

Papel del sistema de secreción TPS en la captación de hierro y colonización de la esfermosfera de plantas por *Pseudomonas putida* KT2440



M^a Antonia Molina Henares

UNIVERSIDAD DE GRANADA. 2005

Editor: Editorial de la Universidad de Granada
Autor: María Antonia Molina Henares
D.L.: Gr. 1968 - 2005
ISBN: 84-338-3624-2

**CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS
ESTACIÓN EXPERIMENTAL DEL ZAIDÍN**



**UNIVERSIDAD DE GRANADA
FACULTAD DE FARMACIA**



**PAPEL DEL SISTEMA DE SECRECIÓN TPS EN LA
CAPTACIÓN DE HIERRO Y COLONIZACIÓN DE LA
ESPERMOSFERA DE PLANTAS POR *Pseudomonas putida*
KT2440**

TESIS DOCTORAL

María Antonia Molina Henares

2005

**PAPEL DEL SISTEMA DE SECRECIÓN TPS EN LA CAPTACIÓN DE
HIERRO Y COLONIZACIÓN DE LA ESPERMOSFERA DE PLANTAS POR
Pseudomonas putida KT2440**

Memoria que presenta la licenciada en
Farmacia, María Antonia Molina Henares, para
aspirar al Título de Doctora

Fdo.: M^a Antonia Molina Henares

V^oB^o Los directores

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

Fdo.: Manuel Espinosa Urgel
Doctor en Biología
Contratado Ramón y Cajal

Universidad de Granada
2005

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

A mi familia
A Juan y Juanmi

“El verdadero significado
de la vida está en los detalles”

Agradecimientos

El trabajo presentado en esta memoria es el resultado de varios años de esfuerzo y dedicación en los que se ha necesitado una gran ayuda tanto personal como profesional. Por esto quiero dar las gracias a todas aquellas personas que de una u otra manera han hecho posible la realización de esta Tesis Doctoral y sin los que habría sido imposible llegar hoy hasta aquí.

En primer lugar quisiera agradecer a mis directores, al Dr. Juan Luis Ramos y Dr. Manuel Espinosa-Urgel, su excelente supervisión. Al Dr. Juan Luis Ramos, director del grupo de Degradación de Tóxicos Orgánicos de la Estación Experimental del Zaidín, por su confianza y por ser un modelo de trabajador infatigable y brillante. Muchas gracias por permitirme formar parte de tu equipo. Al Dr. Manuel Espinosa, siempre dispuesto a ayudar y a escuchar. Por todo el tiempo que me has dedicado, por haber compartido estos años de trabajo conmigo y enseñarme todo lo necesario para poder llevar a cabo este trabajo, y sobre todo por tu amistad.

A Olga, por ser mi amiga y por los buenos ratos de trabajo juntas. A Dietmar, Javi, Nuria, Ana H., Ana S., Mar, Marichu, Maribel, Estrella y, como no me quiero dejar a nadie, a todas aquellas personas con las que he aprendido que una de las cosas más importantes es trabajar en un buen equipo.

A P. Domínguez, Wilson y Olga por ser mis “lazarillos” en radiactividad. Gracias a todos mis compañeros del laboratorio, a los nuevos y a los que ya han buscado otro camino.

Quisiera también agradecer a aquellas personas que no siendo de este grupo han supuesto una inestimable ayuda.

A los informáticos César, Javi y Alejandro por sacarme de más de un apuro y por esos cafés a media mañana. A Antonio J., mi hermano, por su inestimable paciencia y ayudarme con algún que otro “desaguisado” informático.

A la Estación Experimental del Zaidín en su conjunto, a su administración, al personal de mantenimiento, de biblioteca y de compras, por hacernos el trabajo más fácil.

A mi familia, que siempre ha estado a mi lado en los buenos y no tan buenos momentos, por vuestro apoyo y ayuda incondicional. Y sobre todo a Juan y Juanmi, los “niños” de mi casa. Espero poder dedicaros más tiempo a partir de ahora.

ÍNDICE

ÍNDICE	xiii
ABREVIATURAS	xxi
ÍNDICE DE FIGURAS	xxiii
ÍNDICE DE TABLAS	xxvii
INTRODUCCIÓN	1
1. VERSATILIDAD DEL GÉNERO <i>Pseudomonas</i>	3
2. LA RIZOSFERA Y SU MEDIO AMBIENTE	6
2.1. El entorno rizosférico	6
2.2. Actividad microbiana en la rizosfera	7
2.3. Biofilms en la rizosfera	11
3. EL SISTEMA TPS (TWO-PARTNER SECRETION)	13
4. TRANSPORTE DE HIERRO EN LAS BACTERIAS GRAM-NEGATIVAS	18
OBJETIVOS	21
MATERIALES Y MÉTODOS	25
1. CEPAS BACTERIANAS	27
1.1. Conservación de las estirpes bacterianas	28
2. PLÁSMIDOS	28
3. MEDIOS DE CULTIVO	35
3.1. Medios ricos	35
3.2. Medios mínimos	35
3.3. Condiciones de cultivo	36
3.4. Antibióticos	37
4. CURVAS DE CRECIMIENTO	37
5. TRANSFERENCIA DE PLÁSMIDOS: CONJUGACIÓN	38
6. AISLAMIENTO DE ADN PLASMÍDICO	39

6.1. Método de “Qiapreps”	39
6.2. Método de la lisis alcalina	39
7. AISLAMIENTO DE ADN TOTAL	40
8. TRANSFORMACIÓN DE CÉLULAS DE <i>Escherichia coli</i> y <i>Pseudomonas</i> <i>sp.</i>	41
8.1. Preparación de células competentes	41
8.2. Transformación	41
8.3. Electrotransformación	42
9. MANIPULACIÓN DE ADN Y ARN	43
9.1. Determinación de la concentración de ADN y ARN	43
9.2. Digestión de ADN con enzimas de restricción	43
9.3. Defosforilación de ADN con fosfatasa alcalina	44
9.4. Electroforesis de ADN y ARN en geles de agarosa	44
9.5. Recuperación de fragmentos de ADN de geles de agarosa	46
9.6. Ligación de ADN	46
9.7. Reacción de amplificación en cadena con ADN polimerasa termorresistente (PCR)	46
9.8. Secuenciación de ADN	47
9.9. Aislamiento y purificación de ARN	48
9.10. Reacción de amplificación en cadena con ADN polimerasa termorresistente acoplada a una reacción de transcripción reversa (RT-PCR)	49
9.10.1. Cebadores utilizados	49
9.10.2. Reacción de amplificación en cadena con ADN polimerasa termorresis- tente acoplada a una reacción de transcripción reversa (RT-PCR)	50
10. EXTENSIÓN REVERSA A PARTIR DE UN CEBADOR	51
10.1. Marcaje de cebadores	51
10.2. Reacción de extensión	51
10.3. Separación de las cadenas extendidas de ADNc mediante electroforesis	53
11. MUTAGÉNESIS	53
11.1. Construcción de mutantes por reemplazamiento alélico	53

12. TRANSFERENCIA DE ADN A MEMBRANA POR EL MÉTODO DE “SOUTHERN BLOT” E HIBRIDACIÓN	54
12.1. Transferencia por capilaridad	54
12.2. Marcaje no radiactivo de ADN lineal	55
12.3. Prehibridación e hibridación	56
12.4. Detección inmunológica	56
13. ENSAYOS DE MOVILIDAD BACTERIANA	57
14. ENSAYOS DE RESISTENCIA/SENSIBILIDAD	57
14.1. Ensayos de resistencia/sensibilidad a antibióticos	57
14.2. Ensayos de resistencia/sensibilidad a diferentes compuestos químicos	58
15. MICROCOSMOS EDÁFICOS	59
16. EXPERIMENTOS DE COLONIZACIÓN DE LA RIZOSFERA	61
16.1. Plantas utilizadas	61
16.2. Esterilización de semillas en superficie	61
16.3. Inoculación de semillas	61
16.4. Experimentos bajo condiciones de invernadero	62
16.5. Supervivencia de cepas bacterianas en raíz, rizosfera y suelo no rizosférico	62
17. ENSAYOS DE ADHESIÓN	63
17.1. Plantas utilizadas	63
17.2. Esterilización de semillas en superficie	63
17.3. Adhesión a semillas	63
18. OBTENCIÓN DE EXUDADOS RADICULARES	64
19. MEDIDA DE LA ACTIVIDAD β -GALACTOSIDASA	65
20. DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS EN EL MEDIO EXTRACELULAR	66
20.1. Preparación de proteínas del sobrenadante	66
20.2. Aislamiento de proteínas de la membrana externa	67
21. SEPARACIÓN DE PROTEÍNAS POR ELECTROFORESIS DESNATURALIZANTE EN GEL DE POLIACRILAMIDA	67
21.1. Separación de proteínas desnaturante en gel de poliacrilamida en presencia de SDS (PAGE-SDS)	67
21.2. Tinción de proteínas con Azul de Coomassie	67

22. CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS	69
23. TÉCNICAS DE MICROSCOPIA	69
23.1. Microscopía electrónica de transmisión	69
23.2. Microscopía electrónica de barrido	70
24. PROGRAMAS INFORMÁTICOS UTILIZADOS	71
RESULTADOS	73
CAPÍTULO I: ANÁLISIS DE SECUENCIA Y ORGANIZACIÓN GÉNICA.	75
RESUMEN	75
1. Entorno genético del cluster de genes <i>hlpBA</i> de <i>P. putida</i> KT2440	77
2. Comparación de HlpA y HlpB con las secuencias disponibles en las bases de datos	83
2.1. Comparación de HlpA con las secuencias de distintas bases de datos	83
2.2. Comparación de HlpB con las secuencias de distintas bases de datos	92
3. Análisis de la secuencia de ADN que flanquea los genes <i>hlpB-hlpA</i> y comparación con las secuencias existentes en las distintas bases de datos	97
CAPÍTULO II: EXPRESIÓN GÉNICA	101
RESUMEN	101
1. Análisis de la organización transcripcional de los genes <i>hlpBA</i> de <i>P. putida</i> KT2440 mediante RT-PCR	103
2. Estudio de la expresión de los genes <i>hlpBA</i> en <i>P. putida</i> KT2440	105
2.1. Identificación del promotor P _{hlp} mediante determinación de los niveles de ARN mensajero (primer extension)	105
2.2. Caracterización de la expresión del operón <i>hlpBA</i> mediante determinación de la actividad β-galactosidasa en fusiones transcripcionales con el gen ' <i>lacZ</i>	109
2.2.1. Construcción de la fusión transcripcional del promotor de los genes <i>hlpB</i> y <i>hlpA</i> con el gen marcador ' <i>lacZ</i>	109
2.2.2. Estudio de la expresión del promotor P _{hlp} en diferentes medios	111
2.2.3. Análisis de la participación de factores transcripcionales en la expresión de los genes <i>hlpBA</i>	116

2.2.4. Estudio de la inducción de la expresión de los genes <i>hlpB</i> y <i>hlpA</i> en respuesta a exudados de semillas de maíz	117
CAPÍTULO III: CONSTRUCCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE MUTANTES <i>hlp</i> DE <i>P. putida</i> KT2440	121
RESUMEN	121
1. Construcción del mutante mus-28 de <i>P. putida</i> KT2440 y aislamiento del cósmido pNEMO2	123
2. Localización subcelular de las proteínas HlpA y HlpB	128
3. Caracterización fenotípica de los mutantes mus-27 y mus-28 de <i>Pseudomonas putida</i> KT2440	129
3.1. Crecimiento de los mutantes en diferentes medios de cultivo	129
3.2. Análisis de movilidad celular de los mutantes mus-27 y mus-28 de <i>P. putida</i>	130
3.3. Ensayos de resistencia/sensibilidad a diferentes compuestos	131
3.4. Ensayo de actividad hemolítica en <i>P. putida</i> KT2440 y mutantes mus-27 y mus-28	133
3.5. Efecto de la limitación de hierro sobre el crecimiento de la cepa silvestre y mutantes por la presencia de un agente quelante de hierro en el medio de cultivo	133
3.6. Observación de los mutantes al microscopio electrónico.	139
CAPÍTULO IV: PAPEL DEL SISTEMA TPS HlpA/HlpB EN LA INTERACCIÓN DE <i>P. putida</i> KT2440 CON PLANTAS Y LA SUPERVIVENCIA EN SUELOS	143
RESUMEN	143
1. Adhesión de <i>P. putida</i> KT2440 y mutantes mus-27, mus-28 a distintas semillas	145
2. Supervivencia de <i>P. putida</i> KT2440 y mutantes mus-27, mus-28 en microcosmos edáficos	147
3. Colonización de la rizosfera de planta de maíz por la cepa <i>P. putida</i> KT2440 en condiciones controladas de invernadero	148
3.1. Colonización de la rizosfera de planta de maíz por los mutantes mus-27 y mus-28 en competición con la cepa parental <i>P. putida</i> KT2440R	149

4. Papel del hierro en la colonización de semillas	151
DISCUSIÓN	157
1. ORGANIZACIÓN TRANSCRIPCIONAL DE LOS GENES <i>hlpBA</i> EN <i>P. putida</i> KT2440	160
2. SISTEMA DE SECRECIÓN TPS EN <i>P. putida</i> KT2440	164
3. LA PROTEÍNA HlpA ESTÁ INVOLUCRADA EN LA ADQUISICIÓN DE HIERRO	168
4. SUPERVIVENCIA EN SUELO, ADHESIÓN Y COLONIZACIÓN DE SEMILLAS DE LOS MUTANTES <i>mus-27</i> Y <i>mus-28</i> DE <i>P. putida</i>	172
5. EL HIERRO FAVORECE LA ADHESIÓN DE <i>P. putida</i> KT2440 A SEMILLAS DE MAÍZ	176
6. UN MUTANTE EN EL SISTEMA <i>TonB</i> DE <i>P. putida</i> KT2440 ESTÁ AFECTADO EN LA ADHESIÓN A SEMILLA	177
CONCLUSIONES	179
BIBLIOGRAFÍA	183

ABREVIATURAS

ADNc	ADN complementario	LPS	lipopolisacárido
Ap	ampicilina	MATAB	bromuro de alquil-trimetil-amonio
ARNasa	ribonucleasa	medio LB	medio Luria-Bertani
ARNm	ARN mensajero	mg	miligramos
AT	autotransportador	min	minuto(s)
ATP	adenosín trifosfato	ml	mililitros
BCIP	5-bromo-4-cloro-3-indolilfosfato	μl	microlitros
Cm	cloramfenicol	Nal	ácido nalidíxico
cpm	cuentas por minuto	ONPG	<i>o</i> -nitrofenil-β-D-galactopiranosido
DEPC	dietil pirocarbonato	p/v	peso/volumen
DMSO	dimetilsulfóxido	pb	pares de bases
dNTPs	desoxinucleótidos	PAGE-SDS	electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS
DO₆₆₀	turbidez medida a λ=660nm	PCR	reacción en cadena de la polimerasa
DOC	deoxicolato	PMSF	fluoruro de fenilmetanosulfonilo
DTT	ditiotreitól	ref.	Referencia
EDTA	ácido etilendiaminotetraacético	Rif	rifampicina
Fig.	figura	rpm	revoluciones por minuto
% G +C	porcentaje de guanina más citosina de un ácido nucleico	RT-PCR	reacción en cadena de la polimerasa acoplada a una reacción de transcripción reversa
g	gramo	SCM	sitio de clonación múltiple
Gm	gentamicina	SDS	dodecil sulfato sódico
h	horas	s	segundo(s)
H₂O_d	agua desionizada	Sac	sacarosa
H₂O_{DEPC}	agua desionizada tratada con DEPC	Sm	estreptomina
IPTG	isopropil-β-D-tiogalactopiranosido	Tc	tetraciclina
kb	kilobases	TEMED	N,N,N',N'-tetrametiletildiamina
kDa	kilodalton		
Km	kanamicina		

TPS	two-partner secretion	v/v	volumen/volumen
Tris	tris(hidroximetil) aminometano	X-gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil- β - D-galactopiranosido
U	unidades enzimáticas		
UFC	unidades formadoras de colonias		

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura I.1.	Esquema de las etapas de colonización de la rizosfera	10
Figura I.2.	Representación esquemática del sistema TPS	15
Figura I.3.	Modelo propuesto para la translocación de la proteína TpsA	17
Figura M.1	Plásmido pUC18Not	29
Figura M.2	Plásmido pKNG101	30
Figura M.3	Plásmido pMP220	31
Figura M.4	Plásmido p34S-Km3	32
Figura M.5	Mapa del transposón mini-Tn5 <i>phoA</i>	33
Figura C.I.1.	Esquema de la región de 10520 pb del cromosoma de <i>P. putida</i> KT240 que contiene el conjunto de genes <i>hlpBA</i> .	78
Figura C.I.2.	Secuencia correspondiente a los genes <i>hlpB</i> y <i>hlpA</i> de <i>P. putida</i> KT2440 y su traducción en aminoácidos	82
Figura C.I.3.	Alineamiento múltiple de HlpA con otras proteínas	89
Figura C.I.4.	Árbol filogenético de miembros reconocidos actualmente de la familia TPS	90
Figura C.I.5.	Estructura primaria de la región amino terminal de HlpA y del supuesto péptido señal	91
Figura C.I.6.	Alineamiento múltiple de HlpB con otras proteínas	93
Figura C.I.7.	Estructura primaria de la región amino terminal de HlpB y del supuesto péptido señal	95
Figura C.I.8.	Árbol filogenético de las proteínas pertenecientes a este sistema de secreción TPS	97
Figura C.II.1.	Análisis mediante RT-PCR de la organización transcripcional de los genes <i>hlpBA</i> en <i>P. putida</i> KT2440	104
Figura C.II.2.	Determinación de la región promotora de los genes <i>hlpBA</i> de <i>P. putida</i> KT2440	107
Figura C.II.3.	Localización mediante RT-PCR de la existencia de una región promotora aguas arriba del gen <i>hlpB</i> en <i>P. putida</i> KT2440	108

Figura C.II.4.	Mapa de la agrupación génica <i>hlpBA</i> de <i>P. putida</i> KT2440 y de la posición de la fusión transcripcional al gen <i>lacZ</i> (A y B). Ensayo de actividad β -galactosidasa del plásmido pNEMO6 y pNEMO5 en <i>P. putida</i> KT2440 (C)	110
Figura C.II.5.	Efecto de la fase de crecimiento (A) y de la concentración de hierro (B) en la expresión de los genes <i>hlpB</i> y <i>hlpA</i> de <i>P. putida</i> KT2440	113
Figura C.II.6.	Efecto de la fase de crecimiento (A) y de la concentración de hierro (B) en la expresión de los genes <i>hlpB</i> y <i>hlpA</i> de <i>P. putida</i> KT2440	114
Figura C.II.7.	Efecto de la participación de factores transcripcionales en la expresión de los genes <i>hlpB</i> y <i>hlpA</i> de <i>P. putida</i> KT2440	117
Figura C.II.8.	Efecto del exudado de semillas de maíz en la expresión de los genes <i>hlpB</i> y <i>hlpA</i> de <i>P. putida</i> KT2440	118
Figura C.II.9.	Efecto del exudado radicular de maíz en la expresión de los genes <i>hlpB</i> y <i>hlpA</i> de <i>P. putida</i> KT2440	119
Figura C.III.1.	Estrategia seguida para la construcción del mutante mus-28 y análisis mediante hibridación de ADN	125
Figura C.III.2.	Electroforesis del ADNc amplificado usando como molde ARN de mus-27 y mus-28	126
Figura C.III.3.	Identificación mediante hibridación de cósmidos que portaban el operón completo <i>hlpBA</i>	127
Figura C.III.4.	Análisis de las proteínas de membrana externa (A) y del sobrenadante (B) de <i>P. putida</i> KT2440 y mutantes no polares mus-27 y mus-28.	129
Figura C.III.5.	Estructura del compuesto 2,2'-bipiridina (agente quelante) y 4,4'-bipiridina (agente no quelante)	134
Figura C.III.6.	Tolerancia de <i>P. putida</i> KT2440 y mutantes en placas de doble difusión con gradiente de 2,2'-bipiridina (A) y 4,4'-bipiridina (B)	135
Figura C.III.7.	Efecto de la limitación de hierro por EDDHA (A) o 2,2-bipiridina (B) en el crecimiento de <i>P. putida</i> KT2440 y mutantes mus-27, mus-28 y mus-27(pNEMO2) en medio mínimo MB2 (glucosa 0,5% [p/vol]) deficiente de hierro	136
Figura C.III.8.	Producción de sideróforos detectada por exposición de cultivos a la luz UV	137

Figura C.III.9.	Cuantificación de la producción de sideróforos por espectrofotometría	138
Figura C.III.10.	Producción de pioverdina en cultivos de <i>P. putida</i> KT2440 y mutantes cultivados bajo diferentes condiciones	139
Figura C.III.11.	Fotografías de microscopio electrónico de transmisión de secciones ultrafinas de células de <i>P. putida</i> KT2440 (A, E) y mutantes mus-27 (B, G), mus-28 (C, F) y mus-27(pNEMO2) (D)	141
Figura C.III.12.	Microscopía electrónica de barrido de células de <i>P. putida</i> KT2440 y mutantes mus-27, mus-28 y mus-27(pNEMO2)	142
Figura C.IV.1.	Adhesión de <i>P. putida</i> KT2440 y mutantes a semillas de maíz (A), haba (B), guisante (C), y adhesión de KT2440, mutantes y mus-27 portando pNEMO2 a semillas de maíz (D)	146
Figura C.IV.2.	Supervivencia de la cepa <i>P. putida</i> KT2440 y mutantes mus-27, mus-28 en suelo tipo franco	147
Figura C.IV.3.	Supervivencia de la cepa <i>P. putida</i> KT2440 en la raíz, rizosfera y suelo no rizosférico de planta de maíz	149
Figura C.IV.4.	Supervivencia de la cepa <i>P. putida</i> KT2440R en competencia con el mutante mus-27 en la raíz, rizosfera y suelo no rizosférico de planta de maíz	150
Figura C.IV.5.	Supervivencia de la cepa <i>P. putida</i> KT2440R en competencia con el mutante mus-28 en la raíz, rizosfera y suelo no rizosférico de planta de maíz	151
Figura C.IV.6.	Detección de hierro en semillas de maíz	152
Figura C.IV.7.	Efecto de quelantes de hierro en la colonización a semillas por <i>P. putida</i>	153
Figura C.IV.8.	Papel del hierro en la adhesión irreversible y reversible a semillas de maíz	154
Figura C.IV.9.	Adhesión de <i>P. putida</i> KT2440 y mutante PSC209 a semillas de maíz	155
Figura D.1.	Organización de los genes del sistema TPS	161
Figura D.2.	Fotografías de microscopio electrónico de transmisión de secciones ultrafinas de células de <i>P. putida</i> IH-2000 (A) y del mutante mus-27 (B)	163

Figura D.3.	Aminoácidos de proteínas TpsA importantes para la interacción específica entre la exoproteína y el transportador en el proceso de secreción	166
Figura D.4.	Modelo propuesto para el sistema TPS de <i>P. putida</i>	171

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Funciones y conservación de genes implicados en adhesión a semillas	10
Tabla M.1.	Estirpes bacterianas utilizadas en este trabajo	27
Tabla M.2.	Plásmidos utilizados en este trabajo	28
Tabla M.3.	Plásmidos que se han construido en este trabajo	34
Tabla M.4.	Oligonucleótidos utilizados como cebadores en las reacciones de extensión	49
Tabla M.5.	Oligonucleótidos utilizados como cebadores en las reacciones de extensión	52
Tabla M.6.	Características físico-químicas del suelo utilizado	59
Tabla M.7.	Características granulométricas del suelo utilizado	59
Tabla M.8.	Direcciones de Internet	71
Tabla C.I.1.	Proteínas con las que HlpA de <i>P. putida</i> presenta alta identidad	84
Tabla C.I.2.	Proteínas con las que HlpB de <i>P. putida</i> presenta alta identidad	92
Tabla C.I.3.	Marcos de lectura abiertos encontrados en la región de 10,5 kb del cromosoma de <i>P. putida</i> KT2440 que flanquean los genes <i>hlpB</i> y <i>hlpA</i>	99
Tabla C.III.1.	Tiempos de generación de <i>P. putida</i> KT2440 y mutantes en medio mínimo M9 con diferentes fuentes de carbono	130
Tabla C.III.2.	Resistencia de <i>P. putida</i> y mutantes a compuestos químicos	131
Tabla C.III.3.	Sensibilidad/Resistencia a diferentes antibióticos para <i>P. putida</i> y mutantes	132
Tabla D.1.	Funciones de proteínas TpsA del sistema TPS	165

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

1. VERSATILIDAD DEL GÉNERO *Pseudomonas*

Las enfermedades de plantas juegan un papel importante en la disminución de los recursos agrícolas naturales. La pérdida en las cosechas a consecuencia de las enfermedades alcanzan un 25% del rendimiento en los países desarrollados (Europa y Norte América) y casi un 50% en los países en vías de desarrollo. Durante muchos años, el control de las enfermedades de plantas se ha realizado mediante el empleo de compuestos químicos. El uso poco racional de este sistema ha favorecido en los últimos años el desarrollo de estirpes patógenas resistentes a fungicidas y bactericidas. Debido a estas resistencias, los compuestos químicos deben ser utilizados a dosis cada vez más elevadas. El control biológico de patógenos con microorganismos antagonistas ofrece una alternativa atractiva a los pesticidas químicos para el control de enfermedades vegetales. Existen un gran número de microorganismos con capacidad potencial para limitar el crecimiento de patógenos de plantas *in vitro* o en plantas sometidas a condiciones ambientales controladas o semicontroladas (Weller, 1988). Sin embargo, sólo algunos antagonistas son capaces de controlar la enfermedad en condiciones naturales (Weller, 1988). Las rizobacterias promotoras del crecimiento de plantas (PGPR de *plant-growth-promoting rhizobacteria*) colonizan raíces de plantas y causan un incremento en el crecimiento de la planta y su producción (Burr *et al.*, 1978; Kloepper *et al.*, 1978; Kloepper *et al.*, 1980; Suslow y Schroth, 1981).

Algunas bacterias promueven el crecimiento de las plantas, por ejemplo, facilitando la captación de nutrientes o produciendo fitohormonas (*Pseudomonas*, *Serratia*, *Azospirillum* y *Bacillus*, entre otros microorganismos). Otras actúan como agentes de control biológico produciendo, por ejemplo, antifúngicos (Lugtenberg *et al.*, 1999; Montesinos *et al.*, 2002). No obstante como paso previo, es necesario que tenga lugar una colonización efectiva por parte del microorganismo en cuestión. La colonización del sistema de raíces de plantas, es el primer paso en casi todas las interacciones entre plantas y microorganismos del suelo (Simona *et al.*, 1996). Dicho proceso requiere el establecimiento del microorganismo en la raíz emergente, multiplicación del mismo y su posterior establecimiento (Kloepper *et al.*, 1988). Entre los microorganismos con

capacidad de biocontrol, cabe destacar las bacterias del género *Pseudomonas*, de gran interés dado su carácter ubicuo en la naturaleza.

Las bacterias del género *Pseudomonas* están ampliamente distribuidas en el medio ambiente, ya que es posible encontrarlas en todo tipo de suelos y aguas de distintas latitudes. Están clasificadas filogenéticamente dentro del grupo I de las γ -proteobacterias como bacilos gram-negativos quimiorganotróficos aerobios y móviles, con flagelos generalmente polares (Palleroni, 1984). Su peculiar capacidad de crecimiento en medios de cultivo muy simples ha facilitado, principalmente en las últimas cuatro décadas, numerosos y profundos estudios de este amplio grupo taxonómico, tanto en el ámbito metabólico como en el fisiológico y el genético.

Los extensos estudios nutricionales destacan la particular versatilidad metabólica de los miembros de este género (Stanier, *et al.*, 1966), una característica que le otorga un papel nada despreciable en la mineralización y reciclado de la materia orgánica, tanto de origen biogénico como xenobiótico.

El género *Pseudomonas* incluye cepas patógenas oportunistas de animales, como *P. aeruginosa*, patógenos de plantas como *P. syringae*, y cepas que estimulan el crecimiento de plantas actuando como agentes de biocontrol, como *P. fluorescens* (Lugtenberg *et al.*, 1999). Las bacterias del suelo pertenecientes al género *Pseudomonas* se caracterizan además de por su elevada versatilidad metabólica, por una serie de características que las hacen atractivas para numerosas aplicaciones medioambientales y usos agrícolas (Ramos *et al.*, 1994). En los últimos cinco años se ha secuenciado el genoma de las cepas *P. aeruginosa* PAO1 (Stover *et al.*, 2000), *P. putida* KT2440 (Nelson *et al.*, 2002), *P. syringae* pv. tomato DC3000 (Buell *et al.*, 2003), *P. syringae* pv. phaseolicola 1448A, *P. syringae* pv. *syringae* B728a y *P. fluorescens* Pf-5. El análisis de sus genomas ha revelado que comparten cerca del 70% de los genes. Estas bacterias presentan como media 5500 genes en sus genomas, la mitad de ellos sin función conocida.

La cepa *Pseudomonas putida* KT2440, objeto de nuestro estudio, es una bacteria gram-negativa perteneciente al grupo de las *Pseudomonas* “fluorescentes”, denominadas así por la producción de pigmentos que emiten fluorescencia. Deriva de la cepa *P. putida* mt-2, aislada de un campo de cultivo en Japón en 1960 (Nakazawa, 2002). Esta cepa portaba el plásmido TOL pWW0, el cual incluye los genes que codifican las enzi-

mas necesarias para la degradación de toluenos y xilenos (Worsey & Williams 1975). En 1981 aparece *Pseudomonas putida* KT2440 (Bagdasarian *et al.*, 1981), un derivado de mt-2 curado del plásmido pWW0 y presuntamente deficiente en el mecanismo de restricción de ADN exógeno, lo que hace que esta cepa sea ampliamente utilizada para la expansión de rutas catabólicas con fines degradativos (Bagdasarian & Timmis 1982; Ramos *et al.*, 1994) y como hospedador en la clonación y expresión de genes heterólogos para su utilización en procesos de biotransformación de compuestos químicos con valor añadido (Delgado *et al.*, 1992; Kraak *et al.*, 1997; Kellerhals *et al.*, 1999) o de interés farmacológico (Tan *et al.*, 1997). La ubicuidad de *P. putida* refleja su elevada capacidad para adaptarse a una enorme variedad de condiciones físico-químicas presentes en los distintos hábitats donde vive. Esta habilidad representa la capacidad que tiene la cepa de integrar las señales recibidas del medio extracelular con el estado fisiológico celular, conllevando la activación de una apropiada y compleja red de regulación que controla el metabolismo celular (Regenhardt *et al.*, 2002).

P. putida KT2440 puede colonizar la rizosfera de maíz y otras plantas a alta densidad celular lo que hace que esta cepa sea un candidato adecuado para la rizorremediación (Molina *et al.*, 2000), esto es, la degradación de compuestos de naturaleza tóxica mediante el uso de microorganismos asociados a las raíces de plantas, o para el empleo del control biológico mediante la expresión de proteínas con actividad insecticida. Numerosos son los trabajos de investigación que proponen la combinación del potencial metabólico de ciertas bacterias, bien sean naturales o construidas mediante ingeniería genética, y el efecto beneficioso de la rizosfera de la planta en el crecimiento de las bacterias (Kloepper *et al.*, 1980), lo que conlleva en muchas ocasiones la liberación de microorganismos manipulados genéticamente.

2. LA RIZOSFERA Y SU MEDIO AMBIENTE

2.1. EL ENTORNO RIZOSFÉRICO

Cepas pertenecientes a las especies *Pseudomonas fluorescens* y *Pseudomonas putida* son bacterias de suelo cuyas características las hacen muy atractivas para usos medioambientales y agrícolas. Como mencionamos al principio de la Introducción, *P. putida* KT2440 presenta una buena adaptación a la rizosfera de plantas de interés agrícola, entre otras el maíz y el tomate. El término rizosfera, propuesto por Hiltner en 1904, hace referencia a la fracción de suelo en contacto directo con la raíz que se encuentra bajo la influencia biológica y física de la misma (Curl y Truelove, 1986; Lushenhop *et al.*, 1991; Russell, 1977). Este entorno es extremadamente complejo y con una actividad biológica intensa (Lynch, 1982; Schippers *et al.*, 1987) donde los microorganismos metabolizan los nutrientes exudados por la raíz (Lynch, 1991; Lynch y Whipps, 1990). Se ha estimado que un 20% o un porcentaje mayor del peso seco de la planta es liberado a través de la raíz (Barber y Martín, 1976; Hamlen *et al.*, 1972; Vancura, 1988; Whipps, 1987). Este material se compone fundamentalmente por células desprendidas de la raíz, mucílago, exudados y lisados, los cuales contienen aminoácidos, proteínas, azúcares, carbohidratos complejos, alcoholes, vitaminas y hormonas. Los aminoácidos constituyen una fracción importante del total de los exudados de la raíz, por ejemplo, en *Brassica napus* pueden alcanzar el 60-85% del total (Svenningsson *et al.*, 1990; Sundin *et al.*, 1990). La composición de estos exudados depende de la edad de la planta, de su estatus fisiológico y de las condiciones ambientales (Barber y Lynch, 1977; Rovira, 1969). En el caso del tomate se ha identificado la composición de exudados de raíz, donde los ácidos orgánicos constituyen la fracción más importante, siendo el más abundante el citrato (Lugtenberg, 2004). Debido a la riqueza en nutrientes que presentan los exudados, éstos constituyen un factor determinante para la fitoestimulación de la actividad microbiana en la rizosfera (Miller y Wood, 1996). Además de nutrientes, los exudados son ricos también en productos del metabolismo secundario.

Las bacterias de la rizosfera pueden promover en algunos casos la liberación de exudados de la raíz (Barber y Martín, 1976; Prikryl y Vancura, 1980; Vancura, 1988) a través de la producción de reguladores del crecimiento de plantas, vitaminas, toxinas,

enzimas celulolíticos u otros compuestos, o a través de la alteración de la disponibilidad de los nutrientes (Klein *et al.*, 1988; Lynch, 1982; Vancura, 1988). Los recursos base en la rizosfera no son sólo complejos desde el punto de vista químico, sino que no están distribuidos homogéneamente (Loper *et al.*, 1984; Lynch, 1991; Lynch y Wipps, 1990).

2.2. ACTIVIDAD MICROBIANA EN LA RIZOSFERA

Determinados compuestos presentes en los exudados, a bajas concentraciones, actúan como quimioatrayentes para las bacterias que habitan en la rizosfera. Así, el benzoato a concentración de 10^{-9} a 10^{-12} M atrae a especies de *Azospirillum* (López-de-Victoria y Lovell 1993), la luteolina (10^{-9} M) atrae a *Agrobacterium tumefaciens* y *Rhizobium meliloti* (Caetano-Anolles *et al.*, 1988; Bauer y Caetano-Anolles 1991; Dharmatilake y Bauer 1992). Ciertos aminoácidos (glutamato, treonina, serina, cisteína y arginina), a elevadas concentraciones (10^{-2} a 10^{-3} M) atraen a ciertas especies de *Pseudomonas*, como por ejemplo, *P. lachymans* (Chet *et al.*, 1973) y *P. aeruginosa* (Nikata *et al.*, 1992).

Las densidades microbianas encontradas en la rizosfera son en general del orden de 10^9 células por g de suelo o raíz (Curl y Truelove, 1986); esto es, 100 a 1000 veces superior a las encontradas en el suelo no rizosférico. Sin embargo, este gran número de microorganismos no debe traducirse como la existencia de gran actividad fisiológica para todos los microorganismos asociados a la rizosfera. En general, los microorganismos que habitan la rizosfera se encuentran creciendo, con baja tasa de división (Bowen y Rovira, 1976). Se considera que la actividad microbiana en la rizosfera es relativamente alta en los ápices radiculares o en los lugares donde comienzan a emerger raíces laterales, donde los microorganismos parecen recibir un pulso temporal de carbono gracias a los exudados radiculares o los lisados celulares.

Los primeros estudios sobre la comunidad microbiana de la rizosfera sugirieron que las Pseudomonadaceae son los microorganismos predominantes asociados con las raíces de plantas, constituyendo entre el 30-90% de los organismos cultivables en medios sólidos (Vancura, 1980). La introducción de cepas bacterianas en la rizosfera de plantas con fines agrícolas viene realizándose desde hace poco tiempo. Los objetivos perseguidos con estas liberaciones de microorganismos al medio ambiente que, en gene-

ral, se realiza mediante la inoculación de semillas de la planta correspondiente con el microorganismo en cuestión, son diversos: 1) suplemento de nutrientes a las plantas, como ocurre durante la asociación simbiótica de cepas de *Rhizobium* fijadoras de nitrógeno en las raíces de leguminosas (Elsheikh y Elzidany, 1997; Schippers *et al.*, 1987), 2) potenciar el crecimiento vegetal, utilizando las cepas de *Pseudomonas fluorescens* que producen hormonas vegetales (Kloepper *et al.*, 1989); Kloepper y Schroth, 1981; Mahaffee y Kloepper, 1977); 3) controlar el ataque de patógenos mediante el uso de cepas bacterianas productoras de antibióticos (Dowling y O’Gara, 1994; Fravel *et al.*, 1990; Lugtenberg *et al.*, 1991; y 4) en la degradación de compuestos contaminantes de carácter xenobiótico, un área denominada “rizorremediación” (Crowley *et al.*, 1997; Haby y Crowley, 1996; Walton y Anderson, 1990).

El uso controlado y eficiente de *Pseudomonas* para cualquiera de las aplicaciones mencionadas requiere un profundo conocimiento de los elementos que influyen en la colonización y supervivencia de las bacterias en el suelo y la rizosfera. Esto incluye tanto factores ambientales como características fenotípicas y genéticas implicadas en esta adaptación, así como los mecanismos moleculares de la interacción entre planta y microorganismos. El hecho de que muchos antagonistas no persistan sobre las plantas puede deberse a la ineficiencia de la maquinaria necesaria para el crecimiento y la supervivencia en la rizosfera. Así, un buen microorganismo para control biológico debe seleccionarse no sólo por su actividad contra el patógeno, sino también por su capacidad colonizadora, dado que esta última es fundamental para mantenerse a una densidad celular lo suficientemente elevada como para garantizar una reducción eficiente de la población del patógeno. Por lo tanto, para desarrollar mejores agentes de biocontrol es fundamental la identificación y caracterización de los genes que determinan la capacidad colonizadora de rizosfera de los microorganismos asociados a plantas. Esta información a su vez podrá ser utilizada para incrementar la capacidad colonizadora de cepas de interés.

Por lo general, casi todas las interacciones planta-bacteria en la rizosfera se desarrollan a través de una serie de etapas sucesivas. Inicialmente, se produce un fenómeno de quimiotaxis en el que las bacterias son atraídas por determinados componentes presentes en los exudados liberados por la planta (Bayliss *et al.*, 1997; Vande Broek *et al.*,

1988). En la utilización de bacterias en agricultura, tanto en estudios de laboratorio como en la mayoría de las aplicaciones agronómicas, para el control de plagas o mejora del crecimiento vegetal, este primer paso, en el que las bacterias deben moverse hacia la planta, puede ser relativamente menos relevante, ya que el punto de partida suele ser la inoculación directamente de semillas con una suspensión de células bacterianas con el fin de que éstas se adhieran a las semillas. Por tanto, la fase inicial de la colonización de la rizosfera es en muchos casos la adhesión bacteriana a semillas (la denominada espermofera) y colonización de las mismas. Este paso es clave para la posterior colonización del sistema radicular, así como la nodulación en el caso de las *Rhizobiaceae* (Smit *et al.*, 1992). Incluso en el caso de bacterias patógenas, las semillas se consideran como el principal vehículo de diseminación e infección de cultivos (Hirano, 2000). Esta población de bacterias adheridas a las semillas constituyen el “inóculo inicial” para el posterior establecimiento y expansión de la población bacteriana de la rizosfera. La colonización de la espermofera, y cómo ésta determina la posterior evolución de la población bacteriana en la rizosfera, es por tanto un aspecto esencial dentro del estudio de las interacciones planta-bacteria, y de gran relevancia a la hora de mejorar la eficiencia de agentes de biocontrol. Conocer las bases moleculares de dicha colonización permitirá seleccionar cepas con rasgos genéticos óptimos para su establecimiento en la rizosfera, o modificarlas para aumentar su capacidad de expansión y supervivencia en raíces y semillas. Así por ejemplo, se ha visto que en *Pseudomonas*, la capacidad de producir flagelos (de Weger *et al.*, 1987), sintetizar el antígeno-O de los lipopolisacáridos (LPS) (de Weger *et al.*, 1989) y sintetizar aminoácidos (Simons *et al.*, 1997) es crucial para la colonización (Dekkers *et al.*, 1998).

Así pues, se pueden considerar tres tipos de factores fundamentales que determina la eficiencia en la colonización bacteriana de la rizosfera: 1) señales moleculares liberadas por la planta, y que son reconocidas por los microorganismos, y viceversa, 2) mecanismos implicados en la adhesión de las bacterias a los tejidos de la planta; y 3) factores que favorecen la colonización posterior de la raíz y la supervivencia en rizosfera (Figura I.1).

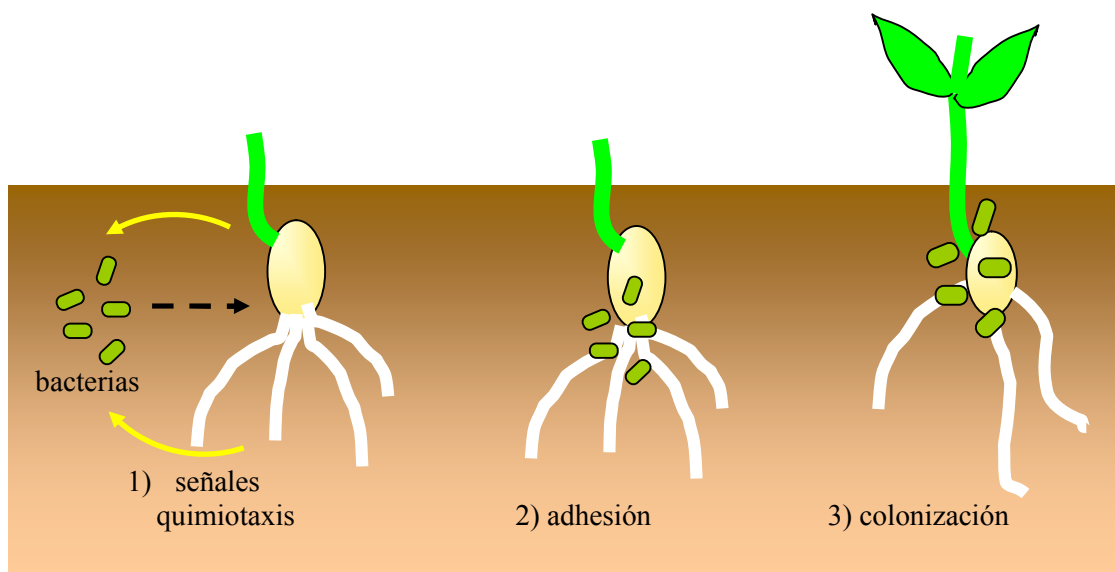


Figura I.1. Esquema de las etapas de colonización bacteriana de la rizosfera

Dentro de las interacciones mutualistas entre plantas y bacterias, el caso más estudiado es la interacción simbiótica entre microorganismos de los géneros *Rhizobium/Bradyrhizobium* y la raíz de leguminosas, donde estas bacterias se establecen en estructuras especializadas, denominadas nódulos en los que tiene lugar la fijación de nitrógeno. Los factores implicados en la nodulación han sido y están siendo ampliamente estudiados a nivel molecular (Economou *et al.*, 1990; Becker *et al.*, 1997; Oke & Long, 1999). Se han descrito varias familias de genes *nod*, algunas inducen la expresión de genes de la planta implicados en el desarrollo de los nódulos, funcionando a nivel de señalización (Sutton *et al.*, 1994). Concretamente, moléculas de lipooligosacáridos sintetizadas por las bacterias actúan como reconocidas por la raíz de las leguminosas.

En el caso de *Pseudomonas*, apenas se conoce nada sobre la posible existencia de señales similares que determinen la especificidad de la interacción planta-microorganismo, a pesar de que las respuestas y la adaptación de *Pseudomonas* a la rizosfera, a nivel molecular, está siendo objeto de gran interés y numerosos estudios. Recientemente, se han aislado genes que se inducen en *Pseudomonas fluorescens* en respuesta a exudados radiculares de remolacha (Rainey, 1999). Entre los genes identificados cuya expresión responde a componentes de los exudados se encuentran algunos implicados en transporte y metabolismo de azúcares, transporte de aminoácidos, secre-

ción y respuesta a estrés oxidativo (Bayliss *et al.*, 1997; Rainey, 1999; Ramos-González *et al.*, 2005). En nuestro grupo de investigación se han identificado genes de *P. putida* cuya expresión se induce en respuesta a exudados de raíces de maíz. Uno de ellos corresponde al operón de utilización de prolina (Vílchez *et al.*, 2000), uno de los aminoácidos más abundantes en exudados radiculares.

En cuanto a los factores implicados específicamente en la adhesión a raíces y colonización de la rizosfera, se ha demostrado la importancia de respuestas quimiotácticas en la iniciación de la colonización (Bayliss *et al.*, 1997). Los trabajos realizados hasta la fecha en este campo se han llevado a cabo fundamentalmente estudiando poblaciones de *Pseudomonas* una vez que éstas se encuentran ya establecidas en la rizosfera (Lugtenberg *et al.*, 2003), mientras que las etapas iniciales de desarrollo de las mismas han recibido muy poca atención. Existen datos en relación al papel que juegan la movilidad flagelar y la quimiotaxis en el inicio del establecimiento de interacciones planta-microorganismo (Turnbull *et al.*, 2001; Bashan, 1986), pero apenas se han realizado estudios exhaustivos sobre los mecanismos de adhesión bacteriana a superficies vegetales. Únicamente se ha descrito el posible papel como adhesinas de flagelos (DeFlaun *et al.*, 1994) o pili tipo IV (Dörr *et al.*, 1988; Suoniemi *et al.*, 1995), y se ha sugerido la existencia de procesos de “quórum sensing” en poblaciones asociadas a raíces (Steidle *et al.*, 2001; Loh *et al.*, 2002). También se ha analizado la influencia de factores ambientales, como por ejemplo la disponibilidad de hierro (Loper & Henkels, 1997), así como el papel de la capacidad de aglutinación (Buell & Anderson, 1992) o de elementos tales como LPS, flagelos o pili, la importancia de los cuales parece no ser universal, sino que varía en función de los microorganismos (de Weger *et al.*, 1989; Séller, 1988; Dorr *et al.*, 1998).

2.3. BIOFILMS EN LA RIZOSFERA

El establecimiento de poblaciones microbianas como comunidades sésiles adheridas a superficies sólidas (denominadas biofilm o biopelículas) constituye una de las principales estrategias de supervivencia de las bacterias en el medio ambiente. Aunque este hecho es conocido desde hace décadas (Meadows, 1971), ha sido en los últimos años cuando este campo ha adquirido una nueva dimensión, debido al reconocimiento

generalizado del enorme impacto que los biofilms tienen en numerosas actividades humanas. Cada vez es más evidente el impacto de los biofilms en medicina, debido a su papel como reservorios de patógenos y al hecho de que estas poblaciones sésiles son más resistentes que las bacterias planctónicas a la acción de antibióticos y biocidas. El estudio de biofilms bacterianos ha adquirido una perspectiva completamente nueva en los últimos años gracias a los avances en técnicas de microscopía no invasivas que permiten realizar observaciones *in situ*, así como a los estudios de genética bacteriana y el desarrollo de marcadores moleculares (*green fluorescent protein* y sus variantes) (Bloemberg *et al.*, 1999).

Nuestro grupo de investigación se ha interesado en la adhesión de células bacterianas y la formación de biopelículas sobre el sistema radicular de plantas, como etapa clave para colonizar la rizosfera. Espinosa-Urgel y colaboradores (2000) identificaron mediante mutagénesis al azar por transposición, una serie de genes que juegan un papel importante en la adhesión de *Pseudomonas putida* a semillas. La publicación de la secuencia completa y anotada del genoma de esta bacteria ha permitido un estudio detallado de las proteínas codificadas por dichos genes, permitiendo definir con mayor precisión las posibles funciones de cada una de ellas (Tabla 1), y su presencia o ausencia en otras bacterias filogenéticamente relacionadas.

Tabla1. Funciones y conservación de genes implicados en adhesión a semillas

<i>Pseudomonas putida</i> KT2440			Presencia en otras <i>Pseudomonas</i>		
mutante	lugar ¹	Función	<i>P. fluorescens</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>P. syringae</i>
mus-5	PP4615	¿transporte?	+	+	+
mus-9	PP5290	Transposasa	-	-	-
mus-13	PP4641	¿transporte dipéptidos?	+	+	+
mus-20	PP0806	Adhesina específica	-	-	-
mus-21	PP0713	Bomba de flujo	-	-	-
mus-24	PP0168	Adhesina global	+	-	-
mus-27	PP1449	Captación de hierro	+	+ ²	-

¹Asignado en el genoma de KT2440 (www.tigr.org). ²Existe un gen con cierta similitud no homólogo

El trabajo de tesis doctoral se ha centrado en la caracterización del mutante mus-27. La secuencia del gen donde se insertó el transposón se encontró que tenía similitudes importantes con genes que codifican hemolisinas, el cual hemos llamado *hlpA* (de haemolysin-like-protein). La proteína predicha HlpA consta de 1.508 aminoácidos y mostró similitud con hemolisinas reguladas por hierro, pertenecientes a la familia de proteínas de secreción llamadas TPS (de two-partner secretion).

3. EL SISTEMA TPS (TWO-PARTNER SECRETION)

La envoltura celular de las bacterias gram-negativas está compuesta por dos membranas, separadas por el periplasma. La membrana externa de bacterias gram-negativas constituye la interfase entre los microorganismos y su ambiente. Esto es, por lo tanto, donde estímulos físicos y químicos se perciben en primer lugar, siendo transducidas estas señales al sistema de expresión génica que conduce a establecer el transcriptoma más apropiado para responder al estímulo sentido. La membrana externa está constituida por fosfolípidos, lipopolisacáridos y proteínas, las cuales corresponden un 50% del total de los componentes, e incluyen porinas, lipoproteínas y un número de receptores específicos (Hancock *et al.*, 1990). Esta membrana juega un papel esencial como barrera de exclusión de compuestos potencialmente nocivos, como detergentes, antibióticos hidrofóbicos, enzimas hidrolíticos, etc., a la vez que funciona de barrera de permeabilidad selectiva para otros solutos, permitiendo la adquisición de nutrientes esenciales del medio externo o para la extrusión de sustancias tóxicas.

Las bacterias gram-negativas han desarrollado numerosos sistemas para exportar proteínas a través de la doble membrana que las envuelve. Estos mecanismos han sido clasificados con respecto a un número de características. Pueden distinguirse principalmente dos estrategias. En ambos casos, se ha identificado un intermediario periplásmico, a continuación translocación de la membrana interna y por último translocación de la membrana externa. Los procesos que constan de dos pasos incluyen: el sistema tipo II (Filloux *et al.*, 1998), autotransportadores (AT) (Loveless *et al.*, 1997; Henderson *et al.*, 2001) y la familia de dos proteínas de secreción (TPS) (Jacob-Dubuisson *et al.*, 2001). En contraste, los sistemas de secreción tipo I (Gentshev *et al.*, 2002) y tipo III (Corne-

lis, 2002) evitan el paso del periplasma y llevan a cabo el proceso en un solo paso. Los dos sistemas de secreción, AT y TPS, se caracterizan por encargarse de la translocación a través de la membrana externa de la mayoría de proteínas largas o proteínas dominios (Jacob-Dubuisson *et al.*, 2004). El sistema TPS es un mecanismo especializado en el que están involucradas dos proteínas, una de ellas es responsable de la secreción de la otra a través de la membrana externa (Jacob-Dubuisson *et al.*, 2001; Yen *et al.*, 2002). Los términos genéricos usados para las proteínas del sistema TPS son TpsA para la exoproteína y TpsB para el transportador.

El sistema TPS ha sido caracterizado en bacterias patógenas, aunque no es exclusivo de estos microorganismos. Los miembros secretados de esta familia descritos hasta la fecha son la mayoría factores virulentos que incluyen citolisinas independientes de Ca^{2+} , proteínas de adquisición de hierro (hemolisinas, proteínas que causan la lisis celular en eritrocitos y a veces en células epiteliales) y varias adhesinas (Jacob-Dubuisson *et al.*, 2001). Siendo el caso mejor estudiado y el primero en caracterizarse, la hemolisina independiente de Ca^{2+} ShlA de *Serratia marcescens* que es transportada a través de la membrana externa y activada por ShlB. En este sistema y en los que han sido estudiados, los genes de la exoproteína y su transportador correspondiente están normalmente organizados en un operón o se encuentran adyacentes. En la Figura I.2 se muestra una representación esquemática del sistema TPS: ambas proteínas son transportadas a través de la membrana interna por el sistema Sec, y la proteína transportadora, TpsB, probablemente forma un canal de tipo barril en la membrana externa que tras un reconocimiento específico entre las dos proteínas en el periplasma de la membrana, transporta la proteína TpsA a la superficie bacteriana. La proteína TpsA por tanto debe encontrar su transportador de membrana externa y contiene un dominio N-terminal conservado esencial para la secreción, el dominio TPS, para interactuar específicamente con su transportador e iniciar su transporte.

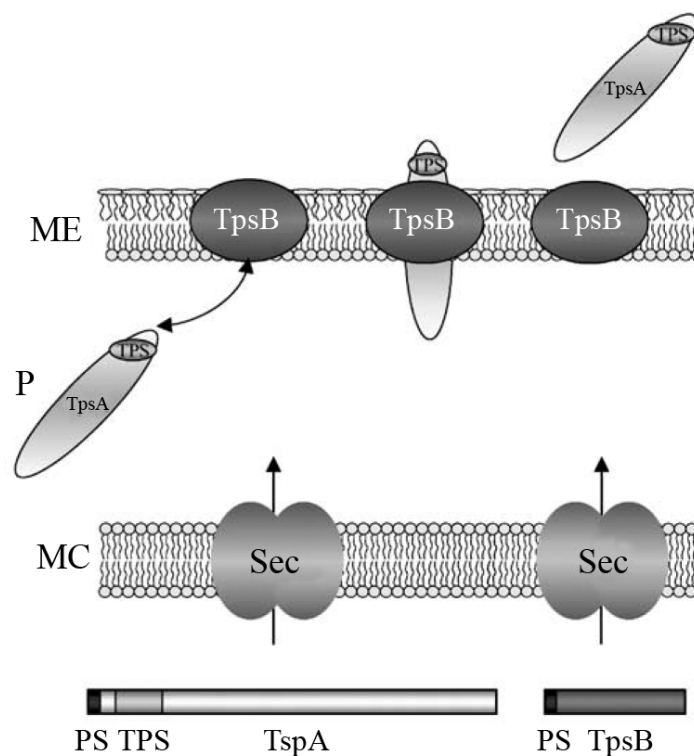


Figura I.2.: Representación esquemática del sistema TPS. Localización en la envoltura celular de las dos proteínas del sistema TPS. MC, membrana citoplasmática; ME, membrana externa; P, periplasma; TPS representa el dominio de secreción de la proteína TpsA; PS, péptido señal; Sec, maquinaria de secreción. Después del transporte dependiente de Sec de ambas proteínas, TpsB se inserta en la membrana externa. Tras un reconocimiento molecular específico entre el dominio TPS de la proteína TpsA y el transportador TpsB, TpsA se transporta a través de la membrana externa. La flecha curvada representa las interacciones específicas entre las dos proteínas, donde probablemente tengan lugar en el periplasma. (Obtenido de Jacob-Dubuisson *et al.*, 2004).

Las exoproteínas secretadas por la ruta TPS son sintetizadas como preproteínas o preproproteínas. Todas ellas son proteínas de gran tamaño, con un peso entre 100 y hasta 400-500 kDa. Las hemolisinas/citolisinas independientes de Ca^{2+} representan una clase de proteínas altamente relacionadas en función y secuencia, mientras que varias adhesinas y una proteína hemopexina, HxuA de *H. influenzae*, tienen secuencias mucho más divergentes, excepto su dominio de secreción. Sin embargo, todas ellas tienen una característica común, su gran tamaño, teniendo algunas alrededor de 3000 residuos aminoácidos, e incluso mayor, como es el caso de la posible proteína TpsA de *P. aeruginosa* que contiene 5627 aminoácidos (Rojas, *et al.*, 2002; Loch, *et al.*, 2001).

Muchas proteínas TpsA contienen tramos de motivos de secuencia repetidos que no son necesariamente homólogos entre las distintas proteínas. En general, las proteínas TpsA de la membrana externa suelen presentar la denominada estructura en barril β formada por cadenas antiparalelas (entre 8 y 22). El dominio de secreción de las proteínas TpsA se encuentra en la región N-terminal que incluye una región de 110 residuos conservados. Se ha estudiado la función significativa de dos motivos que contienen como residuos NPNL y NPNGI por mutagénesis dirigida en varias proteínas TpsA. Los residuos de asparagina en la primera posición de cada motivo son esenciales para la secreción-activación de ShlA (Schön-herret *et al.*, 1993). La porción conservada de este dominio de secreción es un primer candidato para la interacción específica molecular entre la exoproteína y el transportador en el proceso de secreción.

Las proteínas TpsB representan el segundo componente del sistema TPS en bacterias gram-negativas y han sido recientemente incluidas en una larga familia de proteínas semejantes a porinas de membrana externa que forman canales, estando involucradas en el transporte de las proteínas TpsA. Estas proteínas de aproximadamente 60 kDa tienen las características de proteínas integrales de membrana externa, con un residuo C-terminal anfipático para formar una β -hebra transmembrana y un número de segmentos anfipáticos conservados adicionales por toda su secuencia (Könninger *et al.*, 1999). Probablemente los miembros de esta familia, forman canales con forma de barriles en la membrana externa para el transporte de su exoproteína. Esta topología se ha analizado experimentalmente usando métodos de inserción de epítomos para las proteínas ShlB y FhaC (Guédin, *et al.*, 2000; Könninger, *et al.*, 1999). Los transportadores TpsB descritos secretan sólo una exoproteína substrato natural, en contraste con otros sistemas de secreción tipo II y III que secretan varias proteínas (Sandkvist, 2001; Hueck, 1998).

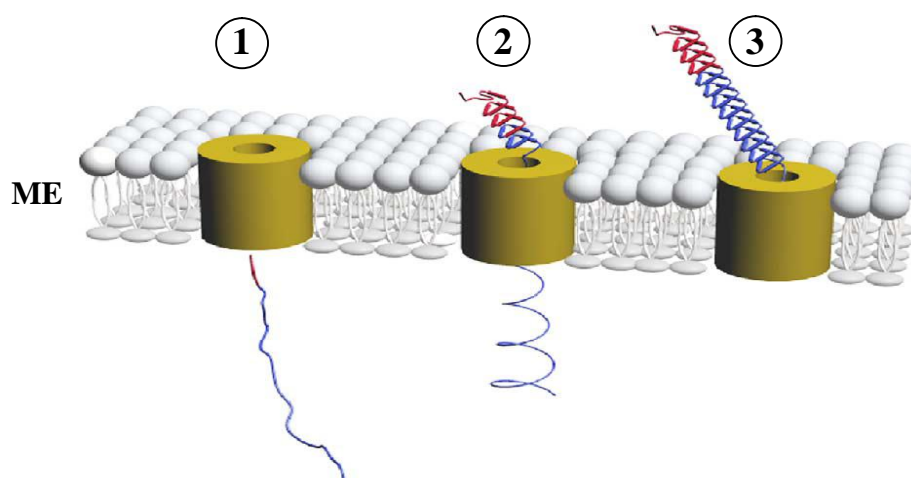


Figura I.3. Modelo propuesto para la translocación de la proteína TpsA. Descripción del paso de secreción a través de la membrana externa de TpsA, con la proteína TpsB insertada como un barril (cilindro hueco amarillo). 1) La proteína TpsA pasa a través del periplasma probablemente en una conformación extendida, no nativa. Su dominio TPS N-terminal (en rojo) interaccionaría con una región aún no identificada, “receptor”, de su otro componente del sistema, TpsB. 2) TpsB inicia la translocación de TpsA a través de la membrana externa que precede de manera vertical, comenzando con la región N-terminal (dominio TPS) de la proteína TpsA, 3) la proteína se pliega progresivamente en la superficie bacteriana. El dominio TPS (representado también en rojo en la proteína madura) puede estar involucrado en el plegamiento del resto de la proteína (mostrado en azul). La proteína TpsA se ha descrito aquí como una β -hélice, al igual que el modelo conocido para FHA y los predichos para varias proteínas TpsA basados en análisis de secuencias. (Obtenido de Jacob-Dubuisson, *et al.*, 2004).

Como podemos observar en la Figura I.3, la proteína TpsA atraviesa la membrana externa en una conformación extendida, y la región N-terminal del dominio TPS, en todas las proteínas TpsA, favorece la iniciación de la translocación. Se sugiere que la interacción entre el sustrato TpsA y el receptor TpsB estabiliza la conformación abierta del canal que facilita el anclaje de la proteína TpsA dentro. En algunos casos, el transportador también actúa como un activador en la translocación y la proteína transportada adquiere su conformación activa (Hertle *et al.*, 1997). Finalmente, Schiebel *et al.* (1989) propone que la energía libre liberada por el plegamiento progresivo de TpsA puede ser el vehículo para su translocación (Jacob-Dubuisson *et al.*, 2004).

En el caso de *Serratia marcescens* la expresión de los genes es inducida por la limitación de hierro (Poole y Braun, 1988; Poole *et al.*, 1988). Además, de estar involucrada en patogénesis y colonización de tejidos hospedadores, estas hemolisinas juegan

un papel en el metabolismo del hierro. Se ha identificado al menos una proteína, HxuA de *Haemophilus influenzae*, implicada en la adquisición de hierro (Jacob-Dubuisson *et al.*, 2004). También han sido encontrados genes de exoproteínas o transportadores en el genoma de *Yersinia pestis*, *Haemophilus ducreyi*, *Neisseria meningitidis*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Bordetella pertussis*.

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

El hierro es uno de los elementos esenciales para todos los organismos vivos. Este metal está implicado en diversos procesos metabólicos por ser cofactor de un gran número de enzimas que contienen hierro en su estructura. Entre estos procesos destacan los citocromos de las cadenas de transporte electrónico, las enzimas de la eliminación de especies activas de oxígeno, y las de la biosíntesis de aminoácidos, pirimidinas y ADN, así como las enzimas del ciclo de los ácidos tricarbónicos (Earhart, 1996). Para su crecimiento, los microorganismos requieren el hierro en concentraciones micromolares y controlan la homeostasis del metal regulando su transporte a través de la membrana (Bagg y Neilands, 1987; Crosa, 1997). En la naturaleza, la disponibilidad de hierro depende de las condiciones de pH y de aireación. En un ambiente aeróbico, el hierro se encuentra en estado de oxidación Fe^{3+} que precipita a pH neutro, por lo que es altamente insoluble y, por consiguiente, inaccesible para la mayoría de los microorganismos. En cambio, en un ambiente anaeróbico, el hierro se encuentra en forma de Fe^{2+} que es lo suficientemente soluble para que pueda ser incorporado directamente al interior de la célula (Braun y Killmann, 1999).

