

**Universidad de Chile**  
**Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas**



**“Estudio de la participación de los reguladores CatR en el  
metabolismo de 3-clorobenzoato en *Cupriavidus necator*  
JMP134 (pJP4)”**

**MEMORIA PARA OPTAR AL TÍTULO DE BIOQUÍMICO**

**Profesor patrocinante:**

**Dr. Sergio Lobos Camus**

**Depto. Bioquímica y Biología Molecular**

**Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas**

**Universidad de Chile**

**Director:**

**Dr. Bernardo González Ojeda**

**Depto. Genética Molecular y  
Microbiología**

**Facultad de Ciencias Biológicas**

**P. Universidad Católica de Chile**

**HEIDI ANDREA PÉREZ BOLLWEG**

**Santiago de Chile**

**2006**

*A mi padre, por enseñarme que siempre se puede ir más lejos.*

## AGRADECIMIENTOS

A mi “alma mater”, la carrera de Bioquímica de la Universidad de Chile, por lo que aprendí y por las personas que me permitió conocer. A mis compañeras y amigas: Ana M<sup>a</sup> Delpiano, Jocelyn Brito, Judith Tello, Paula Rodas, Paula Gálvez, Flor González y Michelle de Saint Pierre, por todo su cariño y apoyo. A Rubén Polanco, Sergio Bucarey, Paola Marchantt y Marcela Ávila, por sus consejos. A mis profesores: Mercedes Zaldivar, Inés Contreras, Dante Miranda y Guillermo Larrazábal, por su comprensión.

En especial a mis queridos y amados profes: Daniela Seelenfreund y Sergio Lobos, por la formación integral que me brindaron. Les agradezco su preocupación, su cariño y su amistad, porque han sido fundamentales en el desarrollo de mis últimos años.

A todo el laboratorio de Microbiología de la PUC. En primer lugar al Dr. Bernardo González por haberme acogido en su laboratorio permitiendo el desarrollo de esta memoria, por sus consejos y dedicación. A mis queridos compañeros BG lab: “maestro” Thomas Ledger, Rodrigo de la Iglesia, Nicole Trefault, Miguel Angel Sánchez, Matías Saavedra, Danilo Pérez, Consuelo Gazitúa, Felipe Flores y Juanita Larraín. Gracias por acogerme con cariño, por las horas de alegría, las canciones inventadas y ¡más de una sorpresita! A Bruno Tesser por su ayuda y Don Víctor Ahumada por su afecto.

A mi amigo Mario Tello, por ser un referente importante en cada proceso y por compartir el día a día queriendo siempre lo mejor para mí. A Susan Smalley, por su alegría y amistad.

A mis queridas amigas, Marlene Manzano y Ana Morán, por estar conmigo en cada alegría o desazón. Gracias por su amistad, sus consejos y los cafés de media tarde. A mi reciente amiga Roxana Aros, por darle luz a muchas cosas y comprometerse de corazón por mi causa.

A mi familia paterna. A mis tíos y tías por estar presentes. En especial a mi abuelita por ser tan buena conmigo y por mantenerse cerca apoyando mis proyectos.

A mi padre, Sergio Pérez Ruete, a quién dedico esta memoria. Gracias “Pai” porque siempre pediste más de mí y a través del tiempo aún me das ejemplos de vida. También a mi madre, Birgid Bollweg Weber, por sus enseñanzas y por apoyarme a la distancia. A mi hermana Leslie y especialmente Katherine, por ser mi chiquitita adorada y el incentivo de mis logros.

Finalmente a Reicito por estar incondicionalmente conmigo, por ser mi apoyo y compañía en todos estos años, por su paciencia durante la realización de esta tesis y sobre todo por amarme tanto.

## FINANCIAMIENTO

Este trabajo fue realizado gracias al proyecto Fondecyt N° 1030493, “Interacción entre el plasmidio catabólico pJP4 y el cromosoma de *Cupriavidus necator* en la adaptación y evolución de vías del catabolismo de contaminantes cloroaromáticos en bacterias”.

## ABREVIATURAS

2,4-D	2,4.diclorofenoxiacetato
3-CB	3-clorobenzoato
BZ	benzoato
DNA	ácido desoxirribonucleico
ORF	marco de lectura abierto
TCA	ciclo de los ácidos tricarbóxicos
RBS	sitio de represión o reconocimiento
ABS	sitio de activación
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
Ap	ampicilina
Km	kanamicina
D.O. <sub>600</sub>	densidad óptica a 600 nm
pb	pares de bases
kb	kilo pares de bases
rpm	revoluciones por minuto
d	días
t	tiempo

# ÍNDICE GENERAL

AGRADECIMIENTOS .....	iii
FINANCIAMIENTO .....	iv
ABREVIATURAS .....	viii
ÍNDICE GENERAL.....	viii
ÍNDICE DE TABLAS .....	viii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	ix
RESUMEN.....	ix
SUMMARY.....	xii
1.INTRODUCCIÓN.....	1
2. MATERIALES .....	11
2.1 Reactivos.....	11
2.2 Material biológico: cepas bacterianas y plasmidios.....	11
2.3 Medios de cultivo.....	11
2.4 Material fotográfico.....	14
3. MÉTODOS.....	14
3.1 Cultivo de microorganismos .....	<b>¡Error! Marcador no definido.</b>
3.1.1 Mantenión de microorganismos.....	15
3.1.2 Crecimiento de microorganismos.....	15
3.1.3 Cultivos para ensayo de degradación de sustrato en células en reposo.....	16
3.1.4 Cuantificación de la degradación mediante HPLC.....	16
3.2 Introducción de DNA foráneo: electroporación y conjugación.....	17
3.3 Análisis de células transformantes.....	18
3.4 Extracción de DNA total y plasmidial.....	19

3.5 Amplificación de DNA por PCR. ....	19
3.5.1 Mezcla de reacción. ....	19
3.5.2 Programas de amplificación. ....	20
3.5.3 Diseño de partidores y análisis de secuencias. ....	20
3.6 Clonamiento de DNA. ....	21
3.7. Predicción bioinformática de la estructura plegada de las proteínas regulatorias.....	23
4. RESULTADOS. ....	24
4.1 Obtención de cepas de <i>Cupriavidus necator</i> para el estudio de los genes <i>catR</i> . ....	26
4.1.1 Obtención de cepas de <i>C. necator</i> con sobreexpresión de los genes <i>catR1</i> y <i>catR2</i> . ....	26
4.1.2 Obtención de una cepa de <i>C. necator</i> mutante del gen <i>catR1</i> . ....	26
4.1.3 Obtención de cepa mutante en el gen <i>catR1</i> (JMP134-M1) complementada con los genes <i>catR1</i> o <i>catR2</i> . ....	29
4.2 Efecto de la sobreexpresión de los genes <i>catR</i> en el metabolismo de compuestos aromáticos. ....	29
4.3 Estudio fenotípico de la cepa mutante en el gen <i>catR1</i> . ....	33
4.4 Metabolización de compuestos aromáticos en la cepa JMP134-M1 complementada con los genes <i>catR1</i> o <i>catR2</i> . ....	35
4.5 Estudio bioinformático de la estructura plegada de los reguladores CatR1 y CatR2. ....	39
5. DISCUSIÓN. ....	44
6. CONCLUSIONES. ....	50
7. BIBLIOGRAFÍA. ....	51

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1:</b> Cepas bacterianas.....	12
<b>Tabla 2:</b> Plasmidios .....	13
<b>Tabla 3:</b> Partidores para la amplificación mediante PCR.....	22
<b>Tabla 4:</b> Velocidad de crecimiento de <i>C. necator</i> JMP134-M1 y <i>C. necator</i> JMP134 en 3-clorobenzoato (3-CB), benzoato (BZ) y 2,4 diclorofenoxiacetato (2,4-D). .....	37

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Fig. 1:</b>	La vía de degradación de 3-clorobenzoato (3-CB), benzoato (BZ) y 2,4 diclorofenoxiacetato (2,4-D) en <i>Cupriavidus necator</i> JMP134.....	3
<b>Fig. 2:</b>	La vía de degradación <i>orto</i> modificada en <i>C. necator</i> JMP134. ....	4
<b>Fig. 3:</b>	El mecanismo de acción de los reguladores LysR (LTTRs) para activar la transcripción. ....	6
<b>Fig. 4:</b>	Los genes <i>catR</i> , su entorno genético y contexto regulatorio en <i>C. necator</i> JMP134.....	9
<b>Fig. 5:</b>	Comprobación mediante amplificación por PCR de la obtención de la cepa mutante JMP134-M1 .....	25
<b>Fig. 6:</b>	Amplificación de la secuencia del gen <i>catR1</i> en la cepa mutante JMP134-M1.....	28
<b>Fig. 7:</b>	Efecto de la concentración de 3-CB y 2,4-D en el crecimiento de las cepas que sobreexpresan los genes <i>catR</i> . ....	31
<b>Fig. 8:</b>	Efecto de la concentración de BZ en el crecimiento de las cepas que sobreexpresan los genes <i>catR</i> . ....	32
<b>Fig. 9:</b>	Efecto de la concentración de 3-CB en la velocidad de crecimiento de las cepas que sobreexpresan los genes <i>catR</i> . ....	34
<b>Fig. 10:</b>	Efecto de la concentración de 2,4-D en la velocidad de crecimiento de las cepas que sobreexpresan los genes <i>catR</i> . ....	34
<b>Fig. 11:</b>	Efecto de la concentración de 3-CB y 2,4-D en el crecimiento de <i>C. necator</i> JMP134-M1 y <i>C. necator</i> JMP134. ....	36
<b>Fig. 12:</b>	Efecto de la concentración de BZ en el crecimiento de <i>C. necator</i> JMP134-M1 y <i>C. necator</i> JMP134. ....	37
<b>Fig. 13:</b>	Degradación de BZ por células de <i>C. necator</i> JMP134-M1 y <i>C. necator</i> JMP134, en reposo metabólico. ....	38
<b>Fig. 14:</b>	Velocidad de crecimiento de las cepas complementantes <i>versus</i> las cepas control en BZ.....	40
<b>Fig. 15:</b>	Velocidad de crecimiento de las cepas complementantes <i>versus</i> las cepas control en 3-CB....	40
<b>Fig. 16:</b>	Degradación de 3-CB en las cepas complementantes <i>versus</i> las cepas control.....	41
<b>Fig. 17:</b>	Visión estéreo de la superposición de la estructura plegada de los reguladores TfdT y TfdR ..	43
<b>Fig. 18:</b>	Modelo de la regulación ejercida por los reguladores CatR1 y CatR2 en <i>C. necator</i> . ....	41

## RESÚMEN

*Cupriavidus necator* JMP134 (pJP4), antes denominada *Ralstonia eutropha* JMP134 (pJP4), es una bacteria ambiental capaz de utilizar los compuestos contaminantes 2,4-diclorofenoxiacetato (2,4-D) y 3-clorobenzoato (3-CB) como única fuente de carbono y energía. Las vías metabólicas que permiten dichas capacidades se encuentran codificadas en los genes cromosomales *benABC* y *benD*, y en la vía de degradación de clorocatecoles, codificados por los genes *tfd* del plasmidio pJP4. Se ha descrito que el regulador TfdR/S (familia LysR) activa la expresión de los genes *tfd*. El regulador de la vía de degradación de catecol, CatR, tiene en común aspectos genéticos, funcionales y evolutivos con el regulador TfdR/S. Estos antecedentes hacen posible proponer que CatR podría estar influyendo en la expresión de los genes *tfd*. En esta memoria se estudió el papel de CatR en la degradación de 3-CB y 2,4-D. Para esto se identificaron los putativos genes *catR* en el genoma de *C. necator*, encontrándose dos, *catR1* y *catR2*, cuyo contexto genómico sugiere que podrían participar diferencialmente en el metabolismo de cloroaromáticos. Estos genes fueron clonados e introducidos en *C. necator*. Adicionalmente, se obtuvo una cepa de *C. necator* mutante del gen *catR1* mediante una estrategia de doble recombinación homóloga. Esta mutante fue complementada con los genes *catR1* o *catR2*.

Estas cepas fueron estudiadas mediante curvas de crecimiento en medios de cultivos con distintas concentraciones de 3-CB, 2,4-D o benzoato (BZ). En cada caso se determinó la densidad óptica en fase estacionaria y la velocidad de crecimiento. Además, se evaluó la degradación de 3-CB y BZ mediante la detección del compuesto por HPLC. Estos estudios permitieron determinar que tanto CatR1 como CatR2 aumentan la degradación de 3-CB, puesto que la sobreexpresión de sus genes aumentó la velocidad de crecimiento ( $\mu$ ) en  $\pm 2$  veces. Consistente con lo anterior, la ausencia de CatR1 disminuyó la velocidad de crecimiento en  $\pm 3$  veces en 3-CB y la tasa de degradación de este sustrato

disminuyó  $\pm 3$  veces, lo cual también fue observado durante el crecimiento en BZ. Adicionalmente, los estudios de complementación realizados para corregir la ausencia de CatR1, con los genes *catR1* y *catR2* por separado, mostraron recuperar el fenotipo silvestre en ambos sustratos.

Por otra parte, la degradación de 2,4-D fue mejorada por CatR2, puesto que la sobreexpresión del gen *catR2* impidió la disminución en el rendimiento celular que se observa en la cepa silvestre al aumentar la concentración de 2,4-D. En cambio, la velocidad de crecimiento en 2,4-D a altas concentraciones de sustrato se vio desfavorecida por la sobreexpresión del gen *catR1*. Los resultados de este trabajo indican que los reguladores CatR1 y CatR2 modifican el crecimiento en estos compuestos, probablemente a través de la modulación de la expresión de los genes *ben* y *tfd*. Lo anterior se basa en que ambos reguladores poseen cercanía estructural con el regulador TfdR y compartirían la capacidad de interactuar con las respectivas regiones promotoras. En este contexto, se propone un modelo de la regulación ejercida por CatR1 y CatR2 en *C. necator*. Este modelo sugiere que estos reguladores modulan diferencialmente los genes *tfd*, de modo que CatR2 activa los módulos génicos *tfd I-II* y el gen *tfdA*, mientras que CatR1 activa sólo el módulo *tfd I*. En base a modelamiento molecular, se predijo que las diferencias observadas entre el regulador CatR1 y CatR2 podrían ser explicadas por la afinidad de unión a DNA y no por la unión del inductor.

## SUMMARY

### “Study of the participation the CatR regulators in the 3-CB metabolism in *Cupriavidus necator* JMP134 (pJP4)”

*Cupriavidus necator* JMP134 (pJP4) (*Ralstonia eutropha*) is a soil bacterium that is able to use the pollutants 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D), and 3-chlorobenzoate (3-CB), as sole carbon and energy source. The metabolic pathways are encoded in the chromosome by the *benABC* and *benD* genes and in the pJP4 plasmid, by the chlorocatechol degrading, *ortho* ring cleavage pathway *tfd* genes. It has been reported that the TfdR/S regulator (LysR family) activates the expression of the *tfd* genes. The regulator of the catechol degradative pathway, CatR, shares genetic, functional and evolutionary aspects with the TfdR/S regulator, making possible that CatR may influence the expression of *tfd* genes. In this work, the role of CatR in 3-CB or 2,4-D degradation was studied. Two putative genes encoding CatR regulators were identified in the genome of *C. necator*, *catR1* and *catR2*, genetic contexts at which suggest that they may be differentially involved in chloroaromatic metabolism. These genes were cloned and overexpressed in *C. necator*. In addition, a *catR1* gene mutant was obtained by a double recombination strategy. This mutant was complemented with either the *catR1* or *catR2* genes.

These strains were studied by growth curves in cultures grown at different concentrations of 3-CB, 2,4-D or benzoate (BZ). In each case, the optical density at the stationary phase and the growth rate were determined. In addition, the degradation of 3-CB or BZ was monitored by HPLC. These studies showed that both regulators increase degradation of 3-CB, since overexpression of *catR1* or *catR2* genes provoked a two-fold increase in growth rate. Accordingly, a three-fold decrease in growth rate and 3-CB degradation rate was determined in the absence of *catR1*. The same was observed during growth in BZ. In addition, complementation with *catR1* or *catR2* genes recovered wild type growth phenotype with both substrates.

On the other hand, the degradation of 2,4-D was improved for CatR2, because the overexpression of *catR2* gene avoided the decrease in cell yield at higher concentrations of 2,4-D. In contrast, the degradation of 2,4-D at higher concentrations of this substrate was impaired by overexpression of *catR1*. The results of this work show that regulators CatR1 and CatR2 modify growth on 2,4-D or 3-CB, probably through modulation of the expression of the *ben* and *tfd* genes. The latter assumption is based on that both regulatory proteins are structurally related to TfdR and that both could interact with the respective promoter regions. In this context, a model for the regulation by CatR1 and CatR2 in *C. necator* is proposed. This model suggests that both regulatory proteins differentially modulates *tfd* genes, with CatR2 activating both *tfd* modules and *tfdA* gene, whereas CatR1 only activates module *tfd-I*. Based on molecular modelling, it was predicted that differences between CatR1 and CatR2 would be explained by DNA binding affinity and not by inducer binding.

## INTRODUCCIÓN

En los últimos 50 años la industria y la actividad urbana han vertido al ambiente cantidades importantes de compuestos químicos tóxicos, denominados xenobióticos. Estos compuestos químicos incluyen solventes orgánicos clorados, herbicidas y pesticidas, entre otros. Específicamente la acumulación de compuestos aromáticos clorados y su difícil degradación química, constituye un problema a nivel mundial, debido a la contaminación de suelos agrícolas y cursos de agua. La contaminación por cloroaromáticos es nociva no sólo para el medio ambiente, sino también para organismos superiores debido a sus efectos neurotóxicos y carcinogénicos [Bradberry y cols., 2004].

