

UCh - Fc
Biotecnología
M385
C.I

**FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE**

**RESPUESTA DE *Burkholderia* sp. LB400 FRENTE A
CLOROBENZOATOS**

Memoria de Título
Entregada a la
Universidad de Chile
en cumplimiento parcial de los requisitos
para optar al Título de
Ingeniero en Biotecnología Molecular

Por
Paula María Martínez Lavanchy

Abril, 2004
Santiago-Chile

Director de Tesis: Dr. Michael Seeger P.
Patrocinante de Tesis: Dr. Carlos Jerez G.





“RESPUESTA DE *Burkholderia* sp. LB400 FRENTE A CLOROBENZOATOS ”

Memoria de Título entregada a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Ingeniero en Biotecnología Molecular.

PAULA MARTÍNEZ LAVANCHY

Director de Memoria de Título
Dr. Michael Seeger Pfeiffer

Profesor Patrocinante de Memoria de Título
Dr. Carlos Jerez Guevara

Comisión de Evaluación de la Memoria de Título

Dr. Nicolás Guiliani
Presidente Comisión

Dr. Héctor Toledo Araya
Corrector



Santiago de Chile, Abril 2004



A mis padres con mucho amor

Agradecimientos

Quiero agradecer primeramente a Michael Seeger por darme la oportunidad de realizar mi tesis en su laboratorio, por todo su apoyo y amistad durante todo este proceso. Agradezco también al Dr. Carlos Jerez por la oportunidad dada al patrocinar esta tesis.

Agradezco en especial a mis padres Marta Lavanchy y Haroldo Martínez por todos los sacrificios que les ha significado este proceso, sin su apoyo incondicional este proyecto no podría haberse terminado. A mi madre, por todos sus desvelos, amor y apoyo.

Asimismo, agradezco el cariño y alegrías compartido con mis hermanas Antonia y Ximena. A Simón por su gran compañía.

No puedo dejar de agradecer a mi abuelita Leo, a mi tío Gregorio Lavanchy, a la familia Hernández Palominos y la familia Mackenzie Felsenhardt por todo su amor y preocupación.

Quiero agradecer a los amigos de siempre, los incondicionales que estuvieron presentes a pesar de la distancia: Natalia Mackenzie, Emilio Erazo, Leonardo Hernández, Susana González, Mónica Cistemas, Víctor Martínez, Sofía Gac, Esteban Nova, Mario Vera, entre muchos otros.

Deseo agradecer a todos mis compañeros de trabajo y los nuevos amigos porteños que compartieron conmigo esta travesía. En especial quiero agradecer a Beatriz Cámara, por todo su cariño y preocupación, a Cristina Herrera, Matías Saavedra, Loreine Agulló, Marcela Hernández y Marta González por compartir alegrías y fracasos, por su cariño y apoyo.

INDICE DE MATERIAS

INDICE DE FIGURAS	viii
INDICE DE TABLAS	x
LISTA DE ABREVIATURAS	xi
RESUMEN	xii
ABSTRACT	xiv
1. INTRODUCCION	1
1.1. POLICLOROBIFENILOS	1
1.2. DEGRADACION BACTERIANA	2
1.2.1. Degradación de PCBs.....	2
1.2.2. Degradación de clorobenzoatos.....	3
1.2.3. Catecol-1,2-dioxigenasa.....	4
1.3. <i>Burkholderia</i> sp.LB400.....	6
1.4. RESPUESTA A ESTRÉS EN BACTERIAS Y ANÁLISIS PROTEÓMICO	8
1.4.1. Proteómica.....	9
1.4.2. Proteómica de expresión.....	9
1.4.3. Separación y aislamiento de proteínas.....	12
1.4.4. Adquisición de información estructural de las proteínas.....	12
1.4.5. Utilización de bases de datos.....	14
1.5. HIPOTESIS DE TRABAJO	15
1.6. OBJETIVOS DE LA TESIS	15
2. MATERIALES Y METODOS	16
2.1. REACTIVOS	16
2.2. CEPAS BACTERIANAS	16
2.3. PLASMIDIOS	17
2.4. MEDIOS DE CULTIVOS	17
2.5. METODOS DE CULTIVO	18
2.6. CUANTIFICACION DE 2-CBA Y 4-CBA	18
2.6.1. Condiciones del HPLC.....	19
2.6.2. Cinética de exposición a CBAs.....	19

2.7.	CURVAS DE CRECIMIENTO Y ESTUDIOS DE VIABILIDAD.....	20
2.8.	ELECTROFORESIS BIDIMENSIONAL EN GELES DE POLIACRILAMIDA (NEPHGE).....	21
2.8.1.	Soluciones.....	21
2.8.2.	Preparación de muestras.....	22
2.8.3.	Primera dimensión.....	23
2.8.4.	Segunda dimensión.....	23
2.9.	DETERMINACION DE LOS NIVELES DE INDUCCION/ REPRESION DE PROTEINAS.....	24
2.10.	OBTENCION DE SECUENCIAS PEPTIDICAS.....	24
2.11.	IDENTIFICACION DE PROTEINAS.....	25
2.12.	CLONAMIENTO DEL GEN <i>catA</i> QUE CODIFICA A LA ENZIMA CATECOL-1,2-DIOXIGENASA.....	25
2.12.1.	Extracción de ADN genómico de la cepa LB400.....	25
2.12.2.	Extracción de ADN plasmidial.....	26
2.12.3.	Diseño de partidores.....	26
2.12.4.	Amplificación del gen <i>catA</i> mediante PCR.....	27
2.12.5.	Ligación del gen <i>catA</i> con el vector de clonamiento TOPO TA.....	27
2.12.6.	Transformación de células.....	28
2.12.7.	Análisis de clones recombinantes mediante PCR en colonia.....	29
2.12.8.	Digestiones con las enzimas de restricción <i>NdeI</i> y <i>SalI</i>	29
2.12.9.	Purificación del gen <i>catA</i> digerido con <i>NdeI</i> y <i>SalI</i>	30
2.12.10.	Ligación del gen <i>catA</i> en el plasmidio de expresión pT7-7.....	30
2.13.	ANALISIS DE LA EXPRESION DEL GEN <i>catA</i>	30
2.13.1.	Obtención de la muestra.....	30
2.13.2.	Geles de poliacrilamida-SDS.....	31
2.14.	MEDICION DE LA ACTIVIDAD DE LA ENZIMA CATECOL-1,2- DIOXIGENASA.....	31
2.14.1.	Extracción de muestra.....	31
2.14.2.	Medición de actividad.....	31

3. RESULTADOS	33
3.1. CAPACIDADES DEGRADATIVAS DE CBAs DE LA CEPA LB400.....	33
3.2. EFECTO DE LOS CBAs SOBRE EL CRECIMIENTO DE LA CEPA LB400.....	35
3.3. RESPUESTA MOLECULAR GLOBAL DE <i>Burkholderia</i> sp. LB400 FRENTE A CBAs.....	38
3.3.1. Respuesta del proteoma de la cepa bacteriana LB400 frente a 4-CBA y 2-CBA.....	39
3.3.1.1. Identificación de proteínas inducidas frente a 4-CBA.....	42
3.3.1.2. Identificación de proteínas inducidas/ reprimidas en presencia de 2-CBA.....	44
3.4. CLONAMIENTO DE LA ENZIMA CATECOL-1,2-DIOXIGENASA DE LB400.....	48
3.4.1. Análisis bioinformático.....	49
3.4.2. Amplificación del gen <i>catA</i> de <i>Burkholderia</i> sp. LB400 mediante PCR.....	52
3.4.3. Clonamiento del gen <i>catA</i> en vectores.....	53
3.5. EXPRESION HETEROLOGA DE LA ENZIMA CATECOL-1,2- DIOXIGENASA.....	55
3.5. ACTIVIDAD DE LA ENZIMA CATECOL-1,2-DIOXIGENASA.....	56
4. DISCUSION	59
4.1. CAPACIDADES DEGRADATIVAS DE CBAs DE <i>Burkholderia</i> sp. LB400.....	59
4.2. EFECTOS DE LOS CBAs SOBRE EL CRECIMIENTO DE LA CEPA LB400.....	60
4.3. RESPUESTA MOLECULAR GLOBAL DE LA CEPA LB400 FRENTE A CBAs.....	62
4.4. CLONAMIENTO DE LA ENZIMA CATECOL-1,2-DIOXIGENASA DE LA CEPA LB400.....	68

5. CONCLUSIONES	72
BIBLIOGRAFIA	74

INDICE DE FIGURAS

	página
Fig 1. Estructura química de los policlorobifenilos.....	1
Fig 2. Reacción catalizada por la enzima catecol-1,2-dioxigenasa.....	5
Fig 3. Organización del locus <i>bph</i> en <i>Burkholderia</i> sp. LB400.....	6
Fig. 4. Vías catabólicas superior e inferior de bifenilo codificadas por el locus <i>bph</i> de <i>Burkholderia</i> sp. LB400.....	7
Fig. 5. Tipos de proteómica y sus aplicaciones en biología.....	10
Fig. 6. Estrategia para la identificación de proteínas en un experimento de proteómica de expresión.....	11
Fig. 7. Espectros UV y estructura química de 2-CBA y 4-CBA.....	19
Fig. 8. Estudio de degradación de 2-CBA o 4-CBA por la bacteria <i>Burkholderia</i> sp. LB400.....	34
Fig. 9. Efecto de 2-CBA o 4-CBA sobre el crecimiento de <i>Burkholderia</i> sp. LB400.....	36
Fig. 10. Efecto de 2-CBA y 4-CBA sobre la viabilidad de las células de <i>Burkholderia</i> sp. LB400.....	37
Fig. 11. Efecto de 4-CBA y 2-CBA en el patrón de expresión de proteínas de <i>Burkholderia</i> sp. LB400.....	40
Fig. 12. Análisis de la proteína número 2 mediante ESI-Q-TOF MS/MS.....	45
Fig. 13. Estudio de la proteína número 9 mediante ESI-Q-TOF MS/MS.....	46
Fig. 14. Dendrograma resultante del alineamiento de la secuencia peptídica de la enzima catecol-1,2-dioxigenasa de la cepa LB400.....	50
Fig. 15. Organización de los genes <i>cat</i> en el genoma de la cepa LB400.....	51
Fig. 16. Amplificación mediante PCR del gen <i>catA</i> de <i>Burkholderia</i> sp. LB400.....	52

Fig. 17. Análisis de clones mediante PCR en colonia de la cepa <i>E.coli</i> DH5 α que contiene el gen <i>catA</i> de la cepa LB400 inserto en el vector TOPO TA.....	53
Fig. 18. Estudio del gen <i>catA</i> extraído desde el vector TOPO TA con las enzimas <i>NdeI</i> y <i>SalI</i>	54
Fig. 19. Análisis mediante PCR en colonia de la presencia del gen <i>catA</i> de la cepa LB400 en clones de <i>E. coli</i>	55
Fig. 20. Análisis de la expresión heteróloga de la catecol-1,2-dioxigenasa.....	56
Fig. 21. Análisis de la solubilidad de la enzima catecol-1,2-dioxigenasa de LB400 expresada en <i>E. coli</i>	58
Fig. 22. Alineamiento de secuencias peptídicas de la enzima CDO, para determinar la presencia de aminoácidos esenciales para la unión de catecol a la enzima.....	71

INDICE DE TABLAS

	página
Tabla 1. Sitios disponibles en internet para análisis bioinformático de proteínas.....	14
Tabla 2. Plasmidios utilizados.....	17
Tabla 3. Inducción relativa de las proteínas seleccionadas a partir de geles 2-D con exposición a 4-CBA 2 mM.....	41
Tabla 4. Identificación de proteínas inducidas en presencia de 4-CBA.....	43
Tabla 5. Identificación de proteínas inducidas/ reprimidas en presencia de 2-CBA mediante secuenciación del N-terminal.....	47
Tabla 6. Medición de la actividad de la enzima catecol-1,2-dioxigenasa de LB400 en <i>E. coli</i>	57

Lista de abreviaturas

PCB:	policlorobifenilo
CB:	clorobifenilo
BDO:	bifenilo-2,3-dioxigenasa
ORF:	marco de lectura abierta
CBA:	clorobenzoato
2-D:	dos dimensiones/bidimensional
HPLC:	cromatografía líquida de alta presión
ESI:	ionización por electrospray
Q:	cuadripolo
TOF:	tiempo de vuelo
NEPHGE:	geles de gradiente de pH al no-equilibrio
DE:	desviación estándar
DOE:	departamento de energía norteamericano
EBI:	instituto europeo de bioinformática
D.O.:	densidad óptica
SDS:	sulfato disódico de dodecilo
UFC:	unidades formadoras de colonias
CDO:	catecol-1,2-dioxigenasa
PCR:	reacción en cadena de la polimerasa
IPTG:	Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido
2-CP:	2-clorofenol
BA:	benzoato
DNP:	2,4-dinitrofenol
ATP:	adenosil tri-fosfato
EF-G:	factor de elongación G
IF2:	factor de iniciación 2
t_r :	tiempo de retención
U:	unidad de enzima

Respuesta de la bacteria *Burkholderia* sp. LB400 frente a clorobenzoatos

RESUMEN

Diversos microorganismos son capaces de degradar policlorobifenilos (PCBs), que son contaminantes recalcitrantes y tóxicos ampliamente distribuidos en el ambiente. *Burkholderia* sp. LB400 es una bacteria gram-negativa capaz de degradar un amplio rango de PCBs. Este microorganismo posee la vía superior de bifenilo, codificada por los genes *bph*, que metaboliza PCBs hasta clorobenzoatos y ácidos 2-hidroxipenta-2,4-dienoicos. Este último compuesto es degradado hasta acetil-CoA por enzimas codificadas por genes *bph* de la vía inferior. Se postula que la exposición de la bacteria *Burkholderia* sp. LB400 frente a CBAs, produce una respuesta de tipo estrés, generando cambios en su proteoma. Mediante la técnica de HPLC se determinó que *Burkholderia* sp. LB400 no posee la capacidad de metabolizar 2-CBA o 4-CBA. Tanto 2-CBA como 4-CBA disminuyen la tasa de crecimiento de la bacteria LB400. Sin embargo, 4-CBA posee un mayor efecto negativo sobre el crecimiento de la bacteria que 2-CBA. Este efecto es proporcional a la concentración de 4-CBA. Después de 24 horas de exposición el 4-CBA produce una disminución de las células viables en dos órdenes de magnitud, mientras que 2-CBA no produce ningún efecto sobre la viabilidad celular. Mediante electroforesis 2-D (NEPHGE-SDS) se analizó el patrón global de proteínas de la cepa LB400 expuesta a 2-CBA o 4-CBA. Las proteínas de interés fueron secuenciadas mediante degradación de Edman. Las proteínas que presentaron su amino terminal bloqueado fueron analizadas mediante espectrometría de masa de alta resolución ESI-Q-TOF. Las secuencias aminoacídicas obtenidas permitieron su identificación mediante herramientas bioinformáticas. Frente a la exposición a 4-CBA

se observaron mayores cambios en los niveles de proteínas en comparación con los observados para el caso de 2-CBA. Al menos 12 proteínas se inducen frente a la exposición de 4-CBA, entre ellas se encuentran las chaperonas moleculares DnaK y HtpG, lo que nos indica que la exposición a este compuesto representa una situación de estrés para la bacteria *Burkholderia* sp. LB400. También se observó la inducción de las enzimas catecol-1,2-dioxigenasa (CDO) y BphB. Se indujeron también enzimas pertenecientes al ciclo de Krebs y otras del metabolismo en general. En el caso de la exposición frente a 2-CBA, se observaron al menos cuatro proteínas inducidas y la represión de al menos una proteína. Todos estos polipéptidos están relacionados con el metabolismo de la bacteria. La enzima CDO corresponde a una de las proteínas más fuertemente inducida frente a 4-CBA. Se clonó el gen que codifica para la CDO de *Burkholderia* sp. LB400 en *E. coli*. Estudios de expresión mostraron que los clones obtenidos no presentaron actividad CDO. Se observó que la CDO está presente en la fracción insoluble de la célula, lo que indicaría que probablemente esta enzima forma cuerpos de inclusión. Este trabajo es uno de los primeros estudios proteómicos de *Burkholderia* sp. LB400. Este tipo de estudios contribuye a conocer sobre la regulación de la expresión de proteínas de la cepa LB400 frente a diferentes metabolitos de la vía superior de bifenilo.

Response of *Burkholderia* sp. LB400 to chlorobenzoates.

ABSTRACT

Several microorganisms are able to degrade polychlorinated biphenyls (PCBs), which are recalcitrant and toxic pollutants widely distributed in the environment. *Burkholderia* sp. LB400 is a gram-negative bacterium capable to oxidize a broad spectrum of PCBs. The *bph* locus of strain LB400 encodes the biphenyl upper pathway enzymes which oxidizes PCBs to chlorobenzoates (CBAs) and 2-hydroxypenta-2,3-dienoic acids. This last compound is converted to acetyl-CoA by enzymes of the lower aliphatic pathway which is also encoded by the *bph* locus. Exposition of *Burkholderia* sp. LB400 to CBAs could represent a stress for this bacterium, generating changes in the proteome. As determined by HPLC, strain LB400 is not able to oxidize 2-CBA or 4-CBA. 2-CBA as well as 4-CBA decreased the growth rate of strain LB400. However, 4-CBA has a stronger negative effect on bacterial growth than 2-CBA. This effect was proportional to 4-CBA concentrations. Additionally, 4-CBA decreased cell viability, by two orders of magnitude inbetween 24 h whereas 2-CBA has no effect on cell viability. To study the molecular response of *Burkholderia* sp. LB400 exposed to 4-CBA or 2-CBA, global protein patterns were analyzed by 2-D electrophoresis (NEPHGE-SDS). Proteins of interest were sequenced by Edman degradation. N-terminal blocked proteins were analyzed by high resolution mass spectrometry, ESI-Q-TOF. Aminoacidic sequences of proteins were identified using bioinformatics tools. Exposition to 4-CBA induced more changes in the proteome of strain LB400 in comparison with 2-CBA. At least 12 proteins were induced after incubation with 4-CBA, among them two molecular chaperones, DnaK and HtpG, showing that 4-CBA exposure constitutes a stress to

Burkholderia sp. LB400. Catechol-1,2-dioxygenase (CDO) and BphB were also induced. The induction of some Krebs cycle enzymes and others belonging to general metabolism was observed. When strain LB400 was exposed to 2-CBA, at least four proteins were induced and one was repressed. All these polypeptides are related with bacterial metabolism. CDO enzyme showed the highest induction upon 4-CBA exposure. CDO gene of *Burkholderia* sp. LB400 was cloned and expressed in *E. coli*. No CDO activity was observed in recombinant clones. CDO protein was present in the insoluble fraction of the cell, indicating that probably this enzyme forms inclusion bodies. This work is one of the first proteomic report of *Burkholderia* sp. LB400. This kind of studies contribute to the knowledge on regulation of protein expression of strain LB400 exposed to different metabolites of the biphenyl upper pathway.

1. INTRODUCCION

1.1. Policlorobifenilos.

Los policlorobifenilos (PCBs) son compuestos orgánicos aromáticos derivados del bifenilo. Estos compuestos son sintetizados artificialmente mediante la cloración directa de una molécula de bifenilo con cloro anhidro usando cloruro férrico como catalizador (Hutzinger *et al.*, 1974). La molécula de bifenilo puede estar sustituida con uno hasta diez átomos de cloro (Fig.1), existiendo teóricamente, 209 congéneres o isómeros de PCBs.

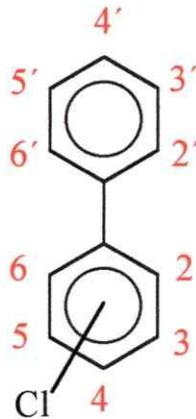


Figura 1. Estructura química de los policlorobifenilos. La molécula de bifenilo puede estar sustituida con uno hasta diez átomos de cloro.

Debido a sus propiedades químicas los PCBs están presentes en diversos productos comerciales y poseen una amplia gama de aplicaciones (Ullmann, 1985; Erickson, 1986).

No existen evidencias de que la exposición a PCBs aumente el riesgo de cáncer en la población humana (ATSDR, 1996). Sin embargo, se han investigado efectos negativos de los PCBs sobre la reproducción y el sistema endocrino (Falck *et al.*, 1992; Krishnan y Safe, 1993).

De los aproximadamente 1,5 millones de toneladas de PCBs producidos en el mundo entre los años 1929 y mediados de los años 80, una fracción sustancial llegó finalmente al ambiente (Abraham *et al.*, 2002). La alta lipofilicidad y la poca eficiencia con que los PCBs son degradados naturalmente, determinan que estos compuestos se bioacumulan en las cadenas tróficas y presentan una alta persistencia en el ambiente (Abramowicz, 1990).

La biorremediación ofrece una solución viable para el tratamiento de sitios contaminados, mediante la conversión catalizada por microorganismos de los compuestos tóxicos en productos inocuos (EPA, 1997).

1.2. Degradación bacteriana.

1.2.1. Degradación de PCBs.

Muchos microorganismos capaces de degradar o transformar PCBs han sido aislados (Abraham *et al.*, 2002). Estos organismos presentan cierta especificidad por algunos congéneres, degradando sólo un pequeño número de PCBs. Las tasas de degradación dependen de la estructura congénere (Abramowicz, 1990).

Existen dos tipos de procesos biológicos capaces de biotransformar PCBs: un proceso oxidativo aerobio y un proceso reductivo anaerobio. La descloración anaerobia de PCBs es responsable de la conversión de compuestos altamente clorados en congéneres con menor cloración (Abramowicz, 1995). Estos productos con menor

cloración son degradados mediante oxidación por un amplio rango de bacterias aerobias. Por ende ambos procesos biológicos son complementarios.

Se han aislado varios microorganismos aerobios capaces de degradar estos compuestos bajo condiciones de laboratorio. Estos microorganismos, que pueden ser tanto gram-negativos (*Burkholderia* sp., *Pseudomonas* sp. y *Sphingomonas* sp.) como gram-positivos (*Rhodococcus* sp.) (McKay *et al.*, 1997, 2003) presentan diversas capacidades degradativas de PCBs (Abraham *et al.*, 2002). La mayoría de las bacterias aerobias no son capaces de mineralizar completamente los PCBs, oxidando uno de los anillos clorados y liberando el segundo como clorobenzoato (CBA).

1.2.2. Degradación de clorobenzoatos.

Los CBAs son los mayores productos intermediarios del catabolismo aerobio de los PCBs. Sin embargo, la mayoría de los microorganismos degradadores de PCBs no son capaces de degradar estos compuestos (Francisco *et al.*, 2001). La mineralización completa de los PCBs requiere la presencia de dos vías catabólicas. La vía superior de bifenilo que degrada los PCBs y una vía para la degradación de CBAs (Sondossi *et al.*, 1992). Estudios previos indican que la degradación de 4-clorobifenilo (4-CB) resulta ser más eficiente en co-cultivos que contengan una cepa bacteriana capaz de degradar 4-CBA (Sylvestre *et al.*, 1985). Además, se ha observado que los CBAs y compuestos derivados de ellos, pueden producir un efecto tóxico sobre bacterias expuestas y afectar la degradación de (cloro)bifenilos (Sondossi *et al.*, 1992). Estudios realizados en *Pseudomonas stutzeri* indican que 3-CBA, 2-CBA y 4-CBA inhiben el crecimiento de la bacteria en distintas fuentes de carbono (Vrana *et al.*, 1996). Además, se observó una disminución en la tasa de degradación de algunos congéneres de PCBs (Vrana *et*

al., 1996). Esto sugiere que los CBAs afectan la vía degradativa de (cloro)bifenilos (Sondossi, *et al.*, 1992).

Diversas bacterias degradadoras de CBAs han sido aisladas desde suelo (Romanov y Hausinger, 1994; Kozlovsky y Kunk, 1995; Francisco *et al.*, 2001). Las enzimas necesarias para la degradación inicial de estos compuestos han sido identificadas (Nakatsu y Wyndham, 1993, 1995, 1997; Haak y Lingens, 1995; Tsoi *et al.*, 1999). La vía más común de degradación de CBAs genera como intermediario un (cloro)catecol (Francisco *et al.*, 2001). Los (cloro)benzoatos son transformados en (cloro)catecoles por la (cloro)benzoato dioxigenasa y la (cloro)benzoato dihidrodiol deshidrogenasa (Focht *et al.*, 1996). Posteriormente, los (cloro)catecoles son transformados por la vía de degradación *orto*.

