

Tesis Doctoral

Rol de los polihidroxialcanoatos en la resuesta al estrés desarrollada por P. putida GPo1

Ruiz, Jimena Alicia

2004

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Químicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the Master's and Doctoral Theses Collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Ruiz, Jimena Alicia. (2004). Rol de los polihidroxialcanoatos en la resuesta al estrés desarrollada por P. putida GPo1. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. http://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis_n3726_Ruiz

Cita tipo Chicago:

Ruiz, Jimena Alicia. "Rol de los polihidroxialcanoatos en la resuesta al estrés desarrollada por P. putida GPo1". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2004. http://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis_n3726_Ruiz

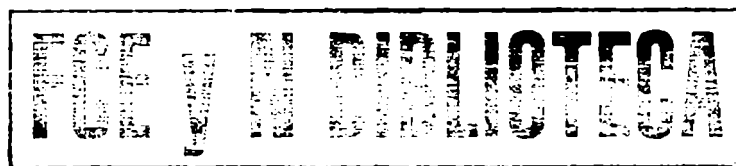
EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



Universidad de Buenos Aires
Facultad de Ciencias Exactas y
Naturales
Departamento de Química Biológica

Tesis presentada para optar al título de Doctor
de la Universidad de Buenos Aires

“Rol de los polihidroxicanoatos
en la Respuesta al estrés
desarrollada por *P. putida* GPo1 ”

Lic. Jimena Ruiz

Directora: Dra. Beatriz Méndez
Lugar de trabajo: Laboratorio de Genética
Bacteriana. Depto. de Química Biológica.
FCEyN. UBA.

- 2004 -

**“Sólo se trata de vivir.
Esa es la historia”**

(Fito Paéz)

A la memoria de mis abuelos: Sabina, Honorato y Francesco

Agradecimientos

A la Universidad de Buenos Aires, por la beca que me permitió el desarrollo de la presente tesis.

A la Dra. Beatriz Méndez, por todo el tiempo que me dedicó en estos cinco años para discutir mis dudas existenciales. Porque siempre que estuvo a su alcance (y cuando no estuvo también) hizo lo posible para facilitarme enormemente el trabajo. Por el entusiasmo que me transmitió en todo momento y su estimulación permanente en los momentos desalentadores.

A Nancy López, porque me considero afortunada de haber compartido todos estos años de trabajo con una persona maravillosa. Porque desde el principio me brindó su ayuda y colaboración para que llegara hasta donde estoy hoy. Por su paciencia increíble, y su ánimo a prueba de casi todo.

A Julia Pettinari, con quién compartí las cosas buenas y malas de este trabajo (además del laboratorio, el caótico escritorio y la computadora). Por transmitirme su experiencia del mundo del DNA, y principalmente por el intercambio de ideas y conversaciones que hoy hacen que sea una persona a quien estimo muchísimo.

A Nicolás Ayub, reciente licenciado. Con quién me une el haber tenido que lidiar con la misma cepa. Porque siempre estaba en el momento justo en que yo perdía la paciencia. Por cambiarme el ánimo en esos días en que todo parecía salir mal.

A Alejandra De Almeida, porque nunca se le borra la sonrisa.

A todos los que en algún momento pasaron por el laboratorio, especialmente a: Gustavo Vázquez, por su asombrosa e interminable lista de ideas; Luciano Chaneton, por hacer tan agradables mis horas laborales; Micaela Pescuma y Ernesto Román, quienes colaboraron con parte del trabajo que forma parte de esta tesis.

A mis “asesoras en proteínas”: Florencia Rosignolli e Irma Roberts, por las millones de veces que las molesté con dudas varias.

A todos los que me socorrieron con préstamos varios, consejo o sugerencias, entre los que se encuentran: Sandra Ruzal, Alejandro Alice, Marina Bellani y Mariana Piuri (habitantes actuales y pasados del laboratorio de al lado); Luis Scolaro, Cybelle García, Sandra Cordo y Paula Ellenberg de Virología; Rubén Benedetti de Inmunoquímica; Julio Fuchs de Toxicología, y Cristina Costa de la CNEA.

A Eva Danti, por la maravillosa dedicación y responsabilidad con que lleva a cabo su trabajo.

A Hebe Goldman, por la fabricación del antisuero.

A los ratones que dieron involuntariamente su vida por esta tesis.

A Rubén Fernández de la CNEA, ya que parte del trabajo de tesis fue realizado en su laboratorio.

A la gente de Agro: Olga, Irma, Laura y Marcela, principalmente por la cerveza y todo lo que venía de yapa. A Romi, por todos estos años de amistad.

A la gente de "La logia sin nombre": San, la Dra., Herbu y Nico. Gracias por todo eso.
A Sandra Cordo (de nuevo), por compartir aspectos varios, entre ellos "el síndrome del tesista" y su correspondiente terapia.

A Sergio Quiroz, por el sol en los días nublados.

A mis padres, porque todo esto se los debo a ellos.
A mis hermanas, porque las adoro con toda mi alma.

A Sergio, por lo único momentáneamente eterno.

Parte de los resultados que se describen en esta Tesis han sido publicados en los siguientes trabajos:

“Polyhydroxyalkanoate degradation is associated with nucleotide accumulation and enhances stress resistance and survival of *Pseudomonas oleovorans* in natural water microcosms”. 2001. Ruiz, J.A., López, N.I., Fernández, R.O. y Méndez, B.S. *Applied and Environmental Microbiology*. 67: 225-230.

“*rpoS* expression in carbon-starved cultures of the polyhydroxyalkanoate accumulating species *Pseudomonas oleovorans*”. 2004. Ruiz, J.A., López, N.I. y Méndez, B.S. *Current Microbiology*. En prensa.

Indice

Indice	1
Abreviaturas	5
Resumen	6
Abstract	7
Introducción	8
I. El género <i>Pseudomonas</i>	9
I.1. Características generales	9
I.2. <i>Pseudomonas putida</i> GPO1	10
II. Mecanismos de resistencia a estrés en bacterias	11
II.1. Mecanismos de resistencia a estrés específicos	11
II.2. Mecanismo general de resistencia a estrés - Rol del factor de transcripción de fase estacionaria, σ^S .	12
II.2.1. Generalidades	12
II.2.2. Genes regulados por σ^S en <i>Pseudomonas</i>	14
II.2.3. Regulación de los niveles de σ^S	15
II.2.3.1. Regiones promotoras del gen <i>rpoS</i> y regulación a nivel transcripcional	16
II.2.3.2. Regulación a nivel traduccional	17
II.2.3.3. Regulación a nivel post-traduccional	18
III. Respuesta estricta - Guanosina tetrafosfato (ppGpp) y señales desencadenadas en respuesta al ayuno en nutrientes.	19
III.1. Generalidades	19
III.2. Rol del ppGpp en la expresión de <i>rpoS</i>	21
IV. Los polihidroxicanoatos (PHAs)	22
IV.1. Generalidades	22
IV.2. Estructura y propiedades de los PHAs	23
IV.3. Síntesis y degradación de PHAs de cadena mediana (PHA _{LCM}) en <i>Pseudomonas</i> .	25
IV.3.1. Características de los PHA _{LCM}	25
IV.3.2. Biosíntesis de PHA _{LCM} en <i>P. putida</i> GPO1	25
IV.3.3. Genes involucrados en la síntesis de PHA _{LCM} en <i>P. putida</i> GPO1	27
IV.3.4. Proteínas asociadas al gránulo de PHA en <i>P. putida</i> GPO1	29
IV.3.5. Metabolismo del PHA en <i>Pseudomonas</i> - Factores involucrados en la Regulación.	29
IV.3.5.1. Regulación de los genes <i>pha</i> a nivel transcripcional	29
IV.3.5.2. Regulación de la degradación de PHA.	32
V. Importancia de la utilización del PHA en la supervivencia bacteriana y en la resistencia al estrés.	32
VI. Hipótesis de trabajo	33
Materiales y Métodos	35