Diferentes líneas de investigación apuntan al hierro como un elemento importante en la adhesión bacteriana y formación de biofilm en superficies abióticas, así como en colonización de tejidos por bacterias patógenas (Stojiljkovic *et al.*, 1993; O'Toole y Kolter, 1998; Ratledge y Dover, 2000; Velayudhan *et al.*, 2000). Bajo condiciones de limitación de hierro, el crecimiento de las bacterias disminuye o se inhibe (Fields *et al.*, Fernández-Beros *et al.*, 1989; Chart y Rowe, 1993), mientras que se incrementa la expresión de varios factores de virulencia implicados en patogénesis (Blumenthals *et al.*, 1987; Strockbine *et al.*, 1988; Chart *et al.*, 1989; Dai *et al.*, 1992). Como otros organis-

mos, las bacterias requieren hierro como cofactor de muchas enzimas con actividad redox, y la mayoría de las bacterias requieren niveles micromolares de hierro disponible para un crecimiento óptimo (Guerinot, 1994). Para adquirir hierro de su entorno, las bacterias gram-negativas han desarrollado sistemas especializados que les permiten secuestrar éste del medio donde se encuentra, a través de la síntesis de sideróforos, o utilizar directamente, como fuente de hierro, proteínas del organismo hospedador que contienen el hierro en forma de grupo hemo, tales como hemoglobina, hemopexina, transferrina y lactoferrina (Braun *et al.*, 1998a; Desai *et al.*, 2000; Genco y Desai, 1996; Gray-Owens y Schryvers, 1996; Mazmanian *et al.*, 2003). La captación de hierro mediada por sideróforos es probablemente la estrategia más común de adquisición de hierro por bacterias (Visca *et al.*, 2002). Los sideróforos aparecen como respuesta evolutiva a la captura de Fe^{3+} insoluble y al papel fundamental que juega el hierro en el metabolismo celular. Indirectamente también pueden actuar como potentes antibióticos y factores de virulencia en enfermedades de animales y plantas. Los sideróforos se definen como compuestos quelantes específicos de hierro férrico, aunque también son capaces de transportar hierro ferroso (Xiao y Kisaalita, 1998), de bajo peso molecular (entre 500 y 1000 Da), sintetizados por bacterias y hongos que crecen en condiciones limitantes de hierro (Neilands, 1995). Su estructura se caracteriza por presentar cadenas laterales y grupos funcionales que proporcionan ligandos de alta afinidad y especificidad para la coordinación de iones férricos (Crosa, 1989; Neilands, 1995).

La pioverdina (o pseudobactina) es el mejor quelante de hierro producido por especies fluorescentes del género *Pseudomonas* aunque algunas cepas se conocen que producen también sideróforos de baja afinidad como piochelina (Cox *et al.*, 1981) su precursor ácido salicílico (Meyer *et al.*, 1992; Visca *et al.*, 1993) o quinolobactina (Mossialos *et al.*, 2000). Los receptores de membrana externa específicos se expresan bajo limitación de hierro y facilitan el transporte del complejo Fe^{3+} -pioverdina al interior de las células (Neilands, 1982). Una vez en el citoplasma el Fe^{3+} se reduce a Fe^{2+} .

Para la adquisición de hierro las bacterias pueden utilizar sideróforos endógenos producidos por ellas mismas (ej. la enterobactina producida por *E. coli* o la piochelina por *P. aeruginosa*) o sideróforos producidos por otros microorganismos, pero, independientemente de su origen, la captura del metal requiere receptores específicos a nivel de

membrana externa. En bacterias de suelo, la elevada afinidad por el Fe^{3+} junto con la alta especificidad de receptores de membrana contribuyen a aumentar el papel nutricional del sistema de adquisición de hierro mediado por pioverdina para mejorar la competencia ecológica (Ongena *et al.*, 2002). Uno de los mecanismos usados por *Pseudomonas* como agentes biocontrol para competir por nutrientes es por tanto la producción de sideróforos. Una característica de *P. putida* y otras especies de este género es que poseen un gran número de sistemas de captación de hierro a través de sideróforos como la pioverdina (Martínez-Bueno *et al.*, 2002). La capacidad que poseen las *Pseudomonas* fluorescentes para adquirir hierro acomplejado, así como sideróforos heterólogos ha sido propuesta ser clave de su éxito como colonizadores de la rizosfera (Loper y Henkels, 1997, 1999).

OBJETIVOS

OBJETIVOS

En un trabajo anterior, Espinosa-Urgel y colaboradores (2000) aislaron mutantes derivados *P. putida* KT2440, obtenidos por mutagénesis al azar con un transposón miniTn5(Km) y mostraron deficiencia en adhesión a semillas de maíz (mutantes “mus” de mutants unattached to seeds). Entre los distintos mutantes se obtuvo uno denominado mus-27, siendo éste la base sobre la que se establecieron los objetivos de esta Tesis Doctoral. El sitio donde el transposón se insertó se determinó y se encontró que correspondía a un gen que presentaba similitud con genes pertenecientes al sistema de secreción TPS de bacterias gram-negativas. La función fisiológica de esta proteína(s), así como los mecanismos que rigen su expresión, no se conocían en detalle. Con objeto de aportar información sobre la función de estas proteínas y la organización transcripcional de sus genes, en el presente estudio se plantearon los siguientes objetivos:

1. Análisis de secuencia y organización génica de los genes *hlpBA* de *P. putida* KT2440.
2. Caracterización preliminar del promotor del operón *hlpBA*, que incluye, estudio de la región promotora, análisis de la expresión de P_{hlp} y la determinación de aquellos factores que pudieran estar implicados en su expresión.
3. Construcción de un mutante (mus-28) en la proteína HlpB, que pertenece al sistema de secreción TPS y caracterización de mutantes *hlp* de *P. putida* KT2440.
4. Papel del sistema TPS HlpA/HlpB en la interacción de *P. putida* KT2440 con plantas y la supervivencia en suelos.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. CEPAS BACTERIANAS.

En este trabajo se han utilizado cepas bacterianas de colecciones de cultivos tipo y de la colección del grupo de Biodegradación de Tóxicos Orgánicos de la Estación Experimental del Zaidín (CSIC-Granada).

Las estirpes utilizadas en este trabajo se recogen en la Tabla M.1. junto con sus genotipos o características más relevantes.

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

Estirpe bacteriana	Características	Referencia
<i>Pseudomonas putida</i>		
KT2440	Cm ^R , Ben ⁺ , <i>hsdMR</i>	Franklin <i>et al.</i> ,1981
KT2442	Rif ^R , derivada de KT2440	Franklin <i>et al.</i> ,1981
KT2440-C1R1	KT2440, <i>rpoS::Km</i> , Km ^R	Ramos-González <i>et al.</i> , 1998
mus-27	KT2440 <i>hlpA::mini-Tn5-Km1</i> Mutante de la cepa KT2440 afectado en la adhesión; obtenido por inserción cromosómica de un mini-Tn5-Km1, Km ^R	Espinosa-Urgel <i>et al.</i> , 2000
mus-28	KT2440 <i>hlpB::Km</i> mutante no polar	En este trabajo
<i>Escherichia coli</i>		
JM109	F'(traD36 <i>proAB</i> ⁺ <i>lacZ</i> ΔM15 <i>lacI</i> ^{q1}) <i>recA1 supE44 endA1 hsdR17 gyrA96 relA1 thi-1 Δ(lac-proAB)</i>	Yanisch-Perron <i>et al.</i> , 1985
DH5α	<i>hi lacI</i> ^q <i>lacZ</i> (pPC6) <i>recA endA φ80d lacZ dmlλ5</i>	Bethesda Research Laboratory
CC118λ <i>pir</i>	ΩRP4-Tc::Mu-Km::Tn7 λ <i>pir</i> Rif ^R Δ(<i>ara-leu</i>)7697 <i>araD139</i>	Herrero <i>et al.</i> ,1990

1.1 Conservación de las estirpes bacterianas.

La conservación de cepas a corto plazo se realizó mediante estría en placas de medios selectivos, almacenados a 4°C. A largo plazo se hizo por congelación a –80°C de cultivos líquidos en glicerol 40% (v/v).

2. PLÁSMIDOS.

En la Tabla M.2. se recogen los plásmidos construidos o aislados por otros autores y utilizados en este trabajo junto con sus características más relevantes. Los plásmidos de nueva construcción se describen en los apartados de *Resultados*.

Tabla M.2. Plásmidos utilizados en este trabajo.

Plásmido	Características	Referencia
pRK600	Cm ^R , <i>oriColE1</i> , <i>mobRK2</i> , <i>traRK2</i>	Kessler <i>et al.</i> , 1992
pUC18Not	Ap ^R , vector de clonación, idéntico a pUC18 pero con sitios <i>Not</i> I flanqueando el SMC de pUC18	Herrero <i>et al.</i> , 1990
pKNG101	Sm ^R , <i>oriR6K</i> , <i>oriTRK2</i> , <i>sacB</i>	Kaniga <i>et al.</i> , 1991
pMP220	Tc ^R ; IncP, amplio espectro de huésped, porta un gen <i>lacZ</i> sin promotor	Spaink <i>et al.</i> , 1987
p34S-Km3	Km ^R	Dennis y Zylstra, 1998
pUT/miniTn5' <i>phoA</i>	Ap ^R , Km ^R , <i>oriR6K</i> , <i>oriTRP4</i> , fusiones traduccionales a ' <i>phoA</i>	de Lorenzo <i>et al.</i> , 1990

pRK600: plásmido auxiliar utilizado para movilizar plásmidos *mob*⁺, *tra*⁺. Es portador del sistema de replicación *ColE1* cuyo espectro de huésped se restringe a *Escherichia coli*, comportándose como vector suicida en *Pseudomonas sp.* al no ser capaz de replicarse en este organismo. Además lleva la región de transferencia de los plásmidos del

grupo RK2 que permite la movilización de plásmidos *mob*⁺ a un amplio espectro de huésped. Confiere resistencia a cloramfenicol.

pUC18Not: vector de clonación que contiene el sitio de clonación múltiple (SMC) del plásmido pUC18 flanqueado por extremos *Not*I. Carece del gen *rop* implicado en el control del número de copias de los plásmidos que contienen el origen de replicación *ColE1*, dando lugar a que esté presente en alto número de copias (100-200) por célula. Confiere resistencia a ampicilina, y el sitio de clonación múltiple (SMC) dentro de la región que codifica el péptido α de *LacZ*. Esto posibilita una fácil selección de los plásmidos recombinantes en cepas que permiten α -complementación, es decir, aquellas portadoras de la delección *lacZ* Δ M15 (por ejemplo JM109, DH5 α , etc.). Aquellos clones que porten un plásmido con inserto, formarán colonias de color blanco (en contraposición al color azul de los clones sin inserto) en medio LB sólido que contenga ampicilina y 25 μ g/ml del sustrato cromogénico 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido (X-Gal). Si el plásmido se transforma en una cepa *lacI*⁺, es necesario añadir, además 130 μ M de isopropil- β -D-tiogalactopiranosido (IPTG).

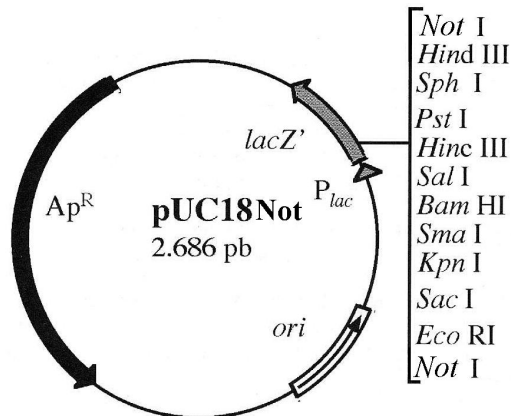


Figura M.1. Plásmido pUC18Not. Los sitios de restricción indicados son únicos y están localizados en el MCS dentro del gen *lacZ'*. También se muestra la localización del origen de replicación (*oriColE1*), y del gen de resistencia a ampicilina. Las flechas indican el sentido de la replicación o de la transcripción de los genes.

pKNG101: plásmido suicida que se utiliza en experimentos de intercambio alélico y que permite la selección de eventos de doble recombinación en bacterias gram negativas. Posee el origen de replicación del plásmido R6K, que es dependiente de la proteína π codificada por el gen *pir* y, por tanto, sólo se mantiene en bacterias que producen dicha proteína (por ejemplo, *E. coli* CC118 λ *pir*). Presenta el origen de transferencia de RK2, lo que permite transferirlo a otras bacterias si se aportan las funciones de movilización en *trans*. Posee los genes *strA* y *strB* de resistencia a estreptomicina, que sirven como marcador de selección de la integración del vector en el cromosoma de la bacteria huésped. Su característica más relevante es que porta el gen *sacB* de *Bacillus subtilis* como marcador contra-seleccionable, lo que permite seleccionar positivamente la escisión del vector del cromosoma. Este gen, codifica una levano-sacarasa que cataliza la hidrólisis de sacarosa así como la síntesis de levanos que, en bacterias gram negativas, se acumulan en el periplasma y producen la muerte celular cuando la concentración de sacarosa es mayor o igual al 5% (p/v).

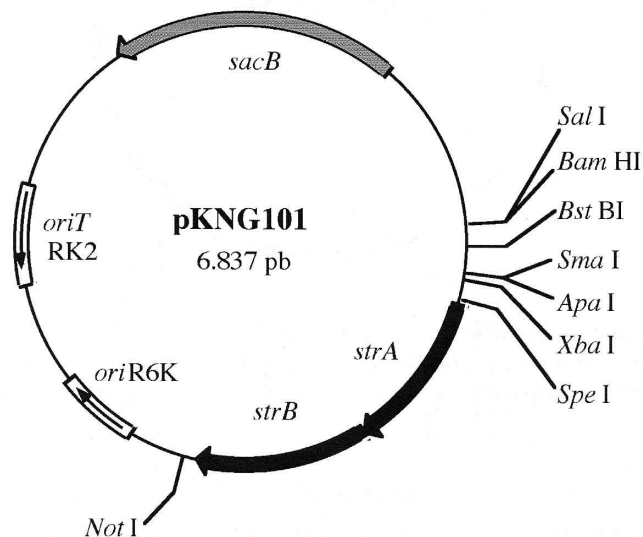


Figura M.2. Plásmido pKNG101. Los sitios de restricción para las enzimas que se indican son únicos. Se muestra además la localización del origen de replicación (*oriR6K*), del origen de transferencia (*oriTRK2*), de los genes de resistencia a estreptomicina (*strA* y *strB*) y del gen que codifica la levano-sacarasa (*sacB*) de *Bacillus subtilis*. Las flechas indican el sentido de la replicación, de la transferencia o de la transcripción de los genes.

pMP220: plásmido de 10,5 kb derivado del vector pTJS75 (Schmidhauser y Helinski, 1985) perteneciente al grupo de incompatibilidad IncP. Posee el SMC de pIC20H (Marsh *et al.*, 1984) y contiene el gen *lacZ* de *E. coli* sin promotor y con el sitio de unión al ribosoma del gen *cat* (que codifica la enzima cloramfenicol acetiltransferasa). La clonación de promotores delante del gen *lacZ* permite medir la expresión desde los mismos como actividad β -galactosidasa (Spaink *et al.*, 1987). Confiere resistencia a tetraciclina.

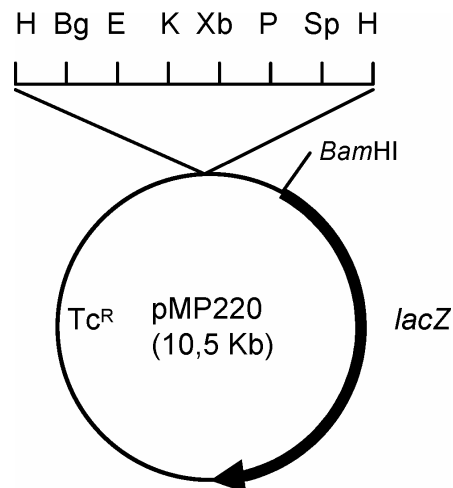


Figura M.3. Plásmido pMP220. Los sitios de restricción de la región de multiclonaje son H, *HindIII*; Bg, *BglII*; E, *EcoRI*; K, *KpnI*; P, *PstI*; y Sp, *SphI*.

p34S-Km3: Plásmido de aproximadamente 3,7 kb derivado de pUC19, que contiene un cassette de resistencia a kanamicina con sitios de restricción duplicados, flanqueando al gen y sin terminadores de transcripción.

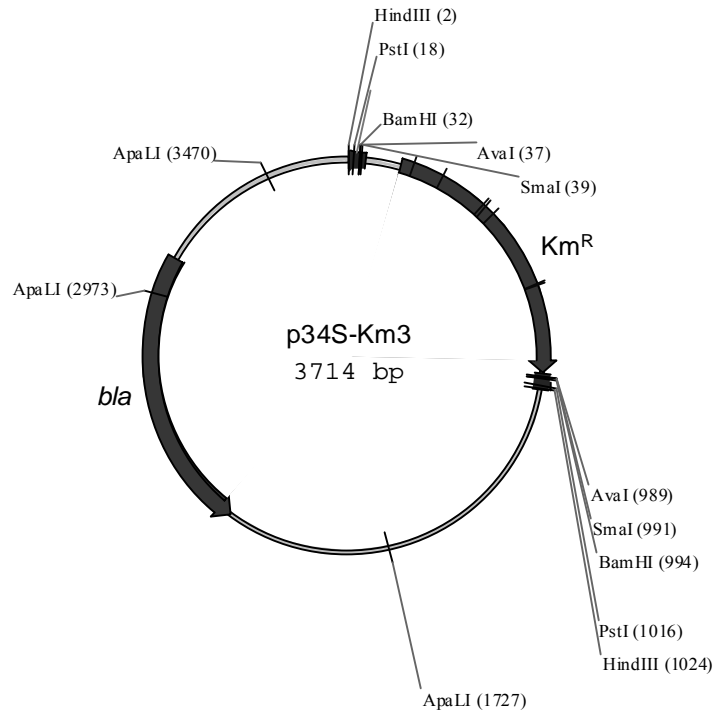


Figura M.4. Plásmido p34S-Km3. Los sitios de restricción para las enzimas que se indican son únicos. Se muestra el gen de resistencia a Km.

pUT/mini-Tn5 *phoA*: Plásmido de la serie pUT que lleva un transposón mini-Tn5 *phoA*. El transposón mini-Tn5 *phoA* es portador del gen *phoA* de *E. coli* desprovisto de la secuencia codificante del péptido señal. Este mini-transposón puede generar fusiones traduccionales con actividad fosfatasa alcalina cuando se inserta en fase en genes que codifican proteínas que contienen un péptido líder, esto es, proteínas que son secretadas (Figura M.5.). Así, este plásmido es indicado para el análisis de proteínas que se exportan al espacio periplásmico o a la membrana externa de bacterias gram-negativas. La fosfatasa alcalina de *E. coli* es un homodímero que posee dos puentes disulfuro intramoleculares en cada monómero, esenciales para que el enzima se pliegue en

su conformación activa. Estos puentes disulfuro no se pueden establecer habitualmente en el citoplasma, por lo que la proteína es activa exclusivamente cuando se exporta a través de la membrana interna celular. Esta propiedad convierte a *'phoA* en un elemento sensor de señales de exportación de proteínas. Los clones mutantes portadores de fusiones a *'phoA* activas son fácilmente detectables en presencia de un sustrato cromogénico de la fosfatasa alcalina como es BCIP (0,1 mM).

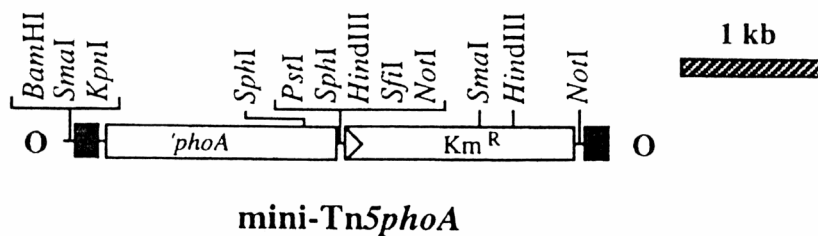


Figura M.5. Mapa del transposón mini-Tn5*phoA*. En el mapa se indican los sitios de restricción más relevantes, el gen *'phoA* desprovisto de su secuencia señal y el gen de resistencia a kanamicina procedente del transposón Tn903. Como cajas oscuras se muestran los límites de la unidad transponible, que está clonada en pUT como fragmento *XbaI-EcoRI*. Ambos sitios de restricción son extremos del mini-transposón (indicados como O), y no se movilizan con éste durante el evento de transposición. Los sitios *BamHI*, *SmaI* y *KpnI*, que se encuentran delante del gen *'phoA*, también están situados fuera del elemento móvil (esquema obtenido de de Lorenzo *et al.*, 1990).

Tabla M.3. Plásmidos que se han construido en este trabajo.

Plásmido	Características
pNEMO2	Fragmento derivado de un cósmido y clonado en mus27. Contiene los genes <i>hlpBA</i> . Km ^R , Tc ^R .
pNEMO5	Fusión transcripcional de la región promotora de <i>hlpBA</i> (534 pb) a ' <i>lacZ</i> en el pMP220; región promotora amplificada por PCR introduciendo los sitios de restricción <i>EcoRI-KpnI</i> . Tc ^R
pNEMO6	Fusión transcripcional de la posible región promotora de <i>hlpBA</i> (738 pb) a ' <i>lacZ</i> en el pMP220; región promotora amplificada por PCR introduciendo los sitios de restricción <i>EcoRI-SphI</i> . Tc ^R .
pNEMO4	Fragmento de 1,8 kb amplificado por PCR clonado en pUC18Not, contiene el gen <i>hlpB</i> . Ap ^R .
pNEMO4K	Fragmento de 1 kb amplificado por PCR clonado en pNEMO4, contiene un cassette de Km procedente del p34S-Km3 interrumpiendo <i>hlpB</i> . Ap ^R , Km ^R .
pNEMO4K-1	Fragmento <i>hlpB::Km</i> de 2,8 kb se subclonó en el sitio <i>NotI</i> de pKNG101. Km ^R , Sm ^R .

3. MEDIOS DE CULTIVO.

La composición de los medios de cultivo utilizados en este trabajo se detalla a continuación. Todos los medios y soluciones se esterilizaron por calor húmedo en un autoclave a 121°C durante 30 minutos aproximadamente, o por filtración, utilizando filtros estériles de nitrocelulosa o policarbonato de 0,22 µm de diámetro de poro. A continuación se detalla la composición de los medios.

3.1. Medios ricos.

Como medio habitual de crecimiento de las cepas de *E. coli* y *Pseudomonas* se utilizó el medio Luria-Bertani (LB) (Sambrook *et al.*, 1989), cuya composición fue la siguiente: bacto-triptona, 10 g; extracto de levadura, 5 g; NaCl, 10 g; H₂O, hasta 1 litro.

Para la preparación de medio sólido LB, se añadió bacto-agar (Difco, cat. no. 0140-01) hasta una concentración final de 1,5% (p/v) y se esterilizó en el autoclave. En la preparación de medio LB semisólido para los ensayos de movilidad bacteriana, se utilizó bacto-agar a una concentración final de 0,3% (p/v).

3.2. Medios mínimos.

Para el cultivo de células de *E. coli* o del género *Pseudomonas* en medio mínimo se utilizó una modificación del medio M9 (Sambrook *et al.*, 1989) cuya composición fue la siguiente: solución 10 x M9, 100 ml; solución A9 (“goodies”), 2,5 ml; MgSO₄ x 7H₂O (1M), 1ml; citrato férrico amónico 6‰ (p/v), 1ml; H₂O, hasta 1 litro. Las soluciones empleadas en este medio se prepararon por separado y se esterilizaron en el autoclave.

La composición de la solución 10 x M9 fue: Na₂HPO₄ x 12H₂O, 70 g; KH₂PO₄, 30 g; NH₄Cl, 10 g; NaCl, 5 g; H₂O, hasta 1 litro.

La composición de la solución A9 fue la siguiente: HBO₃, 300 mg; ZnCl₂, 50 mg; MnCl₂ x 4H₂O, 30 mg; CoCl₂, 200 mg; CuCl₂ x 2H₂O, 10 mg; NiCl₂ x 6H₂O, 20 mg; NaMoO₄ x 2H₂O, 30 mg; H₂O, hasta 1 litro.

La composición de la solución 10 x M8 es idéntica al M9, sin embargo, carece de fuente de nitrógeno.

Como medio deficiente en hierro, se utilizó el medio basal MB2 (Gilleland *et al.*, 1974), suplida con glucosa (0,5% p/v) como fuente de carbono. La composición de la solución 10 x MB2 fue: K₂HPO₄, 70 g; KH₂PO₄, 30 g; (NH₄)₂SO₄, 9,2 g; H₂O, hasta 1 litro.

Como fuente de carbono se utilizaron las que se describen a continuación a las concentraciones que se indican:

- a) Glucosa: se preparó una solución concentrada al 20% (p/v), se esterilizó por filtración, se almacenó a 4°C y se añadió al medio a una concentración final de 0,5% (p/v).
- b) Benzoato: se preparó una solución concentrada 0,5 M a pH 7,0. Esta solución se esterilizó en el autoclave, se almacenó a temperatura ambiente y se utilizó a una concentración final de 5 mM.

Para cepas de *E. coli*, los cultivos en medio mínimo se suplementaron con tiamina a una concentración final de 0,05 mM a partir de una solución 200 veces concentrada y esterilizada por filtración.

Para la preparación de medios sólidos se añadió al medio mínimo bacto-agar a una concentración final de 2% (p/v) o agar noble 2,25% (p/v)

3.3. Condiciones de cultivo.

Las cepas de *E. coli* se cultivaron a 37°C y *P. putida* se cultivó a 30°C. Los cultivos líquidos se incubaron con una agitación de 200 rpm en un incubador orbital Adolf Kühner ISF-4-V.

Las medidas de turbidez de los cultivos bacterianos se realizaron a 660 nm en un espectrofotómetro UV/VIS PERKIN-ELMER modelo Lambda 3B, utilizando cubetas de 1 ml de plástico.

3.4. Antibióticos.

Las soluciones de antibióticos se prepararon a una concentración 1000 veces superior a la concentración final de los ensayos, en H₂O destilada, excepto el cloramfenicol que se preparó en etanol absoluto, y la rifampicina y la tetraciclina que se disolvieron en metanol. Las soluciones preparadas en H₂O se esterilizaron por filtración (utilizando filtros estériles de acetato de celulosa de 0,22 µm de diámetro de poro [Schlicher-Schuell, cat. no. 10462200]) y se almacenaron a -20°C. Los antibióticos se utilizaron a las concentraciones finales indicadas en µg/ml: ácido nalidíxico (Nal), 10; ampicilina (Ap), 100; cloramfenicol (Cm), 30; estreptomicina (Sm), 25; kanamicina (Km), 50; rifampicina (Rif), 50; y tetraciclina (Tc), 15.

4. CURVAS DE CRECIMIENTO.

Las cepas a estudiar se cultivaron a 30°C con agitación continua durante 10-14 horas en medio mínimo suplido con la fuente de carbono y los antibióticos correspondientes. Los cultivos se diluyeron 1:100 hasta una turbidez a 660nm (DO₆₆₀) comprendida entre 0,03 y 0,05, en el medio en el que se quería estudiar el comportamiento de las cepas en cuestión. Se siguió el incremento de la turbidez hasta que el cultivo alcanzó la fase estacionaria de crecimiento.

El tiempo de generación en la fase exponencial se calculó según la siguiente fórmula:

$$g = \ln 2 (t - t_0) / \ln (DO - DO_0)$$

Donde: g es el tiempo de generación; t, el tiempo transcurrido hasta alcanzar la fase logarítmica tardía; t₀, tiempo inicial en fase logarítmica temprana; DO, turbidez del cultivo a tiempo t; y DO₀, turbidez del cultivo a tiempo t₀.

5. TRANSFERENCIA DE PLÁSMIDOS: CONJUGACIÓN

La transferencia de ADN plasmídico a cepas de *Pseudomonas* desde *E. coli* se realizó mediante conjugación. La movilización a *P. putida* de los plásmidos con un origen de transferencia *oriT* del plásmido pRP4 se realizó mediante conjugación tripartita (de Lorenzo y Timmis, 1994) en la que participaron la cepa donadora *E. coli* (portadora del plásmido a movilizar), la cepa receptora *P. putida* y la cepa auxiliar *E. coli* HB101 (pRK600). El plásmido pRK600 determina funciones de transferencia pero no se replica en *Pseudomonas*.

Se partió de cultivos incubados a 30°C con agitación durante 12-16 horas de las cepas donadora y receptora del plásmido en cuestión, así como de la cepa portadora del plásmido auxiliar. Se recogieron aproximadamente 10^8 células de cada cultivo mediante centrifugación a 12000 g durante 2 minutos, y el sedimento se lavó 2 veces con 1 ml de tampón 1 x M9. Posteriormente, las células se mezclaron y se recogieron por centrifugación a 12000 g durante 2 minutos. A continuación, se suspendieron en 50 µl de tampón 1 x M9 y se depositaron sobre un filtro de nitrocelulosa estéril de 0,22 µm de diámetro de poro colocado sobre la superficie de una placa de LB sólido y se incubó a 30°C durante 6-8 horas. Transcurrido este tiempo, el filtro con las células se transfirió a un tubo con 5 ml de tampón 1 x M9 y las células se suspendieron por agitación. A partir de esta suspensión se hicieron diluciones seriadas en el mismo tampón y se sembraron placas de medio selectivo para los transconjugantes; éstos fueron receptores que habían adquirido el plásmido de los donadores. Las placas se incubaron a 30°C hasta la aparición de los transconjugantes. Las cepas donadora, receptora y auxiliar, se sometieron al mismo tratamiento y se sembraron en placas del mismo medio selectivo, sirviendo de esta manera como controles negativos de la conjugación.

Se hicieron siembras en los medios correspondientes para la selección de las cepas donadora, receptora y auxiliar en su caso, con objeto de realizar el conteo del número de bacterias totales iniciales presentes en el cruzamiento. La frecuencia de transcon-

jugantes se expresó como el número de transconjugantes en función del número de receptores.

6. AISLAMIENTO DE ADN PLASMÍDICO.

Para el aislamiento de ADN plasmídico se utilizaron los métodos que se describen a continuación, dependiendo del grado de pureza requerida para el uso posterior del ADN y del tamaño del plásmido en cuestión.

6.1. Método de “Qiapreps”.

El sistema “Qiapreps Spin Plasmid Kit” (QIAGEN, ref. 27104) se utilizó para la preparación rápida de ADN plasmídico libre de ARN para su uso en secuenciación y clonación, partiendo de un volumen de cultivos de 3 ml y siguiendo las instrucciones del fabricante.

6.2. Método de la lisis alcalina.

Para el aislamiento de plásmidos a pequeña escala se utilizó el método de la lisis alcalina (Maniatis *et al.*, 1982). Este método se utilizó para la comprobación de los plásmidos de nueva construcción.

Se partió de un volumen de 1,5 ml de cultivo. Las células se recogieron por centrifugación a 12000 g durante 5 minutos. Tras eliminar el sobrenadante, éstas se suspendieron en 100 µl de GTE y se incubaron durante 5 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se añadieron 200 µl de solución de lisis, se agitó el tubo por inversión y se incubó la mezcla durante 5 minutos en un baño de hielo. El lisado se neutralizó añadiendo 150 µl de tampón acetato sódico 3M pH 4,8 y, tras mezclar el contenido del tubo por inversión, se incubó durante 5 minutos en un baño de hielo. Las proteínas, el ADN cromosómico y los restos celulares se eliminaron por centrifugación a 12000 g durante 10 minutos y el sobrenadante se transfirió a un tubo limpio. Posteriormente, se añadieron 2 volúmenes de etanol frío y la mezcla se incubó a -20°C durante 30 minutos. El

ADN se precipitó por centrifugación a 12000 g durante 5 minutos. El sedimento de ADN se dejó secar a 37°C y se resuspendió en 50 µl de TE.

La composición de las soluciones empleadas en este procedimiento fue la siguiente:

- GTE: glucosa, 50 ml; Tris-HCl (pH 8,0), 25 mM; y EDTA-Na₂, 10 mM. Esta solución se esterilizó en el autoclave y se conservó a 4°C.
- Solución de lisis: dodecil sulfato sódico (SDS), 1% (p/v); y NaOH, 0,2 N. Esta solución se prepara inmediatamente antes de su uso a partir de soluciones concentradas al 10 % (p/v) de SDS y de 2 N de NaOH.
- Tampón acetato sódico pH 4,8: acetato sódico 5 M, 60 ml; ácido acético glacial, 11,5 ml; H₂O, hasta 100 ml. El pH se ajustó a 4,8 con ácido acético glacial. La solución se esterilizó en el autoclave y se conservó a 4°C.
- TE: Tris-HCl (pH 8,0), 10 mM; EDTA, 1 mM. Esta solución se esterilizó en el autoclave y se almacenó a 4°C.

7. AISLAMIENTO DE ADN TOTAL.

Se utilizó el método descrito por Ausubel *et al.*, (1991) partiendo de 1,5-3 ml de cultivo bacteriano. Tras recoger las células por centrifugación y lavarlas con TE, éstas fueron resuspendidas en 567 µl de la misma solución, a la que se le añadió posteriormente, 30 µl de SDS al 10% (v/v) y 3 µl de proteinasa K (20 mg/ml). Tras 1 h de incubación a 37°C, se les añadieron 100 µl de NaCl 5 M, agitando vigorosamente, y 80 µl de CTAB/NaCl (bromuro de hexadeciltrimetilamonio 10 % (p/v) en cloruro de sodio 0,7 M). La mezcla se incubó 10 min a 65°C. Posteriormente se hizo una extracción con fenol:cloroformo:alcohol isoamílico, seguida de dos extracciones con cloroformo:alcohol isoamílico para eliminar los posibles restos de fenol. Se añadieron a la fase acuosa 0,6 vol de isopropanol para la precipitación del ADN. Posteriormente se hicieron dos lavados con etanol 70% (v/v), se resuspendió el ADN en agua milliQ estéril y se cuantificó.

8. TRANSFORMACIÓN DE CÉLULAS DE *Escherichia coli* y *Pseudomonas sp.*

8.1. Preparación de células competentes.

La preparación de células competentes de *E. coli* para su transformación posterior se realizó utilizando el método de Nishimura y colaboradores (1990). La cepa correspondiente de *E. coli* se inoculó en 3 ml de LB suplido con los antibióticos adecuados, y se incubó a 37°C con agitación durante 12-16 horas. Este cultivo se diluyó 100 veces en 50 ml de solución A y se incubó a 37°C con agitación hasta alcanzar la fase exponencial temprana de crecimiento ($DO_{660} = 0,5$). A partir de este momento, se trabajó en frío, ya que de este modo, la eficiencia de transformación fue 10 veces superior. Las células se mantuvieron en un baño de hielo durante 10 minutos, y se recogieron por centrifugación a 12000 g durante 5 minutos a 4°C. A continuación se resuspendieron cuidadosamente en 0,5 ml de solución A fría (4°C). Posteriormente, se añadieron 2,5 ml de solución B fría (4°C) y la mezcla se agitó cuidadosamente. La suspensión celular se dividió en alícuotas de 150 μ l que se mantuvieron a -80°C hasta el momento de su uso. Las soluciones empleadas se conservaron a 4°C. Su composición fue la siguiente:

- Solución A: LB suplido con $MgSO_4 \times 7H_2O$, 10 mM; y glucosa, 0,2% (p/v). Esta solución es perecedera y debe ser preparada en el momento de ser usada.
- Solución B: LB suplido con glicerol, 36% (v/v); polietilenglicol (PEG)-7500, 12% (p/v); y $MgSO_4 \times 7H_2O$, 12 mM.

8.2. Transformación.

La transformación de células competentes de *E. coli* con ADN plasmídico, se realizó utilizando el método descrito por Nishimura *et al.* (1990). Una alícuota de la suspensión celular, mantenida a -80°C, se transfirió a un baño de hielo y se añadieron 0,1-1 μ g de ADN. La mezcla se incubó primero en un baño de hielo durante 30 minutos, a continuación se aplicó un choque térmico sometiéndola a 42°C durante 1 minuto y finalmente, en un baño de hielo durante 1-2 minutos. Posteriormente, se añadió 1 ml de LB y las células se incubaron durante 1 hora a 37°C con agitación para permitir la ex-

presión de el(los) gen(es) de resistencia a antibiótico(s) codificado(s) en el plásmido introducido. Las células que habían adquirido el plásmido, y por tanto la resistencia al (los) antibiótico(s), se seleccionaron sembrando alícuotas de 50-200 µl de la suspensión celular en placas de LB sólido suplido con el(los) antibiótico(s) adecuado(s). Las placas se incubaron a 37°C hasta la aparición de colonias, generalmente durante 16-24 horas.

8.3. Electrotransformación.

La transferencia por electroporación es el método más utilizado para transferir ADN a las cepas de *Pseudomonas*. Para llevarlo a cabo es necesario que las células que van a ser electroporadas sean electrocompetentes.

La preparación de células competentes de *Pseudomonas* sp. para electroporación se realizó mediante el método de Enderle y Farwell (1998). Se partió de un cultivo reciente de *Pseudomonas putida* en medio sólido incubando a 30°C durante 10-14 horas (no debe mantenerse a 4°C pues baja la eficiencia). De este cultivo se tomaron 3 mg de células, evitando arrastrar el agar del medio, y se resuspendieron en 0,5 ml de H₂O destilada estéril. Las células de la mezcla homogénea se recogieron por centrifugación a 12,000 x g, tras lo que se eliminó el sobrenadante y el sedimento se volvió a resuspender en 0,5 ml de H₂O destilada estéril, recogiéndose en las mismas condiciones. Posteriormente se resuspendieron en 40 µl de H₂O destilada estéril y a partir de ese momento las células se mantuvieron en hielo hasta el pulso eléctrico. A la suspensión de células enfriadas en hielo se añadieron entre 50 y 150 ng de ADN libre de sales, para ello debe haber sido dializada o fenolizada dicha muestra. Tras 1 minuto de incubación en hielo, la mezcla de células y ADN plasmídico se transfirió a una cubeta de electroporación de 2 mm de anchura previamente enfriada, donde recibieron un pulso eléctrico de 1,8 kV/cm en un electroporador modelo Gene Pulser Apparatus (Bio-Rad, cat. no. 165-2098). Tras el pulso, se añadió a las células 1 ml de medio rico SOC, a temperatura ambiente, y la suspensión se incubó de 1 a 3 horas a 30°C con agitación, dependiendo del tiempo requerido para la expresión de la resistencia a antibiótico que portase el plásmido. A continuación, la suspensión o sus diluciones seriadas se sembraron en placas de medio selectivo para la selección de células portadoras de plásmido.

En la preparación de células electrocompetentes de *E. coli*, se siguió el mismo protocolo que adjunta Bio-Rad con el electroporador modelo Gene Pulser Apparatus. La suspensión de células así preparadas se distribuyeron en alícuotas de 40 μ l en tubos Eppendorf preenfriados y se almacenaron a -80°C . Las condiciones del pulso fueron las mismas descritas anteriormente para *Pseudomonas* sp.

9. MANIPULACIÓN DE ADN Y ARN

9.1. Determinación de la concentración de ADN y ARN.

Para estimar la concentración de ADN de una solución se utilizó el método espectrofotométrico descrito por Sambrook y colaboradores (1989). Se determinó la absorbancia de la solución de ADN y ARN a 260 y 280 nm, frente a una muestra de referencia de H_2O_d o TE, dependiendo del disolvente utilizado en la disolución del ácido nucleico. La concentración de cada muestra se calculó tomando como referencia el valor estándar de $A_{260}=1$ para soluciones que contienen 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de ADN de cadena doble o 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de ARN. La relación A_{260}/A_{280} se utilizó para determinar el grado de pureza de las preparaciones, de forma que los valores de esta relación por debajo de 1,8 se consideran indicadores de contaminación por proteínas y/o fenol.

9.2. Digestión de ADN con enzimas de restricción.

Las digestiones de ADN con enzimas de restricción se realizaron en las condiciones óptimas para cada enzima indicadas por el fabricante. Las reacciones contenían habitualmente 0,5-5 μg de ADN; 0,1 volúmenes del tampón de restricción correspondiente diez veces concentrado suministrado por la casa comercial; y 0,5-5 unidades del enzima de restricción, en volúmenes finales de 10-30 μl utilizando H_2O o TE para completarlos. En los casos requeridos, se añadió albúmina comercial. Las digestiones se llevaron a cabo incubando las mezclas de reacción durante 2 horas a la temperatura indicada por el fabricante (Roche o NewEngland Biolabs). Cuando fue necesario el enzima de restricción se inactivó por calor, por extracción fenólica, o por purificación del ADN tras electroforesis en gel de agarosa.

9.3. Defosforilación de ADN con fosfatasa alcalina.

Partimos de ADN lineal, previamente digerido con enzimas de restricción. Se añadió 1 unidad de fosfatasa alcalina de gamba ártica (USB-Amercham, ref E70092Z) por cada 5-10 pmoles de extremos 5'. Como tampón de dilución se utilizó 50 mM Tris-HCl, pH 8.0 suministrado por el fabricante. A la mezcla se añadió 0,1 volúmenes del tampón (200 mM Tris-HCl, pH 8,0, 100 mM MgCl₂) y se incubó 1 h a 37°C. Finalmente la reacción se detuvo por calor (10 minutos a 65°C) o mediante extracción fenólica.

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

La separación y visualización tanto de plásmidos completos, como de fragmentos de ADN originados por la digestión con enzimas de restricción se realizó mediante electroforesis en geles de agarosa. Se llevó a cabo según Sambrook *et al.*, (1989), utilizando geles de agarosa al 0,8% (p/v) preparados en tampón TAE. Los fragmentos de ADN menores de 500 pb se separaron en geles de agarosa al 1,5% (p/v). Por cada 5 µl de muestra a analizar se añadió 1 µl de tampón de carga, y la mezcla se depositó en un pocillo del gel sumergido en una cubeta con el mismo tampón. La separación se realizó por electroforesis horizontal sumergida a un voltaje de 5-10 V/cm.

Para visualizar el ADN los geles se tiñeron por inmersión en una solución de bromuro de etidio (10 mg/ml) durante 15 minutos y, después de lavar con agua para eliminar el exceso de bromuro de etidio, se expusieron a luz ultravioleta (254 nm) en un transiluminador. El tamaño de los fragmentos de ADN se estimó por comparación con el patrón de restricción del ADN del fago λ cortado con el enzima *HindIII*, o alternativamente, con los marcadores comerciales VIII y X (Roche Molecular Biochemicals, ref. 1336045 y 1498037, respectivamente). Las imágenes se recogieron con una videocámara acoplada a una impresora térmica, utilizando el equipo Gel-Doc 2000 de la casa comercial Bio-Rad.

La composición de los tampones y soluciones utilizados en este proceso fue la siguiente:

- Tampón de carga: glicerol, 30% (v/v); azul de bromofenol, 0,3% (p/v); xilencianol, 0,3% (p/v).
- Tampón TAE: Tris-Base, 4,84 g; ácido acético glacial, 1,14 ml; EDTA 0,5M, pH 8, 0,2 ml; H₂O, hasta 1 litro. Este tampón se preparó a partir de una solución 50 veces concentrada y esterilizada en el autoclave.

El marcador de peso molecular se preparó de la siguiente forma: se cortaron 80 μ l de ADN de fago λ (250 μ g/mg) con 1,5 unidades / μ g ADN de *Hind*III. Una vez digerido el ADN, la mezcla se incubó a 80°C para separar las regiones cohesivas de λ , posteriormente se añadieron 80 μ l de tampón de carga y se completó el volumen hasta 400 μ l con TE. La concentración final de ADN en la solución fue de 50 μ g/ml. El marcador X (0,07-12,2 kb) y VIII (0,037- 1,11 kb) manufacturados por Roche, se diluyeron en TE hasta alcanzar una concentración final de 50 ng/ μ l. Todas las soluciones de marcadores se almacenaron a 4°C.

Cuando fue necesario la separación y visualización del ARN total también se realizó mediante electroforesis en geles de agarosa, para comprobar si existía contaminación de ADN genómico en las muestras. El procedimiento fue el mismo que el descrito para ADN, con las variaciones siguientes: todo el material de electroforesis se enjuagó previamente en SDS 1% (p/v) y se aclaró con una solución autoclavada de DEPC 1:1000 en H₂O. El tampón TAE se preparó por dilución del 50 veces concentrado (anteriormente descrito) en solución autoclavada de DEPC 1:1000 en H₂O. La concentración de agarosa en los geles fue de 1,5 % (p/v) en lugar de 0,8% (p/v) y se acompañó de 0,1% (p/v) SDS. Todo el material de vidrio para preparar estas soluciones se trató previamente con cloroformo para eliminar posibles contaminaciones con ARNasas.

9.5. Recuperación de fragmentos de ADN de geles de agarosa.

Los fragmentos de ADN se recuperaron de los geles de agarosa con ayuda de un bisturí y se extrajeron utilizando el sistema comercial QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN cat. 28704), siguiendo las instrucciones del fabricante.

9.6. Ligación de ADN.

Para la ligación de moléculas de ADN se partió de fragmentos lineales obtenidos por digestión con enzimas de restricción en sitios compatibles para la ligación. El vector linearizado y el fragmento de ADN obtenido por digestión con uno o varios enzimas de restricción y purificado (según se indica en el apartado 9.3 y 9.4), se mezclaron en una proporción adecuada y se añadió 0,1 volúmenes de tampón de ligación (Roche, ref.1243292) y una unidad de ADN-ligasa del fago T4 (Roche, ref. 481220) en un volumen final de 15-20 μ l completados con H₂O o TE. La mezcla de reacción se incubó a 8-12°C durante 12-24 horas.

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

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

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

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

Las condiciones estándar de la reacción de amplificación fueron las siguientes: tras una desnaturalización inicial a 94°C durante 3 minutos, se realizaron 25 ciclos de 1 minuto a 94°C, 1 minuto de apareamiento a la temperatura adecuada para cada pareja de cebadores (de 48°C a 60°C) y 1 minuto de extensión por cada kb de ADN molde. A estos 25 ciclos le siguieron 7-10 minutos a 72°C para finalizar una posible extensión incompleta de los productos de PCR. Cuando la reacción estándar no resultó satisfactoria, se combinaron distintas modificaciones en la concentración de MgCl₂ (incrementada a 3 ó 4,5 mM) y/o la presencia de ciertos compuestos en la mezcla de reacción, como por ejemplo DMSO al 5% (v/v) que disminuyen la T_m del ADN. Los productos obtenidos tras la amplificación se purificaron utilizando el sistema comercial QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN, cat. no. 28104) para eliminar los cebadores y los dNTPs no incorporados.

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

9.8. Secuenciación de ADN.

La secuenciación de ADN se realizó en el servicio de secuenciación automática del Grupo de Degradación de Tóxicos Orgánicos de la Estación Experimental del Zaidín (CSIC-Granada), donde disponen del secuenciador ABI PRISM™ (modelo 3100) de Perkin Elmer. En el proceso de secuenciación se utilizó el sistema “DNA Sequencing Kit AmpliTaq DNA polymerase” (Perkin- Elmer, ref 402122), basado en la utilización de dideoxinucleótidos marcados con distintos cromóforos fluorescentes. Los oligonucleótidos empleados como cebadores en la secuenciación se sintetizaron en los laboratorios Roche Molecular Biochemicals.

9.9. Aislamiento y purificación de ARN.

Para experimentos de “extensión a partir de cebador” y RT-PCR, se purificó ARN de la cepa *Pseudomonas putida* KT2440. La extracción de ARN se realizó siguiendo las instrucciones descritas por Molecular Research Center, Inc. para el reactivo TRI REAGENT-LS. Es importante usar guantes durante todo el proceso de extracción y cambiarlos frecuentemente, puntas sin autoclavar obtenidas de una bolsa recién abierta, material de vidrio tratado previamente con cloroformo y soluciones tratadas con dietilpicrocarbonato (DEPC) o preparadas en H₂O_d tratada con DEPC (H₂O_{DEPC}) para evitar la degradación del ARN por ribonucleasas. El H₂O_{DEPC} se obtiene tras esterilizar por autoclave una solución de DEPC al 0,1 % (v/v) en H₂O_d incubada previamente al menos durante 60 minutos a temperatura ambiente y en agitación.

Para la preparación de ARN se recogieron sedimentos celulares de cultivos en fase de crecimiento exponencial en tubos para ARN previamente enfriados. Para la extracción se añadieron 200 µl de H₂O_{DEPC} fría al sedimento celular y se resuspendieron con pipeta. A continuación se añadieron 750 µl del reactivo TRI REAGENT-LS y tras resuspender bien los precipitados celulares, las muestras se incubaron durante 10 minutos a 60°C. Posteriormente, se centrifugaron a 10.000 x g durante 10 minutos a 4°C y se recogió la fase acuosa, que pasó a un tubo limpio al que se le añadieron 200 µl de BCP. Las muestras se agitaron de nuevo para homogeneizarlas y se dejaron 5-10 minutos a temperatura ambiente. Después se centrifugaron a 10.000 x g durante 15 minutos a 4°C y se recogió la fase acuosa, que se pasó a un tubo limpio al que se le añadieron 500 µl de isopropanol frío para precipitar el ARN. Las muestras se mezclaron por inversión, se dejaron 5-10 minutos a temperatura ambiente y se concentraron por centrifugación a 10.000 x g durante 8 minutos a 4°C. Los sedimentos se lavaron con etanol 70% (v/v), se centrifugaron durante 5 minutos en las condiciones anteriores y se secaron en una estufa a 37°C. Finalmente, se resuspendieron en 30 µl de H₂O_{DEPC}.

El ADN presente en los ácidos nucleicos extraídos se eliminó mediante tratamiento con la enzima ADNasa I de páncreas bovino. A cada una de las muestras se le añadieron 25 µl de una solución preparada en H₂O_{DEPC} que contenía 20 U de inhibidor de ARNasa (“RNase-Inhibitor”, Roche Molecular Biochemicals, ref. 799025), ditiotrei-

tol (DTT) 4 mM, MgCl₂ 40 mM y 10 U de ADNasa I libre de ARNasa (Roche Molecular Biochemicals, ref. 776785). La mezcla se incubó durante 1 hora a 37°C. Tras este tratamiento, se realizaron dos extracciones con fenol:cloroformo:alcohol isoamílico 25:24:1 (v/v/v), y una extracción con cloroformo:alcohol isoamílico 24:1 (v/v). El ARN presente en la fase acuosa de la última extracción se precipitó añadiendo 0,1 volúmenes de acetato sódico 3 M pH 4,8 y 2,5 volúmenes de etanol frío e incubando la mezcla 30 minutos a -70°C. Las muestras se centrifugaron a 10.000 x g durante 15 minutos a 4°C y el sedimento se lavó con 1 ml de etanol 70% (v/v), se centrifugó durante 5 minutos en las mismas condiciones anteriores y se secó a 37°C. Las muestras de ARN se resuspendieron en 25 µl de H₂O_{DEPC} y se almacenaron a -20°C.

Posteriormente fueron verificadas en un gel de agarosa-TAE 1,5% (p/v) y se cuantificó la concentración espectrofotométricamente, con cubetas de cuarzo de 0,3 ml. Normalmente la muestra se diluyó 300 veces para su cuantificación.

9.10. Reacción de amplificación en cadena con ADN polimerasa termorresistente acoplada a una reacción de transcripción reversa (RT-PCR).

9.10.1. Cebadores utilizados.

Como cebadores complementarios a las cadenas de ARNm se utilizaron los oligonucleótidos que se muestran en la Tabla M.4.

Tabla M.4. Oligonucleótidos utilizados como cebadores en las reacciones de extensión

Nombre	Secuencia (5'→3')	Características
RT-1	CAAAGCCAAGGGATATCGTTG	Hibrida con el gen <i>hlpB</i> (nucleótidos 2714 al 2734 de la Fig.C.I.2)
RT-2	TCGAGCCACAGCAGGTTGAT	Hibrida con el gen <i>hlpB</i> (nucleótidos 2996 al 3015 de la Fig.C.I.2)
RT-3	TACATCGGCCTGGACCTG	Hibrida con el final de <i>hlpB</i> para amplificar la región intergénica (nucleótidos 3368 al 3385 de la Fig.C.I.2)
RT-4	GCCCTGGAAGTGC GGTT	Hibrida con el principio de <i>hlpA</i> para amplificar la región intergénica (nucleótidos 3899 al 3916 de la Fig.C.I.2)
RT-5	AGCTCGACCAGCAACCTG	Hibrida con el gen <i>hlpA</i> (nucleótidos 5429 al 5446 de la Fig.C.I.2)
RT-6	AACCTGGTTGGTCGTGCG	Hibrida con el gen <i>hlpA</i> (nucleótidos 5699 al 5716)

9.10.2. Reacción de amplificación en cadena con ADN polimerasa termorresistente acoplada a una reacción de transcripción reversa (RT-PCR).

Mediante RT-PCR se puede determinar la presencia o ausencia de moldes de ARN en una muestra. Se trata de una técnica semicuantitativa que puede llegar a dar una idea de la expresión de un gen. En nuestro caso se empleó para dilucidar si un conjunto de genes formaban o no parte de una única unidad transcripcional, esto es, si constituían un operón.

Para ello, células de *P. putida* KT2440 y los mutantes mus-27 y mus-28 se cultivaron en medio LB líquido hasta alcanzar la fase de crecimiento exponencial (DO_{660} entre 0,5 y 0,6) momento en el que se aisló el ARN total, tal y como se describe en el apartado 9.9 de esta sección. La reacción de transcripción reversa y la posterior reacción de amplificación del ADNc, se realizaron utilizando el sistema comercial “Titan One Tube RT-PCR System” (Roche Molecular Biochemicals, ref. 1855476) siguiendo las instrucciones del fabricante, con los oligonucleótidos adecuados para cada caso. La transcripción reversa se realizó incubando las muestras a 42°C durante 30 minutos. Las condiciones estándar de la reacción de amplificación fueron las siguientes: tras una desnaturalización inicial a 94°C durante 2 min, se realizaron 30 ciclos en las siguientes condiciones: 94°C, 30 seg; 50°C, 30 seg; 68°C, 30 seg, y finalmente se realizó una extensión a 68°C durante 7 minutos. La temperatura de hibridación se modificó en función de los cebadores utilizados. En este ensayo se realizó un control negativo para detectar posibles falsos positivos en la reacción de extensión debido a la presencia de ADN en las muestras de ARN. Como controles negativos se realizó una PCR normal a partir de las muestras de ARN. En estas reacciones no se obtuvo ningún producto de amplificación. Los productos de RT-PCR se separaron en geles de 2% (p/v) agarosa-TAE y se observaron sobre una lámpara de luz ultravioleta tras ser teñidos en una solución de bromuro de etidio.

10. EXTENSIÓN REVERSA A PARTIR DE UN CEBADOR

10.1. Marcaje de cebadores

Los oligonucleótidos utilizados como cebadores se marcaron por fosforilación en su extremo 5' con [γ -³²P]ATP (Amersham Pharmacia Biotech, ref. AA0068). Cada reacción contenía 5 pmoles de oligonucleótido, 1 μ l del tampón de la enzima polinucleótido kinasa concentrado 10 veces (Tris 0,5 M pH 7,6; MgCl₂ 0,1M; DTT 50 mM; espermidina 1 mM; EDTA 1 mM), 1 μ l de [γ -³²P]ATP (>3.000 mCi/mmol) y 1 U de la enzima polinucleótido kinasa del fago T4 (Roche Molecular Biochemicals, ref. 838292), en un volumen final de 10 μ l. Las mezclas de reacción se incubaron a 37°C durante 1 hora. La kinasa se eliminó tratando la mezcla con fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1 [v/v/v]), y el exceso de [γ -³²P]ATP se eliminó por filtración a través de una columna comercial con gel de poliacrilamida en Tris 10 mM pH 7,4 ("Micro Bio-Spin 6 Column Tris", Bio-Rad, ref. 732-6222) siguiendo las instrucciones del fabricante.

El porcentaje de oligonucleótido marcado se calculó utilizando un detector de radiaciones "TRI-CARB 1500 Liquid Scintillation Analyzer" de Packard. Se determinó el número de desintegraciones por minuto (cpm) de una muestra de 0,5 μ l del oligonucleótido a la que se añadieron 4 ml de líquido de centelleo.

10.2. Reacción de extensión

Como cebadores complementarios a las cadenas de ARNm se utilizaron los oligonucleótidos que se muestran en la Tabla M.5. Los cebadores hibridaban con secuencias próximas al extremo 5' de los genes en estudio.

TABLA M.5. Oligonucleótidos utilizados como cebadores en las reacciones de extensión

Nombre	Secuencia (5'→3')	Características
PE	GATCCGCTGACTGACCGGT	Hibrida con <i>orf</i> PP1452 (nucleótidos 624 al 643 de la Figura C.I.2). Purificado por HPLC
PE-1	CAGCACCTGGGGAATGGACAG	Hibrida con <i>orf</i> PP1450 (nucleótidos 1949 al 1969 de la Figura C.I.2). Purificado por HPLC
PE-2	GCCCTGGAAGTGC GGTT	Hibrida con <i>orf</i> PP1449 (nucleótidos 3899 al 3916 de la Figura C.I.2). Purificado por HPLC

Para la hibridación con los oligonucleótidos marcados con las cadenas de ARN, se mezclaron 2 µl de tampón de hibridación (NaCl 2M, Piperacina-N,N'-bis(2-etanosulfonato) [PIPES] 50 mM pH 6,4), 10⁵ cpm del oligonucleótido marcado y 25 µg de ARN total, en un volumen final de 10 µl en H₂O_{DEPC}. La mezcla se incubó a 85°C durante 5 min, posteriormente se pasó a un baño a 65°C, donde se incubó durante 10 min, y se dejó enfriar lentamente hasta 44°C. La reacción de extensión se realizó añadiendo 40 µl de una solución que contenía el tampón de la transcriptasa reversa (Tris-HCl 62,5 mM pH 8,2; MgCl₂ 10 mM; KCl 37,5 mM; DTT 1,25 mM), los 4 desoxinucleótidos a 1 mM cada uno, 20 U de inhibidor de ARNasas, 3 µg de actinomicina D y 7 U de la transcriptasa reversa del virus de la mieloblastosis de ave (Roche Molecular Biochemicals, ref. 109118). La mezcla se incubó a 44°C durante 1 hora. La reacción se detuvo mediante la adición de 5 µl de acetato sódico 3 M pH 4,8 y 150 µl de etanol frío (-20°C), y la muestra se dejó precipitando durante 10-14 horas a -20°C.

Las reacciones de extensión se precipitaron por centrifugación a 12.000 x g durante 15 min a 25°C. Se lavaron con etanol 70% (v/v) frío (-20°C) y se dejaron secar a 90°C durante 3 min. Finalmente el ADNc se resuspendió en 4 µl de TE (Tris-HCl 10 mM, pH 8; EDTA 1 mM) y 2 µl de tampón de carga con formamida (0,3 % [p/v] azul de bromofenol; 0,3 % [p/v] xilencianol; 10 mM EDTA pH 7,5; 97,5% [v/v] formamida desionizada). Las muestras se desnaturalizaron mediante exposición a 90°C durante 5 min y se enfriaron en hielo antes de su separación por electroforesis.

10.3. Separación de las cadenas extendidas de ADNc mediante electroforesis

La separación de las cadenas de ADNc se llevó a cabo mediante electroforesis desnaturalizante en geles de poliacrilamida (40 x 20 cm de tamaño) al 6,5 % (p/v) en TBE (Tris-base 54 g/l; ácido bórico 27,5 g/l; EDTA 10 mM, pH 8) a potencia fija de 40 W y voltaje variable entre 1.500 y 2.000 V. La solución de acrilamida se preparó disolviendo urea (a 0,42 g/ml de concentración final) en 6,5% (p/v) de acrilamida: N,N'-metilenbisacrilamida en proporción 19:1 (p/p) en TBE, y una vez preparada se filtró a través de una membrana de nitrocelulosa mediante vacío. Para catalizar la polimerización de la acrilamida, a 60 ml de la solución anterior se le añadieron 250 µl de persulfato amónico 10% (p/v) recién preparado y 75 µl de N,N,N',N'-tetrametiletildiamina (TEMED).

El montaje de las placas de cristal de la unidad de electroforesis, una de las cuales se trató con dimetildiclorosilano para evitar la adhesión del gel, se realizó según las instrucciones del fabricante.

Una vez finalizada la separación, el gel se transfirió a un papel de filtro Whatman 3MM, se cubrió con papel de plástico transparente y se secó al vacío en un secador Bio-Rad a 80°C durante 30 min. Las bandas de ADNc del gel se visualizaron por autoradiografía utilizando métodos estándar tras al menos 48 horas de exposición a -80°C. Alternativamente, la radiactividad acumulada en el gel se cuantificó con un Molecular Imager modelo FX (Bio-Rad) utilizando una pantalla IP (Fuji).

11. MUTAGÉNESIS.

11.1. Construcción de mutantes por reemplazamiento alélico.

Para la construcción de mutantes de *P. putida* por recombinación homóloga se utilizó el plásmido pKNG101 (ver apartado de plásmidos), en el cual se clonó el gen a mutar interrumpido por un gen marcador (cassette de resistencia a kanamicina) de manera que hubiese suficiente secuencia de ADN, preferiblemente 1 kb o más, a cada lado de dicho marcador. El plásmido se transfirió desde *E. coli* CC118λpir a *P. putida* por

conjugación “tripartita”. Se seleccionaron los transconjugantes resistentes a estreptomina, surgidos como consecuencia de la integración del vector en el cromosoma del huésped por recombinación homóloga a través de las secuencias que flanquean el marcador. Se comprobó que estas cepas (denominadas merodiploides o cointegrados) poseían el fenotipo que les confería el marcador introducido (resistencia a Km). De esta forma se descartaron posibles mutantes espontáneos resistentes a estreptomina. Los merodiploides fueron de dos tipos: aquellos en los que la recombinación se había producido antes del marcador, y aquellos en los que se había producido después del mismo. Las cepas merodiploides no deberían crecer en el medio LB suplido con estreptomina (100 µg/ml) y sacarosa al 5% (p/v), pero en ocasiones, las condiciones del medio tuvieron que optimizarse (aumentando la concentración de sacarosa) para alcanzar dicho fin. Finalmente, la pérdida de las secuencias del vector y del gen silvestre se confirmó mediante PCR e hibridaciones de ADN.

12. TRANSFERENCIA DE ADN A MEMBRANA POR EL MÉTODO DE “SOUTHERN BLOT” E HIBRIDACIÓN.

La técnica utilizada es la descrita en el libro de métodos “Current protocols in molecular biology” (Ausubel *et al.*, 1991).

12.1. Transferencia por capilaridad.

Las muestras de ADN plasmídico digeridas con las enzimas de restricción seleccionadas o sin digerir, se separaron en geles de agarosa y se transfirieron a membranas de nylon de 0,45 µm de diámetro de poro cargadas positivamente (Roche Molecular Biochemicals, ref. 1417240), siguiendo el protocolo de transferencia alcalina descrito por Reed y Mann (1985).

Después de la electroforesis el gel se sumergió en una solución 0,2 N de HCl durante 15 minutos hasta que se produjo el viraje de azul bromofenol a amarillo. Este tratamiento ácido permite introducir mellas en el ADN y depurarlo, lo que facilita la

transferencia. El ADN se desnaturalizó introduciendo el gel en una solución de NaOH 0,5 M, hasta que se observó de nuevo el viraje del indicador, ahora de amarillo a azul.

Sobre un cristal se colocó una tira de papel de filtro del mismo largo que el gel y de mayor anchura, de manera que los extremos quedasen sumergidos en la solución de transferencia, 10 x SSC, colocada en el reservorio inferior. Sobre el papel se colocó el gel en posición invertida y sobre éste la membrana, sobre la cual se depositaron varias capas de papel de filtro que hacen de absorbentes, otro cristal y por último un peso de aproximadamente 0,5 Kg. De esta forma la solución de transferencia ascendió por capilaridad a través del gel arrastrando el ADN hasta la membrana, donde quedó retenido. La transferencia total de ADN del gel a la membrana requiere un mínimo de 5 horas, aunque a veces se dejó transfiriendo toda la noche. La membrana se lavó posteriormente en 10 x SSC, para eliminar los posibles restos de agarosa, y se dejó secar sobre un papel de filtro.

Para asegurar la fijación de las moléculas de ADN a la membrana de nylon, ésta se expuso durante 3 minutos a una lámpara UV (254 nm). Las membranas se conservaron secas a temperatura ambiente selladas en bolsas de plástico hasta su utilización.

12.2. Marcaje no radiactivo de ADN lineal.

El marcaje de la sonda con digoxigenina y la detección de los híbridos ADN-ADN se realizó utilizando el sistema comercial “DIG DNA Labeling and Detection Kit”(Roche Molecular Biochemicals, ref. 1093657). Las sondas de ADN se marcaron con DIG-11-dUTP (Roche Molecular Biochemicals, ref. 1093088), mediante extensión con el fragmento Klenow de la ADN-polimerasa de *E. coli*, y utilizando como cebadores una mezcla aleatoria de hexanucleótidos. El marcaje de la sonda y su recuperación se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante.

En algunos casos el marcaje de la sonda se hizo por PCR (como se describe en el apartado 9.7) utilizando el mismo producto DIG-11-dUTP, que produce una incorporación múltiple de dUTP marcado, ya que puede ser usado como sustrato por la Taq-polimerasa, reemplazando al dTTP durante la reacción en cadena de la polimerasa. La mezcla de reacción contenía: ADN molde, 0,05-1 µg; cebador, 25 pmoles; tampón Taq-

ADN-polimerasa (10x) 2,5 µl; dNTPs: 0,2 mM de dATP, dCTP y dGTP; 0,18 mM de dTTP y 0,02 mM de dig-dUTP; Taq ADN-polimerasa 1 U y H₂O hasta 25 µl. Para la amplificación se usó el programa descrito en el apartado 9.7 para la amplificación de genes cromosómicos.