1. 2. 3. Catecol-1,2-dioxigenasa.

Existen dos vías que permiten la degradación del catecol hasta succinato, un intermediario del ciclo de Krebs, denominadas vía *orto* y vía *meta* de degradación de catecol (Suzuki *et al.*, 2002).

La primera enzima de la vía *orto* de degradación corresponde a la catecol-1,2-dioxigenasa (CDO). Esta enzima cataliza la transformación del catecol en *cis,cis*-muconato mediante la adición de oxígeno molecular (Fig. 2).

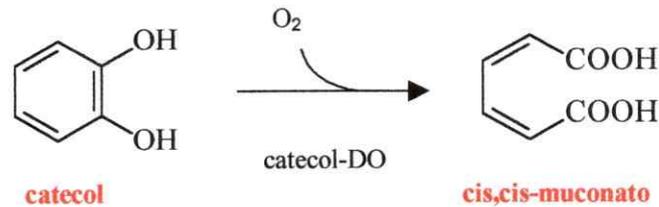


Figura 2. Reacción catalizada por la enzima catecol-1,2-dioxigenasa. Esta enzima cataliza la transformación del compuesto aromático catecol en cis,cis-muconato.

Existen dos tipos de catecol-1,2-dioxigenasas, denominadas CDOs del tipo I y CDOs del tipo II. Las enzimas catecol-1,2-dioxigenasas del tipo I no tienen actividad o tienen actividad muy baja contra los catecoles clorados. Las CDOs de tipo II pueden degradar los catecoles clorados, por lo que se les conoce como clorocatecol dioxigenasas (Kim *et al.*, 1997). Catecol-1,2-dioxigenasas de ambos tipos han sido caracterizadas en diversas bacterias (Patel *et al.*, 1976; Broderick and O'Halloran, 1991; Nakai *et al.*, 1995).

Los genes *cat* que codifican para dioxigenasas del tipo I de la vía *orto* de degradación de catecol, han sido ampliamente estudiados, existiendo antecedentes de su organización y regulación en las bacterias *Pseudomonas putida* y *Acinetobacter calcoaceticus* (Shanley *et al.*, 1986; Aldrich, 1988). Además existen reportes de bacterias que poseen varias isoenzimas de la CDO (Kim *et al.*, 1997; Murakami *et al.*, 1999; Suzuki *et al.*, 2002). Se han descrito CDO bacterianas que se inducen en presencia de compuestos como benzoato e incluso algunos CBAs (Giuffrida *et al.*, 2001, Suzuki *et al.*, 2002), lo que indica una regulación del sistema enzimático, que le permite a las bacterias degradar eficientemente este tipo de compuestos.

1.3. *Burkholderia* sp. LB400.

Burkholderia sp. LB400 es una bacteria gram-negativa capaz de crecer en bifenilo como única fuente de carbono y energía (Bopp, 1986). Debido a su capacidad de transformar un amplio rango de congéneres de PCBs, esta bacteria se ha convertido en un organismo modelo para el estudio de la bioquímica y biología molecular del metabolismo de clorobifenilos (CBs) en procariontes.

La cepa LB400 posee el locus *bph* en su cromosoma (Fig. 3), el que ha sido extensamente caracterizado (Erickson y Mondello, 1992; Hofer *et al.*, 1993, 1994). Este locus posee diez cistrones que codifican para las enzimas que constituyen la vía superior de bifenilo (Fig. 4A), la que le permite a la bacteria degradar el bifenilo a benzoato y una vía alifática inferior (Fig. 4B), que convierte al 2-hidroxipenta-2,4-dienoato a piruvato y acetil-CoA, respectivamente. Además contiene un gen que codifica para una glutatión-s-transferasa (*bphK*) y dos marcos de lectura abiertos (ORFs), ORF0 y ORF1. Estudios recientes indican que el ORF0 podría participar en la regulación de los genes *bph* (Beltrametti *et al.*, 2001). Se desconoce la función de ORF1.



Figura 3. Organización del locus *bph* en *Burkholderia* sp. LB400. Los genes codifican para las siguientes enzimas: *bphA1A2A3A4*, bifenilo-2,3-dioxigenasa (BDO); *bphB*, bifenilo-2,3-dihidrodiol-2,3-dioxigenasa (BDDH); *bphC*, 2,3-dihidroxibifenilo-1,2-dioxigenasa (DBDO); *bphK*, glutatión S-transferasa (GST); *bphH*, 2-hidroxipenta-2,4-dienoato hidratasa; *bphJ*, acetaldehído deshidrogenasa; *bphI*, 4-hidroxi-2oxovalerato aldolasa; *bphD* 2-hidroxi-6-oxo-6-fenilhexa-2,4.dienoato hidrolasa (HOPDAH). Fuente: Adaptado de Bartels *et al.* (1999).

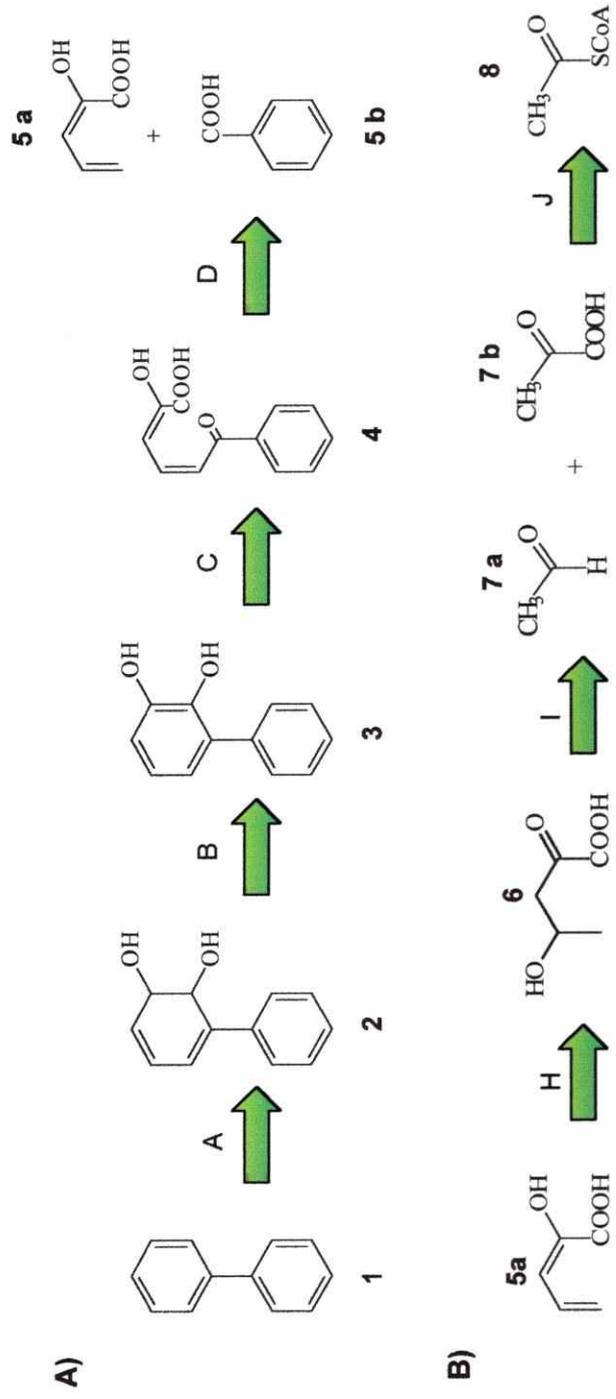


Figura 4. Vías catabólicas superior (A) e inferior (B) de bifenilo codificadas por el locus *bph* de *Burkholderia* sp. LB400. Metabolitos: 1, bifenilo; 2, bifenilo-2,3-dihidrodiol; 3, 2,3-dihidroxi-bifenilo; 4, ácido 2-hidroxi-6-oxo-6-fenilhexa-2,4-dienoico; 5a, ácido 2-hidroxi-penta-2,4-dienoico; 5b, benzoato; 6, ácido 4-hidroxi-2-oxovalérico; 7a, acetaldéido; 7b, ácido pirúvico; 8, acetyl Co-A. Enzimas: A) bifenilo-2,3-dioxigenasa; B) bifenilo-2,3-dihidrodiol-2,3-deshidrogenasa; C) 2,3-dihidroxi-bifenilo-1,2-dioxigenasa; D) 2-hidroxi-6-oxo-6-fenilhexa-2,4-dienoato hidrolasa. H) 2-hidroxi-penta-2,4-dienoato hidrolasa; I) 4-hidroxi-2-oxovalerato aldolasa; J) acetaldéido deshidrogenasa.

El primer paso en la vía de degradación de bifenilo es llevado a cabo por la enzima bifenilo-2,3-dioxigenasa (BDO), la que es capaz de atacar un espectro relativamente amplio de congéneres de PCBs (Seeger *et al.*, 1999; Arnett *et al.*, 2000).

A pesar del amplio rango de congéneres de clorobifenilos que esta bacteria es capaz de transformar, no todos ellos son metabolizados hasta clorobenzoatos (CBAs) y 2-hidroxipenta-2,4-dienoatos, los productos finales de la vía superior de bifenilo. Estudios realizados por Seeger *et al.* demostraron que la vía superior de bifenilo codificada por el locus *bph* es responsable de estas transformaciones, concluyendo que la eficiencia de transformación de clorobifenilos (CBs) hasta clorobenzoatos (CBAs) depende del patrón de sustitución de los compuestos iniciales de la vía (Seeger *et al.*, 1995, 1999).

Las posibles capacidades de degradación de CBAs de la cepa LB400 han sido poco estudiadas. Hernández *et al.* reportaron el crecimiento de esta bacteria en 3-CBA (Hernández *et al.*, 1995). Sin embargo, *Burkholderia* sp. LB400 no crece en 2- y 4-CBA, ni en benzoatos con mayor halogenación (Potrawfke *et al.*, 1998). No se tiene conocimiento de los potenciales efectos que podría producir la acumulación de estos metabolitos finales sobre la bacteria o sobre sus capacidades degradativas.

1.4. Respuesta bacteriana a estrés y estudios proteómicos.

Las bacterias son capaces de responder a cambios en el medio ambiente. La célula monta complejas respuestas frente a cualquier cambio en su ambiente, las que involucran a gran parte de su genoma, y ajustan la tasa de síntesis de proteínas individuales. Frente a cambios favorables en el medio, la bacteria es capaz de acelerar el crecimiento como resultado del aumento de la síntesis de componentes esenciales

para la célula y de la represión de proteínas redundantes. Frente a una condición desfavorable, la célula desvía recursos para mantener su crecimiento, sintetiza proteínas que contrarresten la condición estresante y repara los daños producidos. Por lo tanto, la respuesta fisiológica de las bacterias frente al medio ambiente se traduce en cambios en el patrón de expresión de proteínas (Neidhart y VanBogelen, 2000). La síntesis selectiva de proteínas es la esencia de cada respuesta a estrés. Por lo tanto, si se quiere estudiar la respuesta a estrés en bacterias es necesario estudiar el proteoma del microorganismo.

1.4.1. Proteómica.

Durante los últimos años la genómica ha proporcionado una vasta cantidad de información genética. Sin embargo, la información que proporcionan las secuencias nucleotídicas, no entregan un perfil completo de la abundancia, estructura final y actividad de las proteínas.

En 1994, fue introducido por primera vez el concepto de **proteoma**. Se definió el proteoma como el conjunto completo de proteínas que un organismo es capaz de producir (Van Bogelen *et al.*, 1999). De este concepto derivaron otros como **proteómica**. Se ha definido la **proteómica** como la "Caracterización a gran escala del conjunto proteico de una línea celular, tejido u organismo" (Graves y Haystead, 2002). Del término "gran escala" se desprende una definición integrativa de la proteómica, la cual reúne diversas áreas de estudio (Fig. 5). La vasta información que puede proporcionar la proteómica es absolutamente complementaria con la información entregada por el genoma.

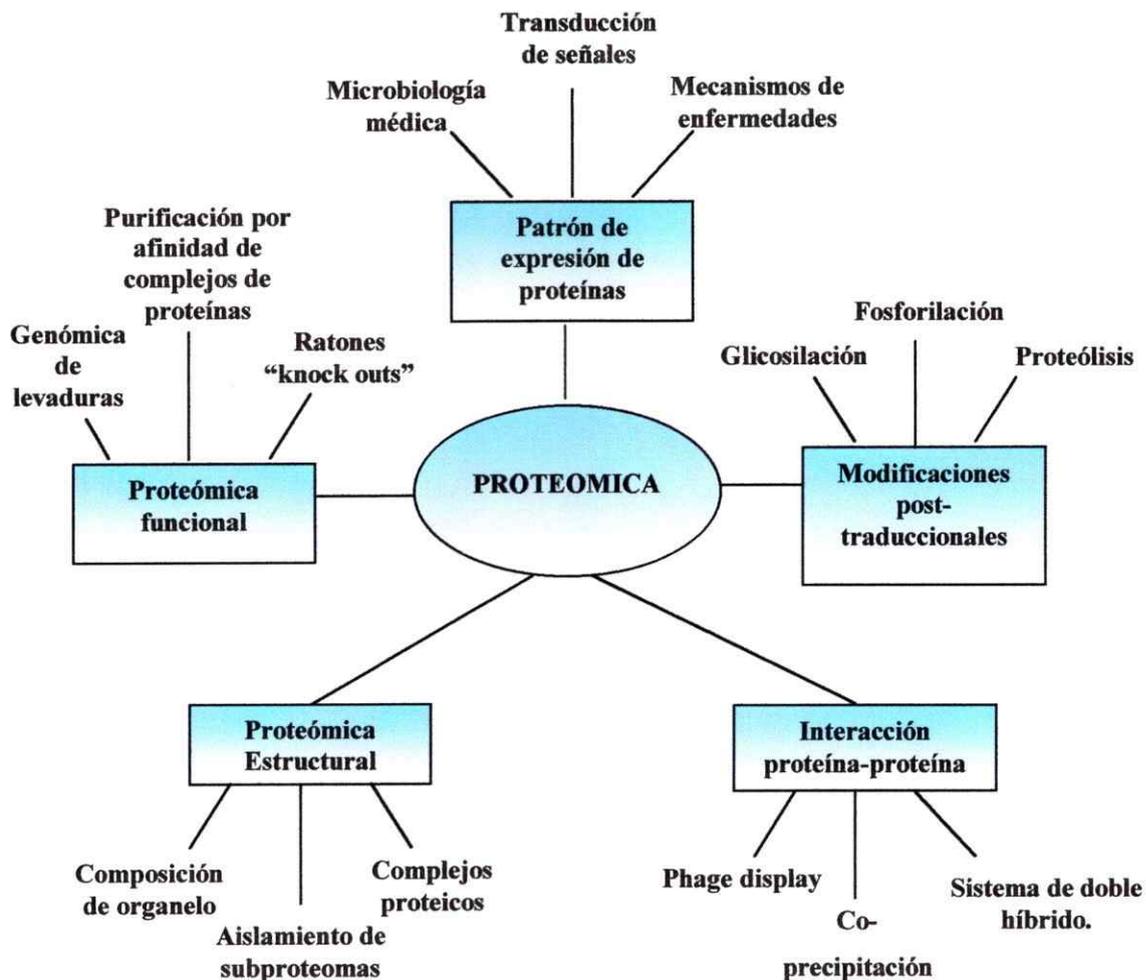


Figura 5. Tipos de proteómica y sus aplicaciones en biología. Fuente: Adaptado de Graves y Haystead (2002).

1.4. 2. Proteómica de expresión.

La **proteómica de expresión** se ha definido como el estudio cuantitativo y cualitativo de la expresión de proteínas entre muestras que difieren en alguna condición (Graves y Haystead, 2002). Dentro de esta área de la proteómica se encuentra el estudio de la respuesta a estrés de bacterias.

Un experimento de proteómica de expresión (Fig. 6) se puede dividir en las siguientes etapas:

- Separación y aislamiento de proteínas.
- Adquisición de información estructural de las proteínas.
- Utilización de bases de datos.

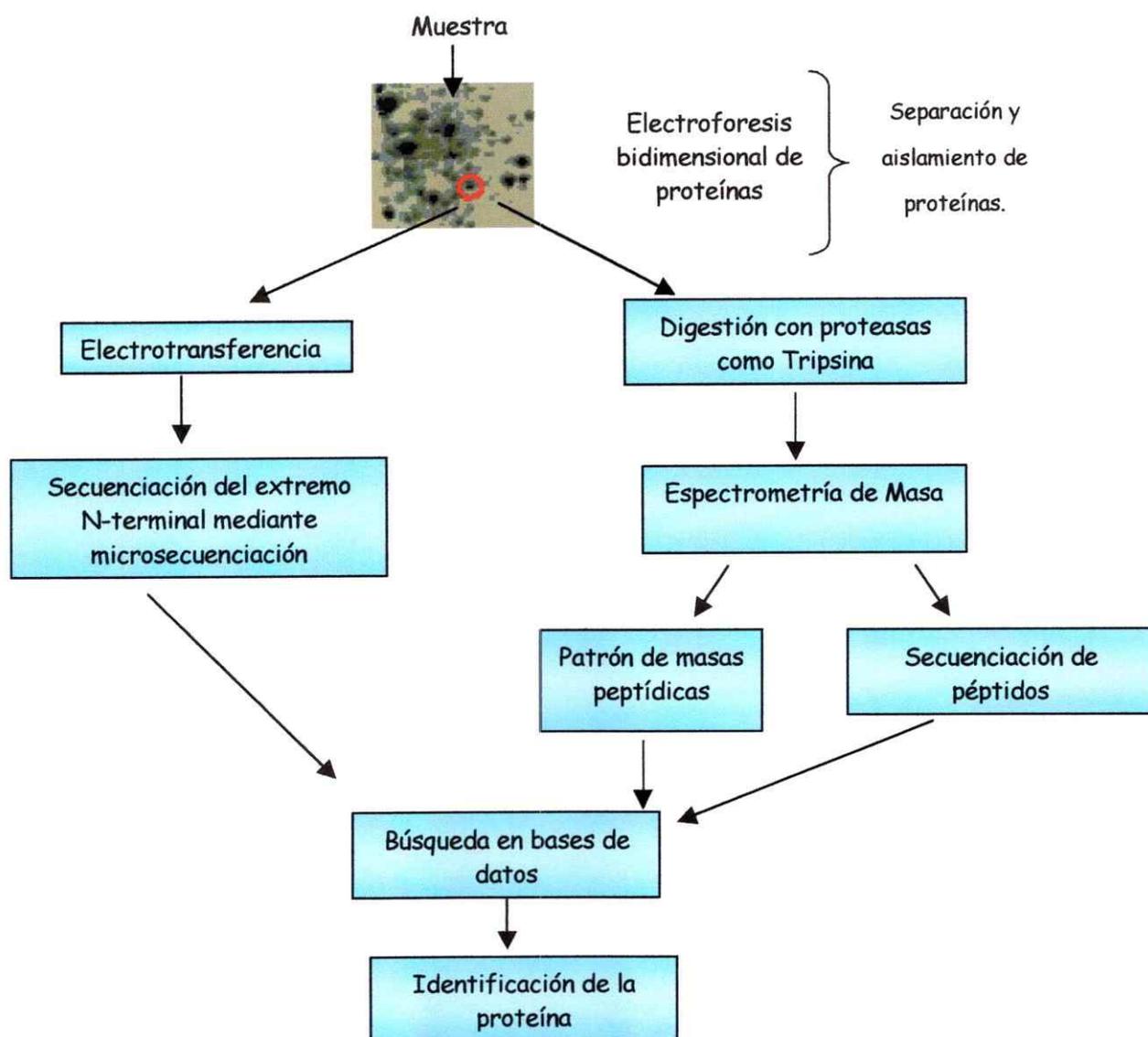


Figura 6. Estrategia para la identificación de proteínas en la proteómica de expresión. Fuente: Modificado de Graves y Haystead. (2002).

1.4.3. Separación y aislamiento de proteínas.

En proteómica la tecnología predominante para separar proteínas es la electroforesis bidimensional en geles de poliacrilamida (Neidhardt y VanBogelen, 2000). En ella, las proteínas son separadas por dos propiedades distintas. En la primera dimensión son separadas de acuerdo a su punto isoelectrónico, y en una segunda dimensión son separadas de acuerdo a su masa molecular. Cada mancha que aparece en estos geles bidimensionales de poliacrilamida representa una proteína.

El principal uso de este método continúa siendo la proteómica de expresión. La aparición, desaparición o cambios en los niveles de proteínas entre los geles bidimensionales de dos muestras crecidas en distintas condiciones, entrega información sobre las diferencias de expresión de proteínas. La intensidad de las proteínas entrega información sobre los niveles de expresión. Numerosos estudios de la expresión de proteínas en diversos microorganismos expuestos a diferentes estímulos o situaciones de estrés, han sido realizados mediante este método (Lambert *et al.*, 1997, Breinig *et al.*, 2000, Stancik *et al.*, 2002, Seung *et al.*, 2002).

1.4.4. Adquisición de información estructural de las proteínas.

Actualmente se utilizan dos métodos para obtener la secuencia parcial de una proteína:

Microsecuenciación: Uno de los primeros métodos utilizados para la identificación de proteínas fue la microsecuenciación química de Edman (Edman, 1949), la cual permite obtener la secuencia N-terminal de una secuencia aminoacídica. Desde su introducción, el método de secuenciación química de Edman ha cambiado muy poco. Sin embargo, las mejoras en la tecnología han incrementado su sensibilidad y

eficiencia. El desarrollo de membranas de transferencia compatibles con la secuenciación química, permite que este método sea el más aplicado para la identificación de proteínas separadas por electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS (Graves y Haystead, 2002). Las modificaciones post-traduccionales de las proteínas, lo que puede incluir un bloqueo del extremo amino-terminal, son una de las dificultades que ha limitado la utilización de la secuenciación de Edman, pues impide que la reacción química se lleve a cabo.

Espectrometría de masa: La espectrometría de masa entrega información estructural de la proteína, como la masa peptídica y la secuencia aminoacídica de un péptido. Esta información es usada para identificar proteínas por búsqueda en bases de datos. Además se puede utilizar en la determinación de modificaciones post-traduccionales de las proteínas y su localización.

La obtención de información de proteínas por espectrometría de masa puede ser dividida en tres etapas:

- A) Preparación de la muestra.
- B) Ionización de la muestra.
- C) Análisis de masa.

Existen hoy en día dos principios de ionización de muestra, desorción láser asistida por matriz (MALDI, Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation) e ionización por electrospray (ESI, ElectroSpray Ionization), las cuales fueron desarrolladas por Karas y Hillenkamp (1988) y Fenn *et al.* (1989), respectivamente. Ambas técnicas están descritas como una ionización suave que resulta en la formación de iones con una mínima fragmentación.

Para el análisis de masa de los péptidos se han diseñado espectrómetros con componentes de paso de iones simples o múltiples. Los cuatro componentes más usados son: cuadrupolo (Q), tiempo de vuelo (TOF, Time of Flight), trampa de iones (ion trap) y cámaras de colisión.

Existen diferentes tipos de espectrómetros de masa, los cuales son el resultado de una combinación de métodos de ionización y métodos de determinación de masas de uno (MALDI-TOF, ESI-Q o ESI-ion trap) o más componentes (ESI-Q-TOF, MALDI-Q-TOF, MALDI-TOF-TOF, etc.). Dependiendo de la combinación que se haga derivan sus nombres.

1.4.5. Utilización de bases de datos.

Las bases de datos aceptan información estructural de proteínas obtenida mediante secuenciación de Edman o espectrometría de masa. La Tabla 1 muestra diversas herramientas y bases de datos para analizar secuencias proteicas que se encuentran disponibles en internet. La ventaja de la búsqueda en bases de datos es que permite una rápida y acertada identificación de un gran número de proteínas.

Tabla 1. Sitios disponibles en la red para análisis bioinformático de proteínas.