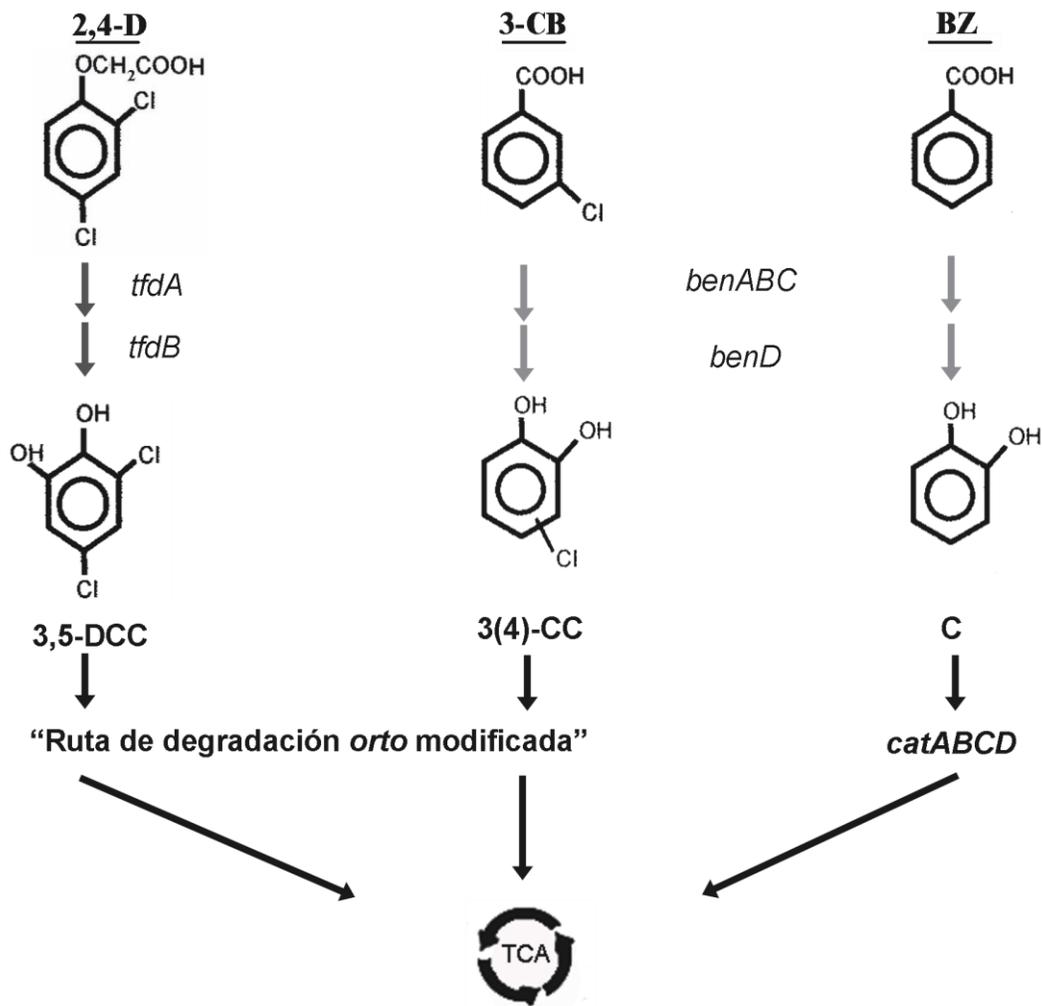
Los microorganismos son capaces de utilizar estos compuestos químicos tóxicos, transformándolos a compuestos simples como CO<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>O [van der Meer, 1994]. Las bacterias son las principales responsables de esta biodegradación gracias a su gran capacidad metabólica y adaptativa. Por este motivo, se han convertido en blanco de investigaciones para la posible biorremediación de suelos y aguas [Timmis y Pieper, 1999].

*Cupriavidus necator* JMP134 (pJP4), antes denominada *Ralstonia eutropha*, una bacteria ambiental aeróbica, Gram-negativa, es capaz de utilizar compuestos químicos tóxicos como 2,4-diclorofenoxiacetato (2,4-D) y 3-clorobenzoato (3-CB) como única fuente de carbono y energía, por lo tanto constituye un buen modelo de estudio del metabolismo bacteriano de compuestos cloroaromáticos. Las capacidades metabólicas de *C. necator* están reflejadas en la amplia diversidad de sustratos aromáticos que puede utilizar (>60). A nivel genético en esta cepa aproximadamente el 8% (550) de sus marcos de lectura abierto (ORFs) corresponden a genes relacionados con el catabolismo de xenobióticos (Pérez-Pantoja, datos no publicados). Estos genes se encuentran codificados tanto en el cromosoma como en el plasmidio conjugativo pJP4.

El plasmidio pJP4 codifica para los genes catabólicos *tfd*, los cuales están organizados en dos módulos genéticos no idénticos, *tfdC<sub>I</sub>D<sub>I</sub>E<sub>I</sub>F<sub>I</sub>* y *tfdD<sub>II</sub>C<sub>II</sub>E<sub>II</sub>F<sub>II</sub>* [Leveau y cols., 1999]. Río arriba del módulo *tfd-I* y *tfd-II* se encuentra el gen regulador *tfdT* y *tfdR*, respectivamente. El tercer gen regulador, *tfdS*, se encuentra río arriba del gen *tfdA*.

En *C. necator* JMP134 la degradación de 2,4-D y 3-CB requiere de la participación de los genes *tfd* [Don y Pemberton, 1985]. Sin embargo, los primeros pasos enzimáticos de estas vías son diferentes para cada uno de estos compuestos. La degradación de 2,4-D se inicia con la participación de la  $\alpha$ -cetoglutarato dioxigenasa y una 2,4-diclorofenol hidroxilasa, producto de los genes *tfdA* y *tfdB*, respectivamente, mientras que la degradación de 3-CB se inicia con la participación de genes cromosomales de la vía de degradación de benzoato (BZ) (Fig. 1). Estas enzimas, llamadas benzoato dioxigenasa y *cis*-dihidrodiol dehidrogenasa, están codificadas en los genes cromosomales *benABC* y *benD*, respectivamente. Estas enzimas convierten el 3-CB a 4-clorocatecol y 3-clorocatecol. La transformación de los clorocatecoles a  $\beta$ -cetoadipato, llevada a cabo por los módulos génicos *tfd*, conforman la vía de la "ruptura *orto* modificada" (Fig. 2), debido a que la ruptura del anillo aromático ocurre en posición *orto* y ha sido adaptada a compuestos clorados [Reineke, 1998]. Las enzimas de los módulos *tfd* son la clorocatecol-1,2-dioxigenasa (TfdC), cloromuconato isomerasa (TfdD), dienolactona hidrolasa (TfdE) y maleilacetato reductasa (TfdF), las que convierten estos clorocatecoles a cloromuconato, (cloro)*cis*-dienelactona, (cloro)maleilacetato y  $\beta$ -cetoadipato, respectivamente. Finalmente, el  $\beta$ -cetoadipato es canalizado hacia el ciclo de los ácidos tricarbóxicos (TCA), para convertirse en CO<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>O como productos finales de degradación (Kaschabek y cols., 2002).

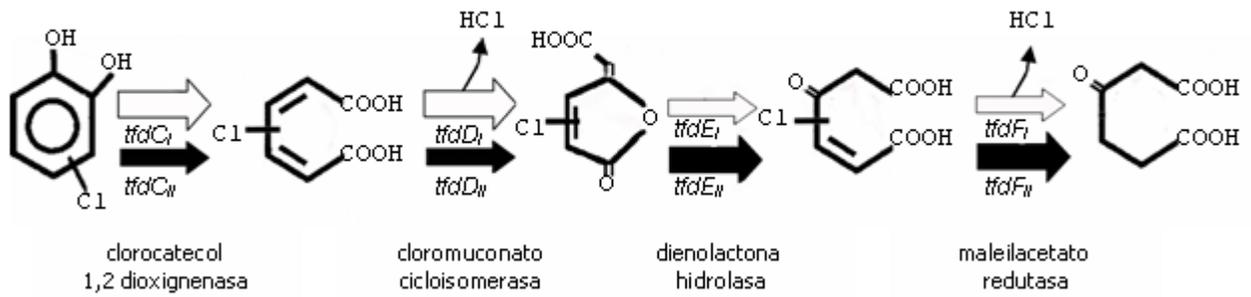
Con respecto a la regulación transcripcional de los módulos *tfd* se sabe que los genes *tfdR* y *tfdS* son idénticos y se encuentran formando una estructura de invertidos repetidos [Matrubutham y Harper, 1994]. El gen *tfdS* se ubica río arriba y en una orientación inversa a *tfdA* ( $\alpha$ -cetoglutarato dioxigenasa),



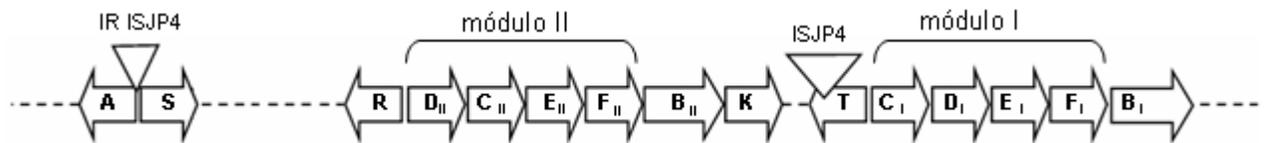
**Fig. 1. La vía de degradación de 3-CB, 2,4-D y BZ en *C. necator* JMP134.**

Se muestran los genes responsables de la degradación inicial de 3-CB, 2,4-D y BZ. La degradación de 3-CB y 2,4-D produce 3,5-diclorocatecol (3,5-DCC) y 3(4)-clorocatecol (3(4)-CC) como intermediarios metabólicos que son degradados por una vía común, la vía de degradación *orto* modificada. Al igual que la degradación de 3-CB, la degradación de BZ es llevada a cabo inicialmente por genes cromosomales *benABCD*. La degradación de BZ involucra la formación de catecol (C), que es metabolizado por los productos génicos de *catABCD*. La mineralización de los tres sustratos involucra la canalización de intermediarios a través del ciclo de los ácidos tricarbóxicos (TCA) [Reineke W., 1998].

**A**



**B**

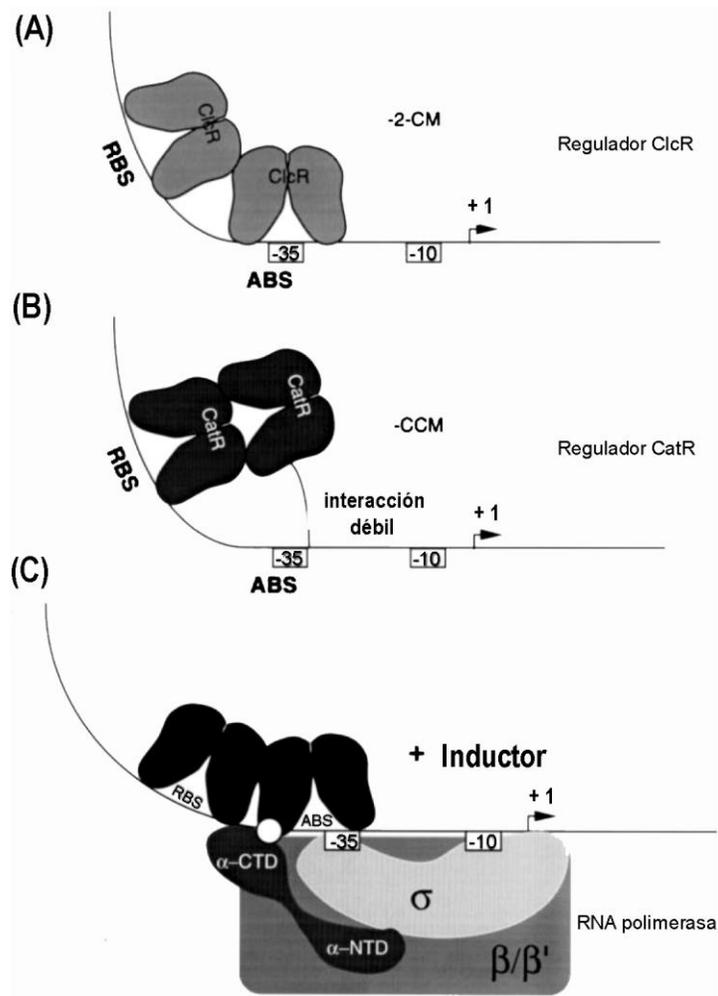


**Fig. 2. La vía de degradación *orto* modificada en *C. necator* JMP134.**

**A.** Se muestra la degradación de clorocatecoles a través de la ruta *orto* modificada. El grosor de las flechas es relativo a la actividad enzimática de cada producto génico del módulo. **B.** Se muestra la organización de los genes *tfd* y sus reguladores en el plasmidio pJP4, no a escala. [Reineke W., 1998]

lo que sugiere que podría estar regulando la expresión de este último, mientras que *ffdR* hace lo mismo con respecto al módulo *ffd-II*. El tercer gen regulador, *ffdT*, está ubicado río arriba del módulo *ffd-I* y se encuentra interrumpido por la presencia de la secuencia de inserción ISJP4 [Leveau y van der Meer, 1996], lo que provoca la formación de una proteína TfdT de menor tamaño que la mayoría de los reguladores de cloroaromáticos descritos, por lo que probablemente no es funcional. Los reguladores TfdR/S codifican para proteínas que pertenecen a la familia de activadores transcripcionales LysR (LTTRs), al igual que la mayoría de las proteínas reguladoras involucradas en la degradación de catecoles y clorocatecoles, tales como ClcR para *clcABD* (*Pseudomonas* sp. pAC27), TcbR para *tcbCDEF* (*Pseudomonas* sp. p51) y CatR para *catBCA* (*Pseudomonas putida* sp. NK8) [Coco y cols., 1993; van der Meer y cols., 1991; Rothmel y cols., 1990].

Los reguladores transcripcionales LysR (LTTR) se caracterizan por estar ubicados río arriba de los genes que regulan y se transcriben en forma divergente a estos últimos. Los LTTR constan de tres dominios importantes: a) un dominio N-terminal de unión a DNA de tipo “helix-turn-helix” que corresponde a la región más conservada, b) un dominio involucrado en el reconocimiento y/o respuesta al inductor y c) un dominio C-terminal requerido para el buen funcionamiento del dominio anterior, ya que mutantes en este dominio presentan una respuesta alterada al inductor y una pérdida de unión al DNA [Schell, 1993]. Los LTTRs presentan una estructura homotetramérica que se encuentra unida a dos sitios en la hebra de DNA, que son el sitio de represión (RBS) y con menor afinidad el sitio de activación (ABS), aún en ausencia del inductor. Cuando se encuentra el inductor en el medio, éste es reconocido por el regulador y se produce un leve cambio en la zona de unión al DNA que aumenta la afinidad del regulador por el dominio  $\alpha$ -CTD de la RNA polimerasa. Esto permite que la enzima se una con mayor afinidad a los sitios -35 y -10 del inicio de transcripción y finalmente la RNA polimerasa transcriba el gen regulado [Tropel y van der Meer, 2004; McFall y cols., 1998] [Fig. 3]. Es importante



**Fig. 3. El mecanismo de acción de los reguladores LysR (LTTRs) para activar la transcripción.**

Se muestra el mecanismo de acción de los reguladores LysR (ClcR y CatR). Se señalan los dominios  $\alpha$ -CTD,  $\alpha$ -NTD,  $\beta/\beta'$  y  $\sigma$  de la RNA polimerasa y el inicio de transcripción +1.

**A.** El regulador ClcR se une al promotor del operón *clcABD* en el sitio RBS (sitio de represión) y con menor afinidad al sitio ABS, aún en ausencia del inductor 2-cloromuconato (2CM).

**B.** El regulador CatR se une al promotor del operón *catBCA* en el sitio RBS, aún en ausencia del inductor *cis,cis*-muconato (CCM).

**C.** Ante la presencia del inductor aumenta la afinidad de ambos reguladores por el sitio ABS (sitio de activación), permitiendo el contacto con el dominio  $\alpha$ -CTD de la RNA polimerasa, indicado por un círculo blanco. Figura adaptada [McFall y cols., 1998].

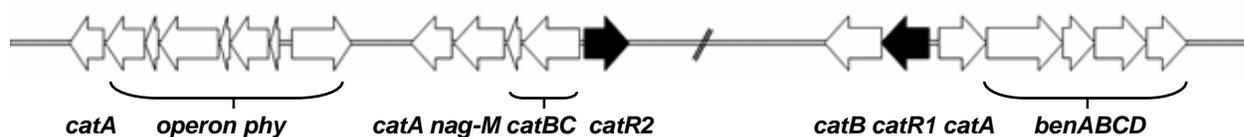
señalar que el mecanismo de activación de los reguladores (Fig. 3) es conservado dentro de una misma familia [McFall y cols., 1998].

Esto podría jugar un rol protagónico en la adaptación de los microorganismos a contaminantes ambientales, puesto que los diversos compuestos químicos novedosos pueden ser aprovechados como potenciales fuentes de carbono, permitiendo así su crecimiento en entornos poco favorables. La adaptación a ambientes tóxicos se explica en parte mediante la adquisición de genes catabólicos a través de plasmidios, en los cuales se mantienen las características de los genes responsables de la degradación de compuestos aromáticos no sustituidos, codificados en el cromosoma. Esta similitud se aprecia tanto en la organización genética en forma de operones, como en la presencia de reguladores comunes o de la misma familia [de Lorenzo y Pérez, 1996].

En este contexto, se ha sido sugerido que cuando dos o más operones catabólicos coexisten en una misma bacteria es posible que ocurra un fenómeno de regulación cruzada; de esta manera, un activador transcripcional de una vía puede llegar a activar otra [McFall y cols., 1998]. Esta regulación cruzada ha sido descrita para el catabolismo del benzoato, entre el regulador XylS, perteneciente a la familia de reguladores transcripcionales AraC, codificado en el plasmidio pWWO de *P. putida* y BenR de la vía cromosomal para la degradación de benzoato [Cowles y cols., 2000]. Por otra parte, estudios recientes realizados en nuestro laboratorio indican que un derivado de pJP4 que carece de la zona en la cual están ubicados los genes *tfdR/tfdS*, permite a *C. necator* JMP134 crecer en 3-CB, pero pierde su capacidad para crecer en 2,4-D. Esta observación sugiere que existen otros reguladores de tipo LysR involucrados en la modulación de la degradación de 3-CB en *C. necator* JMP134. La proteína regulatoria TfdT truncada no ha sido descartada como posible responsable de modular la expresión de los genes *tfd*. Sin embargo, resulta muy interesante estudiar si es posible que en *C. necator* JMP134, exista regulación cruzada entre los reguladores cromosomales de las vías de compuestos aromáticos

no sustituidos, sobre los genes plasmidiales de degradación de cloroaromáticos. Esto último considera que estas vías son genética, funcional y evolutivamente similares. El mejor candidato a ejercer este tipo de acción es CatR, el regulador cromosomal de la vía de degradación de catecoles (genes *catBCA*), que es parte de la familia de activadores transcripcionales LysR (LTTRs), al igual que TfdR/S y TfdT. Además, se ha descrito que CatR de *P. putida* es capaz de activar otras vías como la vía de degradación de fenol codificada por el operón *pheAB* en *P. putida* PaW85 [Kasak y cols., 1993], y el operón *clcABD*, responsable de la degradación de clorocatecoles en el plasmidio de *P. putida* PRS2000 [Parsek y cols., 1994].

Gracias al proyecto de secuenciación de *C. necator* JMP134, hoy se dispone de la secuencia completa y de una anotación manual acabada de la mayoría de los genes del catabolismo de compuestos aromáticos del genoma de *C. necator* [Pérez-Pantoja, no publicado], lo que ha permitido corroborar la identificación de dos genes *catR* putativos en el genoma de esta bacteria: *catR1* y *catR2*, ubicados en dos replicones diferentes. El contexto genético de ambos ORFs mostró que estos reguladores se encuentran acompañados de genes para la degradación de catecoles, lo cual sugiere que estos ORFs efectivamente corresponden a reguladores CatR. Más aún, el gen *catR1* se encuentra colindando a genes con un alto porcentaje de identidad a subunidades de una benzoato dioxigenasa, los cuales probablemente corresponden a los genes *benABC* y *benD*, que catalizan los pasos iniciales de la degradación de 3-CB (Fig. 2). El contexto genético de estos genes putativos refuerza la posibilidad de que estos reguladores participen en la modulación de la degradación de 3-CB y de 2,4-D (Fig. 4). Para explorar esta posibilidad, en esta memoria se decidió estudiar si los reguladores CatR participan en la modulación del metabolismo de 3-CB y de 2,4-D.