12.3. Prehibridación e hibridación.

Se utilizó un horno de hibridación (Hybridisation oven/shaker SI 20H). Se mantuvieron 2-8 horas de prehibridación a 60°C con 20 ml de solución de hibridación por cada 100 cm² de membrana, transcurrido el cual la solución de hibridación se retiró. Se añadió 20-200 ng de sonda marcada y desnaturalizada disuelta en solución de hibridación, dejando la mezcla durante 6-15 horas a 60°C, para que tuviera lugar la hibridación. El lavado de las membranas se realizó en las siguientes condiciones de fuerza iónica y temperatura: dos lavados de 10 minutos cada uno a temperatura ambiente en 2 x SSC más 0,1% (p/v) de SDS; dos lavados de 15 minutos a 65°C en 0,1x SSC más 0,1% (p/v) de SDS.

La composición de la solución de hibridación fue la siguiente: 5 x SSC; formamida, 50% (v/v); 0,02% (p/v) SDS; 5% (p/v) agente bloqueante; H₂O hasta 20 ml/ 100 cm² de membrana.

12.4. Detección inmunológica.

Esta reacción se realizó con el sistema “Detection Kit” (Roche 1093657), siguiendo el protocolo detallado por el fabricante. La membrana se lavó con una solución tampón-1, y se incubó en 100 ml de solución tampón-2 durante 30 minutos. A continuación se lavó con tampón 1 y se incubó con 20 ml de solución de anticuerpo (anti-digoxigenina-fosfatasa alcalina conjugado) diluido en tampón-1 durante 30 minutos. Posteriormente, se realizaron dos lavados de 15 minutos con 100 ml de tampón-1 para eliminar el anticuerpo no unido. A continuación, la membrana se equilibró con 20 ml de solución tampón-3 durante 2 minutos y finalmente se incubó con 10 ml de la solución colorante en oscuridad hasta la aparición de bandas. La reacción se detuvo lavando con 50 ml de H₂O durante 5 minutos.

La composición de las soluciones utilizadas en este proceso fueron las siguientes:

- Tampón-1: Tris-HCl pH 7, 100 mM; y NaCl, 150 mM.

- Tampón-2: Bloqueante 0,5% (p/v) en tampón-1.

- Tampón-3: Tris-HCl pH 9,5, 100 mM; NaCl, 100 mM; y MgCl₂, 50 mM.

- Solución de anticuerpo: Anticuerpo anti-digoxigenina-fosfatasa alcalina conjugado, preparado en 20 ml de tampón-1 a una concentración final de 150 mU/ml.

- Solución colorante: solución de azul de nitrotetrazolio (NBT), solución de 5-bromo-4-cloro-3-indolilfosfato (BCIP), 35 µl; y tampón-3, hasta 10 ml.

13. ENSAYOS DE MOVILIDAD BACTERIANA.

La movilidad de la cepa silvestre y de los mutantes se determinó analizando su capacidad de migrar durante el cultivo en placas de medio LB semisólido. Para ello, bacterias procedentes de una placa de medio LB fresco se inocularon tocando de forma puntual sobre la superficie del medio semisólido, con ayuda de un palillo estéril. Tras 16 horas de incubación a 30°C, se determinó el diámetro del halo de crecimiento.

14. ENSAYOS DE RESISTENCIA /SENSIBILIDAD

14.1 Ensayos de resistencia/sensibilidad a antibióticos.

Para establecer el espectro de resistencia/sensibilidad a antibióticos de las cepas, se utilizaron discos impregnados con las siguientes concentraciones de antibióticos (suministrados por bioMérieux) en µg: ácido nalidíxico, 30; ampicilina, 10; estreptomina, 10; rifampicina, 30; eritromicina (Er), 15; tetraciclina, 30; piperacilina (Pip), 100; gentamicina (Gm), 10.

Se sembraron 50 µl de cultivos incubados a 30°C con agitación durante 12-16 horas de las cepas a estudiar en placas de LB, una vez secas se depositaron los discos de

antibióticos (uno por placa) en la superficie del medio. Las placas se incubaron a 30°C durante 12 horas, transcurridas las cuales, se observaron los halos de inhibición, claramente definidos en torno al disco. Los datos del diámetro del halo de inhibición incluían el diámetro del disco (6 mm).

14.2. Ensayos de resistencia/sensibilidad a diferentes compuestos químicos.

Estos ensayos se realizaron como estudio preliminar de la tolerancia de una cepa bacteriana, para acotar el intervalo de concentraciones de un determinado compuesto, al poder analizarse de manera sencilla en gradiente amplio de concentración.

La sensibilidad a diferentes compuestos químicos se determinó mediante el método de placas de doble difusión. Como compuestos químicos se utilizaron los que se detallan a continuación a las concentraciones finales que se indican:

- a) Deoxicolato sódico (DOC): se preparó una solución concentrada al 10% (p/v) que se esterilizó en el autoclave, se almacenó a temperatura ambiente y se utilizó a una concentración final de 2% (p/v).
- b) Ácido etilendiaminotetraacético (EDTA): se preparó una solución concentrada 0,5 M a pH 7,9 y se esterilizó en el autoclave, se almacenó a temperatura ambiente y se utilizó a una concentración final de 1mM.
- c) Dodecil sulfato sódico (SDS): se preparó una solución concentrada al 10% (p/v) que se esterilizó en el autoclave, se almacenó a temperatura ambiente y se utilizó a una concentración final de 1% (p/v).
- d) Etilenodiamino-DI ácido *o*-hidroxifenilacético (EDDHA, agente quelante): se preparó una solución concentrada 1,5% (p/v) que se esterilizó en el autoclave, se almacenó a una temperatura ambiente y se utilizó a una concentración final de 400 μ M.
- e) 2,2'-Bipiridina: se preparó una solución concentrada 50 mM, se almacenó a temperatura ambiente y se utilizó a una concentración final de 5 mM y 10 mM.
- f) 4,4'-Bipiridina: se preparó una solución concentrada 50 mM, se almacenó a temperatura ambiente y se utilizó a una concentración final de 5 mM y 10 mM.

Para este ensayo se utilizaron placas Petri cuadradas (10 cm x 10 cm), marcándose la placa en uno de los extremos para diferenciar la zona de mayor concentración

del compuesto químico bajo ensayo. En la preparación de las placas se empleó como mencionamos anteriormente la técnica de doble difusión, para lo cual se dispuso un lateral de la placa Petri sobre un apoyo (por ejemplo, una pipeta de vidrio de 1 ml) de manera que en la placa inclinada se vertieron 62 ml de medio de cultivo (LB) suplido con el compuesto problema a una concentración que constituía el máximo del gradiente a preparar. Una vez solidificado el medio, se retiró el apoyo y sobre la base de medio con forma de plano inclinado y ya en posición horizontal, se vertieron 62 ml de medio LB.

Una vez preparadas las placas de doble difusión en LB se estrió una colonia de cada mutante a estudiar, desde la zona de mayor a menor concentración de compuesto químico y se incubaron las placas durante 24 horas a 30°C.

15. MICROCOSMOS EDÁFICOS.

Los estudios en microcosmos intentan reproducir en el laboratorio un ambiente natural, en este caso el suelo, con la intención de controlar distintas condiciones propias del hábitat de origen (temperatura, humedad, etc.).

Las características físico-químicas del suelo utilizado se recogen en la Tabla M.6. Las características granulométricas de este suelo se muestran en la Tabla M.7.

Tabla M.6. Características físico-químicas del suelo utilizado.

Tipo	Materia orgánica	Nitrógeno	Fósforo	Potasio	pH	Procedencia
Franco	2,1%	1,3g/kg	9mg/kg	82mg/kg	7,9	Finca experimental de La EEZ, CSIC, Granada

Tabla M.7. Características granulométricas del suelo utilizado.

Tipo	Composición (%)		
	Arena	Sedimento	Arcilla
Franco	38%	43%	19%

Antes de su utilización, el suelo se tamizó a través de una criba metálica de 4 mm. A continuación, el suelo se esterilizó en el autoclave a vapor fluente a 120°C durante 1 hora, tres veces consecutivas, esperando entre cada esterilización aproximadamente 24 horas para permitir el enfriamiento del suelo y la germinación de esporas de microorganismos gram-positivos y de hongos, si las hubiese (Ciafardini y Marotta, 1989).

Se llenaron recipientes de cristal con 70-90 g de suelo. El inóculo se preparó como se indica a continuación: células cultivadas durante 12 horas a 30°C con agitación en el medio apropiado y suplido con los antibióticos requeridos, se recogieron por centrifugación a 7500 g durante 1 minuto. Las células se lavaron con tampón 1 x M9 y, posteriormente, se resuspendieron en el mismo tampón a la densidad requerida (del orden de 1×10^7 UFC/g). Se añadió 1 ml de esta suspensión celular a cada uno de los microcosmos y las células se mezclaron con el suelo con ayuda de una varilla de vidrio estéril y con aproximadamente 20 ml de agua. Los microcosmos se mantuvieron tapados a una temperatura constante de 25°C.

Periódicamente, se tomaron muestras de 5 g de suelo; se suspendieron en 50 ml de tampón 1 x M9 y se mantuvieron en un agitador a 200 rpm y 30°C durante 30 minutos. A continuación, se hicieron diluciones seriadas y las bacterias se sembraron en placas de medio selectivo. La primera muestra (indicada como “muestra a tiempo = 0”) se tomó 1 hora después de la inoculación. La toma de muestras se prolongó hasta 30 días.

16. EXPERIMENTOS DE COLONIZACIÓN DE LA RIZOSFERA.

16.1. Plantas utilizadas.

En este estudio se emplearon semillas de maíz (*Zea mays*), variedad Girona de ciclo corto, suministradas por Bolivar S.L. (Granada).

16.2. Esterilización de semillas en superficie.

La superficie de las semillas se esterilizó como se indica a continuación: si las semillas habían sido tratadas con fungicidas se lavaron entre 3 y 6 veces con agua destilada abundante. A continuación, se lavaron 10 minutos con etanol 70% (v/v) en un matraz con agitación y de nuevo se lavaron con agua destilada para después lavarlas con lejía al 20% con agitación durante 15 minutos (2 lavados) y por último se lavaron con abundante agua destilada.

Las semillas esterilizadas se hidrataron en placas de vidrio (15-20 semillas por placa), cubriéndose con papel absorbente humedecido en agua estéril y se incubaron 2 días a 30°C. Para ensayos de adhesión se incubaron 1 día a 30°C.

Se eligieron las semillas en las que se observó abultamiento del pericarpo en la zona donde aparecería la raíz.

16.3. Inoculación de semillas.

Bacterias cultivadas durante 10-12 horas a 30°C con agitación en el medio apropiado y suplido con los antibióticos requeridos, se diluyeron hasta una $DO_{660} = 1$, en un volumen final de 1 ml en 1 x M9.

Se inocularon 10 µl en 15 ml de 1 x M9 junto con 10 semillas; el volumen del inóculo es orientativo y se ajustó en función del número de semillas. Tras incubación a 30°C durante 30 minutos, las semillas se sacaron y se lavaron con agua destilada antes de ser sembradas. En los experimentos de coinoculación de semillas con dos cepas bacterianas distintas, se inocularon el mismo volumen de ambas.

Para el recuento de las bacterias adheridas a las semillas, se introdujeron dos de éstas en tubos de ensayo con 1 ml de tampón 1 x M9. La suspensión se agitó vigorosamente durante 2 minutos para separar las bacterias de la semilla y posteriormente, se hicieron diluciones seriadas de esta suspensión bacteriana que se sembraron en placas de medio requerido conteniendo los antibióticos apropiados.

16.4. Experimentos bajo condiciones de invernadero.

Las condiciones de mantenimiento del invernadero fueron las siguientes: temperatura, 25°C; humedad relativa, 50%, mantenida mediante un atomizador de agua y un fotoperiodo natural. Para experimentos realizados en suelo estéril, macetas de 10 cm de diámetro se llenaron con una mezcla de suelo franco:arena en relación 1:1. En cada maceta se sembró una semilla inoculada con la cepa correspondiente. En este caso se procedió a riegos semanales por capilaridad; las macetas se situaron en bandejas de plástico de 60 cm de longitud x 30 cm de anchura x 10 cm de profundidad, en las que se vertieron aproximadamente 2 litros de H₂O.

16.5. Supervivencia de cepas bacterianas en raíz, rizosfera y suelo no rizosférico.

Se tomaron muestras a distintos intervalos de tiempo para determinar el número de UFC presentes tanto en la raíz, rizosfera y suelo no rizosférico. Para ello se prepararon y autoclavaron tubos Falcon con perlas de vidrio de 0,3 mm de diámetro (4 g por tubo). A continuación se extrajeron de las macetas las raíces de las plantas a analizar.

El suelo rizosférico se separó de las raíces sacudiéndolas en una bolsa de plástico, se cortó el tallo justo por encima de la semilla y se pesó la raíz. A continuación se introdujo la raíz en un tubo Falcon con perlas de vidrio, se añadió 10-20 ml de 1 x M9 (volumen orientativo en función del tamaño de la raíz) y se agitó 1 minuto en un agitador de mesa Heidolph a 800 rpm. A partir de esta suspensión se hicieron diluciones seriadas que se sembraron en placas de medio selectivo con benzoato y con los antibióticos apropiados. Los datos se expresaron como UFC/g raíz.

Igualmente se estimó el número de UFC/g de suelo rizosférico. Para ello se pesaron 5 g de suelo rizosférico y se introdujeron en un matraz con perlas de vidrio y se añadió 50 ml de 1 x M9. A continuación se llevó a agitación 30 minutos a 30°C y a partir de esta solución se hicieron diluciones seriadas que se sembraron en placas de medio selectivo con los antibióticos apropiados. Los datos se expresaron como UFC/g de suelo rizosférico.

Por último con el suelo no rizosférico, que constituía aquel que estaba en torno a la rizosfera, se procedió exactamente igual que con el suelo rizosférico y los resultados también se expresaron como UFC/g de suelo no rizosférico.

17. ENSAYOS DE ADHESIÓN A SEMILLAS.

17.1. Plantas utilizadas.

En este estudio se emplearon semillas de diferentes plantas: maíz (*Zea mays*) variedad de ciclo corto, haba (*Vicia faba*) variedad de ciclo muy precoz, guisante (*Pisum sativum*) suministradas por Bolivar S.L.

17.2. Esterilización de semillas en superficie.

Las semillas se esterilizaron e hidrataron como se describió en el apartado 16.2 de esta sección.

17.3. Adhesión a semillas.

Bacterias cultivadas durante 10-12 horas a 30°C con agitación en el medio apropiado (LB) y suplido con los antibióticos requeridos, se diluyeron hasta una $DO_{660} = 1$, en un volumen final de 1 ml de $1 \times M9$. Se inocularon 5 μ l de cultivo en 1 ml de $1 \times M9$ junto con una semilla de maíz en un tubo de ensayo y 10 μ l en 10 ml de $1 \times M9$ con una semilla de haba en un tubo Falcon (se ajustaron los volúmenes para mantener el inóculo en 5×10^6 - 10^7 células por semilla) y se incubaron 1 h a 30°C sin agitación. A continuación se sacaron las semillas y se lavaron con agua destilada para después pasarlas a un tubo nuevo con 1 ml de $1 \times M9$ y 10 ml $M9$ cuando las semillas fueron de haba; entonces se agitaron durante 1 minuto en un agitador de mesa Heidolph y se sacaron de nuevo para lavarlas con agua destilada. De nuevo se pasaron las semillas a tubos nuevos con 2 ml de $1 \times M9$ cuando eran semillas de maíz y 10 ml cuando eran semillas de haba, junto con 8-10 perlas de vidrio de 0,3 mm de diámetro y se agitaron durante 1 minuto en un agitador de mesa Heidolph. Finalmente se hicieron diluciones seriadas de esta suspen-

sión bacteriana que se sembraron en placas de medio selectivo con benzoato y con los antibióticos apropiados.

18. OBTENCIÓN DE EXUDADOS RADICULARES

Los exudados procedentes de la raíz de plantas de maíz se obtuvieron mediante el cultivo hidropónico de semillas de maíz previamente germinadas en condiciones de esterilidad. Las semillas se esterilizaron e hidrataron como se describió en el apartado 16.2 de esta sección. Pasados dos días, las semillas germinadas se transfirieron a vasos de precipitados de cristal de 150 ml de capacidad provistos de un flotador de plástico con 20 orificios en su interior los cuales habían sido autoclavados previamente. El recipiente se llenó con 100 ml de una solución H_2O_d o con una solución de medio mínimo M8 estéril cuya composición se detalla en el apartado 3.2 de esta sección. Las semillas pregerminadas se colocaron sobre el flotador sumergiendo las raíces en la solución acuosa. Posteriormente el cultivo hidropónico se colocó en recipiente mayor previamente autoclavado provisto de tapadera con objeto de mantener la esterilidad del cultivo en todo momento. Tras 5 días desde la introducción de las raíces se retiraron las plantas y la solución acuosa que ahora contenía los exudados radiculares se filtró con papel de filtro para eliminar los restos celulares, posteriormente se esterilizó por filtración a través de membranas de $0,45 \mu m$ y se almacenó a $4^\circ C$.

Los exudados procedentes de semillas de maíz se obtuvieron mediante el cultivo hidropónico de semillas de maíz previamente germinadas en condiciones de esterilidad. Las semillas se esterilizaron e hidrataron como se describió en el apartado 16.2 de esta sección. Pasados dos días, las semillas se transfirieron a vasos de precipitados de cristal de 150 ml de capacidad los cuales habían sido previamente autoclavados. El recipiente se llenó con 20 ml de una solución de H_2O_d y se introdujeron 20 semillas en su interior. Posteriormente se tapó con papel de aluminio con objeto de mantener la esterilidad. Tras un día a temperatura ambiente se retiraron las semillas y la solución acuosa que ahora contenía los exudados de semillas se esterilizó por filtración y se almacenó a $4^\circ C$.

19. MEDIDA DE LA ACTIVIDAD β -GALACTOSIDASA

La medida de actividad β -galactosidasa se realizó en células permeabilizadas según el método descrito por Miller (1972). Este método se basa en una reacción colorimétrica en la que el *o*-nitrofenil- β -D-galactopiranosido (ONPG), sustrato incoloro de la enzima β -galactosidasa, es hidrolizado por dicha enzima produciendo galactosa y *o*-nitrofenol. Este último compuesto es de color amarillo y su concentración puede determinarse por espectrofotometría.

Cultivos celulares incubados a 30°C durante 10-14 horas se diluyeron 100 veces en 20 ml de medio LB líquido o de medio mínimo M9 y se incubaron a 30°C en agitación. Tras un periodo de incubación variable, se recogieron fracciones alícuotas de 50-500 μ l de los cultivos (el volumen de muestra debe ir variando a lo largo del crecimiento del cultivo) y se completó hasta 500 μ l con LB o M9. A continuación se añadió el volumen de una solución que contenía 2 mg/ml de detergente bromuro de alquiltrimetil-amonio (MATAB) en Tris-HCl 0,2 M pH 8, con objeto de permeabilizar las células. Tras incubar esta mezcla en hielo durante 30 min, se le añadieron 0,5 ml de tampón Z pH 7 (60 mM Na₂HPO₄; 40 mM NaH₂PO₄; 10 mM KCl; 1 mM MgSO₄ y 50 mM β -mercaptoetanol) y 0,2 ml de una solución de ONPG (4 mg/ml de *o*-nitrofenil- β -D-galactopiranosido en tampón fosfato 0,1 M pH 7). La solución de ONPG se mantuvo estable a 4°C y en oscuridad durante 2 semanas aproximadamente. Se empezó a contar el tiempo de reacción en el momento en el que se añadió el ONPG. La mezcla de reacción se incubó a 30°C hasta la aparición de color (entre 2 min y 1 hora) y se detuvo añadiendo 0,5 ml de una solución de Na₂CO₃ 1M. La concentración de *o*-nitrofenol se determinó espectrofotométricamente midiendo la absorbancia a 420 nm. También se midió la absorbancia a 550 nm de cada muestra para realizar una corrección debida a la contribución de la turbidez celular, y, además, se determinó la densidad celular de los cultivos midiendo su turbidez a 660 nm. Rutinariamente, los ensayos se realizaron por triplicado.

La actividad β -galactosidasa, expresada en Unidades Miller, se calculó de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$\text{Actividad } \beta\text{-galactosidasa} = \{[A_{420} - (1,7 \times A_{550})] / (t \times V \times DO_{660})\} \times 1000$$

donde “t” representa el tiempo de reacción en min y “V” el volumen (en ml) de células utilizado en la permeabilización.

20. DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS EN EL MEDIO EXTRACELULAR.

20.1. Preparación de proteínas del sobrenadante

Células de *P. putida* KT2440 y de los mutantes mus-27 y mus-28 se cultivaron en 10 ml de medio LB líquido con los antibióticos adecuados, hasta alcanzar una densidad celular de 0,5. Entonces, 5 ml de cultivo celular se recogieron por centrifugación a 10.000 x g durante 2 minutos a 25°C. El sobrenadante se recogió con una pipeta (con cuidado de no llevarse células) y se filtró a través de un filtro de 0,2 μ m, repartiéndolo en varios eppendorf, unos 200 μ l/tubo, y se le añadieron 1 ml de etanol. Las muestras se precipitaron a -20°C durante 30 minutos y se concentraron por centrifugación a 10.000 x g durante 15 minutos. Los sedimentos se eliminaron y se dejó secar el pellet. Finalmente, se resuspendieron en 200-300 μ l de TE (en un volumen total) y se guardaron a -20°C hasta su utilización. Las muestras se solubilizaron calentándolas durante 5 min a 95°C, y después se enfriaron en hielo. Para el análisis electroforético de la muestra se utilizaron 10-12 μ l de este sobrenadante. Como patrones de peso molecular se utilizó el marcador universal “SDS-PAGE Molecular Weight Standards, Broad Range” (Bio-Rad Laboratories, ref. 161-0317) y “DALTON MARK VII-L™” (66-14 kDa, SIGMA, ref. SDS-7). Éstos se diluyeron en tampón de muestra según las recomendaciones del fabricante y se solubilizaron de manera idéntica a las demás muestras.

El tampón de carga utilizado en la electroforesis de estas muestras se preparó 2 veces concentrado, conteniendo glicerol 20% (v/v), 2-mercaptoetanol 10% (v/v), SDS 6% (p/v), 5% (v/v) de azul de bromofenol 0,05% (p/v), Tris Upper (4x) 25% (v/v).

20.2. Aislamiento de proteínas de la membrana externa

Entre 5 y 10 ml de un cultivo de células en la fase de crecimiento deseada se recogieron por centrifugación a 10.000 x g durante 2 minutos y se resuspendieron en 100 µl de NaCl 0,9%. Las muestras se incubaron 15 minutos a 50°C y se centrifugaron de nuevo en las mismas condiciones. Finalmente, se recogió el sobrenadante y se guardaron a -20°C hasta su utilización. Al igual que las muestras anteriores se solubilizaron calentándolas durante 5 min a 95°C, y después se enfriaron en hielo. Para el análisis electroforético de la muestra se utilizaron 20-25 µl de este sobrenadante.

21. SEPARACIÓN DE PROTEÍNAS POR ELECTROFORESIS DESNATURALIZANTE EN GEL DE POLIACRILAMIDA.

21.1. Separación de proteínas por electroforesis desnaturante en gel de poliacrilamida en presencia de SDS (PAGE-SDS)

Para la separación electroforética de proteínas se utilizó el equipo de electroforesis vertical “Mini-PROTEAN II” (Bio-Rad Laboratories, ref. 165-2940) siguiendo las instrucciones indicadas por el fabricante. Las electroforesis se realizaron utilizando geles discontinuos de poliacrilamida de 0,75 mm de espesor, de acuerdo con el método descrito por Laemmli (1970). Cada gel constaba de un segmento superior concentrador (con 4% [p/v] de poliacrilamida) y un segmento inferior separador (con una concentración de poliacrilamida entre el 5 y el 10% [p/v] dependiendo del tamaño de proteínas a separar). Tanto los geles como el tampón de electroforesis llevaban 0,1% (p/v) de SDS.

21.2. Tinción de proteínas con azul de Coomassie

Las proteínas se visualizaron directamente en el gel mediante una tinción con una solución de azul de Coomassie (0,05% [p/v] en una mezcla de metanol:acético:agua en una proporción 50:10:40 [v/v/v]).

Tras la electroforesis, el gel se incubó durante 30 min en una solución de fijación que contenía metanol 50% (v/v), ácido acético 10% (v/v) y agua 40% (v/v). Después, se sumergió durante toda la noche en la solución de azul de Coomassie (preparada como se

indica arriba), tras lo cual se transfirió a una solución de decoloración que contenía metanol 5% (v/v), ácido acético 7% (v/v) y agua 88% (v/v), que se cambió frecuentemente por solución fresca, hasta que las bandas de proteínas se visualizaron con nitidez. Todas las incubaciones del gel en las soluciones se hicieron en agitación y a temperatura ambiente.

Para almacenar los geles de forma definitiva, se secó en una hoja de papel “Whatman 3MM” (Whatman Internacional Ltd., ref.3030917) humedecida y cubierto de papel celofán transparente y se llevó a una secadora de geles “Gel Dryer Model 543 Bio- Rad” sometiendo a calor (80°C) durante 30 minutos.

Alternativamente, las proteínas se visualizaron también mediante tinción de plata específica para proteínas (Switzer *et al.*, 1979). Debido a la sensibilidad de la tinción de plata, es fundamental utilizar durante todo el proceso, H₂O_d de alta calidad, material de vidrio muy limpio, y manejar todo con guantes enjuagados previamente con H₂O_d. También es importante asegurarse de que el gel esté completamente sumergido en todo momento en las soluciones de incubación. Todas las incubaciones se realizaron con agitación suave y a temperatura ambiente. Tras la electroforesis, el gel de acrilamida se sumergió en una solución de fijación que contenía etanol 40% (v/v) y ácido acético 10% (v/v) durante 30 minutos. Después, se sumergió en una solución de incubación (30% etanol, 6,3 g de NaAc x 5 H₂O, 2 g de Na₂S₂O₃ x 5 H₂O) durante 30 minutos. A continuación, el gel se lavó 3 veces en 200 ml de H₂O_d, durante 5 minutos cada vez, y después se sumergió durante 40 minutos en una solución de tinción (preparada como se indica más abajo), tras lo cual se lavó con H₂O_d, y se transfirió a un recipiente de cristal limpio antes de añadir la solución reveladora. Se incubó en la solución de revelado (2,6 % [p/v] de NaCO₃ y 0,02% [v/v] de formaldehído que se añade justo antes de usarse). El revelado se paró sumergiendo el gel en una solución de 1,4% (p/v) EDTA x 2 H₂O pH 8 durante 20 minutos. Finalmente el gel se lavó varias veces con H₂O_d y se almacenó como se indica anteriormente.

Para la preparación de la solución de tinción (ésta se preparó justo antes de usar y se protegió de la luz) se mezclaron 0,1% (p/v) AgNO₃ y formaldehído al 0,02% (v/v).

22. CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS.

La determinación de la concentración de proteínas en extractos libres de células se hizo por una modificación del método original de Lowry y colaboradores (1951). Los reactivos para la determinación de proteínas por este método fueron:

- Reactivo A: Na₂CO₃, 2%; NaOH, 0,1N
- Reactivo B: 0,4 ml CuSO₄, 1%; 0,4 ml Tartrato Na-K 2%
- Folin: 1 vol. Folin + 1 vol. H₂O

Con estos reactivos se preparó una solución que estaba formada por 25 ml reactivo A y 0,5 ml reactivo B (se prepara en el momento de su uso). Se hicieron diluciones 10⁻², 10⁻⁴ de la fracción soluble obtenida tras la lisis y purificación y se completaron las muestras hasta un volumen final de 200 µl con H₂O, posteriormente se añadieron 1 ml de la solución preparada y se incubaron 15 minutos a temperatura ambiente. A continuación se añadió 100 µl Folin y se incubaron 30 minutos a temperatura ambiente. Se determinó la absorbancia de la muestra a una DO₇₀₀ y la concentración de proteínas se estimó utilizando como patrón una solución de albúmina bovina.

23. TÉCNICAS DE MICROSCOPIA

23.1. Microscopía electrónica de transmisión

Células cultivadas en medio LB y MB2 hasta la fase de crecimiento deseada se visualizaron en el microscopio electrónico de transmisión con la técnica de tinción negativa y técnicas especiales para la obtención de cortes ultrafinos.

Para la tinción negativa, se siguió el siguiente método. Sobre una gota de cultivo bacteriano se colocó una rejilla de cobre cubierta con una película de formar durante 4 minutos, después se lavaron en una gota de H₂O_d durante 1 minuto. Posteriormente, se secaron y se contrastaron con acetato de uranilo al 1% (v/v) durante 30 segundos. Se secaron y las muestras se observaron en un microscopio electrónico de transmisión.

Para el estudio de la ultraestructura se emplearon cortes ultrafinos. Células cultivadas en medio LB y MB2 hasta la fase de crecimiento deseada se fijaron con una mez-

cla de formaldehído al 1% (v/v) y glutaraldehído al 2% (v/v) en tampón cacodilato 0,1 M pH 7,4 durante 2 horas a 4°C. Posteriormente, se lavaron con este mismo tampón y se fijaron con tetróxido de osmio al 2% (v/v) y ferrocianuro potásico al 1% (v/v) durante 1 hora. Las muestras se deshidrataron en gradientes de etanol 50, 70, 90 y 100% durante 15 minutos en cada paso, excepto en el de 100% que fueron tres pasos de 15 minutos. A continuación, se infiltraron durante una hora en etanol 100% más resina (proporción 1:1) y se dejaron en resina pura durante 12 horas. Después, se polimerizaron en una estufa a 60°C durante 12 horas y finalmente los bloques se cortaron en secciones ultrafinas de aproximadamente 500-700 Å, que se contrastaron con acetato de uranilo y citrato de plomo. Las muestras se observaron en un microscopio electrónico de transmisión Zeiss modelo EM902, a un voltaje de aceleración de 80 kV. Tanto el procesamiento como la observación de las muestras de ambas técnicas, se realizaron en el Servicio de Microscopía Electrónica del Centro de Instrumentación Científica de la Universidad de Granada.

23.2. Microscopía electrónica de barrido.

Las células se cultivaron en medio LB y MB2 hasta alcanzar la fase de crecimiento deseada. Después, una gota de cultivo bacteriano se colocó sobre un cubreobjetos impregnado con poli-L-lisina, y se expuso durante 24 horas a vapores de glutaraldehído al 25% (v/v) en una cámara húmeda a 4°C. Las muestras se lavaron con tampón cacodilato 0,1 M pH 7,4 y se fijaron con tetróxido de osmio al 1% durante 1 hora. Después se deshidrataron en gradientes de etanol 50, 70, 90, y 100% durante 15 minutos. Posteriormente, se desecaron por el método del punto crítico (Anderson, 1951) en un desecador marca Polaron. Finalmente, se montaron en un carbón conductor LEIT C sobre un portamuestras de aluminio, se metalizaron con oro en un aparato "SEM Coating Unit E5000" marca Polaron, y se observaron en un microscopio electrónico de barrido Zeiss modelo DSM950. Tanto el procesamiento como la observación de las muestras se realizaron en el Servicio de Microscopía Electrónica del Centro de Instrumentación Científica de la Universidad de Granada.

24. PROGRAMAS INFORMÁTICOS UTILIZADOS

Para el tratamiento y análisis de secuencias de nucleótidos y aminoácidos (determinación de las fases de lectura abierta, de los sitios de restricción, etc.) se emplearon los programas informáticos DNA Strider v. 1.3 (Marck, 1988) y SeqEd v. 1.0.3 (Applied Biosystems, Inc., 1992).

Para el diseño y análisis de oligonucleótidos (para secuenciación y PCR) se utilizaron los programas informáticos OLIGO v. 4.05 (W. Rychlik, National Biosciences, Inc., 1992) y Amplify v. 2.52 β (B. Engels, University of Wisconsin, 1996).

Para la estimación de la temperatura de hibridación de los oligonucleótidos se usó el programa “Tm determination” (Breslauer *et al.*, 1986) disponible en internet, que además de la composición de bases también tiene en cuenta su secuencia.

La comparación de nuevas secuencias (de nucleótidos y aminoácidos) con las distintas bases de datos, se realizó con la ayuda de los programas BLAST (Altschul *et al.*, 1990 y 1997) disponible en el servidor de internet del NCBI, y FASTA3 (Pearson y Lipman, 1988) disponible en el servidor de internet del EMBL-EBI. Para la predicción de péptidos señal y de su sitio de corte se usó el programa SignalP v.2.0 (Nielsen *et al.*, 1997) disponible en la página del CBS. El alineamiento de secuencias se realizó con el programa ClustalW (Thompson *et al.*, 1994) disponible en la página del PBIL. Con todos estos programas se usaron las opciones estándar. La predicción de estructuras secundarias en las proteínas se realizó utilizando el programa PHD (Rost *et al.*, 1993) disponible en la página del PBIL (Tabla M.8).

Tabla M.8. Direcciones de internet

Programa	Dirección
Determinación de Tm	http://alces.med.umn.edu/rawtm.html
BLAST	http://ncbi.nlm.nih.gov/BLAST
FASTA3	http://www.ebi.ac.uk/fasta33
SignalP v2.0	http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP-2.0/
ClustalW	http://ebi.ac.uk/clustalw
PHD	http://npsa.pbil.ibcp-fr

RESULTADOS

CAPÍTULO I

ANÁLISIS DE SECUENCIA Y ORGANIZACIÓN GÉNICA

RESUMEN

Los sistemas de secreción TPS (“two-partner secretion”) de bacterias gram negativas, han sido caracterizados en bacterias patógenas aunque no son exclusivos de estos microorganismos. En este capítulo, presentamos la evidencia del primer sistema de secreción TPS descrito en *P. putida* KT2440, donde están involucradas dos proteínas, una de ellas, HlpB, responsable de la secreción de HlpA a través de la membrana externa. La proteína predicha HlpA de 1508 aminoácidos mostró similitud con citolisinas independientes de Ca^{2+} , proteínas de adquisición de hierro y varias adhesinas. El análisis de la secuencia del genoma de KT2440 reveló también la presencia de una ORF, *hlpB*, en sentido 5' del gen *hlpA*, que presenta la misma dirección transcripcional. La proteína HlpB, de 560 aminoácidos, mostró similitud con activadores/transportadores de la membrana externa asociadas a las proteínas mencionadas anteriormente. Mediante análisis computacional del genoma de *P. putida* KT2440 se estudió también el entorno genético de *hlpB-hlpA*.

ANÁLISIS DE SECUENCIA Y ORGANIZACIÓN GÉNICA.

1. ENTORNO GENÉTICO DEL CLUSTER DE GENES *hlpBA* DE *P. putida* KT2440

Tal como se ha mencionado en la Introducción, en un trabajo anterior de nuestro laboratorio se habían aislado mutantes de *Pseudomonas putida* KT2440 que presentaban deficiencias en su capacidad de adhesión a semillas de maíz. Dichos mutantes se obtuvieron por mutagénesis al azar con el transposón mini-Tn5(Km) y selección en columnas rellenas de semillas (Espinosa-Urgel *et al.*, 2000). La búsqueda de los mutantes llamados “mus” (mutantes de unión a semillas) se basó en el método de columna descrito por DeFlaun *et al.* (1990) para identificar mutantes de *P. fluorescens* incapaces de adherirse a partículas del suelo. En esta Tesis Doctoral se ha estudiado en detalle el mutante mus-27 de *P. putida* KT2440, el cual se comprobó que tenía una capacidad reducida para colonizar semillas de maíz con respecto a la cepa parental.

Los sitios del cromosoma en los que se había insertado el transposón en cada uno de los mutantes “mus” se identificaron mediante secuenciación y comparación con la secuencia completa del genoma de *P. putida* KT2440 (publicado durante la realización de este trabajo). Los genes aquí detallados corresponden a los loci PP1449 (*hlpA*), PP1450 (*hlpB*), PP1448 (*orf3*), PP1447 (*orf4*), PP1451 (*orf2*) y PP1452 (*orf1*), según la nomenclatura empleada para designar los genes de *P. putida* (Figura C.I.1). El sitio de inserción del mini-transposón en mus-27 se localizó dentro un gen que se ha denominado *hlpA* (de hemolysin like protein) por presentar similitud con genes que codifican ciertas hemolisinas (véase Apartado 2). En 5' con respecto a *hlpA* se localizó una fase de lectura abierta que denominamos *hlpB*. Como se detalla más adelante, ambas secuencias presentan similitud con sistemas de transporte y secreción de proteínas al medio externo (Jacob-Dubuisson *et al.*, 2001; Brillard *et al.*, 2002), de la familia denominada “two-partner secretion” (TPS).

En sentido 5' de estos genes aparecen dos marcos abiertos de lectura, *orf1* y *orf2* (PP1452 y PP1451, respectivamente), que se transcriben en el mismo sentido que *hlpB-hlpA*. A su vez en 3' con respecto a *hlpA* aparecen dos marcos abiertos de lectura, *orf3* y

orf4 (PP1448 y PP1447, respectivamente), que se transcriben divergentemente con respecto a éste (Figura C.I.1).

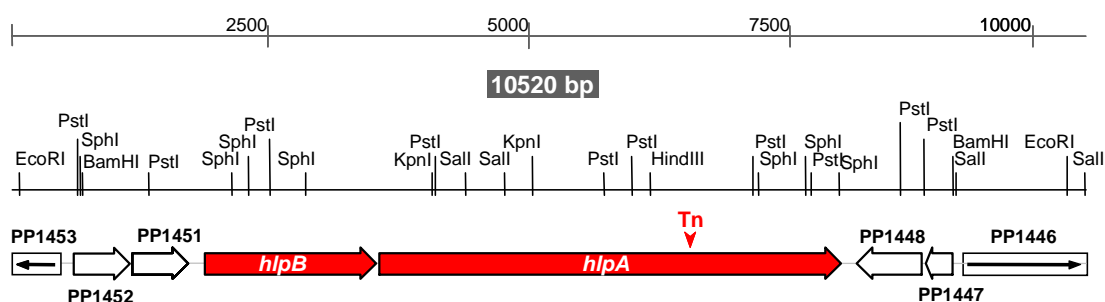


Figura C.I.1: Esquema de la región de 10.520 pb del cromosoma de *P. putida* KT2440 que contiene el conjunto de genes *hlpBA*. Las flechas indican las diferentes fases de lectura abierta y su sentido de transcripción. Las flechas rojas representan los genes *hlpB* y *hlpA*. Las flechas blancas indican las fases de lectura adyacentes a los genes *hlpBA*.

El análisis de la secuencia reveló que el sitio de inserción del transposón estaba localizado entre las posiciones 6.648 y 6.649 de la secuencia de la Figura C.I.2 (según la numeración utilizada en la figura). La región correspondiente al entorno genético del sitio interrumpido en el mutante mus-27 (Figura C.I.2) presentó un 63,5% de G+C, porcentaje muy similar al porcentaje medio de G+C del ADN de *P. putida* (61,2%). En ella se encontraron 7 fases de lectura abierta diferentes (*orf*, del inglés *open reading frame*) completas con posible carácter codificante, cuyo uso de codones se ajustaba al de *P. putida*. Las *orf* comenzaron con un codón ATG canónico y estaban precedidas por secuencias potenciales Shine-Dalgarno de unión a ribosoma (Shine y Dalgarno, 1974).

```

      10      20      30      40      50      60      70      80      90
.....+.....+.....+.....+.....+.....+.....+.....+.....+.....+
TGGGCACATACCAGCTACGCCCTGGTAATCGATACGGTGGGTATGATCGCGCGGGTCTGCCGGAAGAAATTCAGCGGCACGGTGAATA
CTGCCCGATCTCGGCATCATTGGCGCGATATTCGACGAAGTCCGGGATAAGCCCGACGAATGGCGTCACTTTCAGGCCATGTAGCGAAA
TCAGCGGGCTGAGCGGACCAATCACCTCCACCAGGCCAGGGGGCAGGCCGATTTCTTCTTTCAGCCTCGCGCAGGGCAGTAAAGACCAGGT
CCGGGTCTTCCGGGTGCGGGCGGCCACCGGGAAGGCTACTTCGCCACCCTGGGTAGACAGGCCCTTGGCGCGCAGGGTCAAAGACCAGTT
CGGGCGCTTCGCTGCGGTAATGGGCAAGAGGACCGCCGCTTCGGGAACCGCCTGTCGGTTTCCAATGACGCGGGTTGGTGGTTGCTCA
TTCCGGGAAGTAGCTCGTCCAGCATTGCGCACGCTCGTATCCAGGTCCTGTGTTGTCATGATGCACCAAGCCGGAAGCACCAGCCCGCC
AGCGCTTTCGCGCGCACGGTGGCCGAGCCAAGATAGCCTTGGACATAAGGAACACACATGAAATTCGACGCGCATGCGGCCAACCGGT
      M K F C S A C G Q P V

CAGTCAGCGGATCCCCGAGGGCAGACGCCGCTCGGTACTGTCTCGGCTCTTGCCAGACCATCCACTACCAGAACCCCAACATCGTGGC
S Q R I P E G D S R L R Y V C G S C Q T I H Y Q N P N I V A
CGCGTATTGCCGACCTGGGGCAGCCAGGTGTGCTGTGTCGCCGCGCCATTGAGCCGCGCGGGGTTTCTGGACCCTGCCCGCCGGTTT
G V L P T W G S Q V L L C R R A I E P R R G F W T L P A G F
CATGAAAAACCGGAACTGACACCAGGCCGCGCTCGCGAAACCGTCGAGGAAGCCTGCGCCCGGGTCCGGCCGACGTCCCTGTACCA
M E N G E T L D Q A A R R E T V E E A C A R V G P T S L Y Q
GCTGTTTCGATCTGCCGCACATCAGCCAGGTGCATGTGTTCTTCCGCGCGAGTTGGCGGACCTGGACTTTGCCGTCGGTGTGAAAGCCT
L F D L P H I S Q V H V F F R A E L A D L D F A V G V E S L
GGAGGTGCGGCTGTTGGAAGAACATGAGATACCGTGGGACGAGTGGCTTTCGCCACCCTCACTCGCACACTAGAATGCTACTATCGCGA
E V R L T R A F E E H E I P W D E L A F R T V T R T L E C Y Y R D
CCGCATCGGCCAGCACTCCCATAGGCCATGTAATACCTGCCCGCATGAACTGTCGGCCACACCTAAACGCTTTCAGGGATACTGTT
R I G Q H Y P I G H E Y L P P M N V S P H T <<<

ACATGCGCTGGTTGCTTGCCTTTTTCGCTTTTTCGCTTACCTCGGTGTCCAGGCGGCTTTCACCGAAACCATCATCCGCAAGCCCGCGC
M R W L L A L F C L C V T S V S Q A A F T E T I I R K P A

CGGCAGCGCAAATCCCTCGCCTTCGCGAAGCCATGCAACCCTGATCGACAAGGTGCTGGTGATCAAGTCGGAGCGCCCGCTGCAGT
P A A Q T P S P S Q Q A M Q P L I D K V L V I K S E R R L A Q
TGATCAGCCGCGGCGCTGAAAACCTACCGCATCTCGCTGGGCAAGCAGCCCAAGGGCGCAAGGAACGCGAAGGCGCAGAAAA
L I S R G E P L K T Y R I S L G K Q P K G A K E R E G D K K
CCCCGAGGGCTTGTACTGGCTGGACTGGCGCAAGCAGAGCGACCGCTTCAACCTGGCCATGCACATCAATTACCGAACATCAGCGATG
T P E G L Y W L D W R K Q S D R F N L A M H I N Y P N I S D
CCGCCCGCGCAACCGGGCAGGGTGAATGCCGCGAGCATGATCATGATTCACGGCACGCCGATCAACGATGAATACCGGAATGGTACT
A A R A T R A G V N A G S M I M I H G T P I N D E Y P E W Y
TCCATACCTGGACTGGACGGATGGTGCATTCGCATGCGCAACCGCGACATGCAGGAAGTGTGGACCTGGTTCCGGATGGAACGCTGA
F H T L D W T D G C I A M R N R D M Q E V W D L V R D G T L
TCGAGATCCGCCCTTGTATAGACCTTCCGGCAAAAGTTGTAGGAACCTTCTACCATTAGCGCAACTTGCTGACAGGTGCTTAGG
I E I R P <<<

CAGGGTACTGCATCCATACGAGTGGCTTAATTTCTAGCATCCACGCAGACGAGTACGAAAACCGTACATCATTGCGGGGTGCTTCAATG
      M R G A S M

CCGTGCTGATTACCCGCATCGCCCATGGCTGTGCGCGGGTTCCTTCTGGCTTGTCTGCCATTCCCAGGTGCTGGCCGACGACCTT
P C L I H R I A H W L S A G C L S G L L S I P Q V L A D D P
GCCAGCCAGCAGTTCGCGCATCAACAGCATGGGTGCGGCACTGGAGCAACAGCAGCGGTGGAACGCTGGCAGCGTATACCCGTCCCG
A S Q Q L R D Q Q H G L R Q L E Q Q Q R L E R W Q R I P V P
GCTGAACCGACCAACAGCACTTCCCACCGCCGACGATGATCGCTGCTGGGCACTGATGGCGTGGCGGTGGCGGGCATGCACCGCTT
A E P T N S T S H R P H D D R C W A V D G V R V A G M H R L
TCGAACTCGGCACTGGCGCCACCATCCGTGCCCTCACGCTGCTGCATGGGCATCGCGACATCAACCGGCTGCTCAAAGCCATCAC
S N S A L A P T I R A L T P A C M G I A D I N R L L K A I T
CAACGTTATGTACAAGCCGGCTACCCAAACAGCCGCCCTACCTGCGCCAGCCCCAGCAGAGGGCATGCCGTTGGACATCGTCAATTGTC
Q R Y V Q A G Y P T S R P Y L R Q P P A E G M P L D I V I V
GAAGCTTTGTGAAACCATCGAACTGGCTGGCCCGACCTACCCTGTCTCTCCAGTGCCTTCCAGCGCTGCTTGGGACGCCACTG
E G F V E T I E L A G P D L P L S L S A F P G L L G Q P L
TACCTGCCGACCTTGAGCAAGGCTGGACAGCTCAACCGCCTTCCGCGCTATGAACTGGGCGCACCTTGTGCGCGGCAACTGCAG
Y L P D L E Q G L D Q L N R L R A Y E L G A T L L P G E L Q
GGCGCACCCGCGTGGTTCGTCAGCCGGGCAAGGTGCTTTCAGCTGGCACCTGGACAGCCGCTTCGACAACCGGGGCGAGGTGACC
G G T R V V V Q P G K V A S R W H L D S R F D N R G S E L T
GGCCACCAGCGTCAACCTCGCATTTGGCTGGACAGCCGCTTGGCTCAATGATGAGCTGCGCTGTGCTTGGCCCGCAGCGTCTC
G R H R V N L G I G L D S P L G L N D E L R L S L A R T V L
GATACGCCCGGCAAAAGCAAGGATATCGTTTACTACAGCATCCCTACGGCGCTGGACCTTTCGCTCAGCGCCAGCCAGCTAAGC
D T P G Q S Q G I S L Y Y S I P Y G A W T F A L S A S Q L S
TATCAAGCCCCCTCCCTACAGCGCAAGGCTGCCGACGCGCAGCAGTATCAGGGCCTGAGTGTGCGAGCGGTATTGTGGCGCAAC
Y Q A P L P Y S D K A A D G S S S Y Q G L S V E R V L W R N
CAGCAAGGCATGCTCAGCGCAGCCCGCTTGGACCGCAAGCAGCTGATCAACCGCAGCGCTGGCGGGTTATCGTCCAGCAGGCCG
Q Q G M L S A S A R L D R K Q L I N R S A G A V I V Q Q S P
ACGCTGGCCAGGTAGAGCGGCATCAACCTGCTGTGGCTCGAAAGTGGCTGTGGAACGGTACTTCGGCGTTGCCAAAGCATTGAC
T L A T V E A G I N L L W L E S G L W N G Y F G V A Q G I D
GCATTTGGTGGCAGCGCTCGCCCTGGGTGCTCATCGCTGCGCCCGGACTTTCGCAAGTACCGCGCAACCTGCTGCACCTGCGTCAA
A L G A D R S P L G A H R L R P D F R K Y R A N L L H L R Q

```

450

900

1350

1800

2250

2700

3150

PP1452
orf 1

PP1451
orf 2

PP1450
hlpB

Capítulo I

GGCCCCGACCCAGCCCTTGGCGCTGGCAGAGCGAGCTGGCCATGCAGTACAGCCGTGACCCGCTGCCTGCGCTCGAACAGCTGCTGGTC
G P A P S P W R W Q S E L A M Q Y S R D P L P A V E Q L L V
AGCGACGATTCCGGTGTCCGCGGCTTTCGTGTGCACACTTACTCCGGTGCAGCAGCGCCGTCTGGCGCAATACGTTTCCAGCCAGGCGCTG
S D D S A V R G F R L H T Y S G A S S A V W R N T F S Q A L
CCACGGACCTGGGCCCCACCTTTCGAGATACGCCCTTACATCGGCCTGGACCTGGGCTGGGTTTCGACCCGCGAAGGCAAACCGTACAG
P R T W A P P F E I R P Y I G L D L G W V R T A E G K P S Q
CGCCTGGCCGGGGCCGCGCAGGGTTGGAAGTGGACCTGCCCGCAGCCGCTGCGCTGGACTACCAACGCGCCTTGTACACCAGCGAC
R L A G A A A G L E L S L P G S R L R L D Y Q R A L Y T S D
CTGCCCGCCCGGGCTGGAGCCCGGCTTCTGGGTGCTGGACTGGACCTGAGCATCTGATTTCACCCACAACAAGAGAGAGAGAAATG 3600
L P R P R L E P G F W V L D W T L S I <<< M
CAAACACTCTCGCAGTTACCCGCTGTTTCGCGGATACCTTGGCTGGGCAATCTTCTCGCCGTGCTGGGCCCAGCGCCGACTGCTG
Q T L S Q L P P V R P D T L R W A I F L A V L G P S A A L A
CAGACAGGACTGGAAGCAGCCAGCGGCCCGGGGGACCCCGGTATCCATAACGGCCACGGGGTCCCGGTATCGACATCGTCCGCGCC
Q T G L E A A S G P G G T P V I H N G H G V P V I D I V P P
AACGCCACGGGGTGTACACAACCGTTCATCGACTACAACGTTGCCACCCCGGGCCTGGTGTGAACAACGCCACCGCAGCCGGGGCAG
N A T Y N V A A T P G L V L N N A T A A G G
TCGCAACTGGCCGGCCCTGGCGGCCAACCAGGTTCCAGGGCAGGCGCTCGACCTTCTTAACGAAGTATCAGCCGCAAGCC
S Q L A G A L A A N P Q F Q G Q A A S T I L N E V I S R N A
TCGCTGATCGAGGGGCCGAGAAATCTTCGGGCGCCCGCGACTACATACTGGCCAACCCCAATGGCATCACCCCTCAATGGCGGCGAGT 4050
S L I E G P Q E I F G R P A D Y I L A N P N G I T L N G G S
TTCATCAACACCACCGCGCAGGCTTCTGGTGGGCAACCCGCAATTCGAGGAGCAACAGCTCAGGTACCTCGATACGCTCACGCCAGT
F I N T R A L A G F V V G T P Q F E E Q Q L R Y L D T L T A S
GGCACCTGCAGTACTGGAGTATGGCCAGGCAATGCCGTGGCAGCTCGAACTGATCGACCCGCGGTGGACAGCAAAGGCTTGGTC
G T L Q V L E Y G Q G N A G G A L E L I A P R V D S K G L L
ATGGCCAGGAAACGCTCGACATCAGTGTGGCCGCAACCGTATCGACAGCCGCGAGGTTGGTGAACACCTGCCAGCCCTCC
M A S E T L D I T V G R N R I D S R S G E V V E H L P S P S
ACGAGCATGATGCCAGCTGTTTCGGCGCCATGCGCGCCGGGCGTATCCGTGTGGTAAGTACTACCGAAGGCGGGGTGTGCGTGTGGG
T S I D A S L F G A M R A G R I R V V S T T E G A G V R V G
GCCTCGCAGATTTCGGCACCGAAGGGTTCGACATCAGCTCGGCCGGGGCCTGCATGTACAGGGCAGTGGCGACCCGCGGAGCTG 4500
A S Q I L G T E G V D I S S A G G L H V S G S G D R P T E L
CGCAGCGAGCGTGGCGTACTGAAACTCACCGCTGCCGATGACCTGATGCTTGAACGGTTGACGGCCAGGCCCCGGGATCGAAGCAAG
R S E R G V L K L T A A D D L M L E T V D G Q A P R I E A R
GCTGGCAAGAAGCTCACCTGGACGCCAAGACAATCGAGCACATCAAGCAGCAGTGCAGCTGGAACAAGAAGTTCTGGTTCGTCACC
A G K K L T L D A K T I E H I K H D S D S W N K K F W F V T
CGTGAACCTACAACCGCAAGCACCCACCACCCACAAGCAACAACAGGGCAGTCAATTGTGGGCACTGAGAGCGTGTGTCAGTCC
R E T Y N R K T T T T H K Q Q Q G S Q L L G T E S V L L Q S
GGCGAGCATGCGCATGACCCGCGGAAGTGGACGCCGTAACAGAGCTGACGGTGCAGAGCGGTCCGGCCTGGACATCTCGCCGGC
G D D M R M T A A K V D A G N E L T V D S G A G L D I L A G
ATCGACGCAAAACGACCGAACAGCAGGTGCGTATCGAAGGATTTATGGCGCGGTGACAGCGATAGCGACCAGCTCAAGGAAACCGCA 4950
I D S K R T E Q Q V R H R K D L W R G D S D S D Q L K E T A
AAGGGCAGTACCCTGAGCGCCGGGCACATGTGATAAAGGCAAGCGACAACCTCAACGTACAGGGCAGCAGCCTGCACAGCCGCGAGGAT
K G S T L S A G H M S I K A S D N L N V Q G S S L H S R S D
CTGGCTATCCAGCGCAACAGGCGGACATCGGCACCACCCTTGCAGGAACACGGTACCCAACGCGACTACCGAGGCGACTGTTGTTC
L A I Q A K Q A D I G T T T L Q E H G T Q R D Y R G D L V S
GGCACATCTTTGGTACCGCAAAGGTAACGACACTGAGGGCCAGGTGCTCGCGGCAGCAGGATAACCAGCGATGGCGAGCTCACTGTG
G T F F G D R K G N D T E G Q V V A G S T I T S D G E L T V
AGTGCCGACAGGTCACCATCAAAGGCGACCCGTTTCGGTAAACAGGACGCGGTGCTTACAGCGAGAACGGTTCGCTGGCCATCGAG
S A D Q V T I K G S T V F G K Q D A V L Y S E N G S L A I E
GCAGACCATGGCAGCAGCCTCCACCAGCGCACAGCAGTAAACTGTTTCGGCCTGATCGCGCAGCAAGCAGCAAGCAGGACCGC 5400
A D H G S T T S T Q R T S D S K L F G L I G S K H E S T D R
AAACAGCAGTACTGGTACGCGACTGACCTCGACCAACTGCGCCTGGCCAGCGCGAAGAGATCGGTATTCAGGGCCCAAGGTC
K Q Q V L V S D V S S T S N K D R L A S A E E M R I Q G K A K V
GAAGCTGGCAAGCATCTGCAAGTCGAGGCGCAAAGGCGACCTGTTGATTGGCAGTGCAGCAATCGGTCGATGAACGCGAAACCCGCGACCA
E A G K H L Q V E A K G D L L I G S A Q S V D E R E T R D Q
CAACGGGGTTTCACGGCCAACCGCAGACAGACCCAGGAAGCCGAGGATGGCAAGCCCGAGTCTCGCCAGTACCGGGCTGGCGTGGCGTAT
Q R G F T A N A R Q T Q E A E D G K P E S R Q Y A A G G A Y
GAGTCTGTGACAGCAGCAAGCAGCGCACAGCAACAGGTTGCCAGTGAAGTCAAGGGCGCCTCGGTGGGATGAACGAGCAGCGG
E V V T S T S K Q R T T N Q V A S E L K G A S V G M N S S A
CACCTGCAGTCAACCGCAGCAAGTCCAGGCCACTGCCGGGATCTCGATGTGACGGCGGGGAAGTGCAGTGGGGGCGACCCGCAAC 5850
H L Q V N G S K V Q A T A G D L D V Q A R E V T L G A T R N
GACCGTACGATGACCCAGCACCAGAAAGTGGTGGCGGGTTGACAGTAAACCGGTGGCATCGACCCGCTGGGCGAGTGTTCGAAGG
D R D V T A S T T E S G G L T V T G G I D R L G S L F E G G
CATCACACCGGAGGTGCAAGCCGATCGCGACAGCAAGGTGCAGCGCAGGTTGCAGGCCAGCGGATCTGAAATTGCGCAGTGT
H H N R E V Q A D R D S K V Q R S E L Q A S G D L K L R S D

PP1449
hlpA

GCACTGCTCACCGAGGCCGCGCAGCTCGAGGCCGCAACACCCTGCAGGTGACCGCAAACGCATCGACAACCGTGCAGCTCAGGATACC
 A L L T E A A H V E A G N T L Q V T A K R I D N R A A Q D T
 CATGAACATGAACAAAGCCGTGACGACTGGTCCGGTAGCCTGGGCGCCAGTATCGAATACCGCGACCTGACCCGCCCTATCGAACGCCTG
 H E H E Q S R D D W S G S L G A S I E Y R D L T R P I E R L
 GTGCTGGGTGAGGAAGCCCCGCGCTTCAGCAAGCTTCGCCGAAGACGCCATGGCACCTCCAGCGTGGGGCCGACATGACGGTCGAA 6300
 V L G E E A P R F Q Q A S P E D A M A P P S V G A D M T V E
 CACCTCAAGCGCTGAAAAACCGCCGCTGGAATTGCTCAGGTGACGAGTTGTCGCGAGCAAAGTTCGAGGTCAAGGCTGACACACTG
 H L K R L E N Q R R G I A Q V S E L S A A K V E V K A D T L
 GCCGACCAGGGCACAGCTGGCGGGCAATGCCGGCTCGCTGAAAATCGAGGCGCAGCAGCATCAGGTGAGCGCCGCCAAAATACCCAG
 A D Q G T A W R A N A G S L K I E A Q Q H Q V S A A E N T Q
 GAAACACCCTTCAACGCTGGCCTATGGTGGCGATGCGCGCTGGACACCAGCACCGCGGAAGACCTGAATGTACGCGCCGCGGCAAA
 E T T V Q R L A Y G G D A R L D T S T G E D L N V R A A G K
 GGGGGTTCGCTGGATAAAAAAGGATACCGCCAGCACCGCTGCCCGCAGCCTTACGGGCAACAGGTATCCAGGTACAGCTGGGCAGC
 G G S L D K K D T A S T A V P G S L Y G Q Q G I Q V Q L G S
 GATGGCCGCTACGAAGGGGCCGATCGATGGCGGCAAGGCAGCGTGGTTCATGCACAGTGCAGGCTCGCTCGCCCTACCCAGGCGACC 6750
 D G R Y E A R I D G G E G S V V M H S A G S L A L P Q A T
 GACAAGCCGAACAGCAGTACGCCAGCTCGATGGCAATGGCTGGGCAAAAGTTCGGCAACCGCCCGGCGCAGCACCGGTGTGATGAGCCGG
 D K A E Q Q S R Q L D G N A W A K V G N R P G S T G V D G R
 GGGTATCTGGACCATGGCCAAAAGTTCGAGCAGCAGGGCAAGGCACAAGTGGCACAATCGACGCCAAGGGCGAGGTAAAGTTCAGCCAGC
 G Y L D H G Q K L S T Q G K A Q V A Q I D A K G E V K L T S
 ACAGGCGACCTGTGCTCGAAGGCACCGCATTTGGTAGCCGCGAGGCCAAGGCCGCGGACATACAGGTGCAAAAGTGGCGGCCAGTTGCAG
 T G D L L L E G C T R I G S R E A K A G D I Q V Q S G G Q L Q
 GTCAGCCGCGCCAGCAACCCAGCAGGCCACCGCAGCAACCTGGGTGGCGCATGGAGTGGCGGCCAAGGCTGGCCAGCAGCGGG
 V K A A S N T Q Q A T G S N L G G G M E L A A K A G Q T Q G
 GGAGCCATAGGCGGCCACTTCAGCCACGGCAAGCAGGACGAACATGCACGCTCAGGCGGTTCGATGCCAGTTTGGCAGCAACGGCACACTG 7200
 G A I G G H F S H G K Q D E H A R Q A V D A Q F A S N G T L
 ACCCTGACCAGCAGCGCCCGGAGGACATCGCCCTGCACCTGCAAGGCTTCGAGGCTCGGCCGAACAGATCACCCCTCGACGCCCTCGAAT
 T L T S S A R E D I A L H L Q A S A E Q I T L D A S N
 GCGGCATGTGGTTGAAGCCTCTCCAGCCAGGAGCGACGCGACAACCTCGACATCTCGGCCGCGCGGGTTTCAACATGGCCAAAGGGC
 G G M L V E A S S S Q E R R D N L D I S A G A G F N M A K G
 GCCTTGACACCCCGCGCTGCATGGCCGCTCAAGTAGAGCTCGACAAGCGGATAACCTCACCTGGAATACCAGTACCTGCGCGCC
 A L D T R G L H G R L K V E L D K R D N L T W N T S D L R A
 GAGCGCATCGACCTGCAAAAGCCGCGGATACCCGCATCGAGAGTGCACCCCTGGATGCAGGGCATATGGCGGCACAATCGAGGTTGAC
 E R I D L Q S R G D T R I E S A T L D A G H I G G T I G G D
 CTGCGCATCGCCAGCCTCAAGGACAACGCTCAACACCCTGAGCGTGAAAGCGATGTGAGGCTGAGCCAGGAGAAAAACCCGAGGGCTAT 7650
 L R I A S L K D N V N T L S V K G D V R L S Q E K N P Q G Y
 GTCATCGGCCAAATCGTGGCAGGCCGCTGGGAGGCAAGTTCGAGAAAAGGCCGTTTCGCCCTGAGCAAGGCAGACCCAGGGTTC
 V N A A K S V A G P L G G K V E K K A G S A L S K A D P G F
 TCGCCGACCTGACGCTCGACGTGTCGATGCACAGCGTGACAATGTGGCGCTCAGACCAGCTTAAAAGCAGCGACGGCATCGACCTG
 S P T V S L D V S H A Q R D N V A R Q T T L K S S D G I D L
 CAGGTGCGTGGCAACGCTCATCTGTTGGGGCAGCCTTACAGTGGCCAAAGGCGACGTGAGGCTCGACGCCAACTCGTTCACCCAGGAA
 Q V G G N A H L V G A R L Q S A K G D V R L D A N S V T Q E
 ACGCTAAGCGGCAATGACTATCGCCGAGACCTGCTGTTGGATGGTCCAACCTCACCGTGGATCTGGGCAGGCAATCGCCGAGATAGCC
 T L S G N D Y R R D L S L D A S N S P V D L G T A I A E I A
 AAAAGCAAATGGCGCGGATGGGAAAATGGCTGGACCTGGCGCTTGGAGAACCAGTGGGCATAGTCGAGCGAGCAATGGGTTTCG 8100
 K S K M A A D G E N A L D L G V L R T S G H S R S E Q W V S
 AGCATGCAAGGGAAGAGCATAAGACGCCATCGCGCCCTGGCCATTGGGGATATCAGCAATCTTGTGCCCTGCTGCTGACACCCGGG
 S M Q G K K H <<<

PP1449
hlpA

PP1448
orf 3



Figura C.I.2. Secuencia correspondiente a los genes *hlpB* y *hlpA* de *P. putida* KT2440 y su traducción en aminoácidos. En verde se indican las regiones intergénicas. En rojo se indican los codones de iniciación y de parada de la traducción. En azul se indica el resto de la secuencia codificante para cada gen. La posición de los genes (según la numeración utilizada en la figura) fueron las siguientes: *orf 1*, 599-1150; *orf 2*, 1173-1727; *hlpB*, 1873-3570; *hlpA*, 3598-8124; *orf 3*, 8285-8920; *orf 4*, 8922-9170; *orf 5*, 9307 (truncada). Esta secuencia está delimitada por un sitio *EcoRI* en el extremo 5' y por un sitio *SalI* en el extremo 3', indicados en negrita. Los nucleótidos subrayados indican posibles sitios de unión al ribosoma. El triángulo de color negro (ver página anterior) indica el punto donde se insertó el transposón. En la secuencia de aminoácidos de HlpB y HlpA está señalada en rojo la zona de corte del péptido señal predicha por el programa SignalP V3.0.