I. Cepas bacterianas y plásmidos utilizados	36
II. Medios de cultivo y condiciones de crecimiento	38
II.1. Medios de cultivo y condiciones de crecimiento para <i>Escherichia coli</i>.	38
II.2. Medios de cultivo y condiciones de crecimiento para <i>Pseudomonas putida</i>.	38
II.2.1. Condiciones generales	38
II.2.2. Condiciones particulares según el experimento	39
II.2.2.1. Cultivos de <i>P. putida</i> para medición de ppGpp y ATP.	39
II.2.2.2. Condiciones de crecimiento de <i>P. putida</i> GPO500 para aislamiento de PHA.	39
II.2.2.3. Curvas de crecimiento en ME suplementado con caprilato de sodio 0,25% ó 0,5%.	39
II.2.2.4 Curvas de crecimiento en CN.	40
II.2.2.5 Cultivos para ayuno en carbono	40
II.3. Mantenimiento de cepas	40
III. Ensayos de resistencia a estrés	41
III.1. Ensayos de resistencia a estrés oxidativo	41
III.1.1. Ensayos de resistencia por recuento en placa	41
III.1.2. Ensayos de resistencia por tamaño del halo de inhibición	41
III.2. Ensayos de resistencia a estrés térmico	42
IV. Cuantificación de ppGpp y ATP	42
IV.1. Marcado de cultivos	42
IV.1.1 Marcado de cultivos de <i>P. putida</i>	42
IV.1.2. Marcado del cultivo de <i>Salmonella typhimurium</i> argC95.	42
IV.2. Preparación del extracto ácido y corrida de las muestras	43
V. Extracción, detección y cuantificación de PHA	43
V.1. Tinciones específicas para visualizar las inclusiones de PHA: Coloración fluorescente con Azul del Nilo A (Nile Blue A)	43
V.2. Extracción de PHA de <i>P. putida</i> GPO500	44
V.3. Cuantificación de PHA	45
V.3.1. Preparación y metanólisis de las muestras	45
V.3.2. Análisis por cromatografía gaseosa	45
VI. Manipulación de proteínas	46
VI.1. Preparación de extractos celulares	46
VI.2. Determinación de la concentración de proteínas	46
VI.3. Electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE)	46
VI.4. Tinción de geles de poliacrilamida con Coomassie Blue R-250.	47
VI.5. Técnica de Inmunoblot	47
VI.5.1. Transferencia de proteínas a membranas de nitrocelulosa	47
VI.5.2. Revelado utilizando un antisuero anti-RpoS	48
VI.5.3. Análisis semi-cuantitativo de la proteína RpoS	48
VII. Técnicas Moleculares	48
VII.1. Aislamiento de DNA cromosómico	48
VII.2. Aislamiento de DNA plasmídico	49
VII.3. Digestión con enzimas de restricción	50
VII.4. Tratamiento de extremos cohesivos con la enzima <i>Mung Bean</i>	50
VII.5. Purificación y recuperación de DNA	50

VII.6. Análisis de la secuencia de DNA y diseño de cebadores	50
VII.7. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	51
VII.7.1. PCR "tradicional"	51
VII.7.2. PCR de colonias	51
VII.7.3. Secuencias de cebadores utilizados	52
VII.7.4. Condiciones de ciclado	52
VII.8. Reacciones de ligado	54
VII.8.1. Ligado de productos de PCR	54
VII.8.2. Ligado de fragmentos de DNA digeridos enzimáticamente	54
VII.9. Electroforesis en geles de agarosa	55
VII.9.1. Geles de agarosa	55
VII.9.2. Geles de agarosa de bajo punto de fusión	55
VII.9.3. Cuantificación de DNA en geles de agarosa	55
VIII. Técnicas genéticas	56
VIII.1. Transformación de <i>E.coli</i>	56
VIII.1.1. Preparación de células competentes	56
VIII.1.2. Transformación	56
VIII.2. Ensayos de Conjugación	57
VIII.2.1. Conjugación de S17-1 pBBR1MCS-2 y S17-1 pmPpCZ con <i>P. putida</i> GPol y GPo500.	57
VIII.2.2. Conjugación de S17-1 λ pir pKNGrpoS::Km ^r con <i>P. putida</i> GPol.	58
VIII.3. Complementación de la mutante <i>P. putida</i> GPo500	58
IX. Secuenciación del gen <i>rpoS</i> de <i>P. putida</i> GPol	59
X. Expresión y purificación de la proteína <i>RpoS</i> de <i>P. putida</i> KT2440	59
X.1. Condiciones de cultivo	59
X.2. Preparación de lisados en condiciones desnaturalizantes	60
X.3. Purificación de la proteína en condiciones desnaturalizantes	60
XI. Obtención y titulación del antisuero de ratón anti-<i>RpoS</i>.	61
XI.1. Obtención del antisuero	61
XI.2. Titulación de la concentración de antisuero anti- <i>RpoS</i> a utilizar en la técnica de Inmunoblot	61
Anexo	62
I. Medios de cultivo	62
II. Buffers y soluciones utilizadas para manipulación de proteínas	64
III. Buffers utilizados para la manipulación de DNA	66
IV. Buffers utilizados para la preparación de <i>E.coli</i> competentes	66
V. Buffers utilizados para la purificación de la proteína <i>RpoShisx6</i> en condiciones desnaturalizantes	67
Resultados	68
I. Acumulación de nucleótidos (ATP y ppGpp) en <i>P. putida</i> durante la degradación de PHA.	69
I.1. Condiciones de crecimiento y acumulación de PHA para las cepas de <i>P. putida</i> GPol y GPo500.	69
I.2. Medición de los niveles intracelulares de ppGpp en <i>P. putida</i> GPol y GPo500.	70