## B

### **Fig. 4. Los genes *catR*, su entorno genético y contexto regulatorio en *C. necator* JMP134.**

**A.** Entorno genético de *catR1* y *catR2*. En la misma orientación del regulador *CatR1* se encuentra el gen *catB*. Río arriba del regulador se encuentran un gen *catA* y los genes *benABCD* que permiten la degradación de benzoato. Río arriba del regulador *CatR2* se encuentran los genes *catBC*, *catA* y *nag-M* [Zhou y cols., 2000], el que pertenece a la vía de degradación de gentisato. Distante a este regulador. Junto a los genes *phy*, que son análogos a una fenol hidroxilasa de *Burkholderia* sp. JS150 (Kahng y cols., 2001), se encuentra un tercer gen *catA*. El esquema no está a escala.

**B.** Contexto regulatorio de *catR1* y *catR2*. Se muestra la regulación de los módulos *tfd* por parte de los reguladores *TfdR/S*.

## **HIPÓTESIS**

“Los reguladores cromosomales CatR participan en la modulación de la degradación de 3-CB y/o 2,4-D, en *C. necator* JMP134 (pJP4)”.

## **OBJETIVO GENERAL**

Evaluar el rol de los reguladores CatR1 y CatR2 en la degradación de 3-CB y 2,4-D en *C. necator* JMP134 (pJP4).

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Construir cepas de *C. necator* JMP134 (pJP4) con sobreexpresión de los genes *catR1* y *catR2*.
2. Construir cepas de *C. necator* mutantes del gen *catR1*.
3. Complementar cepa de *C. necator* mutante del gen *catR1* con el gen *catR1* o *catR2*.
4. Evaluar el crecimiento y capacidad metabólica de las cepas construidas.

## MATERIALES

**2.1. Reactivos.** Los reactivos utilizados en este trabajo se adquirieron en las siguientes empresas:

- Aldrich Chemical Company Inc. (Milwaukee, WI, EE. UU.): 2,4-D, BZ y 3-CB.
- GibcoBRL (Rockville, MD, EE. UU.): Agarosa ultrapura, albúmina de suero de bovino. DNA polimerasa *Taq*, DNA ligasa de  $T_4$ , dATP, dCTP, dGTP, dTTP, y estándares de peso molecular, 1 kb DNA ladder (0,25-10 kb) y 100 pb (0,1-1,5 Kb).
- MERCK (Darmstadt, Alemania): ácido sulfúrico, agar ultra puro, ampicilina, cloroformo, cloruro de sodio, etanol, extracto de levadura, fosfato ácido de potasio, fosfato diácido de potasio, gentamicina, glicerol, hidróxido de sodio, isopropanol, metanol, molibdato de sodio dihidratado, nitrato cobaltoso hexahidratado, sulfato de amonio, sulfato de calcio dihidratado, sulfato cúprico pentahidratado, sulfato ferroso heptahidratado, sulfato de kanamicina, sulfato de magnesio heptahidratado, sulfato de manganeso monohidratado, sulfato de sodio anhidro, sulfato de zinc heptahidratado y triptona.
- Sigma Chemical Company (St. Louis, MO, EE:UU.): ácido bórico, ácido etilendiamino tetraacético (EDTA), azul de bromofenol, 5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-galactósido (X-Gal), bromuro de etidio, fructosa, isopropil- $\beta$ -ditiogalactopiranósido (IPTG), clorhidrato de Tris[hidroximetil]-aminometano (Tris-HCl), Tris[hidroximetil]-aminometano (Tris), y dodecil sulfato de sodio (SDS).

### **2.2 Material biológico: cepas bacterianas y plasmidios.**

Las cepas bacterianas y los plasmidios utilizados en esta memoria se indican en las Tablas 1 y Tabla 2, respectivamente. Se indica su genotipo/fenotipo más importante y fuente de origen.

**Tabla 1. Cepas bacterianas.**

<b>Cepas</b>	<b>Fenotipo/genotipo relevante</b>	<b>Fuente de origen</b>
<u>Cepas de <i>C. necator</i></u>		
JMP134	Cepa silvestre, 2,4-D; 3-CB.	DSMZ
JMP134 (pBBR1MCS-2)	3-CB, 2,4-D; Ap <sup>r</sup> ; Km <sup>r</sup>	esta memoria
JMP134 (p <i>catR1</i> )	<i>catR2</i> , 3-CB, 2,4-D; Ap <sup>r</sup> ; Km <sup>r</sup>	esta memoria
JMP134 (p <i>catR2</i> )	<i>catR1</i> , 3-CB, 2,4-D; Ap <sup>r</sup> ; Km <sup>r</sup>	esta memoria
JMP134-M1	$\Delta$ <i>catR1</i> , 3-CB, 2,4-D; Gm <sup>r</sup>	esta memoria
JMP134-M1 (p <i>catR1</i> )	$\Delta$ <i>catR1</i> , <i>catR2</i> , 3-CB, 2,4-D; Gm <sup>r</sup> ; Km <sup>r</sup> ; Ap <sup>r</sup>	esta memoria
JMP134-M1 (p <i>catR2</i> )	$\Delta$ <i>catR1</i> , <i>catR1</i> , 3-CB, 2,4-D; Gm <sup>r</sup> ; Km <sup>r</sup> ; Ap <sup>r</sup>	esta memoria
<u>Cepas de <i>E. coli</i></u>		
DH5 $\alpha$	Nal <sup>r</sup>	Bullock y cols., 1987
HB101 (pRK600)	Cm <sup>r</sup> ; <i>tra</i> <sup>+</sup>	de Lorenzo y cols., 1990
DH5 $\alpha$ (pT- <i>catR1</i> )	Nal <sup>r</sup> ; Km <sup>r</sup> ; Ap <sup>r</sup>	esta memoria
DH5 $\alpha$ (pT- <i>catR2</i> )	Nal <sup>r</sup> ; Km <sup>r</sup> ; Ap <sup>r</sup>	esta memoria
DH5 $\alpha$ (pT- <i>catR1</i> /Gm)	Nal <sup>r</sup> ; Km <sup>r</sup> ; Ap <sup>r</sup> ; Gm <sup>r</sup>	esta memoria
DH5 $\alpha$ (p <i>catR1</i> )	Nal <sup>r</sup> ; Km <sup>r</sup> ; Ap <sup>r</sup>	esta memoria
DH5 $\alpha$ (p <i>catR2</i> )	Nal <sup>r</sup> ; Km <sup>r</sup> ; Ap <sup>r</sup>	esta memoria

2,4-D, 3-CB: capacidad de crecimiento en 2,4-D o 3-CB, respectivamente; DSMZ Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen. Ap<sup>r</sup>; Km<sup>r</sup>; Gm<sup>r</sup>; Cm<sup>r</sup>; Nal<sup>r</sup>; resistencia a ampicilina, kanamicina; gentamicina; cloramfenicol o ácido nalidíxico, respectivamente.

**Tabla 2. Plasmidios.**

<b>Plasmidios</b>	<b>Fenotipo/genotipo relevante</b>	<b>Fuente de origen</b>
pRK600	Cm <sup>r</sup> , <i>tra</i> <sup>+</sup>	de Lorenzo y cols., 1990
pBSL202	Gm <sup>r</sup> ; Ap <sup>r</sup>	Alexeyev y cols., 1995
pBBR1MCS-2	<i>mob</i> , Ap <sup>r</sup> ; Km <sup>r</sup>	Kovach y cols., 1995
pTOPO-TA	Km <sup>r</sup>	Invitrogen (CA, EE.UU.)
pT- <i>catR1</i>	<i>catR1</i> , Km <sup>r</sup>	esta memoria
pT- <i>catR2</i>	<i>catR2</i> , Km <sup>r</sup>	esta memoria
pT- <i>catR1</i> /Gm	<i>catR1</i> <sup>∇</sup> <i>aacC1</i> , Km <sup>r</sup> ; Gm <sup>r</sup>	esta memoria
<i>p<i>catR1</i></i>	<i>catR1</i> , Ap <sup>r</sup> , Km <sup>r</sup>	esta memoria
<i>p<i>catR2</i></i>	<i>catR2</i> , Ap <sup>r</sup> , Km <sup>r</sup>	esta memoria

Ap<sup>r</sup>; Km<sup>r</sup>; Gm<sup>r</sup>; Cm<sup>r</sup>; resistencia a ampicilina, kanamicina; gentamicina o cloramfenicol, respectivamente. *mob/tra*<sup>+</sup>, transferencia y movilidad. *catR1*<sup>∇</sup>*aacC1*: interrupción del gen *catR1* con el gen de resistencia a gentamicina.

### 2.1.3 Medios de cultivo.

Medio Luria Bertani (LB) más antibióticos: Medio rico compuesto por triptona 1%, extracto de levadura 0,5%, y NaCl 0,5%. Las concentraciones de los antibióticos utilizados fueron: 20 µg/ml de cloranfenicol (Cm), 20 µg/ml de gentamicina (Gm), 50 µg/ml de kanamicina (Km), 25 µg/ml de ácido nalidíxico (Nal), luego de ser esterilizados con filtros de nitrocelulosa de 0,2 µm de diámetro de poro (Schleicher y Schuell, Hannover, Alemania).

Medio salino mínimo (Ksal): Medio mínimo que contiene sales de amonio y fosfato, junto a minerales en concentraciones trazas [Adriaens y cols., 1989]. Se preparó con cuatro soluciones, cuya composición se detalla más adelante: 10 ml de solución K 100X, 2,5 ml de solución M 400X y 1 ml de las soluciones F y T 1000X. Se completó a un volumen de 1 L con agua bidestilada estéril. Se esterilizaron las soluciones K, M y T por autoclave y la solución F por filtración. La composición de las soluciones fue: Solución K:  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  3 mM,  $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  7 mM,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  3,8 mM a pH 7,2. Solución M:  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  800 mM. Solución F:  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  1mM. Acidificada con ácido sulfúrico hasta pH 2,0. Solución T:  $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  12 mM,  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  1 mM,  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  0,8 mM,  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,7 mM,  $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  0,4 mM,  $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0,4 mM,  $\text{H}_3\text{BO}_3$  0,8 mM.

Para medios sólidos se añadió 1,5% p/v de agar (medio LB) o agar ultra puro (medio Ksal) antes de autoclavar el medio. El medio de cultivo fue dispensado en placas de Petri.

### 2.1.4 Material fotográfico

Las imágenes de las electroforesis fueron tomadas con el sistema "Electrophoresis Documentation and Analysis System 120" de Eastman KODAK Company (Rochester, NY, EE. UU).

## MÉTODOS

### 3.1 Cultivo de microorganismos.

#### 3.1.1 Mantención de microorganismos.

Las cepas de *E. coli* se mantuvieron en placas de agar de medio LB y las cepas *C. necator* en placas de medio mínimo, suplementado con un único sustrato, ambas a 4°C y con antibiótico en caso necesario. Desde estas placas se obtenían los inóculos para los ensayos, las que eran mantenidas periódicamente a partir de un respaldo criopreservado a -80°C. Los inóculos se prepararon en tubos con 2 ml del medio de cultivo y el antibiótico correspondiente a cada cepa, en un agitador orbital Lab Line modelo 3528, a 180 rpm durante 1-2 días, a 37°C para cepas de *E. coli* y a 30°C para cepas de *C. necator*. Como control se incubaron los medios de cultivo sin inóculo.

#### 3.1.2 Crecimiento de microorganismos.

Las mediciones de crecimiento celular a distintas concentraciones de sustrato se realizaron en solución salina y el antibiótico correspondiente a cada ensayo. Los cultivos (2 ml) se incubaron hasta fase estacionaria (1-5 días) en un agitador orbital a 180 rpm, 30°C. Asimismo, los cultivos para medir las curvas de crecimiento se incubaron en matraces con 60-100 ml de solución salina y cada cierto tiempo se tomaron alícuotas hasta llegar a fase estacionaria (1-7 días). El crecimiento celular se midió mediante unidades arbitrarias de densidad óptica a 600 nm (D.O.<sub>600</sub>) en un espectrofotómetro Beckman UV/visible 8452A. Para el análisis de las curvas de crecimiento se graficó el logaritmo de la D.O.<sub>600</sub> versus el tiempo de medición. Con los puntos correspondientes a la fase exponencial se calculó la pendiente con el método de los mínimos cuadrados. El valor de la pendiente permitió calcular el

coeficiente de crecimiento balanceado o velocidad de crecimiento ( $\mu$ ) de las cepas estudiadas, según la fórmula:

$$\ln N = \ln N_0 + \mu \times t, \quad \text{donde } N \text{ es la D.O.}_{.600} \text{ al tiempo } t \text{ y } N_0 \text{ es la D.O.}_{.600} \text{ inicial.}$$

### **3.1.3 Cultivos para ensayo de degradación de sustrato en células en reposo.**

Para los ensayos de degradación en células en reposo, se prepararon cultivos de 100 ml de medio salino suplementado con fructosa 10 mM y antibiótico, en caso necesario. Estos cultivos fueron centrifugados a 7000 rpm durante 10 min. (Beckman modelo J2-21 rotor JA-14), lavados y resuspendidos en medio mínimo de manera de estandarizar la concentración de células a una D.O.<sub>.600</sub> de 1,8-2,0. Éstas fueron inducidas durante 1,5-3 h con sustratos a modo de inductores a una concentración final de 0,75 mM. Se efectuó en forma paralela un control sin inducción. Estos cultivos se incubaron en un agitador orbital a 180 rpm y 30°C durante 1-3 h. Terminada la inducción las células fueron lavadas y resuspendidas en medio mínimo manteniendo la D.O.<sub>.600</sub> anterior. Para el ensayo de degradación se expusieron las células a 1 mM de 3-CB o BZ al tiempo cero del ensayo. Se tomaron alícuotas de 200  $\mu$ l de los cultivos cada 10-20 min. Éstas se centrifugaron durante 4 min a 13000 rpm (microcentrífuga Eppendorff 5804R) y parte del sobrenadante fue rescatado y almacenado a -20°C hasta su medición en un equipo HPLC.

### **3.1.4. Cuantificación de la degradación mediante HPLC.**

Las muestras obtenidas se analizaron en un equipo HPLC Beckman, equipado con una columna C-18 Waters 4,6x 250 mm N° WAT654275. Se utilizó como solvente una mezcla 80% metanol, 20% agua y 0,3% (vol./vol.) de ácido ortofosfórico a un flujo de 1 ml/min. La aparición de señales en el

efluente de la columna se registró por espectroscopía UV a 235 y 240 nm, mediante un detector 166 de arreglo de diodo. Se determinó la presencia de BZ y 3-CB a 4,0 y 4,8 min., respectivamente. Los datos de áreas, obtenidos de la integración del espectro fueron convertidos a unidades de concentración mediante curvas de calibración obtenidas previamente con cada sustrato ensayado.

### **3.2 Introducción de DNA foráneo: electroporación y conjugación.**

La electroporación se realizó en un equipo BioRad (Gene Pulser, modelo 1652110 y Gene Pulser II plus), el que se operó a  $200 \Omega$ ,  $25 \mu\text{F}$ , y  $2,5 \text{ kV}$ . Las células electrocompetentes de *E. coli* y *C. necator* fueron obtenidas a partir de 50 ml de cultivo fresco en medio LB a una  $\text{D.O.}_{600}$  aproximada de 0,5. Las células se incubaron en hielo durante 30 min y se centrifugaron a 7.000 rpm durante 15 min en una centrifuga Beckman J2-21 (rotor JA-14). El precipitado obtenido fue lavado dos veces con 100 y 50 ml de una solución de glicerol al 10% estéril, resuspendido finalmente en  $500 \mu\text{l}$  de esta solución y alícuotado en volúmenes de  $50 \mu\text{l}$  en tubos Eppendorff de 1,5 ml. Las células fueron almacenadas a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Para su utilización, las alícuotas de células se colocaron en hielo y se mezclaron con  $1-3 \mu\text{l}$  de la solución del DNA a electroporar en una cubeta de 0,2 cm, enfriada previamente a  $-20^{\circ}\text{C}$ . En el caso de utilizar una solución con mayor cantidad de DNA, dicha solución fue previamente dializada durante 30 min usando filtros de nitrocelulosa de  $0,025 \mu\text{m}$  de diámetro de poro (Millipore). Luego del pulso de corriente aplicado a la mezcla, ésta se resuspendió en 1 ml de medio LB y se traspasó a un tubo de ensayo para la recuperación de las células durante 1 h. Posteriormente, alícuotas de  $100-500 \mu\text{l}$  fueron incubadas toda la noche en placas de agar LB con el antibiótico correspondiente. En aquellos casos en que fue útil para la selección de clones recombinantes (sistema de  $\alpha$ -complementación [Bullock y cols., 1987]), se emplearon placas de agar LB en cuya superficie se dispersó  $50 \mu\text{l}$  de una solución 20 g/l de

X-Gal y 5  $\mu$ l de una solución 200 g/l de IPTG, que luego se secaron en estufa durante 1 h a 37°C, previo a ser sembradas.

La conjugación de cepas *C. necator* se realizó con la cepa dadora *E. coli* DH5 $\alpha$  y la cepa "helper" *E. coli* pRK600. Las tres cepas se cultivaron a 37°C toda la noche en 2 ml de medio LB con los antibióticos correspondientes. Las células se obtuvieron mediante centrifugación del medio de cultivo durante 2 min a 6000 rpm (microcentrífuga Eppendorff 5804R) y se lavaron dos veces con 1 ml de MgSO<sub>4</sub> 10 mM estéril. Los precipitados se resuspendieron en 40  $\mu$ l de la solución anterior, se mezclaron y se incubaron en una placa de agar LB durante toda la noche a 37°C. La mezcla de células se resuspendió muy suavemente en 1 ml de MgSO<sub>4</sub> 10 mM y se procedió a su aislamiento en placas de medio mínimo con 2,4-D suplementado con el antibiótico cuya resistencia está codificada en el plasmidio movilizado en la conjugación.

### **3.3 Análisis de células transformantes.**

El análisis de células transformantes se realizó por dos métodos. El primero, el método rápido de visualización de plasmidios [Beuken y cols., 1998], permite distinguir plasmidios de mayor tamaño. Esto se realizó mediante el precipitado de alícuotas de cultivo (50  $\mu$ l), el que fue resuspendido en tampón de carga (azul de bromofenol y 100 mM de sacarosa). Luego se separó el DNA de las proteínas presentes en la mezcla mediante la extracción con fenol-cloroformo (1:1). Posteriormente, se centrifugó esta mezcla durante 5 min a 14000 rpm (microcentrífuga Eppendorff 5804R) y se utilizó una alícuota de la fase acuosa en la cual se encontraba el DNA para la electroforesis en gel de agarosa.

El segundo método que se utilizó para el análisis de células transformantes fue PCR convencional o PCR de colonias. Este último se realizó por resuspensión de la colonia en 50  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O estéril libre de nucleasas (Gibco BRL, Rockville, MD, EE.UU.) previo respaldo de las colonias escogidas

(placa maestra). Luego de incubar a 95°C por 10 min para la liberación del DNA al medio, se centrifugó a velocidad máxima durante 10 min., utilizándose 1 µl del sobrenadante en la reacción de PCR.