2. COMPARACIÓN DE HlpA y HlpB CON LAS SECUENCIAS DISPONIBLES EN LAS BASES DE DATOS

Las secuencias de aminoácidos correspondientes a HlpA y HlpB se compararon con las secuencias disponibles en la base de datos de proteínas Swiss-Prot y TREMBL, utilizándose el programa BLASTP (Altschul *et al.*, 1990) (Altschul *et al.*, 1997) para la búsqueda de similitudes en las bases de datos de proteínas.

Las comparaciones de las proteínas deducidas de la secuencia nucleotídica con las bases de datos pueden dar una indicación de la función y localización de cada proteína. Por ejemplo, se puede estudiar si las proteínas poseen péptidos señal o dominios transmembrana, lo cual es importante para entender la localización de una proteína.

2.1. Comparación de HlpA con las secuencias de distintas bases de datos.

El alineamiento múltiple de secuencias presumiblemente homólogas entre sí permite definir dominios funcionales en las mismas (Coulson *et al.*, 1987; Gonnet *et al.*, 1992). Así mismo, estos alineamientos son también el punto de partida de métodos para predecir la estructura secundaria y como pasos intermedios en la construcción de árboles filogenéticos. Cuando se comparó HlpA con las secuencias de las distintas bases de datos, se encontró que mostraba una similitud con exoproteínas que son secretadas por un transportador (hemolisinas/citolisinas no dependientes de calcio) de seis bacterias gram negativas a saber, *Proteus mirabilis*, *Edwardsiella tarda*, *Serratia marcescens*, *Photobacterium luminescens*, *Yersinia pestis* y *Pseudomonas fluorescens*. También mostraron similitud con adhesinas de cuatro bacterias gram negativas, *Haemophilus ducreyi*, *Erwinia chrysanthemi*, *Bordetella pertussis* y *Haemophilus influenzae*. Todas estas proteínas pertenecen a la familia TPS, concretamente al elemento secretado, que genéricamente se denomina TpsA. Algunas de estas adhesinas TpsA son sintetizadas como preproteínas, (FHA de *B. pertussis* y HMW1 de *H. influenzae*) donde todas derivan de largos precursores que sufren un proceso de maduración proteolítico en el curso de la secreción. En la Tabla C.I.1 se recoge el tamaño de estas proteínas, su número de identificación en la fuente de origen y el porcentaje de identidad (a nivel de secuencia de aminoácidos) que presentaron con HlpA de *P. putida*.

TABLA C.I.1. Proteínas con las que HlpA de *P. putida* presenta alta identidad

Nombre de la proteína y microorganismo de origen	aa ^a	% identidad ^b	Nº acceso en GenBank o en Swiss-Prot/Referencia
HpmA, <i>Proteus mirabilis</i>	1577	27 (45)	M30186/ Uphoff, <i>et al.</i> , (1990)
EthA, <i>Edwardsiella tarda</i>	1594	27 (46)	D89876/ Hirono, <i>et al.</i> , (1997)
ShlA, <i>Serratia marcescens</i>	1608	30 (49)	M22618/ Poole, <i>et al.</i> , (1988)
PhlA, <i>Photobacterium luminescens</i>	1480	26 (47)	AL662784/ Brillard, <i>et al.</i> , (2002)
HylA, <i>Yersinia pestis</i>	1654	27 (47)	AE013603/ Deng, <i>et al.</i> , (2002)
Pflu, <i>Pseudomonas fluorescens</i>	1489	37 (55)	NCBI Microbial Genomes Annotation Project (2002)
HhdA, <i>Haemophilus ducreyi</i>	1175	23(42)	7467546/ Palmer, <i>et al.</i> , (1995)
HecA, <i>Erwinia chrysanthemi</i>	3848	24(36)	AF501263/ Rojas, <i>et al.</i> , (2002)
FHA, <i>Bordetella pertussis</i>	3590	22(36)	462082/ Jacob-Dubuisson <i>et al.</i> , (1996)
HMW1, <i>Haemophilus influenzae</i>	1536	19(35)	1170438/ Barenkamp, <i>et al.</i> , (1994)

^a Número de aminoácidos de la proteína.

^b Se indica el porcentaje de residuos idénticos encontrados en el fragmento de solapamiento.

Entre paréntesis se indica los residuos conservados

Estas exoproteínas secretadas por la ruta TPS son sintetizadas como preproteínas o preproproteínas. Todas son largas cadenas proteicas, con masas de aproximadamente 100 kDa y hasta 400-500 kDa. Las hemolisinas/citolisinas independientes de Ca²⁺ representan una subclase de proteínas altamente relacionadas en secuencia y función, mientras que varias adhesinas tienen secuencias más divergentes, excepto para los dominios TPS. Sin embargo, la característica común es sin duda, el gran tamaño de estas proteínas, conteniendo algunas alrededor de 3000 residuos de aminoácidos.

Muchas proteínas TpsA contienen tramos de motivos de secuencia repetidos que no son necesariamente homólogos entre otras proteínas de la misma familia. En la Figura C.I.3 se muestra el alineamiento múltiple de HlpA (proteína de 1508 aminoácidos) con algunas de las proteínas listadas en la Tabla C.I.1. Se observaron dos regiones donde el grado de conservación fue muy alto. En la región amino terminal se encontró el mayor grado de similitud con los otros miembros de esta familia (zona recuadrada en la Figura C.I.4). Todas las proteínas o posibles proteínas TpsA contienen una característica distintiva de la ruta de secreción TPS, como es el dominio conservado “TPS” o domi-

nio de secreción. Este dominio es considerado por contener señales de secreción que interaccionan con una región receptora de la proteína TpsB, aunque esta interacción no ha sido directamente demostrada (Jacob-Dubuisson *et al.*, 2004), siendo por tanto fundamental para la translocación de estas proteínas a través de la membrana externa. Así, dentro del segmento que abarca los primeros 210 aminoácidos se encontró que el de éstos era un 49% de identidad con el extremo N-terminal de ShlA. Este alineamiento reveló tres grupos de al menos tres aminoácidos que estaban conservados entre todas estas proteínas: LAG (posición 94 a 96), ILNEV (posición 112 a 116) y NPNGI (posición 141 a 145). Estos dos últimos motivos son característicos de proteínas de la familia TPS, siendo los residuos de asparagina en la primera posición de los motivos esenciales para la secreción y activación de ShlA (Schönherr *et al.*, 1993). Varias proteínas (ShlA, PhlA, HylA y Pflu) tienen un motivo de CysXXCys en su dominio de secreción, ausente en HlpA y Pflu (Jacob-Dubuisson *et al.*, 2001). Aunque se ha visto que estas cisteínas no son esenciales para la secreción (Schönherr *et al.*, 1993). La otra zona de buena similitud corresponde al segmento central entre las posiciones 535 y 1109 de HlpA que presentó un alto porcentaje de aminoácidos conservados. Por último un pequeño segmento de unos 50 residuos entre las posiciones 1414 y 1454 de HlpA también presentó un alto grado de similitud. El resto de la secuencia es menos similar a esta familia de hemolisinas y adhesinas, como refleja el alineamiento y como se puede observar del árbol filogenético (Figura C.I.4), obtenido del alineamiento múltiple.

Por último, se llevó a cabo un estudio de la predicción de estructura secundaria utilizando programas informáticos que permiten la predicción de la misma en base a diferentes algoritmos. En esta misma Figura C.I.4 podemos observar mediante sombreados amarillos (estructura α -hélice) y grises (estructura β -hebra) la predicción de la estructura secundaria de ambas proteínas propuesta por el programa PHD (Rost *et al.*, 1993) disponible en la siguiente dirección <http://npsa.pbil.ibcp-fr>.

Capítulo I

HlpA 1 ---MQTLSQLPPVPRPDTLRWAIFLAVLGPAAALQTGLEAASGPGGTPVIHN-----GHGVPVIDIVPPNATGLSHNQF
Pflu4788 1 -----MPMNTFAHFSPRGKLRWALASLFLVAHLPAGAMAGVVPVAPGPGGTAQLQTQGGVPIVNIIVAPNGSGLSHNQF
ShlA 1 -----MKNNNFRLSAAGKLAALAIILAASAGAYAAETVAAANGANGPGVSTA--ATGAQVVVDIVAPNGNGLSHNQY
HpmA 1 -----MKSKNFKLSPSGRLLAASLAIFVSLNAYNGIVPDAHQGPVDSAV---NGGTQVINIVTPNNEGISHNQY
HylA 1 MRTPCYSYQIEISPQNGDVKMKKHTFKLSPAGKLAATAIISVSVATCYAAGIVGAGDSAHKPDVSS--VNGTIVINIVQPSASGLSHNQF
EthA 1 -----MAYQHFKLSSAGRLAIIAISFVACSSFAGNIVPDGGALGPGVATA---PSGAQVVNIVTPDRGLSHNQY
PhlA 1 -----MKNKFRRLSPTKLAAASMAIILVSCSTSPASEITVGGGDAHPHDIFAA--EGKATVVNIVTPSSSGLSHNQY
consensus 1 mk fhls p g Laa aii v a g g vvnIV Pn GLSHNQY

HlpA 72 IDYNVATPGLVFNATAAGCQSQLAGALAAANPQFQQAASITLNEVISRNASLIEGPQEIFGRPADYILANPNGITLNGGSFINTTRAGFV
Pflu4788 74 LDYNVDRQGLVFNALQAGCQSQLAGQLAANPQLOQAASVILNEVISRNPSAINGAQEIFGRAADYVLANPNGISVNGGSFINTPNANLL
ShlA 70 QDFNVNPGAVLNNSREAGLSQLAGQLGANPNLNGREASVILNEVIGRNPSSLHGQQEIFGMAADYVLANPNGISCCGCFINTSRSLV
HpmA 69 QDFNVGKPGAVFNNALEAGCQSQLAGHLNANLNNGQAASLILNEVVS RNPSFLLGQQEIVFGIAAEYVLSNPNGITCDGCGCFINTSRSLV
HylA 69 QDFNVGKPGAVLNNSREAGLSQLAGQLAANPNLNGQAASILNEVISRNPSLLLGQQEIFGMTADYVLANPNGITCNGCGFMNTNRESLV
EthA 69 QDFNVNPGAVFNNACTGGCQSQLAGALAAANPNLHGQASVILNEVISRNPSLLLGQQEIVFGMAADYVLANPNGITCDGCGCFINTSRSLV
PhlA 71 LDYNVGMQGVVFNNGLEEGCQSQLAGQLAANPNLNGQAANLILNEVISRNPSLLLGQQEIVFGIAADYVLANPNGITCNGCGCFINTNRSLV
consensus 91 qDfNV pGaVlNna aGqScLAGqLaANpnlgQqaAs ILNEvisRNpSlllGqQEiFG aAdYvLaNPNGItcngcgFiNt r slv

HlpA 162 VGTPOFEEQQLRYLDTLTASGTLQVLEYGQGNAGGALFLIAPRVDSKGLLMASE-----TLDITVGRNRIDRSRGEVVEHLSP
Pflu4788 164 VGRPELNDGKQLALSTRDATGQLQIQGGGRNLRNGEGSINLIAPRIDSQGAISARD-----QLNLTVGRNQIDYASGVKAVDPAG
ShlA 160 VGNPLVENGVLQGYSTFGNRTLSLNGTLNAGGV--LDLIAPKIDSRGEIVQDFKQSNQKVTSAAINASGLNVRARDGTVQASQQMPT
HpmA 159 VGNPLFENGQLKGYSTLNNLTLNLGKLNLTGGL--LDLIAPRIDSRGKITAA-----EISAFITQNTFSQHFLLSSQFPVS
HylA 179 VGNPLIEQGS LKGFETFNNNWLI IQDKGLTANKI--LDLIAPRIEVTGMVTS-----AINALSGNNQISTDGGQILESRQEDH
EthA 159 VGNPLVEGGLSAYSTLNNDNR LQIGTGGLSTNSV--LDLVAPRIE SVGAVSAR-----EINAVSGNNRLTRDLRQIDAGVNT
PhlA 161 VGNPLIEQGNLQGFSTFNQQNSLKI KSDGLIANA L--LDLIAPKIDNRGSVTAQK-----EINAVSGENKISATGEVIDSQALT
consensus 181 VGnPl eng L g sT nn n L i gl ldLiAPrids G v a ina sG Nri s t

HlpA 241 STSIDASL-----FGAMRAGRIRVSTTEGAGV RVGASQILGTFE GVDISSAGGLHVS GSGDRPTELRSERGVKLLT
Pflu4788 243 NTTLDRIDASL-----FGAMQAGRINIVSTAEGAGVKGAVQVA GRDGVQIGSAGDLSVSQQAIPDSDLVTRAGIRSSQ
ShlA 248 ALDSY-----LGSMQAGRINILINTAQGSGV KLAGSLNAGDELKVKAYDIRSESRVDDASSNKNGGDNYQNYRG
HpmA 236 ALDSYF-----FGSMQSGRIRIINTAEGSGVKLAGKFTADNDLSVKADNIQTSQVRYDSYDKDGSENYQNYRG
HylA 257 PNRPTSLGGWFSSLFSSESEESIDGKYLGSMQSGRINLVSTREGSGVKIAGSLNGSEINATIKKGLQLEAAKLGNDININANSIQAFG
EthA 236 ALDSY-----LGSMQAGRIRIINTAAGSGVKLAGTLHADQDISVAADKDRLTLSAELRGGDISLQAGALRAEG
PhlA 239 GVLD SY-----LGSMQAGRIRLLNTAKGSGVNLQGTLTASDEIIVDSHGNLNLLEAAHLRGGNIDL LGNDIEVKG
consensus 271 lGsMqaGRIri nTaeGSvKlag l a e v n g

HlpA 312 AADDLMLETVDGQAPRLEA-----RAGKKTLD AKTIEHIKHDSDSW NKKFWFVTR ETYNRKTTTTHKQOQGSQLLG
Pflu4788 317 QDVGL-----HS GKDLTLAATDVSGRDVKVEAKRNLTLTTEVSRKLQEQRENWNNTIGITWE
ShlA 317 GIYVNDRSSSQT LRTE-----LKGNISLVADNH AHLTDTIRGEDITLQGGKLLTLDGQQLKQTQGH TDDRWFY
HpmA 305 GITVNNSSGSSQT LRKTE-----LKGNITLVASSHQIKASDLMGDDITLQGGALTDGKQLQKQKETDIDNRWFY
HylA 317 NLHKNE DNGVVTQSLERTQ-----LKGNIAIVANKKNQLSAVK IDADNVTLRGGLVLDERILTKTEQESSSDGGN
EthA 305 TLSQRDQREKGDNYQNYRGGINVSDSRREQSYRRTVL SGKNLTLVAAQSTHLTATD ISGDDVTLAGGVLTDGASLTQEQKQTDNRWFY
PhlA 309 KVSSESSYRSDGNNYQSYFSGSYTND SKSSQSLARTKLEGNISLVANSNNRVTATD IVDGDDVNLGSANLTLTLDGQQLKQSTKNINNQQGY
consensus 361 1 GKnitlvA a di gdd tl g eltdg ql q y

HlpA 384 TESVLLQSGDDMRMTAAKVDAGNELTVDSGAGLDLAGIDSKRTEQQVRHRKDL-----WRGSDSDQLKETA--
Pflu4788 375 TYERTKTDSDSRQHGSQIVASRDAQLSGKDPTELKAAKVEAKHNL SVQSGGDLRLTAATESHTQTDQGKHKRHLWKADWDSSSEQRSS--
ShlA 387 S-----WQYDVTREBQLQQAG
HpmA 375 S-----WKYDVTKKEQIQQIG
HylA 419 GVLGLGK-----WNWSENKEEKQQTSLG
EthA 395 S-----WQHDETRSDSQRAVA
PhlA 399 S-----WRHEVTQSEKHLQAG
consensus 451 s W d t e eq g

HlpA 452 -----KGSTLSAGHMSIK
Pflu4788 463 -----ITSELKAGNIALQ
ShlA 404 STVAASGAKLISTQEDVKLLGANVSADRALSVAARDVHLAGLVEKDKSSSE RGYQRN-----HTSSRLTRGRWSNS
HpmA 392 SQIDAKNATLTATKGLVTLDAAKINAGNNLAINANKDIHINGLVAEKESRSSENGNKRN-----HTSRLSEGSWSNS
HylA 442 TITAKNNASLESTQDDIKLSAATITAGKNLAIKAKKDLHDGAEENS IH DYGHNYKHMVKDES WNNKTKTKQL--NKTTLEAGKNLGL
EthA 412 GRIDARHNASLSATHGDLRLQGSSEVSA GHDRLRKA KGDVALSGIQERDEHQLTGYKRN EGAALNSGRWSQRSSEERLHQTRIRAGHDLSL
PhlA 416 NNIQAKGNASLNATEGDVKILGSKIDAKGELAVTAKKGVQIAGL TETEKSAETGYKKN-----HTAKLQTSWEES
consensus 541 i a n a l t d l a l a d g e e g n hts L a G

HlpA 465 ASDNLNVQGSLLHSRSDLAIQAKQADIGTTTTLQEHGTQRDVRGDLVSGTFFGDRKGNDETEGQVVAG-----STIT
Pflu4788 476 TAALLRSEGAELNSAGDLQLAGKQVEITTRTNRSSDNRYSYDGLVGGFFGKTGDADKGTQHOG-----SKIN
ShlA 475 DESESLKASELRSEGELTLKAGRNVTQGAKVHQRDLTIDADNIQVGVQKTANAKAVRDDKTSWGGIGGGDNKNNSNRREI SHA SELT
HpmA 463 HQETTLKASELTAGKDLGLDAQGSITAQGAKLHANENVLVNAKDNINLNVQKTNNDKTVTDNHNVMWGGIGGGQKNNNNQVVSHTAQTIT
HylA 530 TAENKITTOGIKASAGGDDVIDANDVKIGVQKTSNQETTTDQKHBERNLGLGGVDHNNNDKYAETS HS-----SEIT
EthA 502 EAGGDL SAQAQIRADNDAGIAAAGKVNLTQVNANRKTEDIDNHTYVGGIGGGGERDNNHSQERSQA-----SEVE
PhlA 407 KQTERLASELQAGTNLNIKAGTRAELLGAKVHAGQNLTLBAGKQLQIDVQKTADSRVRDDKKYWGGIGGGENKDNSLTKETNHASELT
consensus 631 l a a ga t g qKTADSRVRDDKKYWGGIGGGENKDNSLTKETNHASELT

HlpA 535 SDGELTVSA-DQVTIKGSTVFGKQDAVLVYENGLAIEADHGSTTSTQRTSDSKLFGILIGSKHESTDRKQVVLVSDVSSSTNLRASAE
Pflu4788 546 AAGKLLVKA-DDVRISSGQVRGAKDAVSDNGSLTIDGVQDTSHSNNHDKDSKFFGITKDESQRNSKDSSTVVRSELSADSNNLKLKSAKD
ShlA 565 SGGTLRLNGQQGVITITGSKARQQKGGVETATHGGLRIDNALSTTVDKIDARTGTAFNITSSSHKADNSYQSSSTASELKSDDNTLTVSHKD
HpmA 553 ADGQLLAAANNVNTIGSQVKGNGQAFVKTQGGVVIDNALSETISKIDEERTGTAFNITKSSHKNETNKQSTSGSELISSDQLTVVSGND
HylA 600 ADGNILSVKDDVAITGSKVKATKDGPFQAKEGGIKIDNALSTTNNKVDERTGVAFDITGSSKKANNSEKSTGSEVVSSEANLKLISKKD
EthA 573 SGGQLTISAGQDVTISGSRAGGRRGGVQSQQRGDVIDRVVNTTHEQDNERRGGAFNITTAASEKRTESHQDQVRGSQLASDVNLRVESARD
PhlA 577 ANGRLLLSGNEGIAITGSKVKAVQGAFVNANSSELITIDNAVSHLNRKVDETRGTVLNITSGSKRNSQQQKSHGSELVSEADLKLGDGDD
consensus 721 a G ll sa v ItGskv g kga v G l Idna stt k dertg afnit ss k q s gsel Sd nL l sa d

HlpA 624 MRIQAGKVEAGKHLQVEAKGDLITGSAQSVDERETRDQQRGFTANARQTOEAEDGKPESSROYACVAVYEVVITSTSKQRTTNQVASELKGA
Pflu4788 635 IEVAGSTVKAGGSLTADAAGDVEVHSTQNTDSSNSTQTRGFDAYAKEQT-----AEQYRAGVHYQDKAQTVTANDVTQGGSSLSGG
ShlA 655 ADVIGSQVAGGELSVEKSGTGNINVKAAERQONIDEQKTALTVMNGYAKEAG-----DKQYRAGRLIEHTRDESKTTRTENASSSLSGG
HpmA 643 VNVIGSLIKSADKLGIIHSLGGINVKSQQVTKIDDEKTSLAITGHAKVE-----DKQYSAGFHIHTTNTKNTSTETEQANSTISGA
HylA 690 VDVIGSLVKASAGELGIBTLGDIINVAQAQEKQIDDEKTLTIDGFTSDDG-----KNQYQAGLKVHEHTSESEKTEKVINHGSLTEGG
EthA 663 IQVNGSRVESDGLALQAGGRVDVAAGVDTLKEKSTSLQVTAAYAKAQG-----DKQYRAGVIEHTAQOEESSRVTHRGSQLRGG
PhlA 667 INIIGSRVQSTGALSNTSGNIKVLSYGEQKQVDKQSTSLLEPQSHFPQPKG-----DKQYRAGIGIEHTSNSQKNQVTVQOASTLSGG
consensus 811 viGs v s g L gd v saq t l a dkQYrAG hiehttq k v q aS lsgG

HlpA 714 SVGMNSSAHLQVNGSKVQATAGDLVQAREVTLGATRNRDRVATSTTESGGGLTVGGIDRLGSLFEGHHNREVQADRDSKVQRSELQAS
Pflu4788 717 SVQVKAAGDVTLLKGAEVKSTTGDITLGGKNSVSLAAEQDHSHTSTETRTSTGGGFYTTGGLDRAAGSVDFSHSSTSDTTAKTAQTGTGVQSS
ShlA 738 SVKLKAEKDVTFSGSKLVADKGDASVSGNKVSLAEDKTAASNTETQTKIGGFYTTGGIDKLGSGVAGYENNKTKQASSKAITSGSDVK
HpmA 725 NVDLQANKDVTFAAGSDLKTAGNASITGDNVAFVSTENKKTQDNTDTTISGGFSYTTGGVDKVGSKADFPQYDKQHTQTEVTKNRGSQTEVA
HylA 772 TVKLEADKDVTFSTGSLNTTKGDADITAEVNSFVAQDTTTNSKEKETVGNVNAHYTGGMDKAGSGAGVSYEETKTDSEKSTAVVSHTTVK
EthA 745 SVEVTAAGDVFVSAHLQADAGDAQISGKNVAFVSAEESKTSHTTNTTVDVKYGGNIAYDGVTRPEVETIESEGKLDVGGVLENVGNV--
PhlA 749 SITIDADKDVTLRGSNLVTTTGDAKITGENVHLLAEDNKSEKSSQSKKYVGYALTGGIDKVGSGIYGRYEGNNSNHTSTTAVVSGSQIA
consensus 901 sv a kdvtf Gs l t Gda isg nV fla t t ggg yyTgGiDklGSG y t a s v

HlpA 804 GDLKLRSDALLTEAAHVEAGNTLQVT-AKRDNRAAQDTHEHEQSRDDWSGSLGASIEYRDLTRPIERLVLGEEAPRFQOASPED-----
Pflu4788 807 GSLNINADKLTAGEAQLKAGNGLNVA-ANVDNRAASNTESSTHESNWSADIGANVEYKDIARPIAGAVKEVLDGKVPDKDALA-----
ShlA 828 GNLTINARDKLTQQAQHSVGGAVQENAGVDHLAAADTASTTTTKTDVGVNIGANVDYSAVTRPVERAVGKAAKLDATGVIINDIG--
HpmA 815 GDLTITANKDLLHEGASHHVEGRYQESGENIQHLAVNDSETSKTDSLNVGIDVGNLDYSGVTKPVKKAIEDGVNTTKPGNNDLTKKVT
HylA 862 GDLNLNAKQEIITNQDTHNVGGSYAANATNPNLAAENSETTTTTNTVDVKYGGNIAYDGVTRPEVETIESEGKLDVGGVLENVGNV--
EthA 835 GNLTITATDNTVQQGAHQAGGVYREQAASVEHLEANNRDSRSSRQRTQVHGEAGVSDYSAVTRPLEGAVKKAASLDANGVNVNEIG--
PhlA 839 GNLNLIKANGELVQEGTKHEVNGTYTAEAGKVSNLAVNTESSNTNKKLQVGTDIQVNVVDYSAVTRPIEIKVVKEPAKSALDGLTIT-----
consensus 991 G L i a lt g h v g y a vdhlaa ntesstt v d GanvdYs vtrP erav g e

HlpA 888 -----AMAPPVSGADMTVEHLKRELNQRRGIAQVSELSAAKVEVKADTL-ADQGTAWRANAGS-----
Pflu4788 891 -----NLGQPNVGLDVAIGHASADKTEQGSNAVVRPFGQTVVDVKVGGALRDQGTQYNASAGK-----
ShlA 914 -----GIGAPNVGLDIGAQGGSSSEKRSSSSQAVVSSVQAGSIDINAKGEVRDQGTQYQASKGA-----
HpmA 905 ARDAIANLANLSNLETNPNVGEVGIKGGSSQSQSDSQAVSTISNACKIDIDSNKLNHDQGTHYQSTQEG-----
HylA 950 -----APDSVNAGVDLSVNVGEKENKSSNSQAVVTSIKSGDISITAKEDVKDQGTQYQADKGG-----
EthA 921 -----TIKGNLGDVADGGTHTQSSSDT-----QAQTTQIQAGAIQVTARDEVHTGGRSTGRPTAR
PhlA 922 -----KKGTPNFGADIAANGSSIQTANKKSETVVTSTIQASDIVIKTNGELYDQGTQYRADKGN-----
consensus 1081 g pnvG d av gg s s avv s a iei rdQgTqyqa g

HlpA 945 LKIEAQHQVSAEANTQETTQRLAYGGDARLDITSTGEDLNVRAGKGGSLDKKDTASTAVPGSLYQGGIIVQLGSDGRYEGARIDGGE
Pflu4788 949 VNISADKLVADAANNTHSSTEKSVDAKVDVRVYTKTGEDVNVAGSGAGGSSQSSKDSSTAVVGGYAGNQQVNIHVGGAQFEGSRFDGGQ
ShlA 972 VNLTADSHRSEAAANRQDEQSRDTRGSAQVRVYTTTGGSDLVDAKGEQGTQRSNSSASQAVTGSIDAANGINNVNKKDAIYQGTALNNGR
HpmA 975 ISLTANTHTSEATLKHQTTFHETKGGGQIGVSTKSGSDITVAIKGEGQTTDNALMETKAKGSGFTSNGDLSINVGENAHYEGAQFDAQK
HylA 1008 IKIDAANHTFESAVNRAEESKVVSGGVDMRIYTTTGEDINVDKKGKGENKQVEVKAQAQQTGSMKAVGDI I INVQENARYQGTDLDSGD
EthA 979 VSLRADSHRFDAASSSHRGQTDDVNGGASLRVYTTTGGKDIGGAARQQGENRSGQEVSVAQAGKVQAANGIDIQIGQEGRYQGTALDGGH
PhlA 980 VTLTAGNHTSEAAQNHQSSHSETSGNADLRVYTTTGEDISANGKGGGTQSSHTTTTAVTSRITAADDINIRVERDAEYQGTSLNAGS
consensus 1171 v l A h eaa n h k gg d rvyTtTgEdi v aK Gg stAv g l a ggi i vg da yqGt l gg

HlpA 1035 GSVMHVSAGSLALPQATDKAEQQSRQLDGNAAWAKVGNRPGSTGVGDRGYLDHGQKLST---QGKAQVAQIDAKGEVKLTSTG-----
Pflu4788 1039 GGVSVKTTGGDLALNQANDRQSSDSSSLRGNGLSLVGLPTGDTGNIDLGAQFQLDHKGHQTTDSQAHVASLNGNPPVRLSSGGNQVQQGT
ShlA 1062 KGTAVNAGGDIRLDQASDKQESRSRGNFNKASAKGGTADSKNFGAGFGGTHNG-----ESSSSTAQVGNISGQQGVELKAGR----
HpmA 1065 KKTVINAGGDLTLAQATDTHSESSQSNVNGSANLKVGTTPPEKSDYGGGFNAGTTHHSKE---QTTAKVGTITGSGQIELNAGH----
HylA 1098 KKIATITAGEETIKFEQATSHLSENHNKIDANAKANFGTKPNKSKDFGGGLGGHSGQ---STSAQVSHLHGKQCIELNAGK----
EthA 1069 GKVQLNSGGDLQLEQATDSSVSHAGYDARHLRSGDMSGSNSGSAALGGGQDNGQQS---ETQAHTAQRVADGGVTLNSAG-----
PhlA 1070 KGANIDAKGDIRFDNATNSTTKTATGYNCEASAKGGSNPEKGNVHILGGGYNIDSKN---STTAQVSEIIGKQSVTLNSAG-----
consensus 1261 Gkv aggd l qAtdk s g a ak g tp sk g ggg tsa vaq a gv l

HlpA 1114 -----DLL
Pflu4788 1129 KIDSAGAIIDLKAGGKLDLQAATYTHLANGSHLGGGLKAGGSKTSSEKSRDQGGNLSGNFNIIGRVNENTQTLSSGGQLNSQNGIALSGDSVH
ShlA 1141 -----DLT
HpmA 1144 -----NLT
HylA 1177 -----DLT
EthA 1147 -----SLT
PhlA 1149 -----NLT
consensus 1351 lt

Capítulo I

HlpA	1117	LEGRTRIGSREAKAGDIQVQSGGQLQVKAASNTQQATGSNLGGGMELAAKAGQTQGAIGGFHSHGKQDEHARQAVDAQFASNGTLTLTSS	
Pflu4788	1219	LQGTQVSAFNVSIDAQKGGFVQESAQS TDNRNWNVALNAGGNLSKSTPTAADEKVS SDHGFSAKVGVDYLQGTQOONSQIKADTVVL	
ShlA	1144	LOGTIDVKSQGDVLSAGNKVALQAAESTQTRKESKLSGNIDLGAGSSDSKEKTTGGNLSAGGAFDIAKVNESATERQGGATTASDGKVTLSA	
HpmA	1147	LQGTHTLSSQDIALNATNKVDLQASSEHTEKGNLSSGGVQAGFGKMTDDASSVNLGSAQFAIGKQDEKSVSREGGTINNSGNLTING	
HylA	1180	LQGTTFGSKNAATGDVQLTAGGKVDFOAAQSSKQDMTWSAVSKAGKSKSNSTSENDGTTKHTNNKGFSAEAVNKVNTDETSLTHQAG	
EthA	1150	LQGTVEVSSQGDVTLKAGEKLDLRQANSARSQQGSVWSGELSGGASSGSSDSANSRGGSVGAKAKVAMQHEQQSTAQGARVSGANVTLGAG	
PhlA	1152	LQGAQVTGKQIDLNKQGNVELVSAQDRINNDGWEFNLKNGGNGASSIKKAEDDSTTTTKQNFGEVVKVGDIDRLQATTTQRN-----	
consensus	1441	LqGt v s l a s g g n a s s g s s d s a n s r g g s v g a k a k v a m q h e q q s t a q g a r v s g a n v t l s a g	t
HlpA	1207	AREEDIA-----LHLQGLQASAEQITLDASNGMLVEASSSQE	
Pflu4788	1309	NSGGD-----ASLNGARIDARN-----	
ShlA	1234	NGKGDAD-----LHLQGAQVSGSAALBAKNGGILLES AKNEQ	
HpmA	1237	NS-----VHLOGAQVNSKDTQLTSQSGDLEITSAQSTD	
HylA	1270	GIINSNGAVTIKADGKDQQAIHLQNTNII SQETILNADNGGITVME SAQDKEHKNNWNVNTNLNGSQKNTIKSDDQGVVDKDSAKLIHNAA	
EthA	1240	AQSDA-----LHLQGAQVTGHDVALNAHEGGIVLESASSGQ	
PhlA	1234	-----SHIKGENVINSGGDTTVAGARLEADQ----	
consensus	1531	-----hlqGaqv l a g	
HlpA	1244	RRDNLDISAGAGFNMAKALDTRGLHGR LKVELDKRDNLTWNTSDLRAERIDLQSRGDTRIESATLDAGH-----IGTTIDG	
Pflu4788	1326	-----VSGKVAG	
ShlA	1272	HKDNWSLGIKANAKGGQTFNKDAGGKVDNTPGKDTHTLGAGLKVGVVEQODKTHANTGITAGDVTLSNGKDTRLAGARVDADSVQGVGG	
HpmA	1270	YKNNWGTDIGFNGKKTNNTPKEVTEK PATS IHNIGKLLVNVEDQKQKTS HQNATLETGTLTINSNKDLT LSGANVTADS---VTGNVGG	
HylA	1360	IKLDGGVDKLDVSTQONTHINSDKVTLNSAKNTELAGAVLQANQ-----ISGQIGG	
EthA	1277	EKNWGVVDSAGGLSGRQSVSKDAQGQADPASRQNRHTLNTGLKVAVDRQTQTQOTLAGARVDAQR-----IGGEVGG	
PhlA	1261	-----VKGSI GG	
consensus	1621	k n v g v g g	
HlpA	1321	DLRIASLKDNVNTLSVKGDVRLSQEKNPQQY-----	
Pflu4788	1333	DLSVESLQDSSSHAKVDVDLGLTAKKTPADDKGLAGT DYKPTLKVDGEYAHKDS-----	
ShlA	1362	DLHVESRKDVENGKVDVDAGLSHSNDP GSSITSKLSKVGTPRYAGKVEKLEAGVNKVADATTDKYN SVARRLDPQD TTGAVSFSKAE	
HpmA	1357	SLNIASQKESDRHVTVGVNVGYNHTNDPKSSQ-----	
HylA	1411	DLNVI SRENRLNK-----	
EthA	1350	DLRLESRQDSERSTQVNAGLTFHSNDEGASKTAKLSKIATP HLAGKVQSKLEG AIDKVS DKVSD EYNGAVRR LDKRQD TTGSVGFNKAN	
PhlA	1268	DLQVESRKDTEHGLNVGDAGMNYTKE SKVKSDDIPKDES TKDDFSKDDVSNDEELKDDPSKNPTEEPQPKGWQERLTSFNFS-----	
consensus	1711	dL veSrkd v vd g s p	
HlpA	1352	-----VNAASVAGPLGGKVEKKAQSALSKADPGFSPTVS	
Pflu4788	1388	-----VKQASGISGSGVNLIT	
ShlA	1452	GKVTLPATPAGEKPOGPLWDRGARTVGGAVKDSITGPAGRGHLKVNADVNNNAVGEQSAIAGKNGVALQ	
HpmA	1389	-----VNKTAKAGGSLEKTIKDTIDSGIKSSTDAISDKY	
HylA	1424	-----VNVSAALGSGSHSNKQDLSISQVANASP IMSDKIK	
EthA	1440	ETVTLPETLTGEKPOGALWDRRSAGNVKSSLTGAPGAQGS LQAEKGRVDNLA-VTQQSGLAGQQGVTLR-----	
PhlA	1351	-----LNNIKG I NGVTGKLKSNVDIKDRENVGEQSVISGN	
consensus	1801	-----vn i g g	
HlpA	1387	LDVSHAQRDNVARQTTLKSSDGIDLQ-----	
Pflu4788	1404	-----	
ShlA	1523	-----	
HpmA	1424	NSLSS TIADKTGISDET KAKIDQGF GVGNGIKNI V TGAEGHTANADIKVTHVDNDAVTKT TSLTSNNDLSLN-----	
HylA	1459	NKLEEKSTKIFDKVENKFNTLGKEKDDSVQTI SYTKDGT VKI SEAEKKE TKDKWQKGA KSVGKKIKSA VQDEQVVGNGSVKANVEV	
EthA	1510	-----	
PhlA	1386	QGVNLD-----	
consensus	1891	-----	
HlpA	1413	-----VGGNAHLVGARLQSAKGDVRLDANSVTOETLSGNDYRRRLSLDASNSPVDLGTAI AEIAKSKMAADGEN	
Pflu4788	1404	-----VGGATQLTGARISATEKQVLDGSSKVS SSDLNLDYGVKAGLDLPHKTEENAPK VSL ENGNLKVGPVTL	
ShlA	1523	-----VGGQTLTGGEIRSQQKVELGGSQV SQQDVNGQRYQGGRVDA AATVGGLLGGAAKQSVAGNVPFASG	
HpmA	1497	-----VNGSTKL TGAEIVSQQQVDLGGSSVKLENI EGHY EAGADL DLKSSVVDLAKQLVGGDL I SFKSPVKTN	
HylA	1549	VESQGVEEQSAIRGTQNVDLTVKGTDLVGGKISSKNSDVKLKTNGLETQD INCKYTEGGARLNASS SVMDMISDGAKDVMGKAPLVSG	
EthA	1510	-----VNGETDLTGATIESAAGKVDLSGRVVRDLVGHRYQSGK GALPLSVGG L TEVANKLVTQSELPLSVS	
PhlA	1392	-----VKGNTHLIGGQIGSEKGVILNTQNV EQQSVTSYDNSKGGNVALPDSVSGIVKAVQEGVLSGKILPVKT	
consensus	1981	V G t LtGa i s g V L g s v q d g y g ldl sv l kvp	
HlpA	1482	ALDLGVLRTSGHSRSEQWVSSMQGKKH	
Pflu4788	1473	SGHLDSQPLQAGIDEKG-----	
ShlA	1592	HASTQQADAKAGVFSGK-----	
HpmA	1566	ETVNTKASISEK-----	
HylA	1639	HGKSEQKNA TGGITRE-----	
EthA	1579	TESHPESSQSGVHSKQ-----	
PhlA	1461	YSNETETSTTNGE I INRKSD-----	
consensus	2071	g	

← **Figura C.I.3: Alineamiento múltiple de HlpA con otras proteínas.** El alineamiento múltiple entre HlpA de *P. putida* y las secuencias de seis proteínas se realizó con el programa ClustalW (ver sección *Materiales y Métodos*). Los aminoácidos conservados en todas las secuencias se indican en color rojo. Los residuos similares se indican en color azul. Para que un aminoácido forme parte de la secuencia consenso debe estar presente al menos en cuatro de las siete secuencias alineadas. La secuencia consenso y el color de los aminoácidos se generaron con ayuda del programa MacBoxShade (ver sección *Materiales y Métodos*). El porcentaje de identidad entre HlpA y las distintas proteínas alineadas, así como el número de acceso a la base de datos y la referencia para cada secuencia se indican en la Tabla C.I.1. Abreviaturas: HlpA, *Pseudomonas putida* KT2440; Pflu, *Pseudomonas fluorescens*; ShlA, *Serratia marcescens*; HpmA, *Proteus mirabilis*; HylA, *Yersinia pestis*; EthA, *Edwardsiella tarda*; PhlA, *Photorhabdus luminescens*. La predicción de la estructura secundaria se muestra mediante sombreados amarillos (estructura α -hélice) y grises (estructura β -hebra). Para esta predicción se ha utilizado el programa PHD (Rost *et al.*, 1993).

Este alineamiento múltiple de secuencia se utiliza también como paso intermedio en la construcción de árboles filogenéticos. Para la elaboración del árbol utilizamos el programa TREEVIEW (Page, 1996). La longitud de las ramas es proporcional a las distancias filogenéticas. Las abreviaturas para las proteínas TpsA son las siguientes: HlpA, *Pseudomonas putida* KT2440; Pflu, *Pseudomonas fluorescens*; ShlA, *Serratia marcescens*; Hpm, *Proteus mirabilis*; HylA, *Yersinia pestis*; EthA, *Edwardsiella tarda*; PhlA, *Photorhabdus luminescens*; HMW1, *Haemophilus influenzae*; FHA, *Bordetella pertussis*; HecA, *Erwinia chrysanthemi*; HhdA, *Haemophilus ducreyi*.

El siguiente agrupamiento de proteínas está propuesto basándonos en la homología entre ellas. Observando la Figura C.I.4. del árbol podemos agruparlas en tres grupos: un grupo I que incluirían hemolisinas/citolisinas independientes de Ca^{2+} como son HpmA, ShlA, EthA, HylA y PhlA; un grupo II que está representado por adhesinas, como HMW1, FHA, HecA; y un tercer grupo, el grupo III que correspondería a las proteínas Pflu4788 y HlpA. La proteína HhdA, presenta homología con citolisinas, sin embargo, ocupa una posición alejada del grupo que le correspondería.

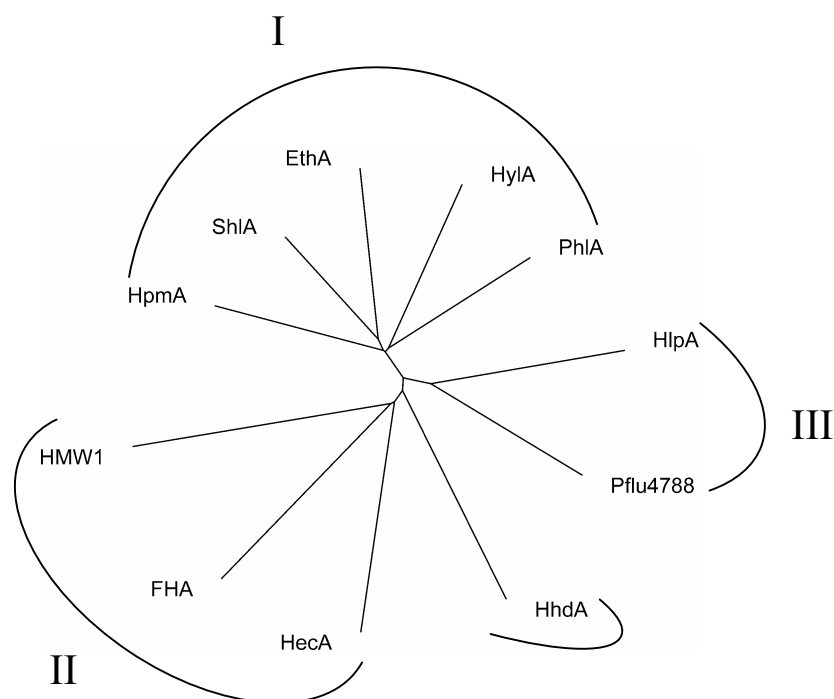


Figura C.I.4. Árbol filogenético de miembros reconocidos actualmente de la familia TPS: La longitud de las ramas es proporcional a las distancias filogenéticas. Para la construcción del alineamiento y árbol se utilizaron los programas CLUSTAL y TREE respectivamente. La agrupación está propuesta según la homología. Grupo I: ShlA, *Serratia marcescens*; HpmA, *Proteus mirabilis*; HylA, *Yersinia pestis*; EthA, *Edwardsiella tarda*; PhlA, *Photorhabdus luminescens*; Grupo II: HMW1, *Haemophilus influenzae*; FHA, *Bordetella pertusis*; HecA, *Erwinia chrysanthemi* y Grupo III: HlpA, *Pseudomonas putida* KT2440; Pflu, *Pseudomonas fluorescens*. HhdA, *Haemophilus ducreyi* aparece alejada del grupo a que correspondería (citolisinas). HlpA presentaría el grado más alto de similitud con *Pseudomonas fluorescens*.

El análisis de la proteína HlpA mediante el programa SignalP v3.0 (Nielsen *et al.*, 1997, ver *Materiales y Métodos*) determinó la presencia de un péptido señal de 33 aminoácidos con características similares a las de las lipoproteínas (Braun y Wu, 1994; Pugsley, 1993). En dicho péptido se podía diferenciar claramente un dominio N con carga neta positiva, un dominio H hidrofóbico y un dominio C que se ajustaba a las características del péptido señal estándar, con residuos neutros de pequeño tamaño en las posiciones -1

y -3, concretamente alanina (muy conservada en dichas posiciones, con un 86,1 % y 58,7% de probabilidad respectivamente). Además, en la posición -6 suele haber un residuo que induce giros β (P o G). El punto de procesamiento se situaría entre los aminoácidos Ala31 y Gln32. Tras dicho procesamiento, la proteína tendría un tamaño de 1475 aminoácidos. En la Figura C.I.5 se muestra la estructura primaria del péptido señal hipotético de HlpA.

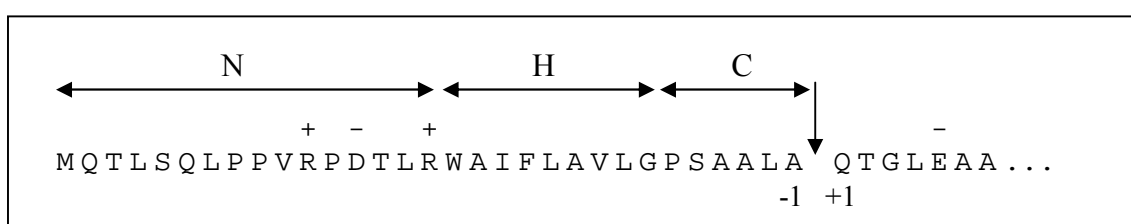


Figura C.I.5: Estructura primaria de la región amino terminal de HlpA y del supuesto péptido señal. Sobre la secuencia de aminoácidos se indican los tres dominios que se diferencian en un péptido señal: un dominio polar con carga neta positiva (el dominio N), una región central hidrofóbica (el dominio H) y un dominio C, normalmente menos hidrofóbico, que contiene las señales que reconoce la peptidasa encargada del corte. Los símbolos + y - que se encuentran encima de algunos aminoácidos indican la carga neta positiva o negativa a pH fisiológico, respectivamente. La flecha vertical indica el sitio de procesamiento propuesto. La numeración -1 y +1 se refiere a la posición de los aminoácidos con respecto a dicho sitio de corte. Así el aminoácido de la posición +1 se convertirá en el primer aminoácido de la proteína madura. Para esta predicción se ha utilizado el programa SignalP v3.0 (Nielsen *et al.*, 1997).

El programa Tmpred (ver Materiales y Métodos) predijo la existencia de una posible hélice transmembrana localizada entre los aminoácidos 17-33 con orientaciones dentro-fuera, quedando en el periplasma el resto de la proteína. Este modelo sugerido podría corresponder a la zona de unión a la membrana interna que posteriormente se liberaría al periplasma para atravesar por último la membrana externa.

2.2. Comparación de HlpB con las secuencias de las bases de datos

Al comparar HlpB con las secuencias de las bases de datos, se encontró similitud con activadores-transportadores de la membrana externa asociados a las hemolisinas de los microorganismos mencionados anteriormente, estos eran *Proteus mirabilis*, *Edwardsiella tarda*, *Serratia marcescens*, *Yersinia pestis*, *Photorhabdus luminescens*, *Pseudomonas fluorescens*, *Haemophilus ducreyi*, *Erwinia chrysanthemi* y *Haemophilus ducreyi*. En algunos casos, esta proteína denominada genéricamente TpsB es también requerida para que la hemolisina adquiera su forma activa. En la Tabla C.I.2 se recoge el tamaño de estas proteínas, su número de identificación en la fuente de origen y el porcentaje de identidad (a nivel de secuencia de aminoácidos) que presentaron con HlpB de *P. putida*.

TABLA C.I.2. Proteínas con las que HlpB de *P. putida* presenta alta identidad

Nombre de la proteína y microorganismo de origen	aa ^a	% identidad ^b	Nº acceso en GenBank o en Swiss-Prot/Referencia
HpmB, <i>Proteus mirabilis</i>	561	32 (50)	M30186/ Uphoff, <i>et al.</i> , (1990)
EthB, <i>Edwardsiella tarda</i>	559	33 (50)	D89876/ Hirono, <i>et al.</i> , (1997)
ShlB, <i>Serratia marcescens</i>	557	34 (52)	M22618/ Poole, <i>et al.</i> , (1988)
PhlB, <i>Photorhabdus luminescens</i>	559	32 (50)	AL662784/ Brillard, <i>et al.</i> , (2002)
HylB, <i>Yersinia pestis</i>	592	31 (50)	AE013603/ Deng, <i>et al.</i> , (2002)
Pflu, <i>Pseudomonas fluorescens</i>	575	44 (59)	NCBI Microbial Genomes Annotation Project (2002)
HhdB, <i>Haemophilus ducreyi</i>	532	23(43)	7467546/ Palmer, <i>et al.</i> , (1995)
HecB, <i>Erwinia chrysanthemi</i>	558	26(45)	AF501263/ Rojas, <i>et al.</i> , (2002)
FhaC, <i>Bordetella pertussis</i>	584	25(40)	462082/ Jacob-Dubuisson <i>et al.</i> , (1996)
HMW1B, <i>Haemophilus influenzae</i>	545	25(39)	1170438/ Barenkamp, <i>et al.</i> , (1994)

^a Número de aminoácidos de la proteína.

^b Se indica el porcentaje de residuos idénticos encontrados en el fragmento de solapamiento.

Entre paréntesis se indica el porcentaje de residuos conservados

Estas proteínas de aproximadamente 60 kDa tienen la característica de proteínas de membrana externa integrales, un probable residuo (10) C-terminal anfipático para formar una β -hebra transmembrana y un número de segmentos anfipáticos conservados adicionales en sus secuencias. La estructura y función de dos miembros de la familia

TPS, ShlB y FhaC, han sido estudiados y en ambos casos se predice formar un β -barril transmembrana en la membrana externa (Jacob-Dubuisson *et al.*, 2001). Datos experimentales han corroborado estas predicciones a pesar de algunas diferencias entre los modelos topológicos de las dos proteínas (Könninger *et al.*, 1999; Guédin *et al.*, 2000). En la Figura C.I.6 se muestra el alineamiento múltiple de HlpB (proteína de 565 aminoácidos) con algunas de las proteínas listadas en la tabla anterior. Se encontró que estas proteínas presentaban un alto grado de similitud a lo largo de todas sus secuencias con segmentos altamente conservados que correspondían a las posiciones situadas entre 36 y 535 de HlpB. La mayoría de estas proteínas tienen dos residuos de cisteínas (posición 82 y 112 de HlpB) y una fenilalanina en la región C-terminal características de proteínas de membrana externa (marcadas ambas cisteínas y fenilalanina con un asterisco en la Figura C.I.6). En la región C-terminal se encontró también una secuencia conservada terminada en RGY/F. Este motivo estaba conservado en casi todas las proteínas del alineamiento.

Se llevó a cabo un estudio de la estructura secundaria obtenida por programas informáticos de predicción de estructura secundaria que utilizan diferentes algoritmos. En esta misma Figura C.I.6 podemos observar mediante sombreados amarillo (estructura α -hélice) y gris (estructura β -hebra) la predicción de la estructura secundaria de ambas proteínas utilizando el programa PHD (Rost *et al.*, 1993) disponible en la siguiente dirección <http://npsa.pbil.ibcp-fr>.

➔ **Figura C.I.6: Alineamiento múltiple de HlpB con otras proteínas.** La nomenclatura utilizada y el método seguido para generar el alineamiento son los mismos que se indicaron en la Figura C.I.3. El porcentaje de identidad entre HlpB y las distintas proteínas alineadas, así como el número de acceso a la base de datos y la referencia para cada secuencia se indican en la Tabla C.I.2. Abreviaturas de las proteínas: HlpB, *Pseudomonas putida* KT2440; Pflu, *Pseudomonas fluorescens*; ShlB, *Serratia marcescens*; HpmB, *Proteus mirabilis*; HylB, *Yersinia pestis*; EthB, *Edwardsiella tarda*; PhlB, *Photobacterium luminescens*. Los residuos de cisteína y fenilalanina están marcados con un asterisco. La predicción de la estructura secundaria se muestra mediante sombreados amarillos (estructura α -hélice) y grises (estructura β -hebra). Para esta predicción se ha utilizado el programa PHD (Rost *et al.*, 1993).

Capítulo I

HlpB	1	-----MRGASMPCLTHRIAHWLSAGCLSGLLSIPQVLAADDPA	SQQLRDQQHGLRQLEQQQRLEWRQIPVPAEPTNST-
Pflu4787	1	MPYSLCVVRRCRSLPRPLLSALLSVCAPSVLAAETPAPGQ	VLRQQQLQQRDLQQLLEQRKRQLERGAFGPTVNPDI
HpmB	1	-----MKKKVVLTLTSCFSTSGLSANETGNLGSIS	ESRRALQDSQREINQLIEQNRYQQLEQKAVNISPTP---
PhlB	1	-----MIKRISILILGCIISFQIIASPAEINDNLPMT	EARRTLQDSSREINQLIEQRRYQQKQQANTVPESTPA-
EthB	1	-----MKLNAPFLPAMGNALGDVVRARAPPFDWNTPTD	ESRRALQNSAREVNSLLEQQSLQRLEKQRARPSAAP-
ShlB	1	-----MIKKITALTLVSTALSAETLPPDSHMMQDMSM	GESRRALQDSTREVNQLIEQRRYQQKQQRLLEAPAA---
HylB	1	-----MIRKRTALWVLSTGAQAETPLALETSSIN	ESRQSLQNNAKEINQLVEEKRHQQTQHTNGQSELSRPA
consensus	1	mk i lll l s i i esrr lqds reinqLieqqr qql	p
*			
HlpB	74	---SHRPHDDRCAVWVGVRVAGMHRLSNSALAPTIRALTP	ACMGIA DINRLLKAITQRYVQAGYPTSRPYLRQPPAEGMP
Pflu4787	81	P--ESIKPDERCWPVLSGTRIGGVTLIDKDKLNARIKPL	LAPCMGVGINHLLATITALLYVEKGYIASRPLSSAPAGQS
HpmB	68	---TLITSEHCLPKGVYIQGITLLTEKDLNSLSPDPQ-	CIKSADINRLVKELTQRYLQHGYYITARIQFLR-PNQHGE
PhlB	70	---PVLPESEKQCLPLTGVYKGISLSSVRDLSTLSALSPA	-CISSH DINRLSHELTHLYISKGYITARVQFIA-PNTDGE
EthB	72	---AQLREDTSCLPIDGVYLTGITLLSRLRLALDPLPTH	-CIRSRDVNHLAKQLTALYLEKGYITARVQFLR-PNARGE
ShlB	70	---PALPQSAQCLPIAGVYLQGVTLTSPADLSALSGLPEQ	-CISSNDINRLTRELTRLYVQKGYITARQIVR-PNSQGE
HylB	71	PPAPVLPEDTQCLPINGVYIQGITLLTEDDLSELSAIP	EQ-CIHPDNINLLTRELTHIYMDKGYITARIQFIIP-PPADGK
consensus	81	lped Clpi Gvyy Gitlls dL ls lp Ci s diNrL	kelt lyv kGyitaRiqfl Pn ge
*			
HlpB	151	LDIVIVEGFVETIELAGPDLPLSLSSAFPGLLQQLYLP	PDLEOGLDQLNRLRAYELGATLLPGELQGGTRVVVQPKVAS
Pflu4787	159	LDILIDEGYIESIELADQSLPVSLGGAFPGLGKPLNLR	DLEOGLDQLNRLSLLDTADIPGGQPGASKIILRSRTSGQ
HpmB	143	LGLYAIIEGFVERIEGGDRGVNTTL--LFPRIKQPLK	LATLDQGLDQANRLQSNKVTVDILPGTEGGSVIKLNQRKSP
PhlB	145	LGLNVIIEGFVEKIEGGDRVWNSM--LFPGLEKPLN	ITDQGLDQANRLQSNKTTLDILPGTVNNGSVIKLNQRKSP
EthB	147	LGVVTERFERIEGGDRGVNRRW--LFPGAVGKPLRL	ASLDQGLDQANRLSNHVSMDILPGERVGGSVIRLYNRRER
ShlB	145	LGLSVTEGFIEKIEGGDRVWNSRL--LFPGLEKPLK	LTELDQGLDQANRLQSNKTTLDILPGRQVGGSVIRLRNHAKP
HylB	149	LGLDLTEGFVEAIDSTDTGLDGET--VFPNMLGKPL	NITRLDQGLDQANRLPSNKVTVDILPGLTLPGGSLKLNHTPSTP
consensus	161	Lgl i EgfvErIeggdr vn sl lFPgllgkPL l	LdQGLDQANRL snkvtvdilPG Ggsviklrn r p
*			
HlpB	231	R-WHLDSRFDNRGSELTGRHRVNLGIGLDSPLGLN	DELRLSLARTVLDTPGQSQGI-SLYYSIPYGAWTFALSASQLSYQ
Pflu4787	239	SRWALGAGFDNLGSASTGRDRDRTLSTLDSPLELND	LLSLSASDTLNQGDYRYSNA-SLYYATPYGWTFFSAFASHAEYR
HpmB	221	--WHLNIASDNYGQKNSGRWLRITNASLDSPLGLS	DFVSLNANITTDNPNTRFNRAYTLLYSIPYGGTFSSFSGYSYEQ
PhlB	223	--WLNLIKTDNYGQKSTCKWRVRTNTSFDSPFGLS	DFISLNASTLDSPSNRYSRAYTLLYSMPYGAATFSFGFSYSQYA
EthB	225	--WQVSGLDNYGQQSTGEWVARGSATLDSPLGLS	DFVSLSASTTLAQPSARYSRAYMLFYSLPYGDLTFSFGFASFSDYQ
ShlB	223	--WLTITAGTDNYGQKSTGEWLRARATLDSPPGLS	DFVSLNANSTLENPAHRYNRAYTLLYSIPYGAATFSFGFASFSSEY
HylB	227	--WHLTSMNDNYGNKNTGKWLRSNALSFDNPLGLS	DFVSLNINISNTVDRPQHNYSRAYSMFYSVPYALTFSGFSGYAEYR
consensus	241	W l DNYGqkstGrwl r tLDsPlgLSdfvslnas	Tldqp ry rayslyYsiPYGawTFsgfaSyseY
*			
HlpB	309	APLPYSDKAA--DGSSYQGLSVERVLRNQQGMLS	SASARLDRKQLINRSAGAVIVQSPPTLATVEAGINLLWLESGLWN
Pflu4787	318	APFKLSTATLYSTGITDLSLRADRVLRDQSHQLS	ANLQLAHKDVSYLENVRLEGIQSPPTLTVABAGINLFWLDRAVWN
HpmB	299	FHQKLTQTRTVNLYGDTTQVQIRGDYAESRSQKQ	IDTLNIOVTHKRRIRNYSFQIRLDDLSPKLTITIBLGINHLIIPNGVL
PhlB	301	SRPHLQMRTIKIYGDTPQIGMRSDFAFYRNQ	CSINSVSGOLTYKNYNYIDNAKIGVSSQTLVSVFELGVNHLHIPTGLI
EthB	303	MHQSLPHIRILDGQASQYGLRGDAVLRQSRQIN	TLLGVQTYKRIRSYLQDDLDRVSSPTLSVAELGLSHLHLSGGVA
ShlB	301	NHQQLPHNVKILHGQTQQGLRSDYVYRDHDQ	IDSLSGOLTYKRIDNYFESVRLVSSPTLTLAELASASHLQILPENGVF
HylB	305	YPMKIQFNITAKLHGGETQQHGLRADYVYFRD	QSINGLSAQLTYKRASNYLEEKIAISSPTLTIPELGLNHLHVLPMGLF
consensus	321	h kl tv l G t q glradyvfwr q qi slsaqlyKrl	nyl rl vsSptLtv Elglnhl ilp gv
*			
HlpB	387	GYF-GVAQCIDALGADRSPPLGAHRL--RPDFRKYR	ANLLHLRQGPAPSPWRWQSELA-MQYSRDPLPAVEQLLVSDSAV
Pflu4787	398	LDV-NYAQGLSFGADDDADRQVKNLPKAQFRKYR	AGLSQWRNGQIQAQAWQWOSQLNLQYSPDPLPAIEQLLGTDDSAV
HpmB	379	STNLSVEKAVGWFGAETPYIANGNGNDYRFTKVK	LFTNWWYQRFSLWHSTFLFNSTFLGQYSHDTPGVEWLSLTDKNAI
PhlB	381	TLNLSVEQGLPWFQAQTGTAYL----DKQFTK	GKLMVNLHQRFMLFNSPYQLNLFYGYQNRHGLPGVEWLNITDRNAV
EthB	383	TGNLSVERGLSILGADRGRQRTGA---EAQYTKL	KLSAGVSQRTVLDADVLENAQWYQYSRDPLPGVEWVSLTERTAV
ShlB	381	SANLSVEQGMPLWLAGRHPSSVHL---DSQFTK	GKLFANLSQRRLGDATYQLNLFYGYQSRDPLPGVEWLSLTDKSAV
HylB	385	NINVSLEQGLPWLGAERSNGPLANYQ-DSQFTK	AKTSITSNHYFALFDDTYLFSNQFYGYTRDRPLPGVEWLSITDSSAI
consensus	401	s nlsveqgl wLGAdr d qftK kl l qr l y wn	fygQYsrdpLPgvEwlsvtdrsAv
*			
HlpB	463	RGFRLHTYSGASSAVWRNTFSQALPRTWAPPF	IRPYIGLDLGVWRTAEGKPSQRLA-GAAAGLELSLPGSRIRLDYQRA
Pflu4787	477	RGYRVSSASGASGAIWRNTLRLPLRSDLPV--Q	LTPRVGLDHGWIKADHGAPVQRLS-GASIGLNLGKNLQVDDVDYQRS
HpmB	459	RGFDQSTLSDNGGYLRNLTLSYPYRLNHFF--	SITPRIGVDIGQVKQHGNYKGWQGGYGLSSGLNIQYQQAQLDLEVAKG
PhlB	456	RGFSKNTLSDNGWYLQNTLSRFTPLANS---T	LSMRIGIDTGRVQGYRSPQGWQSSAGISSGTTLRYQARMLVDIETSRG
EthB	460	RGFKRGTLSADNGWYQNTLSRPLRWRAF---T	VPTRIGLDVGRVLSNAGDQGWQSGVGAVAGVTLTSSASAOQLEIEVGRA
ShlB	458	RGFSRSTQSGDNGWYLQNTLSRSPNLGAT---	TLTPRLGADVGRILPRQDNSGWRSSAGISTGATLRYQALVDLEVSRG
HylB	464	RGFSRNTLSADQGWYLQNTLSRRTLGDA---	TLTPRVGLDTGRLLQKPKQGWVSAM--GLSAGVSNLYQNTALDIEASRG
consensus	481	Rgf r tLsgdngwylqNtlSr f l tltprIGLdVGrv	gw GlS Gtl yq a ldle rg
*			
HlpB	542	LYTSDLPFRLEPGFVWLDWTLISI--	
Pflu4787	554	LNTPTGLHREPETWLMRVGLQI---	
HpmB	536	ELLYHQTNSENKTKDPTQLLVKFSYLF	
PhlB	533	KLLSNRQASDEPIQVLVRFYSYTF---	
EthB	537	RAISNNNFPSQSTQLLTRFSYSF---	
ShlB	535	WLLSNHATPEDPVQVLARFSYTF---	
HylB	539	RLLSGPSKINDPTQILARFSYRF---	
consensus	561	lls qll rfsy f	

El análisis de la proteína HlpB mediante el programa SignalP v3.0 predijo la existencia de un péptido señal de 33 aminoácidos. En dicho péptido se podía diferenciar claramente un dominio N con carga neta positiva, un dominio H hidrofóbico y un dominio C que se ajustaba a las características del péptido señal estándar, con residuos neutros de pequeño tamaño en las posiciones -1 y +3, concretamente alanina y valina respectivamente. El punto de procesamiento se situaría entre los aminoácidos Ala31 y Asp32. Tras dicho procesamiento, la proteína tendría un tamaño de 527 aminoácidos. En la Figura C.I.7 se muestra la estructura primaria del péptido señal hipotético de HlpB.