I.3. Complementación de la mutación <i>phaZ</i>.	71
I.3.1. Análisis de la acumulación y degradación de PHA en <i>P. putida</i> GPo1/pmPpCZ, GPo500/pmPpCZ y GPo500/pBBR1MCS-2.	74
I.3.2. Niveles intracelulares de ppGpp y ATP en <i>P. putida</i> GPo1/pmPpCZ, GPo500/pmPpCZ y GPo500/pBBR1MCS-2.	75
II. Resistencia al estrés y nivel intracelular de RpoS en <i>P. putida</i> durante la degradación de PHA.	77
II.1. Obtención del antisuero anti-RpoS	77
II.1.1. Clonado del gen <i>rpoS</i> de <i>P. putida</i> KT2440 mediante PCR. Construcción y expresión de la proteína RpoShisx6.	78
II.1.2. Purificación de la proteína RpoShisx6.	81
II.1.3. Titulación del antisuero anti-RpoS	82
II.2. Construcción de la mutante <i>rpoS P. putida</i> 50-9.	82
II.2.1. Interrupción del gen <i>rpoS</i> utilizando un casete con resistencia a kanamicina. Construcción del vector pGrpS::Km ^r	83
II.2.2. Construcción del plásmido pKNGrpoS::Km ^r y pasaje por conjugación a <i>P. putida</i> GPo1.	85
II.2.3. Verificación del genotipo de las mutantes <i>rpoS</i> mediante PCR.	85
II.2.4. Verificación del fenotipo de la mutante <i>rpoS P. putida</i> UBA 50-9.	86
II.2.5. Observación de la acumulación de PHA en las mutantes para el gen <i>rpoS</i> .	87
II.3. Detección de la proteína RpoS mediante InmunoBlot.	88
II.4. Clonado del gen <i>rpoS</i> de <i>P. putida</i> GPo1 mediante PCR.	89
II.5. Análisis del contenido intracelular de σ^S en <i>P. putida</i> GPo1 y GPo500 en distintas condiciones de crecimiento.	93
II.5.1. Nivel intracelular de σ^S en <i>P. putida</i> GPo1 durante el crecimiento en medio mínimo.	93
II.5.2. Comparación del nivel intracelular de σ^S en <i>P. putida</i> GPo1 y GPo500 cultivadas en medio rico y medio mínimo.	94
II.6. Resistencia al estrés en <i>P. putida</i> GPo1 y GPo500 durante el ayuno en carbono.	96
II.7. Nivel intracelular de σ^S en <i>P. putida</i> GPo1 y GPo500 durante ayuno en carbono.	102
II.8. Resistencia al estrés y nivel intracelular de σ^S en <i>P. putida</i> GPo500/pBBR1MCS-2 y GPo500/pmPpCZ durante ayuno en carbono.	104
Discusión y Conclusiones	107
I. Niveles intracelulares de guanosina tetrafosfato (ppGpp) y adenosina trifosfato (ATP) durante la degradación de PHA.	108
II. Clonado del gen <i>rpoS</i> de <i>P. putida</i> GPo1	110
III. Resistencia al estrés y nivel intracelular de σ^S en <i>P. putida</i> GPo1 y GPo500	111
III.1. Variaciones en el contenido intracelular de σ^S a lo largo del crecimiento y en distintos medios de cultivo.	111
III.2. Resistencia a estrés y nivel intracelular de σ^S. Relación con la degradación de PHA	113
III.2.1. La resistencia al estrés se incrementa durante la degradación de PHA	113
III.2.2. El nivel intracelular de σ^S aumenta durante la degradación de PHA	115
IV. Conclusiones	118
Bibliografía	119

Abreviaturas

Amp/Amp ^r	ampicilina/resistencia a ampicilina
AMPc	adenosina monofosfato cíclico
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ATP	adenosina trifosfato
cpm	cuentas por minuto
dNTPs	deoxinucleótidos trifosfato
DO/DO _{580nm}	densidad óptica/densidad óptica a una longitud de onda de 580 nanometros.
hs	horas
IgG	inmunoglobulina G
IPTG	isopropil β-D-tiogaláctosido
kDa	kiloDalton
Km/Km ^r	kanamicina/resistencia a kanamicina
min.	minutos
pb/kb	pares de bases/kilo pares de bases
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
PHA	polihidroxialcanoato
PHA _{LCC} /PHA _{LCM} /PHA _{LCL}	polihidroxialcanoato de longitud de cadena corta/longitud de cadena mediana/longitud de cadena larga
PHA polimerasa _{lcm}	PHA polimerasa específica para PHAs de longitud de cadena mediana
PHB	polihidroxibutirato
ppGpp	guanosina 3', 5'-bispirofosfato
pppGpp	guanosina 3'-difosfato, 5'- trifosfato
(p)ppGpp	ppGpp y pppGpp
RNAse	ribonucleasa A
rpm	revoluciones por minuto
RpoShisx6	proteína RpoS recombinante con un hexapéptido de histidina en el extremo N-terminal.
Sac/Sac ^r	sacarosa/resistencia a sacarosa
SD	desvío estándar
SDS	dodecil sulfato de sodio
SDS-PAGE	electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS
Sm/Sm ^r /Sm ^s	estreptomycin/resistencia a estreptomycin/sensibilidad a estreptomycin
Tc	tetraciclina
ufc	unidades formadoras de colonias
UV	ultravioleta
vol.	Volúmenes

Resumen

La supervivencia de los microorganismos en la naturaleza depende de su habilidad para adaptarse rápidamente a los cambios en las condiciones ambientales. Por este motivo, las bacterias han desarrollado estrategias de supervivencia, mecanismos de control activos que les permiten hacer frente a las condiciones adversas y que facilitan el reajuste de la célula a nuevas situaciones. Uno de estos mecanismos es la **Respuesta general a estrés** que se induce en bacterias Gram-negativas ante distintas condiciones de estrés ambiental, tales como escasez en nutrientes, estrés osmótico, estrés oxidativo y cambios bruscos de temperatura. Los genes involucrados en la resistencia al estrés se encuentran bajo el control de una subunidad sigma alternativa de la RNA polimerasa denominada σ^S , codificada por el gen *rpoS*. El nivel intracelular de σ^S se regula a nivel transcripcional, traduccional y de estabilidad de la proteína.

Otra respuesta desencadenada ante condiciones de estrés es la **Respuesta Estricta**, que se caracteriza por un aumento en el nivel intracelular de la alarmona (p)ppGpp. Dicha molécula modula la expresión de varios genes, entre ellos el *rpoS*. Tanto en *E. coli* como en *Pseudomonas* se demostró que el ppGpp tiene un efecto positivo sobre la transcripción de *rpoS*.

Los polihidroxialcanoatos (PHAs) son polímeros de reserva bacterianos cuya acumulación y degradación favorece la supervivencia de los microorganismos en el ambiente. Resultados obtenidos previamente en el laboratorio, demostraron que la degradación del PHA acumulado incrementaba la supervivencia y la resistencia al estrés de la bacteria *Pseudomonas putida* en microcosmos de agua de río.

Teniendo en cuenta estos aspectos, el objetivo general de la presente tesis doctoral fue estudiar el papel de los polihidroxialcanoatos en los mecanismos de repuesta al estrés en *P. putida*. Para esto se utilizó una cepa salvaje y una cepa con una mutación en la enzima PhaZ, encargada de degradar PHA, y se analizó el contenido intracelular de ppGpp en condiciones de depolimerización de PHA, así como también la resistencia a estrés térmico y oxidativo, y el contenido intracelular de σ^S durante ayuno en carbono.

Los resultados obtenidos mostraron que existe un aumento transitorio en el nivel intracelular de ppGpp, aproximadamente 5 hs después del comienzo de la degradación de PHA. No se observó incremento en el contenido de ppGpp en la cepa mutante incapaz de degradar el polímero. La complementación de la mutación *phaZ* restauró el fenotipo salvaje. Asimismo, se observó que la capacidad de degradación de PHA incrementaba el nivel intracelular de σ^S y la resistencia a estrés térmico y oxidativo durante ayuno en carbono. La introducción del gen que codifica para la depolimerasa de PHA en la cepa mutante *phaZ* incrementó el contenido de RpoS y la tolerancia al estrés. Estos resultados sugieren que existe una relación entre la depolimerización de PHA y la Respuesta general a estrés controlada por RpoS, que tal vez se encuentre mediada por ppGpp.