### **3.4 Extracción de DNA total y plasmidial.**

La purificación de DNA total a partir de cepas de *C. necator* se realizó con el sistema comercial “Wizard Genomic DNA Purification” (Promega, Madison, WI, EE.UU.). Este sistema comercial se basa en una lisis celular a alta temperatura (80°C) y la precipitación del DNA en presencia de isopropanol. El DNA obtenido por este método es de alta pureza y puede ser empleado directamente para la amplificación por PCR. La purificación de DNA plasmidial se logró mediante el sistema comercial QIAprep Spin Plasmid, #27106 (QIAGEN, Chatsworth, CA, EE.UU.). Este sistema comercial se basa en la lisis alcalina de la célula, precipitación de DNA con etanol y unión del DNA a una columna de sílica para su posterior elución con agua estéril libre de nucleasas. Este método también permite el uso inmediato del DNA extraído en la amplificación por PCR.

### **3.5 Amplificación de DNA por PCR.**

#### **3.5.1 Mezcla de reacción.**

Los componentes de la mezcla de reacción se utilizaron a la siguiente concentración final: tampón para DNA polimerasa *Taq* 1x, partidores 1 pmol/µl, mezcla de desoxirribonucleótidos trifosfatos (dNTP) 0,2 mM, MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM, DNA polimerasa *Taq* 0,05U y dimetilsulfóxido 1x. Sólo para el programa 4 se agregó albúmina de suero de bovino 1x.

### 3.5.2 Programas de amplificación.

Las reacciones de PCR se realizaron en un termociclador Perkin-Elmer modelo Gene Amp PCR System 2400. Los programas de amplificación consistieron de un ciclo inicial de desnaturalización (5 min a 94°C), un ciclo de amplificación propio de cada programa y un ciclo de extensión (7 min a 72°C) para luego bajar la temperatura a 4°C. Los ciclos de amplificación específicos para cada programa y DNA se detallan a continuación:

Programa 1: Se utilizó para la obtención específica de los genes *catR1* y *catR2*. Constó de 32 ciclos de amplificación de: 30 s a 95°C, 30 s a 54°C y 1,5 min a 72°C.

Programa 2: Se utilizó para la amplificación de los genes *catR1* y *catR2* a partir de los plasmidios pT-*catR1*, pT-*catR2*, p*catR1* y p*catR2*. Constó de 32 ciclos de amplificación de: 30 s a 95°C, 45 s a 54°C y 2 min a 72°C.

Programa 3: Se utilizó para la amplificación de los insertos de los plasmidios pTOPO-TA y pBBR1MCS-2. Constó de 30 ciclos de amplificación de: 30 s a 95°C, 30 s a 59°C y 30 s a 72°C.

Programa 4: Se utilizó para la obtención de un segmento de la secuencia del 16S de *C. necator*. Constó de 25 ciclos de amplificación de: 45 s a 94°C, 45 s a 56°C y 2 min a 72°C.

Programa 5: Se utilizó para la detección específica de la cepa JMP134-M1. Constó de 30 ciclos de amplificación de: 30 s a 95°C, 45 s a 55°C y 2,5 min a 72°C.

### 3.5.3 Diseño de partidores y análisis de secuencias.

El diseño de los partidores para la amplificación de los genes *catR* (partidores CatR1 Rev, CatR1 Fw, CatR2 Rev y CatR2 Fw) y de la zona más externa a la amplificada anteriormente (partidores CatR1 EXT Rev y CatR1 EXT Fw) se realizó con las secuencias disponibles en ([http://www.jgi.doe.gov/tempweb/JGI\\_microbial/html](http://www.jgi.doe.gov/tempweb/JGI_microbial/html)) mediante los programas VectorNTI\_6.0 y Primer3.

El diseño de los partidores para la amplificación de la zona interna del gen de resistencia a Gm se realizó mediante la secuenciación de la construcción pT-*catR1*/Gm con los partidores M13 Fw y M13 Rev, localización de la zona correspondiente al gen de resistencia y posterior búsqueda de homología de esta secuencia por BLASTN y BLASTX en la base de datos del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). En base al plasmidio homólogo de secuencia disponible, pBSL141 [Alexeyev y cols., 1995], se diseñaron los partidores mediante los programas VectorNTI\_6.0 y Primer3. Esto permitió definir los partidores Genta Rev y Genta Fw.

El análisis de las secuencias obtenidas de la unidad de secuenciación de la Facultad de Ciencias Biológicas de la P. Universidad Católica de Chile se realizó con el software DNASTAR (Lasergene Inc., Madison, WI, EE. UU.), utilizando el sistema MegAlign de este software.

En la Tabla 3, se muestran los partidores utilizados en este trabajo.

### **3.6 Clonamiento de DNA.**

Los genes *catR1* y *catR2* fueron clonados en pTOPO-TA. Los plasmidios obtenidos, pT-*catR1* y pT-*catR2* fueron electroporados a *E. coli* DH5 $\alpha$  generando las cepas DH5 $\alpha$  pT-*catR1* y DH5 $\alpha$  pT-*catR2*. Los plasmidios fueron purificados y digeridos con el fin de liberar las secuencias de los genes *catR1* y *catR2*. Por esto el plasmidio pT-*catR1* fue digerido con las enzimas *EcoRI* y *NcoI* utilizando un tampón común a ambas enzimas y el plasmidio pT-*catR2* fue digerido con *EcoRI* y *BssHII*. Las secuencias de los genes *catR1* y *catR2* fueron ligadas al vector pBBR1MCS-2 digerido con *EcoRI*. Los plasmidios obtenidos, *pcatR1* y *pcatR2*, fueron electroporados a *E. coli* DH5 $\alpha$  y las transformantes se por ser Km<sup>r</sup>. De esta manera se obtuvieron las cepas DH5 $\alpha$  (*pcatR1*) y DH5 $\alpha$  (*pcatR2*). Se verificó la presencia del inserto en las colonias resistentes mediante PCR con los partidores M13 Fw y M13 Rev, y

**Tabla 3. Partidores para la amplificación por PCR.**

<b>Nº</b>	<b>Partidor</b>	<b>Secuencia (5' → 3')</b>	<b>Prog.</b>	<b>Fuente de origen</b>
1	CatR1 Fw	TAT GCG AAA GTA TGG GAG CC	1 y 2	esta memoria
2	CatR1 Rev	ATT GTC TGG TAG TGT CGG GG	1 y 2	esta memoria
3	CatR2 Fw	TCG TGG CTG TCA TAC CTT TG	1 y 2	esta memoria
4	CatR2 Rev	AAC ATC GTG GAA GCG TCA GT	1 y 2	esta memoria
5	M13 Fw	CGC CAG GGT TTT CCC AGT CAC G	2 y 3	GibcoBRL (MD, EE.UU.)
6	M13 Rev	TCA CAC AGG AAA CAG CTA TGA C	2 y 3	GibcoBRL (MD, EE.UU.)
7	8F	AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG	4	Amann y cols., 1995
8	1392	ACG GGC GGT GTG TAC	4	Amann y cols., 1995
9	Genta Rev	TGC TTG AGG AGA TTG ATG AGC	5	esta memoria
10	Genta Fw	TTC GGA GAC GTA GCC ACC TA	5	esta memoria
11	CatR1 EXT Rev	TTT CAT CGC CAT AGG AAA GG	5	esta memoria
12	CatR1 EXT Fw	CGA TAC CCT TCC ACA CTT CG	5	esta memoria

Se señalan los partidores utilizados, su secuencia nucleotídica, los programas de amplificación y la fuente de origen.

luego por digestión con la enzima *EcoRI*, que libera el inserto.

Por otra parte, el plasmidio pT-*catR1* se purificó y la secuencia del gen *catR1* fue interrumpida en la zona central mediante el gen que codifica para una gentamicina 3-acetiltransferasa (1500 pb) en un único sitio de corte. Este gen fue obtenido del plasmidio pBSL202 mediante digestión con la enzima de restricción *XhoI*, cuyos extremos cohesivos fueron compatibles a los generados por el corte único con *Sall* en el plasmidio pT-*catR1*. Con esto se obtuvo el plasmidio pT-*catR1*/Gm. Este fue introducido por electroporación a *E. coli* DH5 $\alpha$  generando la cepa DH5 $\alpha$  (pT-*catR1*/Gm). Por lo anterior, se seleccionaron las transformantes por ser resistentes a Gm. Se verificó la presencia del plasmidio en las bacterias resistentes mediante PCR y secuenciación de los insertos con los partidores M13Fw y M13Rev.

Las reacciones de restricción y ligación del DNA fueron realizadas según las indicaciones especificadas por el proveedor e incubando con DNA ligasa del fago T4 a 16°C durante toda la noche. Las endonucleasas de restricción se obtuvieron de New England Biolabs Inc. (Beverly, MA, EE.UU.).

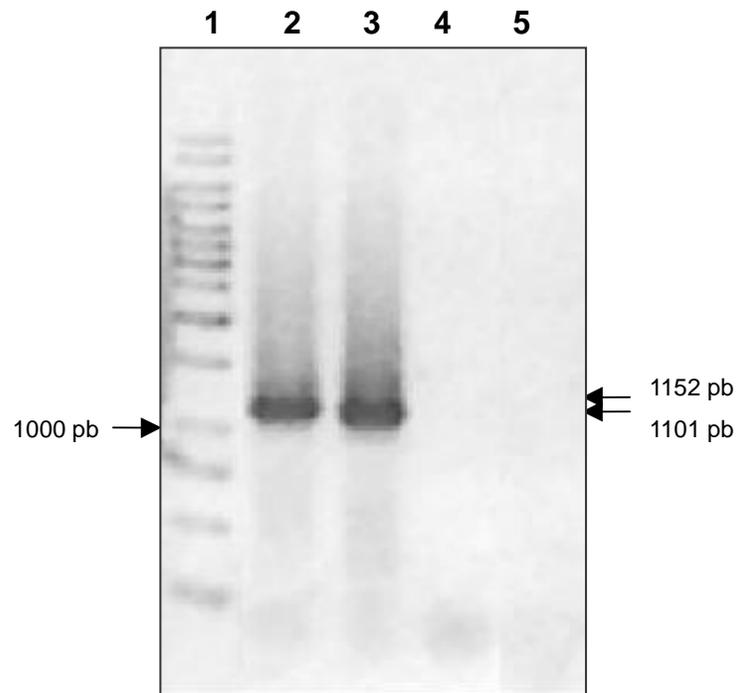
### **3.7 Predicción bioinformática de la estructura plegada de las proteínas regulatorias.**

Para predecir la estructura hipotética de las proteínas regulatorias se utilizó el programa 3D-PSSM del Imperial College of Science, Inglaterra (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/~3dpssm/index2.html>). Se visualizaron las estructuras modeladas mediante el programa Deepview/Swiss-PdbViewer v. 3.7 (<http://www.expasy.org/spdbv/>). La predicción, realizada por homología estructural con una certeza >90% se acercó al regulador CbnR de *C. necator* NH9. El estudio del dominio de regulación se realizó con el regulador CysB en *Klebsiella aerogenes* y el regulador DntR en *Burkholderia sp.* DNT.

## RESULTADOS

### 4.1 Obtención de cepas *C. necator* para el estudio de los genes *catR*.

En esta memoria se propuso estudiar el rol del regulador de la vía no sustituida, CatR, en el metabolismo de 3-CB y 2,4-D. Para ello, se analizó la presencia de este regulador en el genoma de *C. necator* JMP134, encontrándose dos posibles ORFs, *catR1* y *catR2*. Para estudiar la función de estos dos posibles genes se utilizó una estrategia genética que consistió en evaluar el efecto de su ausencia y de su sobreexpresión en el metabolismo de 3-CB y 2,4-D. Como punto de partida se clonó los genes *catR* en el vector pTOPO-TA. Para esto se amplificó la secuencia de cada gen mediante PCR. Esta amplificación se realizó con DNA cromosomal purificado de *C. necator* JMP134, utilizando partidores diseñados específicamente para obtener los ORFs completos de los genes *catR1* y *catR2*, incluyendo 80-120 pb río arriba del inicio de traducción. Como se muestra en la Fig. 5, se obtuvo bandas del tamaño esperado para *catR1* y *catR2* (1101 y 1152 pb, respectivamente). Estos amplicones fueron ligados posteriormente al vector comercial pTOPO-TA (Km<sup>r</sup>) para su clonamiento en *E. coli* DH5 $\alpha$ , donde las colonias blancas fueron analizadas por la presencia de inserto mediante un método rápido de visualización de plasmidios y PCR. Finalmente se verificó que los insertos correspondían a los genes *catR1* y *catR2* mediante secuenciación. Dichos plasmidios se denominaron pT-*catR2* y pT-*catR1*, respectivamente. Estos plasmidios fueron utilizados en la obtención de las cepas de *C. necator* que se describen en las siguientes secciones.



**Fig. 5. Amplificación por PCR de la secuencia de los genes *catR1* y *catR2*.**

Carril 1: estándar de DNA de 1 kb. Carril 2: *catR2* en *C. necator* JMP134. Carril 3: *catR1* en *C. necator* JMP134. Carriles 4 y 5, controles de amplificación sin DNA para la pareja de partidores utilizada en la amplificación de la secuencia de los genes *catR1* y *catR2*, respectivamente.

#### **4.1.1 Obtención de cepas de *C. necator* con sobreexpresión de los genes *catR1* y *catR2*.**

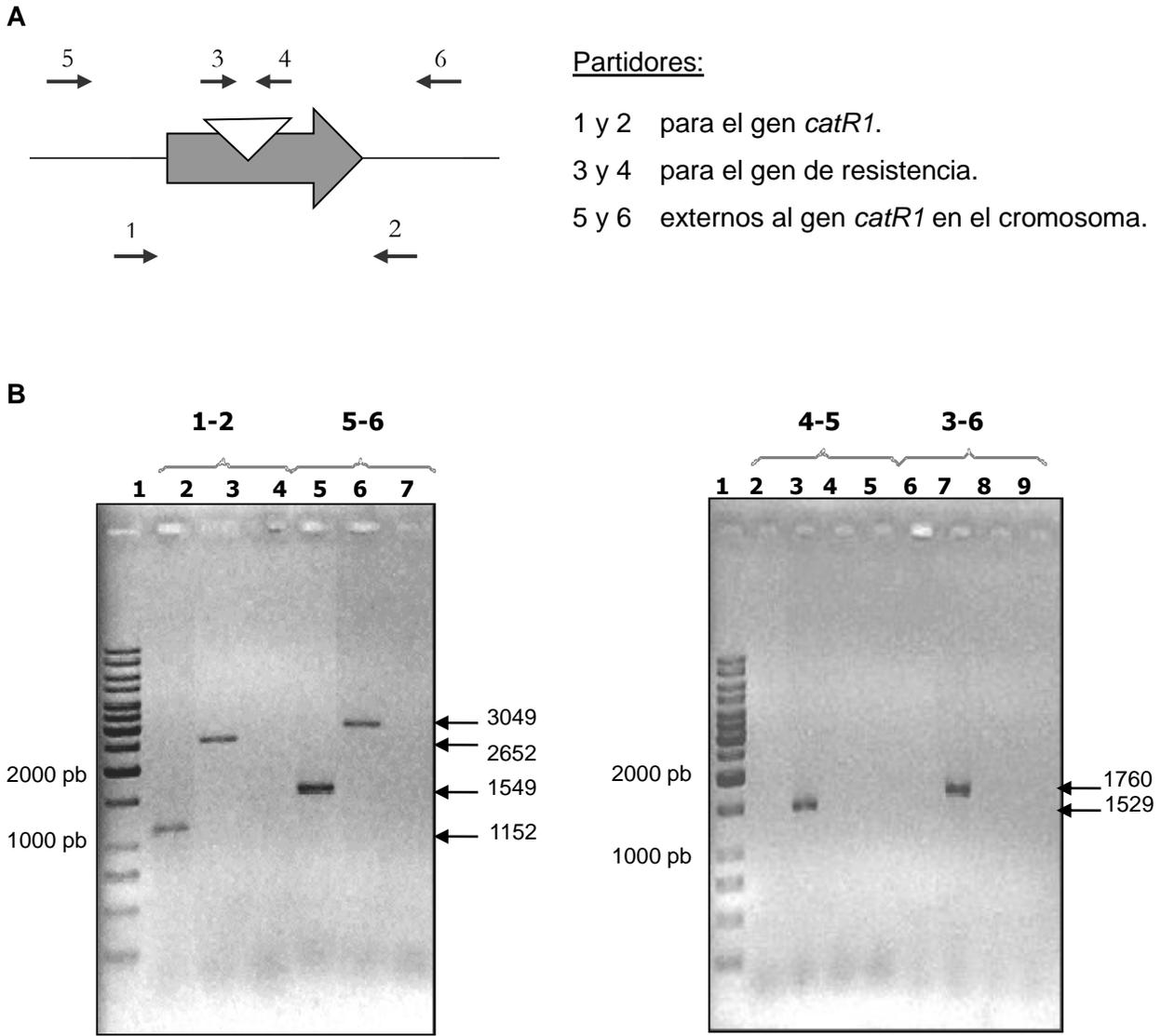
Para sobreexpresar los genes *catR1* y *catR2* se subclonaron sus secuencias a partir de los plasmidios anteriores en el vector pBBR1MCS-2 (Km<sup>r</sup>), un plasmidio capaz de replicar en *C. necator* con número de copia intermedio [Kovach y cols., 1995]. Los plasmidios obtenidos, *p*catR1** y *p*catR2**, fueron introducidos a *C. necator* mediante conjugación triparental, generando las cepas JMP134 (*p*catR1**) y JMP134 (*p*catR2**). Asimismo, se generó la cepa JMP134 (pBBR1MCS-2), por introducción del plasmidio pBBR1MCS-2, para utilizarla como cepa control, a fin de excluir cualquier efecto atribuible a la presencia del plasmidio en la cepa silvestre, o a la utilización de Km en los cultivos. La detección por PCR de las secuencias de los genes *catR1* y *catR2* usando los partidores CatR1Fw y CatR1Rev, CatR2Fw y CatR2Rev, respectivamente, confirmó la presencia de las secuencias de *catR1* y *catR2* en los respectivos transconjugantes.

#### **4.1.2 Obtención de una cepa de *C. necator* mutante en el gen *catR1*.**

La cepa *C. necator* JMP134 mutada en el gen *catR1* se obtuvo mediante la doble recombinación homóloga del gen *catR1*. Esta estrategia consiste en que el gen de interés es clonado en un plasmidio suicida e interrumpido por un gen que codifica una resistencia a antibiótico. Esta construcción plasmidial es introducida en la cepa a mutar, donde mediante la doble recombinación entre las zonas homólogas del gen portado por el plasmidio y el gen cromosomal se produce el intercambio del gen completo por el gen interrumpido, resultando finalmente un gen no funcional. La doble recombinación se detecta seleccionando las recombinantes por su capacidad de crecer en el antibiótico cuyo gen de resistencia fue usado para interrumpir el gen en cuestión. Con el fin de minimizar posibles efectos polares, es importante señalar que el ORF de la resistencia a antibiótico que se utilizó en la

interrupción se encuentra flanqueado por terminadores que impiden la traducción de los genes ubicados río abajo de la mutación [Alexeyev y cols., 1995].