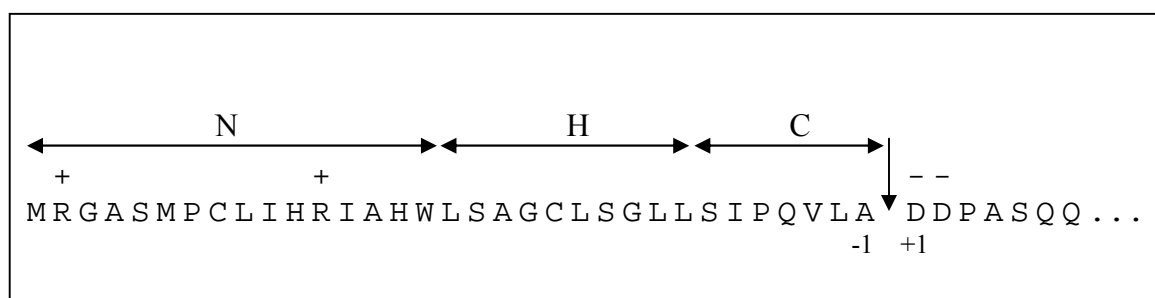


Figura C.I.7: Estructura primaria de la región amino terminal de HlpB y del supuesto péptido señal. La nomenclatura de los dominios, carga neta de los residuos y punto de procesamiento en esta figura son comunes a los de la leyenda de la Figura C.I.5.

El programa Tmpred (ver Materiales y Métodos) predijo la existencia de dos posibles hélices transmembrana localizada entre los aminoácidos 13-34 y 287-309 con orientaciones dentro-fuera, fuera-dentro. El modelo correspondería a la zona de unión a la membrana externa. Las características funcionales y estructurales de FhaC y ShlB hacen razonables proponer que estas, y probablemente todos los miembros de esta familia, forman canales específicos barriles β en la membrana externa para la translocación de sus “sustratos” exoproteínas.

De la misma manera que se realizó anteriormente, se llevó a cabo un estudio filogenético de miembros reconocidos actualmente de la familia TPS. El análisis filogenético sitúa a ShlB, HpmB y otras citolisinas transportadores/activadores como EthB y

HhdB cercanas en el dendrograma. En contraste, proteínas TpsB involucradas en la secreción de proteínas no-citosólicas, como FhaC, son colocadas claramente más lejanas (Figura C.I.8). Funcionalmente ShlB y FhaC representan dos subclases de proteínas TpsB, estando la primera involucrada en la secreción y activación de citolisinas y la segunda en la secreción de adhesinas. A nivel de secuencia, ShlB y HpmB están mucho más relacionadas entre sí que otras como FhaC. Un examen más detallada de las secuencias reveló que todas las proteínas TpsB tienen un par de cisteínas aproximadamente 30 residuos después de la región amino terminal, que están ausentes en FhaC y HMW1B (Jacob-Dubuisson *et al.*, 2001).

Para la elaboración del árbol filogenético utilizamos el programa TREEVIEW (Page, 1996) donde la longitud de las ramas son proporcionales a las distancias filogenéticas. Por tanto, al igual que el árbol anterior, el siguiente agrupamiento de proteínas está propuesto basándonos en la homología entre ellas. El grupo I: incluye la mayoría de los transportadores/activadores de hemolisinas/citolisinas Ca^{2+} -independientes conocidas, como ShlB, *Serratia marcescens*; HpmB, *Proteus mirabilis*; HylB, *Yersinia pestis*; EthB, *Edwardsiella tarda*; PhlB, *Photorhabdus luminescens*. El grupo II: está representado por proteínas involucradas en la secreción de proteínas no-citosólicas, como FhaC, HMW1B y HecB. Y un tercer grupo, grupo III: correspondería a las proteínas Pflu4788 y HlpB. La proteína HhdB, presenta homología con transportadores/activadores de citolisinas, sin embargo, ocupa una posición alejada del grupo que le correspondería (Figura C.I.8)

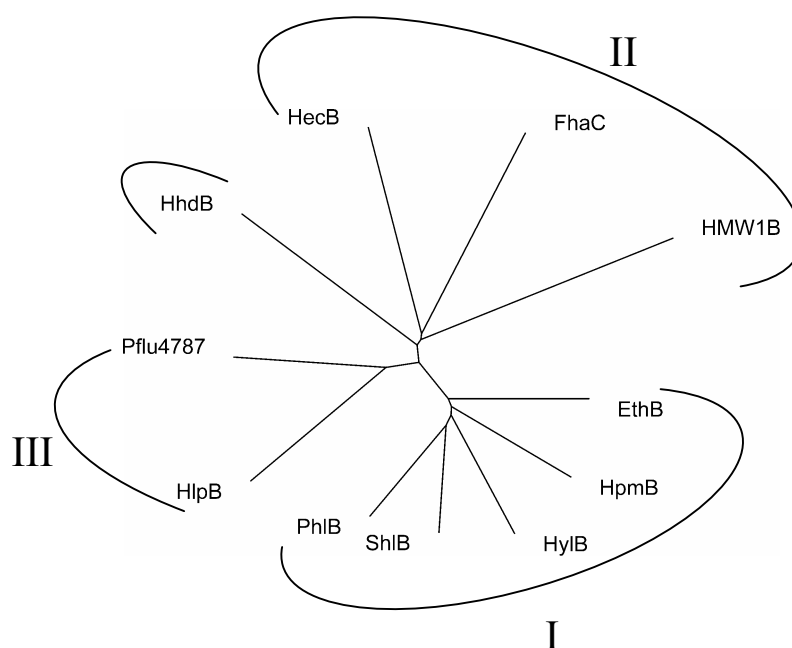


Figura C.I.8. Árbol filogenético de las proteínas pertenecientes a este sistema de secreción TPS: Para la construcción del alineamiento y árbol se utilizaron los programas CLUSTAL y TREE respectivamente. La longitud de las ramas es proporcional a las distancias filogenéticas. La agrupación está propuesta según la homología. Grupo I: ShlB, *Serratia marcescens*; HpmB, *Proteus mirabilis*; HylB, *Yersinia pestis*; EthB, *Edwardsiella tarda*; PhlB, *Photorhabdus luminescens*; Grupo II: Hmw1B, *Haemophilus influenzae*; FhaC, *Bordetella pertusis*; HecB, *Erwinia chrysanthemi* y Grupo III: HlpB, *Pseudomonas putida* KT2440; Pflu, *Pseudomonas fluorescens*. HhdB, *Haemophilus ducreyi* aparece alejada del grupo a que correspondería (citolisinas). HlpB presentaría el grado más alto de similitud con *Pseudomonas fluorescens*.

3. ANÁLISIS DE LA SECUENCIA DE ADN QUE FLANQUEA LOS GENES *hlpB-hlpA* Y COMPARACIÓN CON LAS SECUENCIAS EXISTENTES EN LAS DISTINTAS BASES DE DATOS.

Al principio de este capítulo, se describió la organización física de los genes *hlpB* y *hlpA*, describiéndose que ambos genes se encontraban asociadas en el cromosoma, y que presentaban la misma dirección transcripcional. No obstante, no se sabía si ambos genes formaban un operón.

Mediante análisis computacional del genoma de *P. putida* KT2440, se estudió el entorno genético de *hlpB-hlpA*. En sentido 5' de estos genes aparecen dos marcos abiertos de lectura, *orf1* y *orf2* (PP1452 y PP1451, respectivamente), que se transcriben en el mismo sentido que *hlpB-hlpA*. A su vez en 3' con respecto a *hlpA* aparecen dos marcos abiertos de lectura, *orf3* y *orf4* (PP1448 y PP1447, respectivamente), que se transcriben divergentemente con respecto a éste (Figura C.I.1).

El marco de lectura *orf1* (PP1452) se localizó entre los nucleótidos 599 y 1147, presentando un tamaño de 548 pb, y codificaría un polipéptido de 178 aminoácidos con un peso molecular estimado de 20926 Da. La función de dicha proteína correspondería a las de la familia de proteínas Mut/nudix. Este enzima, ADP-ribosa pirofosfatasa, cataliza la hidrólisis de ADP-ribosa a ribosa-5-P y AMP, compuestos que pueden ser reciclados como parte del metabolismo de nucleótidos (Gabelli *et al.*, 2001). La comparación de la secuencia de aminoácidos codificada por esta región con las secuencias de las distintas bases de datos dio como resultado un elevado grado de similitud con ADP-ribosa-pirofosfatasa de *P. fluorescens* PfO-1 (76%) y *P. aeruginosa* (70%). También presentó alta homología con hidrolasas nudix de *P. syringae* (69%) y *Azotobacter vinelandii* (60%) entre otras. En lo referente a la composición de aminoácidos, la lisina era el aminoácido más abundante (8,7%) y los aminoácidos cargados (D, E, K y R) sumaban el 21,7% del total.

El marco de lectura *orf2* (PP1451) se localizó entre los nucleótidos 1172 y 1724 (Figura C.I.2) y codificaría un polipéptido de 185 aminoácidos con un peso molecular estimado de 21072 Da que presentaría cierta similitud con posibles proteínas de *P. syringae* (64%), *P. fluorescens* PfO-1 (64%) y *P. aeruginosa* (58%). La posible proteína PP1451 presentó menos similitud con posibles lipoproteínas de *Geobacter sulfurreducens* (43%). Sin embargo, la función de dicha proteína es desconocida. En lo referente a la composición de aminoácidos, la lisina y alanina fueron los aminoácidos más abundantes (8,6% y 8,1% respectivamente) y los aminoácidos cargados (D, E, K y R) sumaban el 24,9% del total.

El marco de lectura (PP1448) más cercana al gen *hlpA*, denominada *orf3*, se localizó entre los nucleótidos 8285 y 8920 (Figura C.I.2) y codificaría un polipéptido de 204 aminoácidos con un peso molecular estimado de 23603 Da. Dicho polipéptido poseía

como aminoácidos mayoritarios, lisina (17,5%), valina (11,3%), alanina (10,4%) y glicina (10,4%) que sumados representan el 50% del total. En lo referente a los aminoácidos cargados (D, E, K y R) sumaban el 10,7% del total. La función de dicha proteína es desconocida. La comparación de la secuencia de aminoácidos codificada por esta región con las secuencias de las distintas bases de datos presentó homología con posibles proteínas, también sin caracterizar, de *P. fluorescens* PfO-1 (61%), *P. syringae* (57%) y con un posible regulador integral de membrana (31%) de *Streptomyces coelicolor*.

En cuanto al producto del marco de lectura de *orf4* (PP1447) se localizó entre los nucleótidos 8922 y 9170. Se desconoce su función y codificaría un polipéptido de 81 aminoácidos con un peso molecular estimado de 9645 Da. La posible proteína presentó también homología con posibles proteínas sin caracterizar de *P. fluorescens* PfO-1 (76%), *P. syringae* (76%) y *P. aeruginosa* (67%). En lo referente a la composición de aminoácidos, la lisina era el aminoácido más abundante (10,9%) y los aminoácidos cargados (D, E, K y R) sumaban el 23,1% del total. Estos datos se recogen en la Tabla C.I.3.

TABLA C.I.3. Marcos de lectura abiertos encontrados en la región de 10.5 kb del cromosoma de *P. putida* KT2440 que flanquean los genes *hlpB* y *hlpA*. Se indica el número de asignación de dichas *orf*, el tamaño, el número de acceso a la base de datos de GenBank y la posible función.

<i>orf</i>	PP	Tamaño (aa)	Homólogos	% de identidad	Nº de acceso (GenBank/GI)
<i>orf1</i>	PP1452	178	ADP-ribosa pirofosfatasa	76%	48732632
<i>orf2</i>	PP1451	185	Proteína hipotética	64%	AAO54982.1
			Posible lipoproteína	43%	AAR33516.1
<i>orf3</i>	PP1448	204	Proteína hipotética	61%	48730260
			Posible regul. integral de membrana	31%	21222000
<i>orf4</i>	PP1447	81	Proteína hipotética	76%	AAY38959.1

CAPÍTULO II

EXPRESIÓN GÉNICA

RESUMEN

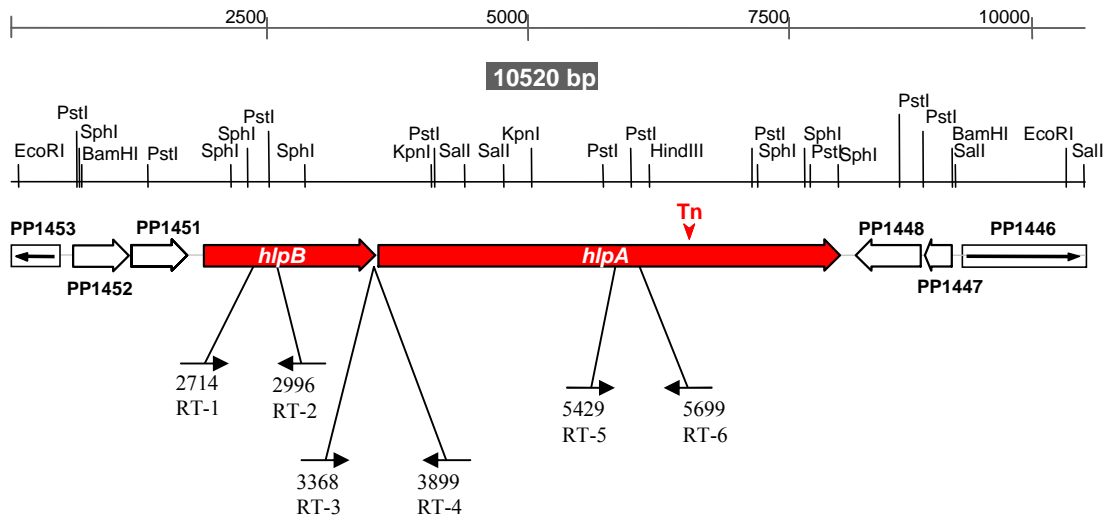
Los genes *hlpBA* forman un operón que se expresa a niveles relativamente altos cuando los cultivos entran en fase estacionaria. El análisis de fusiones transcripcionales de los genes *hlp* de *P. putida* al gen *lacZ* de *E. coli* reveló que éstos estaban organizados en una unidad transcripcional: *hlpB-hlpA*, bajo el control del promotor P_{hlp} . Adyacentes al operón *hlpBA* se identificaron dos marcos de lectura abiertos (que denominamos *orf1* y *orf2*) que se transcriben también en la misma dirección. Estos dos ORFs forman parte de la misma unidad transcripcional. Estos resultados se complementaron mediante análisis de RT-PCR y estudios de expresión. El sitio de iniciación de la transcripción de esta unidad transcripcional se determinó mediante análisis de extensión de ARN a partir de cebadores específicos y se localizó aproximadamente 25 pb en sentido 5' del codón iniciador del gen *orf1*. Las regiones -10 y -35 de dicho promotor presentaron gran similitud con las secuencias consenso definidas para los promotores reconocidas por el factor de transcripción σ^{70} . Por otro lado, se analizó la expresión de los genes *hlp* en distintas condiciones de crecimiento, encontrándose la mayor expresión de estas proteínas en fase estacionaria de crecimiento.

EXPRESIÓN GÉNICA

1. ANÁLISIS DE LA ORGANIZACIÓN TRANSCRIPCIONAL DE LOS GENES *hlpBA* DE *P. putida* KT2440 MEDIANTE RT-PCR.

La corta distancia (30 nucleótidos) entre el extremo 3' del gen *hlpB* y el codón de inicio de *hlpA*, y la ausencia de secuencias que pudieran corresponder a un terminador entre ambos genes, sugiere que la agrupación génica *hlpB* y *hlpA* de *P. putida* se transcribían formando parte de una misma unidad transcripcional, *hlpBA*, tal como ocurre en otros genes de esta familia TPS. Con objeto de confirmar esta organización transcripcional se realizaron ensayos de RT-PCR mediante amplificación de ADNc obtenidos por retrotranscripción de ARN total (aislado de cultivos crecidos en LB de la cepa *P. putida* KT2440) con cebadores adecuados (ver apartado 9.10 de la sección de *Materiales y Métodos*). En el ensayo se usaron tres parejas de oligonucleótidos diferentes, tal como se muestra en la Figura C.II.1, diseñados para amplificar regiones internas de la secuencia codificante de *hlpB* (302 pb; RT-1 y RT-2) y *hlpA* (288 pb; RT-5 y RT-6) y la región intergénica entre ambos genes (549 pb; RT-3 y RT-4). El producto de PCR se analizó por electroforesis en gel de agarosa al 1,5% (p/v). Se observaron bandas con el tamaño predicho a partir de la secuencia de ADN, indicando que estos genes se transcriben en un solo ARN mensajero. Los resultados de la reacción de RT-PCR se muestran en la Figura C.II.1-B donde se analizó la cepa silvestre (calles de 2 a 4). Con las tres parejas de oligos se obtuvieron bandas de ADNc del tamaño esperado en la cepa silvestre. Los controles negativos, en los que no se añadió la retrotranscriptasa, no mostraron amplificación alguna, indicando la ausencia de ADN contaminante en la reacción. Estos resultados confirmaban que los genes *hlpBA* formaban un operón.

A



B

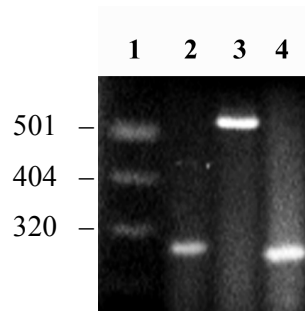


Figura C.II.1. Análisis mediante RT-PCR de la organización transcripcional de los genes *hlpBA* en *P. putida* KT2440. **A.** Localización de los genes *hlpBA* y de los oligonucleótidos usados para la amplificación del ARNm en el ensayo de RT-PCR. Los números debajo de los cebadores indican su posición en la secuencia de ADN de los genes *hlpBA* conforme a la Figura C.I.2. **B.** Electroforesis del ADNc amplificado usando como molde RNA de KT2440 (calles de 2 a 4) y oligos diseñados para amplificar RNAm correspondiente a *hlpB* (calle 2), la región intergénica *hlpB-hlpA* (calle 3) y *hlpA* (calle 4). Calle 1: marcador de peso molecular VIII de Roche. En el margen izquierdo se indican los tamaños correspondientes de las bandas del marcador de peso molecular más cercanas a las de las bandas amplificadas en el ensayo. Como control negativo se realizó la RT-PCR de muestras que contenían la misma cantidad de ARN total, de cebadores y la enzima *Taq* polimerasa, pero sin la enzima transcriptasa reversa. En estas reacciones no se obtuvo ningún producto de amplificación (no mostrado).

2. ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DE LOS GENES *hlpBA* EN *P. putida* KT2440

Con objeto de caracterizar el funcionamiento del operón *hlpBA* en *P. putida* KT2440 se diseñaron una serie de experimentos encaminados al estudio de la transcripción del operón. Como primer paso, se determinaron los niveles de ARN mensajero y el punto de inicio de la transcripción mediante *primer extension*. Posteriormente se realizaron fusiones transcripcionales con el gen marcador '*lacZ*, y se midió la actividad β -galactosidasa en distintas condiciones.

2.1. Identificación del promotor P_{hlp} mediante determinación de los niveles de ARN mensajero (*primer extension*)

Para definir la región promotora y determinar el posible punto de iniciación de la transcripción de los genes *hlpBA*, se realizaron ensayos de extensión de ARN a partir de varios cebadores. La cepa *P. putida* KT2440 se cultivó en medio LB líquido a 30°C hasta alcanzar la fase de crecimiento estacionaria, momento en el que se recogieron las células y se aisló el ARN total tal y como se detalla en el apartado 16.1 de *Materiales y Métodos*. Se usaron como molde 25 μ g de ARN total para la extensión reversa a partir de los cebadores PE-1 y PE-2 marcados radiactivamente en sus extremos 5' (el marcaje del oligonucleótido y la extensión del ARN se realizaron como se describe en los apartados 10.1 y 10.2, respectivamente, de la sección *Materiales y Métodos*). Estos cebadores se localizaron a 75 pb del punto de inicio de la traducción de la *orf* PP1450 (*hlpB*) y de la *orf* PP1449 (*hlpA*), ambos complementarios a la secuencia codificante (Figura C.II.2-A). El análisis de extensión de cadena a partir de estos cebadores no nos mostró ninguna banda de ADNc lo que sugería que la región promotora estaba más arriba. La región intergénica entre la *orf* PP1452 y PP1451 es también muy pequeña, por lo que probablemente el promotor debería estar más arriba de PP1452. Igualmente se diseñó un cebador PE localizado a 25 pb del codón de inicio de la traducción de la *orf* PP1452 situada en sentido 5' del gen *hlpB* y fue complementario a la secuencia codificante de esta. Se marcó radiactivamente en su extremo 5' de igual manera que los anteriores y se realizó la electroforesis desnaturizante en gel de poliacrilamida del ADNc obtenido tras la extensión. El análisis de extensión de cadena a partir del cebador PE, nos permi-

tió identificar una banda de ADNc de unos 160 pb de tamaño y otra más intensa de menor tamaño (~147 pb) (Figura C.II.2-B). La presencia de dos bandas en este ensayo puede indicar la existencia de dos promotores diferentes, pero también podría ser que la banda menor de ADNc, sea producto de degradación de la mayor.

Basándonos en el tamaño del producto del ADNc obtenido de la muestra de ARN de la cepa parental, y analizando la secuencia de dicha región en busca de posibles promotores. Se identificó una región -10 con una secuencia (5'-TATCCA-3') con un alto grado de similitud con la región -10 típica (5'-TATAcT-3') para promotores de *P. putida* KT2440 reconocidas por el factor de transcripción σ^{70} (Domínguez y Marqués, 2004). A su vez, la posible región -35 (5'-TCGTCC-3') también está bastante conservada con respecto a la propuesta para σ^{70} (5'-TTGAcC-3') en este microorganismo. La región promotora recién definida se denominó P_{hip} . Se dedujo que el punto de iniciación de la transcripción podría corresponder a la base T_{500} de la secuencia que se muestra en la Figura C.I.2 para el promotor denominado P_{hip} . Este punto +1 coincide con el tamaño de la banda de mayor intensidad. No se encontró ninguna otra secuencia que pudiera corresponder a un segundo promotor en esta región, aunque no se puede descartar su existencia.

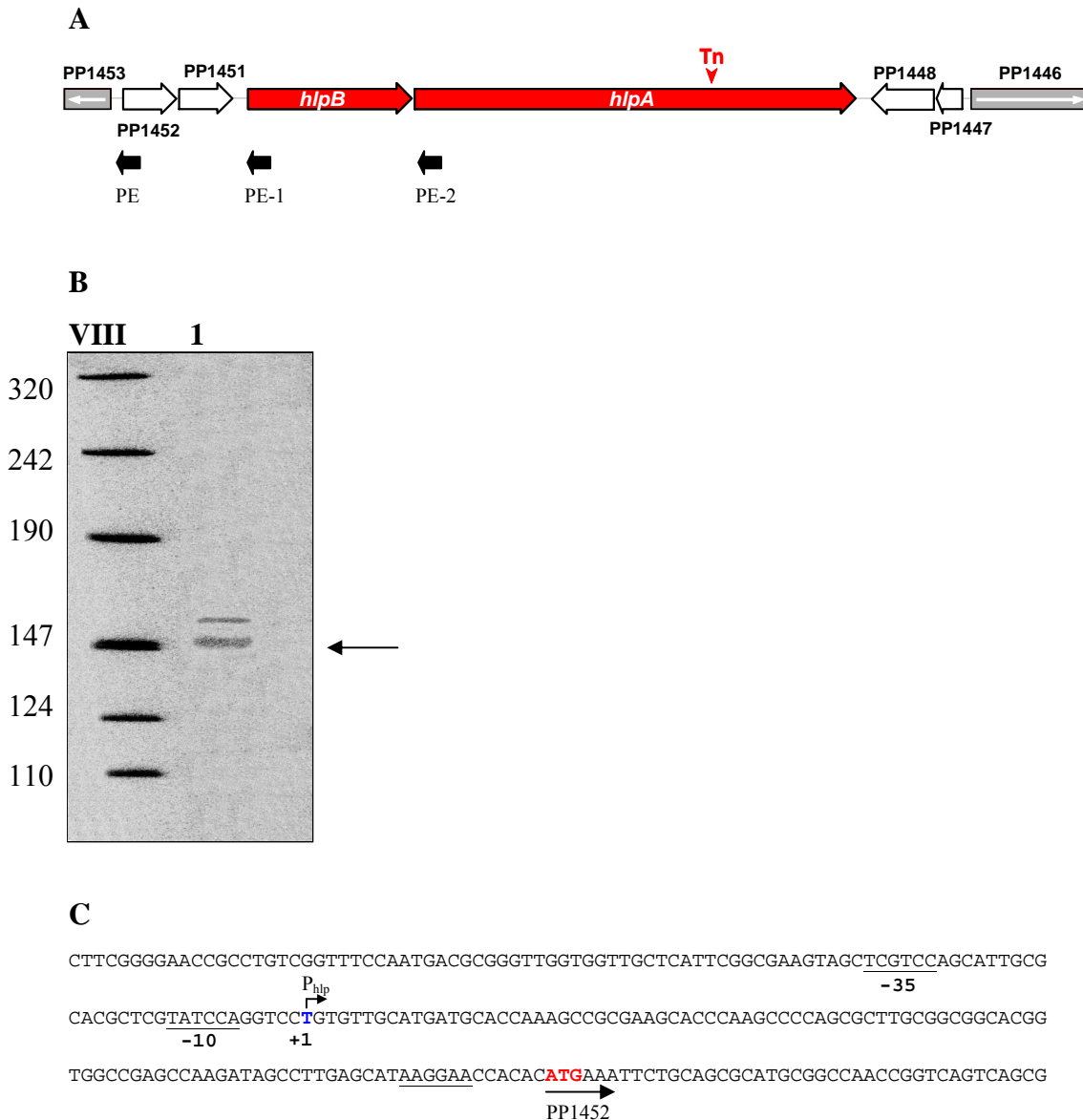


Figura C.II.2. Determinación de la región promotora de los genes *hlpBA* de *P. putida* KT2440. **A.** Localización de los oligonucleótidos (flechas negras) para la determinación de los niveles de ARNm. **B.** Células de *P. putida* KT2440 se cultivaron en medio LB líquido a 30°C con agitación hasta la fase de crecimiento estacionaria. Muestras de 25 µg de ARN total aislado se extendieron con el cebador PE marcado radiactivamente en su extremo 5' como se describió en el apartado 10.1 de la sección de *Materiales y Métodos*. En el margen izquierdo de la figura se indican los tamaños correspondientes al marcador de peso molecular VIII en pb. La flecha situada a la derecha de la figura indica el producto de ADNc derivado del punto de iniciación de la transcripción de *hlpBA*. La banda que aparece de tamaño mayor que 150 pb, podría corresponder a la existencia de un posible promotor aún sin definir. **C.** Secuencia de ADN de la región promotora de *hlpBA*. El punto de inicio de la transcripción está en azul para P_{hlp} y la flecha indica el sentido de la transcripción del gen *orf* PP1452. Localización de las regiones -10 y -35 del promotor P_{hlp}.

Para confirmar que el promotor identificado era responsable de la transcripción de *hlpBA*, y que ambos genes formaban un operón con *orf1* y *orf2*, se realizó un ensayo de RT-PCR a partir de ARN total aislado de la cepa *P. putida* KT2440. En el ensayo se usaron una parejas de oligonucleótidos diferentes (m27-1 y pMP-1), tal como se muestra en la Figura C.II.3-A, diseñados para amplificar una región intergénica entre el gen *hlpB* y la secuencia codificante de PP1451 (situada en sentido 5' con respecto a *hlpB*), y de un tamaño de 718 pb. Se observó, tras la electroforesis en gel de agarosa al 1,5% (p/v), una banda con el tamaño esperado para el producto de la amplificación, por lo que pudimos corroborar que el promotor se encontraba más arriba del marco abierto de lectura *orf2* (Figura C.II.3-B) y que por tanto los cuatro genes (PP1452, PP1451, *hlpB* y *hlpA*) forman una sola unidad transcripcional.

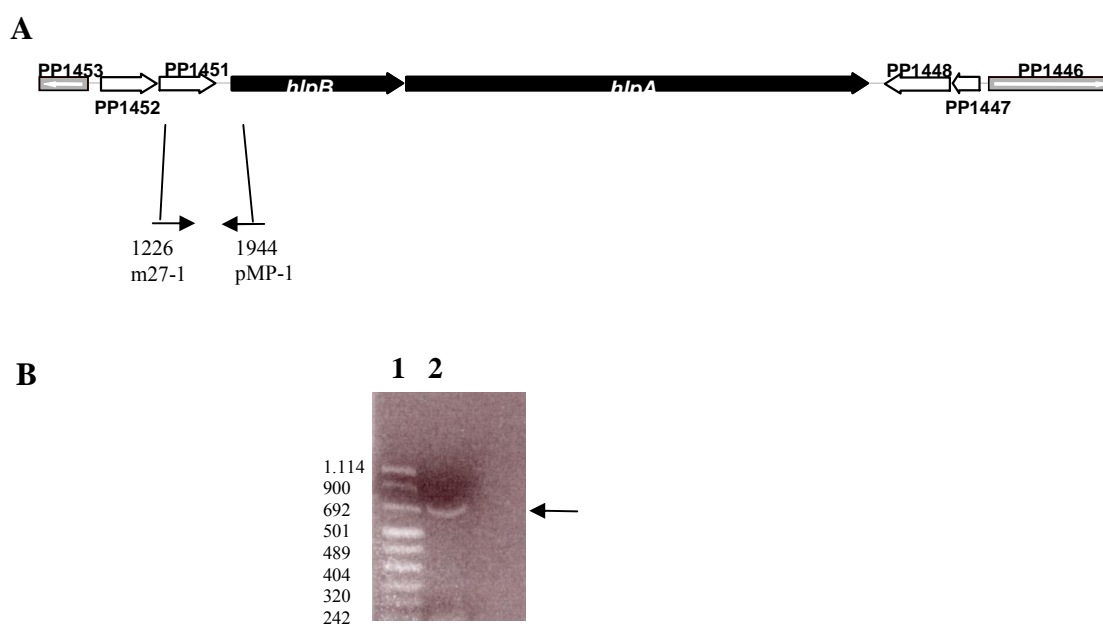


Figura C.II.3. Localización mediante RT-PCR de la existencia de una región promotora aguas arriba del gen *hlpB* en *P. putida* KT2440. **A.** Localización de los oligonucleótidos usados para la amplificación del ARNm en el ensayo de RT-PCR. Los números debajo de los cebadores indican su posición en la secuencia de ADN de los genes conforme a la Figura C.I.2. **B.** Electroforesis del ADNc amplificado usando como molde RNA de KT2440 (calle 2) y oligos diseñados para amplificar RNAm correspondiente a la región que se encuentra en sentido 5' con respecto al gen *hlpB*. Calle 1: marcador de peso molecular VIII. En el margen izquierdo se indican los tamaños correspondientes de las bandas del marcador de peso molecular VIII en pb.

2.2. Caracterización de la expresión del operón *hlpBA* mediante determinación de la actividad β -galactosidasa en fusiones transcripcionales con el gen '*lacZ*.

2.2.1. Construcción de la fusión transcripcional del promotor de los genes *hlpB* y *hlpA* con el gen marcador '*lacZ*.

Como se ha mencionado con anterioridad, los sistemas TPS en bacterias gram-negativas constan de dos genes estructurales, *tpsB* y *tpsA*, los cuales se transcriben en la misma dirección a partir de la región de ADN situada corriente arriba del extremo 5' del gen *tpsB* (Jacob-Dubuisson *et al.*, 2001).

Dado que la organización genética del operón *hlpBA* en *P. putida* es similar a la de este grupo de bacterias se pensó que la región situada corriente arriba del extremo 5' del gen *hlpB* debía contener la región promotora de ambos genes. Sin embargo, los datos de los apartados anteriores indicaban que el promotor estaba aguas arriba de PP1452.

Para el estudio de la expresión de los genes del operón *hlpBA* se construyó una fusión transcripcional de la región situada en sentido 5' de PP1452 al gen '*lacZ* de *E. coli* desprovisto de promotor en el plásmido pMP220, generándose así el plásmido **pNEMO5**. La región promotora se obtuvo a partir de ADN cromosómico de *P. putida* KT2440 mediante amplificación por PCR con los cebadores PRO-1 y PROM-2. Estos cebadores presentan sitios de restricción *EcoRI* y *KpnI*, respectivamente, con objeto de facilitar la clonación del fragmento amplificado. Tras la amplificación por PCR de la región comprendida entre los cebadores PRO-1 y PROM-2 con una temperatura de hibridación de 65°C, se obtuvo un fragmento de aproximadamente 1,8 kb, el cual se digirió con *EcoRI* y *PstI* para obtener un fragmento de 534 pb (Figura C.II.4). Dicho fragmento se ligó al vector pMP220 previamente digerido con las mismas enzimas, y el producto de la ligación se transformó en *P. putida* mediante electroporación, tras lo cual las células se sembraron en placas de medio rico LB con tetraciclina y X-Gal. Después de 12 horas de incubación a 30°C se seleccionaron, para su posterior análisis, aquellas colonias que presentaban una coloración azul consecuencia de la expresión del gen *lacZ*.

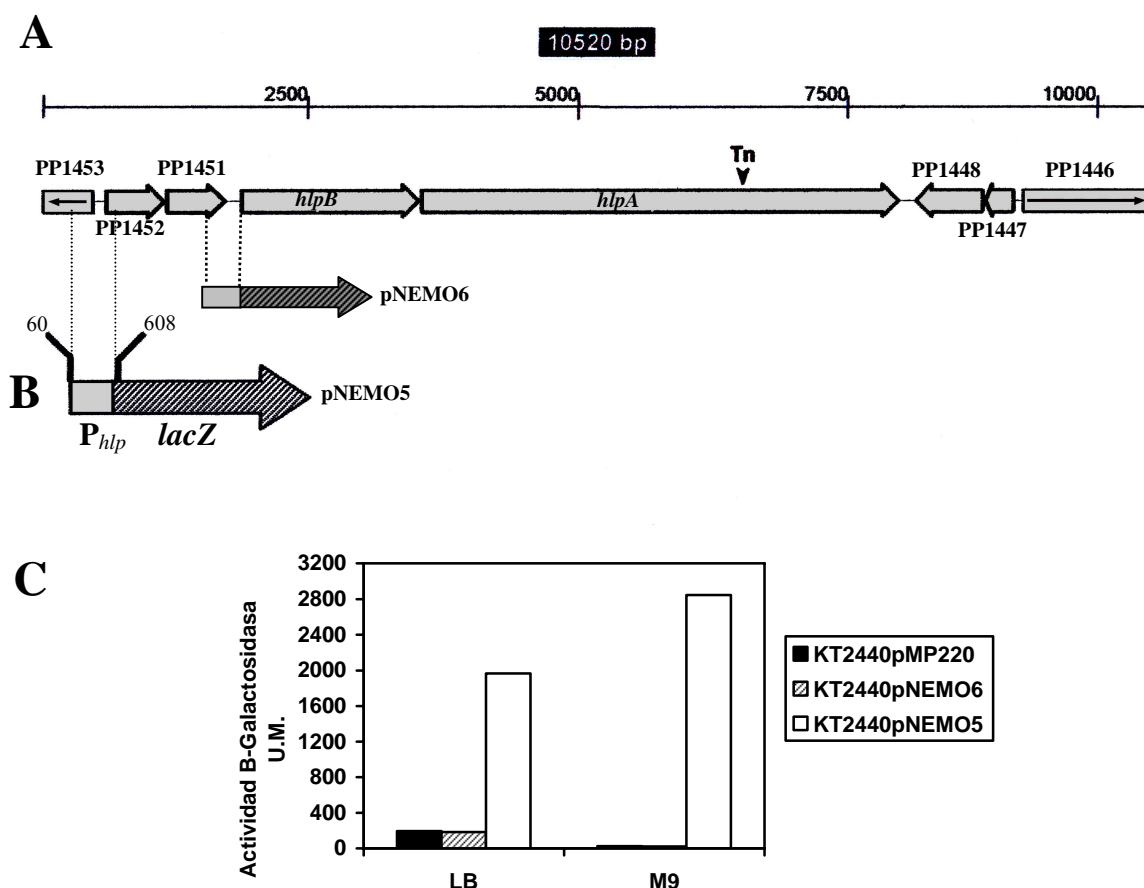


Figura C.II.4: A y B: Mapa de la agrupación génica *hlpBA* de *P. putida* KT2440 y de la posición de la fusión transcripcional al gen *lacZ*. A. Mapa de la región de 10.520 pb del fragmento de ADN del cromosoma de *P. putida* que contiene el conjunto de genes *hlpBA*. Las flechas grises indican la posición de los genes *hlpBA*, su tamaño y el sentido de su transcripción. B. Diagrama de la fusión transcripcional construida para el estudio del promotor de los genes *hlpBA*. El rectángulo gris indica la posición de la región de ADN amplificada para el diseño del plásmido pNEMO5 y pNEMO6. La flecha rayada representa el gen *lacZ* sin promotor del plásmido pMP220. C: **Ensayo de la actividad β -galactosidasa del plásmido pNEMO6 y pNEMO5 en *P. putida* KT2440.** Células de *P. putida* KT2440 portando el plásmido pNEMO6 (barras rayadas) y pNEMO5 (barras blancas) se cultivaron en medio LB y M9 líquido con 20 μ g/ml de tetraciclina a 30°C con agitación. Como control negativo se usaron células de *P. putida* KT2440 portando el plásmido pMP220 (barras negras). La actividad β -galactosidasa se determinó a las 10-12 horas, estando las células en fase estacionaria de crecimiento. La actividad se expresa en Unidades Miller, y los valores son el resultado de una media procedente de tres ensayos independientes.

Para confirmar una vez más la existencia de un solo promotor, se construyó una fusión transcripcional de la región intergénica del gen *hlpB* y PP1451, generándose así el plásmido pNEMO6 (Figura C.II.4-B). La región se obtuvo a partir de ADNromo-

sómico de *P. putida* KT2440 mediante amplificación por PCR con los cebadores m27-1 y pMP-1. Ambos cebadores presentan un sitio de restricción *EcoRI* y *SphI* respectivamente con objeto de facilitar la clonación del fragmento amplificado. Tras la amplificación por PCR de la región comprendida entre los cebadores m27-1 y pMP-1 con una temperatura de hibridación de 65°C, se obtuvo un fragmento de 738 pb. Dicho fragmento se ligó al vector pMP220 previamente digerido con las mismas enzimas generándose así el plásmido pNEMO6. La construcción se transfirió a *P. putida* KT2440 mediante electroporación, y la expresión de dicha fusión se analizó midiendo su actividad β -galactosidasa. La expresión desde esta posible región promotora, cuantificada como actividad β -galactosidasa en células cultivadas en medio LB líquido y medio M9 fue nula, tal y como se muestra en la Figura C.II.4-C presentando un nivel de expresión idéntico al del plásmido pMP220 sin promotor. Estos resultados, junto con los de RT-PCR, permitieron concluir que *hlpB-hlpA* forman un operón con los genes PP1452 y PP1451, donde la expresión de dicho transcrito tiene lugar a partir de un solo promotor en 5' con respecto a PP1452.

2.2.2. Estudio de la expresión del promotor P_{hlp} en diferentes medios.

La expresión desde el promotor de *hlpBA*, cuantificada como actividad β -galactosidasa de la fusión pNEMO5 en células cultivadas en medio LB líquido, alcanzó un valor máximo de 2.000 unidades Miller, coincidiendo siempre su inducción con la entrada del cultivo en fase estacionaria.

Por otro lado, la síntesis de Sh1A y otras hemolisinas de esta familia está regulada por hierro (Poole and Braun, 1988; Hirono *et al.*, 1997) por lo que decidimos analizar si la concentración de hierro en el medio de cultivo ejercía algún efecto sobre la expresión de los genes *hlpBA*. La expresión de estos genes se analizó en células de *P. putida* KT2440 portando el plásmido pNEMO5 cultivadas en medio mínimo M9 y en LB con alta concentración de hierro (50 μ M FeCl₂) o con limitación de hierro por la adición del quelante de hierro 2,2'-bipiridina (0,5 mM). La expresión desde el promotor de los genes *hlpB* y *hlpA* de *P. putida* fue similar en medio con alta y baja concentración de hierro. En la

Figura C.II.5. se muestra el efecto de la fase de crecimiento (Figura C.II.5-A) y de la concentración de hierro (Figura C.II.5-B) en la expresión de los genes *hlpB* y *hlpA* de *P. putida* KT2440 cuando se cultivó en medio LB. Se obtuvieron los mismos resultados cuando se cultivó en medio mínimo M9 con benzoato como fuente de carbono (Figura C.II.6.).

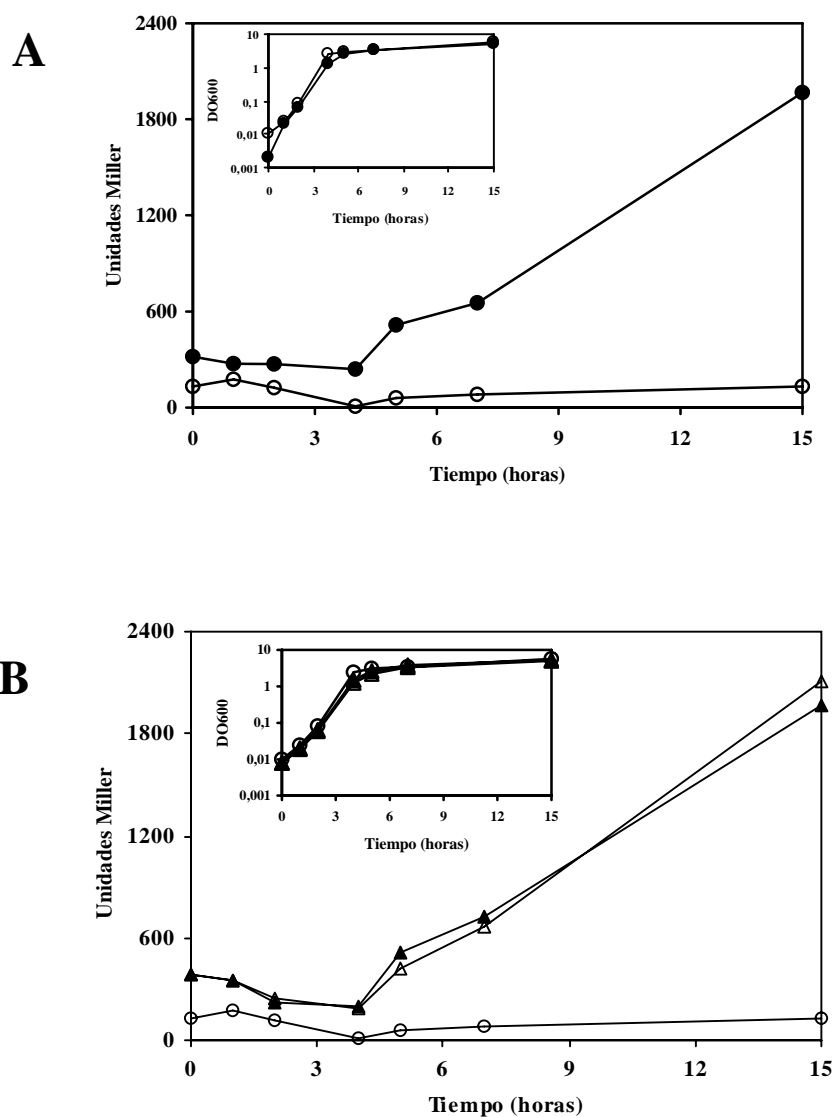


Figura C.II.5: Efecto de la fase de crecimiento (A) y de la concentración de hierro (B) en la expresión de los genes *hlpB* y *hlpA* de *P. putida* KT2440. A. Células de *P. putida* KT2440 portando el plásmido pNEMO5 (círculos cerrados) se cultivaron en medio LB líquido con 20 $\mu\text{g/ml}$ de tetraciclina a 30°C con agitación. Se recogieron fracciones alícuotas de 50 μl del cultivo a distintas DO_{600} , con las que se determinó la actividad β -galactosidasa. Como control negativo se usaron células de *P. putida* KT2440 portando el plásmido pMP220 (círculos abiertos). **B.** Células de *P. putida* KT2440 portando el plásmido pNEMO5 se cultivaron en medio LB líquido suplido con 50 μM de FeCl_2 (triángulos cerrados) o con 0,5 mM de 2,2'-bipiridina (triángulos abiertos) y se determinó la actividad β -galactosidasa. Células de *P. putida* KT2440 portando el plásmido pMP220 se usaron como control negativo (círculos abiertos).

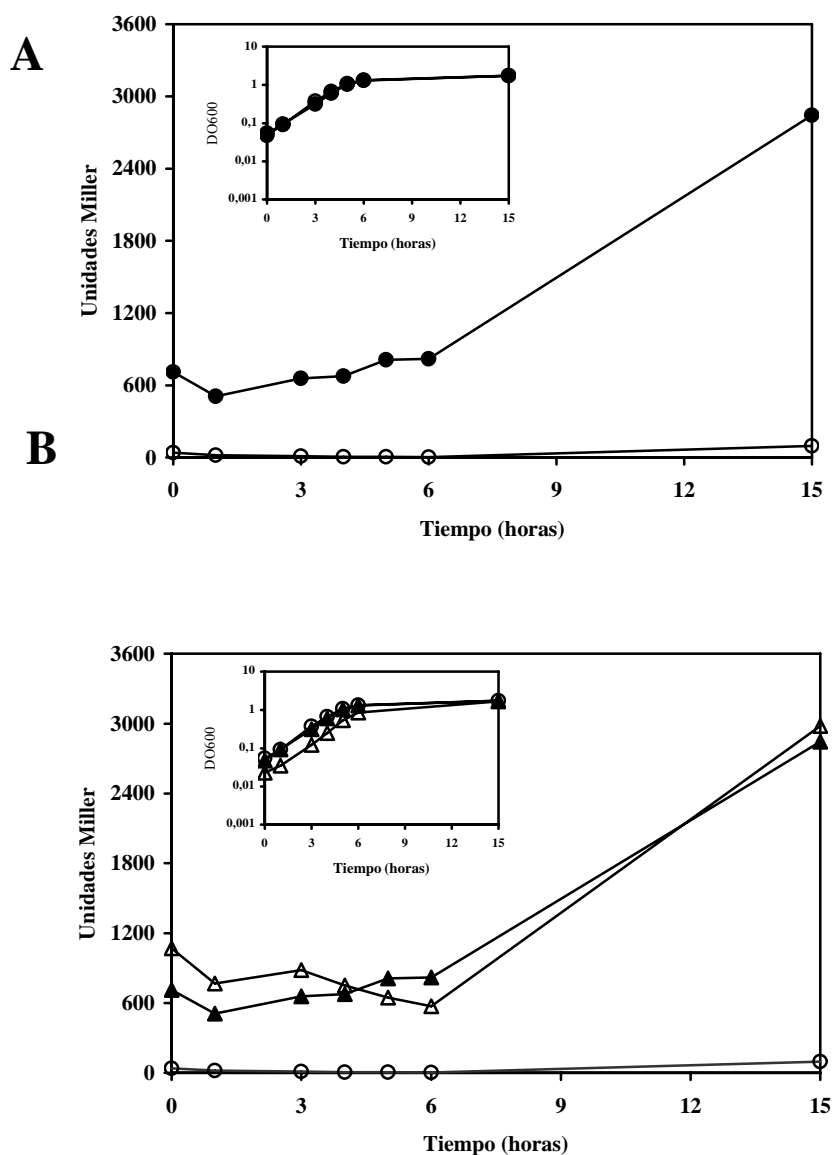


Figura C.II.6: Efecto de la fase de crecimiento (A) y de la concentración de hierro (B) en la expresión de los genes *hlpB* y *hlpA* de *P. putida* KT2440. A. Células de *P. putida* KT2440 portando el plásmido pNEMO5 (círculos cerrados) se cultivaron en medio M9 líquido con 20 $\mu\text{g/ml}$ de tetraciclina a 30°C con agitación. Se recogieron fracciones alícuotas de 50 μl del cultivo a distintas DO_{600} , con las que se determinó la actividad β -galactosidasa. Como control negativo se usaron células de *P. putida* KT2440 portando el plásmido pMP220 (círculos abiertos). **B.** Células de *P. putida* KT2440 portando el plásmido pNEMO5 se cultivaron en medio M9 líquido suplido con 50 μM de FeCl_2 (triángulos cerrados) o con 0,5 mM de 2,2'-bipiridina (triángulos abiertos) y se determinó la actividad β -galactosidasa. Células de *P. putida* KT2440 portando el plásmido pMP220 se usaron como control negativo (círculos abiertos).

En un trabajo anterior, Godoy *et al.*, (2004) habían construido y caracterizado un mutante llamado PSC209 de la cepa *P. putida* KT2440 afectado en el sistema TonB (formado por los genes *exbB*, *exbD* y *tonB*). El sistema *exbBDtonB* está implicado en la adquisición de hierro en *P. putida* KT2440, como se deduce del hecho de que algunos aspectos del fenotipo pleitrópico de clones afectados en este sistema quedaban restaurados con un suplemento adicional de hierro, y como es también el caso en otras bacterias gramnegativas (Braun, 1995; Visca *et al.*, 2002). Además de su papel en la adquisición de hierro, TonB participa en otros procesos, como resistencia a disolventes y antibióticos a través de la actividad de bombas de eflujo (Zhao *et al.*, 1998; Godoy *et al.*, 2001, 2004). Mutantes de *P. putida* y *P. aeruginosa* en *exbB*, *exbD* o *tonB* mostraron una reducida captación de hierro y su crecimiento era limitado severamente en medio deficiente de hierro (Poole *et al.*, 1996; Godoy *et al.*, 2001, 2004).

Puesto que determinadas hemolisinas de esta familia están reguladas por hierro (Poole and Braun, 1988; Hirono *et al.*, 1997) decidimos analizar la expresión de los genes *hlpBA* en una cepa con reducida capacidad de captación de hierro. Para comprobar la expresión de la región promotora en un mutante afectado en la adquisición de hierro, se transfirió la construcción pNEMO5 a *P. putida* KT2440 *exbBDtonB*⁻ (PSC209) mediante electroporación, y la expresión de dicha fusión se analizó midiendo su actividad β -galactosidasa. Como control se usaron células de *P. putida* KT2440 portando pNEMO5. La expresión desde esta posible región promotora, cuantificada como actividad β -galactosidasa en células cultivadas en medio LB líquido y medio M9 fue similar en ambas cepas.

2.2.3. Análisis de la participación de factores transcripcionales en la expresión de los genes *hlpBA*.

El análisis de la región en sentido 5' del punto de inicio de la transcripción reveló una elevada similitud con la secuencia consenso reconocida por el factor de transcripción σ^{70} , observándose una clara región -10 y -35.

Algunos promotores pueden transcribirse in vivo por los factores σ^{70} ó σ^{38} dependiendo de la fase de crecimiento (Jishage *et al.*, 1996; Tanaka *et al.*, 1993). El gen *rpoS* de *E. coli* codifica un factor σ alternativo de la ARN polimerasa σ^{38} que es el regulador central de la expresión de genes en fase estacionaria (Lange *et al.*, 1991). Dado que la expresión de *hlp* se inducía al inicio de la fase estacionaria de crecimiento, una característica propia de los promotores σ^{38} dependientes, se decidió comprobar si el factor σ^{38} intervenía en la transcripción de los genes *hlpBA*. Para ello se empleó la cepa *P. putida* C1R1, un mutante en el gen *rpoS* de *P. putida* KT2440, y por tanto deficiente en σ^{38} (Ramos-González *et al.*, 1998). Se transfirió el plásmido pNEMO5 a la cepa *P. putida* C1R1 mediante electroporación, y la expresión de dicha fusión se analizó midiendo su actividad β -galactosidasa en dicha cepa a distintos tiempos (como control negativo se usó *P. putida* C1R1 con pMP220).

La expresión desde el promotor P_{hlp} de los genes *hlpBA* de *P. putida* cuando se cultivó en LB fue similar en la cepa *P. putida* C1R1 (mutante *rpoS*) y en el silvestre, como se muestra en la Figura C.II.7. Se obtuvieron los mismos resultados cuando se cultivó en medio M9. A la vista de los resultados se concluyó que el comportamiento del promotor en el fondo genético del mutante *rpoS* no difiere del silvestre y, por tanto, la expresión de este promotor es independiente de dicho factor sigma para el inicio de la transcripción.

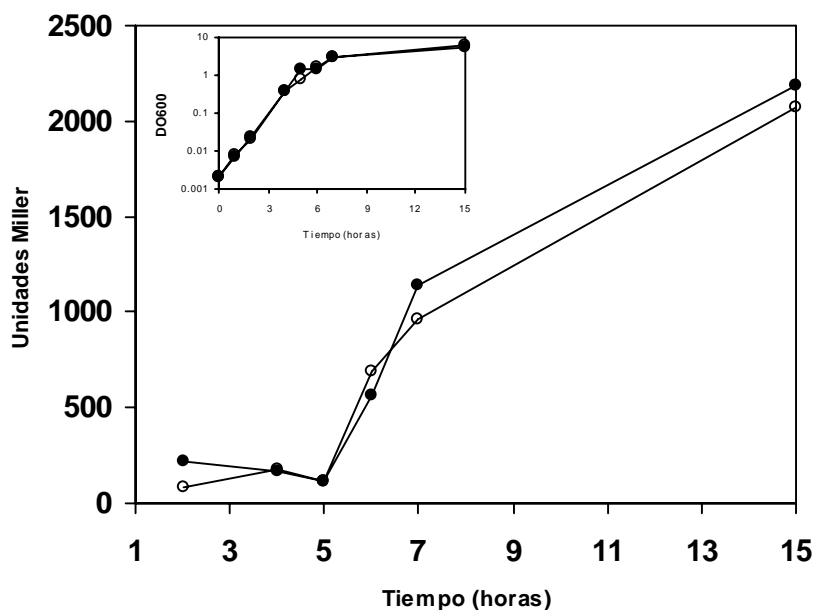


Figura C.II.7: Efecto de la participación de factores transcripcionales en la expresión de los genes *hlpB* y *hlpA* de *P. putida* KT2440. Células de *P. putida* KT2440C1R1 portando el plásmido pNEMO5 (círculos abiertos) se cultivaron en medio LB líquido con 20 $\mu\text{g/ml}$ de tetraciclina a 30°C con agitación. Se recogieron fracciones alícuotas de 50 μl del cultivo a distintas DO_{600} , con las que se determinó la actividad β -galactosidasa. Como control negativo se usaron células de *P. putida* KT2440 portando el plásmido pNEMO5 (círculos cerrados).

2.2.4. Estudio de la inducción de la expresión de los genes *hlpB* y *hlpA* en respuesta a exudados de semillas de maíz.

Como se mencionó en la Introducción, las semillas y raíces de plantas exudan una compleja mezcla de compuestos orgánicos. Para comprobar si la producción de exudados por semillas de maíz daba lugar a la inducción de la expresión de los genes *hlpBA* de *P. putida* KT2440, se realizó un análisis de la expresión de los genes *hlpBA* en células expuestas a exudados de semillas de maíz obtenidos de cultivos hidropónicos como se menciona en el apartado 18 de *Materiales y Métodos*.

La cepa *P. putida* portando pNEMO5 se cultivó en medio LB con tetraciclina. Tras 3 horas de agitación a 30°C los cultivos se dividieron en dos fracciones alícuotas de 10 ml, a una de las cuales se le añadió 5 ml de exudados de semillas de maíz y a la otra alícuota 5 ml de H_2O como control. Una hora después de la adición se determinó la actividad β -galactosidasa de los dos cultivos (Figura C.II.8.) y sucesivamente hasta que las células se encontraban en fase estacionaria de crecimiento. Se observó que en aque-

llos casos donde no se añadió exudado la actividad β -galactosidasa fue de 2.600 U.M., mientras que en presencia de estos exudados fue de 3.284 U.M. tras 19 horas de crecimiento. Estos resultados sugieren que la adición de exudados de semillas de maíz al medio de cultivo afecta ligeramente a la expresión de los genes *hlpBA*, observándose un pequeño aumento de actividad en fase estacionaria cuando se cultivan en presencia de estos. Se obtuvieron los mismos resultados cuando se cultivó en medio M9.

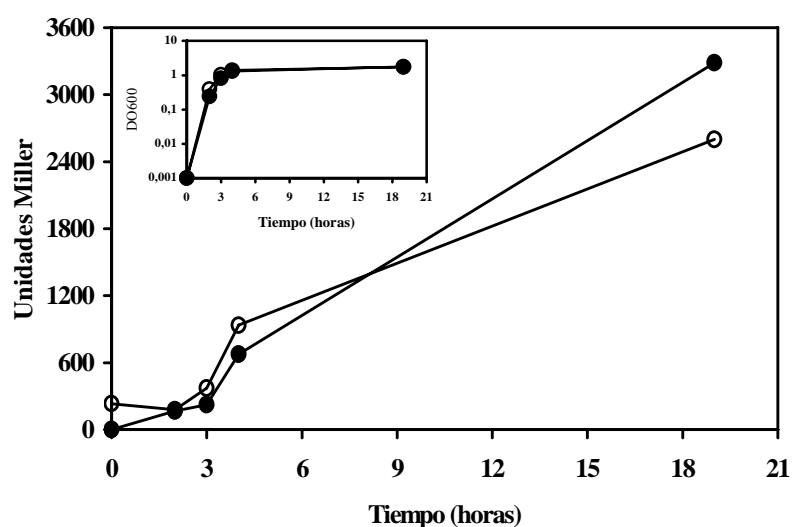


Figura C.II.8: Efecto del exudado de semillas de maíz en la expresión de los genes *hlpB* y *hlpA* de *P. putida* KT2440. Se muestra la actividad β -galactosidasa de cepas de *P. putida* KT2440 portadoras del plásmido pNEMO5 cultivadas en medio LB en presencia de exudado de semillas de maíz (círculos cerrados) Se recogieron fracciones alícuotas de 50 μ l del cultivo a distintas DO_{600} , con las que se determinó la actividad β -galactosidasa. Como control se usaron células de *P. putida* KT2440 portando el plásmido pNEMO5 cultivadas en LB en presencia de agua (círculos abiertos).

Por último, se realizó un análisis de la expresión de los genes *hlpBA* en células expuestas a exudados radiculares de maíz obtenidos de cultivos hidropónicos como se menciona en el apartado 18 de *Materiales y Métodos*. Este ensayo se llevó a cabo de la misma manera que en presencia de exudados de semillas de maíz, obteniéndose los siguientes resultados. Se observó que en aquellos casos donde no se añadió exudado la actividad β -galactosidasa fue de 1.780 U.M., mientras que en presencia de estos exudados fue de 2.020 U.M. tras 19 horas de crecimiento. Estos resultados sugieren que la adición de

exudados radiculares de maíz al medio de cultivo no afecta en gran medida a la expresión de los genes *hlpBA* (Figura C.II.9).

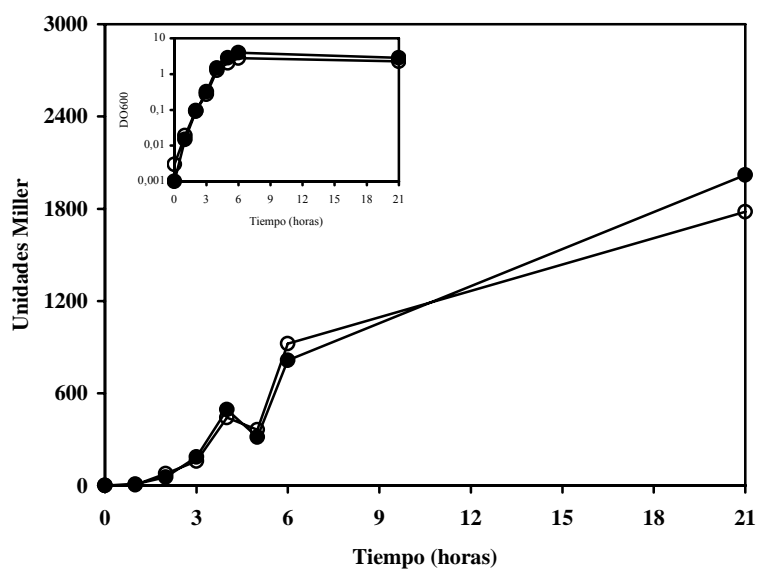


Figura C.II.9: Efecto del exudado radicular de maíz en la expresión de los genes *hlpB* y *hlpA* de *P. putida* KT2440. Se muestra la actividad β -galactosidasa de cepas de *P. putida* KT2440 portadoras del plásmido pNEMO5 cultivadas en medio LB en presencia de exudado radicular de maíz (círculos cerrados). Se recogieron fracciones alícuotas de 50 μ l del cultivo a distintas DO_{600} , con las que se determinó la actividad β -galactosidasa. Como control se usaron células de *P. putida* KT2440 portando el plásmido pNEMO5 cultivadas en LB en presencia de agua (círculos abiertos).

CAPÍTULO III

CONSTRUCCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE MUTANTES *hlp* DE *P. putida* KT2440

RESUMEN

En *P. putida* el sistema TPS descrito en este trabajo está formado por cuatro genes (en el orden *orf1-orf2-hlpB-hlpA*). Las proteínas TpsB y TpsA del complejo TPS, están presentes en un gran número de bacterias gram-negativas. Las funciones fisiológicas de estas proteínas aún no se han dilucidado en la cepa *P. putida* KT2440. Para abordar el estudio de las mismas se construyó en *P. putida* KT2440, mediante la técnica de intercambio alélico por recombinación homóloga, un mutante en el gen *hlpB*, denominado mus-28. La mutación, no polar, en el gen *hlpB* se generó por la inserción cromosómica del cassette de resistencia a kanamicina que carecía de señales de terminación de transcripción. También se llevó a cabo la construcción del mutante mus-27 complementado por un cósmido que portaba la región mutada y que llamamos pNEMO2. El fenotipo de cada una de las cepas mutantes se analizó y se comparó con el de la cepa silvestre. Los dos mutantes presentaron un fenotipo similar: mayor sensibilidad a agentes quelantes de hierro en el medio de cultivo, siendo más sensible el mutante mus-27 a la presencia del quelante 2,2-bipiridina. Además, al microscopio electrónico, se observó la formación de pequeñas vesículas que se liberan al medio extracelular, sobre todo en presencia de quelantes. Mediante ensayos de fusión con *phoA* se determinó que el gen *hlpA* codificaba una proteína que se exportaba a la envoltura celular. Mediante análisis electroforético se realizó una localización preliminar de HlpA y HlpB en la cepa silvestre y los mutantes.

CONSTRUCCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE MUTANTES *hlp* DE *P. putida* KT2440

1. CONSTRUCCIÓN DEL MUTANTE *mus-28* DE *P. putida* KT2440 Y AISLAMIENTO DEL CÓSMIDO pNEMO2

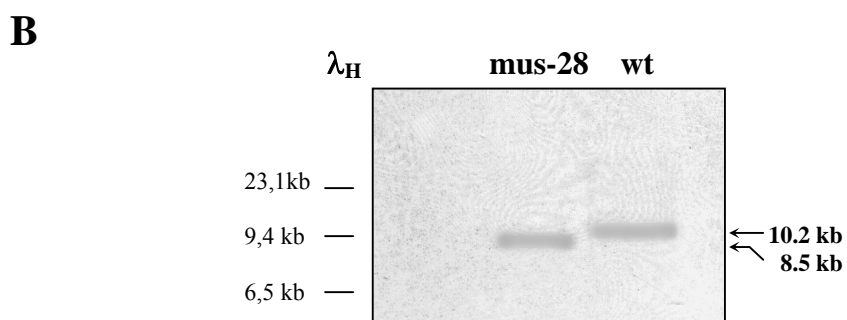
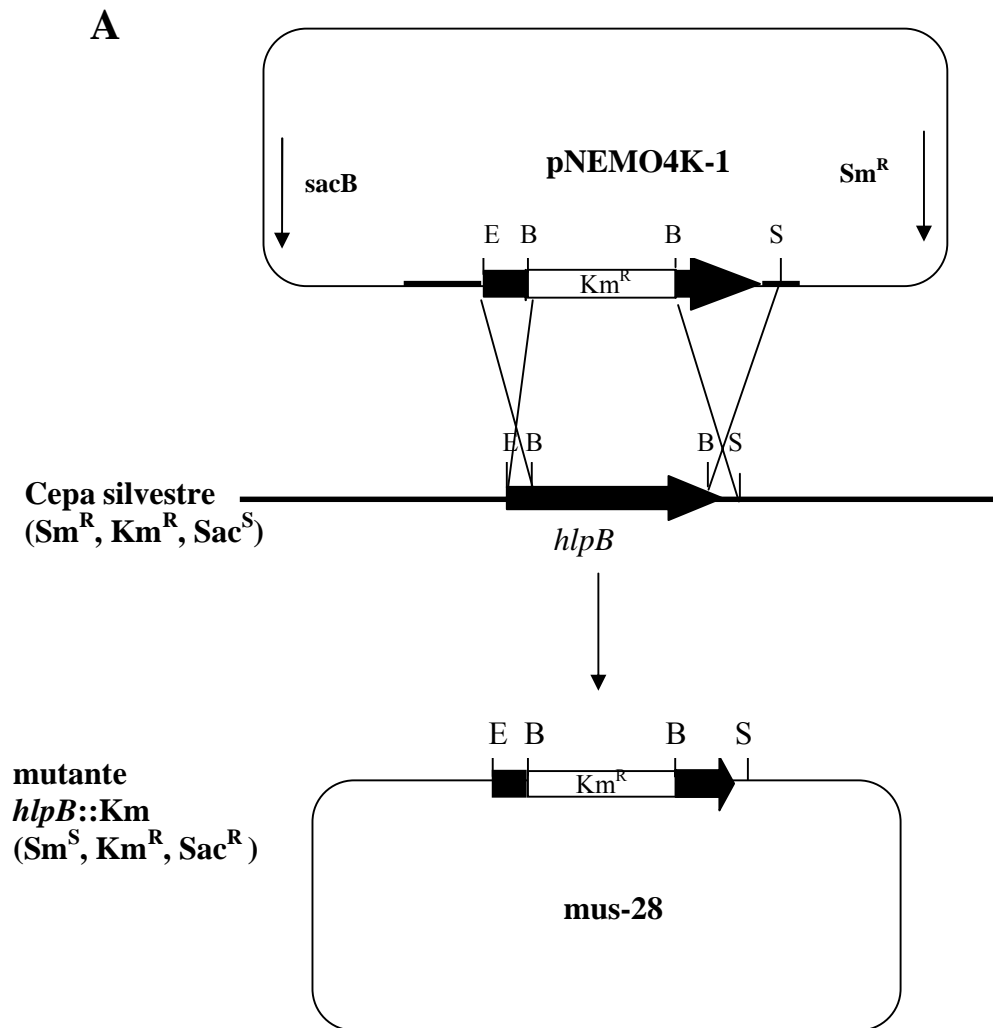
Dado que en los microorganismos mencionados anteriormente los genes correspondientes a *hlpBA* siempre se daba un agrupamiento y basándonos en que la proteína HlpB parece ser que actúa como un sistema de transporte y secreción de la proteína HlpA al medio externo, decidimos construir un mutante cromosómico en el gen *hlpB* mediante reemplazamiento génico. El tipo de mutante que se construyó fue no polar en el que se reemplazó un fragmento interno del gen por un cassette de resistencia a kanamicina que carecía de señales de terminación de transcripción. De esta manera nos asegurábamos el carácter isogénico de la cepa y que las características del mutante en *hlpB* no se deberían a la falta de HlpA.