Nombre del sitio	Dirección	Información disponible
NCBI	http://www.ncbi.nlm.nih.gov	Bases de datos de secuencias nucleotídicas y peptídicas.
FASTA	http://www.tigr.org	
Blast	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/	Alineamiento de secuencias.
Clustal W	http://www.ebi.ac.uk/ClustalW	
Pfam	http://www.sanger.ac.uk/cgi-bin/pfam	Búsqueda de motivos
ProFound	http://prowl.rockefeller.edu/cgi-bin/ProFound	Mapeo de masa y secuenciación peptídica
Pepident	http://www.expasy.ch/tools/pepident	

1.5. HIPÓTESIS DE TRABAJO.

La exposición de la bacteria *Burkholderia* sp. LB400 a clorobenzoatos, productos finales de la vía superior de bifenilo, produce efectos fisiológicos con cambios en su proteoma, incluyendo la inducción de enzimas catabólicas de compuestos aromáticos.

1.6. OBJETIVOS DE LA TESIS.

Los objetivos específicos de esta tesis son:

1. Determinar el efecto de la exposición a CBAs sobre el crecimiento y viabilidad de *Burkholderia* sp. LB400.
2. Estudiar la respuesta del proteoma de la bacteria *Burkholderia* sp. LB400 frente a la exposición de CBAs.
3. Identificar proteínas en la cepa LB400, inducidas o reprimidas frente a la exposición a CBAs.
4. Clonamiento del gen de alguna proteína de interés inducida por CBA.

2. MATERIALES Y MÉTODOS.

2.1. Reactivos.

Los CBAs (98%) se adquirieron en Fluka AG (Buchs, Suiza) o Lancaster Síntesis (Reino Unido). Glicina p.a., bifenilo 99%, alcohol isoamílico, cloroformo y dimetilsulfóxido se adquirieron de Merck (Darmstadt, Alemania); β -mercaptoetanol, se obtuvo de J.T. Baker (Phillipsburg, Estados Unidos); ampicilina, azul de bromofenol, acrilamida 99%, TEMED 99%, IGEPAL CA-630, Ribonucleasa A, DNAsa I y azul de Coomassie (Brilliant Blue R) se adquirieron de Sigma (Steinheim, Alemania); SDS, bisacrilamida, persulfato de amonio, urea, acrilamida ultra pura 99,9%, IPTG, estándares de PM de proteínas, anfolitos Bio-Lyte de pH 5-7 y anfolitos Bio-Lyte de pH 3-10 se obtuvieron de Bio Rad (Hercules, Estados Unidos); reactivo de Bradford, dideoxinucleótidos (dNTPs) se obtuvo de Winkler (Santiago, Chile). Taq polimerasa se adquirió en GeneLab (Santiago, Chile), las endonucleasas de restricción *Sall* y *NdeI*, marcador de peso molecular 1kb DNA extensión Ladder se adquirieron en Invitrogen (Carlsbad, Estados Unidos).

2.2. Cepas bacterianas.

Las cepas utilizadas fueron las siguientes:

- *E. coli* B cepa BL21(DE3): F⁻ ompT gal [dcm] [lon] hsdS_B (r_B⁻, m_B⁻) con DE3, un profago lambda que lleva el gen de la T7 RNA polimerasa (Studier *et al.*, 1990).

- *E. coli* cepa DH5 α : F⁻ endA1 hsdR17 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 deoR Δ (lacZYA-argF) U169 lacZ Δ M15) (Grant *et al.*, S. G. N, 1990).
- *Burkholderia* sp. LB400 es una cepa silvestre, aislada desde suelo, capaz de degradar un amplio rango de PCBs (Bopp, 1986). Esta cepa fue donada gentilmente por el Dr. Kenneth Timmis (Instituto Nacional de Biotecnología, GBF, Braunschweig, Alemania)

2. 3. Plasmidios.

Los vectores utilizados en esta tesis se describen en la Tabla 2.

Tabla 2. Plasmidios utilizados.

Plasmidio	Características	Referencia
TOPO TA ^r	Vector comercial diseñado para clonar productos de PCR en forma directa.	Invitrogen, U.S.A
pT7-7	Vector que posee un sitio múltiple de Clonamiento bajo el promotor de la RNA polimerasa del fago T7. Río arriba del promotor se encuentra un sitio de unión fuerte a ribosoma (rbs).	Tabor y Richardson, 1985

2. 4. Medios de Cultivos.

Medio LB (Sambrook *et al.*, 1989): triptona 10 g/l, extracto de levadura 5 g/l y NaCl 5 g/l. Para la preparación de placas con agar, se agregó al medio agar al 1,5% (p/v).

Medio mínimo M9 (Sambrook *et al.*, 1989): Na_2HPO_4 50 mM, KH_2PO_4 22 mM, NaCl 85 mM y NH_4Cl 7,5 mM. Soluciones trazas: Solución A (50 ml): 0,5375 g de $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0,1000 g de CaCO_3 , 0,2250 g de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,0720 g de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,0424 g de $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0,0125 g de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0,0140 g de $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0,0030 g de H_3BO_3 y 2,565 ml de HCl (37%). Solución B: $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1M. Solución C: $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 36 mM. Las soluciones A y B se autoclavaron y se guardaron a 4°C. La solución C se esterilizó por filtración y se mantuvo congelada a -24°C.

Medio Mínimo Mineral M9: Para 1 lt de este medio mineral se utilizan las siguientes soluciones: 100 ml de medio mínimo M9 (10X); 2,5 ml de solución A: B: C (2:1:1). Como fuente de carbono se utilizó glucosa 5 mM.

2. 5. Métodos de cultivo.

Las cepas de *E. coli* se cultivaron a 37°C en medio LB líquido con agitación rotatoria o en placas de agar-LB. Se utilizaron cepas de *E. coli* como receptoras de vectores que contienen resistencia a ampicilina, por lo que el medio se suplementó con ampicilina 100 µg/ml. Las bacterias *Burkholderia* sp. LB400 se crecieron a 30°C en medio LB o medio mineral M9 líquido utilizando glucosa como única fuente de carbono con agitación rotatoria o en placas de agar-LB.

2. 6. Cuantificación de 2-CBA y 4-CBA.

Para medir la concentración de 2-CBA y 4-CBA, en un cultivo de *Burkholderia* sp. LB400 a diferentes tiempos de incubación, se utilizó la técnica de Cromatografía Líquida de Alta Presión (HPLC) (Seeger *et al.*, 1995). Utilizando estándares de alta pureza se obtuvieron los espectros de absorción para cada compuesto (Fig. 7).

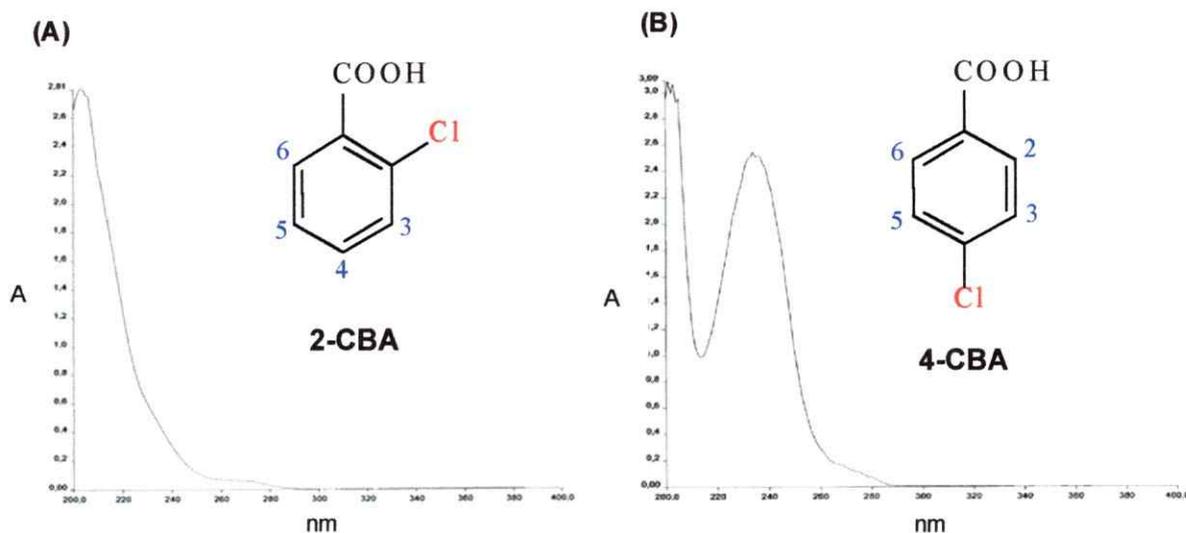


Figura 7. Espectros UV y estructura química de 2-CBA y 4-CBA. Espectros UV de 2-CBA (A) y 4-CBA (B).

2.6.1. Condiciones del HPLC.

Se utilizó un sistema HPLC marca Beckman modelo System Gold equipado con un detector de arreglo de diodos y con una columna Lichrosphere RP-C18 de 5 μ m de espesor de film, 150 mm de largo y 4,6 mm de diámetro (Supelco, Bellefonte, USA). Como fase móvil se utilizó una mezcla que contiene 60% metanol, 39,5% agua y 0,5% de ácido fosfórico. Los CBAs se cuantificaron por comparación con estándares de alta pureza.

2.6.2. Cinética de exposición a CBAs.

La bacteria *Burkholderia* sp. LB400 se creció en 5 ml de medio LB en un agitador termorregulado a 30°C, por aproximadamente 10-12 hrs. Un inóculo de este cultivo fresco (1% v/v) se transfirió a tres matraces con 100 ml de medio mineral M9

utilizando como fuente de carbono glucosa 5 mM. Las células se cultivaron a 30°C hasta llegar a una densidad óptica a 525 nm ($D.O_{525nm}$) de 0,3. Una vez alcanzada esta densidad óptica se agregó 2-CBA o 4-CBA en una concentración 2 mM. Se tomó una alícuota de 1 ml de cultivo a las 0, 1, 4, 6 y 24 horas y este volumen se transfirió a un tubo Eppendorf. Posteriormente, se centrifugó la muestra durante 10 min a 10.000 rpm y se recuperó el sobrenadante, el que se guardó en un tubo nuevo a -24°C.

2.7. Curvas de crecimiento y estudios de viabilidad.

Para estudiar el efecto de la exposición a clorobenzoatos en el crecimiento de *Burkholderia* sp. LB400 se realizaron curvas de crecimiento de esta bacteria en presencia de 4-CBA en concentraciones de 0,5 mM, 2 mM y 5 mM y de 2-CBA en una concentración 2 mM.

La bacteria *Burkholderia* sp. LB400 se creció en 5 ml de medio LB en un agitador termorregulado a 30°C durante aproximadamente 8 horas o hasta obtener un cultivo saturado. Un inóculo de este cultivo fresco se transfirió a 20 ml de medio mineral M9. Las células se cultivaron en matraces con vástago a 30°C y agitación. Cada hora se midió la densidad óptica del cultivo en un espectrofotómetro modelo Spectronic 20 (Bausch and Lomb). A una $D.O_{525nm}$ 0,3 se agregó 2-CBA o 4-CBA en las concentraciones ya mencionadas. Como control se utilizó un cultivo crecido en glucosa 5 mM sin exposición a clorobenzoato. Se siguió el crecimiento de la bacteria por medición de la densidad óptica. Adicionalmente se tomaron alícuotas para determinar las unidades formadoras de colonia (UFC). Se tomó una alícuota de 100 μ l de cultivo a las 0, 1, 4, 6 y 24 horas de exposición a CBAs. Con esta alícuota se realizaron diluciones seriadas y se plaqueó 100 μ l de las diluciones -5, -6 y -7 en

placas de Petri con medio LB. Las placas se incubaron en una estufa a 30°C durante tres días, para luego determinar las UFC.

2.8. Electroforesis bidimensional en geles de poliacrilamida (NEPHGE).

2.8.1. Soluciones.

- (A) Solución Stock de IGEPAL CA-630 al 10%: IGEPAL CA-630 al 10% p/v.
- (B) Amortiguador de lisis: Urea 9,5 M, IGEPAL CA-630 al 2% v/v, anfolitos al 2% (1,6% de anfolitos pH entre 5 y 7, 0,4% de anfolitos pH entre 3 y 10) y β -mercaptoetanol al 5%. Se almacenó en tubos Eppendorf a -24° C.
- (C) Amortiguador de sonicación: Tris-HCl 0,01 M (pH 7,4), $MgCl_2$ 5 mM y RNasa 50 μ g/ml. Se almacenó en tubos Eppendorf a -24° C.
- (D) Solución madre de DNasa I: 1 mg/ml de DNasa I en Tris-HCl 0,01M (pH 7,4) y $MgCl_2$ 1 mM.
- (E) Solución de persulfato de amonio 10%: persulfato de amonio 0,1 g/ml. Se almacenó en tubos Eppendorf a -24° C, por no más de dos semanas.
- (F) Solución de sobrecapa: Urea 9 M y anfolitos al 1% (80 μ l de anfolitos pH 5-7 y 20 μ l de anfolitos pH 3-10). Se almacenaron en tubos Eppendorf a -24° C.
- (G) Amortiguador de muestra: Tris-HCl 0,0625 M (pH 6,8), SDS al 2%, glicerol al 10%, β -mercaptoetanol al 5% y azul de bromofenol al 0,001%.
- (H) Solución del cátodo: H_3PO_4 0,01 M.
- (I) Solución del ánodo: NaOH 0,02 M.
- (J) Solución de agarosa al 1% p/v: A 0,25 g de Agarosa se le adicionaron a 25 ml de amortiguador de muestra SDS en un tubo de ensayo hermético y se almacenó a 4° C. Para utilizarla, se fundió a baño María.

- (K) Solución de Acrilamida al 30% (NEPHGE): Acrilamida ultra pura al 28,38% p/v y Bisacrilamida al 1,62%.
- (L) Solución de Acrilamida al 30% para geles con SDS: Acrilamida al 29,18% y Bisacrilamida al 0,82%. Se almacenó a 4° C.
- (M) Amortiguador para gel de corrida: Tris-HCl 1,5 M (pH 8,8) y SDS al 0,4%.
- (N) Amortiguador para gel concentrador : Tris-HCl 0,5 M (pH 6,8) y SDS al 0,4%.
- (O) Amortiguador de corrida: Tris-glicina 0,025 M y SDS al 0,4%. Preparación: 14,4 g glicina y 3,0 g de Tris se disolvieron en 990 ml de agua. Posteriormente se agregó 10 ml de SDS al 10% p/v.
- (P) Solución de tinte: metanol al 50% v/v, ácido acético al 7% v/v y Azul de Coomassie al 0,2% p/v.
- (Q) Solución de destintado: metanol al 20% v/v y ácido acético al 7% v/v.

2.8.2. Preparación de Muestra.

El cultivo crecido en medio mínimo mineral M9 se colectó mediante centrifugación y lavó al menos dos veces con NaH_2PO_4 50 mM pH 7,2. Se transfirieron las bacterias a un tubo Eppendorf previamente pesado. Se centrifugó a 13.000 rpm por 5 minutos, se eliminó el sobrenadante y se determinó el peso húmedo de las células. Posteriormente, las bacterias se resuspendieron en 10 μl de amortiguador de sonicación por cada mg de bacterias húmedas. Para romper las células se sometieron a ultrasonido (Misonix modelo XL200) 5 veces durante 5 minutos con una potencia de 6 W. Posteriormente, se adicionó DNasa I en una concentración final de 80 $\mu\text{g/ml}$, manteniendo las muestras en hielo por 10 minutos. Se alicuotó la muestra en tubos Eppendorf, los que se llevan a speed-vac (Concentrator 5301, Eppendorf) durante 1 h

aproximadamente a 60°C. Finalmente se resuspendió en 4,3 µl de amortiguador de lisis por mg de bacteria húmeda inicial y se cargó 30 µl en el gel de primera dimensión.

2.8.3. Primera Dimensión.

Se utilizó la técnica de geles de gradiente de pH al no-equilibrio (NEPHGE) descrita por O'Farrell (1977), con algunas modificaciones. Se utilizó un gradiente de pH de 3 a 10. La mezcla para seis geles de primera dimensión contiene 2,06 g de urea, 850 µl de H₂O, 750µl de la solución de IGEPAL CA-630 al 10%, 500 µl de acrilamida al 30% y 125 µl de anfolitos con un rango de pH entre 3 y 10, 10 µl de persulfato al 10% y 7,5 µl de TEMED. Con esta mezcla se llenaron los tubos (125 mm por 2,5 mm de diámetro) hasta una altura de 11 cm. Se cargaron 30 µl (7 mg) de la muestra en cada tubo, se cubrió la muestra con 10 µl de la solución de sobrecapa y el resto del tubo se llenó con H₃PO₄ 0,01 M. El reservorio inferior de la cámara de electroforesis se llenó con la solución de NaOH 0,02 M (ánodo) y la parte superior con la solución de H₃PO₄ 0,01 M (cátodo). La electroforesis se realizó aplicando un voltaje de 400 V por un período de 6,5 h. A continuación, los geles fueron equilibrados durante 1 h en amortiguador de muestra-SDS.

2.8.4. Segunda Dimensión.

Para la segunda dimensión se utilizaron geles de poliacrilamida con SDS según el protocolo descrito por O'Farrell (1975), con algunas modificaciones.

A. Gel de corrida al 11%: 7 ml agua, 0,4 ml glicerol 50% v/v, 5 ml amortiguador para gel de corrida, 7,65 ml de solución de acrilamida al 30% p/v, 0,074 ml persulfato de amonio al 10% p/v y 0,006 ml de TEMED.

B. Gel concentrador al 4,5%: 3 ml agua, 1,25 ml amortiguador para gel concentrador, 0,75 ml de solución de acrilamida al 30% p/v, 0,015 ml persulfato de amonio al 10% p/v y 0,01 ml TEMED 99%.

El gel de la primera dimensión (NEPHGE), se cargó sobre el gel de la segunda dimensión. La electroforesis se corrió a 60 V hasta que el frente de azul de bromofenol salió del gel. Una vez terminada la electroforesis, el gel de corrida se colocó en solución de tñido con agitación suave. Posteriormente, el gel fue destañido y secado.

2.9. Determinación de los niveles de inducción/ represión de proteínas.

Se determinaron por inspección visual de los geles bidimensionales las proteínas que presentaban inducción/represión. Posteriormente, se midió la densidad (Intensidad \times mm²) de cada proteína seleccionada mediante un programa computacional llamado Quantity One de BioRad. Para la cuantificación, se creó una imagen computacional de cada gel, a partir de la cual el programa permite determinar la densidad (Int \times mm²) de cada proteína individual. Con los datos obtenidos de al menos tres geles 2-D con exposición a 4-CBA 2 mM se calculó la inducción relativa de cada proteína. Este índice fue calculado como el cuociente de las densidades obtenidas de cada proteína en geles con exposición a 4-CBA versus la condición control. A cada valor se le descontó la densidad medida en el fondo del gel, lo que nos permite descontar el error asociado a la tinción de los geles.

2.10. Obtención de secuencias peptídicas.

Se determinó la secuencia aminoacídica de las proteínas seleccionadas mediante microsecuenciación del amino terminal. Adicionalmente, se obtuvieron secuencias parciales de ellas mediante espectrometría de masa de alta resolución

(ESI-Q-TOF). Estos análisis se realizaron en el Instituto Nacional de Biotecnología (GBF) en Braunschweig, Alemania, gentileza de la Dra. Daniela Regenhardt.

2.11. Identificación de proteínas.

Para identificar las proteínas seleccionadas se ingresó las secuencias amino-terminal obtenidas mediante secuenciación de Edman o ESI-Q-TOF en la base de datos del genoma de *Burkholderia* sp. LB400, que está construyendo el Joint Genome Institute, U.S Department of Energy (DOE) (<http://JGI.doe.gov>), a través de la cual se obtuvo la secuencia completa de las proteínas seleccionadas. Para confirmar la información entregada por el método de búsqueda anterior, las secuencias proteicas se ingresaron en el programa de comparación con bases de datos, FASTA desarrollado por el Instituto Europeo de Bioinformática (<http://www.ebi.ac.uk>). Para estimar el punto isoeléctrico y la masa molecular de las proteínas se utilizó la herramienta pepInfo disponible en la página del Instituto Europeo de Bioinformática.

2.12. Clonamiento del gen *catA* que codifica a la enzima catecol 1,2-dioxigenasa.

2.12.1. Extracción de ADN genómico de la cepa LB400.

Para extraer ADN genómico de la bacteria *Burkholderia* sp. LB400 se utilizó el protocolo establecido por Ausubel *et al.* (1999). El ADN se precipitó agregando 0,6 volúmenes de isopropanol y agitando por inversión hasta ver la aparición de un ovillo de ADN. Con una pipeta Pasteur sellada en la punta se procedió a extraer este ovillo. El ADN se lavó con etanol 70% y posteriormente se dejó secar a temperatura ambiente. Por último el ADN se resuspendió en 100 μ l de amortiguador TE (100 mM Tris-HCl pH 7,4, 100 mM EDTA pH 8,0).

2.12.2. Extracción de ADN plasmidial.

Las extracciones de ADN plasmidial se realizaron utilizando el kit Wizard Plus maxipreps DNA purification system (Promega, Estados Unidos), de acuerdo al protocolo indicado por el fabricante.

2.12.3. Diseño de partidores.

Los partidores Cat1 y Cat2 fueron diseñados mediante el programa computacional oligo (National Bioscience, Inc.) prestado por el Laboratorio de Genética Molecular Bacteriana de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile dirigido por la Dra. Eugenia Jedlicki y el Dr. Omar Orellana. Se realizó un alineamiento de secuencias nucleotídicas de catecol-1,2-dioxigenasa de varias bacterias para intentar utilizar las zonas conservadas del gen en el diseño de los partidores.

A ambos partidores se les creó un sitio de restricción para las enzimas *NdeI* y *SaI* respectivamente. Las secuencias y características principales de los partidores son las siguientes:

Cat1: 5'- ACC atA TGA ACA GGC AAG CTA TC-3'

Largo: 23 nt

T_m: 66°C

En azul: sitio de restricción para la enzima *NdeI*.

En minúscula: nucleótidos no complementarios al gen *catA*.

Cat2: 5'- ACC AGG GTc GAC AGA TTC ATG C-3'

Largo: 22 nt

T_m: 68°C

En rojo: sitio de restricción para la enzima *SaI*.

En minúscula: nucleótidos no complementarios al gen *catA*.

2.12.2. Extracción de ADN plasmidial.

Las extracciones de ADN plasmidial se realizaron utilizando el kit Wizard Plus maxipreps DNA purification system (Promega, Estados Unidos), de acuerdo al protocolo indicado por el fabricante.

2.12.3. Diseño de partidores.

Los partidores Cat1 y Cat2 fueron diseñados mediante el programa computacional oligo (National Bioscience, Inc.) prestado por el Laboratorio de Genética Molecular Bacteriana de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile dirigido por la Dra. Eugenia Jedlicki y el Dr. Omar Orellana. Se realizó un alineamiento de secuencias nucleotídicas de catecol-1,2-dioxigenasa de varias bacterias para intentar utilizar las zonas conservadas del gen en el diseño de los partidores.

A ambos partidores se les creó un sitio de restricción para las enzimas *NdeI* y *SaII* respectivamente. Las secuencias y características principales de los partidores son las siguientes:

Cat1: 5'- ACC atA TGA ACA GGC AAG CTA TC-3'

Largo: 23 nt

Tm: 66°C

En azul: sitio de restricción para la enzima *NdeI*.

En minúscula: nucleótidos no complementarios al gen *catA*.

Cat2: 5'- ACC AGG GTc GAC AGA TTC ATG C-3'

Largo: 22 nt

Tm: 68°C

En rojo: sitio de restricción para la enzima *SaII*.

En minúscula: nucleótidos no complementarios al gen *catA*.

2.12.4. Amplificación del gen *catA* mediante PCR.

El ADN genómico de LB400 fue diluido en amortiguador TE (100 mM Tris-HCl pH 7.4, 100 mM EDTA pH 8.0). 1 μ l de esta dilución se utilizó en la reacción de PCR como templado para el par de partidores Cat1/Cat2 complementarios a las regiones extremas del gen *catA*. La reacción de PCR se realizó en un volumen de 25 μ l utilizando amortiguador PCR 1X (GenLab), $MgCl_2$ 50 mM, los cuatro dideoxínucleótidos trifosfato en una concentración de 0,2 mM cada uno, cada partidor en una concentración de 0,5 μ M, 10% de dimetilsulfóxido, y 2,5 U de Taq polimerasa. El programa de PCR utilizado consta de una etapa de desnaturalización inicial de 5 min a 94°C. Después de este período se agregó la Taq polimerasa. Posteriormente, se realizaron 35 ciclos, cada uno de ellos consta de las siguientes etapas: desnaturalización de 45 seg a 94°C, apareamiento de 45 seg a 66°C y elongación de 1 min y 20 seg a 72°C. Posteriormente se realiza una elongación final de 10 min a 72°C.