Palabras claves: Polihidroxialcanoatos - Resistencia a estrés - RpoS - ppGpp- Ayuno en carbono - *Pseudomonas putida* (*oleovorans*) GP01.

Abstract

Survival of microorganisms in nature depends on their ability to adapt to changes in environmental conditions. For this reason, bacteria have developed survival strategies, active control mechanisms that allow them to cope with adverse conditions and facilitate the cell readjustment to new situations. One of these mechanisms is the **General stress response** induced in Gram-negative bacteria in response to several environmental stresses, such as nutrient starvation, osmotic stress, oxidative stress and abrupt temperature changes. The genes involved in stress resistance are under the control of an alternative sigma subunit of the RNA polymerase, σ^S , encoded by the *rpoS* gene. The intracellular level of σ^S is regulated at several levels, including transcription, translation and protein stability.

Another mechanism triggered by stress conditions is the **Stringent response**. This response is characterized by an increase in the intracellular level of the alarmone (p)ppGpp. This molecule modulates the expression of several genes, including *rpoS*. The involvement of ppGpp as a positive signal for *rpoS* expression has been reported in *E. coli* and *Pseudomonas*.

Polyhydroxyalkanoates (PHAs) are bacterial reserve polymers that enhance survival and competition abilities of microorganisms in the environment. Previous results of our laboratory, demonstrated that PHA degradation increased survival and stress resistance of *Pseudomonas putida* in river water microcosms.

Considering all these aspects, the general purpose of this PhD. thesis was to study the role of PHAs in the stress response mechanisms in *P. putida*. For this purpose we used a *P. putida* wild type strain and a mutant in the PhaZ enzyme, which is involved in PHA degradation, to analyze the ppGpp intracellular levels in PHA depolymerization conditions; as well as the resistance to thermal and oxidative stress, and the intracellular σ^S content during carbon starvation.

The results showed that PHA degradation is followed by an increase in ppGpp intracellular levels. This increase was not observed in the mutant strain unable to degrade the polymer. The complementation of the *phaZ* mutant restored the wild type phenotype. Moreover, it was observed that the capacity of PHA degradation increased the intracellular σ^S level and the resistance to heat shock and oxidative stress during carbon starvation. The introduction of the gene that codes for the PhaZ depolymerase in the mutant strain, increased RpoS content and tolerance to stress agents. These results suggest a relation between PHA depolymerization and the General stress response controlled by RpoS, that could be mediated by ppGpp.

Key words: Polyhydroxyalkanoates - Stress resistance - RpoS - ppGpp - Carbon starvation - *Pseudomonas putida* (*oleovorans*) GPO1.

Introducción

I. El género *Pseudomonas*

I.1. Características generales

Las bacterias del género *Pseudomonas* se encuentran clasificadas dentro de la subdivisión γ *Proteobacteria*. El género *Pseudomonas* fue creado por Migula en el año 1894. El primer estudio taxonómico de las especies del género fue realizado por Stanier en el año 1966, quién en base a características bioquímicas, morfológicas y nutricionales las dividió en tres grupos (Fluorescentes, Acidovorans y Alcaligenes) y varios subgrupos o biotipos (Stanier *et al.*, 1966). En el año 1973, las especies de *Pseudomonas* fueron divididas en 5 grupos, en base a la homología del RNA ribosomal (Palleroni *et al.*, 1973). Actualmente, de acuerdo con el análisis filogenético utilizando la secuencia del rRNA 16S, el género se divide en siete grupos: *Pseudomonas syringae*, *Pseudomonas chlororaphis*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas stutzeri* y *Pseudomonas pertucinogena* (Anzai *et al.*, 2000).

Las especies pertenecientes al género *Pseudomonas* son bacilos Gram-negativos y móviles, con uno o más flagelos polares. La mayoría de las especies son aerobias estrictas, aunque existen algunas que pueden utilizar nitrato como aceptor de electrones alternativo en la cadena respiratoria, lo cual les confiere la capacidad de crecer en anaerobiosis. No poseen metabolismo fermentativo.

Una de las características más sobresalientes de las *Pseudomonas* es su asombrosa versatilidad nutricional. Son capaces de utilizar una gran variedad de compuestos orgánicos como fuente de carbono y como dadores de electrones para la producción de energía. Debido a esta versatilidad metabólica, estas bacterias cumplen un papel muy importante en la degradación de compuestos orgánicos en suelos y en ambientes acuáticos, donde en general se las encuentra, lo cual determina que sean microorganismos de gran importancia ecológica.

En el suelo, las *Pseudomonas* se encuentran especialmente en la rizosfera, debido a la mayor disponibilidad de nutrientes de ese microambiente. Muchas de ellas poseen características que las hacen adecuadas como agentes de control biológico, como ser la producción de antibióticos, la liberación de sideróforos al medio y la síntesis de HCN (O'Sullivan y O'Gara, 1992).

Existe una gran variedad de especies de *Pseudomonas* que se caracterizan por su capacidad para sintetizar pigmentos fluorescentes verde-amarillentos y solubles en agua denominados pioverdinas. Entre ellas, se encuentran aquellas especies pertenecientes a los grupos *Pseudomonas syringae*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Pseudomonas chlororaphis*. Debido a esta característica se las suele denominar comúnmente, *Pseudomonas* fluorescentes.

1.2. *Pseudomonas putida* GPo1

Pseudomonas putida GPo1 fue aislada a partir de una muestra de suelo e inicialmente identificada como una cepa perteneciente a la especie *Pseudomonas oleovorans* (Baptist *et al.*, 1963). En el año 1973 (Schwartz y McCoy, 1973) la cepa fue mejorada para la producción de epóxidos y enviada al *American Type Culture Collection* como *P. oleovorans* TF4-1L (ATCC 29347). Sin embargo, en el trabajo realizado por Stanier en 1966 el aislamiento original fue clasificado como una cepa perteneciente a la especie *P. putida* biotipo A, enviada al ATCC y disponible con otro número (ATCC 17633). Posteriormente se confirmó que la secuencia del rRNA 16S de las dos cepas era idéntica.

Recientemente, en el año 2001, la secuenciación completa del rRNA 16S de la cepa GPo1, demostró que dicha secuencia estaba íntimamente relacionada con la secuencia del rRNA 16S de la especie tipo de *P. putida* biotipo A, DSM 291^T (99,2% de identidad en la secuencia). Además, la secuencia del rRNA 16S de GPo1 se encontró menos relacionada con el rRNA 16S de otras especies de *Pseudomonas* (< 98% de identidad en la secuencia), incluyendo a la especie tipo de *P. oleovorans*, DSM 1045^T (van Beilen *et al.*, 2001). Estos resultados corroboraron la ubicación taxonómica de la cepa GPo1 asignada por Stanier en 1966.

Algunos trabajos ponen en duda la utilidad del análisis de la secuencia del rRNA 16S para definir especies (Stackebrandt y Goebel, 1994). Por este motivo, Diard y colaboradores realizaron experimentos de hibridación DNA-DNA con distintas especies de *Pseudomonas* seleccionadas según el análisis de la secuencia de rRNA 16S. Los datos de homología de DNA sugirieron que GPo1 podría llegar a representar una nueva especie, aunque los valores de porcentaje de homología y ΔT_m se encuentran cercanos al umbral aceptado para definir una nueva especie (Diard *et al.*, 2002).