De acuerdo a lo descrito anteriormente se utilizó el plasmidio pT-*catR1*/Gm, el cual es incapaz de replicar en *C. necator*. Este plasmidio que contiene el gen *catR1* interrumpido por el gen de resistencia a gentamicina fue purificado e introducido a *C. necator* por electroporación, utilizando para ello cantidades mayores a 200 ng de plasmidio con el fin de aumentar la probabilidad de obtener recombinantes [Lefrancois y cols., 1998]. La obtención de mutantes del gen *catR2* en *C. necator* JMP134 tuvo una frecuencia del orden de  $10^{-10}$  recombinantes/célula. Se verificó que estas colonias tenían la capacidad de crecer en medio mínimo con 2,4-D suplementado con Gm y además ser sensibles a Km, lo que es esperado para una doble recombinante en *C. necator*. Luego se verificó su genotipo por la amplificación del gen *catR1* mediante PCR a partir del DNA cromosomal de estas colonias, puesto que era esperable un aumento de tamaño en los productos de amplificación en el recombinante. Esto se realizó con partidores con los cuales se obtuvo la secuencia de este gen desde *C. necator* (CatR1 Fw y CatR1 Rev), así como, con partidores CatR1 EXT Fw y CatR1 EXT Rev, externos al gen en el cromosoma. Con el fin obtener solamente la amplificación en la cepa recombinante se utilizaron los partidores externos al gen en el cromosoma, en combinación con partidores Genta Fw y Genta Rev, para el gen de resistencia a Gm. Como se observa en la Fig. 6, el tamaño del producto amplificado para la cepa de *C. necator* mutante del gen *catR1* (JMP134-M1) aumentó en aprox. 1500 pb respecto del gen silvestre tanto al utilizar los partidores para la amplificación del gen *catR1* como los partidores externos al gen en el cromosoma (combinaciones 1-2 y 5-6, respectivamente). La amplificación con los partidores específicos para la recombinante (combinaciones 4-5 y 3-6, respectivamente) generó los amplicones de tamaño esperado (aprox. 1529 y 1760 pb). Como se esperaba, no se obtuvo amplificación con estas combinaciones de partidores en la cepa silvestre ni



**Fig. 6. Comprobación mediante amplificación por PCR de la obtención de la cepa mutante JMP134-M1. A.** Esquema de las posiciones donde alinean los partidores utilizados para el análisis de la cepa de *C. necator* JMP134-M1, mediante PCR. **B. Izquierda:** Productos de amplificación con los partidores 1-2 y 5-6. Carril 1 Estándar DNA de 1 kb. Carril: 2 y 5 cepa JMP134. Carril: 3 y 6 cepa JMP134-M1. Carril: 4 y 7 control sin DNA. **Derecha:** Productos de amplificación con los partidores 4-5 y 3-6. Carril 1 Estándar DNA 1 kb. Carril: 2 y 6 cepa JMP134. Carril: 3 y 7 cepa JMP134-M1. Carril: 5 y 9 control sin DNA. Carril 4 y 8 control con pT-*catR1*/Gm. Se señalan mediante flechas las bandas obtenidas para la cepa mutante y al costado de la figura el tamaño esperado en pb. Combinación: 1-2: CatR1 Rev -CatR1 Fw, 5-6: CatR1 EXT Fw-CatR1 EXT Rev; 4-5: Genta Fw- CatR1 EXT Fw y 3-6: Genta Rev- CatR1 EXT Rev.

en el plasmidio que contenía el gen de resistencia a Gm, los cuales se utilizaron como controles. Se comprobó que la cepa mutante JMP134-M1 correspondía a *C. necator* mediante la amplificación de un segmento del DNA ribosomal 16S y posterior digestión de este amplicón con la enzima de restricción *MspI*, la que produjo los fragmentos esperados de aproximadamente 544, 239, 139, 110 y 81 pb (datos no mostrados).

#### **4.1.3 Obtención de cepa mutante en el gen *catR1* (JMP134-M1) complementada con los genes *catR1* o *catR2*.**

Con el fin de establecer que el fenotipo de la cepa mutante se debía solamente a la interrupción del gen *catR1*, la cepa JMP134-M1 fue complementada con el plasmidio *pcatR1* (Km<sup>r</sup>) mediante conjugación triparental. Para explorar la potencial contribución del gen *catR2*, se realizó la complementación de la cepa mutante con el plasmidio *pcatR2* (Km<sup>r</sup>). Usando partidores que amplificaban la zona de múltiple clonamiento se obtuvo el producto del tamaño esperado para la presencia de los insertos en los conjugantes. La obtención de los productos esperados (tamaños aprox. 1381 y 1434 pb) indicó que estos genes se encontraban presentes en estas cepas, las cuales fueron denominadas JMP134-M1 (*pcatR1*) y JMP134-M1 (*pcatR2*), respectivamente.

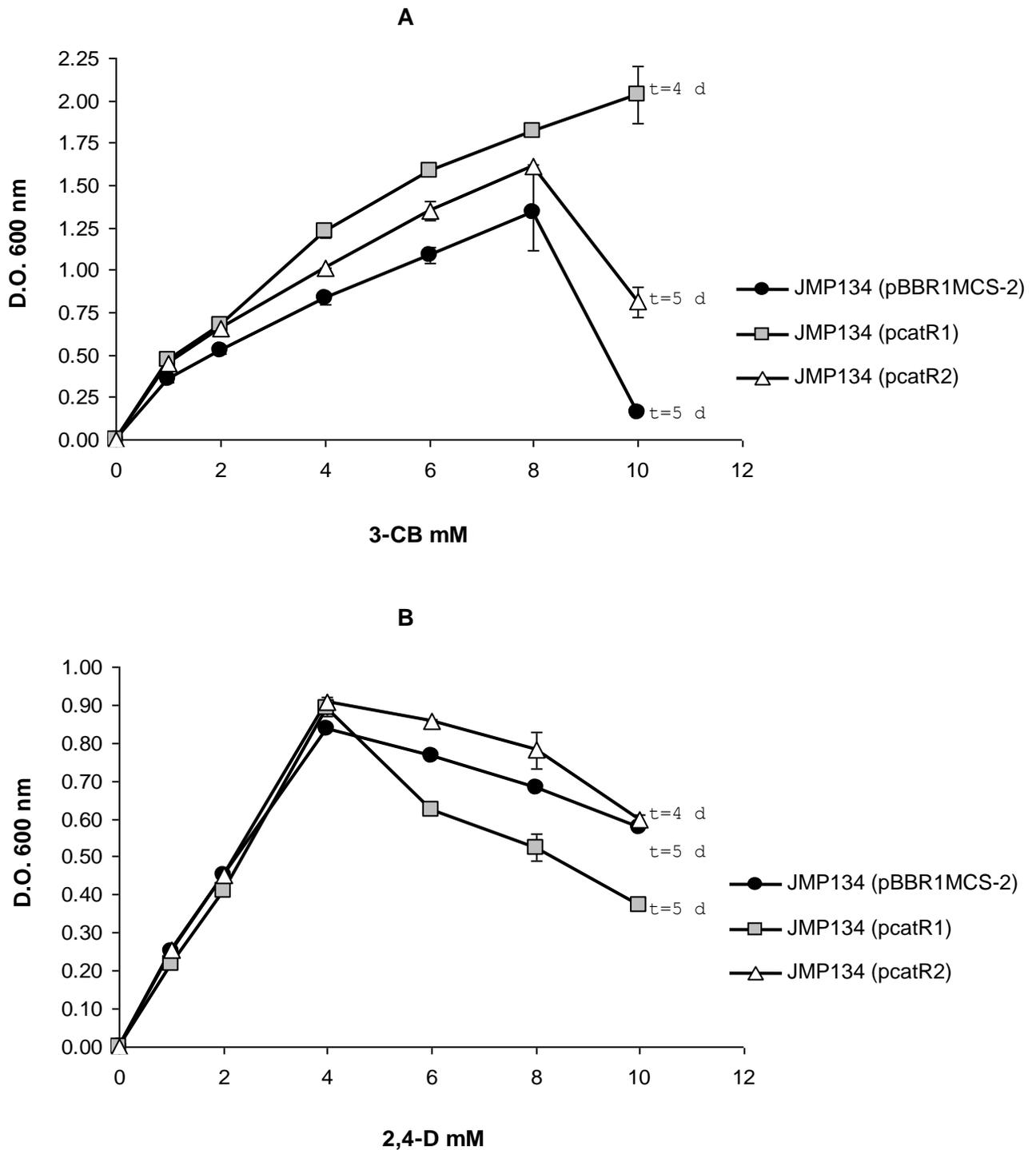
#### **4.2 Efecto de la sobreexpresión de los genes *catR* en el metabolismo de compuestos aromáticos.**

Para determinar cual es la influencia de los reguladores CatR en el metabolismo de algunos compuestos cloroaromáticos, se estudió el efecto de su sobreexpresión en el crecimiento de *C. necator* JMP134 en 3-CB y 2,4-D, usándose también el BZ como compuesto de referencia. Los parámetros que se utilizaron para evaluar esta influencia fueron: a) el efecto de la concentración de sustrato sobre el

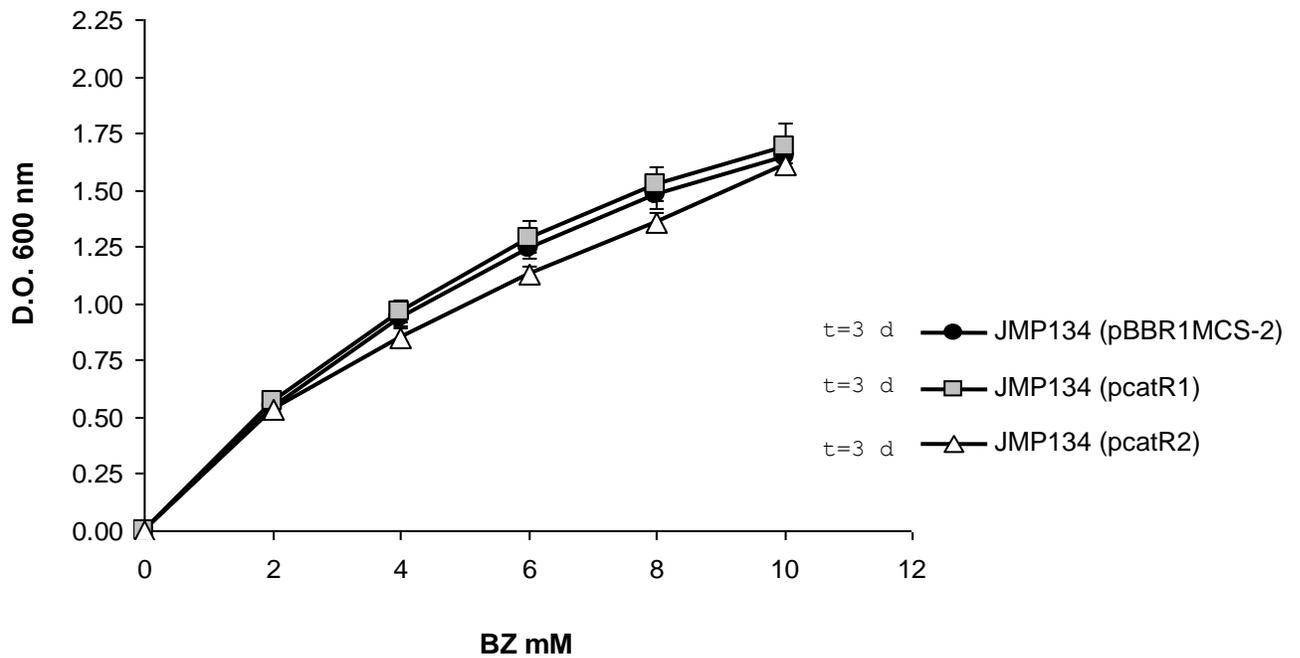
crecimiento de las cepas (rendimiento celular *versus* concentración de sustrato) y b) la velocidad de crecimiento ( $\mu$ ). En algunos casos, se determinó también la remoción del compuesto mediante HPLC.

El estudio del efecto de la concentración de 3-CB en el crecimiento de las cepas JMP134 (pBBR1MCS-2), JMP134 (*pcatR1*) y JMP134 (*pcatR2*) indicó que la cepa JMP134 (*pcatR1*), alcanzó una mayor densidad de cultivo que la cepa JMP134 (*pcatR2*) y ésta, a su vez, mayor densidad de cultivo que la cepa control, JMP134 (pBBR1MCS-2), en todas las concentraciones analizadas (Fig. 7 A). Se observó que a diferencia de la cepa JMP134 (*pcatR2*) y la cepa control, una mayor concentración de 3-CB (10 mM) no disminuyó en rendimiento celular de la cepa JMP134 (*pcatR1*). Esto sugiere que el regulador CatR1 puede activar la expresión de los módulos *tfd* y por ende contribuir a una menor acumulación de intermediarios tóxicos en esta cepa. Un comportamiento opuesto, con respecto a la cepa control, se observó cuando se estudió el efecto de concentraciones crecientes de 2,4-D, ya que la cepa JMP134 (*pcatR2*) alcanzó mayor densidad de cultivo, mientras que la cepa JMP134 (*pcatR1*) mostró menor densidad de cultivo (Fig. 7 B). No se encontró diferencias con respecto a la cepa control, cuando se realizó el mismo estudio en cultivos usando BZ como única fuente de carbono, alcanzando las tres cepas la misma densidad óptica en fase estacionaria (Fig. 8).

Posteriormente se profundizó el estudio del comportamiento de las cepas JMP134 (*pcatR1*), JMP134 (*pcatR2*) y JMP134 (pBBR1MCS-2) durante el crecimiento en 3-CB, 2,4-D y BZ. Esto se realizó mediante curvas de crecimiento, en algunos casos a varias concentraciones. A través de la gráfica en escala logarítmica se calculó la velocidad de crecimiento ( $\mu$ ). Como durante el crecimiento en 3-CB se observó que las cepas JMP134 (*pcatR1*) y JMP134 (*pcatR2*) mantenían su comportamiento en un rango amplio de concentraciones con respecto a su control JMP134 (pBBR1MCS-2), (Fig. 7 A), se calculó la velocidad de crecimiento a partir de curvas de crecimiento en medios de cultivo que contenían 4 y 6 mM de 3-CB. En ambas concentraciones se pudo observar que las cepas JMP134 (*pcatR1*) y JMP134



**Fig. 7. Efecto de la concentración de 3-CB y 2,4-D en el crecimiento de las cepas que sobreexpresan los genes *catR*.** Se muestra la D.O.<sub>600</sub> alcanzada en cultivos en fase estacionaria de medio mínimo suplementado con Km a concentraciones crecientes de 3-CB (A) y 2,4-D (B). Se señala el tiempo (t) necesario para alcanzar fase estacionaria a 10 mM de 3-CB o 2,4-D. Los valores corresponden al rango obtenido de dos determinaciones independientes.



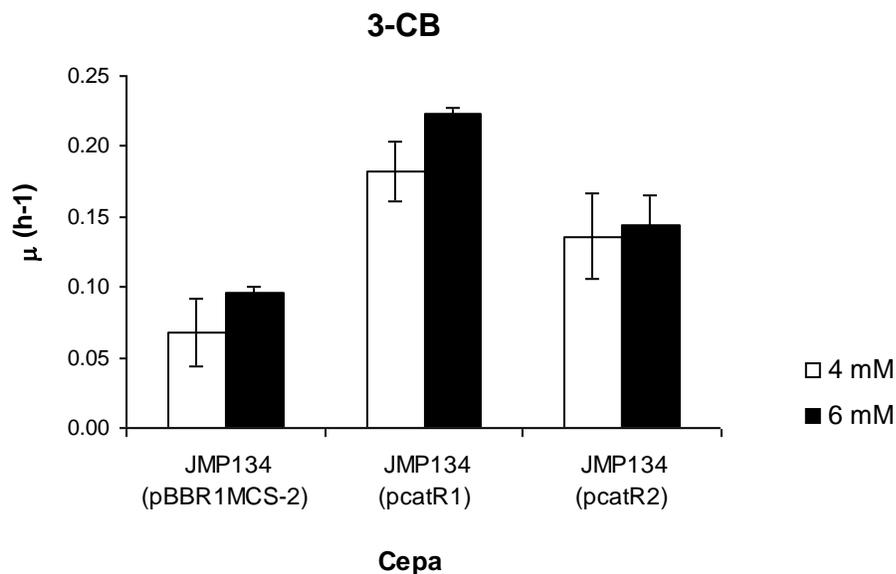
**Fig. 8. Efecto de la concentración de BZ en el crecimiento de las cepas que sobreexpresan los genes *catR*.** Se muestra la D.O.<sub>600</sub> alcanzada en cultivos en fase estacionaria de medio mínimo suplementado con Km a concentraciones crecientes de BZ. Se señala el tiempo (t) necesario para alcanzar fase estacionaria a 10 mM de BZ. Los valores corresponden al rango obtenido de dos determinaciones independientes.

(*pcatR2*) presentaron mayor velocidad de crecimiento que la cepa control JMP134 (*pBBR1MCS-2*) (Fig. 9). El estudio equivalente con 2,4-D fue efectuado en curvas de crecimiento a 2, 4 y 6 mM del compuesto. El comportamiento de las cepas fue dependiente de la concentración de sustrato (Fig. 10), ya que a 2 mM no se observó diferencia en la velocidad de crecimiento. En cambio, a 4 mM y 6 mM de 2,4-D, la cepa de *C. necator* que sobreexpresa el gen *catR1* tuvo una velocidad menor que el control. La disminución de la velocidad de crecimiento al aumentar la concentración de sustrato fue una tendencia observada en la cepa JMP134 (*pBBR1MCS-2*) y JMP134 (*pcatR1*) pero con distinta magnitud. En la cepa JMP134 (*pcatR1*) esta magnitud aumentó aprox. al doble respecto de la cepa control, de modo que esta cepa fue afectada mayormente por la concentración de 2,4-D. En cambio, la cepa JMP134 (*pcatR2*) no fue afectada por el aumento de la concentración de sustrato. Esto sugiere que una mayor cantidad del regulador CatR2 en *C. necator* provoca una menor sensibilidad de esta cepa a la intoxicación mediada por la acumulación de clorocatecoles, intermediarios de la degradación de 2,4-D (Fig. 10).