Los productos amplificados por PCR se analizaron en geles de agarosa 1% preparado en amortiguador TAE 1X (Tris acetato 40 mM, EDTA 2mM pH 8,5) a 80 V durante 45 min. Como marcador de peso molecular se utilizó una escalera de 100 pb o de 1 kb. Para tefir los geles se incubaron en una solución 1 μ g/ml bromuro de etidio.

2.12.5. Ligación del gen *catA* con el vector de clonamiento TOPO TA.

Un volumen de 2 μ l del producto de la reacción de PCR se mezcló con 1 μ l del vector de clonamiento TOPO TA (Invitrogen), 1 μ l de solución salina (NaCl 1,2 M, $MgCl_2$ 0,06 M) y 1 μ l de agua desionizada y la mezcla se incubó por media hora a temperatura ambiente.

2.12.6. Transformación de células.

Los productos de ligación TOPO TA/*catA* y de ligación del vector de expresión pT7-7/*catA* se incorporaron a cepas de *E. coli* DH5 α y BL21(DE3), respectivamente. El método de transformación utilizado fue el de la electroporación. Para producir células electrocompetentes se creció la cepa de *E. coli* en 500 ml de medio LB durante toda la noche a 37°C hasta una D.O._{600nm} de 0,8 aproximadamente. Este cultivo se centrifugó durante 15 min a 3000 rpm y 4°C. El precipitado resultante se lavó tres veces con 30 ml de glicerol 10%. Posteriormente se resuspendió el precipitado en agua ajustando a una D.O._{600 nm} de 150 por ml. Las células electrocompetentes se guardan a -80°C en alícuotas de 20 μ l.

20 μ l de células electrocompetentes se mezclaron con 2 μ l de la reacción de ligación y se incubaron en hielo durante 5 min. Posteriormente, se colocó la mezcla en cámaras de microelectroporación (Life & Technologies) previamente enfriadas. Para la electroporación se utilizó una capacitancia de 330 μ F y una resistividad de 4 kOhm. Después de la electroporación las células se colocaron en una solución de recuperación (1 ml medio LB, 5 μ l de Mg⁺² 2 M, 5 μ l glucosa 2 M) y se incubó durante 1 hora a 37°C.

Para la obtención de clones recombinantes se plaqueó 100 μ l de las bacterias en recuperación y 100 μ l de estas mismas células previamente centrifugadas (concentradas). Se utilizaron placas de agar LB suplementadas con ampicilina 100 μ g/ml.

2.12.7. Análisis de clones recombinantes mediante PCR en colonia.

Con el objetivo de buscar entre los clones recombinantes aquellos que efectivamente poseían el vector TOPO TA con el gen *catA* insertado, se utilizó el método de PCR en colonia (Dra. Eugenia Jedlicki, comunicación personal) con los partidores Cat1 y Cat2 en las condiciones que se describieron anteriormente.

2.12.8. Digestiones con las enzimas de restricción *NdeI* y *SaI*.

Se realizó una extracción de ADN plasmidial de los clones de la cepa DH5 α que contienen el vector TOPO TA con el gen *catA*. 750 ng de este producto fue digerido con 12 U de la enzima de restricción *SaI* (GeneCraft, Alemania) en 16 μ l del amortiguador indicado para la enzima. Esta mezcla se incubó a 37°C durante cuatro horas. Posteriormente, se realizó una extracción con fenol:cloroformo:isoamílico (25:24:1, Winkler, Chile) y el ADN se precipitó con etanol (Merck, Alemania). El precipitado resultante se resuspendió en 60 μ l de amortiguador TE. Este ADN (440 ng) se digirió con 12,5 U de la enzima de restricción *NdeI* (Invitrogen, origen) en 8 μ l del amortiguador 1X indicado para la enzima. La mezcla se incubó durante 4 horas a 37°C.

El vector pT7-7 se trató con las enzimas *NdeI* y *SaI*. 3,3 μ g de ADN plasmidial se digirió con 10 U de la enzima *NdeI* (Invitrogen) y 16 μ l del amortiguador 1X indicado para la enzima. La mezcla se incubó durante seis horas a 37°C, luego se sometió a extracción y precipitación como se describió anteriormente. 2,2 μ g de este producto se digirió con 3,5 U de la enzima *SaI* y 5 μ l del amortiguador apropiado para esta enzima. La reacción se incubó durante 4 horas a 37°C.

2.12.9. Purificación del gen *catA* digerido con *NdeI* y *SaI*.

El producto de la digestión del gen *catA* con las enzimas *NdeI* y *SaI* se cargó en un gel de agarosa-cuyas características se indicaron anteriormente. Para rescatar el ADN desde el gel se utilizó el kit comercial QIA quick gel extraction kit (QIAGEN, USA). Se utilizó el protocolo indicado por el fabricante.

2.12.10. Ligación del gen *catA* en el plasmidio de expresión pT7-7.

10 μ l del vector pT7-7 (100 ng) se mezclaron con 10 μ l de inserto (200 ng) ambos digeridos con las enzimas *NdeI* y *SaI*. Se agregaron 2,4 μ l de la enzima T4 ligasa y 5,6 μ l del amortiguador adecuado para la enzima. Esta reacción se incubó durante 12 a 16 horas a 16°C. Para precipitar el producto de ligación se utilizaron dos volúmenes de etanol, 0,1 volumen de acetato de sodio y 1 μ l de una solución de glicógeno (5 mg/ml). Esta mezcla se incubó durante toda la noche a -20°C. Posteriormente se centrifugó durante 30 minutos a 14.000 rpm y 4°C. El precipitado se resuspendió en 15 μ l de agua desionizada estéril.

2.13. Análisis de la expresión del gen *catA*.

2.13.1. Obtención de muestra.

Los clones se crecieron en medio LB suplementado con ampicilina 100 μ g/ml en un agitador termorregulado a 37°C. Una vez alcanzada una D.O._{600nm} entre 0,6 y 0,7 se agregó IPTG en una concentración de 0,4 mM y las células se incubaron durante 2 h en las mismas condiciones mencionadas anteriormente. 2 ml de cada muestra se transfirieron a tubos Eppendorf previamente pesados y se centrifugaron a 10.000 rpm durante 10 minutos. Se descartó el sobrenadante y se determinó el peso húmedo de

bacterias. Luego se adicionaron 100 μ l de solución amortiguador de muestra (glicerol al 10% p/v, β -mercaptoetanol al 5% v/v, SDS al 2,3% p/v y Tris-HCl 0,0625 M pH 6,8) por cada 5 mg de bacteria húmeda. Se hirvieron las muestras a baño María por 5 minutos. En cada carril del gel se cargaron 10 μ l de esta muestra.

2.13.2. Geles de poliacrilamida-SDS.

La electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS se realizó según la técnica descrita por Laemmli (1970). Se utilizó un gel concentrador al 3% y un gel de corrida al 11% en poliacrilamida, en presencia de SDS al 0,1%. Se cargó 0,5 mg en base húmeda de cada muestra en los distintos carriles y 12 μ l de estándar de masa molecular para proteínas (SDS-PAGE Standard, low range, Bio-Rad). La electroforesis se corrió a 50 V por aproximadamente 16 h, hasta que el frente alcanzó el borde inferior del gel.

2.14. Medición de la actividad de la enzima catecol-1,2-dioxigenasa.

2.14.1. Extracción de muestra.

Los clones de *E. coli* BL21(DE3) que expresan el gen *catA* se crecieron en medio LB suplementado con ampicilina 100 μ g/ml. Las células se cultivaron a 25°C con agitación suave (50 rpm). Cuando los cultivos alcanzaron una D.O._{600 nm} entre 0,6 y 0,7 se agregó IPTG en una concentración de 0,4 mM con el objetivo de inducir el gen de la catecol-1,2-dioxigenasa, y se incubó por media hora. Posteriormente, las células se centrifugaron durante 10 minutos a 10.000 rpm y 4°C. El precipitado resultante se lavó varias veces con amortiguador Tris-acetato 50 mM pH 7,5 (Perez-Pantoja *et al.*, 2000). Las bacterias resuspendidas en 1 ml de amortiguador se sometieron a sonicación 5

veces durante 15 segundos con una potencia de 6 W. Luego se centrifugó la muestra durante 30 minutos a 14.000 rpm y 4°C. El sobrenadante corresponde al extracto crudo en el que se midió la actividad de la enzima catecol-1,2-dioxigenasa.

2.14.2. Medición de actividad.

Para la medición de actividad se utilizó como sustrato catecol, 3-clorocatecol y 4-clorocatecol en una concentración de 50 μM . En una cubeta de cuarzo se mezcló: 2,96 ml de amortiguador Tris-acetato 50 mM pH 7,5 (Perez-Pantoja *et al.*, 2000), la cantidad necesaria de sustrato en una concentración final de 50 μM y finalmente 60 μl de extracto crudo. Se realizó una cinética de la reacción midiendo la absorbancia a 260 nm. Se registró la pendiente de cada curva que representa la velocidad de aparición del compuesto 2-cloromuconato. Para normalizar la medición de actividad por mg de enzima se debió medir la concentración total de proteínas en el extracto crudo. Para ello se utilizó el método colorimétrico Bradford (Bradford, 1976; Stoscheck, 1990).

3. RESULTADOS

3.1. Capacidades degradativas de CBAs de *Burkholderia* sp. LB400.

Burkholderia sp. LB400 posee la vía superior de degradación de bifenilo, la que le permite degradar un amplio rango de PCBs (Haddock *et al.*, 1993; Seeger *et al.*, 1997, 1999; Amett *et al.*, 2000). Esta vía metaboliza los PCBs hasta el correspondiente clorobenzoato y el compuesto alifático lineal ácido 2-hidroxipenta-2,4-dienoico, el que continua siendo degradado hasta formar un compuesto capaz de entrar al ciclo de Krebs. De acuerdo al trabajo realizado por Seeger *et al.* tanto el 2-CB como el 4-CB son metabolizados por la cepa LB400 hasta 2-CBA y 4-CBA, respectivamente (Seeger *et al.*, 1995). Sin embargo, no se tiene conocimiento de que esta bacteria sea capaz de degradar estos CBAs.

Con el objetivo de determinar si esta bacteria posee la capacidad de metabolizar 2-CBA y 4-CBA, se realizó un seguimiento de la concentración de estos CBAs en un cultivo de la cepa LB400 expuesta a estos compuestos. Para detreminar la concentración de CBAs se utilizó un sistema HPLC con detector arreglo de diodos.

Se midió la concentración de estos compuestos a través del tiempo en cultivos de la cepa LB400 crecida en glucosa como fuente de carbono e incubada por diferentes tiempos con 2-CBA o 4-CBA. Las cinéticas muestran que la concentración de ambos compuestos permanece constante (Fig. 8). Esto nos indica que esta bacteria no es capaz de metabolizar 2-CBA y 4-CBA en las condiciones de cultivo utilizadas, y por lo tanto, corresponden a metabolitos finales de la vía de degradación de bifenilo.

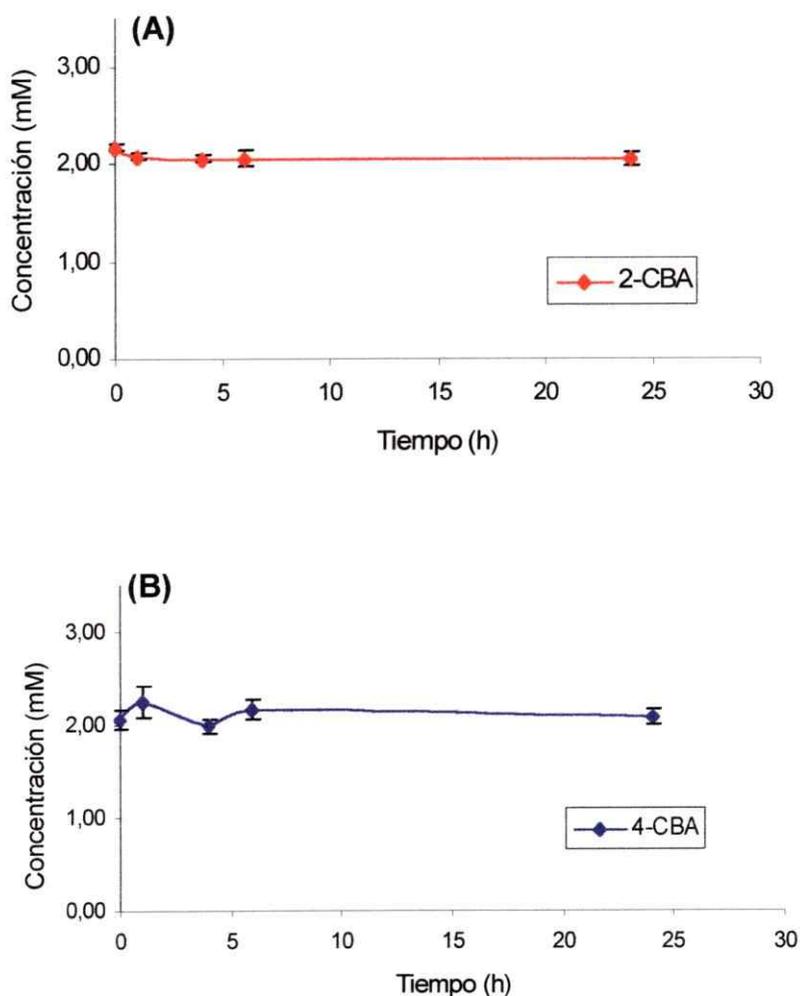


Figura 8. Estudio de degradación de 2-CBA o 4-CBA por la bacteria *Burkholderia* sp. LB400. La concentración de CBA se determinó mediante la utilización de HPLC. La bacteria crecida en medio mínimo M9 y glucosa fue expuesta a 2-CBA (A) o 4-CBA (B) 2 mM. Cada punto corresponde a tres experimentos independientes. Las barras representan la desviación estándar de cada punto.

Este resultado era esperado, ya que se ha descrito anteriormente que para la degradación completa de PCBs se necesitan vías metabólicas diferentes, una para la

transformación de los PCBs en CBAs y otra para la degradación de estos últimos compuestos (Sondossi *et al.*, 1992), las que normalmente no se encuentran en una misma bacteria (Brenner *et al.*, 1994).

3.2. Efecto de los CBAs sobre el crecimiento de *Burkholderia* sp. LB400.

Se investigó el efecto de 2-CBA y 4-CBA en una concentración de 2 mM sobre el crecimiento de la cepa LB400, mediante curvas de crecimiento. Para esto, la bacteria se creció hasta fase exponencial temprana utilizando glucosa como fuente de carbono, fue expuesta a uno de estos CBAs. Ambos compuestos afectan negativamente el crecimiento de la bacteria. Este efecto se refleja en una disminución de la pendiente de la fase exponencial de la bacteria y una D.O. menor en el valor máximo de crecimiento (Fig. 9A). La exposición a 4-CBA produce un efecto negativo más marcado comparado con el 2-CBA. Debido a esto, se estudió el efecto de la exposición a diferentes concentraciones de 4-CBA en cultivos de LB400. Se observó que el tipo de efecto negativo sobre el crecimiento se mantiene, pero se acentúa a medida que se aumenta la concentración de 4-CBA en el medio de cultivo (Fig. 9B).

Las curvas de crecimiento obtenidas nos permiten obtener una visión global de lo que ocurre en el cultivo. Para estudiar un posible efecto tóxico de los CBAs sobre LB400 se realizó la medición de las células viables de un cultivo de LB400 crecido previamente en glucosa hasta una fase exponencial temprana y expuesto a 2-CBA y 4-CBA en las concentraciones utilizadas en las curvas de crecimiento. Las unidades formadoras de colonias (UFC) se midieron a diferentes tiempos después de la exposición a 2-CBA y 4-CBA (Fig.10).

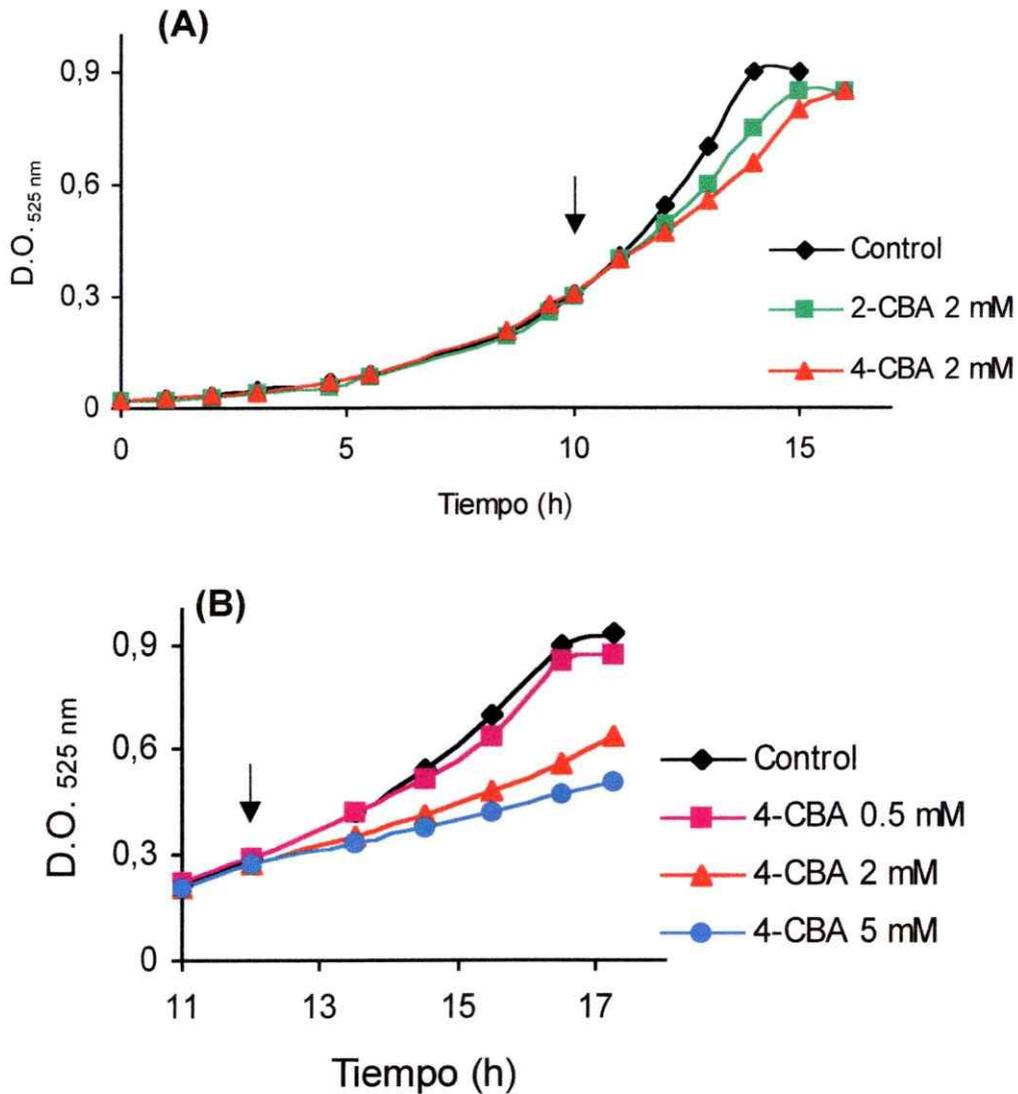


Figura 9. Efecto de 2-CBA o 4-CBA sobre el crecimiento de *Burkholderia* sp. LB400. La cepa LB400 fue crecida en medio mínimo M9 con glucosa como fuente de carbono. En el punto indicado con una flecha la cepa fue expuesta a: **(A)** 2-CBA (verde) o 4-CBA (rojo) 2 mM, **(B)** 4-CBA en una concentración de 0,5 mM (rosado), 2 mM (rojo) y 5 mM (azul). Los controles se indican en negro. Cada punto de las curvas es representativo de tres experimentos independientes.

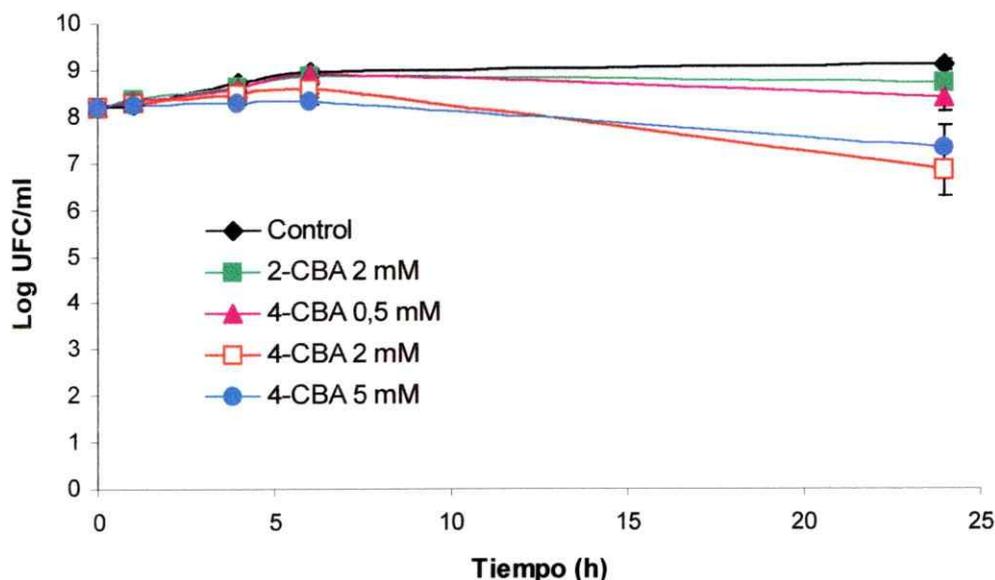


Figura 10. Efecto de 2-CBA y 4-CBA sobre la viabilidad de *Burkholderia* sp. LB400. La cepa LB400 crecida hasta fase exponencial temprana utilizando glucosa como fuente de carbono fue expuesta a: 2-CBA 2 mM (verde), 4-CBA en las concentraciones 0,5 mM (rosado), 2 mM (rojo), y 5 mM (azul). El control corresponde a un cultivo sin exposición (negro).

El compuesto 2-CBA en una concentración 2 mM, no produce ningún efecto sobre el número de células viables de LB400. El 4-CBA afecta en forma diferente en horas tempranas y tardías de exposición. A partir de las 4 horas de exposición a 4-CBA 5 mM se observa un leve efecto en la viabilidad celular. Sin embargo, los valores de UFC se mantienen dentro del mismo orden de magnitud en comparación con el control, por lo que no puede asegurarse que exista un efecto tóxico sobre las células. Sin embargo, después de 24 horas de exposición frente a concentraciones de 2 mM y 5 mM de 4-CBA se observan cambios más drásticos, disminuyendo aproximadamente en dos órdenes de magnitud la viabilidad de las células.

3.3. Respuesta molecular global de *Burkholderia* sp. LB400 frente a CBAs.

Las bacterias son capaces de responder a cambios en el medio y esta respuesta puede llevarse a cabo de diferentes maneras, pero esencialmente esta capacidad se basa en la habilidad que poseen las bacterias de modular la cantidad y actividad de sus proteínas. Existen numerosos estudios de la respuesta molecular global en bacterias expuestas a diferentes compuestos y condiciones ambientales diversas (Blom *et al.*, 1992; Gage y Neidhardt, 1993; Duché *et al.*, 2002). En el caso de LB400 existen algunos estudios de este tipo frente a PCBs (Seeger *et al.*, en preparación). Sin embargo, no han sido descritos estudios a nivel de expresión de proteínas frente a intermediarios de la degradación de CBs. En esta parte de la tesis se estudió la respuesta molecular global de la cepa LB400 frente a 2-CBA y 4-CBA, enfocándose principalmente a la respuesta frente a 4-CBA, debido al mayor efecto que este compuesto produce en el crecimiento de la bacteria.