II. Mecanismos de resistencia a estrés en bacterias

II.1. Mecanismos de resistencia a estrés específicos

En la naturaleza existe una gran variedad de recursos y condiciones que pueden influenciar el crecimiento bacteriano, como ser la temperatura, el pH, la presencia de sustancias tóxicas, la concentración y la disponibilidad de nutrientes. Como consecuencia, las bacterias han desarrollado diversos mecanismos de adaptación que les permiten sobrevivir a un amplio rango de condiciones ambientales.

Estudios realizados principalmente en *Escherichia coli* y *Salmonella typhimurium* demostraron que las bacterias son capaces de responder a alteraciones en el ambiente mediante la activación de un grupo específico de genes que se encuentran bajo el control de una proteína regulatoria en común (Gottesman, 1984). Dichos genes, comúnmente regulados en respuesta a situaciones de estrés específicas, constituyen sistemas globales de control; ejemplos bien caracterizados incluyen la **respuesta al choque térmico** (Neidhardt *et al.*, 1984), la **respuesta SOS** (Walker, 1984), la **respuesta al estrés oxidativo** (Christman *et al.*, 1985) y la “**respuesta estricta**” (Gallant, 1979).

En algunos casos, las proteínas asociadas con la respuesta a un agente estresante pueden ser inducidas durante la exposición a otros agentes. Por ejemplo, *S. typhimurium* sintetiza algunas proteínas de respuesta a choque térmico cuando se expone a agua oxigenada (Christman *et al.*, 1985; Morgan *et al.*, 1986) y etanol (Morgan *et al.*, 1986). En *E. coli*, tanto la exposición a altas temperaturas como al etanol, ocasionan la inducción de las proteínas de choque térmico (Van Bogelen *et al.*, 1987). Resultados obtenidos con *P. putida* sometida a dosis subletales de agua oxigenada demostraron que se inducían proteínas que también se encontraban en respuesta a altas temperaturas y alta osmolaridad (Givskov *et al.*, 1994a). Estos resultados demuestran que existe un efecto de protección cruzada para algunos sistemas globales de control que comparten proteínas en común.

II.2. Mecanismo general de resistencia a estrés - Rol del factor de transcripción de fase estacionaria, σ^S .

II.2.1. Generalidades

El crecimiento bacteriano en el laboratorio es una situación idealizada que raramente ocurre en la naturaleza, debido principalmente a la escasez de nutrientes necesarios para el crecimiento. Por este motivo, las condiciones que los microorganismos encuentran en sus ambientes naturales son semejantes a las de la fase estacionaria en el laboratorio.

En algunas bacterias, condiciones nutricionales desfavorables inducen una serie de estadios morfológicos de diferenciación que finalizan con la formación de estructuras de resistencia al estrés, como por ejemplo la formación de cistos en *Azotobacter* sp. o de endosporas en *Bacillus* sp. Los mecanismos de adaptación en bacterias no-diferenciadas ocurren en ausencia de cambios morfológicos tan fácilmente detectables, sin embargo, las mismas también desarrollan respuestas de resistencia. Dichas respuestas son el resultado de la inducción de un conjunto de proteínas comúnmente denominadas: “proteínas de estrés” (Matin, 1991). Los genes que codifican para dichas proteínas se encuentran bajo el control del regulador central de la **Respuesta general de estrés**, denominado σ^S o RpoS.

El gen *rpoS* fue descubierto en *Escherichia coli* por varios grupos y en distintos contextos. Fue identificado como un gen involucrado en la resistencia a UV (Tuveson y Jonas, 1979), como un regulador de la catalasa codificada por el gen *katE* y de la exonucleasa III (Sak *et al.*, 1989), como un regulador de la fosfatasa ácida (Touati *et al.*, 1986), y como un gen inducible por condiciones de ayuno en nutrientes que codifica para un regulador central de la fase estacionaria (Lange y Hengge-Aronis, 1991). Finalmente, resultó evidente que todos los estudios trataban sobre el mismo gen, el cual codificaba para un factor sigma (Mulvey y Loewen, 1989; Tanaka *et al.*, 1993) que se denominó σ^S . Desde entonces, se han identificado más de 100 genes que se encuentran bajo el control de este factor de transcripción. Algunos de estos genes se encuentran detallados en la Tabla 1.

Gran parte del conocimiento acerca de la **Respuesta general de estrés** se obtuvo del análisis de células bacterianas en fase estacionaria de crecimiento o en bacterias

mantenidas en condiciones de ayuno en algún nutriente esencial. En dichas condiciones, las bacterias son capaces de desarrollar un estado de resistencia que las protege contra distintos agentes de estrés.

Aunque σ^S puede ser activado en respuesta a muchos agentes de estrés específicos, esto no ocurre necesariamente con todos los genes inducidos por σ^S , ya que la expresión de estos genes puede ser modulada por varios co-reguladores que pueden estar o no estar presentes durante la exposición a determinados agentes de estrés. Por este motivo, las consecuencias fisiológicas de la **Respuesta general de estrés** no son necesariamente las mismas bajo diferentes condiciones de estrés. Por ejemplo, mutantes *rpoS* de *E. coli* son deficientes en termotolerancia de fase estacionaria (Lange y Hengge-Aronis, 1991; McCann *et al.*, 1991), pero pueden desarrollar termotolerancia cuando son expuestas a altas temperaturas. Esto indica que al menos la regulación, y tal vez los genes estructurales involucrados en estos dos tipos de termotolerancia son diferentes.

Tanto en enterobacterias como en *Pseudomonas*, la **Respuesta general de estrés** actúa como una respuesta rápida de emergencia y como un programa de adaptación a largo plazo al ayuno en nutrientes y a otros tipos de estrés, que involucra cambios en la fisiología y morfología celular (Givskov *et al.*, 1994b; Hengge Aronis, 1996). Cuando la célula bacteriana entra en fase estacionaria, se inducen una serie de proteínas de estrés con un patrón temporal específico, y como resultado se desarrolla una resistencia a estrés múltiple (Jenkins *et al.*, 1988; Givskov *et al.*, 1994a).

A diferencia de las respuestas de estrés específicas que protegen a las bacterias contra un agente de estrés determinado, ya sea eliminando al agente estresante o reparando el daño provocado, la función fisiológica de la **Respuesta general de estrés** es preventiva. Confiere a la célula resistencia a estrés múltiple para evitar el daño. A su vez esta respuesta es totalmente reversible, a diferencia de lo que ocurre con bacterias esporuladas.

Tabla 1. Ejemplos de algunos genes inducidos por RpoS en *Escherichia coli*.