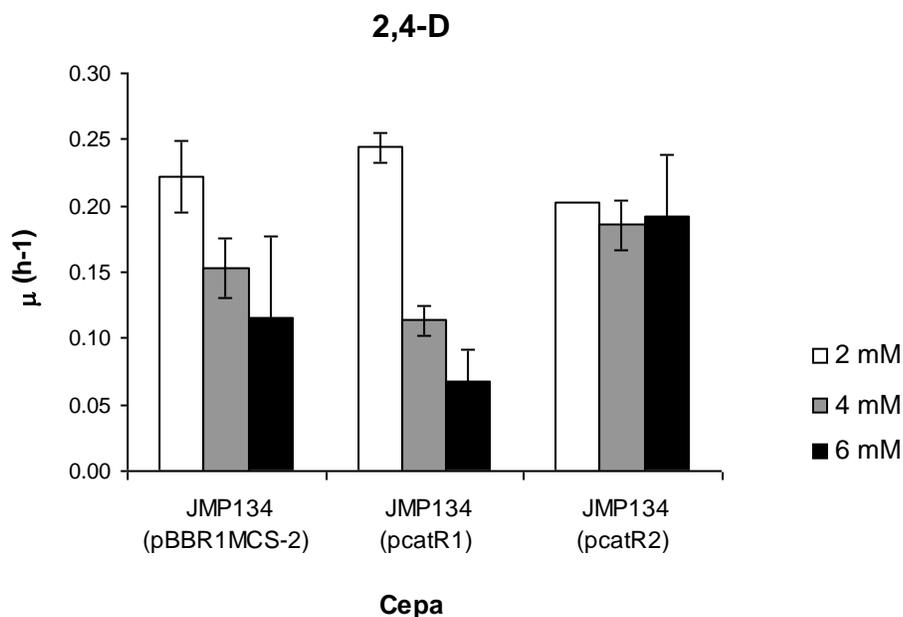
Por otra parte, se observó las cepas JMP134 (*pcatR2*) y JMP134 (*pcatR1*) presentaron valores similares de velocidad de crecimiento que la cepa control en 2 mM de BZ ( $0,3289 \pm 0,098 \text{ h}^{-1}$ ,  $0,3335 \pm 0,089 \text{ h}^{-1}$  y  $0,3655 \pm 0,089 \text{ h}^{-1}$ , respectivamente).

#### **4.3 Estudio fenotípico de la cepa mutante en el gen *catR1*.**

A continuación, se evaluó el efecto de la interrupción del gen *catR1* en el metabolismo de 3-CB, 2,4-D y BZ. Se estudió preliminarmente el rendimiento de la cepa JMP134-M1 respecto a la concentración de estos sustratos. En estos experimentos, se observó que la cepa JMP134-M1 no se vio mayormente afectada por el aumento de la concentración de estos sustratos, puesto que alcanzó



**Fig. 9. Efecto de la concentración de 3-CB en la velocidad de crecimiento de las cepas que sobreexpresan los genes *catR*.** Se muestra el rango de velocidad de crecimiento expresado en h<sup>-1</sup>, calculados a partir de curvas de crecimiento en medio mínimo a 4 y 6 mM de 3-CB suplementado con Km. Los valores corresponden a dos determinaciones independientes.



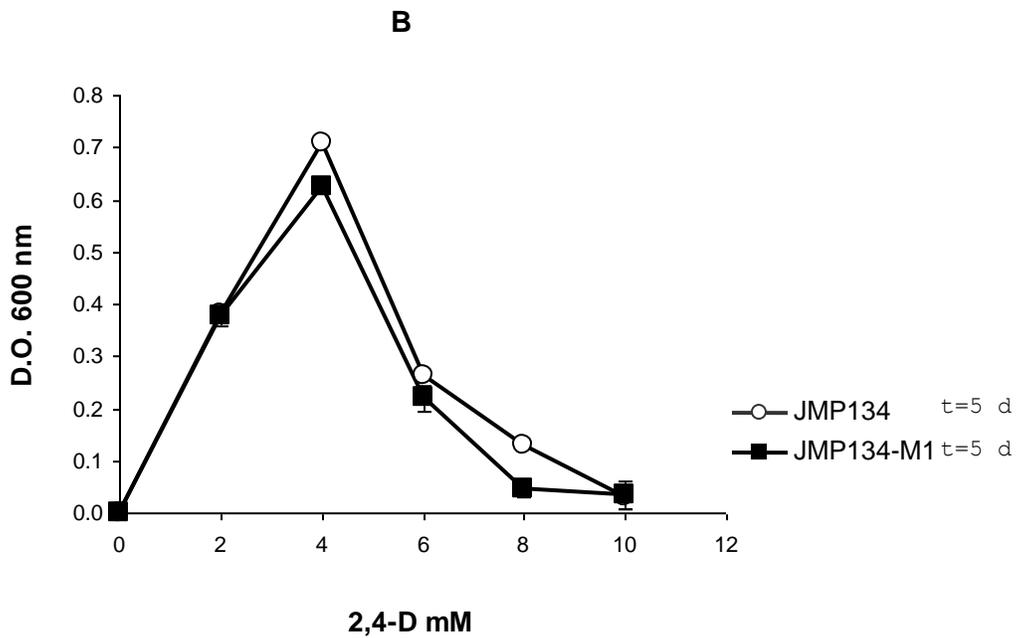
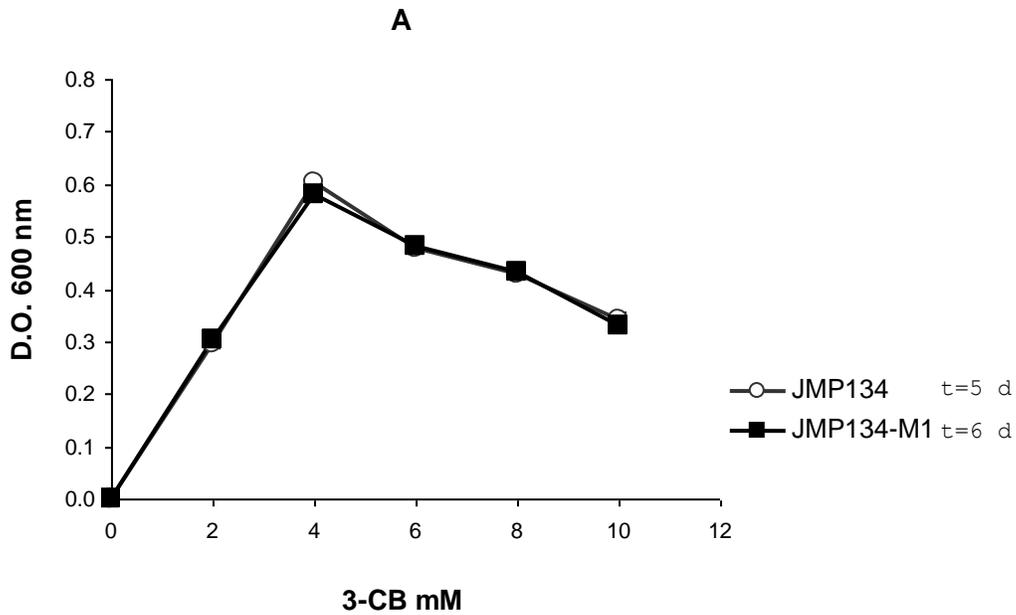
**Fig. 10. Efecto de la concentración de 2,4-D en la velocidad de crecimiento de las cepas que sobreexpresan los genes *catR*.** Se muestra el rango de velocidad de crecimiento expresado en h<sup>-1</sup>, calculados a partir de curvas de crecimiento en medio mínimo a 2, 4 y 6 mM de 2,4-D suplementado con Km. Los valores corresponden a dos determinaciones independientes.

valores de densidad óptica similares a los de la cepa silvestre (Figs. 11 y 12). Sin embargo, cuando se realizaron curvas de crecimiento en 4 mM de 3-CB, 2,4-D y BZ, se pudo determinar que la cepa JMP134-M1 presentó una menor velocidad de crecimiento respecto a la cepa silvestre, tanto en 3-CB como en BZ, pero no en 2,4-D. Como se observa a continuación (tabla 4), el rango de velocidad de crecimiento obtenido para la cepa JMP134-M1 fue de dos a tres veces menor en 3-CB y BZ, mientras que en 2,4-D no presentó variación.

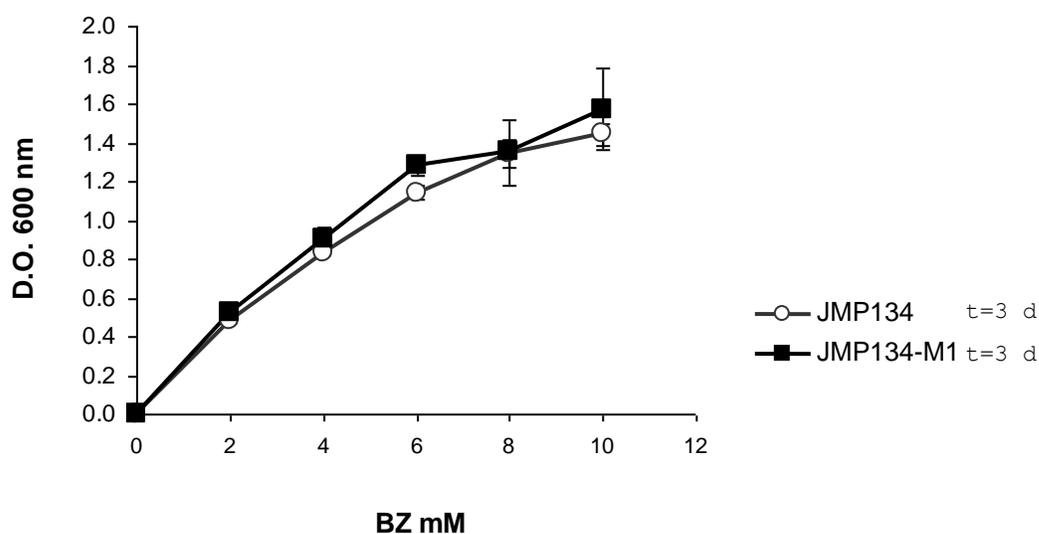
La disminución de la velocidad de crecimiento observada para la cepa JMP134-M1 en 3-CB y BZ, sugirió que los genes *ben* no estaban expresándose eficientemente en esta mutante, lo que disminuiría la capacidad para degradar estos sustratos y por ende la acumulación de sus intermediarios tóxicos. Para analizar esta posibilidad se cuantificó la degradación de BZ mediante HPLC usando un ensayo de células en reposo. En estos experimentos se evaluó el efecto de la preincubación con 3-CB, 2,4-D o BZ, usando como control fructosa. Como se observa en la figura 13, los ensayos de degradación determinaron que independiente del sustrato utilizado en la preinducción, la cepa JMP134-M1 degradó BZ a una velocidad menor que la cepa silvestre ( $\geq 3$  veces).

#### **4.4 Metabolización de compuestos cloroaromáticos en la cepa JMP134-M1 complementada con los genes *catR1* o *catR2*.**

Para establecer inequívocamente que la menor velocidad de crecimiento de la cepa mutante en el gen *catR1* en 3-CB y BZ se debía a la inactivación del gen *catR1*, se complementó la cepa JMP134-M1 con los genes *catR*. Para ello se introdujo en la cepa JMP134-M1 los plasmidio *pcatR1* o *pcatR2*, obteniéndose las cepas complementantes JMP134-M1 (*pcatR1*) y JMP134-M1 (*pcatR2*). Estas cepas fueron analizadas en términos de sus velocidades de crecimiento en medio mínimo suplementado con 3-CB o BZ, comparándolas con la cepa mutante JMP134-M1. Como control se incluyó la cepa JMP134.



**Fig. 11. Efecto de la concentración de 3-CB y 2,4-D en el crecimiento de *C. necator* JMP134-M1 y *C. necator* JMP134.** Se muestra la D.O.<sub>600</sub> de cultivos en fase estacionaria a concentraciones crecientes de 3-CB (A) y 2,4-D (B). Se señala el tiempo (t) necesario para alcanzar fase estacionaria a 10 mM de 3-CB o 2,4-D. Los valores corresponden al rango de dos experimentos independientes.

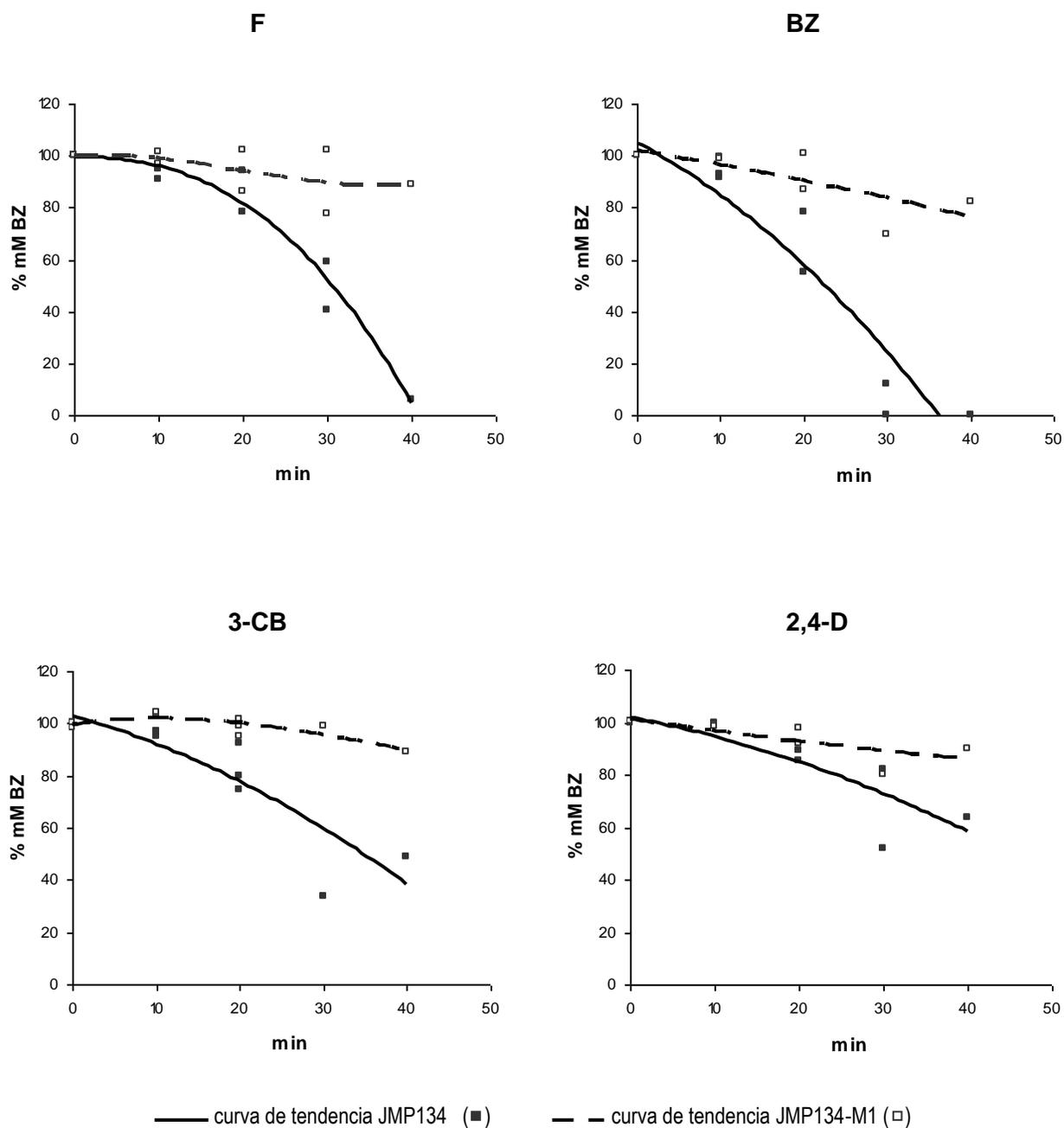


**Fig. 12. Efecto de la concentración de BZ en el crecimiento de *C. necator* JMP134-M1 y *C. necator* JMP134.** Se muestra la D.O.<sub>600</sub> de cultivos en fase estacionaria a concentraciones crecientes de BZ. Se señala el tiempo (t) necesario para alcanzar fase estacionaria a 10 mM de BZ. Los valores corresponden al rango de dos experimentos independientes.

**Tabla 4. Velocidad de crecimiento de *C. necator* JMP134 y *C. necator* JMP134-M1 en 3-CB, BZ y 2,4-D.**

<u>Cepas</u>	<u>3-CB</u>	<u>BZ</u>	<u>2,4-D</u>
JMP134	0,086 ±0,019 h <sup>-1</sup>	0,403 ±0,107 h <sup>-1</sup>	0,196 ±0,035 h <sup>-1</sup>
JMP134-M1	0,029 ±0,007 h <sup>-1</sup>	0,195 ±0,041 h <sup>-1</sup>	0,193 ±0,038 h <sup>-1</sup>

Se señala el rango de velocidad de crecimiento, calculados a partir de curvas de crecimiento de medio mínimo con 4 mM de 3-CB, BZ y 2,4-D. Los valores fueron obtenidos de dos determinaciones independientes para el caso de 2,4-D y tres determinaciones para el caso de 3-CB y BZ.

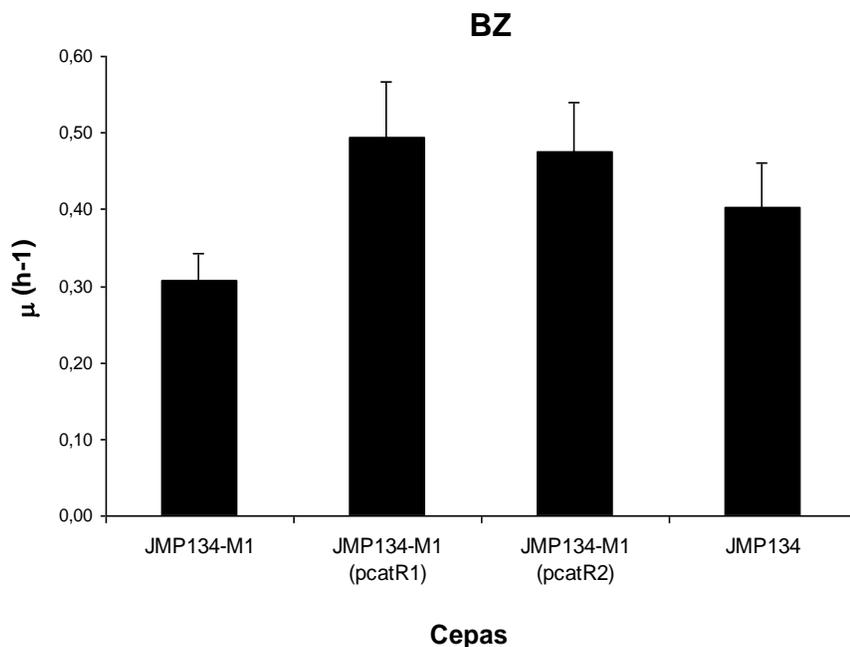


**Fig. 13. Degradación de BZ por células de *C. necator* JMP134-M1 y *C. necator* JMP134, en reposo metabólico.** Se muestra el porcentaje de BZ residual en incubaciones de células en reposo expuestas a 0,75 mM de BZ, medidos a través del tiempo. Los cultivos fueron crecidos en fructosa, luego fueron lavados, resuspendidos y preincubados con 1 mM fructosa (F) en el caso del control sin inducción, 1 mM benzoato (BZ), 1 mM 3-clorobenzoato (3-CB) y 1mM de 2,4-diclorofenoxyacetato (2,4-D). Las curvas de tendencia para cada cepa fueron obtenidas a partir de dos experimentos independientes, dónde datos de áreas fueron transformados a mmoles de BZ mediante una curva de calibración.