Mediante electroforesis bidimensional en geles de poliacrilamida (NEPHGE) se analizó la expresión global de las proteínas de la cepa LB400 expuesta a 2-CBA y 4-CBA. Células en fase exponencial temprana se expusieron durante cuatro horas a estos compuestos. El tiempo de exposición frente a CBAs se escogió de acuerdo a los resultados obtenidos en las curvas de crecimiento (Fig. 9). Se observó que a las cuatro horas de exposición, estos compuestos producían un mayor efecto sobre el crecimiento de la cepa LB400. Para la identificación de proteínas se obtuvieron secuencias peptídicas de las proteínas que presentaron inducción o represión, mediante el uso herramientas bioinformáticas se identificó las proteínas seleccionadas. Los niveles de proteínas individuales en cada gel 2-D se cuantificaron mediante un programa computacional para el procesamiento de imágenes.

3.3.1 Respuesta del proteoma de *Burkholderia* sp. LB400 frente a 4-CBA y 2-CBA.

Los patrones de las proteínas totales de la cepa LB400 expuesta a 4-CBA o 2-CBA 2 mM se compararon con su control (Fig. 11).

En general, en presencia de 4-CBA se observó mayores cambios en los niveles de proteínas en comparación con los observados para el caso de 2-CBA. Este resultado podría relacionarse con el mayor efecto negativo en el crecimiento de la bacteria producido por el 4-CBA. A lo menos 12 proteínas se indujeron frente a la exposición a 4-CBA, las que se enumeraron en orden decreciente de acuerdo a su masa molecular. No se observó la represión de alguna proteína. De las doce proteínas, la proteína 10 es la que presenta una mayor inducción. Las proteínas restantes presentan un grado moderado de inducción, pero pueden ser observadas en los geles 2-D control como en los geles 2-D de bacteria expuesta 4-CBA.

La exposición a 2-CBA no produce un efecto drástico a nivel de expresión de proteínas en la bacteria. Cuatro proteínas son inducidas por la exposición a 2-CBA (proteínas 13, 14, 15 y 17) y al menos una proteína disminuyó su expresión (proteína 16).

Con el objetivo de realizar una comparación de la respuesta molecular de LB400 frente a distintas concentraciones de 4-CBA se realizaron geles 2-D de las proteínas totales de LB400 expuesta a 0,5 mM y 5 mM de 4-CBA. Estas concentraciones ya se habían utilizado para los estudios de crecimiento y viabilidad de LB400 frente a 4-CBA.

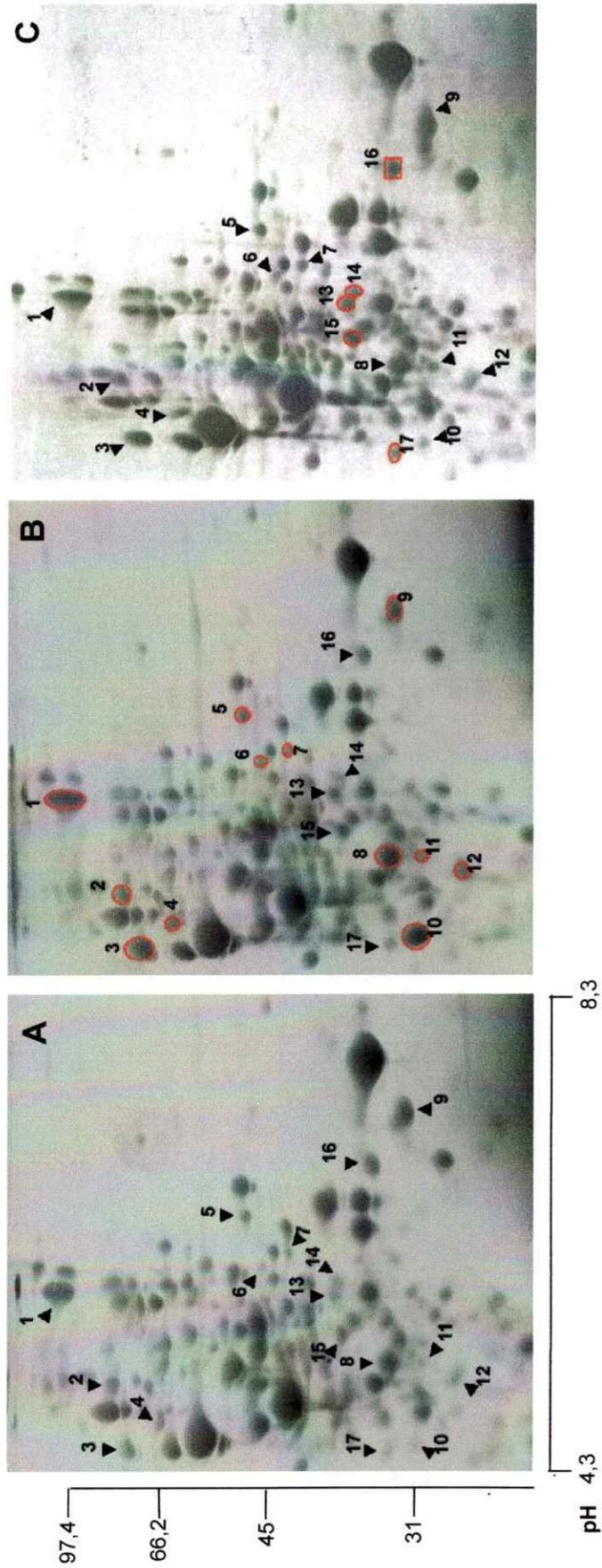


Figura 11. Efecto de 4-CBA y 2-CBA en el patrón de expresión de proteínas de *Burkholderia* sp. LB400. Las proteínas totales de la cepa LB400 se separaron por electroforesis bidimensional (pH 3 a 10). Las células se crecieron en medio mínimo M9 utilizando glucosa como fuente de carbono hasta fase exponencial temprana y se incubaron durante 4 horas en ausencia (A) o presencia de 4-CBA 2 mM (B) o 2-CBA 2 mM (C). Las proteínas estudiadas se indican con flechas. Las proteínas inducidas están señaladas por círculos, mientras que la reprimida está señalada en rectángulo. Este análisis está basado en al menos cinco geles de cada condición.

En la exposición de la cepa LB400 a 4-CBA 0,5 mM se observó la inducción de al menos ocho proteínas (proteínas 1, 3, 4, 8, 9, 10, 11 y 12). Mientras al exponer la cepa LB400 a 4-CBA 5 mM se observó la inducción de al menos siete proteínas (proteínas 1, 2, 3, 4, 7, 10 y 12). En ambos casos las proteínas observadas como inducidas habían sido detectadas anteriormente en los patrones de expresión de proteínas frente a 4-CBA 2 mM.

La Tabla 3 muestra la inducción (Intensidad x mm²) para cada una de las proteínas inducidas por LB400 frente a la exposición a 4-CBA 2 mM en comparación al control. Por ejemplo, un valor de 2 indica que la proteína se encuentra dos veces inducida con respecto al control.

Tabla 3. Inducción relativa de las proteínas seleccionadas a partir de geles 2-D con exposición a 4-CBA 2mM.

Proteína N°	Inducción ^{a,b} Relativa	Proteína N°	Inducción ^{a,b} Relativa
1	1,7 ± 0,14 ^c	7	1,9 ± 0,22
2	2,0 ± 0,18	8	1,6 ± 0,13
3	1,9 ± 0,34	9	2,9 ± 0,72
4	1,6 ± 0,15	10	5,6 ± 1,10
5	2,1 ± 0,37	11	1,7 ± 0,08
6	1,6 ± 0,16	12	2,3 ± 0,32

^a Inducción relativa corresponde al cociente entre las densidades de cada proteína frente a 4-CBA 2mM y su control.

^b Los valores presentados en la tabla son representativos de al menos tres experimentos.

^c Valor de la desviación estándar asociado para cada inducción relativa.

3.3.1.1. Identificación de proteínas inducidas frente a 4-CBA.

Se obtuvo la secuencia amino-terminal de diez de las doce proteínas inducidas en la cepa LB400 expuesta a 4-CBA 2 mM. Dos de estas doce proteínas presentaron su amino terminal bloqueado. Estas proteínas corresponden a la proteína identificada como número 2 y 9.

Con las secuencias obtenidas, se realizó una búsqueda en la base de datos del genoma de LB400 que se encuentra en construcción por el U.S. Department of Energy (DOE) (www.JGI.doe.gov). Para confirmar los resultados de identificación se realizó una búsqueda en la base de datos del European Bioinformatics Institute (EBI) utilizando la secuencia aminoacídica completa de cada proteína previamente obtenida en la base de datos de DOE. Mediante el alineamiento con proteínas descritas en otros organismos, se obtuvo la identificación y mayor identidad de las proteínas. La Tabla 4 resume los resultados obtenidos de la identificación de proteínas y algunas de sus características.

Dentro de las proteínas identificadas se pueden destacar las manchas 3 y 4 que corresponden a las chaperonas DnaK y HtpG, respectivamente. Ambas corresponden a proteínas de estrés térmico. Se ha observado su sobreexpresión frente a distintos cambios ambientales, incluyendo la exposición a diferentes compuestos aromáticos (Gage y Neidhardt, 1993; Lambert *et al.*, 1997; Duché *et al.*, 2002). La proteína 10, que presenta una fuerte inducción en geles de exposición a 4-CBA 2 mM y 5mM, fue identificada como una catecol-1,2-dioxigenasa. Esta proteína corresponde a la primera enzima de la vía degradativa del catecol, compuesto que a su vez puede derivar de la transformación del benzoato. La proteína número 12 corresponde a la enzima BphB, que pertenece a la vía superior de degradación de bifenilo. No se ha descrito que metabolitos finales de esta vía superior de bifenilo pudieran inducir sus enzimas.

TABLA 4. Identificación de proteínas inducidas en presencia de 4-CBA.

Proteína Nº	Método de secuenciación	Secuencia peptídica	Estimación ^a		Identificación	Identidad ^b (%)
			Masa Molecular (kDa)	pI		
1	N-terminal	NLHKTLEKFDXGXGKGFYXXP	98	6,5	Aconitato hidratasa	<i>Deinococcus radiodurans</i> (82)
2	ESI-Q-TOF	VYSGVNSGDTVYQGLK LMFPEPVL SAGAVEPK	78	5,3	EF-G	<i>Ralstonia Solanacearum</i> (86)
3	N-terminal	GKIIGIDLGTNSCVAIMEGNSVK	70	4,7	DnaK	<i>B. pseudomallei</i> (92)
4	N-terminal	SQETMSFQAEVKQLLHLMIDX	72	4,9	HtpG	<i>Ralstonia solanacearum</i> (74)
5	N-terminal	MRLIQTALTFDDVLLVPAFSDVLP	52	7,1	IMP deshidrogenasa	<i>Ralstonia solanacearum</i> (78)
6	N-terminal	AIPSYDTRLLINGEXDAA	51	6,9	Succinato-semialdehído DH	<i>Pseudomonas syringae</i> (62)
7	N-terminal	MQYRSLGSDVQVSLIGLGMTX	39	6,9	Oxidoreductasa TAS	<i>Vibrio parahaemolyticus</i> (62)
8	N-terminal	AKPAKRVAVTGAAGQIAYSLLFRIA	35	5,8	Malato deshidrogenasa	<i>Aquasillum articum</i> (73)
9	ESI-Q-TOF	AFFMDDALT ESSLPASPAAMLSDLGLVQ	34 ^d	8,2 ^d	No identificada	_____
10	N-terminal	MNRQAIDALLQKINDSAIHAGNPRT	33	4,9	Catecol-1,2-dioxigenasa	<i>Frateuria sp. ANA-18</i> (94)
11	N-terminal	DRYTVLGADALXVSELIPYA	33 ^d	5,8 ^d	No identificada ^c	_____
12	N-terminal	MGLKGEAVLITGGASGLGRA	29	5,1	BphB	<i>Burkholderia sp. LB400</i> (100)

^a Estimación realizada ingresando la secuencia peptídica completa de cada mancha (base de datos del JGI, U.S. DOE) en el programa pepident del EBI.

^b Búsqueda realizada mediante alineamientos contra en la base de datos del EBI mediante el programa FASTA.

^c Secuencia amino terminal no encontrada en la base de datos en construcción de la cepa LB400 (JGI, U.S. DOE).

^d Valores estimados a partir de la posición de la proteína en el gel

Entre las proteínas restantes se pueden encontrar enzimas pertenecientes al ciclo de Krebs y al metabolismo celular en general. De las diez proteínas analizadas sólo la secuencia de la proteína 11 no fue encontrada en el genoma en construcción de la cepa LB400. Por lo tanto, para su identificación se utilizó su secuencia amino-terminal en la base de datos del EBI.

Como ya se mencionó las proteínas número 2 y 9 presentaron su extremo amino-terminal bloqueado, por lo que se decidió analizarlas mediante espectrometría de masa de alta resolución ESI-Q-TOF (Fig. 12 y 13). Las manchas correspondientes a estas proteínas fueron extraídas a partir de geles, digeridas con tripsina y purificadas para poder inyectar la muestra en un equipo ESI-Q-TOF (Heim *et al.*, 2002).

Los espectros de diferentes péptidos se obtuvieron junto con las probables secuencias de cada uno. La proteína número 2 fue identificada como el factor de elongación G perteneciente a la maquinaria traduccional de proteínas en bacterias. Mientras que la proteína número 9, no pudo ser identificada mediante las bases de datos utilizadas (Tabla 4).

3.3.1.2. Identificación de proteínas inducidas/ reprimidas en presencia de 2-CBA.

Se obtuvo la secuencia amino-terminal de las proteínas seleccionadas a partir de geles bidimensionales. Las secuencias se analizaron mediante herramientas bioinformáticas de la misma manera que se realizó la identificación de las proteínas provenientes de los geles bidimensionales frente a 4-CBA. Los resultados obtenidos en la identificación de las proteínas se resume en la Tabla 5. La secuencia que corresponde a la proteína 15 no fue encontrada dentro del genoma en construcción de LB400. La proteína 16 presentó un valor de incerteza muy elevado, por lo tanto, no se reportó

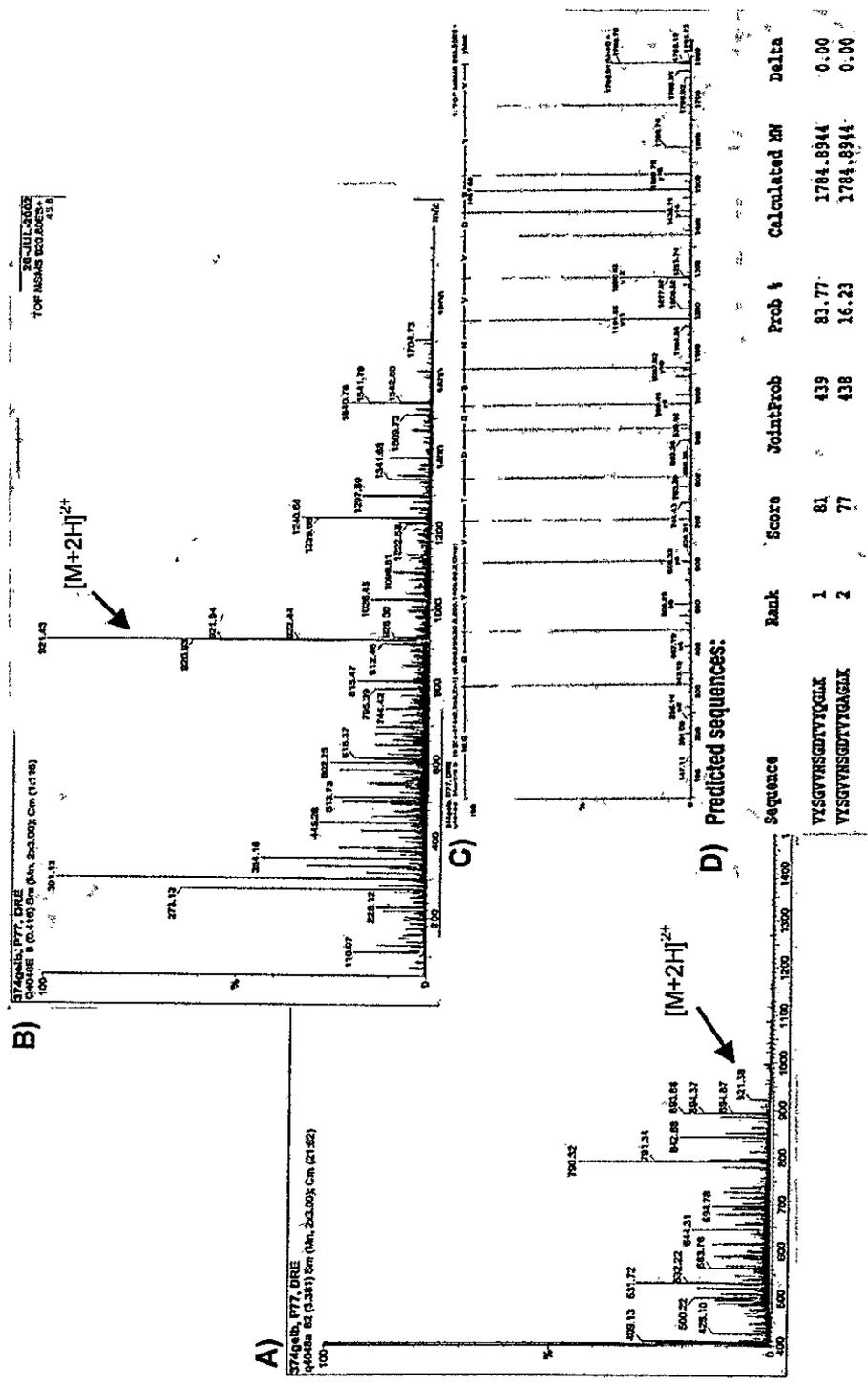


Figura 12. Análisis de la proteína número 2 mediante ESI-Q-TOF MS/MS. A) Espectro MS producido por la proteína 2, se seleccionó el ión parental con un m/z 920,8 para revisar su fragmentación. B) Espectro MS del ión parental 920,8 C) Espectro MS/MS del ión parental 920,8 D) Probables secuencias peptídicas del ión parental 920,8.

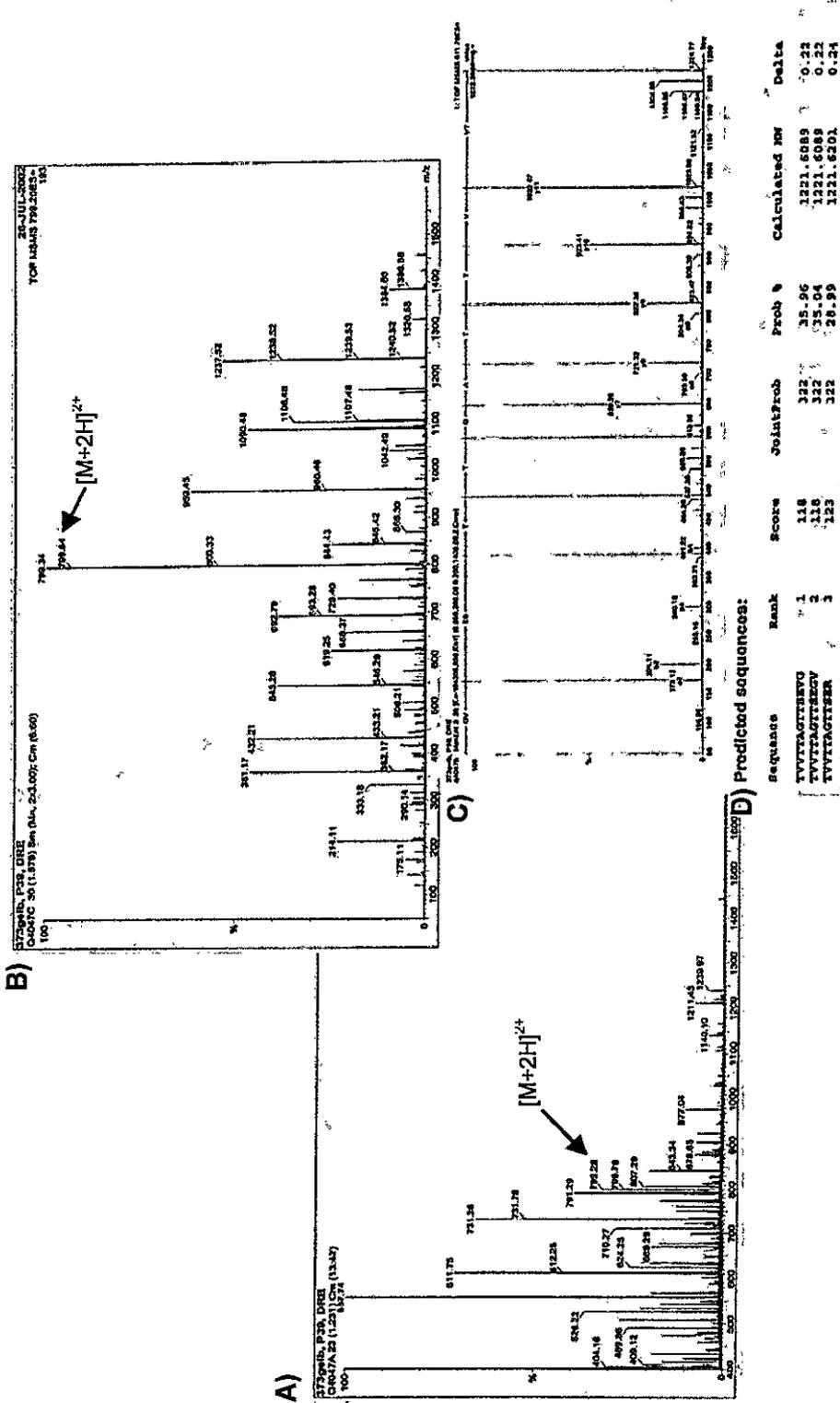


Figura 13. Estudio de la proteína número 9 mediante ESI-Q-TOF MS/MS. A) Espectro MS producido por la proteína 9, se seleccionó el ion parental con un m/z 799,2 para revisar su fragmentación. B) Espectro MS del ion parental 799,2. C) Espectro MS/MS del ion parental 799,2. D) Probables secuencias peptidicas del ion parental 799,2.

TABLA 5. Identificación de proteínas inducidas/reprimidas en presencia de 2-CBA.

Proteína Nº	Secuencia peptídica	Estimación ^a		Identificación	Similitud ^b (%)
		Masa molecular (kDa)	pI		
13	MLLLNPGVTLTERVRNS LLQTDL	39	6,6	2-aminoetilfosfonato transferasa (PhnV)	<i>Vibrio cholerae</i> (38)
14	SMADRDGKIXMDGKLIDX RDAKIQ	34	6,4	Probable amino transferasas	<i>Ralstonia solanacearum</i> (77)
15	SQPDITIADEXGTGSA ^c	37 ^e	5,8 ^e	No identificada	_____
16	MQTKAA IARGAGAPIDTEE ^d	34 ^e	7,4 ^e	No identificada	_____
17	TNLVIAEHDNTSIKAA TLNTYAAAQXI	32	4,8	Probable flavoproteína electron transferasa	<i>Ralstonia solanacearum</i> (79)

^a Calculados con la secuencia peptídica completa utilizando la herramienta pepident del Instituto Europeo de Bioinformática (EBI).

^b Identidad determinada utilizando la herramienta FASTA del Instituto Europeo de Bioinformática (EBI).

^c Secuencias no encontradas en la página en construcción del genoma de *Burkholderia* sp. LB400.

^d Secuencia con valor de incerteza (e-value) demasiado alto.

^e Valores determinados a partir de la posición de la proteína en el gel.

como identificada. La secuencia amino terminal de la proteína 15 se utilizó para realizar la búsqueda en la base de datos del EBI.

En general, se puede decir que las proteínas identificadas corresponden a proteínas relacionadas con el metabolismo de la bacteria. Las proteínas 13 y 14 fueron identificadas como amino transferasas, las que participan en la síntesis de diversos aminoácidos. Por otra parte, se pudo identificar la proteína 17 como una probable subunidad alfa de una flavoproteína de transferencia de electrones. No se identificó ninguna proteína relacionada con estrés bacteriano en este grupo de proteínas.