Gen	Función	Interviene en...	Referencia
<i>xthA</i>	Exonucleasa. Involucrada en la reparación de DNA	Protección contra estrés oxidativo	Demple <i>et al.</i> , 1983
<i>dps</i>	Histona. Previene la formación de radicales hidroxilos.	Protección contra estrés oxidativo	Almirón <i>et al.</i> , 1992
<i>katG</i> , <i>katE</i>	Catalasas	Protección contra estrés oxidativo	Ivanova <i>et al.</i> , 1994; Loewen, 1992
<i>sodC</i>	Superóxido dismutasa periplásmica	Protección contra estrés oxidativo. Patogenia	Gort <i>et al.</i> , 1999
<i>otsBA</i>	Operón involucrado en la síntesis de trehalosa (osmoprotector).	Protección contra estrés osmótico, desecación y termotolerancia	Hengge-Aronis <i>et al.</i> , 1991
<i>gadA</i> , <i>gadB</i>	Codificantes para glutamato decarboxilasas	Protección contra estrés ácido.	Castanie-Cornet <i>et al.</i> , 1999
<i>uspA</i>	Proteína transmembrana	Protección contra el etanol.	Farewell <i>et al.</i> , 1998
<i>ecnAB</i>	Lipoproteínas	Muerte celular programada.	Bishop <i>et al.</i> , 1998
<i>bolA</i>	Probable regulador de la expresión de <i>penicillin-binding protein 6</i>	Morfología celular	Aldea <i>et al.</i> , 1989
<i>osmB</i>	Lipoproteína de membrana externa	Agregación celular	Jung <i>et al.</i> , 1990
<i>poxB</i>	Piruvato oxidasa	Metabolismo del piruvato	Chang <i>et al.</i> , 1994
<i>esp</i>	Sistema de secreción tipo III	Virulencia	Beltrametti <i>et al.</i> , 1999

II.2.2. Genes regulados por σ^S en *Pseudomonas*

La adaptabilidad de las *Pseudomonas* fluorescentes se ve reflejada en el gran número de probables reguladores transcripcionales que se encontraron en los genomas de las distintas especies de *Pseudomonas* secuenciados hasta el momento. Se detectaron cerca de 24 probables factores sigma en *P. aeruginosa* PAO-1 y *P. putida* KT2440, mientras que *E. coli* solo posee siete genes que codifican para factores sigma.

Trabajos realizados con *P. aeruginosa*, *P. fluorescens* y *P. putida* KT2440 demostraron que σ^S es fundamental para la supervivencia en condiciones de ayuno en carbono y para la resistencia a distintas formas de estrés, entre las que se encuentran:

condiciones de alta osmolaridad, cambios a alta temperatura, exposición a agua oxigenada y exposición al etanol (Sarniguet *et al.*, 1995; Ramos-González y Molin, 1998; Suh *et al.*, 1999). Sin embargo, en *Pseudomonas* el gen *rpoS* cumple otras funciones importantes además de la protección general a estrés. En *P. fluorescens*, σ^S esta involucrado en la producción de antibióticos y en la supresión de patógenos vegetales (Sarniguet *et al.*, 1995); en *P. aeruginosa* en la producción de alginato y exotoxina A (Suh *et al.*, 1999); mientras que en *P. putida* GPoI, RpoS regula la vía biosintética de asimilación de alcanos codificada por el plásmido OCT (Canosa *et al.*, 1999).

II.2.3. Regulación de los niveles de σ^S

El contenido intracelular de σ^S se regula a varios niveles, que incluyen transcripción, traducción, y estabilidad de la proteína (Figura 1). A su vez, diferentes tipos de estrés afectan distintos niveles de control. En general, condiciones de estrés potencialmente letales que requieren una respuesta rápida, afectan la proteólisis de σ^S ; por el contrario, cambios graduales en las condiciones externas tienden a estimular la transcripción y traducción del gen.

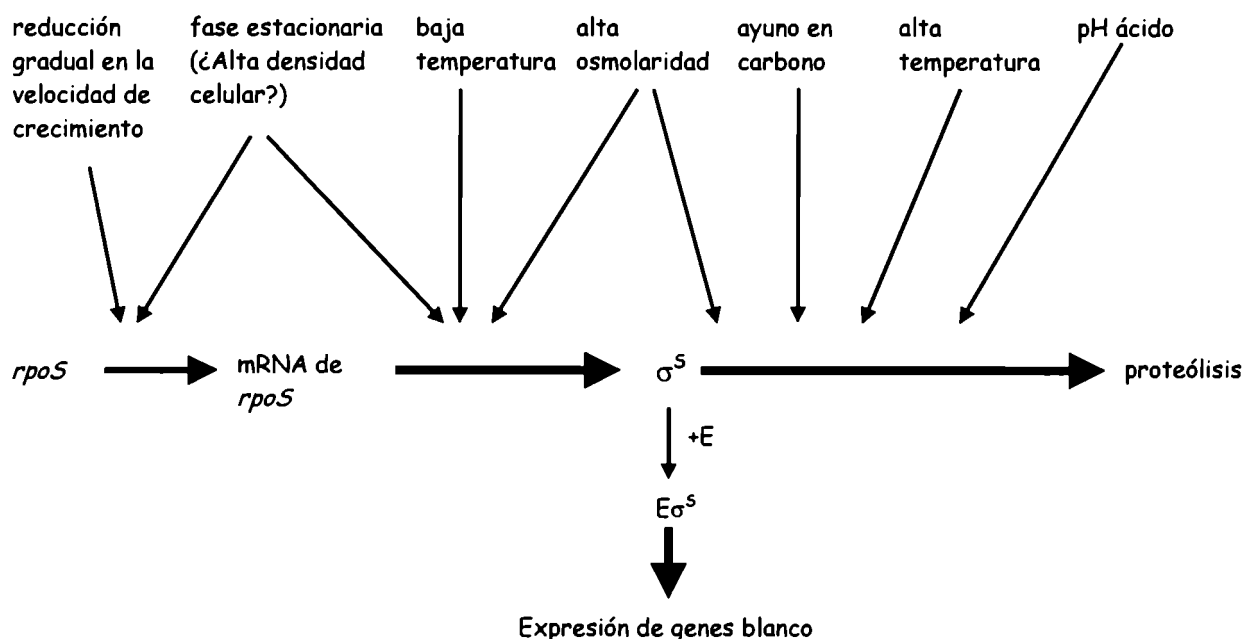


Figura 1. Esquema de la activación de la Respuesta general a estrés a distintos niveles. Reproducido de Hengge-Aronis, 2000.

II.2.3.1. Regiones promotoras del gen *rpoS* y regulación a nivel transcripcional

El gen *rpoS* se identificó en los genomas de varias bacterias pertenecientes a la subdivisión γ proteobacteria. Este gen se encuentra río abajo del gen *nlpD*, el cual codifica para una lipoproteína estructural. En *E. coli*, *P. aeruginosa* y *P. putida* WCS538 el promotor principal del gen *rpoS* se encuentra localizado dentro del gen *nlpD* y posee secuencias promotoras -10 y -35 reconocidas por σ^{70} (Fujita *et al.*, 1994; Lange *et al.*, 1995; Kojik y Venturi, 2001). En *P. putida* WCS538 el sitio de iniciación de la transcripción se encuentra 373 pb río arriba del codón de iniciación de la traducción (Kojik y Venturi, 2001).

Tanto en *P. putida* WCS538 (Kojik y Venturi, 2001), como en *P. aeruginosa* (Fujita *et al.*, 1994) y *P. fluorescens*, (Whistler *et al.*, 1998) la expresión de *rpoS* aumenta en la fase estacionaria del crecimiento. Las secuencias promotoras de *P. putida* WCS538 no muestran actividad en ninguna fase de crecimiento en *E. coli* (Kojik *et al.*, 2002), lo cual indica que la maquinaria de transcripción de *E. coli* no puede dirigir la expresión de este promotor.