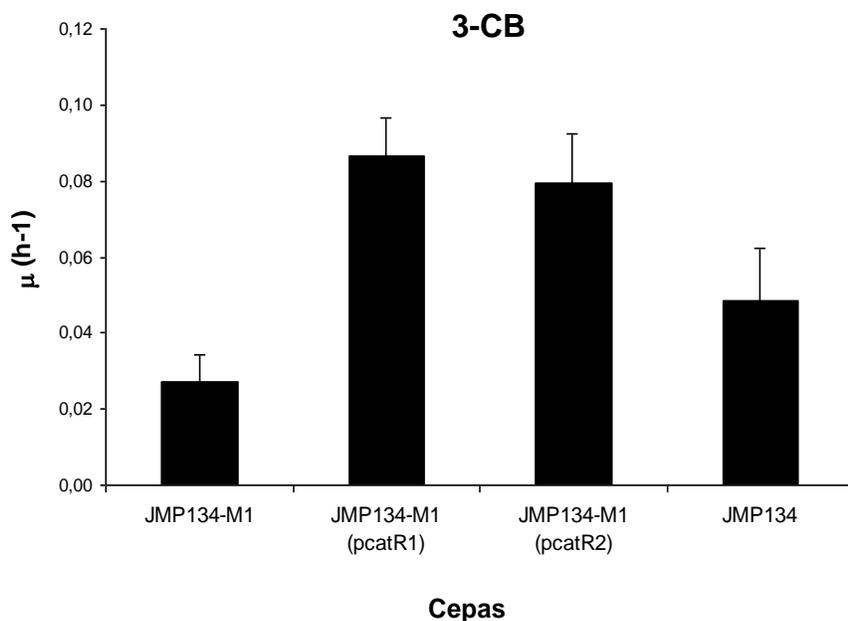
Como se muestra en la Fig. 14 las velocidades de crecimiento de las cepas JMP134-M1 (*pcatR1*) y JMP134-M1 (*pcatR2*) en BZ fueron mayores que la de la cepa mutante JMP134-M1 y similares a la velocidad de la cepa control. Al analizar la velocidad de crecimiento de las cepas en 3-CB (Fig. 15), se observó que las cepas JMP134-M1 (*pcatR1*) y JMP134-M1 (*pcatR2*) fueron claramente más eficientes que la cepa silvestre y, por supuesto, la cepa mutante JMP134-M1. Los ensayos de degradación de 3-CB en la cepa mutante y las dos cepas complementantes indicaron que las cepas JMP134-M1 (*pcatR1*) y JMP134-M1 (*pcatR2*), tuvieron mayor capacidad que la cepa mutante para degradar 3-CB, presentando un comportamiento semejante a la cepa control (Fig. 16). Las cepas JMP134-M1 (*pcatR1*) y JMP134-M1 (*pcatR2*) degradaron alrededor del 80% del 3-CB, un valor similar al observado en la cepa control JMP134, que degrada alrededor del 70% de 3-CB.

### **3.5 Estudio bioinformático de la estructura plegada de los reguladores CatR1 y CatR2.**

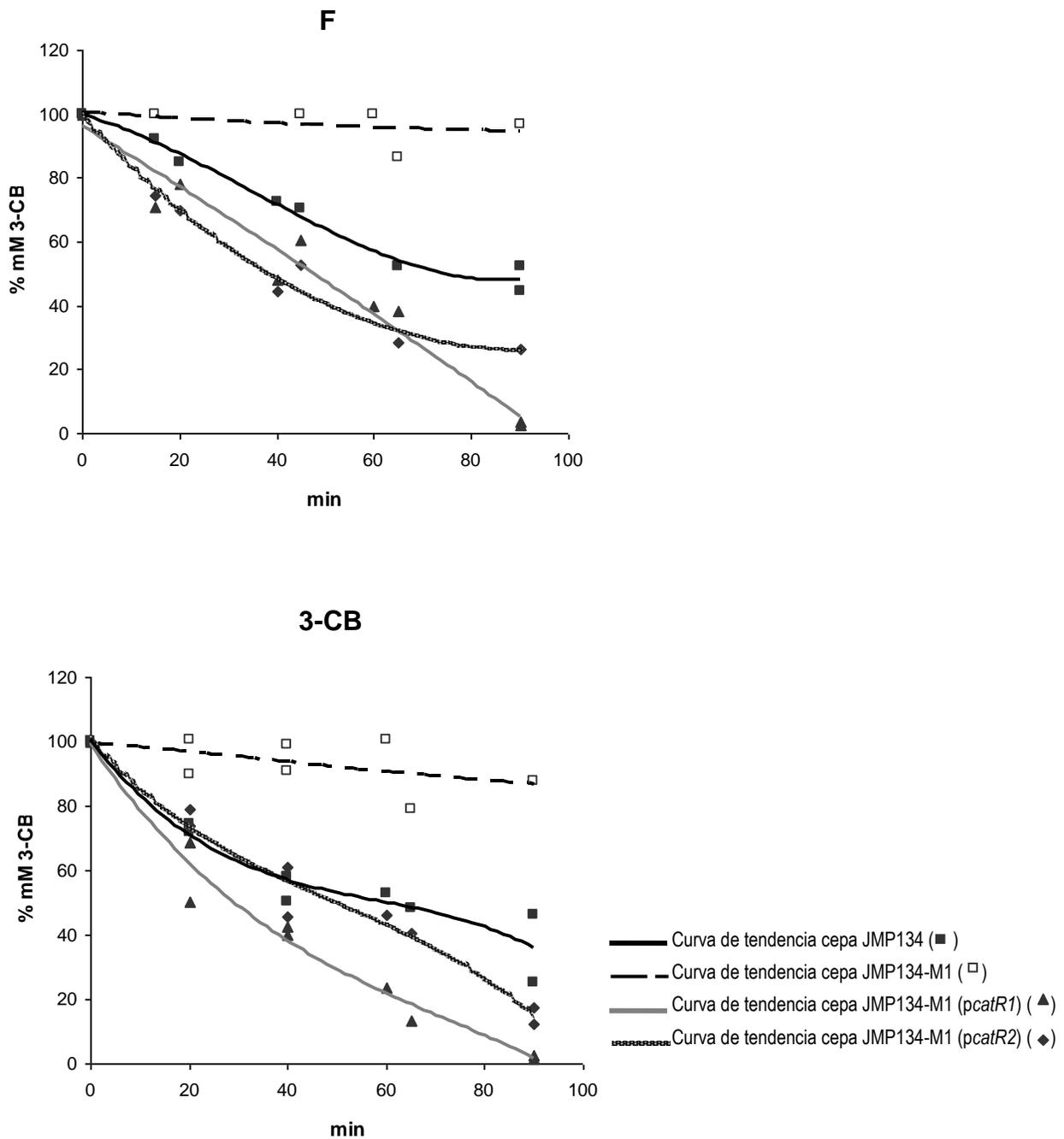
Para intentar explicar las diferencias observadas en el crecimiento en 2,4-D o 3-CB entre las distintas cepas de *C. necator* estudiadas en esta memoria, se quiso estudiar la estructura tridimensional de los reguladores CatR1 y CatR2. Para ello se realizó una predicción por homología estructural, utilizando herramientas bioinformáticas, de la estructura plegada de estos reguladores. Se observó que la estructura plegada de estos reguladores es semejante a la estructura del regulador CbnR (LTTR), cuya función es activar la expresión de los genes *cbnABCD*, homólogos funcionales de los genes *tfd* en *C. necator* NH9 [Muraoka y cols., 2003]. Además, se quiso analizar los dominios de regulación y unión a DNA de los reguladores CatR1 y CatR2. El dominio de regulación presentó homología con el dominio de regulación del regulador CysB(RD), cuya función es activar la biosíntesis de cisteína en *Klebsiella aerogenes* [Tyrrell y cols., 1997]. También se analizó el bolsillo de unión al inductor con este último regulador y con el regulador de la degradación de 2,4-dinitrotolueno (DntR), descrito en *Burkholderia sp.*



**Fig. 14. Velocidad de crecimiento de las cepas complementantes versus las cepas control en BZ.** Se muestra el promedio de dos determinaciones de velocidad de crecimiento, expresado en  $h^{-1}$ , calculadas a partir de curvas de crecimiento en medio mínimo a 2mM de benzoato (BZ).



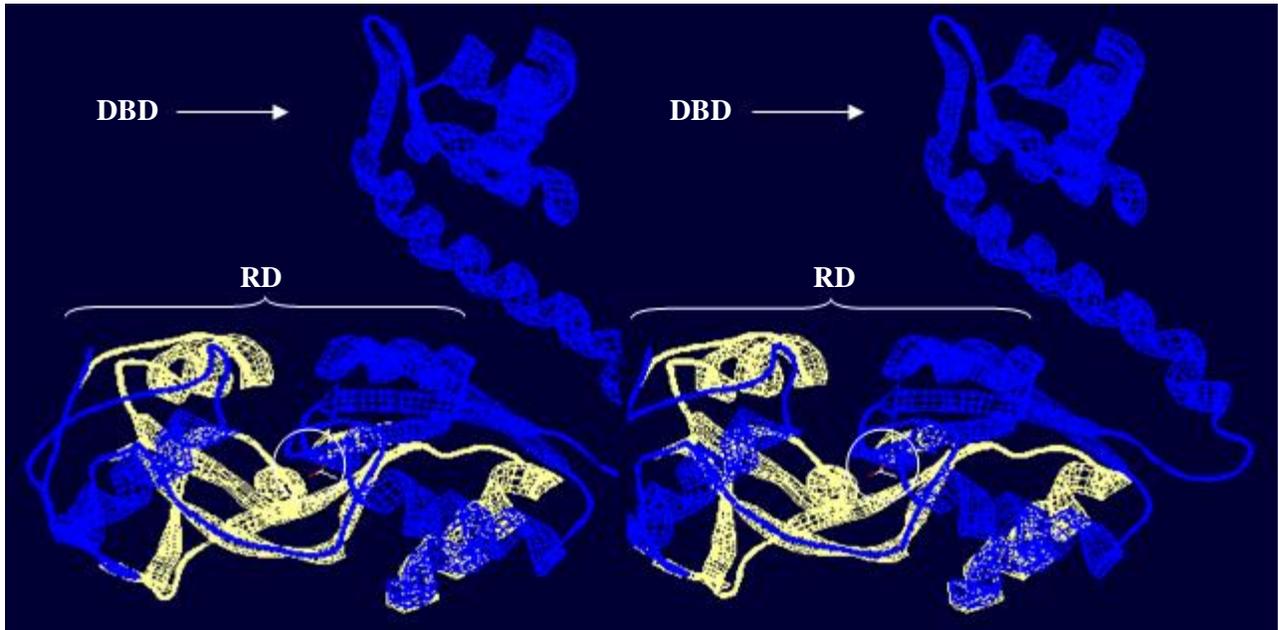
**Fig. 15. Velocidad de crecimiento de las cepas complementantes versus las cepas control en 3-CB.** Se muestra el promedio de dos determinaciones de velocidad de crecimiento, expresado en  $h^{-1}$ , calculadas a partir de curvas de crecimiento en medio mínimo a 2mM de 3-CB.



**Fig. 16. Degradación de 3-CB en las cepas complementantes versus las cepas control.** Se muestra el porcentaje de 3-CB residual en incubaciones de células en reposo luego de exponerlas a 0,75 mM de 3-CB. Se crecieron los cultivos en fructosa y luego se lavaron, resuspendieron y preincubaron con 3-CB o fructosa (F), como control. Las curvas de tendencia para cada cepa fueron obtenidas a partir de dos experimentos independientes, dónde datos de áreas fueron transformados a mmoles de BZ mediante una curva de calibración.

DNT [Smirnova y cols., 2004]. La estimación de la posición tanto del bolsillo como del inductor fue consistente con las cavidades calculadas por superficie molecular. A una distancia de 7 Å del inductor se identificaron 18 residuos pertenecientes al bolsillo de unión a inductor. Seis de ellos son conservados en CatR2/CatR1: Phe145/146, Arg147/148, Ile148/149, Glu163/164, Pro 245/247 y Pro 267/Pro269. Tres de ellos probablemente tienen la función de unir al inductor mediante puentes de hidrógeno a partir de sus cadenas laterales. Los reguladores CatR1 y CatR2, al igual que la mayoría de los LTTRs, presentaron la mayor parte de sus residuos conservados en el dominio de unión a DNA. Este dominio es un motivo HTH compuesto por tres estructuras  $\alpha$ -hélice y dos  $\beta$ -plegadas, cuya función es interactuar con la hendidura mayor de la hebra de DNA. Al analizar la predicción de la estructura plegada de este motivo, se observó que en este dominio existen leves diferencias entre los reguladores, relacionadas con la cantidad de residuos polares y su disposición.

En relación a la regulación de la vía de clorocatecoles, se quiso analizar la estructura plegada del regulador TfdT, un tercer regulador LTTR codificado en el plasmidio pJP4. La predicción de la estructura plegada de este regulador indica que, con respecto al regulador TfdR, los 64 aminoácidos faltantes en su extremo C-terminal, corresponden a parte del dominio de regulación (Fig. 17). En este dominio, TfdT carece de cinco residuos que están involucrados en la estabilización de los aminoácidos que unen al inductor (Pro 243, Ser 245, Pro 267, Val 268 y Ser 269). Esto sugiere que aunque TfdT se una al DNA, no reconocería al inductor, interfiriendo en el aumento de la afinidad del regulador por la RNA polimerasa y, por ende, la transcripción. Esto último refuerza la posibilidad que los reguladores CatR tengan una función importante durante el crecimiento de *C. necator* en 3-CB en ausencia de los reguladores TfdR/S.



**Fig. 17. Visión estéreo de la estructura plegada de los reguladores TfdT y TfdR superpuestos.**

La imagen tridimensional se observa cruzando los ejes ópticos de los ojos o bien mirando un lápiz situado entre los ojos y la imagen. Se muestra la estructura plegada superpuesta de los reguladores TfdT en color amarillo y TfdR en azul, según la predicción bioinformática. Se señala el dominio de unión a DNA (DBD) y el dominio de regulación (RD). La molécula encerrada en el círculo (al centro) indica la posición del inductor en el dominio de regulación (RD) de estos reguladores, donde el regulador TfdT con respecto a TfdR carece de las estructuras en color amarillo.

## DISCUSIÓN

En esta memoria se estudió el rol de los reguladores CatR1 y CatR2, que modulan la vía metabólica de degradación de catecoles, específicamente en el metabolismo de 3-CB y 2,4-D en *C. necator* JMP134 (pJP4). Observaciones recientes realizadas en nuestro laboratorio indican que la ausencia de los reguladores de la vía de degradación de clorocatecoles (TfdR/S) no afecta el crecimiento de *C. necator* JMP134 en 3-CB [Manzano M., datos no publicados]. Esto indica que otro (u otros) regulador(es) transcripcional(es) debe(n) estar activando la vía de degradación de 3-CB. Un excelente candidato a ejercer la activación es el regulador cromosomal CatR. Para estudiar el rol de los reguladores CatR1 y CatR2 en el metabolismo de 3-CB y, además, 2,4-D y BZ en *C. necator* JMP134 (pJP4), se evaluó de qué manera la sobreexpresión de los genes *catR1* y *catR2*, como también la inactivación del gen *catR1*, modificaban la capacidad de esta cepa para metabolizar los sustratos anteriormente mencionados. Para esto, primero se construyeron cepas de *C. necator* que sobreexpresan los genes *catR1* o *catR2* y además se obtuvo una cepa mutante del gen *catR1*, la que posteriormente fue complementada por separado con los genes *catR1* o *catR2*. Se analizó el crecimiento de estas cepas en 3-CB, 2,4-D y BZ por determinación de la densidad óptica en fase estacionaria a concentraciones crecientes de sustrato y además se realizaron curvas de crecimiento a partir de las cuales se calculó la velocidad de crecimiento ( $\mu$ ) de cada cepa. También se monitoreó la capacidad de estas cepas para degradar 3-CB y BZ mediante HPLC.

En relación a la participación de los reguladores CatR durante el crecimiento en 3-CB en *C. necator*, ésta puede involucrar dos puntos de regulación. El primero puede relacionarse con las etapas iniciales de degradación de este sustrato, modulando los genes *ben* y el segundo, con la modulación de la ruta *orto* modificada, codificada por los genes *tfd* en el plasmidio pJP4. Los resultados obtenidos en

esta memoria, especialmente mediante el estudio de la cepa JMP134-M1 apuntan a que la función del regulador CatR1 es modular los genes *ben* en el genoma de *C. necator*. Acorde a lo anterior, la cepa JMP134-M1 presentó una menor velocidad de crecimiento en 3-CB y BZ, además de una menor tasa de degradación de estos sustratos. El fenotipo observado en la cepa mutante fue revertido mediante la complementación de esta cepa con los genes *catR1* o *catR2*. Esto permitió descartar posibles efectos polares producidos por la interrupción del gen. Estos resultados indicaron que también el regulador CatR2 es funcional, siendo capaz de modular los genes *ben*, lo que es consistente con los resultados obtenidos en las cepas en las que se sobreexpresó los genes *catR1* y *catR2*, puesto que se observó un aumento en el rendimiento de los cultivos y la velocidad de crecimiento. El hecho que los dos reguladores CatR, que sólo comparten un 56% de identidad de nucleótidos y 46% de identidad de aminoácidos, sean capaces de potenciar la degradación de 3-CB y BZ en *C. necator*, sugiere que son capaces de activar las mismas secuencias blanco, lo que concuerda con lo descrito para otros LTTRs [Parsek y cols., 1994; Brzostowicz y cols., 2003].

En cuanto al segundo punto de regulación, los estudios obtenidos con la sobreexpresión de los genes *catR* durante el crecimiento en 2,4-D, apoyan que los reguladores CatR1 y CatR2 influyen de forma diferencial en la regulación de los genes *tfd*. Para el caso del regulador CatR1, esta influencia puede explicarse en que este regulador sea capaz de actuar como represor de la expresión de los módulos génicos *tfd*. Sin embargo, los resultados obtenidos anteriormente en 3-CB indican que este regulador también sería capaz de activar los genes *ben*, por lo que ambas funciones conllevarían a la acumulación de clorocatecoles en la degradación de 3-CB. La acumulación no fue observada cualitativamente mediante la presencia de una coloración café oscura en los cultivos y además los resultados obtenidos sugieren que el regulador CatR1 activa los genes *tfd* contribuyendo a una menor intoxicación de *C. necator* durante el crecimiento en 3-CB. Por estos motivos no es probable la

represión de los módulos *tfd* por parte del regulador CatR1. Otra explicación a la influencia del regulador CatR1 durante el crecimiento en 2,4-D, radica en que la transformación de 2,4-D a 3,5-diclorocatecol es responsabilidad de los genes *tfdA* y *tfdB*, por lo que también se podría suponer que CatR1 sea capaz de modular negativamente estos genes. Esta acción no sería ejercida por CatR2, puesto que un aumento de este regulador en *C. necator* provoca una menor sensibilidad de esta cepa a la intoxicación por clorocatecoles, intermediarios en la degradación de 2,4-D. Por lo anteriormente mencionado y debido a que los LTTRs son mayormente activadores, resulta más probable que las diferencias observadas entre CatR1 y CatR2 en el metabolismo de 2,4-D sean producto de que estos reguladores tengan distinta afinidad por las mismas secuencias blanco, siendo esta afinidad menor a la de los reguladores TfdR/S. Esto último explica que sólo el aumento del regulador CatR1 disminuyó la velocidad de crecimiento de *C. necator* en 2,4-D, lo cual probablemente sea reflejo de que este regulador compite con TfdR/S, disminuyendo la disponibilidad de que los reguladores más afines ejerzan su acción en las zonas de control de la transcripción.