3.4. Clonamiento de la enzima catecol-1,2-dioxigenasa de LB400.

De acuerdo a los resultados obtenidos mediante geles 2-D, se observó que frente a la exposición a 4-CBA *Burkholderia* sp. LB400 expresa fuertemente una CDO. Según los análisis realizados para su identificación (Tabla 4), esta enzima presenta una alta similitud con la isoenzima CatA2 de la bacteria *Frateuria* sp. ANA-18 (Murakami *et al.*, 1999).

Se han descrito catecol-1,2-dioxigenasa bacterianas que se inducen en presencia de compuestos como benzoato e incluso algunos CBAs (Giuffrida *et al.*, 2001, Suzuki *et al.*, 2002). Pero a diferencia de la cepa LB400 estas dioxigenasas pertenecen a microorganismos degradadores naturales de este tipo de compuestos. El cuarto objetivo específico de esta tesis fue el estudio de la enzima catecol-1,2-dioxigenasa. El genoma en construcción de la bacteria *Burkholderia* sp. LB400 indica que esta bacteria posee además la enzima clorocatecol-1,2-dioxigenasa y la enzima protocatecuato-1,2-dioxigenasa, por lo tanto, para estudiar específicamente la actividad de la enzima catecol-1,2-dioxigenasa no se puede utilizar la cepa silvestre *Burkholderia* sp. LB400, ya que la presencia de estas otras dos enzimas no permite hacer distinción

entre sus actividades en un extracto crudo de proteínas. Se propuso clonar el gen que codifica para esta enzima en la cepa LB400, denominado gen *catA*, y estudiar la actividad de esta enzima expresada en *E. coli*.

3.4.1. Análisis bioinformático.

Utilizando herramientas bioinformáticas se realizaron algunos análisis de la enzima catecol-1,2-dioxigenasa de la cepa LB400 para obtener información que puede resultar útil para el estudio de esta enzima aún no descrita.

Se realizó un alineamiento múltiple de la secuencia aminoacídica de la enzima CDO de la cepa LB400 y las secuencias aminoacídicas de (cloro)catecol-1,2-dioxigenasas que se encuentran disponible en la base de datos del GeneBank. Para ello se utilizó el programa ClustalW disponible en la página del EBI (www.ebi.ac.uk). El dendrograma obtenido se muestra en la Figura 14.

En general, la CDO de *Burkholderia* sp. LB400 se encuentra en un cluster apartado de la mayoría de las enzimas CDO descritas. Las enzimas de mayor similitud a la CDO de la cepa LB400 corresponden a la isoenzimas *CatA2* de las bacterias *Frateuria* sp. ANA-18, *Acinetobacter lwoffii* K24 y *Burkholderia* sp. TH2. Se ha observado que la isoenzima *CatA2* de la cepa TH2 es inducida en presencia de BA o 2-CBA.

Con el objetivo de encontrar otros genes pertenecientes a la vía *orto* de degradación del catecol, se buscó los genes contiguos al gen *catA* de la cepa LB400, utilizando la base de datos en construcción del genoma de esta bacteria. Allí se

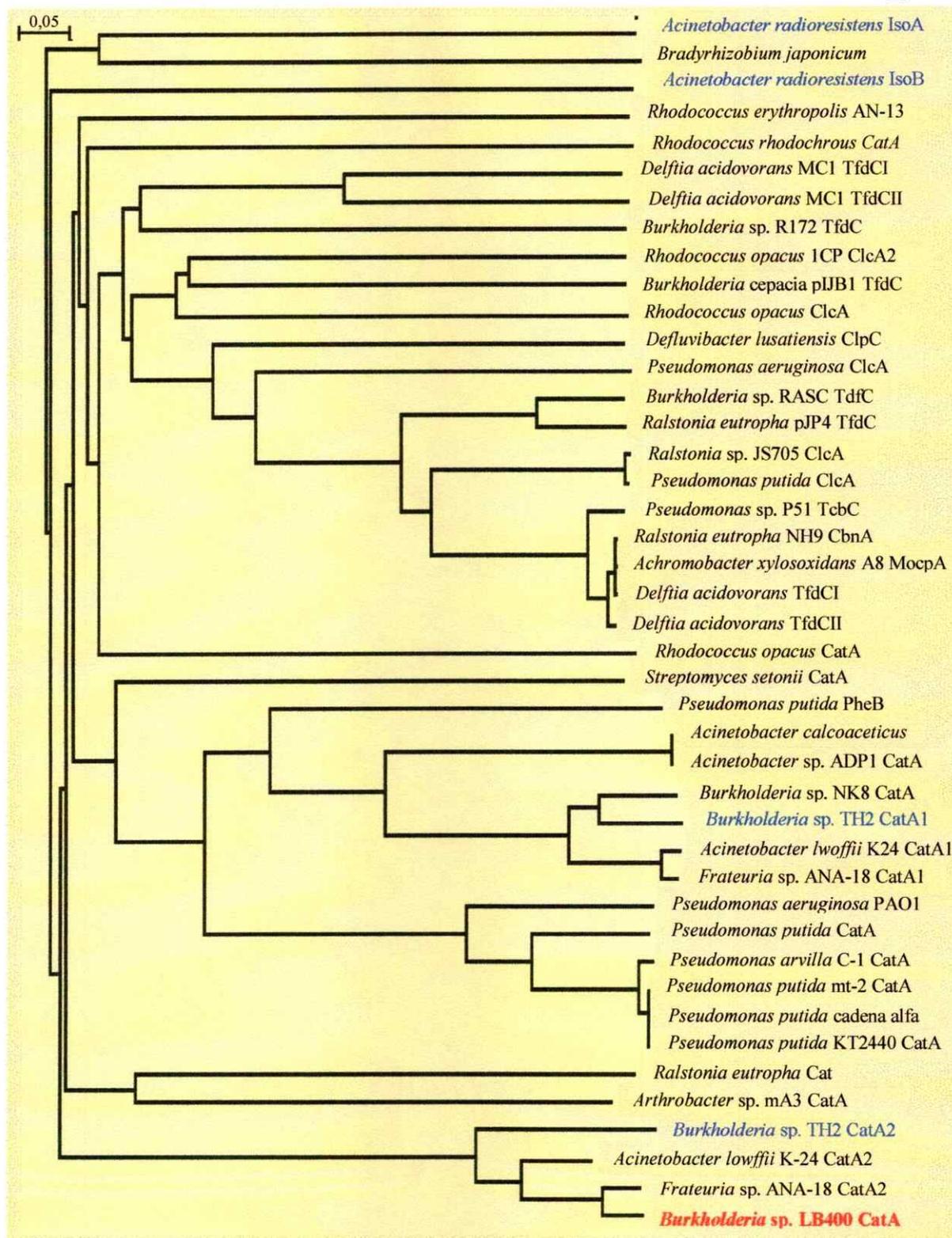


Figura 14. Dendrograma del alineamiento de la secuencia peptídica de la enzima catecol-1,2-dioxigenasa de la cepa LB400. La secuencia de aminoácidos de la enzima CatA de la cepa LB400 (rojo) fue comparada con las secuencias peptídicas de las (cloro)catecoles-DO existentes en el GeneBank utilizando el programa ClustaIW. Las cepas en las que se ha observado inducción de la enzima catecol-1,2-dioxigenasa en presencia de BA o CBA citadas en este trabajo se muestran en azul.

encontró el gen *catR* que codifica para el regulador transcripcional de la vía, el gen *catB* que codifica para la muconato cicloisomerasa y el gen *catC* que codifica para la muconolactona delta-cicloisomerasa. CatR es un regulador perteneciente a la familia de reguladores Lys-R. La Figura 15 muestra la distribución que estos genes tendrían, incluyendo el gen *catA*, en el genoma de la cepa LB400.

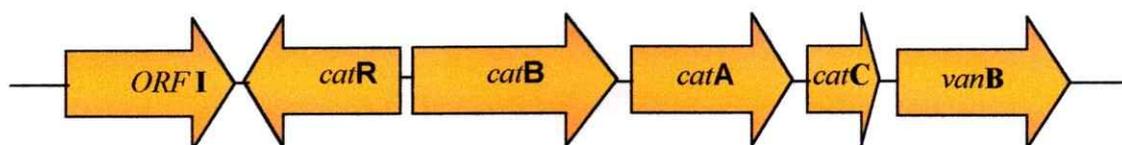


Figura 15. Organización de los genes *cat* en el genoma de la cepa LB400. El sentido de las flechas indica la dirección de la transcripción de los genes.

Se buscó río arriba y río abajo de los genes *catR* y *catC*, respectivamente, para determinar los genes que estarían flanqueando el conjunto de genes *cat* en la cepa LB400 (Fig. 15). Río arriba del gen regulador se encontró un marco de lectura abierta, denominado ORF I, que codificaría para un probable regulador transcripcional perteneciente a la familia de reguladores Lys-R. Este regulador podría corresponder a un regulador global de la transcripción de la vía. Sin embargo, no se pudo obtener mayor información sobre este gen en las bases de datos del DOE y EBI. Mientras que río abajo del gen *catC* se encontró un gen que codifica para la vanilato-o-demetilasa oxidoreductasa (VanB), una proteína perteneciente a la familia de las ferredoxinas-NADPH-reductasas.

La distribución y dirección de los genes *cat* en la cepa LB400 es similar a la que poseen las regiones donde se encuentran las isoenzimas CatA2 en las bacterias *Acinetobacter lwoffii* K24 y *Burkholderia* sp. TH2. Con respecto a los genes que flanquean los genes *cat*, río abajo del gen *catC* en las cepas ANA-18 y TH2 se ha reportado que existen ORFs que codifican un componente de la enzima VanB y una

flavoheproteína, respectivamente. Este resultado es similar a lo obtenido para la cepa LB400.

3.4.2. Amplificación del gen *catA* de *Burkholderia* sp. LB400 mediante PCR.

Para amplificar el gen *catA* se diseñó un par de partidores específicos a partir de la secuencia génica disponible en la base de datos en construcción para LB400 del DOE.

Para la obtención del gen *catA* se purificó el ADN genómico de la bacteria y una dilución de este ADN, se utilizó como templado en la reacción de PCR. Se probaron distintos programas para determinar la temperatura óptima de hibridación de los partidores. Se decidió utilizar una temperatura bastante cercana a la T_m de los partidores (66°C), ya que no se observan productos no específicos y además se observa una alta cantidad de amplificado (Fig. 16).

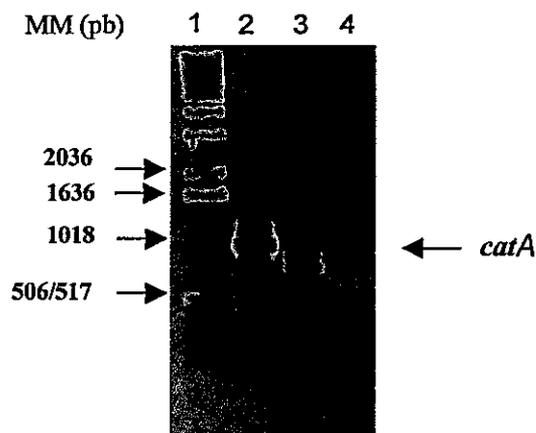


Figura 16. Amplificación mediante PCR del gen *catA* de *Burkholderia* sp. LB400. El producto de PCR amplificado utilizando los partidores Cat1 y Cat2 se muestra en el carril 2. Las reacciones de control de amplificación específica, se realizaron eliminando el partidor Cat1 (carril 3) o el partidor Cat2 (carril 4) de la mezcla de reacción. El carril 1 corresponde a los estándares de masa molecular 1 kb DNA Leader.

3.4.3. Clonamiento del gen *catA* en vectores.

El DNA del gen *catA* amplificado por PCR fue ligado al vector de clonamiento TOPO TA (Invitrogen). Este producto de ligación se introdujo en la cepa de *E.coli* DH5 α , recomendada para el vector. Se aislaron cuatro colonias en una placa suplementada con antibiótico. Posteriormente, la presencia del gen *catA* se confirmó mediante PCR de colonia. La Figura 17 muestra el resultado del PCR donde se observó que los cuatro clones aislados contenían el gen *catA*.

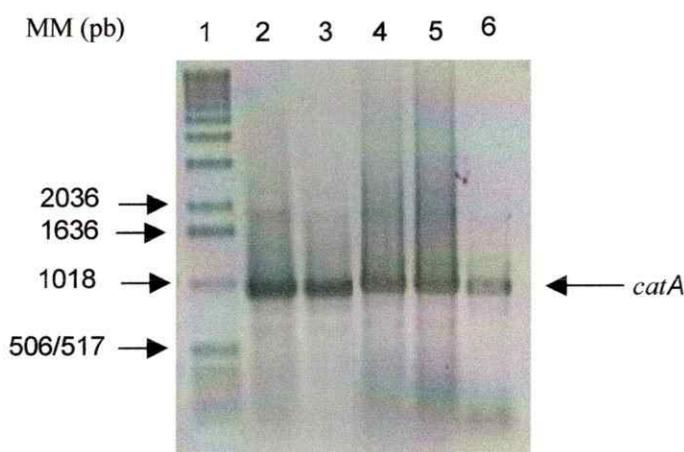


Figura 17. Análisis de clones mediante PCR de colonia de la cepa *E.coli* DH5 α que contiene el gen *catA* de la cepa LB400 inserto en el vector TOPO TA. Los carriles 2 al 5 corresponden a los clones positivos para el gen *catA* de la cepa LB400 que fue insertado en el vector de clonamiento TOPO TA (Invitrogen). El carril 6 corresponde al control positivo, gen *catA* amplificado desde LB400. El carril 1 corresponde a los estándares de masa molecular.

De estos cuatro clones se seleccionó en forma aleatoria el clon 1 para estudios posteriores. Como se indicó anteriormente en **Materiales y Métodos**, a los partidores Cat1 y Cat2 se les incorporó los sitios de restricción para las nucleasas *NdeI* y *SaII*, respectivamente. Estas enzimas se utilizaron para extraer el gen *catA* desde el vector TOPO TA proveniente del clon 1, realizando digestiones en forma separada. Al utilizar la enzima *SaII* se obtuvo la forma lineal y el tamaño esperado del vector TOPO TA que

contenía el gen *catA*. Luego de la digestión con *NdeI* se obtuvo un producto de aproximadamente 1kb, que corresponde al gen *catA* (Fig. 18).

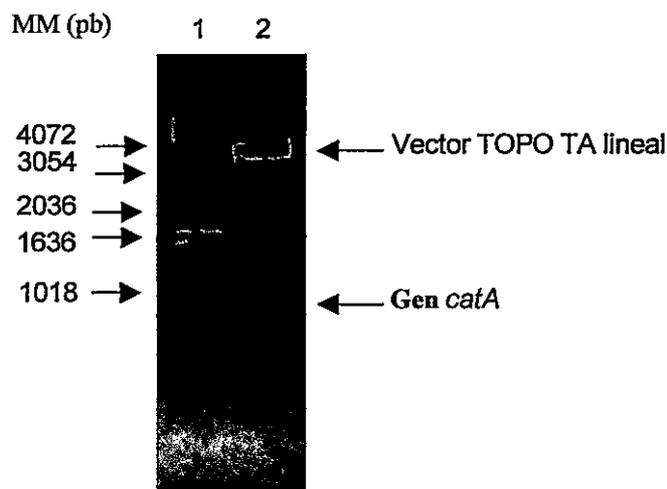


Figura 18. Estudio del gen *catA* extraído desde el vector TOPO TA con las enzimas *NdeI* y *Safl*. En el carril 2 se muestra las bandas correspondientes al vector TOPO TA linealizado y el gen *catA* de la cepa LB400 liberado desde el vector (indicadas por flechas). El carril 1 corresponde al estándar de masa molecular.

El gen *catA* liberado desde el vector de clonamiento fue extraído a partir de un gel de agarosa y ligado al vector de expresión pT7-7 (Tabor y Richardson, 1985), este producto de ligación se introdujo en la cepa de *E. coli* BL21, cepa contiene la RNA polimerasa del fago T7 en forma lisogénica en el cromosoma bacteriano bajo un promotor inducible con IPTG. Esta RNA polimerasa transcribe cualquier gen que esté bajo el control del promotor de la RNA polimerasa del fago T7. Este promotor se encuentra en el vector de expresión pT7-7 donde se ligó el gen *catA*. Se aislaron 60 colonias y se enumeraron al azar y en orden correlativo. Una vez aislados los 60 clones, se confirmó la presencia del gen *catA* mediante PCR de colonia con los partidores Cat1 y Cat2. De los sesenta clones analizados se observaron 17 clones positivos en la reacción de PCR que contienen el gen *catA* de la cepa LB400 (Fig. 19).

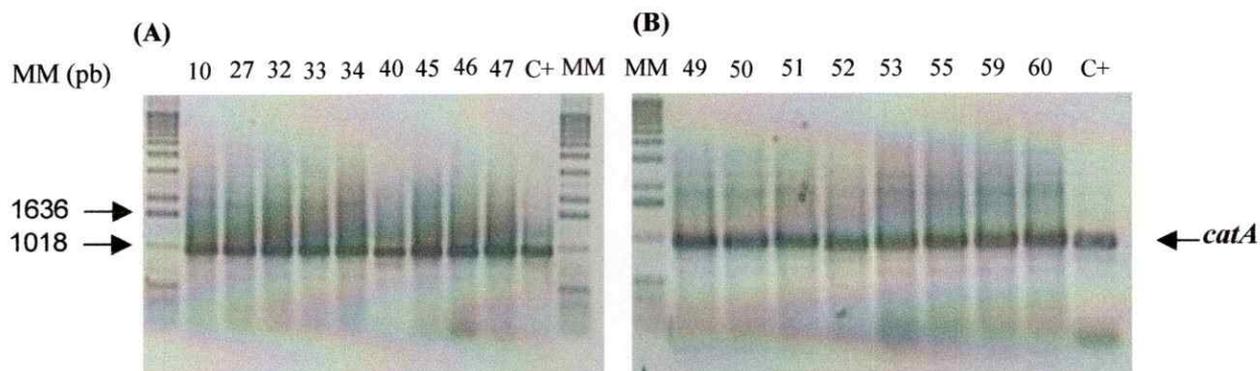


Figura 19. Análisis mediante PCR en colonia de la presencia del gen *catA* de la cepa LB400 en clones de *E.coli*. Los números sobre cada carril indican el clon analizado mediante PCR utilizando los partidores Cat1 y Cat2. C+: control positivo, que corresponde a la amplificación del gen *catA* a partir del ADN genómico de la cepa LB400 utilizando los partidores Cat1 y Cat2. MM: estándar de masa molecular.

3.5. Expresión heteróloga de la enzima catecol-1,2-dioxigenasa.

Teniendo identificados los clones que contenían el gen *catA* de la cepa LB400, se utilizó la técnica de electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS para determinar los clones que expresaban la enzima CDO. Los clones fueron crecidos en medio LB suplementado con ampicilina hasta fase exponencial y el sistema de expresión del plasmidio pT7-7 se indujo con IPTG. Se cargó 0,5 mg de proteínas en base húmeda en cada carril. De los 17 clones analizados sólo en los carriles de los clones 32 y 55 se obtuvo una banda de proteína inducida (Fig. 20), que de acuerdo a su masa molecular mediante un estándar correspondería a la enzima catecol-1,2-dioxigenasa. La Figura 20 muestra los geles de poliacrilamida-SDS obtenidos para los clones 32 y 55 inducidos. En la misma figura se muestra el resultado obtenido para el clon 10 que no presenta inducción de la enzima CDO en presencia de IPTG. Como control negativo se utilizó la bacteria *E.coli* BL21(DE3). Se muestran además los clones 10, 32 y 55 sin inducción con IPTG.

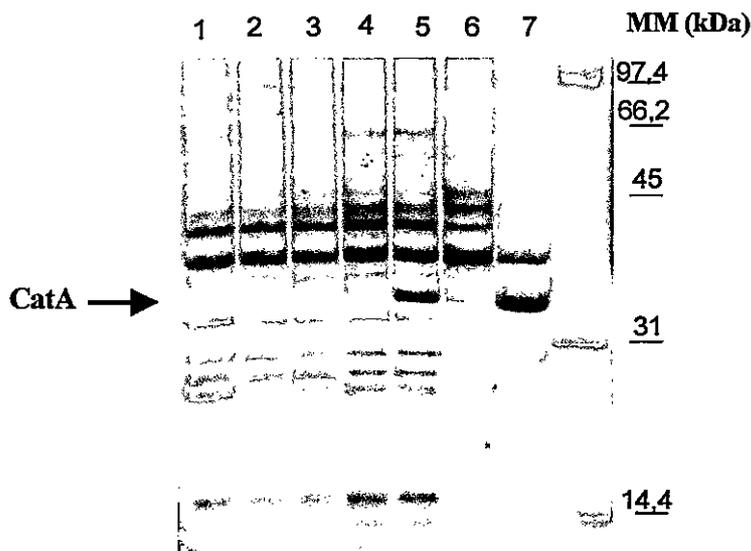


Figura 20. Análisis de la expresión heteróloga de la catecol-1,2-dioxigenasa. Utilizando geles de poliacrilamida-SDS se analizó la inducción mediante IPTG de la enzima catecol-DO de las cepas BL21(DE3) de *E. coli* que poseían clonado el gen *catA*. Carriles 1 y 8, estándares de masa molecular. Carril 2, control negativo que corresponde a *E. coli* BL21(DE3). Carriles 3 y 6, clon 10 y clon 55 respectivamente, sin inducción con IPTG. Carriles 4, 5 y 7: clones 10, 32 y 55 respectivamente, inducidos con IPTG.

3.6. Actividad de la enzima catecol-1,2-dioxigenasa.

Los clones 32 y 55 que presentaron inducción en presencia de IPTG fueron seleccionados para realizar la medición de actividad de la enzima catecol-1,2-dioxigenasa codificada por el gen *catA*. Para ello se estudió la actividad de la enzima midiendo la aparición del producto *cis,cis*-muconato. Como sustrato se utilizó catecol, 3-clorocatecol y 4-clorocatecol. El catecol corresponde al sustrato natural de la enzima. A pesar de que los catecoles clorados no son atacados fuertemente por esta enzima, se ha observado que pueden ser metabolizados (Kim *et al.*, 1997; Suzuki *et al.*, 2002).

Se determinó la actividad de CDO en extracto crudo de proteínas de los clones 32 y 55. Como control positivo se utilizó la bacteria *Ralstonia eutropha* JMP134 (pJP4) (Pieper *et al.*, 1988; Clement *et al.*, 1995). Esta cepa posee los genes *tdf*, los que

codifican las enzimas necesarias para el metabolismo de (cloro)catecoles (Perez-Pantoja *et al.*, 2000). Como control negativo se utilizó la cepa de *E. coli* BL21 (DE3) que no posee los genes para la degradación de (cloro)catecoles. La Tabla 6 muestra los datos obtenidos.

Tabla 6. Medición de la actividad de la enzima catecol-1,2-dioxigenasa de LB400 en *E. coli*.

		Actividad enzima catecol-1,2-DO (U/ mg de proteínas)			
Cepa	Sustrato	<i>E.coli</i> BL21(DE3) Control (-)	<i>Ralstonia eutropha</i> JMP134 Control (+)	<i>E.coli</i> BL21(DE3) clon32	<i>E.coli</i> BL21(DE3) clon55
	Catecol	0	0,285	0	0
	4-clorocatecol	0	0,036	0	0
	3-clorocatecol	0	0,019	0	0

Como se puede observar, los clones 32 y 55 no presentaron actividad de la enzima CDO. Diversas proteínas foráneas altamente expresadas en *E. coli* se agregan y forman cuerpos de inclusión (Marston, 1986; Kane y Hartley, 1988). Se analizó la formación de cuerpos de inclusión mediante geles de poliacrilamida-SDS. Cultivos de los clones 32 y 55 crecidos hasta fase exponencial, se incubaron con IPTG durante 2 horas para lograr la sobreexpresión de la enzima CDO. Luego de esta incubación, los clones fueron tratados con el mismo protocolo de preparación de muestra indicado para la medición de actividad enzimática. Luego de centrifugar las muestras sonicadas,

tanto al precipitado como al sobrenadante se les agregó amortiguador de muestra para desnaturalizar las proteínas. Estas muestras fueron cargadas en un gel de poliacrilamida-SDS (Fig. 21).