Existen varios reguladores y moléculas pequeñas que están involucradas en la regulación del promotor *rpoS* (Tabla 2). En *E. coli*, la transcripción de *rpoS* se encuentra controlada por un sistema de dos componentes (BarA/UvrY) y por la proteína receptora de AMPc (Crp). En *Pseudomonas*, en cambio, la transcripción es controlada por los reguladores de la familia TetR y por *quorum sensing*. Tanto en *E. coli* como en *Pseudomonas* se ha demostrado que el ppGpp (sintetizado por las proteínas RelA y SpoT) tiene un efecto positivo sobre la transcripción de *rpoS*.

La mayoría de los sistemas que regulan la transcripción de *rpoS* en *Pseudomonas* están involucrados en la expresión de genes en respuesta a alta densidad celular, lo que pone de manifiesto la integración de σ^S con otros sistemas regulatorios globales.

Tabla 2. Locus genéticos involucrados en la transcripción de *rpoS*.

Gen (es)	Microorganismo	Efecto sobre la transcripción de <i>rpoS</i>	Referencia
<i>gacA/gacS</i>	<i>P. fluorescens</i>	Efecto positivo	Whistler <i>et al.</i> , 1998
<i>rhlR/rhlR</i>	<i>P. aeruginosa</i>	Efecto positivo	Latifi <i>et al.</i> , 1996
<i>psrA</i>	<i>P. aeruginosa</i> <i>P. putida</i> WCS538	Efecto positivo.	Kojic y Venturi, 2001; Kojic <i>et al.</i> , 2002
<i>relA</i>	<i>P. aeruginosa</i>	Efecto positivo.	van Delden <i>et al.</i> , 2001
<i>barA</i>	<i>E. coli</i>	Efecto positivo	Pernestig <i>et al.</i> , 2001
<i>crp</i>	<i>E. coli</i>	Efecto negativo	Fujita <i>et al.</i> , 1994
<i>relA/spoT</i>	<i>E. coli</i>	Efecto positivo.	Hirsch y Elliot, 2002
<i>ppk/ppx</i>	<i>E. coli</i>	Efecto positivo.	Shiba <i>et al.</i> , (1997)

II.2.3.2. Regulación a nivel traduccional

El mRNA del gen *rpoS* es capaz de formar estructuras secundarias que determinan que gran parte de la región de iniciación de la traducción quede inaccesible para los ribosomas. Estudios realizados en *E. coli*, utilizando fusiones traduccionales y transcripcionales, demostraron que tanto la entrada en fase estacionaria, como ciertas condiciones de estrés, eran capaces de aumentar la traducción del mRNA del gen *rpoS* (Lange y Hengge-Aronis, 1994; Muffler *et al.*, 1996). Una de las hipótesis que se manejan es que dichas condiciones alteran la estructura secundaria del mRNA, facilitando el acceso a la región de iniciación de la traducción.

En *E. coli* se han identificado varias proteínas que regulan la traducción del mRNA de *rpoS* (Brown y Elliot, 1996; Muffler *et al.*, 1997), aunque en la mayoría de los casos no se logró encontrar la conexión de dicho factor regulador en *trans* con señales ambientales específicas. Otros factores que intervienen en la regulación de la traducción de *rpoS* son moléculas pequeñas de RNA regulatorias, como ser el RNA de DsrA (Sledjeski y Gottesman, 1995) y el de OxyS (Zhang *et al.*, 1998), que se inducen en

respuesta a cambios bruscos a bajas temperaturas y a condiciones de estrés oxidativo, respectivamente.

II.2.3.3. Regulación a nivel post-traducciona

El factor σ^S es sintetizado en células en fase de crecimiento exponencial, pero los niveles de esta proteína son bajos debido a la continua proteólisis realizada por una proteasa específica denominada ClpXP (Schweder *et al.*, 1996). En *E. coli*, la proteína σ^S se estabiliza rápidamente en condiciones de ayuno en carbono o cuando las bacterias son expuestas a alta temperatura, alta osmolaridad o pH alto (Lange y Hengge-Aronis, 1994). Un factor clave en la regulación de la proteólisis de σ^S es el regulador RssB, que actuaría presentando σ^S a la proteasa ClpXP. (Becker *et al.*, 1999). Las señales ambientales controlarían la proteólisis de σ^S alterando la afinidad de RssB por σ^S , mediante fosforilación de RssB (Figura 2).

Hasta el momento no se han realizado estudios de regulación post-transcripcional y post-traducciona en *Pseudomonas*, por lo que se desconoce el papel que juegan en la regulación de *rpoS*.

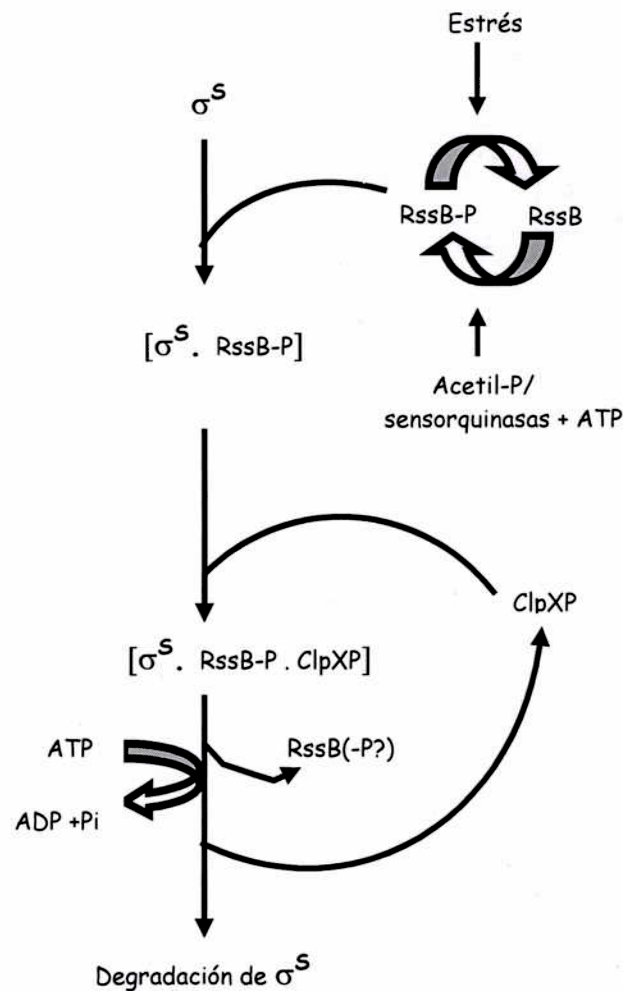


Figura 2. Modelo de reconocimiento de σ^S por la proteasa ClpXP. En condiciones normales (no estrés), σ^S es reconocido por RssB fosforilada y transferido al complejo ClpXP para su degradación. En condiciones de estrés, RssB es defosforilada, lo cual disminuye su afinidad por σ^S . Se desconoce si todas las condiciones de estrés que afectan la proteólisis de σ^S actúan mediante defosforilación de RssB. Gráfico reproducido de Hengge-Aronis, 2000.