Para la construcción por recombinación homóloga del mutante no polar de *P. putida* se utilizó el plásmido pKNG101. Este plásmido porta el gen *sacB* de *Bacillus subtilis* como marcador contra-seleccionable, lo que permite seleccionar positivamente la escisión del vector del cromosoma. Para la construcción del mutante por recombinación homóloga, se siguió el procedimiento descrito en el apartado 11 de la sección *Materiales y Métodos*. Se amplificaron por PCR dos fragmentos correspondientes a regiones corriente arriba y abajo de *hlpB* con parejas de oligonucleótidos que se diseñaron para introducir los correspondientes sitios de restricción para la clonación. Después de digerir con *EcoRI/BamHI* y *BamHI/SalI*, respectivamente, los fragmentos resultantes se clonaron en pUC18Not, generando el plásmido **pNEMO4**. Posteriormente se clonó un fragmento *BamHI* que contenía un cassette de resistencia a kanamicina del plásmido p34S-Km, en pNEMO4 para producir el plásmido **pNEMO4K**. El fragmento *hlpB::Km* se subclonó en el sitio *NotI* de pKNG101 para rendir **pNEMO4K-1**, vector incapaz de replicar en *Pseudomonas* y que permite la generación de eventos de doble recombinación los cuales se seleccionaron después de la pérdida de la resistencia a estreptomicina y del gen *sacB* contenidos en el plásmido. El plásmido suicida pNEMO4K-1 (Figura

C.III.1-A) que contiene la construcción *hlpB*::Km se transfirió a *P. putida* KT2440 por electroporación. Los clones en los que tuvo lugar la doble recombinación se seleccionaron en LB conteniendo kanamicina y sacarosa 7% (p/v), y además se probó la pérdida del plásmido en placas con estreptomicina. Los clones que fueron resistentes a kanamicina y sacarosa y sensibles a estreptomicina se comprobaron por hibridación en Southern para confirmar el reemplazamiento de *hlpB* por *hlpB*::Km. Uno de estos clones mutantes se seleccionó y se llamó **mus-28**.

En el ensayo de hibridación en Southern se utilizó ADN cromosómico de la cepa silvestre y el mutante mus-28 seleccionado que, una vez digeridos con *EcoRI*, se hibridaron con una sonda de un fragmento *EcoRI/SalI* marcado con dUTP-digoxigenina de 3,2 kb localizada entre las posiciones 1.225 y 4.457 de la secuencia génica descrita en la Figura C.I.2. El resultado esperado fue una banda de hibridación en el silvestre y mutante de distinto tamaño ya que el fragmento interno del gen que fue reemplazado por el cassette de kanamicina era de mayor tamaño, como podemos observar en la Figura C.III.1-B de la membrana de nailon. La sonda hibridó en la cepa mutante con un fragmento de *EcoRI* de 8,5 kb, correspondiente a la construcción *hlpB*::Km, mientras que en la cepa silvestre hibridó con una banda de 10,2 kb que contenía el gen *hlpB*.

➔ **Figura C.III.1: Estrategia seguida para la construcción del mutante mus-28 y análisis mediante hibridación de ADN.** (A) Pasos seguidos para el reemplazamiento génico. Paso 1: el primer hecho de recombinación se produce entre las secuencias situadas corriente arriba y abajo del cassette de kanamicina insertado en *hlpB*, y sus secuencias homólogas en el cromosoma de *P. putida* KT2440. Paso 2: se generará una cepa mutante *hlpB*::Km. La selección de resistencia a Km permite distinguir entre los mutantes y cepas de genotipo silvestre. E, *EcoRI*; B, *BamHI*; S, *SalI*; Km^R/Km^S, cepa resistente o sensible a kanamicina (50 µg/ml), respectivamente; Sm^R/Sm^S, cepa resistente o sensible estreptomicina (100 µg/ml), respectivamente; Sac^R/Sac^S, cepa resistente o sensible a sacarosa al 7% (p/v), respectivamente. La flecha negra indica el gen *hlpB*, y el rectángulo blanco el cassette de kanamicina. Las líneas negras de trazo fino indican las regiones de ADN que pertenecen al plásmido pKNG101, y las de trazo más grueso indican las regiones de ADN pertenecientes al cromosoma de *P. putida* KT2440. (B) Análisis mediante hibridación de la región de ADN donde se encuentra el gen *hlpB*. El ADN del mutante mus-28 (calle 1) y la cepa silvestre (calle 2) se digirieron con *EcoRI*, se separaron por electroforesis en gel de agarosa y se transfirieron a membrana de nailon. Como sonda se utilizó un fragmento *EcoRI/SalI* de 3,2 kb localizado entre las posiciones 1.225 y 4.457 de la secuencia génica mostrada en la Figura C.I.2 obtenido y marcado por PCR con dUTP-digoxigenina. En el margen derecho de la figura se indican los tamaños de los fragmentos obtenidos. A la izquierda de la figura se indican los tamaños correspondientes al marcador de peso molecular λ /*HindIII*(λ_H).



Para comprobar en el mutante mus-28 el reemplazamiento de *hlpB* por *hlpB::Km* y su carácter no polar (dicha mutación no afecta a la transcripción del gen *hlpA*), se realizó un ensayo de RT-PCR mediante amplificación de ADNc obtenido por retrotranscripción de ARN total aislado de células cultivadas en LB de los mutantes mus-27 y mus-28, con cebadores adecuados. Se usaron tres parejas de oligonucleótidos, los mismos que se diseñaron en el apartado 1 de la sección de Resultados del Capítulo II tal y como se muestra en la Figura C.II.1-A, diseñados para amplificar regiones internas de la secuencia codificante de *hlpB* (302 pb; RT-1 y RT-2) y *hlpA* (288 pb; RT-5 y RT-6) y la región intergénica entre ambos genes (549 pb; RT-3 y RT-4). El producto de PCR se analizó por electroforesis en gel de agarosa al 1,5% (p/v). Los resultados de la reacción de RT-PCR se muestran en la Figura C.III.2. donde se analizan el mutante mus-27 (calle de 2 a 4) y mus-28 (calle de 5 a 7). Con las tres parejas de oligos se obtuvieron bandas de ADNc del tamaño esperado en el mutante mus-27. Con los oligos RT-5/RT-6 si se obtuvo banda en el mutante mus-28, mientras que con los oligonucleótidos RT-1/RT-2 y RT-3/RT-4, las bandas obtenidas con el mutante mus-27 no se observaron en mus-28. Este resultado obtenido fue el esperado como consecuencia de la inserción del cassette de Km en el gen *hlpB*. Los controles negativos, en los que no se añadió la retrotranscriptasa, no mostraron amplificación alguna, indicando la ausencia de ADN contaminante en la reacción.

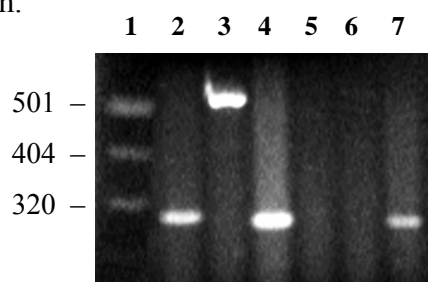


Figura C.III.2. Electroforesis del ADNc amplificado usando como molde ARN de mus-27 y mus-28. Electroforesis del ADNc amplificado usando como molde ARN de mus-27 (calle de 2 a 4) y mus-28 (calle de 5 a 7) y oligos diseñados para amplificar ARNm correspondiente a *hlpB* (calle 2 y 5), la región intergénica (calle 3 y 6) y *hlpA* (calle 4 y 7). Calle 1: marcador de peso molecular VIII de Roche. En el margen izquierdo se indican los tamaños correspondientes de las bandas del marcador de peso molecular más cercanas a las de las bandas amplificadas en el ensayo. La inserción del cassette de Km en mus-28 elimina las regiones de ADN correspondientes a los oligos RT-1, RT-2, RT-3 y RT-4, resultando la ausencia de amplificación observada en la calle 5 y 6. Como control negativo se realizó un a RT-PCR de muestras que contenían la misma cantidad de ARN total, de cebadores y la enzima *Taq* polimerasa, pero sin la

enzima transcriptasa reversa. En estas reacciones no se obtuvo ningún producto de amplificación (no mostrado).

Para poder realizar estudios de complementación se decidió rescatar la agrupación *hlpBA* de una genoteca en cósmido disponible en nuestro grupo de investigación (Ramos-González, Tesis Doctoral, 1993). Para ello se realizó un ensayo de hibridación en colonia utilizando la librería de cósmidos de *P. putida* KT2440 y como sonda un fragmento de *hlpA* obtenido y marcado por PCR con dUTP-digoxigenina para identificar clones que portaran el operón *hlpBA*. Se obtuvieron cinco cósmidos que hibridaron con la sonda, se preparó ADN cromosómico de los cósmidos y se digirieron con *EcoRI* y que tras separación electroforética en gel de agarosa (0,8%, p/v) y posterior transferencia a membranas de nailon, se realizó un ensayo de hibridación en Southern para identificar cual de ellos llevaba el operón completo *hlpBA*. Se encontraron tres cósmidos en los que aparecía una banda de hibridación de 9 kb (calles 1, 2 y 4 de la Figura C.III.3) uno con una banda de 15 kb (calle 3 en la Figura C.III.3.) y uno con dos bandas de 15 y 7,2 kb (calle 5 en la Figura C.III.3). Decidimos retener el cósmido de la calle 1, ya que presentaba el tamaño esperado.

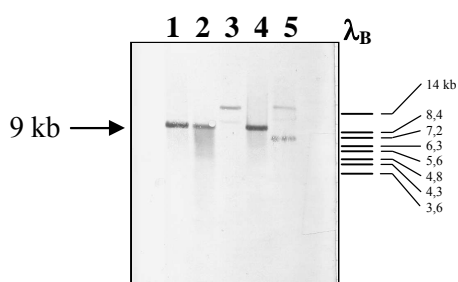


Figura C.III.3: Identificación mediante hibridación de cósmidos que portaban el operón completo *hlpBA*. Cinco cósmidos que dieron positivo se digirieron con *EcoRI*. Tras separación electroforética en gel de agarosa (0,8%, p/v) y posterior transferencia a membranas de nailon, se realizó un ensayo de hibridación en Southern para identificar cual de ellos llevaba el operón completo *hlpBA*. Se seleccionó uno que daba el tamaño esperado, el correspondiente a la calle 1. Este cósmido se llamó pNEMO2. En el margen derecho se indican los tamaños de las bandas del marcador de peso molecular λ /*BstEII* en kb.

Todos los intentos para subclonar el operón *hlpBA* en plásmidos de elevado número de copias fueron fallidos, probablemente debido a la toxicidad de los productos cuando se

sobreexpresan, como ocurre con otras proteínas de la familia como es el caso de EthA de *Edwardsiella tarda* (Hirono *et al.*, 1997). Por ello, se utilizó el cósmido, denominado **pNEMO2**, para posteriores estudios.

2. LOCALIZACIÓN SUBCELULAR DE LA PROTEÍNA HlpA.

Con objeto de determinar la localización subcelular de la proteína HlpA de la cepa *P. putida* KT2440, se generó una fusión traduccional mediante mutagénesis con el transposón mini-Tn5'*phoAKm* presente en el plásmido pUT/*phoA* (de Lorenzo *et al.*, 1990). Este sistema permite distinguir los mutantes afectados en proteínas del espacio periplásmico o de la membrana externa del resto de los mutantes, por el color azul de los primeros en presencia de BCIP (fenotipo PhoA⁺). Tras la mutagénesis se obtuvieron colonias de color azul, por lo que se pudo determinar que el gen *hlpA* codificaba una proteína que se exportaba a la envoltura celular.

Por otro lado, decidimos analizar la composición de proteínas tanto de la membrana externa como las que se liberan al medio extracelular, en la cepa silvestre y en los mutantes no polares en los genes *hlpA* y *hlpB* de *P. putida*. Las proteínas de membrana externa se aislaron tal y como se describe en el apartado 20.2 de la sección de *Materiales y Métodos*. Las proteínas se separaron electroforéticamente en gel desnaturizante de poliacrilamida y se tiñeron con azul de Coomassie (apartado 21 de la sección de *Materiales y Métodos*). En el mutante mus-27, se observó que falta una banda de un tamaño similar al esperado para HlpA, detectada en la cepa parental y mus-28, resultado que era de esperar pues en el mutante mus-27 está truncada dicha proteína. Esta banda aparece en el mutante portador del cósmido (calle 27p). En el mutante mus-28 está ausente una banda del tamaño esperado para HlpB, pero sorprendentemente aparece la banda que podría corresponder a HlpA, lo que puede deberse a que se acumule en el periplasma o bien se puede translocar a través de algún mecanismo alternativo (Figura C.III.4-A). Como aproximación para determinar si la proteína HlpA estaba correctamente plegada y expuesta en la superficie celular de los mutantes, se analizó su presencia en el sobrenadante de células cultivadas en medio LB. Las proteínas se aislaron tal y como se describe en el apartado 20.1 de la sección de *Materiales y Métodos* y se separaron elec-

troforéticamente en gel desnaturizante de poliacrilamida y se tiñeron con azul de Coomassie. Se observó que en mus-27 la proteína HlpA truncada deja de estar asociada a la superficie de la bacteria (Figura C.III.4-A) y se libera al medio (Figura C.III.4-B). Esta banda también se aprecia, aunque mucho menos intensa en mus27(pNEMO2).

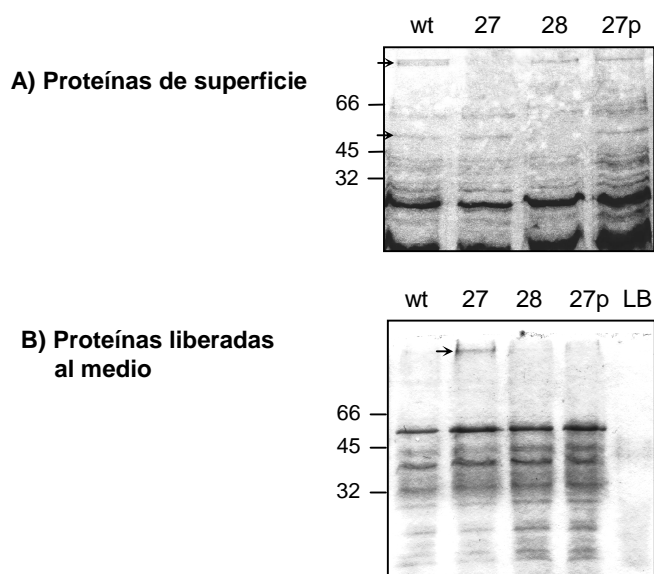


Figura C.III.4: Análisis de las proteínas de membrana externa (A) y del sobrenadante (B) de *P. putida* KT2440 y mutantes no polares mus-27 y mus-28. Células de *P. putida* KT2440 y de los mutantes se cultivaron en medio LB líquido con los antibióticos adecuados, hasta alcanzar una DO_{660} de 0,8-1. Entonces se recogieron por centrifugación y se aislaron las proteínas de la membrana externa como se describió en el apartado 20 de la sección de *Materiales y Métodos*. Las distintas muestras se separaron por electroforesis en gel de poliacrilamida al 10% (p/v) con SDS y se tiñeron con azul de Coomassie. En el margen izquierdo de la figura se indican los tamaños correspondientes al marcador de peso molecular en kDa y con flechas negras la posición de las proteínas de HlpA y HlpB.

3. CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DE LOS MUTANTES mus-27 y mus-28 DE *Pseudomonas putida* KT2440.

3.1. Crecimiento de los mutantes en diferentes medios de cultivo.

En el contexto de la caracterización de los mutantes, se estudió el crecimiento en medio rico LB y en medio mínimo M9 suplido con diferentes fuentes de carbono.

Células de *P. putida* KT2440 y de los diferentes mutantes mus-27 y mus-28 se cultivaron durante toda la noche en medio LB líquido a 30°C y 200 rpm. Cuando se cultivaron en LB el crecimiento de ambos mutantes y de la cepa silvestre fue similar. Los tiempos de generación en fase de crecimiento exponencial tanto de la cepa silvestre como el mutante mus-28, fueron 36 min. Mientras que el mutante mus-27 mostró un tiempo de generación ligeramente superior, 39 min.

Igualmente, se cultivaron en medio mínimo con benzoato (5 mM) y glucosa (20 mM) como fuente de carbono. Cuando se usó benzoato, los tiempos de generación de ambos mutantes mus-27 y mus-28 fueron similares (58 y 61 min respectivamente) y ligeramente inferiores al de la cepa parental (79 min). Los tiempos de generación en fase de crecimiento exponencial se muestran en la Tabla C.III.1.

En medio mínimo con glucosa como fuente de carbono, los tiempos de generación de los mutantes mus-27 y mus-28 (76 y 82 min respectivamente) fueron similares al de la cepa parental (78 min). Los tiempos de generación en fase de crecimiento exponencial se muestran en la Tabla C.III.1.

Tabla C.III.1. Tiempos de generación de *P. putida* KT2440 y mutantes en medio mínimo M9 con diferentes fuentes de carbono

Cepa	Benzoato Na ⁺ 5 mM	Glucosa 20 mM
KT2440	79	78
mus-27	58	76
mus-28	61	82

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

3.2 Análisis de la movilidad celular de los mutantes mus-27 y mus-28 de *P. putida*

Dado que las proteínas HlpA y HlpB son de localización en membrana externa y que en nuestro grupo de investigación se han descrito mutantes deficientes en proteínas de membrana externa que pierden la movilidad, por ejemplo mutantes *tol-oprL* de *P. putida* KT2440 (Llamas *et al.*, 2000), y puesto que la movilidad es un carácter importante en la adhesión de *Pseudomonas* y otras bacterias a superficies bióticas y abióticas (O'Toole *et al.*, 1998), decidimos determinar la movilidad de la cepa silvestre y de los

mutantes. Para ello se analizó su capacidad de migrar en placas de medio LB semisólido, como se describió en el apartado 13 de la sección de *Materiales y Métodos*. Tras 16 horas de incubación a 30°C, el diámetro del halo de crecimiento y movilidad de la cepa parental y de los mutantes fue de 3,5 cm.

3.3. Ensayos de resistencia/sensibilidad a diferentes compuestos

Algunos mutantes en proteínas de membrana muestran patrones de sensibilidad a ciertos detergentes, antibióticos, agentes quelantes y otros compuestos, cuando se comparan con las correspondientes cepas silvestres (Fung *et al.*, 1978; Sukupolvi *et al.*, 1986; Llamas *et al.*, 2000).

En este estudio se comparó el patrón resistencia/sensibilidad de los mutantes mus-27 y mus-28 de *P. putida* a los detergentes SDS, DOC y frente al agente quelante EDTA, con el de la cepa parental. Las células se incubaron durante 24 horas a 30°C en placas de doble difusión que contenían LB suplido con 2% (p/v) de DOC, 1% (p/v) de SDS, 1 mM de EDTA, y se determinó su sensibilidad a estos compuestos tal y como se describe en el apartado 14.2 de la sección *Materiales y Métodos*.

La cepa silvestre y los mutantes presentaron un crecimiento uniforme a lo largo de toda la placa de doble difusión a las concentraciones indicadas arriba. Los resultados se muestran en la Tabla C.III.2.

TABLA C.III.2. Resistencia de *P. putida* y mutantes a compuestos químicos

Cepa	SDS (1%)	DOC (2%)	EDTA (1mM)
KT2440	+	+	+
mus-27	+	+	+
mus-28	+	+	+
mus-27 (pNemo2)	+	+	+

Las células se incubaron durante 24 horas a 30°C en placas de doble difusión que contenían medio LB suplido con diferentes compuestos a la concentración indicada arriba. Los símbolos + indican crecimiento uniforme a lo largo de toda la placa.

Por otro lado, se determinó la resistencia/sensibilidad a diferentes antibióticos mediante el método de antibiograma como se describió en el apartado 14.1 de la sección de *Materiales y Métodos*. Se observó que la cepa parental y los mutantes mus-27 y mus-28 fueron resistentes a los antibióticos ampicilina, eritromicina y ácido nalidíxico. Los mutantes y la cepa parental fueron sensibles a los antibióticos piperacilina, tetraciclina y rifampicina y a los aminoglicósidos, como gentamicina y estreptomycin (Tabla C.III.3). El grado de sensibilidad a estos antibióticos de las cepas mutantes fue similar al de la cepa parental.

TABLA C.III.3: Sensibilidad/Resistencia a diferentes antibióticos de *P. putida* y sus mutantes isogénicos mus-27 y mus-28

Antibióticos	Diámetro del halo de inhibición de crecimiento (mm)		
	KT2440	mus-27	mus-28
Rifampicina	14	14	14
Ampicilina	R	R	R
Eritromicina	R	R	R
Estreptomycin	15	14	15
Ácido nalidíxico	R	R	R
Tetraciclina	18	19	18
Piperacilina	25	25	25
Gentamicina	20	23	22

Los datos que aparecen en la tabla, corresponden al diámetro del halo de inhibición de crecimiento expresado en mm en placas de LB. Tras aproximadamente 20 horas de incubación a 30°C se determinó el diámetro del halo de inhibición del crecimiento, que incluía el diámetro de los discos (6,5 mm). La resistencia a un antibiótico se representa por la letra R.

3.4. Ensayo de actividad hemolítica en *P. putida* KT2440 y mutantes mus-27 y mus-28.

Este ensayo se realizó para determinar si la cepa KT2440 y sus mutantes tenían actividad hemolítica. Las hemolisinas bacterianas son usualmente reconocidas en placas de agar sangre donde aparece una zona transparente alrededor de las colonias (Brillard *et al.*, 2002). Cultivos de *P. putida* KT2440, mus-27 y mus-28 cultivadas durante 10-12 horas a 30°C y con agitación en LB y suplido con los antibióticos requeridos se diluyeron seriadamente y se sembraron en placas de agar sangre de caballo (ref. L0011P1) durante 10-12 horas a 30°C y a temperatura ambiente. Tras este período se observaron colonias de 2 mm de tamaño pero en ningún caso se observó un halo transparente alrededor de las colonias indicando que la cepa KT2440 carece de actividad hemolítica conforme a este ensayo, resultado que afianza el carácter no patógeno de esta cepa y sugiere que HlpA no actúa como hemolisina aunque eso no descarta que pueda participar en la captura de hierro.

3.5. Efecto de la limitación de hierro sobre el crecimiento de la cepa silvestre y mutantes por la presencia de un agente quelante de hierro en el medio de cultivo.

La producción de hemolisinas en un número de bacterias, incluyendo *E. coli* (Lebek *et al.*, 1985) y *S. marcescens* (Braun *et al.*, 1985) está relacionada con el metabolismo del hierro, implicando que la liberación del hierro-hemo de los eritrocitos es su principal función (Poole and Braun *et al.*, 1988). Esta idea está apoyada por el hecho de que la síntesis de ShlA y otras hemolisinas de esta familia están reguladas por hierro (Hirono *et al.*, 1997; Poole and Braun, 1988). Nuestra cepa, como hemos descrito anteriormente no tiene actividad hemolítica pero sin embargo, consideramos la posibilidad de que HlpA estuviese involucrada en la adquisición de hierro por *P. putida* y decidimos analizar el efecto de la limitación del hierro en los mutantes *hlp*.

El compuesto 2,2'-bipiridina es un quelante de hierro que tiene preferencia por el Fe²⁺ y con el objeto de analizar en una primera aproximación el nivel de tolerancia (resistencia) a este compuesto se realizaron los ensayos de tolerancia que se describen a continuación. Para la evaluación de la tolerancia en medio sólido, las células se incubaron durante 24 horas a 30°C en placas de doble difusión de medio LB, que contenían un

gradiente lineal de concentración del compuesto objeto en estudio, cuyas cotas abarcan desde 0 a 5 mM en una placa y 0 a 10 mM en la otra. Se determinó su sensibilidad a este compuesto tal y como se describe en el apartado 14.2 de la sección *Materiales y Métodos*. El límite de inhibición de crecimiento se estableció en aquella concentración a partir de la cual se inhibía el crecimiento bacteriano, en forma de línea, como se muestra en la Figura C.III.6. La cepa silvestre y el mutante mus-28 presentaron un crecimiento uniforme a lo largo de toda la placa de doble difusión que contenía un gradiente de 0 a 5 mM de 2,2'-bipiridina. Mientras que el mutante mus-27 inhibía su crecimiento a una concentración aproximada de 2,5 mM. Los resultados se muestran en la Figura C.III.6-A.

Para ampliar la cota de gradiente se realizó el ensayo en una segunda placa que contenía un gradiente de 0 a 10 mM de este mismo compuesto. La cepa silvestre toleraba hasta una concentración de 7 mM y el mutante mus-28 hasta 5 mM aproximadamente. Una vez más se comprobó el límite de inhibición de crecimiento en el mutante mus-27 coincidiendo en 2,5 mM al igual que en la primera placa (Figura C.III.6-A).

Para comprobar que el efecto inhibitorio del 2,2'-bipiridina era una consecuencia de la limitación del hierro y no debido a un efecto tóxico directo de estos compuestos heterocíclicos, se realizó el mismo ensayo pero con el compuesto 4,4'-bipiridina, agente no quelante de estructura similar al 2,2'-bipiridina (Figura C.III.5), observándose crecimiento en ambas cepas mutantes y silvestre, como observamos en la Figura C.III.6.B

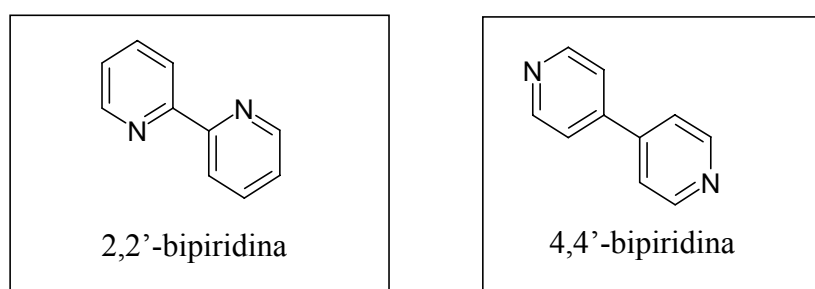


Figura C.III.5: Estructura del compuesto 2,2'-bipiridina (agente quelante) y 4,4'-bipiridina (agente no quelante).

Se realizó el mismo ensayo de placas de doble difusión descrito anteriormente, pero conteniendo un gradiente lineal del compuesto EDDHA (ácido etilendiamino-DI *o*-hidroxifenilacético) (Bitter *et al.*, 1993; Watanabe *et al.*, 1987), quelante que tiene preferencia por Fe³⁺ y cuyas cotas de estudio abarcaron desde 0 a 500 μM. La cepa silvestre y los mutantes mus-27 y mus-28 presentaron un crecimiento uniforme a lo largo de la placa de doble difusión (datos no mostrados).

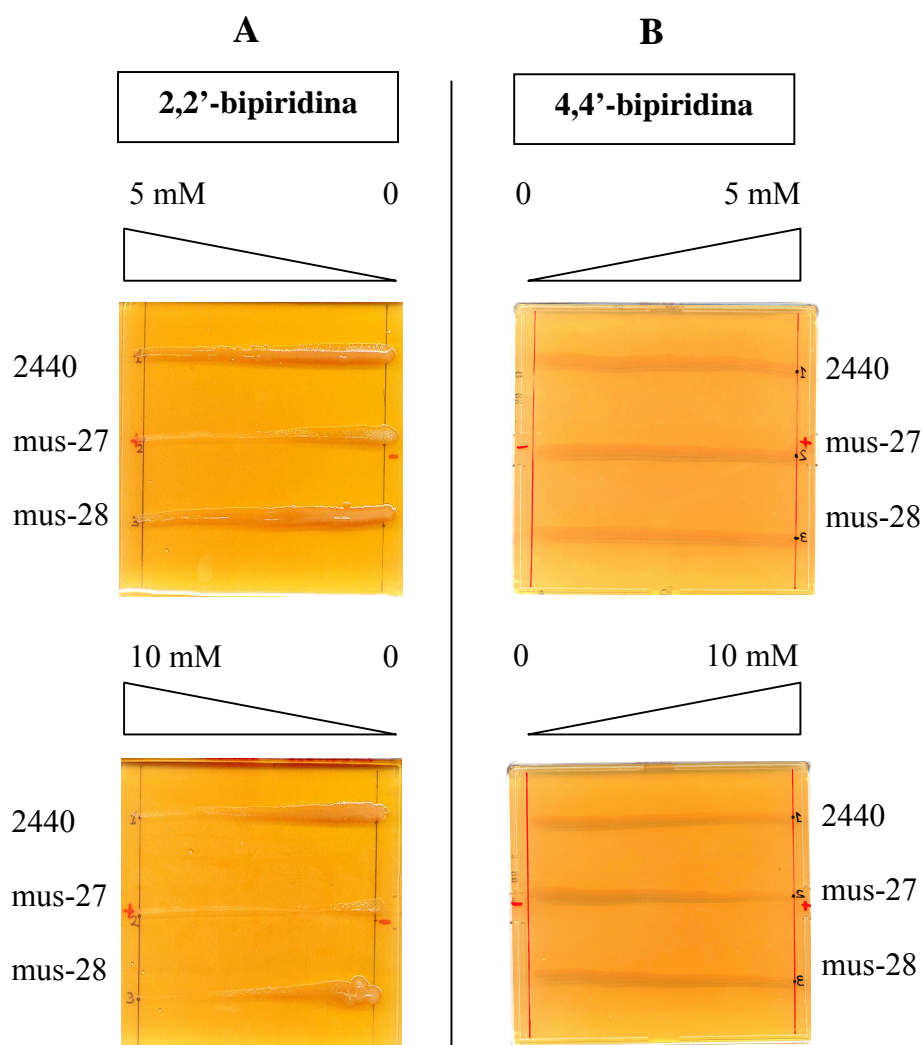


Figura C.III.6: Tolerancia de *P. putida* KT2440 y mutantes en placas de doble difusión con gradiente de 2,2'-bipiridina (A) y 4,4'-bipiridina (B). Las células se incubaron durante 24 horas a 30°C en placas de doble difusión de medio LB, que contenían un gradiente lineal de concentración del compuesto objeto en estudio, cuyas cotas abarcan desde 0 a 5 mM en una placa y 0 a 10 mM en la otra. Se determinó su sensibilidad a este compuesto tal y como se describe en el apartado 14.2 de la sección *Materiales y Métodos*.

Para confirmar los resultados obtenidos en las placas de doble difusión se hicieron estudios en condiciones de limitación extrema de hierro, en un medio líquido deficiente de hierro como es el MB2 (Gilleland *et al.*, 1974) y en presencia del quelante de hierro 2,2'-bipiridina y EDDHA, dos quelantes que tienen preferencia por el Fe^{2+} y Fe^{3+} respectivamente. Las cepas se cultivaron en medio MB2 suplido con 1 mM de MgSO_4 y glucosa (0,5% [p/vol]) en presencia de concentraciones crecientes de 2,2'-bipiridina (de 0 a 2 mM) y de EDDHA (de 0 a 500 μM). Se inocularon en el medio del orden de 10^7 UFC/ml de *P. putida* KT2440 y de los mutantes. En esta serie de ensayos el crecimiento se determinó midiendo la DO a 660 nm de cada cultivo después de 12 horas de crecimiento. Mientras que el crecimiento de ambas cepas no se vio afectado con la adición de EDDHA a las concentraciones usadas (Figura C.III.7-A), el crecimiento de mus-27 se vio severamente reducido al 50% en presencia de una concentración de 0,35 mM de 2,2'-bipiridina y al 99% a concentraciones mayores de 0,5 mM, como podemos observar en la Figura C.III.6-B. Este defecto en el crecimiento quedó parcialmente restaurado en mus-27(pNemo2). El mutante mus-28 y la cepa silvestre fueron capaces de crecer a concentraciones mayores de quelante (Figura C.III.7-B).

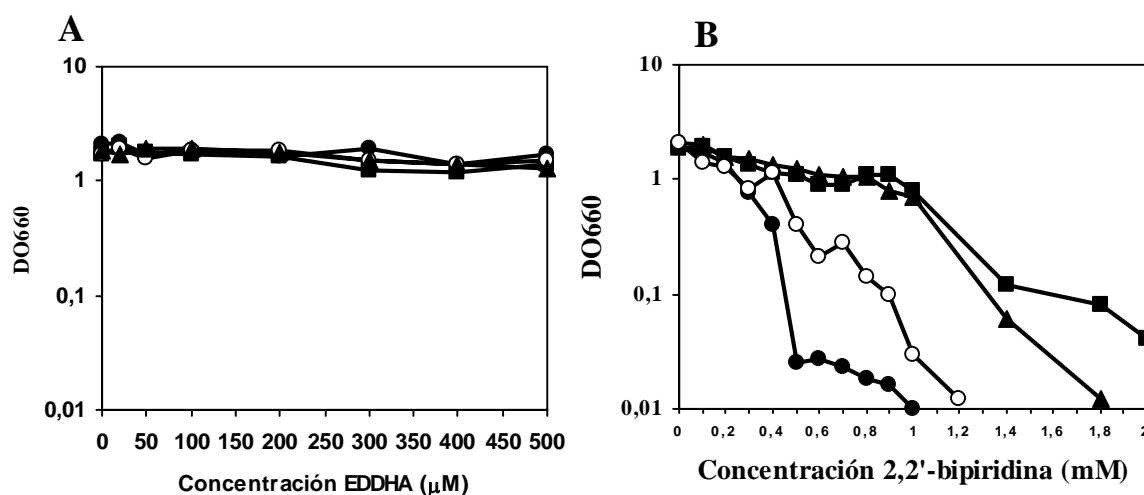


Figura C.III.7.: Efecto de la limitación de hierro por EDDHA (A) o 2,2'-bipiridina (B) en el crecimiento de *P. putida* KT2440 y mutantes mus-27, mus-28 y mus-27(pNemo2) en medio mínimo MB2 (glucosa 0,5 % [p/vol]) deficiente de hierro. En las gráficas se muestra el efecto de la limitación del hierro por la adición al medio de cantidades crecientes del quelante EDDHA (A) o 2,2'-bipiridina (B). Tras 12 horas de crecimiento se determinó la turbidez de los cultivos a 660 nm. Los cuadrados (■) indican los cultivos de la cepa silvestre *P. putida* KT2440. Los círculos cerrados (●) indican los cultivos del mutante mus-27. Los círculos abiertos (○) indican los cultivos del mutante mus-27(pNemo2).

tos (o) indican los cultivos del mutante mus-28. Los triángulos (s) indican los cultivos de mus-27(pNemo2).

Al igual que en medio sólido, se comprobó que el efecto inhibitorio del 2,2'-bipiridina era una consecuencia directa de la limitación del hierro y se realizó el mismo ensayo pero con el compuesto 4,4'-bipiridina, observándose crecimiento en ambas cepas mutantes y silvestre (datos no mostrados).

Esto fue más tarde apoyado por el hecho de que dicho crecimiento quedó restaurado en todas las cepas cuando se añadió a los cultivos FeCl_2 o FeCl_3 (20 μM) en presencia de 0,5 mM de 2,2'-bipiridina. Sin embargo, bajo estas condiciones, mus-27 mostró intensa fluorescencia al ser observados a la luz UV, indicando una elevada liberación de sideróforos como resultado de la privación de hierro como observamos en la Figura C.III.8.

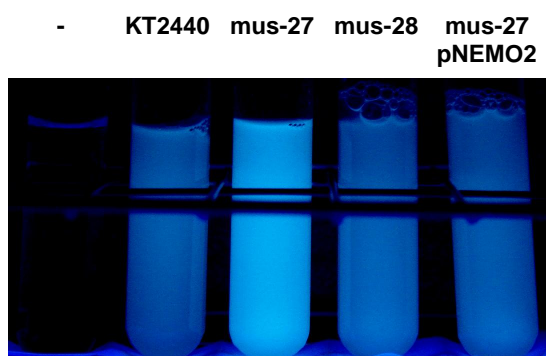


Figura C.III.8: Producción de sideróforos detectada por exposición de cultivos a la luz UV. Células crecidas en medio MB2, con glucosa, más 0,5 mM de 2,2'-bipiridina. Se adicionó 20 μM de FeCl_3 al medio y se observó que mus-27 mostró intensa fluorescencia al ser observados a la luz UV, indicando una elevada liberación de sideróforos. Se obtuvieron los mismos resultados con la adición de FeCl_2 .

Para cuantificar la producción de los sideróforos, se analizó el espectro de absorbancia del sobrenadante de células de KT2440 y mus-27 cultivadas durante la noche, después de recogerlas por centrifugación, en medio MB2 o MB2 con 20 μM FeCl_2 , en presencia o ausencia de 0,5 mM de 2,2'-bipiridina. Cuando ni el FeCl_2 ni el quelante se añadían al medio, se observaron en ambos casos tres picos de absorbancia a 400, 260 y 210 nm, como observamos en la Figura C.III.9-A. El primer pico (400 nm) corresponde a la pioverdina (Xiao and Kisaalita, 1998). En cultivos crecidos en presencia de FeCl_2 ,

el pico de 400 nm no aparecía, y los picos a 210 y 260 nm se reducían significativamente, indicando que probablemente estos dos picos correspondían a sideróforos, aunque quedan todavía por ser caracterizados (Figura C.III.9-B). La adición de 0,5 mM de 2,2'-bipiridina al medio de crecimiento en presencia de FeCl_2 , resultó en un incremento en el sobrenadante de mus-27 de pioverdina y los otros dos sideróforos, mientras que en la cepa parental sólo se incrementaron los picos de 210 y 260 nm (Figura C.III.9-C). Se obtuvieron resultados similares cuando se usó FeCl_3 en vez de FeCl_2 (datos no mostrados).

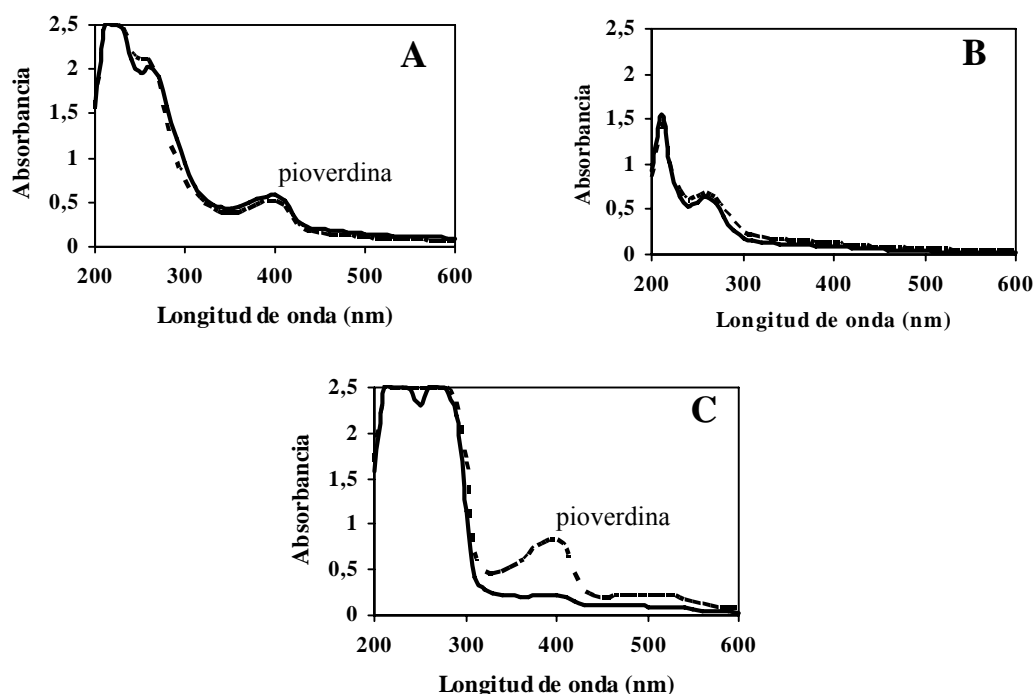


Figura C.III.9. Cuantificación de la producción de sideróforos por espectrofotometría. Se midió el espectro de absorbancia del sobrenadante de células de KT2440 (líneas continuas) y mus-27 (líneas discontinuas) crecidas durante la noche, después de recogerlas por centrifugación, en medio MB2 (A), MB2 con 20 μM FeCl_2 (B) o con FeCl_2 y 0,5 mM de 2,2'-bipiridina (C). Cuando ni el FeCl_2 ni el quelante estaban en el medio, se observaron en ambos casos tres picos de absorbancia a 400, 260 y 210 nm, como observamos en la Figura (A), correspondiendo el pico de 400 nm a la pioverdina. En cultivos crecidos en presencia de FeCl_2 , el pico de 400 nm no aparecía, y los picos a 210 y 260 nm se reducían significativamente (B). En cultivos crecidos en presencia de FeCl_2 y 0,5 mM de 2,2'-bipiridina se observó en mus-27 un incremento de pioverdina y los otros sideróforos, mientras que en la cepa parental sólo se incrementaron los picos de 210 y 260 nm (C).

La Figura C.III.10. resume la producción de pioverdina por cepas cultivadas bajo diferentes condiciones. Estos resultados, junto con los datos de inhibición del crecimiento indican que la cepa *P. putida* KT2440 es capaz de captar eficientemente hierro del complejo Fe-bipiridina, mientras que mus-27 ha perdido esta capacidad, resultando en un aumento de la producción de pioverdina. Este fenómeno se revierte en mus-27 portando el cósmido pNEMO2, mientras que en mus-28 se observó un leve incremento en la producción de pioverdina sólo bajo severa limitación de hierro por bipiridina.

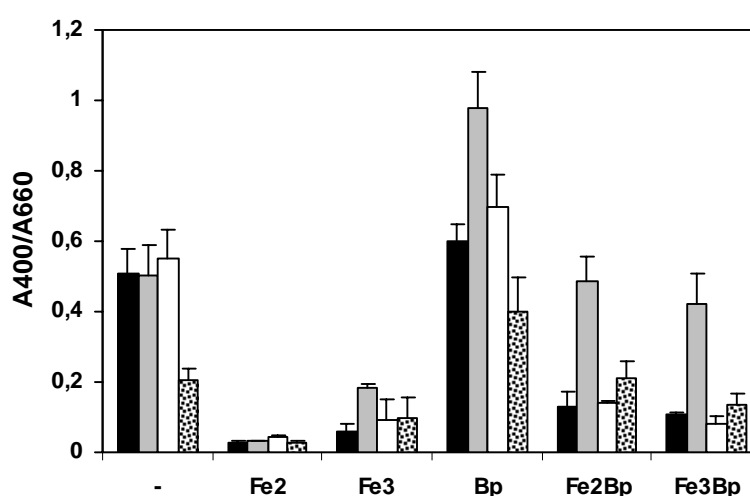


Figura C.III.10. Producción de pioverdina en cultivos de *P. putida* KT2440 y mutantes cultivados bajo diferentes condiciones. Células de *P. putida* KT2440 (barras negras) y mutantes mus-27 (barras grises), mus-28 (barras blancas) y mus-27(pNEMO2) (barras salpicadas) crecidas en medio MB2 (-) o MB2 suplido con 20 μ m de FeCl₂ (Fe2), 20 μ m de FeCl₃ (Fe3), 0,25 mM de 2,2'-bipiridina (Bp), 20 μ m de FeCl₂ + 0,5 mM 2,2'-bipiridina (Fe2B), y 20 μ m de FeCl₃ + 0,5 mM de 2,2'-bipiridina (Fe3B). Se midió la absorbancia de los cultivos crecidos durante la noche a una $\lambda = 660$ nm. Igualmente se midió el sobrenadante obtenido después de recoger las células por centrifugación, a una $\lambda = 400$ nm. Las barras de error representan la desviación estándar de tres ensayos independientes.

3.6. Observación de los mutantes al microscopio electrónico

Como se ha mencionado anteriormente en *P. putida* y otras especies las mutaciones en proteínas de membrana pueden dar lugar a la alteración de su morfología. Por ejemplo, el mutante *oprL* de *P. putida* KT2440 presentó morfología celular alterada apareciendo la cepa mutante deformada y su membrana externa ondulada (Rodríguez-Herva *et al.*, 1996). Igualmente, mutaciones en cada uno de los genes *tol* de *P. putida*

revelaron que eran críticos para el mantenimiento de la estabilidad de la membrana externa ya que todos los mutantes mostraron morfología celular alterada y formación de filamentos (Llamas *et al.*, 2000).

Conociendo la localización predicha del sistema TPS de Hlp asociada a la membrana externa, consideramos la posibilidad de que el defecto en el crecimiento en medio deficiente de hierro y el aumento en la liberación de pioverdina en mus-27 pudiera estar acompañada por alteraciones en la membrana externa bacteriana.

Ello nos animó a estudiar si la reducida capacidad de adhesión de mus-27 y mus-28 se debía a alteraciones en la morfología o ultraestructura de la membrana. Para ello mediante microscopía electrónica de transmisión, se analizó la ultraestructura de células de *P. putida* KT2440 y de los mutantes mus-27, mus-28 y mus-27(pNEMO2) cultivadas en LB y MB2 + 20 μm de FeCl_2 en fase de crecimiento estacionario. Las células de las cepas mutantes y parental cultivadas en LB o MB2 con FeCl_2 no mostraron diferencias aparentes (resultados no mostrados), presentando un aspecto homogéneo y la morfología característica del género *Pseudomonas*. Sin embargo, en las muestras de secciones ultrafinas de bacterias cultivadas bajo limitación de hierro al añadirle al medio 0,25 mM de 2,2'-bipiridina, se observó la aparición de abundantes vesículas en la superficie celular de mus-27 y mus-28, en contraste con la silvestre y mus-27(pNEMO2) en las que las vesículas aunque presentes, estaban en menor proporción que en los dos mutantes (Figura C.III.11). De todas las microfotografías obtenidas, se estimó que el número de vesículas en mus-27, mus-28 y mus-27(pNEMO2) era 4, 3,5 y 2,5 veces más alto que en la cepa silvestre, respectivamente.

Estas observaciones nos condujeron a realizar observaciones de las células al microscopio electrónico de barrido. De nuevo se observaron diferencias en la superficie celular de los mutantes frente al silvestre bajo condiciones de limitación de hierro. Así una proporción significativa de células de los mutantes mus-27 y mus-28 mostraron una extrusión larga en forma de apéndice terminado en vesículas. En las células de la cepa silvestre y mus-27(pNEMO2) el número de vesículas fue menor y el tamaño de extrusión un poco más corto (Figura C.III.12).

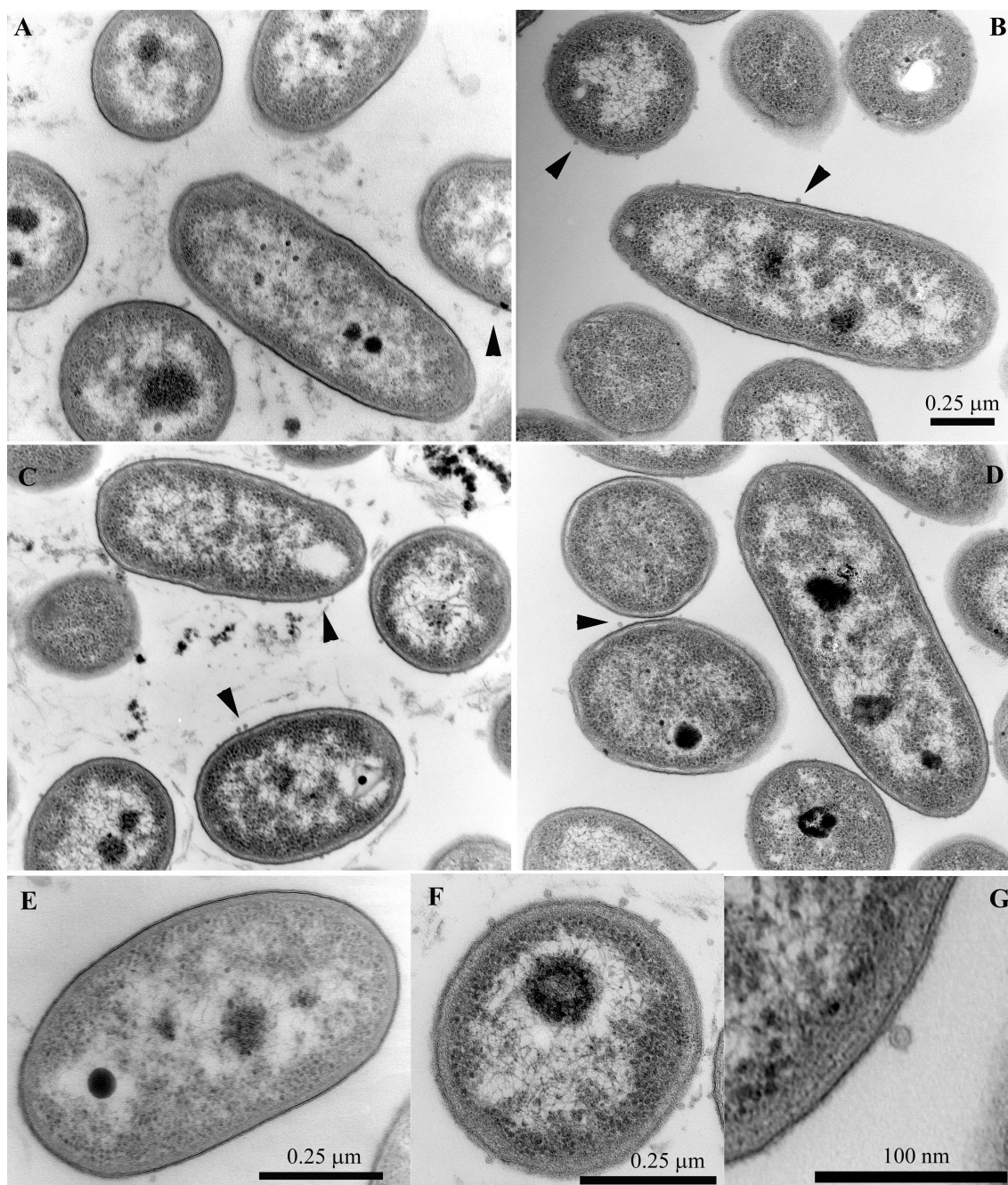


Figura C.III.11.: Fotografías de microscopio electrónico de transmisión de secciones ultrafinas de células de *P. putida* KT2440 (A, E) y mutantes *mus-27* (B, G), *mus-28* (C, F) y *mus-27(pNEMO2)* (D). Las células se cultivaron en medio MB2 con glucosa y 0,25 mM de 2,2'-bipiridina y se recogieron en fase de crecimiento estacionaria. Las muestras se prepararon como se describe en el apartado 23.1 de la sección *Materiales y Métodos* y se observaron al microscopio electrónico de transmisión. Las flechas negras indican algunas de las vesículas observadas. A, B, C y D Aumentos: x40.000. E y F Aumentos: x80.000. G Muestra un detalle de una vesícula observada en *mus-27*.

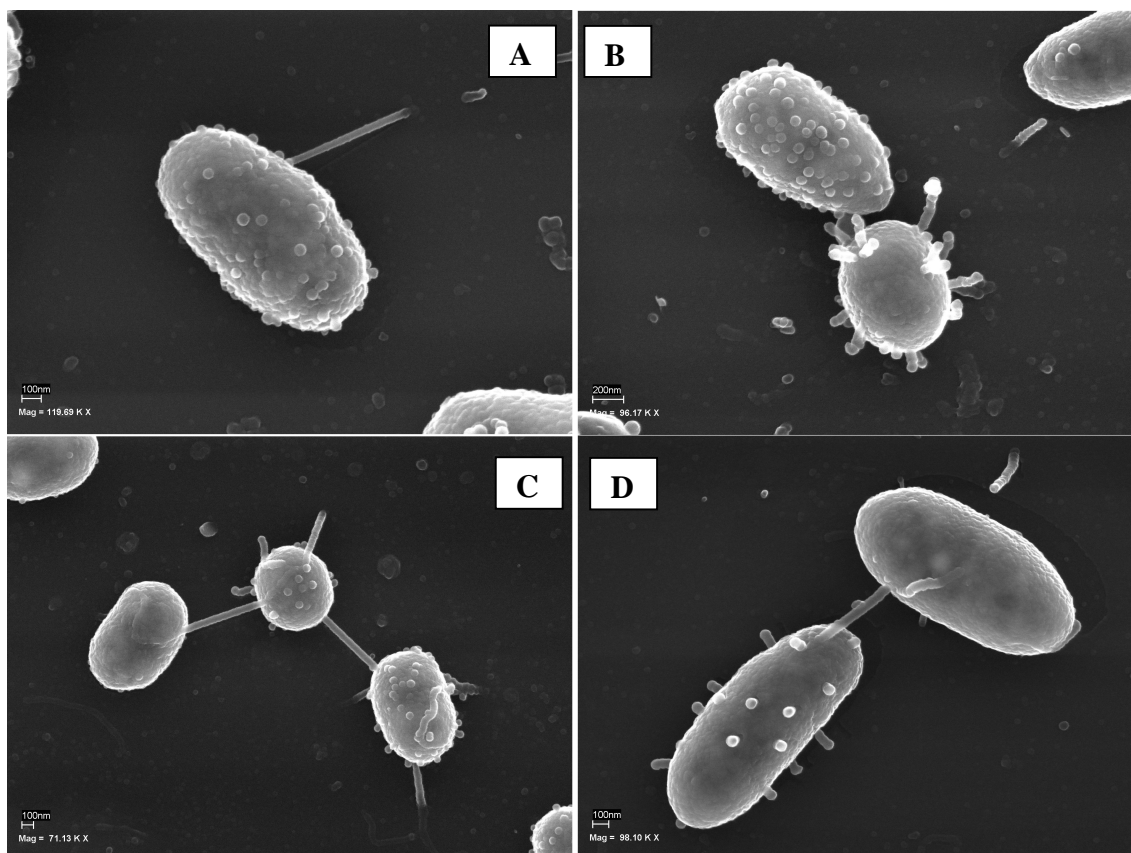


Figura C.III.12: Microscopía electrónica de barrido de células de *P. putida* KT2440 y mutantes mus-27, mus-28 y mus-27(pNEMO2). Las células se cultivaron en MB2 líquido con glucosa y 0,25 mM de 2,2'-bipiridina y se recogieron en fase de crecimiento estacionaria. Las muestras se prepararon como se describe en el apartado 23.2 de la sección *Materiales y Métodos* y se observaron al microscopio electrónico de barrido. (A) KT2440 Aumentos: x119.690 (B) mus-27 Aumentos: x96.170 (C) mus-28 Aumentos: x71.130 (D) mus-27(pNEMO2) Aumentos: x98.100.

CAPÍTULO IV

PAPEL DEL SISTEMA TPS HlpA/HlpB EN LA INTERACCIÓN DE *P. putida* KT2440 CON PLANTAS Y LA SUPERVIVENCIA EN SUELOS

RESUMEN

Como previamente se había descrito, mus-27 presentaba un a reducida capacidad de adhesión a semillas de maíz en comparación con la cepa parental. En este estudio el análisis de adhesión se ha extendido a semillas de guisante y haba. También se ha analizado el efecto de la mutación *hlpB* sobre la adhesión bacteriana a estas semillas, siendo la capacidad de colonizar las semillas de maíz similar a la de mus-27, alrededor de tres veces menor que la silvestre. Estos resultados nos indicaban que una proteína intacta, completamente activa es necesaria para la eficiente colonización de la semilla de maíz. Esto fue confirmado por ensayos con el mutante complementado en donde la capacidad de adhesión fue similar a la de KT2440 confirmando la implicación de HlpA en la colonización de semillas de maíz. La implicación de HlpA en captación de hierro, así como, en la colonización de semillas, indicaba que el hierro podía estar involucrado en la adhesión bacteriana de *P. putida* a semillas. Se analizó el efecto de quelantes de hierro en la colonización a semillas por *P. putida*. Los resultados indicaban que el hierro de la semilla actúa como señal quimiotáctica, determinando la capacidad de células bacterianas que perciben la presencia de la semilla e inicia el proceso de adhesión. También se realizaron ensayos de colonización de la rizosfera de planta de maíz por los mutantes mus-27 y mus-28 en competencia con la cepa parental *P. putida* KT2440R para estudiar si las mutaciones en los genes *hlpA* y *hlpB* daban lugar a desventaja competitiva en la colonización.

PAPEL DEL SISTEMA TPS HlpA/HlpB EN LA INTERACCIÓN DE *P. putida* KT2440 CON PLANTAS Y LA SUPERVIVENCIA EN SUELOS

1. ADHESIÓN DE *P. putida* KT2440 Y MUTANTES mus-27, mus-28 A DISTINTAS SEMILLAS.

La introducción de cepas bacterianas en la rizosfera de plantas con fines agrícolas está realizándose cada vez con más frecuencia. Los objetivos perseguidos con estas liberaciones de microorganismos al medio ambiente son diversos: favorecer el crecimiento de la planta (Kloepper *et al.*, 1989), actuar como agentes de biocontrol (Lugtenberg *et al.*, 1991) y en un área denominada biorremediación encaminada a reducir la presencia de contaminantes en suelos (Crowley *et al.*, 1997). El paso por tanto de la adhesión de las células bacterianas a la superficie de los tejidos de la planta (raíces, semillas) es clave para la posterior colonización del sistema radicular, así como la nodulación en el caso de Rhizobiaceae (Smit *et al.*, 1992). Esta población de bacterias adheridas a las semillas constituyen el “inóculo inicial” para el posterior establecimiento y expansión de la población bacteriana de la rizosfera.

Era de esperar que este fenómeno de adhesión esté mediado por proteínas y otras moléculas de superficie celular, ya que las proteínas de la membrana externa tienen un papel importante en la adhesión a superficies abióticas y bióticas (O’Toole, *et al.*, 1998). Se había descrito previamente que el mutante mus-27 presentaba una reducida capacidad de adhesión a semillas de maíz en comparación con la cepa parental (Espinoza *et al.*, 2000). En este estudio se han repetido los ensayos con semillas de maíz y se han extendido a semillas de guisante y haba. También se ha analizado el efecto de la mutación *hlpB* sobre la adhesión bacteriana a estas semillas. El ensayo de adhesión consistía en inocular 5 µl de cultivo, cuya DO_{660nm}=1, en un volumen final de 1 ml de 1 x M9 junto con una semilla de maíz o guisante, en un tubo de ensayo y 10 µl de cultivo cuando el ensayo se hacía con semillas de haba en un volumen final de 10 ml de 1 x M9. Se incubaron 1 hora a 30°C sin agitación y a continuación se sacaron las semillas que tras lavarse con agua destilada se pasaron a tubos nuevos que contenían perlas de vidrio. Los tubos junto con las semillas y las perlas de vidrio se agitaron con un agitador

de mesa Heidolph durante 1 min. Finalmente se hicieron diluciones seriadas de esta suspensión bacteriana que se sembraron en placas de medio selectivo con benzoato y con los antibióticos apropiados.

Como se había descrito previamente, el mutante mus-27 presentaba una reducida capacidad de adhesión a semillas de maíz en comparación con la cepa parental. Estos resultados se confirmaban también con las semillas de haba. La capacidad de mus-28 de colonizar semillas de maíz, fue similar a la de mus-27 (Figura C.IV.1-A y C). En semillas de haba, su capacidad aumentó un poco más, siendo aproximadamente la mitad que la que presentaba la cepa parental. En el caso de las semillas de guisante, no se observaron diferencias entre la cepa parental y los mutantes. Estos resultados indicaban que la proteína HlpA intacta, completamente activa sería necesaria para una colonización eficiente de las semillas de maíz y haba. Esto se corroboró mediante ensayos de complementación en donde se pudo comprobar que la capacidad de adhesión a semillas de maíz, de mus-27 portando pNEMO2 fue similar a la de KT2440 (Figura C.IV.1-D).

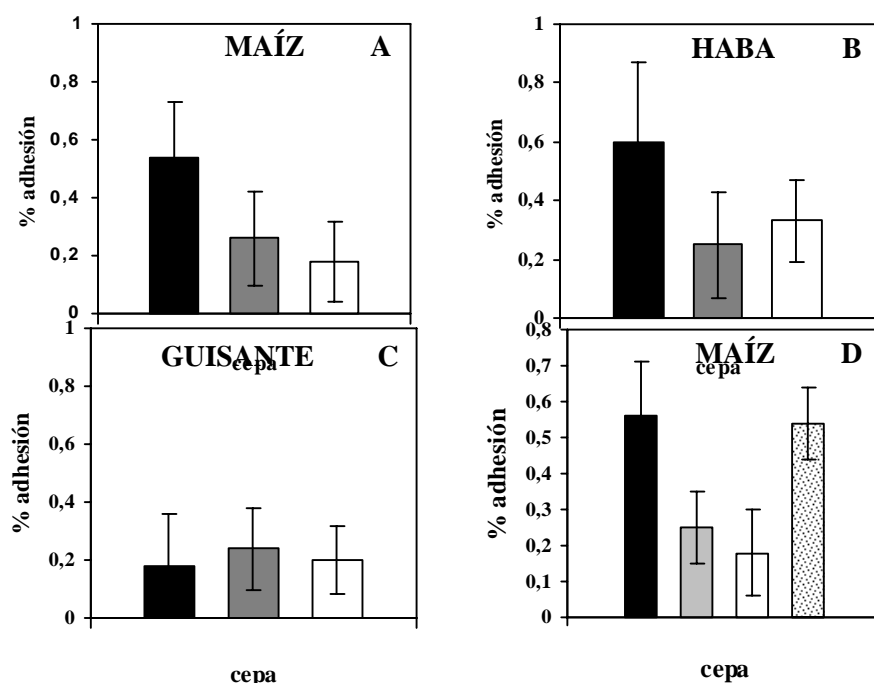


Figura C.IV.1: Adhesión de *P. putida* KT2440 y mutantes a semillas de maíz (A), haba (B) guisante (C), y Adhesión de KT2440, mutantes y mus-27 portando pNEMO2 a semillas de maíz (D). (A, B y C): Cuantificación de adhesión de *P. putida* KT2440 (barra negra) y mutantes mus-27 (barra gris), mus-28 (barra blanca) a semillas. Después de una hora de incubación

con cada suspensión bacteriana, las semillas se lavaron con agua y se secaron, y el número de adhesión celular se estimó como UFC después de plaquear diluciones seriadas. **(D)**: Adhesión de KT2440 (barra negra), mus-27 (barra gris), mus-28 (barra blanca) y mus-27 portando el cósmido pNEMO2 (barra salpicada) a semillas de maíz. Los resultados son la media y las barras de error representan la desviación estándar de cuatro ensayos independientes.