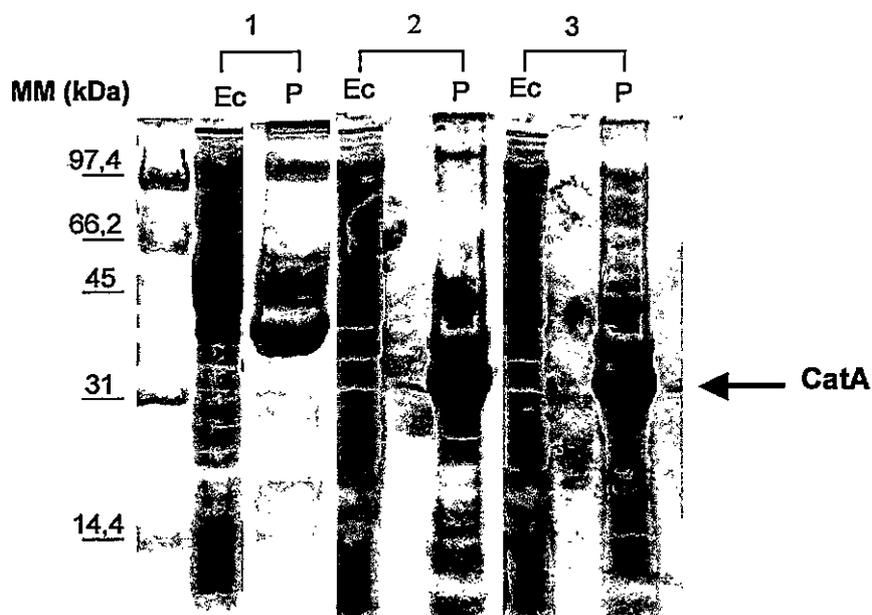


Figura 21. Análisis de la solubilidad de la enzima catecol-1,2-dioxigenasa de LB400 expresada en *E. coli*. Ec, extracto crudo; P, precipitado. 1, control negativo *E.coli* BL21(DE3); 2, clon 55; 3, clon 32. MM, estándares de masa molecular, se indica su masa en kDa.

Como control negativo se utilizó la cepa BL21(DE3) de *E. coli*. Se observó una banda muy intensa en las muestras correspondientes al precipitado de los clones 32 y 55, la que posee el tamaño esperado para la enzima CDO. Este resultado nos indica que la enzima CDO expresada en *E.coli* estaría formando cuerpos de inclusión.

4. DISCUSION

4.1. Capacidades degradativas de CBAs de *Burkholderia* sp. LB400.

Las capacidades degradativas de PCBs de *Burkholderia* sp. LB400 han sido extensamente estudiadas (Bopp, 1986; Haddock *et al.*, 1993, 1995; Seeger *et al.*, 1995, 1997, 1999). Sin embargo, existen pocos estudios acerca de las capacidades degradativas de CBAs en esta cepa (Hernández *et al.*, 1985; Potrawfke *et al.*, 1998). Se sabe que la cepa LB400 es capaz de degradar 2-CB y 4-CB hasta 2-CBA y 4-CBA. Estos productos atraviesan la membrana celular y son liberados al medio de cultivo, donde es posible cuantificarlos debido a su acumulación (Seeger *et al.*, datos no publicados). Este fenómeno ha sido frecuentemente observado durante la degradación de PCBs (Hernández *et al.*, 1991, Sondossi *et al.*; 1992; Maltseva *et al.*, 1999). Por otra parte, se sabe que la cepa LB400 es capaz de crecer en benzoato y 3-CBA (Hernández *et al.*, 1985; Potrawfke *et al.*, 1998), por lo que estos compuestos son capaces de entrar a la célula para ser degradados. Los experimentos realizados indican que en cultivos crecidos en glucosa como fuente de carbono y expuesto a 2-CBA o 4-CBA, la concentración de cada uno de estos compuestos permanece constante inclusive después de largos tiempos de exposición (24 h). Por lo tanto los cultivos de la cepa LB400 crecidos en glucosa no poseen la capacidad de degradar 2-CBA y 4-CBA.

En bacterias como *Pseudomonas testosteroni* B-356 (Sondossi *et al.*, 1992) crecidas en bifenilo, la exposición a CBAs afecta la degradación de PCBs. Sondossi *et*

al. postulan que la presencia de bifenilo en el medio induciría dioxigenasas, las que transformarían los CBAs hasta compuestos como clorocatecoles o hidroxibenzoatos. Estos compuestos pueden afectar la actividad de enzimas pertenecientes a la vía superior de degradación de bifenilo (Sondossi *et al.*, 1992). Los experimentos realizados en esta parte de la tesis no nos permiten determinar si estos compuestos son capaces de ingresar a la célula para ser eventualmente degradados. Sin embargo, las condiciones de cultivo utilizadas nos permiten asegurar que los CBAs no son transformados en compuestos que interfieran con el objetivo central de este trabajo, que es observar el efecto de la exposición a CBAs sobre *Burkholderia* sp. LB400.

4.2. Efectos de los CBAs sobre el crecimiento de la cepa LB400.

Para estudiar el efecto de la presencia de CBAs sobre la cepa LB400, se analizó el efecto de la exposición a estos compuestos sobre el crecimiento de la bacteria. Estos experimentos permitieron determinar las condiciones de exposición para realizar los estudios proteómicos en esta bacteria.

Se observó que la exposición a 2-CBA o 4-CBA en una concentración 2 mM produce retardamiento en el crecimiento celular, siendo mayor el efecto en presencia de 4-CBA. Debido a que este último compuesto permitió observar un efecto más marcado, se estudió el efecto de diferentes concentraciones de 4-CBA sobre la curva de crecimiento de la cepa LB400. A mayores concentraciones de 4-CBA la tasa de crecimiento disminuyó más y se llegó hasta una menor densidad óptica en la fase estacionaria. Sin embargo, ninguno de los CBAs estudiados, en una concentración 2 mM, produce un efecto tóxico sobre la cepa LB400 según lo observado en las curvas de viabilidad. Los efectos observados en estos estudios se asemejan a los producidos por la exposición a benzoato (BA) y 2-clorofenol (2-CP) en el crecimiento de *E. coli*

(Lambert *et al.*, 1997) y *P. putida* KT2442 (Lupi *et al.*, 1995), respectivamente. Ambos compuestos poseen una estructura similar al 2-CBA y 4-CBA. El efecto en la baja de la tasa de crecimiento celular frente a benzoato a pH 8,0 y el 2-CP, es similar al efecto del agente desacoplante dinitrofenol (DNP) (Lambert *et al.*, 1997; Lupi *et al.*, 1995). En *E. coli* el DNP es capaz de transportar protones a través de las membranas biológicas, lo que rompe el potencial de membrana (Gage y Neidhardt, 1993). La disipación de la fuerza protón motriz de la membrana produce varios efectos negativos sobre las bacterias, entre ellas, la disminución de la síntesis de ATP. Los trabajos de Lambert *et al.* y Lupi *et al.* postulan que este fenómeno podría estar relacionado con la baja en la tasa de crecimiento bacteriano al exponer a las células a compuestos como BA, 2-CP, 2-CBA y 4-CBA (Lambert *et al.*, 1997; Lupi *et al.*, 1995).

Para examinar si la inhibición del crecimiento de la cepa LB400 expuesta a 2-CBA y 4-CBA, está relacionada con una reducción en la viabilidad celular se realizó un recuento de UFC en condiciones similares a las de las curvas de crecimiento. Existe un efecto débil de estos compuestos en la viabilidad celular a tiempos cortos de exposición. Por lo tanto, las células son capaces de sobrellevar la presencia de este compuesto en el medio. En cambio, a largos tiempos de exposición, cuando las bacterias se encuentran en fase estacionaria, se observa una disminución significativa de las células viables en el medio. Este efecto depende del compuesto al que la bacteria se encuentra expuesta. Al igual que en las curvas de crecimiento el 4-CBA en sus concentraciones más altas produce una mayor disminución en la viabilidad de las células.

4.3. Respuesta molecular global de la cepa LB400 frente a CBAs.

Para estudiar la respuesta molecular de la cepa LB400 frente a 2-CBA o 4-CBA, se realizaron estudios proteómicos. Existen cambios en los niveles de proteínas frente a ambos compuestos. A una concentración 2 mM, se observaron mayores cambios frente a 4-CBA. Esto se correlaciona con los resultados obtenidos en las curvas de crecimiento de la bacteria expuesta a estos compuestos.

El proteoma de la cepa LB400 presenta varios cambios al exponer a la bacteria frente a 4-CBA 2 mM. Se observaron al menos 12 proteínas inducidas, y no se detectaron proteínas reprimidas.

Entre las diez proteínas inducidas e identificadas frente a 4-CBA se encuentran dos chaperonas moleculares, las proteínas DnaK (Bardwell y Craig, 1984) y HtpG (Bardwell y Craig, 1987), las que son inducidas incluso en las concentraciones más bajas de este compuesto. La sobreexpresión de estas proteínas nos entrega indicios que la exposición a 4-CBA podría corresponder a una situación de estrés para la bacteria. Ambas chaperonas, descritas por ejemplo en la bacteria *E. coli*, se encuentran bajo la regulación del factor σ^{32} , el que se encuentra codificado por el gen *rpoH*. Este regulador es bastante conservado en bacterias gram-negativas, aunque los mecanismos regulatorios varían considerablemente. DnaK y HtpG son inducidas bajo distintas condiciones de estrés en diversas bacterias (Mason *et al.*, 1999; Duché *et al.*, 2002; Leichert *et al.*, 2003). La aparición de estas proteínas ha sido descrito como un efecto de tipo "desacoplante", ya que uno de los efectos del colapso de la fuerza protón motriz es que, tanto el transporte de nutrientes como la translocación de proteínas destinadas a la membrana citoplasmática es inhibido (Gage y Neidhardt, 1993). Estudios realizados en *E. coli* sugieren que las chaperonas moleculares, que son

reguladas por el factor σ^{32} tienen un rol preponderante para evitar la agregación de proteínas intracelulares (Yura *et al.*, 2000).

Por otra parte, la respuesta a estrés mediada por factores sigma, se ha relacionado con la regulación transcripcional de vías degradativas en bacterias (Marqués *et al.*, 1995, 1999; Cases y De Lorenzo, 2001). Un ejemplo destacado corresponde al plasmido TOL pWW0 de *Pseudomonas putida*. Esta bacteria es capaz de crecer en 3-metilbenzoato como única fuente de carbono (Marqués *et al.*, 1995, 1999). Este compuesto corresponde al activador del regulador positivo de la vía inferior de degradación, Xyls. Sin embargo, la presencia del regulador no es suficiente para la activación del promotor de la vía degradativa (Pm) durante la fase exponencial de la bacteria (Marqués *et al.*, 1999). Se demostró que el 3-metilbenzoato produce una respuesta de tipo estrés, que se traduce en el aumento del factor σ^{32} al interior de la célula. La unión del factor σ^{32} a la RNA polimerasa es esencial para la transcripción de los genes que se encuentran río abajo del promotor Pm (Marqués *et al.*, 1999).

La proteína que posee una mayor sobreexpresión frente a 4-CBA fue identificada como la enzima catecol-1,2-dioxigenasa (CDO). Esta proteína corresponde a la primera enzima de la vía *orto* de degradación de catecoles. La mayoría de los compuestos aromáticos incluyendo los CBAs son convertidos por las bacterias hasta los intermediarios metabólicos catecol y protocatecuato (Gottschalk *et al.*, 1986). Se debe mencionar que esta proteína no es inducida por la presencia de 2-CBA. Esto podría estar relacionado con la regulación de la expresión de esta enzima. Se han descrito CDO inducidas por CBAs, pero en cepas que son capaces de degradar estos compuestos (Giuffrida *et al.*, 2001; Suzuki *et al.*, 2002). La aparición de la CDO en *Burkholderia* sp. LB400 inducible por 4-CBA, sugiere fuertemente realizar futuros

estudios con este tipo de enzimas que podrían potenciar las características degradativas de esta bacteria.

Al exponer a la cepa LB400 a 4-CBA se induce la proteína BphB. Esta proteína corresponde a la segunda enzima de la vía superior de degradación de bifenilo. Sin embargo, fue la única proteína inducida de esta vía. La regulación de vías catabólicas en el ambiente no sólo implican la habilidad para responder frente a un sustrato, sino que además dependen del beneficio o perjuicio de expresar un complejo enzimático (Cases y de Lorenzo, 2001). Es conocido que intermediarios metabólicos pueden inducir las enzimas de algunas vías metabólicas (Bundy *et al.*, 2002; Cospér *et al.*, 2000), pero no se tenía antecedente que BphB pudiera ser inducida por un metabolito final de la vía, en este caso 4-CBA. Por otro lado, este estudio proteómico corresponde a uno de los primeros en su tipo realizado con la bacteria *Burkholderia* sp. LB400. A pesar que los genes *bph* han sido estudiados extensamente, la transcripción y regulación de estos genes es poco conocida (Beltrametti *et al.*, 2001). Erickson y Mondello (1992), postularon la existencia de tres promotores, p1, p2 y p3. Los promotores p1 y p2, ubicados río arriba del gen *bphA1*, dirigirían la transcripción constitutiva de estos genes, mientras que p3 localizado río arriba del ORF0 se activaría en presencia de bifenilo, permitiendo la expresión de todos los genes *bph*. Un estudio más reciente indica que el ORF0 podría actuar como regulador del promotor del gen *bphA1* (Beltrametti *et al.*, 2001). Sin embargo, en este mismo estudio se deja abierta la posibilidad de la existencia de varios promotores aún no descritos. Esto último podría ser la explicación a la sobreexpresión de una sola enzima de la vía superior de degradación de bifenilo, BphB. Es posible que exista un promotor que controle la expresión de *bphB* y que la actividad del promotor se vea inducida en presencia de 4-CBA.

La degradación de proteínas en bacterias constituye una herramienta de control global dentro del ciclo celular (Grünenfelder *et al.*, 2000; Jenai y Hengge-Aronis, 2003). Por lo tanto, no se puede descartar una mayor estabilidad de la enzima BphB, en la presencia de 4-CBA. Se deberá seguir estudiando el proteoma de la cepa LB400 frente a distintos intermediarios de la vía de degradación de bifenilo, como una herramienta de estudio de la regulación de la expresión de sus proteínas.

Otra de las proteínas inducidas por la presencia de 4-CBA es el factor de elongación G (EF-G). Se ha demostrado que la proteína EF-G purificada posee propiedades de chaperona molecular (Caldas *et al.*, 2000). Estos estudios indican que el factor de elongación EF-G y el factor de iniciación IF2 son capaces de interactuar específicamente con proteínas desplegadas, de forma similar a las chaperonas moleculares clásicas, así como la protección de ciertas proteínas frente a estrés calórico. Se ha observado la inducción de este tipo de proteínas en distintas condiciones de estrés en diferentes bacterias (Duché *et al.*, 2002; Bébien *et al.*, 2002).

Otras proteínas inducidas frente a 4-CBA corresponden a proteínas que pertenecen a distintos procesos metabólicos, como por ejemplo la aconitato hidratasa, la malato deshidrogenasa y la succinato-semialdehído deshidrogenasa, enzimas pertenecientes al ciclo de Krebs. Adicionalmente se indujo la inositol mono fosfato deshidrogenasa (IMPDH), una enzima perteneciente a la síntesis de bases nitrogenadas y la oxidoreductasa TAS, que cumple el rol típico de las proteínas pertenecientes a la familia de las oxidoreductasas: transferir electrones a la cadena respiratoria. Todas estas proteínas son inducidas cuando la bacteria se ve enfrentada a la concentración de 4-CBA 2 mM, excepto la aconitato hidratasa. Estas proteínas podrían ver afectada su expresión frente a este compuesto debido a una respuesta global de control de la bacteria crecida en glucosa frente a la exposición a 4-CBA. Para

analizar esta posibilidad será necesario crecer la bacteria en alguna otra fuente de carbono como, por ejemplo, succinato o bifenilo, y exponerla a este compuesto.

Las secuencias parciales de las proteínas inducidas 9 y 11, no permitieron identificar estos polipéptidos en las bases de datos en construcción de LB400. La secuencia del extremo N-terminal de la proteína 11 se obtuvo por microsecuenciación. Esta secuencia no arrojó muy buen resultado, ya que entregó 11 aminoácidos con una alta incerteza de un total de 20. Se podría utilizar técnicas más sofisticadas de secuenciación para la proteína 11, como ESI-Q-TOF. La proteína 9 fue analizada por ESI-Q-TOF, obteniéndose varios fragmentos con bajos valores de incerteza. Sin embargo, no fue posible identificarla, por lo que no puede descartarse que este polipéptido corresponda a alguna proteína aún no identificada.

En bacterias expuestas al compuesto 2-CBA se observó la inducción de al menos cuatro proteínas, y la represión de al menos una proteína. Los resultados de identificación de estas proteínas no proporcionó evidencia de algún efecto de tipo estrés en la bacteria cuando se enfrenta a 2-CBA, debido a la ausencia de proteínas universales de estrés (Usp), proteínas de estrés térmico (Htp) u otras chaperonas moleculares. Dos de las proteínas inducidas corresponden a aminotransferasas (proteínas 13 y 14). Estas enzimas están ligadas al metabolismo de aminoácidos permitiendo su formación a través de la aminación de α -oxoácidos. Se detectó también la sobreexpresión de una proteína que corresponde probablemente a una flavoproteína electrotransferasa (ETF) (proteína 17). Esta enzima actúa como aceptor de electrones de diversas deshidrogenas en distintas vías metabólicas. Las proteínas número 15 y 16, una inducida y la otra reprimida, no pudieron ser identificadas. La secuencia parcial de la proteína inducida número 15 no arrojó resultados positivos en ninguna de las bases de datos utilizadas para su identificación. La proteína número 16

aparece en las bases de datos en construcción de la cepa LB400. Sin embargo, el valor de incerteza que entregó la búsqueda fue bastante alto, por lo que se decidió no incorporar esta proteína en la identificación. Ambas proteínas se podrían estudiar mediante espectrometría de masa, la que nos permitiría obtener distintos fragmentos de cada proteína. En general, la respuesta de la cepa LB400 frente a 2-CBA involucra enzimas pertenecientes al metabolismo de aminoácidos y a la cadena respiratoria. Estas proteínas probablemente se estimulen en respuesta al control global de la presencia de este compuesto en el medio, pero no nos entrega información sobre posibles efectos tóxicos sobre la bacteria o la estimulación de alguna vía relacionada con compuestos aromáticos.

En este estudio se observó que los compuestos 2-CBA y 4-CBA, a pesar de su estructura química similar, producen efectos diferentes sobre el proteoma de la cepa LB400. Se sabe que pequeñas diferencias en la sustitución de átomos de cloro en moléculas de PCBs, son fundamentales para el reconocimiento por parte de las enzimas que participan en su degradación (Seeger *et al.*, 1995, 1999). Basándose en este antecedente, no debiera sorprender la diferencia de los efectos producidos por 2-CBA y 4-CBA sobre el proteoma de la cepa LB400. Por otra parte, se ha observado que compuestos como el hexaclorobenceno y pentaclorofenol, entre otros, inducen proteínas en *E.coli*, las que entre un 50% y 90% son únicas para cada compuesto (Blom *et al.*, 1992).

Se propone estudiar el efecto de concentraciones más altas de 2-CBA sobre el proteoma de la cepa LB400. No se puede descartar que a una mayor concentración de este compuesto se observen mayores cambios en la expresión de proteínas.

4.4. Clonamiento de la enzima catecol-1,2-dioxigenasa de la cepa LB400.

Si bien se cuentan con estudios que describen la inducción de la enzima catecol-1,2-dioxigenasa en presencia de CBAs, esta enzimas pertenece a organismos degradadores naturales de CBAs o compuestos catecólicos (Giuffrida *et al.*, 2001, Suzuki *et al.*, 2002). Teniendo en cuenta estos antecedentes y la fuerte inducción de esta enzima por 4-CBA se decidió clonar la enzima catecol-1,2-dioxigenasa para cumplir el cuarto objetivo de esta tesis. Estudios bioinformáticos nos indican que la CDO se encuentra en el genoma de la bacteria *Burkholderia* sp. LB400. En sus zonas contiguas a este gen *Burkholderia* sp. LB400 posee otros dos genes pertenecientes a la vía de degradación del catecol y el gen del regulador de la vía (Fig.14). De acuerdo al dendrograma, esta CDO sería similar a las isoenzimas del tipo II de las bacterias *Frateuria* sp. ANA-18 (Murakami *et al.*, 1999), *Acinetobacter* *lwoffii* K24 (Kim *et al.*, 1997) y *Burkholderia* sp. TH2 (Suzuki *et al.*, 2002), las que poseen dos conjuntos de genes para la degradación del catecol. La similitud con las demás (cloro)catecoles disponibles en la base de datos GeneBank es bastante menor. Estos antecedentes indican que la CDO que posee la cepa LB400 es novedosa, lo que hace interesante su estudio.

La enzima fue clonada en el vector de expresión pT7-7. Este vector posee un promotor regulado por IPTG, lo que permite sobreexpresar el gen clonado. Se analizó la actividad de esta enzima en dos clones que la sintetizan en forma heteróloga. La enzima clonada y sobreexpresada en estos clones resultó estar inactiva.

De acuerdo a antecedentes de la literatura, es conocido que proteínas foráneas sintetizadas en *E. coli* tienden a formar cuerpos de inclusión (Marston, 1986; Kane y Hartley, 1988). Mediante geles de poliacrilamida-SDS se pudo observar que efectivamente la enzima CDO se encontraría mayoritariamente en forma insoluble en la

cepa *E. coli*, lo que podría explicar su inactividad. Estudios futuros debieran contemplar secuenciar los clones que expresan la proteína para descartar cualquier error en la secuencia debido a la amplificación inicial del gen. Cualquier cambio en el marco de lectura del gen que codifica para esta proteína podría estar produciendo una enzima inactiva. Por otro lado, podría pensarse que la maquinaria de *E. coli*, no es capaz de realizar un correcto plegamiento de la enzima proveniente de la cepa LB400, y por lo tanto, formar agregados de proteína inactiva. Una posibilidad sería cambiar el gen de hospedero, que posea una mayor similitud con la cepa LB400, lo que probablemente implicaría que su maquinaria traduccional sea parecida y permita un correcto plegamiento de la enzima. No se descarta realizar estos análisis en un futuro para poder realizar una descripción de la enzima CDO de la cepa LB400.

Sin embargo, se decidió analizar *in silico* la secuencia proteica de la enzima de la cepa LB400 disponible en la base de datos del DOE, con el objetivo de descartar que la secuencia peptídica tuviera mutados los aminoácidos que constituyen el sitio activo, y por lo tanto, descartar que la enzima estuviera naturalmente inactiva. Para ello se recurrió a la base de datos Protein Data Bank (PDB). Estos archivos contienen datos de la estructura de macromoléculas como proteínas, ácidos nucleicos, complejos proteína-ácidos nucleicos, etc. Se puede encontrar una variedad de información asociada a estas estructuras, incluyendo detalles de secuencias, átomos coordinados y estructura 3D. Allí se encontró la secuencia aminoacídica de la CDO de la bacteria *Acinetobacter* sp. ADP1 en la que se indican los aminoácidos necesarios para la unión de la molécula de catecol a la enzima. Se realizó un alineamiento entre las secuencias de la enzima CDO de *Acinetobacter* sp. ADP1, *Burkholderia* sp. LB400 y *Frateuria* sp. ANA-18. Estas dos últimas bacterias poseen una CDO con una alta identidad. Se buscó los aminoácidos esenciales para la unión a catecol y metales, de acuerdo a los

datos entregados por el PDB. Este alineamiento (Fig. 22) mostró que de los 11 aminoácidos indicados como necesarios para la unión del catecol en la cepa ADP1, sólo los aminoácidos 29 y 50 (subrayados) no son idénticos a los de las cepas LB400 y ANA-18. Sin embargo han sido reemplazados por aminoácidos conservados. Este tipo de sustitución no debería afectar la actividad normal de la enzima.

