plant- growth-promoting *Pseudomonas putida* WCS358. *Microbiology* **144**: 965-973.
- 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.C. y Schore, N.E. (1994) *Organic Chemistry*. New York: W.H. Freeman and co.
- Wackett, L.P. y Gibson, D.T. (1988) Degradation of trichloroethylene by toluene dioxygenase in whole-cell studies with *Pseudomonas putida* F1. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**: 1703-1708.

- Wackett, L.P. (2003) *Pseudomonas putida*--a versatile biocatalyst. *Nat. Biotechnol.* **21**: 136-138.
- 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.
- Whited, G.M. y Gibson, D.T. (1991) Separation and partial characterization of the enzymes of the toluene-4-monooxygenase catabolic pathway in *Pseudomonas mendocina* KR1. *J. Bacteriol.* **173**: 3017-3020.
- Widdel, F. y Rabus, R. (2001) Anaerobic biodegradation of saturated and aromatic hydrocarbons. *Curr. Opin. Biotechnol.* **12**: 259-276.
- Wilbur, W.J. y Lipman, D.J. (1983) Rapid similarity searches of nucleic acid and protein data banks. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **80**: 726-730.
- Willems, M.I., Dubois, G., Boyd, D.R., Davies, R.J.H., Hamilton, L., McCullough, J.J. y van Bladeren, P.J. (1992) Comparison of the mutagenicity of quinoline and all monohydroxyquinolines with a series of arene oxide, trans-dihydrodiol, diol epoxide, *N*-oxide and arene hydrate derivatives of quinoline in the Ames/*Salmonella* microsome test. *Mutat. Res.* **278**.
- 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.
- Wirth, R., Friesenegger, A. y Fiedler, S. (1989) Transformation of various species of gram-negative bacteria belonging to 11 different genera by electroporation. *Mol. Gen. Genet.* **216**: 175-177.
- Wootton, J.C., Nicolson, R.E., Cock, J.M., Walters, D.E., Burke, J.F., Doyle, W.A. y Bray, R.C. (1991) Enzymes depending on the pterin molybdenum cofactor: sequence families, spectroscopic properties of molybdenum and possible cofactor-binding domains. *Biochim. Biophys. Acta.* **1057**: 157-185.
- Xuedong, W., Huili, W. y Defang, F. (2005) Biodegradation of imazapyr by free cells of *Pseudomonas fluorescens* biotype II and *Bacillus cereus* isolated from soil. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **74**: 350-355.
- Xun, L. y Sandvik, E.R. (2000) Characterization of 4-hydroxyphenylacetate 3-hydroxylase (HpaB) of *Escherichia coli* as a reduced flavin adenine dinucleotide-utilizing monooxygenase. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**: 481-486.
- Yamaguchi, A., Kimura, T., Someya, Y. y Sawai, T. (1993) Metal-tetracycline/H<sup>+</sup> 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, M. y Fujisawa, H. (1982) Subunit structure of oxygenase component in benzoate-1,2-dioxygenase system from *Pseudomonas arvilla* C-1. *J. Biol. Chem.* **257**: 12497-12502.
- Yamamoto, S., Katagiri, M., Maeno, H. y Hayaishi, O. (1965) Salicylate hydroxylase, a monooxygenase requiring flavin adenine dinucleotide. I. Purification and general properties. *J. Biol. Chem.* **240**: 3408-3413.
- Yoshida, T. y Nagasawa, T. (2000) Enzymatic functionalization of aromatic *N*-heterocycles: Hydroxylation and carboxylation. *J. Biosci. Bioeng.* **89**: 111-118.



- You, I.S., Murray, R.I., Jollie, D. y Gunsalus, I.C. (1990) Purification and characterization of salicylate hydroxylase from *Pseudomonas putida* PpG7. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **169**: 1049-1054.
- 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*. *Mol. Microbiol.* **54**: 223-238.
- Zajc, A., Joao Romao, M., Turk, B. y Huber, R. (1996) Crystallographic and fluorescence studies of ligand binding to *N*-carbamoylsarcosine amidohydrolase from *Arthrobacter* sp. *J. Mol. Biol.* **263**: 269-283.
- Zhou, N.-Y., Al-Dulayymi, J., Baird, M.S. y Williams, P.A. (2002) Salicylate 5-hydroxylase from *Ralstonia* sp. Strain U2: a monooxygenase with close relationships to and shared electron transport proteins with naphthalene dioxygenase. *J. Bacteriol.* **184**: 1547-1555.