2. SUPERVIVENCIA DE *P. putida* KT2440 Y MUTANTES mus-27, mus-28 EN MICROCOSMOS EDÁFICOS.

Se ha analizado la capacidad de supervivencia de la cepa *P. putida* KT2440 y los mutantes mus-27 y mus-28. En esta serie de ensayos *P. putida* KT2440, mus-27 y mus-28 se introdujeron en microcosmos que contenían 90 g de suelo franco estéril y 10 ml de 1 x M9 a densidades celulares de alrededor de 10^7 UFC/g suelo. Los microcosmos se incubaron a 25°C en invernadero y se tomaron muestras cada 3 ó 5 días a lo largo de un mes determinándose el número de UFC por gramo de suelo mediante plaqueo en medio selectivo (*Materiales y Métodos*, apartado 15). A los 3 días de la inoculación se detectaron aproximadamente 2×10^8 UFC/g suelo de la cepa silvestre y del mutante mus-28, y del orden de 5×10^7 UFC/g suelo del mutante mus-27. Esta densidad celular se mantuvo con pequeñas fluctuaciones durante el tiempo del experimento (30 días), como se observa en la Figura C.IV.2.

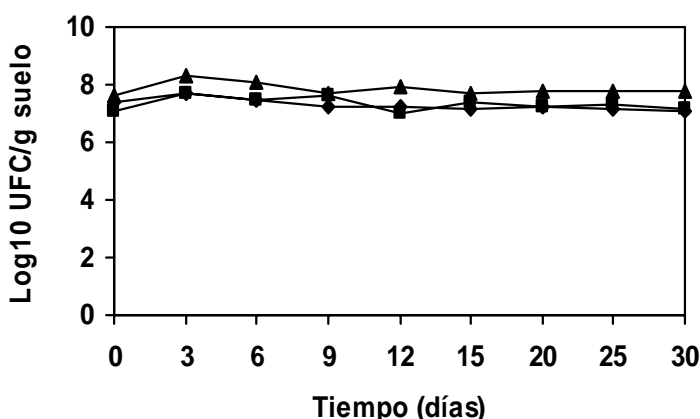


Figura C.IV.2: Supervivencia de la cepa *P. putida* KT2440 y mutantes mus-27, mus-28 en suelo tipo franco. La densidad celular inicial fue de alrededor de 10^7 UFC/g suelo para cada cepa. Los microcosmos se incubaron a 25°C en un invernadero. A los tiempos indicados, se estimó el número de UFC/g suelo de cada una de las cepas mediante siembra en placas de medio selectivo. *P. putida* KT2440 (rombos), mus-27 (cuadrados) y mus-28 (triángulos). Los datos presentados son la media de los valores obtenidos de tres ensayos por duplicado. Las desviaciones típicas calculadas estuvieron por debajo del 5% de la media.

Dado que el comportamiento de los mutantes de *P. putida* KT2440 fue similar al de la cepa silvestre, puede afirmarse que las mutaciones en los genes *hlpA* y *hlpB* de *P. putida* KT2440 no afectan a la supervivencia a largo plazo de esta cepa en suelo estéril tipo franco.

3. COLONIZACIÓN DE LA RIZOSFERA DE PLANTA DE MAÍZ POR LA CEPA *P. putida* KT2440R EN CONDICIONES CONTROLADAS DE INVERNADERO

P. putida KT2440 es una cepa que coloniza la rizosfera a elevada densidad de un buen número de plantas (Molina, *et al.*, 2000). Se realizaron ensayos para estudiar la colonización de la rizosfera de plantas de interés agrícola por la cepa parental *P. putida* KT2440R y de los mutantes mus-27 y mus-28. Semillas de maíz, previamente esterilizadas e hidratadas como se describió en el apartado 16.2. de la sección de *Materiales y Métodos*, se inocularon con la cepa *P. putida* KT2440R (derivada de la cepa *P. putida* KT2440, resistente a rifampicina) a una densidad celular inicial de aproximadamente 10^6 UFC por semilla. Estas semillas se sembraron en macetas que contenían 1 kg de una mezcla de suelo franco y arena en una proporción 1:1. A partir de la aparición de la primera hoja (5 días después de sembrar las semillas), y durante un período de 15 días, se determinó el número de células de la cepa inoculada presentes tanto en la raíz, rizosfera como en suelo no rizosférico (suelo no adherido a la raíz ni influenciado por el sistema radicular). La cepa bajo estudio se seleccionó en placas de medio mínimo con benzoato sódico (10 mM) como fuente de carbono y rifampicina (30 $\mu\text{g/ml}$) como antibiótico de selección. A tiempo=0 se recogieron del orden de 1×10^4 UFC/ semilla. Se observó que, tras 5 días se detectaron 10^7 , 10^6 , 10^5 UFC de KT2440R por gramo de raíz, rizosfera y suelo no rizosférico respectivamente. A partir de este momento, en las siguientes medidas, estos valores de UFC se mantuvieron casi constantes hasta el final del ensayo (Figura C.IV.3).

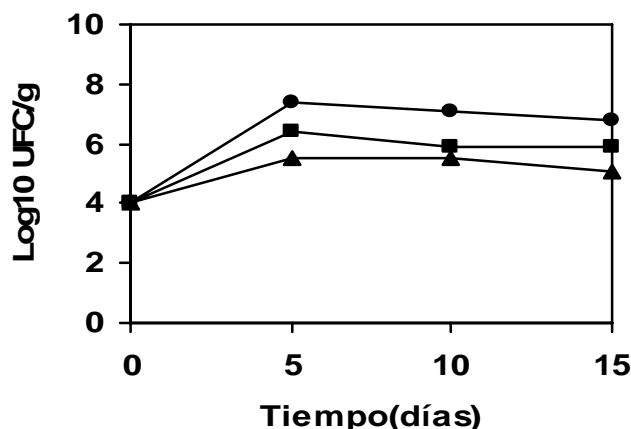


Figura C.IV.3. Supervivencia de la cepa *P. putida* KT2440R en la raíz, rizosfera y suelo no rizosférico de planta de maíz. Semillas de maíz se inocularon con 10^6 UFC/ semilla de la cepa *P. putida* KT2440R y se sembraron en macetas conteniendo una mezcla de suelo tipo franco estéril y arena. A los tiempos indicados se determinó el número de UFC tanto en la raíz (círculos), rizosfera (cuadrados) y suelo (triángulos) mediante el recuento en placas de medio selectivo. Los datos presentados son la media de los valores obtenidos de tres ensayos por duplicado. Las desviaciones típicas calculadas estuvieron por debajo del 5% de la media.

3.1. Colonización de la rizosfera de planta de maíz por los mutantes mus-27 y mus-28 en competencia con la cepa parental *P. putida* KT2440R.

Los experimentos que se describen a continuación se realizaron para estudiar si las mutaciones en los genes *hlpA* y *hlpB* resultaban en una desventaja competitiva en la colonización de la raíz, rizosfera y suelo no rizosférico. Para ello se realizaron ensayos de colonización con cada uno de los mutantes (mus-27 y mus-28) en competición con la cepa parental. Para poder diferenciar ambas cepas en placas de medio selectivo, se utilizó la cepa *P. putida* KT2440R (resistente a rifampicina).

Se inocularon semillas de maíz previamente germinadas durante 2 días, con aproximadamente 5×10^6 UFC por semilla de KT2440R y mus-27. Éstas se sembraron de igual manera que el ensayo descrito en el apartado anterior. Igualmente, se recogieron a tiempo=0 aproximadamente 10^4 UFC/semilla. Se observó que, tras 5 días de cultivo, ambas cepas se establecieron en la raíz a una densidad celular de 10^7 UFC por gramo de raíz. A los 15 días, se establecieron a una densidad de 10^6 UFC/g raíz, un orden de magnitud inferior que al inicio del ensayo (Figura C.IV.4-A). En la rizosfera, a partir del día 5 el número de células de mus-27 fue del orden de 10^6 UFC, un orden de magni-

tud superior que la cepa parental y se mantuvo constante hasta el final del ensayo (Figura C.IV.8-B). La cepa parental se estableció en la rizosfera a una densidad de 10^5 UFC/g de rizosfera, manteniéndose constante durante los 15 días (Figura C.IV.4-B).

Por último, mus-27 se estableció en el suelo no rizosférico prácticamente igual que en la rizosfera, alcanzando una densidad celular de 10^6 UFC por gramo de suelo no rizosférico. En cambio, la cepa parental se mantuvo al mismo nivel que al principio del ensayo durante los 15 días, 10^4 UFC/g de suelo no rizosférico (dos órdenes de magnitud inferior a la de mus-27. Figura C.IV.4-C).

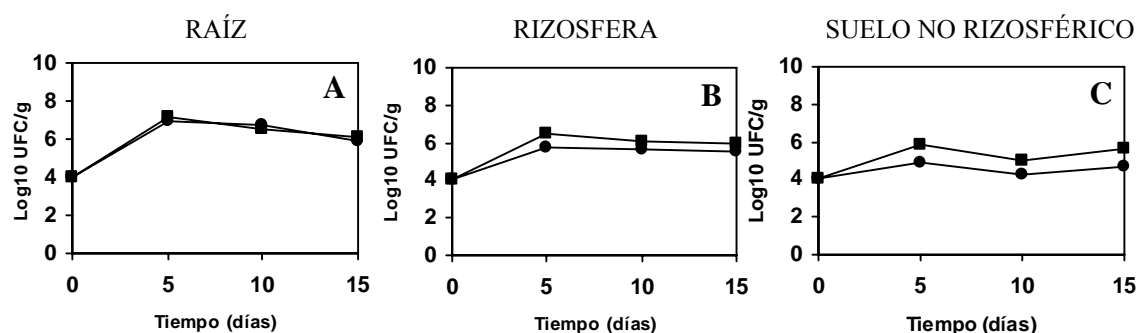


Figura C.IV.4. Supervivencia de la cepa *P. putida* KT2440R en competencia con el mutante mus-27 en la raíz, rizosfera y suelo no rizosférico de planta de maíz. Semillas de maíz se inocularon con 10^7 UFC/semilla de ambas cepas y se sembraron en macetas conteniendo una mezcla de suelo tipo franco estéril y arena. A los tiempos indicados se determinó el número de UFC tanto en la raíz (A), rizosfera (B) y suelo no rizosférico (C) mediante el recuento en placas de medio selectivo. *P. putida* KT2440R se representa en las gráficas por círculos y mus-27 por cuadrados. Los datos presentados son la media de los valores obtenidos de tres ensayos por duplicado. Las desviaciones típicas calculadas estuvieron por debajo del 5% de la media.

Se realizó el mismo ensayo de competición con el mutante mus-28, obteniéndose los siguientes resultados. En general, el número de UFC tendió a disminuir con el tiempo para ambas cepas. Se observó que, tras 5 días de cultivo ambas cepas, KT2440R y mus-28, se establecieron en la raíz a una densidad celular de 10^8 UFC/g de raíz y 10^7 UFC/g raíz, respectivamente (Figura C.IV.5-A). El contenido de células en la raíz decreció progresivamente durante los 15 días que duró el ensayo, recuperándose 10^6 UFC/g de raíz de KT2440R y 10^5 UFC/g de raíz de mus-28. En la rizosfera, el número de células de ambas cepas se mantuvo a los 5 y 10 días a niveles prácticamente iguales, 10^6 UFC/g rizosfera y descendió al final del ensayo hasta dos órdenes de magnitud, 10^4 UFC/g rizosfera (Figura C.IV.5-B). En suelo no rizosférico, alcanzaron a los 10 días

niveles de colonización de aproximadamente 10^6 UFC/g suelo no rizosférico (Figura C.IV.5-C). Posteriormente se observó un ligero descenso paulatino en el número de UFC hasta alcanzar una densidad de 10^4 y 10^3 UFC/g suelo no rizosférico, respectivamente.

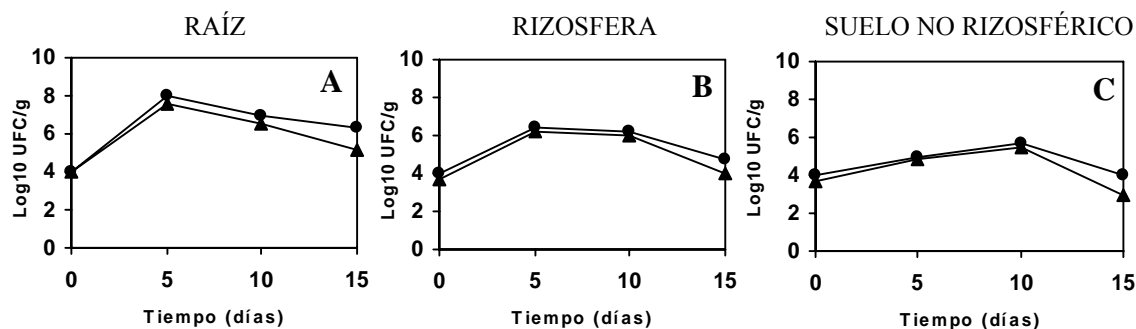


Figura C.IV.5. Supervivencia de la cepa *P. putida* KT2440R en competencia con el mutante mus-28 en la raíz, rizosfera y suelo no rizosférico de planta de maíz. Semillas de maíz se inocularon con 10^7 UFC/semilla de ambas cepas y se sembraron en macetas conteniendo una mezcla de suelo tipo franco estéril y arena. A los tiempos indicados se determinó el número de UFC tanto en la raíz (A), rizosfera (B) y suelo no rizosférico (C) mediante el recuento en placas de medio selectivo. *P. putida* KT2440R se representa en las gráficas por círculos y mus-28 por triángulos. Los datos presentados son la media de los valores obtenidos de tres ensayos por duplicado. Las desviaciones típicas calculadas estuvieron por debajo del 5% de la media.

4. PAPEL DEL HIERRO EN LA COLONIZACIÓN DE SEMILLAS.

Una vez confirmado que la función de *hlpBA* no parece tener un efecto en la colonización de la rizosfera, es decir, las mutaciones en los genes *hlpA* y *hlpB* no mostraron desventaja competitiva en la colonización de la raíz, rizosfera y suelo no rizosférico, decidimos analizar el papel del hierro en la colonización de semillas. La implicación de HlpA en captación de hierro, así como, en colonización de semillas, sugería que el hierro podía estar involucrado en la adhesión de *P. putida* a semillas. El hierro es un factor importante para adhesión bacteriana y formación de biofilm, así como en la colonización de tejidos hospedadores por bacterias patógenas. La presencia de abundante hierro en semillas de maíz había sido previamente comprobada por Jacobs and Walter (1977). Para identificar las regiones donde se localizaba el hierro preferentemente, se usó como

indicador el quelante 2,2'-bipiridina (el cual secuestra el Fe^{2+}). La formación de complejos Fe^{2+} -bipiridina dio lugar a la aparición de un halo de color rojo (Eguchi and Saltman, 1984), una característica que nos permitió detectar fácilmente la presencia de hierro en las semillas, localizado principalmente en el cotiledón y embrión, como podemos observar en la Figura C.IV.6. Esta área parece ser un sitio preferente para la colonización de semillas de cebada por *P. chlororaphis* (Tombolini *et al.*, 1999).

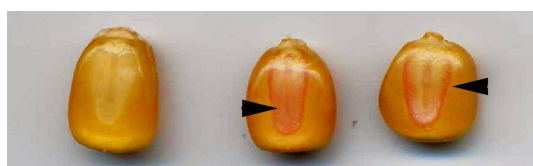


Figura C.IV.6. Detección de hierro en semillas de maíz. Las semillas fueron incubadas durante 2 horas con 1 mM de 2,2'-bipiridina. Las flechas indican el área donde fue más intenso el color rojo resultante del complejo Fe-bipiridina, detectándose sobre todo alrededor del cotiledón. La semilla de la izquierda se utilizó como control (semilla no tratada).

Para determinar si el hierro presente en las semillas de maíz tenía un efecto en la adhesión bacteriana, se hicieron estudios de adhesión a semillas esterilizadas, las cuales habían sido previamente tratadas con 2,2'-bipiridina 0,5 mM durante 1 hora. Como control, se usaron semillas no tratadas y semillas preincubadas con 4,4'-bipiridina. Las semillas se inocularon con 5×10^6 UFC/semilla de cultivos crecidos toda la noche de KT2440R, una cepa derivada de KT2440 resistente a rifampicina (Espinosa-Urgel and Ramos, 2004). Después de 1 hora de incubación, las semillas se lavaron y se transfirieron a 1 ml de 1x M9 y se agitaron para remover las bacterias que no se habían adherido a la superficie de la semilla. Las bacterias adheridas se recuperaron al transferir las semillas a tubos con 1 x M9 y agitación en presencia de perlas de vidrio. Se cuantificó el número de células adheridas mediante diluciones seriadas de esta suspensión bacteriana que se sembraron en placas de medio selectivo. Como se muestra en la Figura C.IV.7., la preincubación de semillas con 2,2'-bipiridina resultó en una reducción significativa en la colonización de semillas por KT2440R. Se obtuvieron resultados similares con un quelante de hierro diferente, 8-hidroxiquinolina (0,5 mM). En contraste, la incubación

con 4,4'-bipiridina no tuvo ningún efecto, indicando que la reducida adhesión bacteriana a semillas era debida a la actividad quelante del hierro y no a otros efectos tóxicos de estos compuestos heterocíclicos. Esto se confirmó añadiendo 50 μM de FeCl_2 al mismo tiempo que el 2,2'-bipiridina, como un competidor de este compuesto, para reducir la cantidad de quelante disponible que secuestra el hierro de las semillas. Este pretratamiento restauró parcialmente la adhesión a semillas por *P. putida* (Figura C.IV.7). Curiosamente, la adición de FeCl_2 o citrato de hierro en ausencia de quelante durante el estudio de adhesión, no resultó en un incremento en la adhesión, más bien en una reducción (datos no mostrados). Esto podía indicar que el hierro de la semilla actúa como una señal quimiotáctica, determinando la capacidad de células bacterianas que perciben la presencia de la semilla e inicia el proceso de adhesión. Alternativamente, el hierro podría jugar un papel en una etapa más tarde, como estabilizador de la interacción semilla-bacteria.

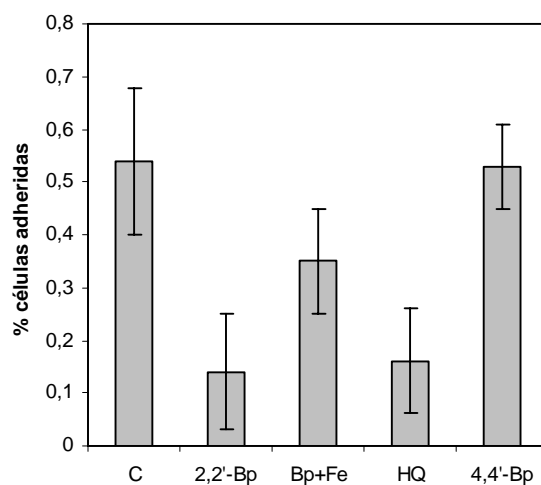


Figura C.IV.7. Efecto de quelantes de hierro en la colonización a semillas por *P. putida*. Los estudios de adhesión se hicieron con semillas esterilizadas e hidratadas y que fueron pretratadas durante 1 hora con 0,5 mM de 2,2'-bipiridina (2,2'-Bp) o con 0,5 mM de 8-hidroxiquinolina (8HQ). Semillas no tratadas (C), semillas incubadas con el agente no quelante 4,4'-bipiridina (4,4'-Bp), o semillas incubadas con quelante y hierro (Bp + Fe) se utilizaron para verificar que los efectos observados se debían a la secuestación del hierro por los quelantes. Cultivos de toda la noche crecidos en LB se diluyeron en medio M9 a una $\text{DO}_{660\text{nm}}=1$, y se inocularon 5 μl en 1 ml de medio M9 con una semilla, en triplicado. Se estimó el número inicial de bacterias inoculadas por semilla mediante diluciones seriadas de esta suspensión que se sembraron en placas de medio selectivo. Después de 1 hora, las semillas se lavaron y las bacterias adheridas se recogieron por agitación en presencia de perlas de vidrio. Igualmente se cuantificó el número de células que se habían adherido a las semillas mediante diluciones en placas de medio selectivo. Los resultados son la media y las barras de error representan la desviación estándar de cuatro ensayos independientes.

Para definir el papel del hierro, se realizaron estudios de adhesión modificados. Se inocularon 5 μ l de cultivo de KT2440, cuya $DO_{660}=1$, en un volumen final de 1 ml de 1 x M9 junto con una semilla de maíz, tratadas o sin tratar con 2,2'-bipiridina durante 1 hora. A unas semillas se les eliminó el paso intermedio de lavado/agitación y las bacterias se recogieron con perlas de vidrio después de un breve lavado de las semillas. A otras se les realizó el tratamiento completo, es decir, no se eliminó este paso intermedio. De esta manera se podía distinguir entre bacterias que estuvieran ya firmemente adheridas a la semilla (adhesión “irreversible”) y aquellas que hubieran iniciado el proceso de adhesión (adhesión “reversible”). El tratamiento con bipiridina resultó de nuevo en una disminución en el número de células recogidas de las semillas con respecto a las no tratadas que actúan de control, como observamos en la Figura C.IV.8. Esta diferencia fue mucho más significativa que la que se observó en estudios previos, indicando que el hierro presente en la semilla es importante en las primeras etapas del proceso de colonización. En ambos casos, el número de células recogidas fue cinco veces superior que cuando se realizó el paso intermedio del lavado.

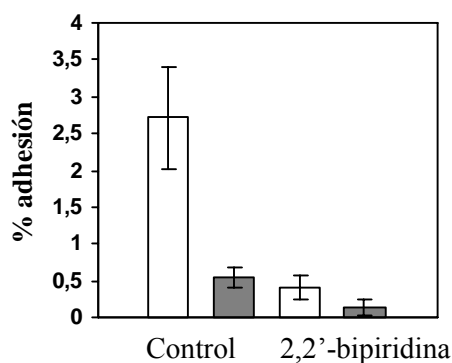


Figura C.IV.8. Papel del hierro en adhesión irreversible y reversible a semillas de maíz. Semillas no tratadas (control) o semillas tratadas con un quelante (2,2'-bipiridina) durante 1 hora se inocularon con KT2440R (5×10^6 UFC/semilla). Se realizaron estudios de adhesión como se describe arriba en el texto, y las células se recogieron por agitación en presencia de perlas de vidrio, uno omitiendo el paso intermedio de lavado/agitación (barras blancas, células adheridas reversiblemente) o realizándolo (barras grises, células adheridas irreversiblemente).

Mutantes de *P. putida* y *P. aeruginosa* en *exbB*, *exbD* o *tonB* son deficientes en captura de hierro y su crecimiento está limitado en un medio deficiente de hierro (Poole *et al.*, 1996; Godoy *et al.*, 2001, 2004). Para confirmar el papel que juega el hierro presente en la semilla en la iniciación de la adhesión bacteriana, hipotetizamos que una

deficiencia en el sistema TonB debería resultar en una capacidad de adhesión más limitada, como una consecuencia del reducido transporte de hierro y detección por células bacterianas. Se realizaron estudios de adhesión a semillas con la cepa PSC209, mutante deficiente en el sistema TonB de *P. putida* KT2440. Como observamos en la Figura C.IV.9. la capacidad de esta cepa de adherirse a semillas de maíz, estaba también reducida significativamente, siendo el porcentaje de células recogidas por semilla de sólo el 24% que el de la cepa silvestre.

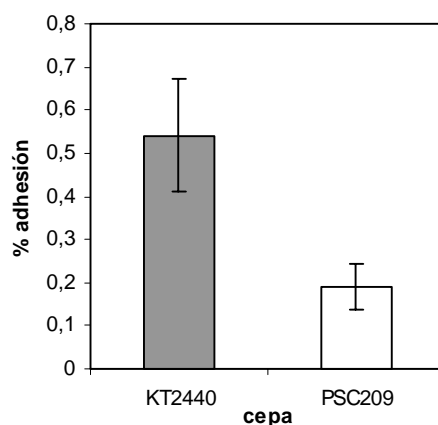


Figura C.IV.9. Adhesión de *P. putida* KT2440 y mutante PSC209 a semillas de maíz. Los ensayos se realizaron como se describe en la leyenda de la Figura C.IV.1. Los resultados son la media de tres ensayos independientes.

DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

El género *Pseudomonas* engloba a una amplia variedad de microorganismos, miembros comunes de la microflora del suelo y del agua, que se caracterizan entre otros aspectos por mostrar una gran versatilidad metabólica, gracias a la cual pueden colonizar una gran diversidad de ecosistemas (Espinosa-Urgel *et al.*, 2004). Así, por ejemplo, dentro de este género existen bacterias patógenas de animales y de plantas (Hattermann y Ries, 1989; Quinn, 1992; Pier *et al.*, 2004); bacterias que juegan un papel importante en los ciclos biogeoquímicos de la materia (Gibson y Subramanian, 1984); bacterias de ambientes acuáticos (García-Valdés *et al.*, 1988); y muchas cepas tolerantes a disolventes orgánicos (Inoue y Horikoshi, 1989, Ramos *et al.*, 1995; Poole, 2004; Rojas *et al.*, 2001), de gran interés en procesos de biodegradación de compuestos contaminantes y en procesos de biotransformación para la obtención de productos de valor añadido (Gibson *et al.*, 1990; Spain, 1990; Esteve-Núñez *et al.*, 2001; Pieper *et al.*, 2004). También existen bacterias que colonizan la rizosfera de plantas potenciando el crecimiento de éstas a través de un conjunto de efectos antagonistas contra posibles agentes patógenos, fundamentalmente hongos (de Weger *et al.*, 1995; O'Sullivan y O'Gara, 1992); dentro de este género existen especies que reducen las infecciones de la planta causada por organismos como *Fusarium*, *Gaeumannomyces*, *Rhizoctonia* o *Roossellinia*. Los mecanismos a través de los cuales puede actuar como biopesticida son los siguientes: antibiosis, competición por nutrientes o nicho ecológico, colonización de las hifas de los hongos o por inducción de la resistencia sistemática en plantas.

Dado que el contacto entre una célula bacteriana y su entorno tiene lugar a través de estructuras de la superficie celular, el estudio de la organización y la función de los distintos elementos que componen la envoltura celular es uno de los aspectos importantes para comprender como las bacterias de género *Pseudomonas* son capaces de colonizar nichos ecológicos tan variados.

La especie *P. putida* se encuentra generalmente en el suelo y rizosfera, como rizobacteria promotora del crecimiento de la planta (PGPR de plant growth promoting rhizobacteria) y puede ofrecer a la planta protección a través de una serie de mecanismos como producción de antibióticos, exclusión de nichos, captura de nutrientes a tra-

vés de la producción de sideróforos (Duffy y Defago, 1999; Godoy *et al.*, 2001) y adhesión a raíces de plantas para inducir una respuesta sistémica (van Loon *et al.*, 1998).

La cepa de este estudio, *P. putida* KT2440, se convierte en un organismo modelo para estudiar interacciones mutualistas entre plantas y bacterias, debido a su eficiencia en la colonización de la superficie de la raíz de plantas y el suelo que la rodea, nicho conocido como rizosfera, y la espermosfera, que corresponde a la superficie de la semilla y el suelo circundante (Espinosa-Urgel *et al.*, 2000; Molina *et al.*, 2000). El desarrollo de las aplicaciones mencionadas requiere asegurar el correcto y duradero establecimiento del microorganismo sobre la raíz de la planta, así como, garantizar la expresión de las funciones deseadas en condiciones medioambientales. Para ello es necesario un mayor conocimiento acerca de los mecanismos moleculares que tienen lugar durante la colonización, establecimiento y desarrollo del microorganismo sobre la raíz.

Espinosa-Urgel y colaboradores (2000) identificaron siete genes de la cepa *P. putida* KT2440 importantes para el biocontrol implicados en adhesión a semillas de maíz. La cepa mus-27 es un derivado de *P. putida*, que fue obtenido por mutagénesis al azar con un transposón mini-Tn5(Km) y mostró deficiencia en adhesión a estas semillas. Este trabajo se ha centrado en la construcción de un mutante no polar en el gen *hlpB* (situado en 5' con respecto a *hlpA*) perteneciente al sistema de secreción TPS, y caracterización del operón *hlpBA* de *P. putida* KT2440, y análisis de su expresión génica, con objeto de dilucidar la función que este complejo proteico de membrana externa desempeña en *P. putida*.

1. ORGANIZACIÓN TRANSCRIPCIONAL DE LOS GENES *hlpBA* EN *P. putida* KT2440.

Cuando Espinosa-Urgel y colaboradores (2000) aislaron el mutante mus-27, comprobaron que el miniTn5(Km) se había insertado en el gen *hlpA* de *P. putida* KT2440. El producto de este gen presentaba homología con hemolisinas reguladas por hierro. En sentido 5' de *hlpA*, se identificó un marco abierto de lectura que se denominó *hlpB* y que se correspondía con un sistema de transporte y secreción de la proteína HlpA. Los resultados de esta Tesis Doctoral han demostrado que ambos genes se en-

cuentran formando un operón, así como, que están implicados en la captación de hierro y en la colonización de rizosfera por la bacteria.

Análisis genómicos y ensayos de RT-PCR demuestran que el gen *hlpB* forma una unidad transcripcional con *hlpA*. Mediante ensayos de extensión del cebador se logró determinar el punto de inicio de la transcripción del operón y proponer el posible promotor P_{hlp} , definiéndose las posibles regiones -10 (5'-TATCCA-3') y -35 (5'-TCGTCC-3') similares a las propuestas para promotores σ^{70} en *P. putida* con un secuencia -10 (5'-TATAcT-3') y -35 (5'-TTGAcC-3') (Domínguez & Marqués 2004). Ante la presencia de dos bandas, no se descarta la posibilidad de la existencia de otro promotor, aún sin identificar, ya que no se han encontrado otras secuencias que pudieran corresponder al mismo. En todos los sistemas TPS los dos componentes del sistema están codificados por genes que forman un solo operón (Jacob-Dubuisson *et al.*, 2001), sin embargo en nuestro caso, se pudo corroborar mediante RT-PCR que en sentido 5' de estos genes *hlpB-hlpA*, se encuentran dos marcos abiertos de lectura, *orf1* (PP1452) y *orf2* (PP1451) que se transcriben en el mismo sentido que los genes *hlp* formando parte de la misma agrupación transcripcional.



Figura D.1: Organización de los genes del sistema TPS en *P. putida* KT2440.

La comparación de la secuencia de aminoácidos codificada por esta región correspondiente a *orf1* (PP1452), con las secuencias de las distintas bases de datos dio como resultado un elevado grado de similitud con ADP-ribosa-pirofosfatasa de *P. fluorescens* PfO-1 (76%) y *P. aeruginosa* (70%). También presentó alta homología con hidrolasas nudix de *P. syringae* (69%) y *Azotobacter vinelandii* (60%) entre otras. Igualmente, *orf2* (PP1451) presentó cierta similitud con posibles proteínas de *P. syringae* (64%), *P. fluorescens* PfO-1 (64%) y *P. aeruginosa* (58%). La posible proteína PP1451 presentó menos similitud con posibles lipoproteínas de *Geobacter sulfurreducens* (43%). Sin

embargo, un estudio de su secuencia no predecía la presencia de un péptido señal típico de las lipoproteínas. La función de dicha proteína de localización periplásmica, es por tanto desconocida.

La expresión a partir del promotor P_{hlp} se induce al entrar los cultivos en fase estacionaria. Se han descrito promotores que pueden transcribirse in vivo por los factores σ^{70} y/o σ^{38} . Este último es responsable de la expresión de numerosos genes al inicio de la fase estacionaria, lo cual condujo a comprobar si σ^{38} estaba implicado en la transcripción del promotor P_{hlp} . El análisis de la expresión de P_{hlp} en un fondo σ^{38-} demostró que la expresión de este promotor es independiente de tal subunidad para el inicio de la transcripción. Por tanto, la inducción de P_{hlp} al entrar en fase estacionaria se debe a otra serie de factores independientes de esta subunidad.

Para el estudio de la expresión de P_{hlp} se analizó la actividad β -galactosidasa obtenida de las fusiones transcripcionales construidas entre el gen marcador '*lacZ* y la región promotora, en distintas condiciones. Se decidió analizar posibles factores que influyeran en la expresión del promotor P_{hlp} . Puesto que la síntesis de determinadas hemolisinas de esta familia TPS está regulada por hierro (Poole and Braun, 1988; Hirono *et al.*, 1997) se analizó si la concentración de hierro en el medio de cultivo ejercía algún efecto sobre la expresión de los genes *hlpBA*. El seguimiento de la fusión $P_{hlp}::lacZ$ demostró que la expresión desde el promotor de los genes *hlpB* y *hlpA* de *P. putida* era independiente de la concentración de hierro presente en el medio.

Como se indicó al comienzo de la Introducción, estudios realizados por Vílchez y colaboradores (2000) demostraron que genes implicados en el catabolismo de prolina, *putA* y *putC*, se inducen por exudados de maíz. Cabría esperar que ciertos componentes del exudado radicular actuaran como señales capaces de activar una serie de mecanismos genéticos en los microorganismos. Así pues, se realizó un análisis de la expresión de los genes *hlpBA* en células expuestas a exudados de semillas y de rizosfera de maíz. La adición de exudados radiculares y de semillas de maíz al medio de cultivo no afecta en gran medida a la expresión de los genes *hlpBA*, por lo que podemos concluir que la expresión desde el promotor de los genes *hlpB* y *hlpA* de *P. putida* era independiente de la presencia en el medio de exudados ricos en nutrientes.

En este trabajo, hemos construido un mutante no polar (mediante la inserción de un cassette de Km carente de terminadores de la transcripción) del gen *hlpB* perteneciente a la agrupación *hlpBA*, obteniéndose el mutante mus-28. Aunque a lo largo de este trabajo se ha intentado en numerosas ocasiones complementar dichas mutaciones usando diferentes vectores de expresión (tanto de medio como de bajo número de copias conteniendo los genes del sistema *hlpBA*), nunca se han obtenido transconjugantes (o transformantes) capaces de mantener esos plásmidos. Estos resultados sugieren que la sobreexpresión de alguna de las proteínas Hlp podría ser tóxica para *P. putida*, como ocurre también con proteínas de la familia como es el caso de EthA de *Edwardsiella tarda* (Hirono *et al.*, 1997). Por ello, se utilizó el cósmido, denominado pNEMO2, para estudios de complementación.

Puesto que se predijo el sistema de dos componentes Hlp estaba asociado a la membrana externa, se analizó el patrón de resistencia/sensibilidad a varios antibióticos y otros agentes químicos de los mutantes mus-27 y mus-28 de *P. putida*, como método para estudiar si la permeabilidad de la membrana externa estaba alterada. En general, los dos mutantes presentaron un grado de sensibilidad similar al de la cepa silvestre. Se decidió comprobar también si las mutaciones daban lugar a alteraciones en la membrana externa bacteriana. Estas alteraciones se hicieron evidentes al analizar los mutantes *hlp* mediante microscopía electrónica de transmisión y de barrido. Dichos mutantes presentaban con frecuencia vesículas en su superficie celular. La formación de vesículas de membrana fue más frecuente en el mutante mus-27 que en mus-28, sobre todo en presencia de 2,2'-bipiridina. Este fenómeno confiere a las bacterias ciertas ventajas para sobrevivir en su medio ambiente ya que las vesículas de membrana externa son capaces de concentrar ciertos componentes celulares como factores de virulencia o enzimas que degradan las paredes celulares, que son capaces de lisar las células de su alrededor, liberando como consecuencia de dicho proceso, una gran cantidad de compuestos inorgánicos que favorecen el crecimiento bacteriano (Beveridge, 1999; Li *et al.*, 1998). En estudios de *P. putida* IH-2000, cepa tolerante a tolueno, se encontraron vesículas de membrana compuestas de fosfolípidos y lipopolisacaridos, liberadas de la membrana externa cuando se añadía tolueno al medio de cultivo. Este sistema de defensa parece representar una función nueva de la membrana externa de bacterias gram-negativas (Kobayashi

et al., 2000). La producción de estas vesículas puede ser incrementada por diferentes factores de estrés. Esto también ha sido investigado en un mutante de *P. aeruginosa* en el gen *ankB*, que codifica una proteína periplásmica y que resultó en una liberación de vesículas cuando la cepa era sometida a estrés oxidativo (Howell *et al.*, 2000). Estas vesículas parecen ser similares a las observadas en este trabajo. Dada la relación que parece existir entre estas vesículas y situaciones de estrés, no es extraña la mayor liberación de vesículas en *mus-27*, ya que está disminuida la captación de hierro. Igualmente, mutaciones en los genes *tol-pal* de *E. coli* inducen efectos pleiotrópicos como liberación de proteínas periplásmicas al medio extracelular e hipersensibilidad a drogas y detergentes. Se ha visto que estos mutantes forman también vesículas como resultado del defecto de alguna de las proteínas Tol-Pal de membrana externa (Bernadac *et al.*, 1998). La ausencia de las proteínas Hlp de la membrana externa de *P. putida* podría tener un efecto similar.

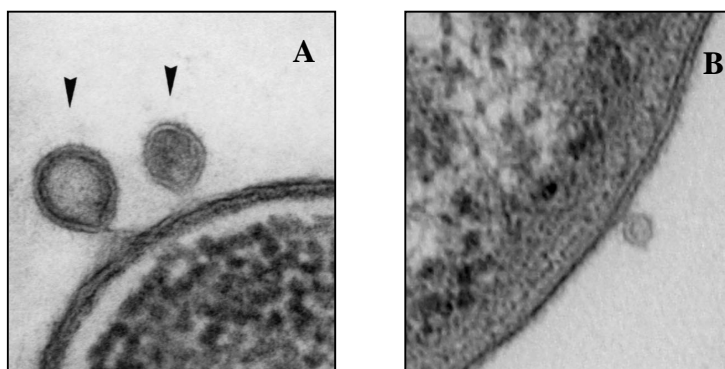


Figura D.2: Fotografías de microscopio electrónico de transmisión de secciones ultrafinas de células de *P. putida* IH-2000 (A) y del mutante *mus-27* (B). Las células se cultivaron en medio MB2 con glucosa y 0,25 mM de 2,2'-bipiridina y se recogieron en fase de crecimiento estacionaria. Las muestras se prepararon como se describe en el apartado 24.1 de la sección *Materiales y Métodos* y se observaron al microscopio electrónico de transmisión (B). La microfotografía del panel A pertenece a la cepa *P. putida* IH-2000 crecidas en un medio LB-Mg con tolueno (obtenida de Kobayashi *et al.*, 2000).

2. SISTEMA DE SECRECIÓN TPS EN *P. putida* KT2440.

La membrana externa de bacterias gram-negativas constituye la interfase entre los microorganismos y su medio ambiente. Las bacterias han desarrollado numerosos sistemas para secretar proteínas a la membrana externa, al medio extracelular o al inter-

ior de células eucariotas o procariotas. El sistema de secreción de dos componentes TPS es un mecanismo especializado constituido por dos proteínas, una proteína transportadora de membrana externa, TpsB, y una exoproteína, TpsA, que es secretada por el transportador (Ma *et al.*, 2002). Una amplia colección de exoproteínas de gran tamaño implicadas en procesos de virulencia, incluyendo citolisinas independientes de Ca²⁺, proteínas de adquisición de hierro y varias adhesinas, son secretadas por el tipo de sistemas llamado TPS. Estas proteínas juegan un papel importante en el metabolismo del hierro bacteriano ya que participan en la liberación del grupo hemo de los eritrocitos. Los sistemas TPS han sido caracterizados en bacterias patógenas, aunque no son exclusivos de estos microorganismos. En este estudio presentamos la evidencia del primer sistema TPS descrito en la bacteria no patógena *P. putida* KT2440. En la Tabla D.1. se resumen las principales funciones de las proteínas TpsA de un número representativo del sistema TPS.

TABLA D.1. Funciones de proteínas TpsA del sistema TPS

TpsA proteínas	TpsB proteínas	Organismos	Funciones de TpsA
CITOLISINAS			
ShlA	ShlB	<i>Serratia marcescens</i>	Citolisina
HpmA	HpmB	<i>Proteus mirabilis</i>	Citolisina
EthA	EthB	<i>Edwardsiella tarda</i>	Citolisina/invasión
ADHESINAS			
HMW1	HMW1B	<i>Haemophilus influenzae</i>	Adhesina
HMW2	HMW2B	<i>Haemophilus influenzae</i>	Adhesina
FHA	FhaC	<i>Bordetella pertussis</i>	Adhesina/agregación bacteriana
HecA	HecB	<i>Erwinia chrysanthemi</i>	Adhesina/agregación bacteriana
LspA1	LspB1	<i>Haemophilus ducreyi</i>	Adhesina?
LspA2	LspB2	<i>Haemophilus ducreyi</i>	Adhesina?
OTRAS			
HxuA1	HxuB	<i>Haemophilus influenzae</i>	Proteína de unión al grupo hemo hemopexina

(Jacob-Dubuisson *et al.*, 2004)

Como mencionamos anteriormente, la fase de lectura abierta interrumpida por el transposón miniTn5(Km) en la cepa *P. putida* KT2440, corresponde al gen *hlpA*, que codifica una proteína implicada en adhesión a semillas y colonización de la rizosfera de maíz. El polipéptido codificado por dicha región presentó una gran similitud con las

proteínas TpsA descritas en bacterias gram-negativa (Tabla C.I.1, Capítulo 1). HlpA mostró la estructura típica de proteínas TpsA. Se caracteriza, entre otros aspectos, por su gran tamaño (con masas entre 100 kDa y algunas entre 400-500 kDa) y por poseer en su extremo amino terminal una secuencia señal seguida de un extenso dominio de secreción. Este dominio de secreción incluye una región de unos 110 residuos conservados. En esta región, HlpA mostró la mayor similitud con los otros miembros de esta familia, siendo por ejemplo, los primeros 210 aminoácidos un 46% idénticos al dominio de secreción de ShlA. Como podemos observar de los alineamientos múltiples realizados en este trabajo de algunas de las proteínas TpsA, existen determinados motivos conservados dentro de este dominio que parecen ser importantes para la secreción de determinadas proteínas (como es el caso de ShlA, Schönherr *et al.*, 1993; Jacob-Dubuisson *et al.*, 1997). La característica funcional de dos motivos que contienen como residuos, NPNL y NPNGI, se ha estudiado por mutagéneis dirigida en varias proteínas TpsA. Su importancia varía entre las distintas exoproteínas. Los residuos de asparagina en la primera posición de cada motivo son esenciales para la secreción y activación de ShlA (Schönherr *et al.*, 1993). En contraste, sólo el primero de estos es esencial para la secreción de FHA (Jacob-Dubuisson *et al.*, 1997). Esta porción conservada del dominio de secreción es un primer candidato para las interacciones moleculares específicas entre la exoproteína y el transportador en el proceso de secreción.

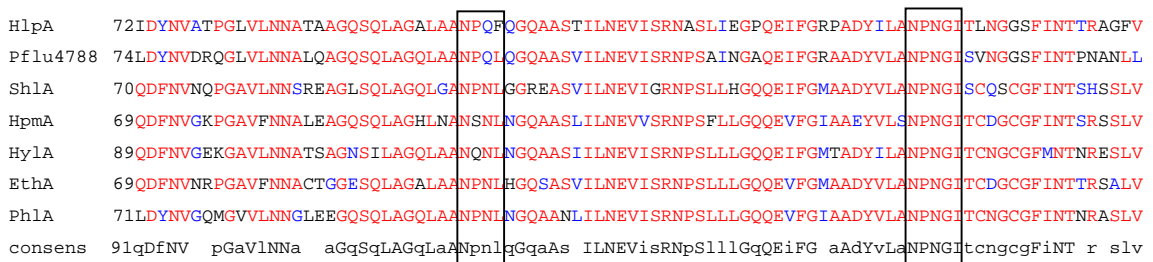


Figura D.3: Aminoácidos de proteínas TpsA importantes para la interacción específica entre la exoproteína y el transportador en el proceso de secreción. Se presenta el alineamiento de la región amino terminal de varias proteínas TpsA. Los aminoácidos conservados en todas las secuencias se indican en color rojo. Los residuos similares se indican en color azul. Los aminoácidos recuadrados representan los dos motivos con los residuos NPNL y NPNGI conservados, cuya mutación en el residuo de asparagina de la primera posición provoca la inactivación y la no secreción de ShlA (Schönherr *et al.*, 1993).

La proteína HlpA contiene además tramos de motivos de secuencia repetidos que no son necesariamente homólogos entre las varias proteínas. Se ha predicho que FHA es rica en estructura β . Basados en estudios de microscopía electrónica, dicroísmo circular y análisis de secuencia, Kajava & colaboradores (2001) y Makhov & colaboradores (1994) propusieron que FHA debería plegarse en una β -hélice. Recientemente, se ha resuelto la estructura del cristal de un fragmento N-terminal de unos 30 kDa de FHA, el cual mostró una estructura β -helicoidal. Esta estructura ha sido también predicha en otros miembros de la familia TpsA, incluyendo citolisinas ShlA, HpmA y EthA y proteínas de virulencia de *H. ducreyi*. El largo tamaño, la abundancia de secuencias repetidas y el predominio de estructura β , son características comunes de las proteínas TpsA. Algunas adhesinas TpsA son sintetizadas como preproteínas, pero esto no parece ser el caso de las citolisinas.

El análisis de la secuencia genómica de *P. putida* KT2440 reveló la presencia de un marco de lectura abierto, *hlpB*, en sentido 5' de *hlpA*, que se transcribe en la misma dirección, cuyo producto de la transcripción muestra homología con transportadores/activadores de la membrana externa asociados a las proteínas de la familia TpsA. Se llevó a cabo un alineamiento múltiple de proteínas de la familia TpsB (ver Figura C.I.6. de Resultados Capítulo I). Se pudo observar que HlpB, de tamaño aproximadamente de 60 kDa, al igual que el resto de proteínas de la familia TpsB, tienen dos residuos de cisteínas (posición 82 y 112 de HlpB) y una fenilalanina en la región C-terminal características de proteínas de membrana externa. En la región C-terminal de algunas de estas proteínas se encontró también una secuencia conservada terminada en RGY/F. Este motivo estaba conservado en casi todas las proteínas del alineamiento. Mutaciones en esta secuencia conservada en FhaC (transportador de FHA en *Bordetella pertusis*), indicaron que esta región es crucial para la secreción de FHA (Guédin *et al.*, 2000). Podemos concluir que este motivo podría estar involucrado en el reconocimiento de la exoproteína sustrato u otro paso de la translocación.

3. LA PROTEÍNA HlpA ESTÁ INVOLUCRADA EN ADQUISICIÓN DE HIERRO.

Se ha postulado que la producción de hemolisinas está relacionada con el metabolismo del hierro bacteriano, ya que estas proteínas causan la liberación del hierro-hemo por lisis de eritrocitos (Poole y Braun, 1988). Generalmente, la expresión de varios de estos genes se induce por la limitación de hierro. Aunque el operón *hlpBA* no está regulado por hierro, consideramos la posibilidad de que HlpA estuviera involucrada en la percepción y adquisición del hierro por *P. putida*, y se decidió analizar el efecto de la limitación del hierro en los mutantes *hlp*. Por otro lado, se ha identificado en semillas de maíz regiones con un alto contenido en hierro, principalmente el cotiledón y embrión, utilizando como indicador el quelante 2,2'-bipiridina.

Cuando se cultivaron las cepas en un medio deficiente en hierro, MB2, en presencia de concentraciones crecientes de 2,2'-bipiridina o EDDHA, dos quelantes que tienen preferencia por Fe^{2+} y Fe^{3+} , respectivamente, se observó que mientras que el EDDHA no tenía ningún efecto a las concentraciones probadas, el crecimiento de mus-27 se redujo hasta un 50% a una concentración de 0,35 mM de 2,2'-bipiridina, y un 99% a concentraciones mayores de 0,5 mM (Figura C.III. del Capítulo III de Resultados). Este defecto en el crecimiento fue parcialmente restaurado por el cósmido pNEMO2. En cambio, el mutante mus-28, fue capaz de crecer a concentraciones altas de quelante. Se pudo concluir que el efecto inhibitorio del crecimiento era una consecuencia directa de la limitación de hierro, ya que la adición de $FeCl_2$ o $FeCl_3$ al medio restauró el crecimiento normal de todas las cepas en presencia de 0,5 mM de 2,2'-bipiridina. Además, la realización del ensayo con un análogo estructural, 4,4'-bipiridina, no tuvo ningún efecto. Sin embargo, bajo estas condiciones, mus-27 mostró una intensa fluorescencia bajo luz UV, indicando un incremento en la liberación de sideróforos como resultado de la limitación de hierro. Analizando el espectro de absorbancia de sobrenadantes de KT2440 y mus-27 cultivadas en medio MB2 con y sin $FeCl_2$, en presencia o ausencia de bipiridina, se pudo cuantificar la producción de los sideróforos. Cuando ni el hierro ni el quelante se añadía al medio, se observaron tres picos de absorbancia a 400, 260 y 210 nm, correspondiendo el primero a la pioverdina (Xiao y Kisaalita, 1998). La

adición al medio de crecimiento de 2,2'-bipiridina, en presencia de FeCl_2 , resultó en un incremento en pioverdina y los otros dos sideróforos en el sobrenadante de mus-27, mientras que en la cepa silvestre sólo se incrementaron los picos de 210 y 260 nm. Estos resultados, junto con la inhibición de crecimiento indicaban que KT2440 es capaz de captar hierro eficientemente de complejos Fe-bipiridina, mientras que mus-27 ha perdido esta capacidad y bajo limitación de hierro, se incrementa la producción de pioverdina. Este fenómeno es revertido por el cósmido pNEMO2, mientras que en mus-28 se observó un leve incremento en producción de pioverdina bajo limitación de hierro por 2,2-bipiridina.

El crecimiento del mutante *hlpA* por tanto está significativamente afectado por la adición del quelante de hierro 2,2'-bipiridina, fenotipo semejante al mutante *feoB* de *E. coli*. FeoB es una proteína de membrana involucrada en el transporte del hierro ferroso por *E. coli* y otras bacterias gram-negativas, pero no se ha encontrado un homólogo en el genoma de KT2440. La presencia de Fe^{2+} en las semillas de maíz, junto con el efecto inhibitorio del 2,2-bipiridina en la colonización por la cepa parental, favorece la idea de que el hierro es una señal que promueve el establecimiento de *P. putida* en la espermosfera, en un proceso mediado por el sistema TPS que codifica *hlpBA*.

Todos estos resultados plantean la cuestión de por qué sólo la proteína truncada HlpA del sistema TPS descrito en este trabajo resultó en una reducción del crecimiento y en un aumento en la producción de pioverdina bajo condiciones de limitación de hierro, mientras que la ausencia del transportador/activador tiene un efecto limitado en la captación de hierro libre del medio. Hay varias posibles explicaciones para los diferentes fenotipos observados en los mutantes mus-27 y mus-28 (ver Figura D.2). Una de ellas puede ser que una cantidad limitada de HlpA se secrete en el mutante *hlpB* por mecanismos alternativos. En este aspecto, la presencia de un dominio relacionado con el transportador en el extremo C-terminal de HlpA apoyaría esta hipótesis. Una segunda posibilidad es que la función de HlpA involucrada en la interacción con el componente de la membrana externa y que el efecto de la proteína truncada en el transporte de hierro es debido a una interacción anómala. Esta idea está apoyada por las alteraciones observadas en la membrana externa de mus-27 y por el hecho de que el cósmido con el ope-

rón intacto *hlp* no complementa totalmente el defecto en la limitación de hierro del mutante *hlpA*, así que el fenotipo de la cepa complementada es intermedio entre la silvestre y el mutante. Sin embargo, la presencia del cósmido pNEMO2 resulta en un crecimiento más lento de la cepa complementada, lo cual puede también explicar la falta de complementación. La obtención de anticuerpos para la detección inmunológica de HlpA y HlpB, nos permitirá un análisis más preciso de los mecanismos e interacciones entre el sistema TPS y otros componentes de la envoltura de *P. putida*. Sin embargo, a la vista de los análisis del patrón de proteínas (Figura C.III.4. de Resultados), proponemos en la siguiente figura (Figura D.4) un resumen de nuestra hipótesis actual sobre el funcionamiento de este sistema TPS en *P. putida* KT2440, y los fenotipos observados en los distintos mutantes.

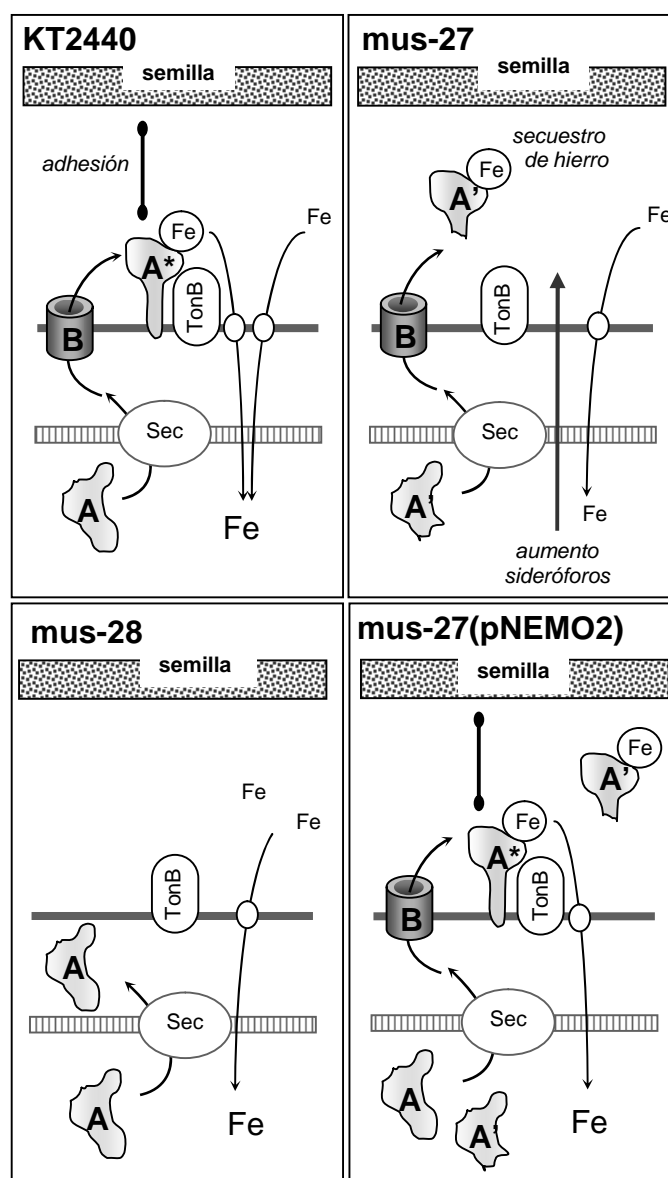


Figura D.4: Modelo propuesto para el sistema TPS de *P. putida*.

En el panel de la cepa silvestre KT2440, representaría el sistema TPS presente en esta cepa: la proteína de membrana externa HlpA, se sintetiza como precursor provisto de un péptido señal y atraviesa la membrana interna a través de la ruta de secreción dependiente de la proteína Sec (Pugsley, 1993), y una vez en el periplasma se exporta a la superficie de la membrana externa, por medio del transportador de membrana externa HlpB. La proteína HlpA adquiere su conformación activa y madura quedando asociada a la membrana externa para desempeñar su función en la colonización a semillas y cap-

tura de hierro. En el panel del mutante mus-27, al estar la proteína HlpA truncada, deja de estar asociada a la superficie bacteriana, perdiendo la capacidad de adhesión a semillas. HlpA captaría hierro, pero al estar liberada al medio, actuaría como secuestrante, disminuyendo la entrada de hierro a la célula produciéndose por tanto un aumento en la producción de sideróforos, como consecuencia de la limitación de hierro. Los sideróforos aparecen como respuesta evolutiva a la captura de Fe^{3+} insoluble y al papel fundamental que juega el hierro en el metabolismo celular. La percepción de la carencia de hierro en el ambiente inmediato, como ocurre en dicho mutante, de alguna manera ha de traducirse en la activación de la transcripción de los sistemas particulares de transporte de hierro, como por ejemplo el sistema TonB. Una característica común de muchos sistemas de transporte de hierro en *Escherichia coli* y otras bacterias gram-negativas es su dependencia del sistema TonB. La síntesis de TonB está regulada por hierro (Postle, 1990). En el panel del mutante mus-28, al estar afectado el transportador de HlpA, ésta se quedaría en el periplasma y no se exportaría a la membrana externa. Como se comentó en el Capítulo III de Resultados, la detección de una banda del tamaño esperado para HlpA en el mutante HlpB⁻ en geles de poliacrilamida para el análisis de proteínas de membrana externa, cabe la posibilidad de que algo se transporte a través de otro sistema. También está afectado en la adhesión a semillas, pero el efecto sobre la captura de hierro sería menor al no estar actuando como “secuestrante” en el medio. En el último panel, donde se muestra el mutante mus-27 complementado con el cósmido, el mutante recupera en parte la capacidad de adhesión a semillas y también parcialmente la captura de hierro, al haber mezcla de la proteína HlpA activa, asociada a la membrana externa, y HlpA truncada secuestrando hierro en el medio.

4. SUPERVIVENCIA EN SUELO, ADHESIÓN Y COLONIZACIÓN DE SEMILLAS DE LOS MUTANTES mus-27 Y mus-28 DE *P. putida*.

Los usos de microorganismos en la agricultura a menudo implican recubrimiento de semillas con una suspensión bacteriana. Antes de la propagación de los microorganismos en el suelo, el revestimiento de las semillas es un camino más simple y eficaz

que la introducción de bacterias beneficiosas para plantas. La quimiotaxis y el movimiento hacia las raíces y semillas tiene lugar en el suelo, pero depende del contenido de agua y de las características del suelo. Las bacterias asociadas a semillas tienen una ventaja competitiva inicial para la colonización del sistema de raíces de la planta. La eficiente colonización de semillas puede ser decisiva para el establecimiento de las interacciones planta-bacteria en la rizosfera. Las semillas son también consideradas como uno de los principales medios de propagación de microorganismos patógenos y no-patógenos, asociados a plantas (Hirano y Upper, 2000). La información referente a los elementos y mecanismos involucrados en la colonización bacteriana de la espermosfera está muy limitada. En *Enterobacter cloacae*, una bacteria de interés en biocontrol, ya que suprime los daños causados por el hongo *Pythium ultimum* (Roberts *et al.*, 1996b; Kageyama y Nelson, 2003) se ha establecido la relación entre la colonización de la rizosfera y la captación y utilización de nutrientes (aminoácidos, péptidos y carbohidratos (Roberts *et al.*, 1996a, 1999). Mutantes de *E. cloacae* deficientes en *pfkA*, gen que codifica una fosfofructoquinasa, mostró una reducida capacidad de colonización (Roberts *et al.*, 1999). La enzima fosfofructoquinasa es clave en glicólisis y determina la capacidad de utilizar diferentes azúcares como fuente de carbono. Tombolini y colaboradores (1999) observaron la importancia de los nutrientes en la formación de biofilm en semillas, donde el sitio preferido para la colonización bacteriana de semillas de cebada era el área de donde emerge la raíz, alrededor del cotiledón. En *P. fluorescens* se han aislado mutantes deficientes en adhesión a semillas (DeFlaun *et al.*, 1990, 1994) donde dos de ellos eran deficientes en flagelina, componente estructural del flagelo.

Como se había descrito previamente, el mutante mus-27 presentaba una reducida capacidad de adhesión a semillas de maíz en comparación con la cepa parental (Espinoza *et al.*, 2000). En este trabajo se han realizado ensayos con semillas de maíz y se han extendido a semillas de guisante y haba. También se analizó el efecto de la mutación *hlpB* sobre la adhesión bacteriana a estas semillas. Estos resultados de deficiencia en adhesión a semillas de maíz del mutante mus-27 se confirmaron también con las semillas de haba. La capacidad de mus-28 de colonizar semillas de maíz, fue similar a la de mus-27 (Figura C.IV.1-A y C del Capítulo IV). En semillas de haba, su capacidad aumentó un poco más, siendo aproximadamente la mitad que la que presentaba la cepa

parental. Cuando se llevaron a cabo estos ensayos de adhesión en semillas de guisante, no se observaron diferencias entre la cepa parental y los mutantes. Estos resultados indican que la proteína HlpA intacta, completamente activa sería necesaria para una colonización eficiente de las semillas de maíz y haba. Esto se corroboró mediante ensayos de complementación en donde se pudo comprobar que la capacidad de adhesión a semillas de maíz, de mus-27 portando pNEMO2 fue similar a la de KT2440.

Las características que permiten a los microorganismos sobrevivir y colonizar un ecosistema como el suelo, son muy variadas y no se conocen en detalle. El suelo es, además, una materia de difícil estudio debido a la enorme heterogeneidad y complejidad de sus propiedades tanto biológicas como físico-químicas. En el presente trabajo, se analizó si las mutaciones en los genes *hlpB* y *hlpA* afectaban a la colonización del suelo por esta bacteria y a la capacidad de adhesión a distintas semillas. Este tipo de ensayo se eligió por su fácil realización y porque en muchas ocasiones el proceso de biocontrol comienza con la aplicación de los inóculos bacterianos sobre las semillas, antes de la siembra (Lugtenberg *et al.*, 1991).

En lo referente al primer punto, la evaluación de cepas bacterianas en entornos simulados, como lo son los microcosmos, aporta datos preliminares muy valiosos. Las mutaciones en los genes *hlpA* y *hlpB* de *P. putida* KT2440 no afectaron a la supervivencia a largo plazo de esta cepa en suelo estéril, detectándose una densidad celular de aproximadamente 10^7 UFC/g de suelo, en ambos mutantes y cepa parental durante el tiempo que duró el experimento (30 días). Sin embargo, en este tipo de estudios no se consideran los cambios ambientales y el trasiego de materiales que tipifica cada combinación específica de planta y suelo, por lo que se evaluó el comportamiento de los mutantes de *P. putida* en condiciones ambientales.

Las raíces de plantas y el suelo que lo rodea (la rizosfera) son los sitios de preferencia para la colonización de bacterias del suelo, ya que se libera una cantidad importante de nutrientes por la planta, en forma de exudados radiculares y debido a la muerte y lisis de células de la corteza durante el crecimiento de las raíces. La composición de estos exudados radiculares varía en función de una planta a otra y con la edad de la planta, pero generalmente se componen de una mezcla compleja que contiene azúcares, aminoácidos y ácidos orgánicos, que pueden servir como fuente de energía, carbono y/o

fuentes de nitrógeno para los microorganismos (Vancura, 1980; Lugtenberg *et al.*, 1999). Esto está demostrado por el hecho de que el número de bacterias por gramo de suelo rizosférico (10^8 - 10^9) es entre 2 y 4 órdenes de magnitud mayores que en suelo no rizosférico (Molina *et al.*, 2000). La colonización de la rizosfera y del suelo que rodea a la misma sin entrar en contacto directo con ella requiere tanto multiplicación como movilización de las bacterias para así poder alcanzar zonas profundas de la raíz (Benizri *et al.*, 1997; de Weger *et al.*, 1987; Reniero *et al.*, 1999). La existencia de división celular en la rizosfera de plantas se ha demostrado para cepas de *Pseudomonas aureofaciens* marcadas con los genes *lacYZ* de *E. coli* (Drahos *et al.*, 1988). En la colonización de la planta de maíz por la cepa *P. putida* KT2440R en condiciones controladas de invernadero se observó un establecimiento a una densidad celular de 10^7 , 10^6 y 10^5 UFC/g de raíz, rizosfera y suelo no rizosférico respectivamente. Por lo que se puede considerar que en condiciones ambientales *P. putida* KT2440R es una buena colonizadora de la raíz y rizosfera de maíz, lo que apoya su utilización en la recuperación de suelos contaminados con la utilización conjunta de plantas (fitorremediación) y en la construcción de cepas para control biológico de patógenos de plantas.