5. CONCLUSIONES

- La bacteria *Burkholderia* sp. LB400 no es capaz de metabolizar 2-CBA y 4-CBA. Por lo tanto, 2-CBA y 4-CBA constituyen metabolitos finales de la vía superior de bifenilo.
- Tanto el 2-CBA y 4-CBA producen un retraso del crecimiento de la bacteria *Burkholderia* sp. LB400. Este efecto negativo sobre la fisiología de la bacteria es mayor en presencia de 4-CBA y se acentúa a medida que este compuesto aumenta su concentración.
- La exposición a 2-CBA o 4-CBA no afectan significativamente la viabilidad de la bacteria *Burkholderia* sp. LB400.
- *Burkholderia* sp. LB400 sufre cambios en la expresión de proteínas frente a la exposición a 4-CBA o 2-CBA. Se observan mayores cambios del proteoma durante la exposición a 4-CBA.
- La cepa LB400 expuesta a 4-CBA induce al menos dos chaperonas moleculares: DnaK y HtpG, lo que da indicios de una respuesta de tipo estrés.

- La exposición de la cepa LB400 frente a 4-CBA, metabolito final de la vía superior de bifenilo, produce una modificación en los niveles de la enzima BphB de esta vía. Este trabajo es uno de los primeros informes sobre la variación de los niveles de expresión de BphB por metabolitos finales de la vía.
- La cepa LB400 expuesta a 4-CBA, induce proteínas ligadas a distintos procesos metabólicos. Entre ellas encontramos tres enzimas pertenecientes al ciclo de Krebs, una enzima de la síntesis de bases nitrogenadas y una oxidoreductasa. Probablemente este tipo de respuesta permita optimizar los procesos metabólicos de la célula frente al efecto negativo producido por la presencia de 4-CBA.
- La enzima catecol-1,2-dioxigenasa (CatA) de la cepa LB400, que es una de las proteínas inducidas fuertemente en presencia de 4-CBA, fue clonada y expresada en la cepa de *E.coli* (BL21). La enzima sintetizada en forma heteróloga no presentó actividad enzimática. La enzima está formando cuerpos de inclusión, y por lo tanto, no se encontraría en forma soluble dentro de la bacteria huésped.
- Esta tesis corresponde uno de los primeros reportes en proteómica de la cepa LB400. De acuerdo a los resultados obtenidos se debe decir que este tipo de análisis, y la continuación de ellos, es fundamental en la descripción de un microorganismo con potenciales usos en biorremediación, ya que nos permite determinar la respuesta de las bacterias y su regulación frente a las distintas condiciones a las que puede verse enfrentada en el ambiente.

BIBLIOGRAFIA

Abraham, Wolf- Rainer, Nogales, B., Golyshin, P. N., Pieper, D. H., and Timmis, K. N. (2002). Polychlorinated biphenyl-degrading microbial communities in soils and sediments. *Curr. Opin. Microbiol.* **5**: 246-253.

Abramowicz, D. A. (1990). Aerobic and anaerobic biodegradation of PCBs: a review. *Crit. Rev. Biotechnol.* **10**: 241-251.

Abramowicz, D. A. (1995). Aerobic and anaerobic PCB biodegradation in the environment. *Environ Health Perspect.* **103 Suppl 5**: 97-99 .

Agency for Toxic Substances and Diseases Registry (ATSDR). (1996). Toxicological profile for Polychlorinated Biphenyls. U.S. Department of Health and Human Services.

Aldrich, T. L., and Chakrabarty, A. M. (1988). Transcriptional regulation, nucleotide sequence, and localization of the promoter of the *catBC* operon in *Pseudomonas putida*. *J. Bacteriol.* **170**: 1297-1304.

Arnett, C. M., Parales, J. V., and Haddock, J. D. (2000). Influence of chlorine substituents on rates of oxidation of chlorinated biphenyls by the biphenyl dioxygenase of *Burkholderia* sp. strain LB400. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**: 2928-2933.

Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A., Struhl, K. (1999). Short Protocols in Molecular Biology. A compendium of methods from Current Protocols in Molecular Biology, 4^a edición.

Bauw, G., Van Damme, J., Puype, M., Vandekerckhove, J., Gesser, B., Ratz, G. P., Lauridsen, J. B., and Celis, J. E. (1989). Protein electroblotting and microsequencing strategies in generating protein database from two-dimensional gels. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **86**: 7701-7705.

- Bardwell, J. C., and Craig, E. A. (1984).** Major heat shock gene of *Drosophila* and the *Escherichia coli* heat inducible *dnaK* gene are homologous. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **81:** 848-852.
- Bardwell, J. C. A., and Craig, E. A. (1987).** Eukariotic Mr 83,000 heat shock protein has a homologue in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **84:** 5177-5181.
- Bebien, M., Lagniel, G., Garin, J., Touati, D., Vermeglio, A., and Labarre, J. (2002).** Involvement of superoxide dismutases in the response of *Escherichia coli* to selenium oxides. *J. Bacteriol.* **184:** 1556-1564.
- Beltrametti, F., Reniero, D., Backhaus, S., and Hofer, B. (2001).** Analysis of transcription of the *bph* locus of *Burkholderia* sp. strain LB400 and evidence that the ORF0 gene product acts as a regulator of the *bphA1* promoter. *Microbiology.* **147:** 2169-2182.
- Blom, A., Harder, W., and Matin, A. (1992).** Unique and overlapping pollutant stress proteins of *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* **58:** 5226-5231.
- Bopp, L. H. (1986).** Degradation of highly chlorinated PCBs by *Pseudomonas* strain LB400. *J. Ind. Microbiol.* **1:** 23-29.
- Boyle, A. W., Silvin, C. J., Hassett, J. P., Nakas, P. and Tanenbaum, S.W. (1992).** Bacterial PCB biodegradation. *Biodegradation* **3:** 285-298.
- Bradford, M. M. (1976).** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.* **72:** 248-254.
- Breinig, S., Schiltz, E., and Fuchs, G. (2000).** Genes involved in aerobic metabolism of phenol in the bacterium *Thaurea aromatica*. *J. Bacteriol.* **182:** 5849-5863.
- Brenner, V., Arensdorf, J. J., and Focht, D. S. (1994)** Genetic construction of PCB degraders. *Biodegradation.* **5:** 359-377.
- Broderick, J. B. and O'Halloran, T. V. (1991).** Overproduction, purification, and characterization of chlorocatechol dioxygenase, a non-heme iron dioxygenase with broad substrate tolerance. *Biochemistry.* **30:** 7349-7358.

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

Caldas, T., Laalami, S., and Richarme, G. (2000). Chaperone properties of bacterial elongation factor EF-G and initiation factor IF2. *J. Biol. Chem.* **275:** 855-860.

Canadian Council of Resource and Environment Ministers (CCREM). (1986). The PCBs Story.

Cases, I., and de Lorenzo, V. (2001). The black cat/white cat principle of signal integration in bacterial promoters. *EMBO J.* **20:** 1-11.

Clément, P., Matus, V., Cárdenas, L., and González, B. (1995). Degradation of trichlorophenols by *Alcaligenes eutrophus* JMP134. *FEMS Microbiol. Lett.* **127:** 51-55.

Cosper, N. J., Collier, L. S., Todd, J.C., Scott, R. A., and Neidle, E. L. (2000). Mutations in *catB*, the gene encoding Muconate Cycloisomerase, activate transcription of the distal *ben* genes and contribute to a complex regulatory circuit in *Acinetobacter* sp. strain ADP1. *J. Bacteriol.* **182:** 7044-7052.

De Voogt, P., and Brinkman, U. A. (1989). Production properties and usage of polychlorinated biphenyls. En: Halogenated biphenyls, terphenyls, naphthalenes, dibenzodioxins, and related products. 2nd ed. R. D. Kimbrough, A. A. Jensen, Eds. Pp: 3-45, Elsevier Science Publishers, Amsterdam.

Duché, O., Trémoulet, F., Glaser, P., and Labadie, J. (2002). Salt stress proteins induced in *Listeria monocytogenes*. *Appl. Environ. Microbiol.* **68:** 1491-1498.

Edman, P. (1949). A method for the determination of the amino acid sequence of peptides. *Arch. Biochem. Biophys.* **22:** 475-483.

Erickson, M.D. (1986). Analytical Chemistry of PCBs, Butterworth Publishers, Stoneham, Massachusetts.

- Erickson, B. D., and Mondello, F. J. (1992).** Nucleotide sequencing and transcriptional mapping of the genes encoding biphenyl dioxygenase, a multicomponent polychlorinated-biphenyl-degrading enzyme in *Pseudomonas* strain LB400. *J. Bacteriol.* **174**: 2903-2912.
- Fain, M. G., and Haddock, J. D. (2001).** Phenotypic and phylogenetic characterization of *Burkholderia* (*Pseudomonas*) sp. strain LB400. *Current Microbiology.* **42**: 269-275.
- Falck, F., Ricci, A., Wolff, M. S., Godbold, J., and Deckers, P. (1992).** Pesticides and polychlorinated biphenyl residues in human breast lipids and their relation to breast cancer. *Arch. Environ. Health.* **47**: 143-.
- Fenn, J. B., Mann, M., Meng, C. K., Wong, S. F., and Whitehouse, C. M. (1989).** Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science.* **246**: 64-71.
- Francisco, P. B., Ogawa, N., Suzuki, K., and Miyasahita, K. (2001).** The chlorobenzoate dioxygenase genes of *Burkholderia* sp. strain NK8 involved in the catabolism of chlorobenzoates. *Microbiology.* **147**: 121-133.
- Focht, D. D., Searles, D. B., and Koh, S. C. (1996).** Genetic exchange in soil between introduced chlorobenzoate degraders and indigenous biphenyl degraders. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 3910-3913.
- Gage, D. J., and Neidhardt, F. C. (1993).** Adaptation of *Escherichia coli* to the uncoupler of oxidative phosphorylation 2,4-dinitrophenol. *J. Bacteriol.* **175**: 7105-7108.
- Giuffrida, M. G., Pessione, E., Mazzoli, R., Dellavalle, G., Barello, C., Conti, A., and Giunta, C. (2001).** Media containing aromatic compounds induce peculiar proteins in *Acinetobacter radioresistens*, as revealed by proteome analysis. *Electrophoresis.* **22**: 1705-1711.
- Gottschalk, G. (1985).** Growth with aromatics compounds. En Springer-Verlag New York Inc (Eds), *Bacterial Metabolism*, 2^a edición.
- Grant, S. G. N., Jessee, J., Bloom, F. R. and Hanahan, D. (1990).** Differential plasmid rescue from transgenic mouse DNAs into *E. Coli* methylation-restriction mutants. **87**: 4645-4649.

- Graves, P. R., and Haystead, T. A. J. (2002). Molecular biologist's guide to proteomics. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **66**: 39-63.
- Grünenfelder, B., rummel, G., Vohradsky, J., Röder, D, Langen, H., and Jenai, U. (2001). Proteomic analysis of the bacterial cell cycle. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **98**: 4681-4686.
- Haak, B., Fetzner, S., and Lingens, F. (1995). Cloning nucleotide sequence, and expression of the plasmid-encoded genes for the two-component 2-halobenzoate 1,2-dioxygenase from *Pseudomonas cepacia* 2CBS. *J. Bacteriol.* **177**: 667-675.
- Haddock, J. D., Nadim, L. M., and Gibson, D. T. (1993). Oxidation of biphenyl by a multicomponent enzyme system from *Pseudomonas* sp. strain LB400. *J. Bacteriol.* **175**: 395-400.
- Haddock, J. D. and Gibson, D. T. (1995). Purification and characterization of the oxygenase component of biphenyl 2,3-dioxygenase from *Pseudomonas* sp. strain LB400. *J. Bacteriol.* **177**: 5834-5839.
- Heim, S., Lleo, M., Bonato, B., Guzman, C. A., and Canepari, P. (2002). The viable but nonculturable state and starvation are different stress responses of *Enterococcus faecalis*, as determined by proteome analysis. *J. Bacteriol.* **184**: 6739-6745.
- Hernández, B. S., Arensdorf, J. J., and Focht, D. D. (1995). Catabolic characteristic of biphenyl-utilizing isolates which cometabolize PCBs. *Biodegradation.* **6**: 75-82.
- Hofer, B., Eltis, L. D., Dowling, D. N., and Timmis, K. N. (1993). Genetic analysis of a *Pseudomonas* locus encoding a pathway for biphenyl/polychlorinated biphenyl degradation. *Gene.* **130**: 47-55.
- Hofer, B., Backhaus, S., and Timmis, K. N. (1994). The biphenyl/polichlorinated biphenyl-degradation locus (*bph*) of *Pseudomonas* sp. LB400 encodes four additional metabolic enzymes. *Gene.* **144**: 9-16.
- Hutzinger, O., Safe, S. and Zitko, V. (1974). The chemistry of PCBs. CRC Press Inc. Cleveland.

International Agency for Research on Cancer (IARC). (1987). IARC monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans. Suppl7: Update of IARC monograph. Volumes 1-42. World Health Organization (WHO), Lyons, France.

Jenal, U., and Hengge-Aronis, R. (2003). Regulation by proteolysis in bacterial cells. *Curr. Opin. Microbiol.* **6**: 163-172.

Kane, J. And Hartley, D. (1988). Formation of recombinant protein inclusion bodies in *Escherichia coli*. *Trends. Biotechnol.* **6**: 95-101.

Karas, M., and Hillenkamp, F. (1988). Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. *Anal. Chem.* **60**: 2299-2301.

Kim, S. I., Leem, S-H., Choi, J-S., Chung, Y. H., Kim, S., Park, Y-M., Park, Y. K., Lee, Y. N, and Ha K-S. (1997). Cloning and characterization of two *catA* genes in *Acinetobacter Iwoffii* K24. *J. Bacteriol.* **179**: 5226-5231.

Kozlovski, S. A., and Kunk, F. (1995). Metabolism of 2-cholorbenzoic acid in *Pseudomonas stutzeri*. *Folia Microbiol.* **40**: 454-456.

Krishnan, V., Safe, S. (1993). Polychlorinated biphenyls (PCBs), dibenzo-p-dioxins (PCDDs), and dibenzofurans (PCDFs) as antiestrogens in MCF-7 human breast cancer cells: quantitative structure-activity relationships. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **120**: 55-61.

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

Lambert, L. A., Abshire, K., Blankenhorn, D., and Slonczewski, J. (1997). Proteins induced in *Escherichia coli* by benzoic acid. *J. Bacteriol.* **179**: 7595-7599.

Leichert, L. I. O., Scharf, C., and Hecker, M. (2003). Global characterization of disulfide stress in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **185**: 1967-1975.

Lupi, C. G., Colangelo, T., and Mason, C. A. (1995). Two-dimensional gel electrophoresis analysis of the response of *Pseudomonas putida* KT244 to 2-chlorophenol. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**: 2863-2872.

- Marqués, S., Manzanera, M., González-Pérez MM. Gallegos, MT., and Ramos, J.L. (1999).** The XylS-dependent Pm promoter is transcribed *in vivo* by RNA polymerase with σ^{32} or σ^{38} depending on the growth phase. *Mol. Microbiol.* **31**: 1105-1113.
- Marqués, S., Gallegos, M.T., and Ramos, J. L. (1995).** Role of σ^S in transcription from the positively controlled Pm promoter of the TOL plasmid of *Pseudomonas putida*. *Mol. Microbiol.* **18**: 851-857.
- Marston, F.A. (1986).** The purification of eukariotic polypeptides synthesized in *Escherichia coli*. *J. Biochem.* **240**: 1-12.
- Mason, C. A., Dünner, J., Indra, P., and Colangelo, T. (1999).** Heat-induced expression and chemically induced expression of the *Escherichia coli* stress protein HtpG are affected by the growth environment. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 3433-3440.
- McKay, D.B, Seeger, M., Zielinski, M., Hofer, B., and Timmis, K. N. (1997).** Heterologous expression of biphenyl dioxygenase-encoding genes from a gram-positive broad-spectrum polychlorinated biphenyl degrader and characterization of chlorobiphenyl oxidation by the genes products. *J. Bacteriol.* **179**: 1924-1930.
- McKay, D.B, Prucha, M., Reineke, W., Timmis, K. N., and Pieper, D. H. (2003).** Substrate specificity and expression of three 2,3-dihydroxybiphenyl-1,2-dioxygenase from *Rhodococcus globerulus* strain P6. *J. Bacteriol.* **185**: 2944-2951.
- Murakami, S., Takashima, A., Takemoto, J., Takenata, S., Shinke, R., and Aoki, K. (1999).** Cloning and sequence analysis of two catechol-degrading gene clusters from the aniline-assimilating bacterium *Frateuria* species ANA-18. *Gene.* **226**: 189-198.
- Nakai, C., uyeyama, H., Kagamiyama, H., Nakazawa, Inouye, S., Kishi, F., Nakazawa, A., and Nozaki, M. (1995).** Cloning DNA sequencing and amino acid sequencing of catechol-1,2-dioxygenase (pyrocatechase) from *Pseudomonas arvilla* C-1. *Arch. Biochem. Biophys.* **321**: 353-362.

- Nakatsu, CH., and Wyndham, RC.** (1993). Cloning and expression of the transposable chlorobenzoate-3,4-dioxygenase genes of *Alcaligenes* sp. strain BR60. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**: 3625-3633.
- Nakatsu, CH., Straus, NA., and Wyndham, RC.** (1995). The nucleotide sequence of Tn5271 3-chlorobenzoate 3,4-dioxygenase genes (*cbaAB*) unites the class IA oxygenases in single lineage. *Microbiology.* **141**: 485-495.
- Nakatsu, CH., Providenti, M., and Wyndham, RC.** (1997). The *cis*-diol dehydrogenase *cbaC* gene of Tn5271 is required for growth on 3-chlorobenzoate but not 3,4-dichlorobenzoate. *Gene.* **196**: 209-218.
- National Toxicology Program (NTP).** (1989). Fifth annual report on carcinogens: Summary (1989). NTP 89-239. Research Triangle Park, North Carolina.
- Neidhardt, F. C and VanBogelen R. A.** (2000). Proteomic analysis of bacterial responses. En Storz, G. y Hengge-Aronis (Eds), *Bacterial stress responses* pp: 445-452.
- O'Farrell, P. H.** (1975). High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J. Biol. Chem.* **25**: 4007-4021.
- O'Farrell, P. Z., Goodman, H. M., and O'Farrell, P. H.** (1977). High resolution two-dimensional electrophoresis of basic as well as acidic proteins. *Cell.* **12**: 1133-1142.
- Parrado, J., Ayala, A., and Machado, A.** (1995). One-step Electroblothing of 2- to 100- kDa Proteins onto PVDF Membrane. *App. Biochem. Biotech.* **53**: 285-292.
- Patel, R. N, Hou, C. T, Felix, A., and Lillard, M. O.** (1976). Catechol-1,2-dioxygenase from *Acinetonacter calcoaceticus*: purification and properties. *J. Bacteriol.* **127**: 536-544.
- Perez-Pantoja, D., Guzmán, L., Manzano, M., Pieper, D. H., and González, B.** (2000). Role of *tfdC_I, D_IE_IF_I* and *tfd D_{II}C_{II}E_{II}F_{II}* gene modules in catabolism of 3-chlorobenzoate by *Ralstonia eutropha* JMP134(pJP4). *Appl. Environ. Microbiol.* **66**: 1602-1608.

- Pieper, D. H., Reineke, W., Engesser, K. H., and Knackmuss, H.J. (1988). Metabolism of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid, 4-chloro-2-methylphenoxy-acetic and 2-methylphenoxyacetic acid by *Alcaligenes eutrophus* JMP134. *Arch. Microbiol.* **150**: 95-102.
- Potrawfke, T., Löhnert, T. -H., and Timmis, K. N. (1998). Mineralization of low-chlorinated biphenyls by *Burkholderia* sp. strain LB400 and by a two-membered consortium upon directed interspecies transfer of chlorocatechol pathway genes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **50**: 440-446.
- Romanov, V., and Hausinger, R. P. (1994). *Pseudomonas aeruginosa* 142 uses a three-component ortho-halobenzoate-1,2-dioxygenase for metabolism of 2,4-dichloro- and 2-chlorobenzoate. *J. Bacteriol.* **176**: 3368-3374.
- Safe, D. H. (1994). Polychlorinated biphenyls (PCBs): Environmental impact, biochemical and toxic responses, and implications for risk assessment. *Crit. Rev. Toxicol.* **24**(2): 87-149.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning. A Laboratory Manual* (2nd ed.), Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
- Seeger, M., Timmis, K., and Hofer, B. (1995). Conversion of chlorobiphenyls into phenylhexadienoates and benzoates by the enzymes of the upper pathway for polychlorobiphenyl degradation encoded by the *bph* locus of *Pseudomonas* sp. strain LB400. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**: 2654- 2658.
- Seeger, M., Timmis, K.N., and Hofer, B. (1997). Bacterial pathways for the degradation of polychlorinated biphenyl. *Marine Chemistry.* **58**: 327-333.
- Seeger, M., Zielinski, M., Timmis, K., and Hofer, B. (1999). Regioespecificity of dioxygenation of di- to pentachlorobiphenyls and their degradation to chlorobenzoates by the *bph*-encoded catabolic pathway of *Burkholderia* sp. strain LB400. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 3614- 3621.
- Seungil, K., Soo-Jung, K., Myung, H. N., Soohyun, K., Kwon-Soo, H., Kye-Heon, O., Jomg-Shin, Y., and Young-Mok, P. (2002). Proteome analysis of aniline induced proteins in *Acinetobacter Iwoffii* K24. *Curr. Microbiol.* **44**: 61-66.

Shanley, M. S., Neidle, E. L., Parales, R. E., and Orston, L. N. (1986). Cloning and expression of *Acinetobacter calcoaceticus* catBCDE in *Pseudomonas putida* and *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **168**: 557-563.

Sittig, M., et al. (1981). Handbook of Toxic and Hazardous Chemicals, Noyes Publications, (New Jersey).

Sondossi, M., Sylvestre, M., and Ahmad, D. (1992). Effects of chlorobenzoate transformation on the *Pseudomonas testosteroni* biphenyl and chlorobiphenyl degradation pathway. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**: 485-495.

Stancik, L. M., Stancik, D. M., Schimdt, B., Barnhart, D. M., Yoncheva, Y. N., and Slonczewski, J. L. (2002). pH-Dependent expression of periplasmic proteins and amino acid catabolism in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **184**: 4246-4258.

Stoscheck, C. M. (1990). Quantitation of protein. *Methods in Enzymology.* **182**: 50-69.

Studier, F. W., Rosenberg, A. H., Dunn, J. J., and Dubendorff, J. W. (1990). Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. *Meth. Enzymol.* **185**: 60-89.

Suzuki, K., Ichimura, A., Ogawa, N., Hasebe, A., and Miyashita, K. (2002). Differential expression of two catechol-1,2-dioxygenases in *Burkholderia* sp. strain TH2. *J. Bacteriol.* **184**: 5714-5722.

Sylvestre, M., Massé, R., Ayotte, C., Messier, F., and Fauteux, J. (1985). Total biodegradation of 4-chlorobiphenyl (4CBP) by a two-membered bacterial culture. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **21**: 191-195.

Tabor, S., and Richardson, C.C. (1985). A bacteriophage T7 RNA polymerase/promoter system for controlled exclusive expression of specific genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **82**: 1074-1078.

Tsoi, TV., Plotnikova, EG., Cole, JR., Guerin, WF., Bagdasarian, M., and Tiedje, JM. (1999). Cloning, expression, and nucleotide sequence of *Pseudomonas aeruginosa* 142 *ohb* genes coding for oxygenolytic ortho dehalogenation of halobenzoates. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 2151-2162.

Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry. (1985) /Editor: Wolfgang Gerhartz. 5^a ed. Weinheim: VCH Verlagsgesellschaft, Vol. A6: 346-351.

U. S. Environmental Protection Agency (EPA), Office of Pollution Prevention and toxics. (1997). Management of polychlorinated biphenyls in the United States.

VanBogelen, R. A., Schiller, E.E., Thomas, J. D., and Neidhardt, F. C. (1999). Diagnosis of cellular states of microbial organisms using proteomics. *Electrophoresis*. **20**: 2149-2159.

Vrana, B., Decorová, K., Baláz, S, and Sevciková, A. (1996). Effect of chlorobenzoates on the degradation of polychlorinated biphenyls (PCB) by *Pseudomonas stutzeri*. *J. Microbiol. Biotechnol.* **12**: 323-326.

Yura, T. Kanemori, M., and Morita, M.T. (2000). The heat shock response: regulation and function. En *Bacterial Responses*. G. Sortz y R. Hengge-Aronis, Eds. Pp: 3-18. ASM Press,