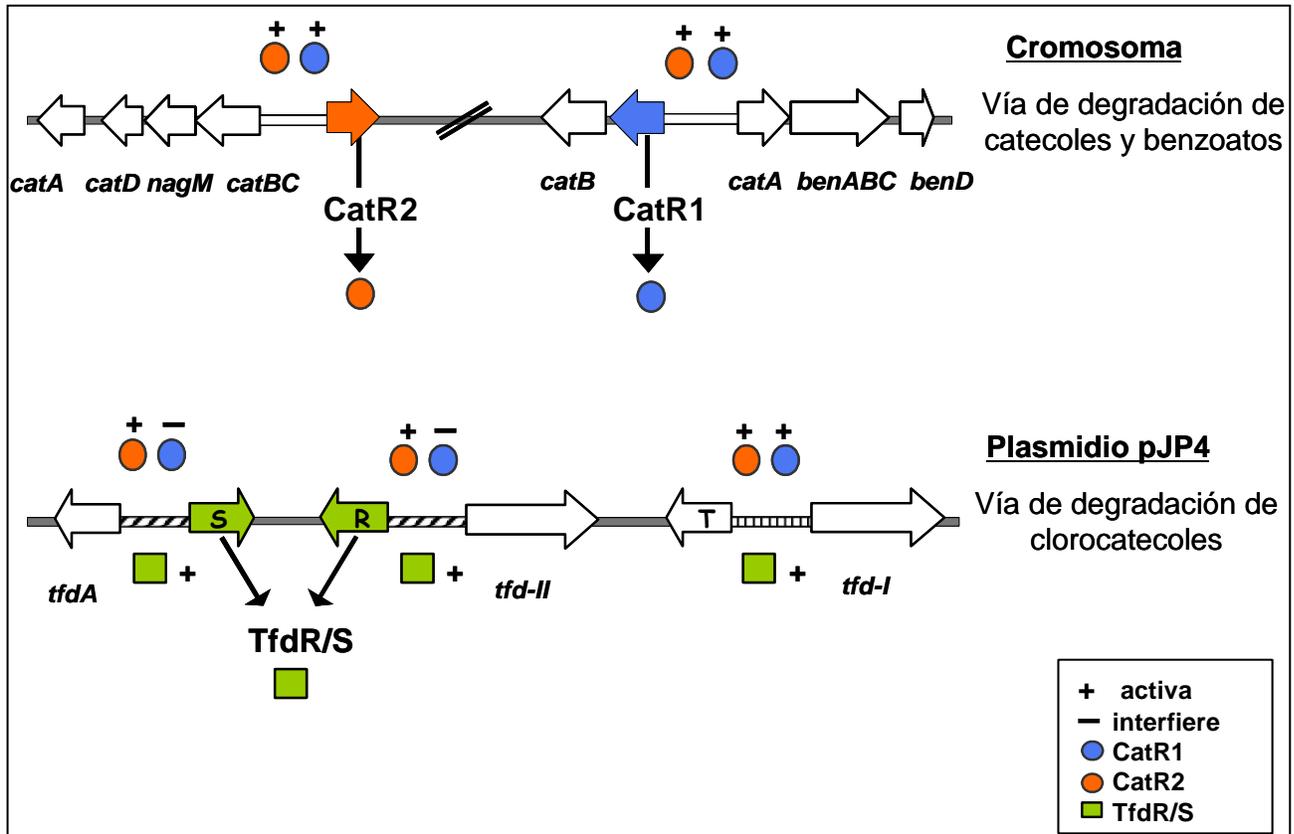
Antecedentes encontrados en la literatura apoyan la distinta afinidad de unión de reguladores por las mismas secuencias blanco. Esto ha sido descrito en otros LTTRs, como es el caso de los reguladores ClcR y CatR de *P. putida* por el promotor del operón *clcABD* y los reguladores BenM y CatM de *Acinetobacter sp.* ADP-1 por el promotor del gen *catA* [McFall y cols., 1998; Collier y cols., 1998; Takashima y cols., 2001]. Considerando que a pesar que las tres regiones intergénicas que abarcan los promotores de los genes *tfd* son similares, las regiones intergénicas del módulo I y del gen *tfdA* son más parecidas entre sí que con la región intergénica del módulo II, de modo que es posible suponer que los reguladores CatR1 y CatR2 tienen distinta afinidad por cada una de esas zonas intergénicas. De esta forma, la afinidad de CatR1 sería mayor para la zona intergénica del módulo I, puesto que participa mayormente en la degradación de 3-CB. Del mismo modo, CatR2 tendría mayor

afinidad para la zona intergénica del módulo II y *tfdA*, debido a que éstas tienen mayor importancia en la degradación de 2,4-D [Pérez-Pantoja y cols., 2000; Plumeier y cols., 2002].

Para establecer las diferencias entre los reguladores que expliquen en alguna medida su comportamiento diferencial, éstos fueron comparados *in silico* mediante herramientas bioinformáticas. Las leves diferencias en los residuos del dominio de unión a DNA podrían tener relación con los fenotipos observados, puesto que se sabe que el carácter de los residuos es importante en la capacidad para formar puentes de hidrógeno con los grupos fosfato de la hebra de DNA [Luscombe y cols., 2001]. Un segundo factor que explicaría las diferencias entre los reguladores es que estos tengan respuesta a más de un inductor. Esto se fundamenta en lo descrito para el regulador BenM (LTTR) de *Acinetobacter* sp. ADP-1, para el cual recientemente se ha propuesto un modelo en el que producto de la respuesta a más de un inductor, se pueden establecer distintos niveles transcripcionales [Bundy y cols., 2002; Clark y cols., 2004]. Si bien no se observó diferencias entre los reguladores CatR, respecto de TfdR, la presencia de residuos importantes para el reconocimiento del inductor en ambos reguladores indica que estos tendrían capacidades parecidas al regulador TfdR, lo que además sería consistente con la modulación ejercida por los reguladores CatR sobre los genes *tfd*. Adicionalmente, la relación del regulador TfdR con reguladores descritos como capaces de responder a cloromuconato, como es el caso del regulador TfdT de *Burkholderia* sp. NK8 y el regulador ClcR de *P. putida*, [Mc Fall y cols., 1997; Liu y cols., 2001] no descarta que los reguladores CatR respondan a este inductor además de responder al inductor normal (muconato). En este sentido se debe tener en cuenta que el cloromuconato es intermediario en la vía de degradación de clorocatecoles.

Finalmente, se plantea un modelo simplificado de la regulación ejercida por CatR1 y CatR2 en *C. necator* (Fig. 18). Para esto se consideró como base la función canónica de estos reguladores (regular los genes *cat*) y que la degradación de 3-CB involucra la participación de los genes *benABCD* y *tfd*. El

modelo propuesto sostiene que tanto CatR2 como CatR1 participarían en la modulación de los genes *cat*, *ben* y *tfd*, responsables de la degradación de catecoles, benzoatos y clorocatecoles. CatR1 y CatR2 activarían la expresión de los genes *cat* y *ben*, además modularían diferencialmente la vía de degradación de clorocatecoles codificados en los genes *tfd*. Esto último se explica en que estos reguladores compiten por las mismas secuencias blanco, pero presentan una distinta capacidad de unión por ellas, siendo menor a la capacidad de unión de los reguladores TfdR/S. De este modo, CatR2 activaría las regiones intergénicas de los módulos génicos *tfd* I-II y el gen *tfdA*. En tanto, CatR1 activaría sólo la región intergénica del módulo I, puesto que la influencia sobre el módulo II probablemente se debe a la interferencia que ejerce este regulador en la función de los reguladores TfdR/S durante el crecimiento en 2,4-D. A nivel estructural, las diferencias observadas entre ambos reguladores podrían deberse a los residuos que componen su dominio de unión a DNA.



**Fig. 18. Modelo de la regulación ejercida por los reguladores CatR1 y CatR2 en *C. necator* JMP134.**

Se muestra la regulación ejercida por los reguladores CatR en el genoma de *C. necator* (no a escala). El modelo postula que ambos reguladores CatR1 y CatR2 activan la expresión de los genes que pertenecen a la vía de degradación de catecoles y benzoatos. Sin embargo, CatR1 y CatR2 modularían en forma diferencial la vía de degradación de clorocateoles, debido a la diferente afinidad de unión de estos reguladores a las zonas intergénicas blanco de los reguladores TfdR/S, los cuales presentan mayor afinidad por ellas. CatR2 activaría los dos módulos génicos *tfd* I-II y además el gen *tfdA*. En cambio, CatR1 activaría sólo el módulo I.

## CONCLUSIONES

- El genoma de *C. necator* codifica para dos reguladores *catR* que están ubicados en distintos contextos genómicos y que son funcionales.
- El regulador CatR1 afecta positivamente la capacidad para degradar 3-CB y está también involucrado en la degradación de BZ. En cambio el regulador CatR2 afecta positivamente la degradación de 3-CB, BZ y 2,4-D.
- El regulador CatR1 contribuiría a una menor intoxicación durante el crecimiento en 3-CB, mientras que el regulador CatR2 tendría el mismo efecto durante el crecimiento en 2,4-D, sugiriendo que ambos reguladores son capaces de activar a los genes *tfd*, responsables de la degradación de clorocatecoles en *C. necator*.
- Las diferencias observadas entre ambos reguladores podrían deberse a una afinidad de unión diferencial por las mismas secuencias blanco.

## BIBLIOGRAFÍA

**Adriaens P.**, Kohler H., Kohler-Staub D. y D. Focht (1989). Bacterial dehalogenation of chlorobenzoates and coculture biodegradation of 4, 4'-dichlorobiphenyl. *Appl. Environ. Microbiol.* 55: 887-892.

**Alexeyev M.**, Shokolenko I. y T. Croughan (1995). Improved antibiotic resistance gene cassettes and omega elements for *Escherichia coli* vector construction and *in vitro* deletion/insertion mutagenesis. *Gene* 160: 63-67.

**Amann R.**, Ludwig W. y K. Schleifer (1995). Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol. Rev* 59: 143-169.

**Beuken E.**, Vink C. y C. A. Bruggeman (1998). One-step procedure for screening recombinant plasmids by size. *BioTechniques* 24: 7487-7450.

**Bradberry S.**, Proudfoot A. y J. Vale (2004). Poisoning due to chlorophenoxy herbicides. *Toxicol. Rev.* 23: 65-73.

**Brzostowicz P.**, Reams A., Clark T. y E. Neidle (2003). Transcriptional cross-regulation of the catechol and protocatechuate branches of the  $\beta$ -ketoacid branches contributes to carbon source-dependent expression of the *Acinetobacter* sp. strain ADP-1 *pobA* gene. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 1598-1606.

**Bullock W.**, Fernández J. y J. Short (1987). XL1-Blue: A high efficiency plasmid transforming *recA* *Escherichia coli* strain with beta-galactosidase selection. *BioTechniques* 5: 376-379.

**Bundy B.**, Collier L., Hoover T. y E. Neidle (2002). Synergistic transcriptional activation by one regulatory protein in response to two metabolites. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 99: 7693-7698.

**Clark T.**, Phillips R., Bundy B., Momamy C. y E. Neidle (2004). Benzoate decreases the binding of *cis,cis* muconate to the BenM regulator despite the synergistic effect of both compounds on transcriptional activation. *J. Bacteriol.* 186: 1200-1204.

**Collier L.**, Gaines G. y E. Neidle (1998). Regulation of benzoate degradation in *Acinetobacter* sp. strain ADP-1 by BenM, a LysR-type transcriptional activator. *J. Bacteriol.* 180: 2493-2501.

**Cowles C.**, Nichols N. y C. Harwood (2000). BenR, a XylS Homologue, regulates three different pathways of aromatic acid degradation in *Pseudomonas putida*. *J. Bacteriol.* 182: 6339–6346.

**de Lorenzo V.**, Herrero M., Jakubzic U. y K. 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 Lorenzo V.** y J. Pérez (1996). Regulatory noise in prokaryotic promoters: how bacteria learn to respond to novel environmental signals. *Mol. Microbiol.* 19: 1177-1184.

**Don R.** y J. Pemberton (1985). Genetic and physical map of the 2,4-dichlorophenoxyacetic acid-degradative plasmid pJP4. *J. Bacteriol.* 161: 466-468.

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

**Kahng H.**, Maliverni J., Majko M. y J. Kukor (2001). Genetic and functional analysis of the *tbc* operons for catabolism of alkyl- and chloroaromatic compounds in *Burkholderia* sp. strain JS150. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 4805-4816.

**Kaschabek S.**, Kuhn B., Müller D., Schmidt E. y W. Reineke (2002). Degradation of aromatics and chloroaromatics by *Pseudomonas* sp. strain B13: Purification and characterization of 3-oxoadipate:succinyl-coenzyme A (CoA) transferase and 3-oxoadipyl-CoA thiolase. *J. Bacteriol.* 184: 207–215.

**Kasak I.**, Horak R., Nurk A., Talvik K. y M. Kivisaar (1993). Regulation of the catechol 1,2-dioxygenase and phenol monooxygenase-encoding *pheBA* operon in *Pseudomonas putida* PaW85. *J. Bacteriol.* 175: 8038-8042.

**Kovach M.**, Elzer P., Hill S., Robertson G., Farris M., Roop R. y K. Peterson (1995). Four new derivatives of the broad-host-range cloning vector pBBR1MCS, carrying different antibiotic-resistance cassettes. *Gene* 166: 175-176.

**Lefrancois J.**, Samrakandi M. y A. Sicard (1998). Electrotransformation and natural transformation of *Streptococcus pneumoniae*: requirement of DNA processing for recombination. *Microbiol.* 144: 3061–3068.

**Leveau J.** y J. van der Meer (1996). The *tfdR* gene product can successfully take over the role of the insertion element-inactivated TfdT protein as a transcriptional activator of the *tfdCDEF* gene cluster, which encodes chlorocatechol degradation in *Ralstonia eutropha* JMP134 (pJP4). *J. Bacteriol.* 178: 6823-6832.

**Leveau J.**, Konig F., Fuchslin H., Werlen C. y J. van der Meer (1999). Dynamics of multigene expression during catabolic adaptation of *Ralstonia eutropha* JMP134 (pJP4) to the herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetate. *Mol. Microbiol.* 33: 396-406.

**Liu S.**, Ogawa N. y K. Miyashita (2001). The chlorocatechol degradative genes, *tfdT-CDEF*, of *Burkholderia* sp. strain NK8 are involved in chlorobenzoate degradation and induced by chlorobenzoates and chlorocatechols. *Gene* 268: 207-214.

**Luscombe N.**, Laskowski R. y J. Thornton (2001). Amino acid-base interactions: a three-dimensional analysis of protein-DNA interactions at an atomic level. *Nucl. Acid. Res.* .29: 2860-2874.

**Matrubutham U.** y A. Harper (1994). Analysis of duplicated gene sequences associated with *tfdR* and *tfdS* in *Alcaligenes eutrophus* JMP134. *J. Bacteriol.* 176: 2348-2353.

**McFall S.**, Parsek M. y M. Chakrabarty (1997). 2-Chloromuconate and ClcR-mediated activation of the *clcABD* operon. *In vitro* transcriptional and Dnase I footprint analyses. *J. Bacteriol.* 179: 3655-3663.

**McFall S.**, Chugani S. y A. Chakrabarty (1998). Transcriptional activation de catechol and chlorocatechol operons: variations on a theme. *Gene* 223: 257-267.

**Muraoka S.**, Okumura R., N. Ogawa, T. Nonaka, K. Miyashita y T. Senda. (2003). Chrystal structure of a full-length LysR-type transcriptional regulator, CbnR: unusual combination of two subunit forms and molecular bases for causing and changing DNA bend. *J. Mol. Biol.* 328: 555–566.

**Parsek M.**, Mc Fall S., Shinabarger D. y A. Chakrabarty (1994). Interaction of two LysR-type regulatory proteins CatR and ClcR with heterologous promoters: functional and evolutionary implications. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 20: 12393-12397.

**Pérez-Pantoja D.**, Guzmán L., Manzano M., Pieper H. y B. González (2000). Role of *tfdC<sub>I</sub>D<sub>I</sub>E<sub>I</sub>F<sub>I</sub>* and *tfdD<sub>II</sub>C<sub>II</sub>E<sub>II</sub>F<sub>II</sub>* gene modules in catabolism of 3-chlorobenzoate by *Ralstonia eutropha* JMP134(pJP4). *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 1602-1608.

**Plumeier I.**, Pérez-Pantoja D., Heim S., González B. y H. Pieper (2002). Importance of different *tfd* genes for degradation of chloroaromatics by *Ralstonia eutropha* JMP134. *J. Bacteriol.* 184: 4054-4064.

**Reineke W.** (1998). Development of hybrid strains for the mineralization of chloroaromatics by patchwork assembly. *Ann. Rev. Microbiol.* 52: 287-331.

**Rothmel R.**, Aldrich T., Houghton J., Coco W., Ornston L. y M. Chakrabarty (1990). Nucleotide sequencing and characterization of *Pseudomonas putida* CatR: a positive regulator of the *catBC* operon is a member of the LysR family. *J. Bacteriol.* 172: 922-931.

**Schell M.** (1993). Molecular biology of the LysR family of transcriptional regulators. *Annu. Rev. Microbiol.* 47: 597-626.

**Smirnova I.**, Dian C., Leonard G., McSweeney S., Birse D. y P. Brzezinski (2004). Development of bacterial biosensor for nitrotoluenes: The crystal structure of the transcriptional regulator DntR. *J. Biol. Mol.* 340: 405-418.

**Takashima A.**, Murakami S., Takenaka S. y K. Aoki (2001). Regulation by two CatR proteins that differ in binding affinity to *catB* promoters expressing two *cat* gene clusters. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 65: 2146-2153.

**Timmis K.** y D. Pieper (1999). Bacteria designed for bioremediation. *Trends Biotechnol.* 17: 200-204.

**Tropel D.** y J. van der Meer (2004). Bacterial transcriptional regulators for degradation pathways of aromatic compounds. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 68: 474-500.

**Tyrrell R.**, Verschueren K., Dodson E., Murshudov G., Addy C. y A. Wilkinson (1997). The structure of the cofactor-binding fragment of the LysR family member, CysB: a familiar fold with a surprising subunit arrangement. *Structure* 5: 1017-1032.

**van der Meer J.**, Frijters A., Leveau J., Eggen R., Zehnder A. y W. de Vos (1991). Characterization of the *Pseudomonas* sp. strain p51 gene *tcbR*, a LysR-type transcriptional activator of the *tcbCDEF* chlorocatechol oxidative operon, and analysis of the regulatory region. *J. Bacteriol.* 173, 3700-3708.

**van der Meer J. R.** (1994). Genetic adaptation of bacteria to chlorinated aromatic compounds. *FEMS Microbiol. Rev.* 15: 239-249.

**Zhou N.**, Fuenmayor S. y P. Williams (2000). *nag* genes of *Ralstonia* (formerly *Pseudomonas*) sp. strain U2 encoding enzymes for gentisate catabolism. *J. Bacteriol.* 183: 700-708.