Mencionamos la importancia de realizar ensayos de competencia de la cepa parental y mutantes, en lugar de ensayos de colonización con cada mutante, ya que se han dado casos de microorganismos mutados en genes que aparentemente no influían en la colonización de la raíz cuando se ensayaban las cepas por separado pero que, sin embargo, parecían jugar un papel importante cuando se hacían ensayos de competencia con la cepa silvestre (Dekkers *et al.*, 1998). Las densidades celulares alcanzadas en los ensayos de competencia de la cepa *P. putida* KT2440R y mus-27 fueron similares tanto en raíz, rizosfera y suelo no rizosférico. Estos resultados se repitieron con el mutante mus-28, por lo que se puede concluir que las mutaciones en los genes *hlpA* y *hlpB* no mostraron desventaja competitiva en la colonización de la raíz, rizosfera y suelo no rizosférico. Esto implicaría que la función de HlpA es fundamentalmente a nivel de colonización de semillas, mientras que su papel es menos importante en estadios posteriores de desarrollo de la planta. Hasta la fecha, prácticamente no se ha estudiado la secuencia de funciones que se activan/desactivan durante el proceso de colonización. También es posible que la presencia de la cepa parental compense de alguna manera el defecto del mutante.

5. EL HIERRO FAVORECE LA ADHESIÓN DE *P. putida* KT2440 A SEMILLAS DE MAÍZ.

Diferentes investigaciones han establecido una conexión entre adhesión bacteriana a superficies y disponibilidad de hierro. Ciertos mutantes de *P. fluorescens* afectados en formación de biofilm pueden ser rescatados por adición de hierro al medio (O'Toole y Kolter, 1998). Una investigación reciente mostró que la lactoferrina humana, un fuerte quelante de hierro, inhibía el desarrollo de biofilm en *P. aeruginosa* (Singh et al., 2002). La adquisición de hierro ferroso a través de la proteína de membrana FeoB es esencial para la completa virulencia y colonización de tejidos hospedadores por *E. coli* y otros patógenos (Stojiljkovic et al., 1993; Velayudhan et al., 2000). Este paralelismo puede ser contrastado con los resultados presentados en este trabajo para *P. putida*, con HlpA ejerciendo un papel algo análogo a FeoB en bacterias patógenas. Mediante estudios de adhesión con semillas de maíz que habían sido preincubadas con un quelante de hierro, 2,2'-bipiridina, que secuestra el hierro presente en las semillas, se pudo determinar que el hierro contenido tenía un efecto en la adhesión bacteriana. Los resultados obtenidos nos indicaron que la preincubación de semillas con dicho quelante resultó en una reducción significativa en la colonización de semillas por *P. putida* KT2440R. Se obtuvieron los mismos resultados cuando se utilizó el quelante 8-hidroxiquinolina. Igualmente se comprobó que la reducida adhesión no era debida a efectos tóxicos de este compuesto heterocíclico realizando el mismo ensayo de adhesión pero con semillas preincubadas con el compuesto 4,4'-bipiridina, de estructura similar al 2,2'-bipiridina, y con semillas incubadas con el quelante 2,2'-bipiridina más un suplemento de hierro. De esta manera, se pudo verificar que el efecto era debido al secuestro del hierro por los quelantes y que el hierro presente en las semillas actúa como una señal quimiotáctica, determinando la capacidad de las células bacterianas de percibir la presencia de la semilla.

Se pudo comprobar también que el hierro presente en semillas es importante en las etapas iniciales del proceso de colonización. Estos datos reflejan una similitud entre adhesión a semillas y las primeras etapas que se dirigen a la formación de biofilm por *Pseudomonas* en superficies abióticas (Davery y O'Toole, 2000; Sauer et al., 2002; Es-

pinosa-Urgel y Ramos, 2003; Molina *et al.*, 2003). Parte de esta población adherida llegará entonces a adherirse firmemente o irreversiblemente y permitirá el desarrollo del biofilm. En el caso de la colonización de semillas, estas dos etapas pueden ser también distinguidas, así el 2,7% de bacterias inoculadas son recogidas de la superficie de una semilla después de 1 hora, pero sólo una quinta parte de ellas se adhiere firmemente. El hierro de las semillas parece jugar un papel en la iniciación de la interacción bacteria-semilla antes que en la transición de adhesión irreversible, mientras que la proporción de bacterias adheridas irreversiblemente frente a reversibles se mantiene en presencia de quelante.

Sin embargo, los datos citados anteriormente no sirvieron para discernir si el hierro unido a la semilla actúa como un quimioatrayente, o si su papel está directamente relacionado al proceso de adhesión. La primera posibilidad implicaría que el hierro es liberado de la semilla y detectado por células planctónicas, permitiendo su desplazamiento hacia la superficie de la semilla. Se estimó el hierro contenido de exudados de semillas, obtenido después de la incubación de semillas en un medio mínimo MB2 deficiente en hierro (Gilleland *et al.*, 1974), mediante una reacción colorimétrica con 2,2'-bipiridina, apareciendo un halo de color rojo alrededor del cotiledón.

6. UN MUTANTE EN EL SISTEMA TonB DE *P. putida* KT2440 ESTÁ AFECTADO EN LA ADHESIÓN A SEMILLA.

Las bacterias han desarrollado varias estrategias para combatir bajos niveles de hierro celular y uno de los más comunes es la secreción de compuestos quelantes de hierro llamados sideróforos. Estos compuestos de bajo peso molecular tienen una elevada afinidad por iones hierro (Lamont *et al.*, 2002; Visca *et al.*, 2002). Una característica de *P. putida* y otras especies de este género es que poseen un elevado número de sistemas de captación de hierro por la vía del transporte de sideróforos como la pioverdina (Martínez-Bueno *et al.*, 2002), el cual tiene una elevada afinidad por iones Fe^{2+} y Fe^{3+} . *Pseudomonas aeruginosa* secreta dos tipos de sideróforos, pioverdina y pioquelina. La competición por el hierro es un factor importante en la rizosfera. La capacidad para adquirir hierro acomplejado producido por el mismo, así como sideróforos heterólogos ha

sido propuesto ser clave para sus éxitos como colonizadores de la rizosfera (Loper and Henkels, 1997, 1999), y mutantes incapaces de producir pioverdina o afectados en la captación de hierro mostraron una desventaja competitiva en la rizosfera y esfermosfera (Mirleau *et al.*, 2000; Molina *et al.*, 2004). Los sistemas de captación de sideróforos requieren activación por proteínas del sistema TonB, el cual está formado por tres componentes, ExbB, ExbD y TonB. Mutantes de *P. putida* y *P. aeruginosa* en *exbB*, *exbD* o *tonB* mostraron reducida captación de hierro y su crecimiento está severamente limitado en medio deficiente de hierro (Poole *et al.*, 1996; Godoy *et al.*, 2001, 2004). Mediante ensayos de adhesión se pudo demostrar que una deficiencia en el sistema TonB resultó en una limitada capacidad de adhesión a semillas, como una consecuencia del reducido transporte y detección de hierro por las células bacterianas.

Además de su papel en adquisición de hierro, TonB participa en otros procesos, como resistencia a disolventes y antibióticos a través de la actividad de bombas de eflujo (Zhao *et al.*, 1998; Godoy *et al.*, 2001, 2004). En base a los resultados arriba discutidos proponemos que TonB participa en la adhesión a semillas y sugiere que su papel está relacionado con la detección y/o transporte de Fe^{2+} .

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en este trabajo permiten establecer las siguientes conclusiones:

1. Los genes del sistema TPS de *Pseudomonas putida* KT2440 están organizados en una unidad transcripcional: *orf1-orf2-hlpB-hlpA* bajo el control del promotor P_{hlp} , situado en 5' de *orf1*. Este promotor presenta la secuencia consenso de promotores reconocidos por el factor de transcripción σ^{70} .
2. La expresión de los genes *hlp* está ligeramente influenciada por la fase de crecimiento celular, siendo la mayor en fase de crecimiento estacionaria, y su expresión no se ve influenciada por la concentración de hierro en el medio de cultivo.
3. El sistema TPS en *P. putida* KT2440 está involucrado en la captación del hierro, así como en la colonización de semillas, como se deduce de los fenotipos observados en los mutantes *mus-27* y *mus-28*.
4. La proteína de membrana externa HlpA, atraviesa la membrana interna a través de la ruta de secreción dependiente de la proteína Sec y una vez en el periplasma se exporta a la superficie de la membrana externa, por medio del transportador de membrana externa HlpB. La proteína HlpA adquiere su conformación activa y madura quedando asociada a la membrana externa para desempeñar su función en la colonización a semillas y captura de hierro.
5. La ausencia de las proteínas Hlp provoca un aumento en la sensibilidad celular a compuestos quelantes de hierro, sobre todo, al compuesto 2,2-bipiridina, siendo el más afectado el mutante *hlpA*, incapaz de crecer en un medio con una concentración superior a 0,5 mM de 2,2'-bipiridina. Bajo estas condiciones se observó también un aumento en la producción de sideróforos (pioverdina) como consecuencia de la limitación de hierro en el medio.

6. Las mutaciones en los genes *hlp* dieron lugar a alteraciones en la membrana externa bacteriana. Estas alteraciones se hicieron evidentes al analizar los mutantes *hlp* mediante microscopía electrónica de transmisión y de barrido. Dichos mutantes presentaban con frecuencia vesículas de membrana en su superficie celular. La formación de vesículas de membrana fue más frecuente en el mutante mus-27 que en mus-28, sobre todo en presencia de 2,2'-bipiridina.
7. Las mutaciones en los genes *hlpA* y *hlpB* no mostraron desventaja competitiva en la colonización de la raíz, rizosfera y suelo no rizosférico.
8. El hierro presente en las semillas de maíz juega un papel clave en el proceso de adhesión y colonización bacteriana de *P. putida*, actuando como señal y promoviendo el establecimiento de las interacciones planta-*P. putida*.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

Altschul, S. F., W. Gish, W. Miller, E. W. Myers, and D. J. Lipman. 1990. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* **215**: 403-410.

Altschul, S. F., T. L. Madden, A. A. Schaffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller, and D. J. Lipman. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* **25**: 3389-3402.

Anderson, T. F. 1951. Techniques for the preservation of three-dimensional structure in preparing specimens for the electron microscope. *Trans. N. Y. Acad. Sci.* **13**: 130.

Ausubel, F. M., Brent R., Kingston R.E., Moore D.D, Seidman J.G., Smith J.A., and Struhl K. 1991. *Current protocols in molecular biology.* Greene Publishing Associated. New York.

Bagdasarian, M., R. Lurz, B. Ruckert, F. C. Franklin, M. M. Bagdasarian, J. Frey, and K. N. Timmis. 1981. Specific-purpose plasmid cloning vectors. II. Broad host range, high copy number, RSF1010-derived vectors, and a host-vector system for gene cloning in *Pseudomonas*. *Gene* **16**: 237-247.

Bagdasarian, M. and K. N. Timmis. 1982. Host: vector systems for gene cloning in *Pseudomonas*. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **96**: 47-67.

Bagg, A. and J. B. Neilands. 1987. Ferric uptake regulation protein acts as a repressor, employing iron (II) as a cofactor to bind the operator of an iron transport operon in *Escherichia coli*. *Biochemistry* **26**: 5471-5477.

Barber, D. A. and Martín J.K. 1976. The release of organic substances by cereal roots into the soil. *New Phytol.* **76**: 68-80.

Barber, D. A. and Lynch J.M. 1977. Microbial growth in the rhizosphere. *Soil Biochem.* **9**: 305-308.

Barenkamp, S. J. and G. J. St, III. 1994. Genes encoding high-molecular-weight adhesion proteins of nontypeable *Haemophilus influenzae* are part of gene clusters. *Infect. Immun.* **62**: 3320-3328.

Bauber, W. D. and Caetano-Anolles G. 1991. Chemotaxis, induced gene expression and competitiveness in the rhizosphere. *The Rhizosphere and plant growth.* Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands. En D.I. Kleister and P. B. Cregan (ed).: 155-162

Bayliss, C., E. Bent, D. E. Culham, S. MacLellan, A. J. Clarke, G. L. Brown, and J. M. Wood. 1997. Bacterial genetic loci implicated in the *Pseudomonas putida* GR12-2R3--*canola* mutualism: identification of an exudate-inducible sugar transporter. *Can. J. Microbiol.* **43**: 809-818.

Benizri, E., A. Schoeny, C. Picard, A. Courtade, and A. Guckert. 1997. External and Internal Root Colonization of Maize by Two *Pseudomonas* Strains: Enumeration by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay(ELISA). *Curr. Microbiol.* **34**: 297-302.

Bernadac, A., M. Gavioli, J. C. Lazzaroni, S. Raina, and R. Lloubes. 1998. *Escherichia coli* tol-pal mutants form outer membrane vesicles. *J. Bacteriol.* **180**: 4872-4878.

- Beveridge, T. J.** 1999. Structures of gram-negative cell walls and their derived membrane vesicles. *J. Bacteriol.* **181**: 4725-4733.
- Bitter, W., J. Tommassen, and P. J. Weisbeek.** 1993. Identification and characterization of the *exbB*, *exbD* and *tonB* genes of *Pseudomonas putida* WCS358: their involvement in ferric-pseudobactin transport. *Mol. Microbiol.* **7**: 117-130.
- Bloemberg, G. V., G. A. O'Toole, B. J. Lugtenberg, and R. Kolter.** 1997. Green fluorescent protein as a marker for *Pseudomonas* spp. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**: 4543-4551.
- Blumenthals, I. I., Skaja A.K., Kelly R.M., Clem T.R., and Shiloach J.** 1987. Effect of culturing conditions on the production of exotoxin A by *Pseudomonas aeruginosa*. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **506**: 663-668.
- Bowen, G. D. and Rovira A.D.** 1976. Microbial colonization of plant roots. *Annu. Rev. Phytopathol.* **14**: 121-144.
- Braun, V., H. Gunther, B. Neuss, and C. Tautz.** 1985. Hemolytic activity of *Serratia marcescens*. *Arch. Microbiol.* **141**: 371-376.
- Braun, V. and Wu H.C.** 1994. Lipoproteins, structure, function, biosynthesis and model for protein export. p. 319-341. En J.M. Ghuyssen and R. Hakenbeck (ed), *Bacterial cell wall*. Elsevier, Amsterdam.
- Braun, V.** 1995. Energy-coupled transport and signal transduction through the gram-negative outer membrane via TonB-ExbB-ExbD-dependent receptor proteins. *FEMS Microbiol. Rev.* **16**: 295-307.
- Braun, V. and H. Killmann.** 1999. Bacterial solutions to the iron-supply problem. *Trends Biochem. Sci.* **24**: 104-109.
- Breslauer, K. J., R. Frank, H. Blocker, and L. A. Marky.** 1986. Predicting DNA duplex stability from the base sequence. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **83**: 3746-3750.
- Brillard, J., E. Duchaud, N. Boemare, F. Kunst, and A. Givaudan.** 2002. The PhIA hemolysin from the entomopathogenic bacterium *Photobacterium luminescens* belongs to the two-partner secretion family of hemolysins. *J. Bacteriol.* **184**: 3871-3878.
- Buell, C. R., V. Joardar, M. Lindeberg, J. Selengut, I. T. Paulsen, M. L. Gwinn, R. J. Dodson, R. T. DeBoy, A. S. Durkin, J. F. Kolonay, R. Madupu, S. Daugherty, L. Brinkac, M. J. Beanan, D. H. Haft, W. C. Nelson, T. Davidsen, N. Zafar, L. Zhou, J. Liu, Q. Yuan, H. Khouri, N. Fedorova, B. Tran, D. Russell, K. Berry, T. Utterback, S. E. Van Aken, T. V. Feldblyum, M. D'Ascenzo, W. L. Deng, A. R. Ramos, J. R. Alfano, S. Cartinhour, A. K. Chatterjee, T. P. Delaney, S. G. Lazarowitz, G. B. Martin, D. J. Schneider, X. Tang, C. L. Bender, O. White, C. M. Fraser, and A. Collmer.** 2003. The complete genome sequence of the Arabidopsis and tomato pathogen *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **100**: 10181-10186.
- Burr, T. J., Schroth M.N., and Suslow T.** 1978. Increased potato yields by treatment of seedpieces with specific strains of *Pseudomonas fluorescens* and *P. putida*. *Phytopathology* **68**: 1377-1383.
- Caetano-Anolles, G., D. K. Crist-Estes, and W. D. Bauer.** 1988. Chemotaxis of *Rhizobium meliloti* to the plant flavone luteolin requires functional nodulation genes. *J. Bacteriol.* **170**: 3164-3169.

- Chart, H., S. M. Scotland, and B. Rowe.** 1989. Production of vero cytotoxin by *Escherichia coli* and Shiga toxin by *Shigella dysenteriae* 1 as related to the growth medium and availability of iron. *Zentralbl. Bakteriol.* **272**: 1-10.
- Chart, H. and B. Rowe.** 1993. Iron restriction and the growth of *Salmonella enteritidis*. *Epidemiol. Infect.* **110**: 41-47.
- Chet, I., Zilberstein Y., and Henis Y.** 1973. Chemotaxis of *Pseudomonas lachrymans* to plant extracts and to water droplets collected from the surfaces of resistant and susceptible plants. *Physiol. Plant. Pathol.* **3**: 473-479.
- Ciafardini G. and Marotta G.** 1989. Use de most-probable number technique to detect *Polymixa batae* (Plasmodiophromycetes) in soil. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**: 1273-1278.
- Coulson, R. A., T. D. Coulson, J. D. Herbert, and M. A. Staton.** 1987. Protein nutrition in the alligator. *Comp Biochem. Physiol A* **87**: 449-459.
- Cox, C. D., K. L. Rinehart, Jr., M. L. Moore, and J. C. Cook, Jr.** 1981. Pyochelin: novel structure of an iron-chelating growth promoter for *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **78**: 4256-4260.
- Crosa, J. H.** 1989. Genetics and molecular biology of siderophore-mediated iron transport in bacteria. *Microbiol. Rev.* **53**: 517-530.
- Crosa, J. H.** 1997. Signal transduction and transcriptional and posttranscriptional control of iron-regulated genes in bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **61**: 319-336.
- Crowley, D. E., Alvey S., and Gilbert E.S.** 1997. Rhizosphere ecology of xenobiotic-degrading microorganisms., En: *Phytoremediation of Soil and Water Contaminants*. p.i. 19. E.L. Kruger, T.A Anderson y J.R. Coats (ed.). ACS Symposium Series 664. American Chemical Society, Washington D.C.
- Curl, E. A. and Truelove B.** 1986. *The rhizosphere*. Springer-Verlag, Berlín. Heidelberg.
- Dai, J. H., Y. S. Lee, and H. C. Wong.** 1992. Effects of iron limitation on production of a siderophore, outer membrane proteins, and hemolysin and on hydrophobicity, cell adherence, and lethality for mice of *Vibrio parahaemolyticus*. *Infect. Immun.* **60**: 2952-2956.
- Davey, M. E. and G. A. O'Toole.** 2000. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **64**: 847-867.
- de Weger L.A., A. J. van der Bij, L. C. Dekkers, M. Simons, Wijffelman C.A., and B. Lugtenberg.** 1995. Colonization of rhizosphere of crop plants by plant-beneficial *pseudomonas*. *FEMS Microbiol. Ecol.* **17**: 221-228.
- de Weger, L. A., d. van, V, A. H. Wijfjes, P. A. Bakker, B. Schippers, and B. Lugtenberg.** 1987. Flagella of a plant-growth-stimulating *Pseudomonas fluorescens* strain are required for colonization of potato roots. *J. Bacteriol.* **169**: 2769-2773.
- de Weger, L. A., Bakker P.A.H.M., Schippers B., van Loosdrecht M.C.M., and B. J. J. Lugtenberg.** 1989. *Pseudomonas* spp. with mutational changes in the O-antigenic side chain of their lipopolysaccharide are effected in their ability to colonize potato roots. p. 197-202. En: *Signal Molecules in Plant-Microbe Interactions*. B.J.J. Lugtenberg, ed. NATO ASI Series, Vol, H36. Springer-Verlag, Berlín.

- de, L., V. M. Herrero, U. Jakubzik, and K. N. Timmis.** 1990. Mini-Tn5 transposon derivatives for insertion mutagenesis, promoter probing, and chromosomal insertion of cloned DNA in gram-negative eubacteria. *J. Bacteriol.* **172**: 6568-6572.
- de, L., V and K. N. Timmis.** 1994. Analysis and construction of stable phenotypes in gram-negative bacteria with Tn5- and Tn10-derived minitransposons. *Methods Enzymol.* **235**: 386-405.
- DeFlaun, M. F., Tanzer A.S., McAteer A.L., Marshall B., and Levy S.B.** 1990. Development of an adhesion assay and characterization of an adhesion-deficient mutant of *Pseudomonas fluorescens*. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**: 112-119.
- Dekkers, L. C., C. J. Bloemendaal, L. A. de Weger, C. A. Wijffelman, H. P. Spaink, and B. J. Lugtenberg.** 1998. A two-component system plays an important role in the root-colonizing ability of *Pseudomonas fluorescens* strain WCS365. *Mol. Plant Microbe Interact.* **11**: 45-56.
- Dekkers, L. C., A. J. van der Bij, I. H. Mulders, C. C. Phoelich, R. A. Wentwoord, D. C. Glandorf, C. A. Wijffelman, and B. J. Lugtenberg.** 1998. Role of the O-antigen of lipopolysaccharide, and possible roles of growth rate and of NADH:ubiquinone oxidoreductase (nuo) in competitive tomato root-tip colonization by *Pseudomonas fluorescens* WCS365. *Mol. Plant Microbe Interact.* **11**: 763-771.
- Delgado, A., E. Duque, and J. L. Ramos.** 1992. Behavior in agricultural soils of a recombinant *Pseudomonas* bacterium that simultaneously degrades alkyl- and haloaromatics. *Microb. Releases* **1**: 23-28.
- Dennis, J. J. and G. J. Zylstra.** 1998. Improved antibiotic-resistance cassettes through restriction site elimination using Pfu DNA polymerase PCR. *Biotechniques* **25** : 772-4, 776.
- Desai, P. J., E. Garges, and C. A. Genco.** 2000. Pathogenic neisseriae can use hemoglobin, transferrin, and lactoferrin independently of the tonB locus. *J. Bacteriol.* **182**: 5586-5591.
- Dharmatilake, A. and Bauer W.** 1992. Chemotaxis of *Rhizobium meliloti* towards Nodulation Gene-Inducing Compounds. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**: 1153-1158.
- Domínguez-Cuevas, P. and Marqués S.** 2004. Compiling σ^{70} -dependent promoters. The *Pseudomonads*. Vol II: Virulence and gene regulation. Kluwer Publishing. 273-292.
- Drahos, D. J., B. C. Barry, B. C. Hemming, E. J. Brandt, and H. D. Skipper.** 1988. Prerelease testing procedures: US field test of a lacZY-engineered soil bacterium, p. 181-191. En: C.H. Collins, F.A. Skinner, M. Sussman, and D.E. Stewart-Tull (eds.), *Proc. Int. Conf. Realease Genet. Eng. Micro-Org. (REGEM 1)*, 1st, Cardiff, South Wales, Academic, San Diego.
- Duffy, B. K. and G. Defago.** 1999. Environmental factors modulating antibiotic and siderophore biosynthesis by *Pseudomonas fluorescens* biocontrol strains. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 2429-2438.
- Earhart, C. F.** 1996. Uptake and metabolism of iron and molybdenum. En: *Escherichia coli and Salmonella cellular and molecular biology*, vol.1. Neidhart, F.C., R. Cutiss, J.L. Ingraham, E.C.C. Lin, K.B. Magasanik, et al. (eds). Washington, D.C.. American Society for Microbiol. Press. Capítulo 71, p. 1075-1090.
- Economou, A., W. D. Hamilton, A. W. Johnston, and J. A. Downie.** 1990. The *Rhizobium* nodulation gene nodO encodes a Ca²⁺(+)-binding protein that is exported without N-terminal cleavage and is homologous to haemolysin and related proteins. *EMBO J.* **9**: 349-354.

- Eguchi, L. A. and P. Saltman.** 1984. The aerobic reduction of Fe(III) complexes by hemoglobin and myoglobin. *J. Biol. Chem.* **259**: 14337-14338.
- Enderle, P. J. and M. A. Farwell.** 1998. Electroporation of freshly plated *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* cells. *Biotechniques* **25**: 954-6, 958.
- Espinosa-Urgel, M., A. Salido, and J. L. Ramos.** 2000. Genetic analysis of functions involved in adhesion of *Pseudomonas putida* to seeds. *J. Bacteriol.* **182**: 2363-2369.
- Espinosa-Urgel, M. and Ramos J.L.** 2003. Genetics of biofilm formation, En *Biofilms in Medicine, Industry and Environmental Biotechnology*. Lens, P., Moran, A.P., Mahony, T., Stoodley, P., y O'Flaherty, V. (ed.), London, UK: IWA Publishing, pp. 47-62.
- Espinosa-Urgel, M. and M.I. Ramos-González.** 2004. In vivo gene expression: The IVET system. En: *The Pseudomonads. Vol I: Genomic, Life style and molecular architecture*. Kluwer Publishing. 351-366.
- Espinosa-Urgel, M. and J. L. Ramos.** 2004. Cell density-dependent gene contributes to efficient seed colonization by *Pseudomonas putida* KT2440. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**: 5190-5198.
- Esteve-Nuñez, A., A. Caballero, and J.L. Ramos.** 2001. Biological degradation of 2,4,6-trinitrotoluene. *Microb. Mol. Biol. Rev.* **65**: 335-352.
- Fernandez-Beros, M. E., C. Gonzalez, M. A. McIntosh, and F. C. Cabello.** 1989. Immune response to the iron-deprivation-induced proteins of *Salmonella typhi* in typhoid fever. *Infect. Immun.* **57**: 1271-1275.
- Fields, P. I., R. V. Swanson, C. G. Haidaris, and F. Heffron.** 1986. Mutants of *Salmonella typhimurium* that cannot survive within the macrophage are avirulent. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **83**: 5189-5193.
- Franklin, F. C., M. Bagdasarian, M. M. Bagdasarian, and K. N. Timmis.** 1981. Molecular and functional analysis of the TOL plasmid pWVO 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.
- Fung, J., T. J. MacAlister, and L. I. Rothfield.** 1978. Role of murein lipoprotein in morphogenesis of the bacterial division septum: phenotypic similarity of lkyD and lpo mutants. *J. Bacteriol.* **133**: 1467-1471.
- Garcia-Valdes, E., E. Cozar, R. Rotger, J. Lalucat, and J. Ursing.** 1988. New naphthalene-degrading marine *Pseudomonas* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**: 2478-2485.
- Genco, C. A. and P. J. Desai.** 1996. Iron acquisition in the pathogenic *Neisseria*. *Trends Microbiol.* **4**: 179-184.
- Gibson, D. T. and V. Subramanian.** 1984. Microbial degradation of aromatic hydrocarbons, En D.T.Gibson (ed.), *Microbial degradation of organic compounds*. Marcel Dekker, Inc., New York.
- Gibson, D. T., G. J. Zylstra, and S. Chauhan.** 1990. Biotransformations catalyzed by toluene doxygenase from *Pseudomonas putida* F1, p. 121-132. En S. Silver, A. M. Chakrabarty, B. Iglewski, and S. Kaplan (eds.), *Pseudomonas: biotransformations, pathogenesis and evolving biotechnology*. American Society for Microbiology, Washington, D.C.

- Gilleland, H. E., Jr., J. D. Stinnett, and R. G. Eagon.** 1974. Ultrastructural and chemical alteration of the cell envelope of *Pseudomonas aeruginosa*, associated with resistance to ethylenediaminetetraacetate resulting from growth in a Mg²⁺-deficient medium. *J. Bacteriol.* **117**: 302-311.
- Godoy, P., M. I. Ramos-Gonzalez, and J. L. Ramos.** 2001. Involvement of the TonB system in tolerance to solvents and drugs in *Pseudomonas putida* DOT-T1E. *J. Bacteriol.* **183**: 5285-5292.
- Godoy, P., M. I. Ramos-Gonzalez, and J. L. Ramos.** 2004. *Pseudomonas putida* mutants in the *exbBexbDtonB* gene cluster are hypersensitive to environmental and chemical stressors. *Environ. Microbiol.* **6**: 605-610.
- Gonnet, G. H., M. A. Cohen, and S. A. Benner.** 1992. Exhaustive matching of the entire protein sequence database. *Science* **256**: 1443-1445.
- Gray-Owen, S. D. and A. B. Schryvers.** 1996 . Bacterial transferrin and lactoferrin receptors. *Trends Microbiol.* **4**: 185-191.
- Guedin, S., E. Willery, J. Tommassen, E. Fort, H. Drobecq, C. Locht, and F. Jacob-Dubuisson.** 2000. Novel topological features of FhaC, the outer membrane transporter involved in the secretion of the *Bordetella pertussis* filamentous hemagglutinin. *J. Biol. Chem.* **275**: 30202-30210.
- Guerinot, M. L.** 1994. Microbial iron transport. *Annu. Rev. Microbiol.* **48**: 743-772.
- Hamlen, R. A., Lukezic F.C., and Bloom J.R.** 1972. Influence of age and stage of development of the neutral carbohydrate components in root exudates from alfalfa plants grown in gnotobiotic environment. *Can. J. Plant.*
- Hancock, R. E., R. Siehnel, and N. Martin.** 1990. Outer membrane proteins of *Pseudomonas*. *Mol. Microbiol.* **4**: 1069-1075.
- Hattermann, D. R. and S. M. Ries.** 1989. Motility of *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* and its role in infection. *Phytopathology* **79**: 284-289.
- Herrero, M., L. de, V, and K. N. Timmis.** 1990. Transposon vectors containing non-antibiotic resistance selection markers for cloning and stable chromosomal insertion of foreign genes in gram-negative bacteria. *J. Bacteriol.* **172**: 6557-6567.
- Hertle, R., S. Brutsche, W. Groeger, S. Hobbie, W. Koch, U. Konninger, and V. Braun.** 1997. Specific phosphatidylethanolamine dependence of *Serratia marcescens* cytotoxin activity. *Mol. Microbiol.* **26**: 853-865.
- Hirono, I., N. Tange, and T. Aoki.** 1997. Iron-regulated haemolysin gene from *Edwardsiella tarda*. *Mol. Microbiol.* **24**: 851-856.
- Howell, M. L., E. Alsabbagh, J. F. Ma, U. A. Ochsner, M. G. Klotz, T. J. Beveridge, K. M. Blumenthal, E. C. Niederhoffer, R. E. Morris, D. Needham, G. E. Dean, M. A. Wani, and D. J. Hassett.** 2000. AnkB, a periplasmic ankyrin-like protein in *Pseudomonas aeruginosa*, is required for optimal catalase B (KatB) activity and resistance to hydrogen peroxide. *J. Bacteriol.* **182**: 4545-4556.
- Hueck, C. J.** 1998. Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**: 379-433.

- Iain, L. L., Beare P.A., Ochsner U., I. Vasil A, and Vasil M.L.** 2002. Shiderophore-mediated signaling regulates virulence factor production in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology* **99**: 7072-7077.
- Inoue, A. and K. Horikoshi.** 1989. A *Pseudomonas* that thrives in high concentration of toluene. *Nature (London)* **338**: 264-266.
- Jacob-Dubuisson, F., C. Buisine, N. Mielcarek, E. Clement, F. D. Menozzi, and C. Locht.** 1996. Amino-terminal maturation of the *Bordetella pertussis* filamentous haemagglutinin. *Mol. Microbiol.* **19**: 65-78.
- Jacob-Dubuisson, F., C. Locht, and R. Antoine.** 2001. Two-partner secretion in Gram-negative bacteria: a thrifty, specific pathway for large virulence proteins. *Mol. Microbiol.* **40**: 306-313.
- Jacob-Dubuisson, F., R. Fernandez, and L. Coutte.** 2004. Protein secretion through autotransporter and two-partner pathways. *Biochim. Biophys. Acta* **1694**: 235-257.
- Jacobs, J. W. and R. B. Walker.** 1977. Localization of iron in *Vigna sinensis* L. and *Zea mays* L. *J. Agric. Food Chem.* **25**: 803-806.
- Jishage, M., A. Iwata, S. Ueda, and A. Ishihama.** 1996. Regulation of RNA polymerase sigma subunit synthesis in *Escherichia coli*: intracellular levels of four species of sigma subunit under various growth conditions. *J. Bacteriol.* **178**: 5447-5451.
- Kageyama, K. and E. B. Nelson.** 2003. Differential inactivation of seed exudate stimulation of *Pythium ultimum* sporangium germination by *Enterobacter cloacae* influences biological control efficacy on different plant species. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**: 1114-1120.
- Kajava, A. V., N. Cheng, R. Cleaver, M. Kessel, M. N. Simon, E. Willery, F. Jacob-Dubuisson, C. Locht, and A. C. Steven.** 2001. Beta-helix model for the filamentous haemagglutinin adhesin of *Bordetella pertussis* and related bacterial secretory proteins. *Mol. Microbiol.* **42**: 279-292.
- Kaniga, K., I. Delor, and G. R. Cornelis.** 1991. A wide-host-range suicide vector for improving reverse genetics in gram-negative bacteria: inactivation of the *blaA* gene of *Yersinia enterocolitica*. *Gene* **109**: 137-141.
- Kellerhals, M. B., B. Kessler, and B. Witholt.** 1999. Closed-loop control of bacterial high-cell-density fed-batch cultures: production of mcl-PHAs by *Pseudomonas putida* KT2442 under single-substrate and cofeeding conditions. *Biotechnol. Bioeng.* **65**: 306-315.
- Kessler, B., L. de, V, and K. N. Timmis.** 1992. A general system to integrate *lacZ* fusions into the chromosomes of gram-negative eubacteria: regulation of the Pm promoter of the TOL plasmid studied with all controlling elements in monocopy. *Mol. Gen. Genet.* **233**: 293-301.
- Klein, D. A., Frederick B., Biondini M., and Trlica M.J.** 1988. Rhizosphere microorganism effects on soluble amino acids, sugars and organic acids in the root zone of *Agropyron cristatum*, *A. smithii* and *Bouteloua gracilis*. *Plant Soil* **110**: 19-25.
- Kloepper J.W., Hume D.J., Scher F.M, Singleton C., Tipping B., Laliberte M., Frauley T., Kutshaw T., Simonson C., Lifshitz R., Zaleska I., and Lee L.** 1988. Plant growth-promoting rhizobacteria on Canola (Rapeseed). *Plant Disease* **72**: 42-46.

- Kloepper, J. W. and Schroth M.N.** 1978. Plant growth promoting rhizobacteria on radishes. Proc. 4th Int. Conf. Plant Pathogenic Bacteria **2**: 879-882.
- Kloepper, J. W., Schroth M.N., and Miller T.D.** 1980. Effects of rhizosphere colonization by plant growth-promoting rhizobacteria on potato plant development and yield. Phytopathology **70**: 1078-1082.
- Kobayashi, H., K. Uematsu, H. Hirayama, and K. Horikoshi.** 2000. Novel toluene elimination system in a toluene-tolerant microorganism. J. Bacteriol. **182**: 6451-6455.
- Konninger, U. W., S. Hobbie, R. Benz, and V. Braun.** 1999. The haemolysin-secreting ShIB protein of the outer membrane of *Serratia marcescens*: determination of surface-exposed residues and formation of ion-permeable pores by ShIB mutants in artificial lipid bilayer membranes. Mol. Microbiol. **32**: 1212-1225.
- Kraak, M. N., T. H. Smits, B. Kessler, and B. Witholt.** 1997. Polymerase C1 levels and poly(R-3-hydroxyalkanoate) synthesis in wild-type and recombinant *Pseudomonas* strains. J. Bacteriol. **179**: 4985-4991.
- Laemmli, U. K.** 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature **227**: 680-685.
- Lamont, I. L., P. A. Beare, U. Ochsner, A. I. Vasil, and M. L. Vasil.** 2002. Siderophore-mediated signaling regulates virulence factor production in *Pseudomonas aeruginosa*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A **99**: 7072-7077.
- Lange, R. and R. Hengge-Aronis.** 1991. Identification of a central regulator of stationary-phase gene expression in *Escherichia coli*. Mol. Microbiol. **5**: 49-59.
- Lebek, G. and H. M. Gruenig.** 1985. Relation between the hemolytic property and iron metabolism in *Escherichia coli*. Infect. Immun. **50**: 682-686.
- Li, Z., A. J. Clarke, and T. J. Beveridge.** 1998. Gram-negative bacteria produce membrane vesicles which are capable of killing other bacteria. J. Bacteriol. **180**: 5478-5483.
- Llamas, M. A., J. L. Ramos, and J. J. Rodriguez-Herva.** 2000. Mutations in each of the tol genes of *Pseudomonas putida* reveal that they are critical for maintenance of outer membrane stability. J. Bacteriol. **182**: 4764-4772.
- Locht, C., R. Antoine, and F. Jacob-Dubuisson.** 2001. *Bordetella pertussis*, molecular pathogenesis under multiple aspects. Curr. Opin. Microbiol. **4**: 82-89.
- Loh, J., E. A. Pierson, L. S. Pierson, III, G. Stacey, and A. Chatterjee.** 2002. Quorum sensing in plant-associated bacteria. Curr. Opin. Plant Biol. **5**: 285-290.
- Loper, J. E. and M. D. Henkels.** 1997. Availability of iron to *Pseudomonas fluorescens* in rhizosphere and bulk soil evaluated with an ice nucleation reporter gene. Appl. Environ. Microbiol. **63**: 99-105.
- Loper, J. E. and M. D. Henkels.** 1999. Utilization of heterologous siderophores enhances levels of iron available to *Pseudomonas putida* in the rhizosphere. Appl. Environ. Microbiol. **65**: 5357-5363.
- Loper, J. L., Suslow T.V., and Schroth M.N.** 1984. Lognormal distribution of bacterial populations in the rhizosphere. Phytopathology **74**: 1454-1460.

- Lopez-de-Victoria, G. and Novell C.** 1993. Chemotaxis of *Azospirillum* species to aromatic compounds. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**: 2951-2955.
- Loveless, B. J. and M. H. Saier, Jr.** 1997. A novel family of channel-forming, autotransporting, bacterial virulence factors. *Mol. Membr. Biol.* **14**: 113-123.
- Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr, and R. J. Randall.** 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**: 265-275.
- Lugtenberg, B. J., L. V. Kravchenko, and M. Simons.** 1999. Tomato seed and root exudate sugars: composition, utilization by *Pseudomonas* biocontrol strains and role in rhizosphere colonization. *Environ. Microbiol.* **1**: 439-446.
- Lugtenberg, B. J. J., de Weger L.A., and Bennet J.W.** 1991. Microbial stimulation of plant growth and protection from disease. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2**: 457-464.
- Lugtenberg, B. J. J. and Bloemberg G.V.** 2004. Life in the rhizosphere., *The Pseudomonads. Vol.I: Genomics, life style and molecular architecture.* Kluwert Publishing 403-430.
- Lussenhop J., Fogel R., and Pregitzer K.** 1991. A new dawn for soil biology: video analysis of root soil microbial faunal interactions. *Agric. Ecosyst. Environ.* **34**: 235-249.
- Lynch, J. M.** 1982. Interaction between bacteria and plants in the root environment., 264pp. En: F.A.M.E. Skinner (ed.), *Bacteria and Plants.* Academic. London.
- Lynch, J. M. and Wipps J.M.** 1990. Substrate flows in the rhizosphere. 386pp. En: P.B. Cregan D.L. Kister (ed.), *The Rhizosphere and Plant Growth.* Kluwer, Dordrecht, The Netherlands. ed.
- Lynch, J. M.** 1991. Microbial metabolites, p. 177-206. En J.M. Lynch (ed.), *The Rhizosphere,* Wiley, Chichester.
- Makhov, A. M., J. H. Hannah, M. J. Brennan, B. L. Trus, E. Kocsis, J. F. Conway, P. T. Wingfield, M. N. Simon, and A. C. Steven.** 1994. Filamentous hemagglutinin of *Bordetella pertussis*. A bacterial adhesin formed as a 50-nm monomeric rigid rod based on a 19-residue repeat motif rich in beta strands and turns. *J. Mol. Biol.* **241**: 110-124.
- Maniatis, T., Fritsch E.F., and Sambrook J.** 1982. *Molecular cloning: a laboratory manual.* Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York.
- Marck, C.** 1988. 'DNA Strider' : a 'C' program for the fast analysis of DNA and protein sequences on the Apple Macintosh family of computers. *Nucleic Res.* **16**: 1829-1836.
- Marsh, J. L., M. Erfle, and E. J. Wykes.** 1984. The pIC plasmid and phage vectors with versatile cloning sites for recombinant selection by insertional inactivation. *Gene* **32**: 481-485.
- Martinez-Bueno, M. A., R. Tobes, M. Rey, and J. L. Ramos.** 2002. Detection of multiple extracytoplasmic function (ECF) sigma factors in the genome of *Pseudomonas putida* KT2440 and their counterparts in *Pseudomonas aeruginosa* PA01. *Environ. Microbiol.* **4**: 842-855.
- Mazmanian, S. K., E. P. Skaar, A. H. Gaspar, M. Humayun, P. Gornicki, J. Jelenska, A. Joachmiak, D. M. Missiakas, and O. Schneewind.** 2003. Passage of heme-iron across the envelope of *Staphylococcus aureus*. *Science* **299**: 906-909.
- Meyer, J. M.** 1992. Exogenous siderophore-mediated iron uptake in *Pseudomonas aeruginosa*: possible involvement of porin OprF in iron translocation. *J. Gen. Microbiol.* **138**: 951-958.

- Miller, J.** 1972. Experiments in molecular genetics. Cold Spring Harbor, New York, USA
- Miller, K. J. and J. M. Wood.** 1996. Osmoadaptation by rhizosphere bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* **50**: 101-136.
- Mirleau, P., S. Delorme, L. Philippot, J. Meyer, S. Mazurier, and P. Lemanceau.** 2000. Fitness in soil and rhizosphere of *Pseudomonas fluorescens* C7R12 compared with a C7R12 mutant affected in pyoverdine synthesis and uptake. *FEMS Microbiol. Ecol.* **34**: 35-44.
- Mol, O. and B. Oudega.** 1996. Molecular and structural aspects of fimbriae biosynthesis and assembly in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Rev.* **19**: 25-52.
- Molina, L., Ramos C., Duque E., Ronchel M.C., García J.M., Wyke L., and Ramos J.L.** 2000. Survival of *Pseudomonas putida* KT2440 in soil and in the rhizosphere of plants under greenhouse and environmental conditions. *Soil Biol. Biochem.* **32**: 315-321.
- Molina, M. A., Ramos J.L., and M. Espinosa-Urgel.** 2003. Plant-associated biofilms. *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.* **2**: 99-108.
- Molina, M. A., P. Godoy, M. I. Ramos-Gonzalez, N. Munoz, J. L. Ramos, and M. Espinosa-Urgel.** 2005. Role of iron and the TonB system in colonization of corn seeds and roots by *Pseudomonas putida* KT2440. *Environ. Microbiol.* **7**: 443-449.
- Montesinos, E., A. Bonaterra, E. Badosa, J. Frances, J. Alemany, I. Llorente, and C. Moragrega.** 2002. Plant-microbe interactions and the new biotechnological methods of plant disease control. *Int. Microbiol.* **5**: 169-175.
- Mossialos, D., J. M. Meyer, H. Budzikiewicz, U. Wolff, N. Koedam, C. Baysse, V. Anjaiah, and P. Cornelis.** 2000. Quinolobactin, a new siderophore of *Pseudomonas fluorescens* ATCC 17400, the production of which is repressed by the cognate pyoverdine. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**: 487-492.
- Nakazawa, T.** 2002. Travels of a *Pseudomonas*, from Japan around the world. *Environ. Microbiol.* **4**: 782-786.
- Neilands, J. B.** 1982. Microbial envelope proteins related to iron. *Annu. Rev. Microbiol.* **36**: 285-309.
- Neilands, J. B.** 1995. Siderophores: structure and function of microbial iron transport compounds. *J. Biol. Chem.* **270**: 26723-26726.
- Nelson, K. E., C. Weinel, I. T. Paulsen, R. J. Dodson, H. Hilbert, d. S. Martins, V, D. E. Fouts, S. R. Gill, M. Pop, M. Holmes, L. Brinkac, M. Beanan, R. T. DeBoy, S. Daugherty, J. Kolonay, R. Madupu, W. Nelson, O. White, J. Peterson, H. Khouri, I. Hance, L. P. Chris, E. Holtzapple, D. Scanlan, K. Tran, A. Moazzez, T. Utterback, M. Rizzo, K. Lee, D. Kosack, D. Moestl, H. Wedler, J. Lauber, D. Stjepandic, J. Hoheisel, M. Straetz, S. Heim, C. Kiewitz, J. A. Eisen, K. N. Timmis, A. Dusterhoft, B. Tumbler, and C. M. Fraser.** 2002. Complete genome sequence and comparative analysis of the metabolically versatile *Pseudomonas putida* KT2440. *Environ. Microbiol.* **4**: 799-808.
- Nielsen, H., J. Engelbrecht, S. Brunak, and H. G. von.** 1997. Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. *Protein Eng* **10**: 1-6.
- Nikata, T., Sumida K., Kato J., and Ohtake H.** 1992. Rapid method for analyzing bacterial behavioral responses to chemical stimuli. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**: 2250-2254.

- Nishimura, A., M. Morita, Y. Nishimura, and Y. Sugino.** 1990. A rapid and highly efficient method for preparation of competent *Escherichia coli* cells. *Nucleic Acids Res.* **18**: 6169.
- O'Sullivan, D. J. and F. O'Gara.** 1992. Traits of fluorescent *Pseudomonas* spp. involved in suppression of plant root pathogens. *Microbiol. Rev.* **56**: 662-676.
- O'Toole, G. A. and R. Kolter.** 1998. Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Mol. Microbiol.* **30**: 295-304.
- O'Toole, G. A. and R. Kolter.** 1998. Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signalling pathways: a genetic analysis. *Mol. Microbiol.* **28**: 449-461.
- Oke, V. and S. R. Long.** 1999. Bacteroid formation in the *Rhizobium*-legume symbiosis. *Curr. Opin. Microbiol.* **2**: 641-646.
- Ongena, M., P. Jacques, P. Delfosse, and P. Thonart.** 2002. Unusual traits of the pyoverdinin-mediated iron acquisition system in *Pseudomonas putida* strain BTP1. *Biometals* **15**: 1-13.
- Page, R. D.** 1996. TreeView: an application to display phylogenetic trees on personal computers. *Comput. Appl. Biosci.* **12**: 357-358.
- Palleroni, N. J.** 1986. Taxonomy of *Pseudomonas*, En *The Bacteria*. Academic. Press. London, Vol X: 3-25.
- Paulsen, I. T., J. H. Park, P. S. Choi, and M. H. Saier, Jr.** 1997. A family of gram-negative bacterial outer membrane factors that function in the export of proteins, carbohydrates, drugs and heavy metals from gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* **156**: 1-8.
- Pearson, W. R. and D. J. Lipman.** 1988. Improved tools for biological sequence comparison. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **85**: 2444-2448.
- Pieper, D.H., Reineke, W.** 2004. Degradation of chloroaromatics by *pseudomonas*(d)s. En: *The Pseudomonads*. Vol III: Biosynthesis of macromolecules and molecular metabolism. 509-574.
- Pier, G.B and Goldberg, J.B.** 2004. *Pseudomonas aeruginosa* interactions with host cells. En: *The Pseudomonads*. Vol I: Genomic, Life style and molecular architecture. Kluwer Publishing. 505-545.
- Poole, K.** 2004. Efflux pumps. En: *The Pseudomonads*. Vol I: Genomic, Life style and molecular architecture. Kluwer Publishing. 635-674.
- Poole, K. and V. Braun.** 1988. Iron regulation of *Serratia marcescens* hemolysin gene expression. *Infect. Immun.* **56**: 2967-2971.
- Poole, K., E. Schiebel, and V. Braun.** 1988. Molecular characterization of the hemolysin determinant of *Serratia marcescens*. *J. Bacteriol.* **170**: 3177-3188.
- Poole, K., Q. Zhao, S. Neshat, D. E. Heinrichs, and C. R. Dean.** 1996. The *Pseudomonas aeruginosa* tonB gene encodes a novel TonB protein. *Microbiology* **142 (Pt 6)**: 1449-1458.
- Postle, K.** 1990. Aerobic regulation of the *Escherichia coli* tonB gene by changes in iron availability and the fur locus. *J. Bacteriol.* **172**: 2287-2293.

- Prikryl, Z. and Vancura V.** 1980. Root exudates of plants IV. Wheat root exudation as dependent on growth, concentration gradient of exudates and the presence of bacteria. *Plant Soil* **57**: 69-83.
- Pugsley, A. P.** 1993. The complete general secretory pathway in gram-negative bacteria. *Microbiol. Rev.* **57**: 50-108.
- Quinn, J. P.** 1992. Intrinsic antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*, p.154-160. En E. Galli, S. Silver y B. Witholt (ed.), *Pseudomonas: molecular biology and biotechnology*. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- Rainey, P. B.** 1999. Adaptation of *Pseudomonas fluorescens* to the plant rhizosphere. *Environ. Microbiol.* **1**: 243-257.
- Ramos-Gonzalez, M. I. and S. Molin.** 1998. Cloning, sequencing, and phenotypic characterization of the *rpoS* gene from *Pseudomonas putida* KT2440. *J. Bacteriol.* **180**: 3421-3431.
- Ramos-González, M. I.** 1993. Tesis Doctoral.
- Ramos, J. L., E. Diaz, D. Dowling, L. de, V, S. Molin, F. O'Gara, C. Ramos, and K. N. Timmis.** 1994. The behavior of bacteria designed for biodegradation. *Biotechnology (N. Y.)* **12**: 1349-1356.
- Ramos, J. L., E. Duque, M. J. Huertas, and A. Haidour.** 1995. Isolation and expansion of the catabolic potential of a *Pseudomonas putida* strain able to grow in the presence of high concentrations of aromatic hydrocarbons. *J. Bacteriol.* **177**: 3911-3916.
- Ratledge, C. and L. G. Dover.** 2000. Iron metabolism in pathogenic bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* **54**: 881-941.
- Reed, K. C. and D. A. Mann.** 1985. Rapid transfer of DNA from agarose gels to nylon membranes. *Nucleic Acids Res.* **13**: 7207-7221.
- Regenhardt, D., H. Heuer, S. Heim, D. U. Fernandez, C. Strompl, E. R. Moore, and K. N. Timmis.** 2002. Pedigree and taxonomic credentials of *Pseudomonas putida* strain KT2440. *Environ. Microbiol.* **4**: 912-915.
- Roberts, D. P., P. D. Dery, and J. S. Hartung.** 1996a. Peptide utilisation and colonisation of corn, radish and wheat spermospheres by *Enterobacter cloacae*. *Soil Biol. Biochem.* **28**: 1109-1111.
- Roberts, D. P., A. M. Marty, P. D. Dery, I. Yucel, and J. S. Hartung.** 1996b. Amino acids as reduced carbon sources for *Enterobacter cloacae* during colonisation of the spermosphere of crop plants. *Soil Biol. Biochem.* **28**: 1015-1020.
- Roberts, D. P., P. D. Dery, I. Yucel, J. Buyer, M. A. Holtman, and D. Y. Kobayashi.** 1999. Role of *pfkA* and general carbohydrate catabolism in seed colonization by *Enterobacter cloacae*. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 2513-2519.
- Rodriguez-Herva, J. J. and J. L. Ramos.** 1996. Characterization of an *OprL* null mutant of *Pseudomonas putida*. *J. Bacteriol.* **178**: 5836-5840.

- Rojas, A., E. Duque, G. Mosqueda, G. Golden, A. Hurtado, J.L. Ramos, and A. Segura.** 2001. Three efflux pumps are required to provide efficient tolerance to toluene in *Pseudomonas putida* DOT-T1E. *J. Bacteriol.* **183**: 3967-3973.
- Rojas, C. M., J. H. Ham, W. L. Deng, J. J. Doyle, and A. Collmer.** 2002. HecA, a member of a class of adhesins produced by diverse pathogenic bacteria, contributes to the attachment, aggregation, epidermal cell killing, and virulence phenotypes of *Erwinia chrysanthemi* EC16 on *Nicotiana clevelandii* seedlings. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **99**: 13142-13147.
- Rost, B. and C. Sander.** 1993. Prediction of protein secondary structure at better than 70% accuracy. *J. Mol. Biol.* **232**: 584-599.
- Rovira, A. D.** 1969. Plant root exudates. *Bot. Rev.* **35**: 35-37.
- Russell R.S.** 1997. *Plant Root System: Their Function and Interaction with the Soil*, p.298. McGraw-Hill, London.
- Sambrook, J., Fritsch E.F., and Maniatis T.** 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York.
- Sandkvist, M.** 2001. Biology of type II secretion. *Mol. Microbiol.* **40**: 271-283.
- Sauer, K., A. K. Camper, G. D. Ehrlich, J. W. Costerton, and D. G. Davies.** 2002. *Pseudomonas aeruginosa* displays multiple phenotypes during development as a biofilm. *J. Bacteriol.* **184**: 1140-1154.
- Schiebel, E., Schwarz H., and Braun V.** 1989. Subcellular localization and unique secretion of the hemolysin of *Serratia marcescens*. *J. Biol. Chem.* **264**: 16311-16320.
- Schippers, B., Baker A.W., and Bakker P.A.H.M.** 1987. Interactions of deleterious and beneficial rhizosphere microorganisms and effect of cropping practices. *Annu. Rev. Phytopathol.* **25**: 339-358.
- Schmidhauser, T. J. and D. R. Helinski.** 1985. Regions of broad-host-range plasmid RK2 involved in replication and stable maintenance in nine species of gram-negative bacteria. *J. Bacteriol.* **164**: 446-455.
- Schönherr, R., R. Tsolis, T. Focareta, and V. Braun.** 1993. Amino acid replacements in the *Serratia marcescens* haemolysin ShIA define sites involved in activation and secretion. *Mol. Microbiol.* **9**: 1229-1237.
- Shine, J. and L. Dalgarno.** 1974. The 3'-terminal sequence of *Escherichia coli* 16S ribosomal RNA: complementarity to nonsense triplets and ribosome binding sites. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **71**: 1342-1346.
- Simons, M., A. J. van der Bij, I. Brand, L. A. de Weger, C. A. Wijffelman, and B. J. Lugtenberg.** 1996. Gnotobiotic system for studying rhizosphere colonization by plant growth-promoting *Pseudomonas* bacteria. *Mol. Plant Microbe Interact.* **9**: 600-607.
- Simons, M., Permentier H.P, de Weger L.A.Wijffelman C.A., and B. J. J. Lugtenberg.** 1997. Amino acids synthesis is necessary for tomato root colonization by *Pseudomonas fluorescens* strain WCS365. *Mol. Plant Microbe Interact.* **10**: 102-106.
- Smit, G., S. Swart, B. J. Lugtenberg, and J. W. Kijne.** 1992. Molecular mechanisms of attachment of *Rhizobium* bacteria to plant roots. *Mol. Microbiol.* **6**: 2897-2903.

Spain, J. C. 1990. Metabolic pathways for biodegradation of chlorobenzenes. p. 197-206. En S. Silver, A. M. Chakrabarty, B. Iglewski, and S. Kaplan (eds.), *Pseudomonas: biotransformations, pathogenesis and evolving biotechnology*, American Society for Microbiology, Washington, D.C.

Spaink, H. P., Okker R.J.H., Wijffelman C.A., Pees E., and B. J. J. Lugtenberg. 1987. Promoters in the nodulation region of the *Rhizobium leguminosarum* Sym plasmid pRL1J1. *Plant Mol. Biol.* **9**: 27-39.

Stanier, R. Y., N. J. Palleroni, and M. Doudoroff. 1966. The aerobic pseudomonads: a taxonomic study. *J. Gen. Microbiol.* **43**: 159-271.

Steidle, A., K. Sigl, R. Schuegger, A. Ihring, M. Schmid, S. Gantner, M. Stoffels, K. Riedel, M. Givskov, A. Hartmann, C. Langebartels, and L. Eberl. 2001. Visualization of N-acylhomoserine lactone-mediated cell-cell communication between bacteria colonizing the tomato rhizosphere. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**: 5761-5770.

Stojiljkovic, I., M. Cobeljic, and K. Hantke. 1993. *Escherichia coli* K-12 ferrous iron uptake mutants are impaired in their ability to colonize the mouse intestine. *FEMS Microbiol. Lett.* **108**: 111-115.

Stover, C. K., X. Q. Pham, A. L. Erwin, S. D. Mizoguchi, P. Warrenner, M. J. Hickey, F. S. Brinkman, W. O. Hufnagle, D. J. Kowalik, M. Lagrou, R. L. Garber, L. Goltry, E. Tolentino, S. Westbrook-Wadman, Y. Yuan, L. L. Brody, S. N. Coulter, K. R. Folger, A. Kas, K. Larbig, R. Lim, K. Smith, D. Spencer, G. K. Wong, Z. Wu, I. T. Paulsen, J. Reizer, M. H. Saier, R. E. Hancock, S. Lory, and M. V. Olson. 2000. Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PA01, an opportunistic pathogen. *Nature* **406**: 959-964.

Strockbine, N. A., M. P. Jackson, L. M. Sung, R. K. Holmes, and A. D. O'Brien. 1988. Cloning and sequencing of the genes for Shiga toxin from *Shigella dysenteriae* type 1. *J. Bacteriol.* **170**: 1116-1122.

Sukupolvi, S., D. O'Connor, and M. F. Edwards. 1986. The traT protein is able to normalize the phenotype of a plasmid-carried permeability mutation of *Salmonella typhimurium*. *J. Gen. Microbiol.* **132**: 2079-2085.

Sundin, P., Valeur A., Olsson S., and Odham G. 1990. Interactions between bacteria-feeding nematodes and bacteria in the rape rhizosphere: effects on roots exudation and distribution of bacteria. *FEMS Microbiol. Ecol.* **73**: 13-22.

Suoniemi, A., Björklöf K., Haahtela K., and Romantschuk M. 1995. Pili of *Pseudomonas syringae* pathovar *syringae* enhance initiation of bacterial epiphytic colonization of bean. *Microbiology* **141**: 497-503.

Suslow, T. V. and Schroth M.N. 1981. Role of deleterious rhizobacteria as a minor pathogens in a reducing crop growth. *Phytopathology* **72**: 111-115.

Svenningsson, H., Sundin P., and Liljenberg C. 1990. Lipids, carbohydrates and amino acids exuded from the axenic roots of rape seedlings exposed to water-deficit stress. *Plant Cell Environ.* **13**: 155-162.

Switzer, R. C., III, C. R. Merril, and S. Shifrin. 1979. A highly sensitive silver stain for detecting proteins and peptides in polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.* **98**: 231-237.

Tan, Y., M. Xu, X. Tan, X. Tan, X. Wang, Y. Saikawa, T. Nagahama, X. Sun, M. Lenz, and R. M. Hoffman. 1997. Overexpression and large-scale production of recombinant L-methionine-

alpha-deamino-gamma-mercaptomethane-lyase for novel anticancer therapy. *Protein Expr. Purif.* **9**: 233-245.

Tanaka, K., Y. Takayanagi, N. Fujita, A. Ishihama, and H. Takahashi. 1993. Heterogeneity of the principal sigma factor in *Escherichia coli*: the *rpoS* gene product, sigma 38, is a second principal sigma factor of RNA polymerase in stationary-phase *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **90**: 3511-3515.

Thompson, J. D., D. G. Higgins, and T. J. Gibson. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* **22**: 4673-4680.

Tombolini, R., D. J. van der Gaag, B. Gerhardson, and J. K. Jansson. 1999. Colonization pattern of the biocontrol strain *Pseudomonas chlororaphis* MA 342 on barley seeds visualized by using green fluorescent protein. *Appl. Environ. Microbiol.* **65** : 3674-3680.

Turnbull, G. A., J. A. Morgan, J. M. Whipps, and J. R. Saunders. 2001. The role of motility in the in vitro attachment of *Pseudomonas putida* PaW8 to wheat roots. *FEMS Microbiol. Ecol.* **35**: 57-65.

Uphoff, T. S. and R. A. Welch. 1990. Nucleotide sequencing of the *Proteus mirabilis* calcium-independent hemolysin genes (*hpmA* and *hpmB*) reveals sequence similarity with the *Serratia marcescens* hemolysin genes (*shlA* and *shlB*). *J. Bacteriol.* **172**: 1206-1216.

van Loon, L. C., Bakker P.A.H.M., and Pieterse C.M.J. 1998. System resistance induced by rhizosphere bacteria. *Annu. Rev. Phytopathol.* **36**: 453-483.

Vancura, V. 1980. Fluorescent pseudomonads in the rhizosphere of plants and their relation to root exudates. *Folia Microbiol. (Praha)* **25**: 168-173.

Vancura, V. 1988. Plant metabolites in soil. pp.498. En: F. Kunc, V. Vancura (ed.), *Soil Microbial Associations: Control of Structure and Functions*, Elsevier, Amsterdam/New Cork.

Velayudhan, J., N. J. Hughes, A. A. McColm, J. Bagshaw, C. L. Clayton, S. C. Andrews, and D. J. Kelly. 2000. Iron acquisition and virulence in *Helicobacter pylori*: a major role for *FeoB*, a high-affinity ferrous iron transporter. *Mol. Microbiol.* **37**: 274-286.

Vilchez, S., L. Molina, C. Ramos, and J. L. Ramos. 2000. Proline catabolism by *Pseudomonas putida*: cloning, characterization, and expression of the *put* genes in the presence of root exudates. *J. Bacteriol.* **182**: 91-99.

Visca, P., A. Ciervo, V. Sanfilippo, and N. Orsi. 1993. Iron-regulated salicylate synthesis by *Pseudomonas* spp. *J. Gen. Microbiol.* **139**: 1995-2001.

Visca, P., L. Leoni, M. J. Wilson, and I. L. Lamont. 2002. Iron transport and regulation, cell signalling and genomics: lessons from *Escherichia coli* and *Pseudomonas*. *Mol. Microbiol.* **45**: 1177-1190.

Watanabe, N. A., T. Nagasu, K. Katsu, and K. Kitoh. 1987. E-0702, a new cephalosporin, is incorporated into *Escherichia coli* cells via the *tonB*-dependent iron transport system. *Antimicrob. Agents Chemother.* **31**: 497-504.

Weller, D. M. 1988. Biological control of soilborne plant pathogens in the rhizosphere with bacteria. *Ann. Rev. Phytopathol.* **26**: 379-407.

Whipps, J. M. 1987. Carbon loss from the roots of tomato and pea seedling grown in soil. *Plant Soil* **102**: 95-100.

Worsey, M. J. and P. A. Williams. 1975. Metabolism of toluene and xylenes by *Pseudomonas (putida (arvilla) mt-2*: evidence for a new function of the TOL plasmid. *J. Bacteriol.* **124**: 7-13.

Xiao, R. and W. S. Kisaalita. 1998. Fluorescent pseudomonad pyoverdines bind and oxidize ferrous ion. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**: 1472-1476.

Yanisch-Perron, C., J. Vieira, and J. Messing. 1985. Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* **33**: 103-119.

Yen, M. R., C. R. Peabody, S. M. Partovi, Y. Zhai, Y. H. Tseng, and M. H. Saier. 2002. Protein-translocating outer membrane porins of Gram-negative bacteria. *Biochim. Biophys. Acta* **1562**: 6-31.

Zhao, Q., X. Z. Li, A. Mistry, R. Srikumar, L. Zhang, O. Lomovskaya, and K. Poole. 1998. Influence of the TonB energy-coupling protein on efflux-mediated multidrug resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **42**: 2225-2231.

Las bacterias del suelo pertenecientes al género *Pseudomonas* se caracterizan, además de por su elevada versatilidad metabólica, por una serie de características que las hacen atractivas para numerosas aplicaciones medioambientales y usos agrícolas.

La cepa *P. putida* KT2440, objeto de nuestro estudio, puede colonizar la rizosfera de maíz y otras plantas a alta densidad celular lo que hace que esta cepa sea un buen candidato para la rizorremediación. La colonización de la esfermosfera, y cómo ésta determina la posterior evolución de la población bacteriana en la rizosfera, es por tanto un aspecto de gran relevancia a la hora de mejorar la eficiencia de agentes de biocontrol.

A través del desarrollo experimental de esta Tesis Doctoral se ha descrito el sistema de secreción TPS involucrado en la captación del hierro, así como en la colonización de semillas. El hierro presente en las semillas de maíz juega un papel clave en el proceso de adhesión y colonización de *P. putida*, actuando como señal y promoviendo el establecimiento de las interacciones planta-bacteria. Los genes *hlp* de este sistema se encuentran formando una unidad transcripcional. A lo largo de este trabajo se ha comprobado que mutaciones en ambos genes daban lugar a una deficiencia en la adhesión a semillas y un aumento en la sensibilidad celular a compuestos quelantes de hierro, observándose también bajo estas condiciones un incremento en la producción de sideróforos.



**CONSEJO SUPERIOR DE
INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS**
Estación Experimental del Zaidín



**UNIVERSIDAD DE GRANADA
FACULTAD DE FARMACIA**