III. Respuesta estricta - Guanosina tetrafosfato (ppGpp) y señales desencadenadas en respuesta al ayuno en nutrientes.

III.1. Generalidades

En el año 1952, Sands y Roberts encontraron que en *E. coli* la primera respuesta regulatoria ante condiciones de escasez de aminoácidos era la pérdida de la acumulación de RNA estable (Sands y Roberts, 1952). Buscando los efectores que estaban

involucrados en esa red regulatoria, Cashel y Gallant descubrieron que el pppGpp (guanosina 3'-difosfato, 5'-trifosfato) y el ppGpp (guanosina 3', 5'-bispirofosfato) se acumulaban en respuesta al ayuno en aminoácidos (Cashel y Gallant, 1969). Estos nucleótidos son sintetizados por fosforilación enzimática de GDP y GTP a ppGpp y pppGpp, respectivamente, utilizando ATP como molécula dadora de fosfatos (Figura 3). En condiciones favorables de crecimiento existe un nivel intracelular estable de pppGpp y ppGpp, mantenido por la acción de dos enzimas denominadas RelA y SpoT. RelA es una sintetasa, mientras que SpoT es fundamentalmente una hidrolasa, aunque tiene actividad de sintetasa en ciertas condiciones de escasez nutricional.

Uno de los parámetros principales en la regulación de la síntesis de (p)ppGpp es la relación entre tRNAs aminoacilados y tRNAs libres (Haseltine y Bock, 1973). La presencia de tRNAs libres en el sitio A del ribosoma 50S detiene la síntesis de proteínas, con la consecuente activación de la enzima RelA para la síntesis de (p)ppGpp. Por este motivo, en condiciones de escasez nutricional, el aumento en la población de tRNAs libres provoca acumulación de (p)ppGpp.

Por otro lado, cuando *E. coli* se expone a diferentes clases de estrés físico-químico (etanol, H₂O₂ y agentes quelantes) también existe un aumento en el contenido intracelular de ppGpp (VanBogelen *et al.*, 1987).

En condiciones de estrés, ya sea nutricional o físico-químico, la acumulación de ppGpp provoca un cambio global en el metabolismo celular. Al conjunto de esos cambios se los conoce con el nombre de "**respuesta estricta**".

A partir del descubrimiento de la acumulación de nucleótidos de guanosina en respuesta al ayuno en nutrientes, se realizaron muchos estudios para esclarecer la acción de dichos efectores. Se encontró que estos nucleótidos modulan la transcripción de ciertos genes, algunos de los cuales codifican para reguladores globales, mediante la unión a las subunidades β y β' de la RNA polimerasa (Chatterji y Ojha, 2001). Asimismo, el (p)ppGpp también modula la competición de factores sigma alternativos por la unión al núcleo de la RNA polimerasa, y como resultado determina la abundancia relativa de las diferentes holoenzimas de la RNA polimerasa (Jishage *et al.*, 2002). El efecto neto de esta respuesta global es ejercer un efecto negativo sobre los procesos asociados con el crecimiento rápido, y regular positivamente la expresión de genes involucrados en la resistencia al estrés y en la búsqueda de nutrientes.

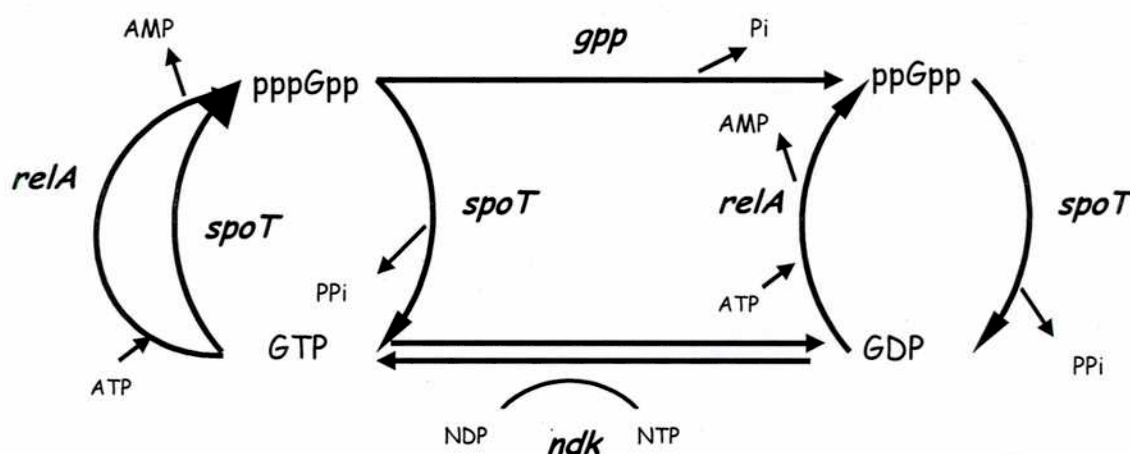


Figura 3. Rutas celulares del metabolismo del (p)ppGpp en *E. coli*. Las enzimas involucradas se representan con los nombres de sus genes estructurales y se muestran en negrita. *relA*: (p)ppGpp sintetasa I, *gpp*: (p)ppGpp 5'-fosfohidrolasa, *spoT*: (p)ppGpp 3'-pirofosfohidrolasa, *ndk*: nucleósido 5'-difosfato quinasa.

III.2. Rol del ppGpp en la expresión de *rpoS*

Existen varios trabajos realizados en *E. coli*, en los que se demostró que el ppGpp regula positivamente la expresión de *rpoS*. En condiciones de ayuno en nutrientes son dos las enzimas capaces de sintetizar este nucleótido, RelA y SpoT, de manera que únicamente las dobles mutantes *relA spoT* no poseen cantidades detectables de ppGpp. En dobles mutantes *relA spoT* de *E. coli*, se comprobó que existía una reducción de la actividad β -galactosidasa de fusiones *rpoS-lacZ*, así como también de los niveles de σ^S (Gentry *et al.*, 1993). Posteriormente se demostró, que en las células deficientes de ppGpp, la transcripción y la traducción de *rpoS* estaban desacopladas, lo cual provocaba una terminación temprana de la transcripción (Lange *et al.*, 1995). Trabajos recientes realizados en *E. coli*, demostraron que el papel principal del ppGpp era aumentar la expresión basal de *rpoS*, tanto durante la fase exponencial de crecimiento como durante la fase estacionaria (Hirsch y Elliot, 2002). Además, en esta bacteria, el ppGpp incrementa los niveles de σ^S a nivel post-transcripcional, probablemente debido a que este nucleótido es capaz de regular ciertos factores necesarios para la traducción de *rpoS* (Brown *et al.*, 2002).

Por otro lado, también se demostró que el ppGpp era necesario para la inducción de los promotores dependientes de RpoS, y que ciertas mutantes que desestabilizaban la formación de complejos transcripcionales con el factor *housekeeping* σ^{70} no requerían la presencia de este nucleótido para la inducción de los promotores dependientes de σ^S . Teniendo en cuenta que la holoenzima unida a σ^S ($E\sigma^S$) es capaz de reconocer las mismas secuencias consenso que la holoenzima unida a σ^{70} , se sugirió que el ppGpp era capaz de inducir un cambio estructural en la RNA polimerasa que permitía al factor σ^S competir con más éxito por la enzima (Kvint *et al.*, 2000).

En el género *Pseudomonas* no se han realizado muchos estudios sobre el efecto del ppGpp sobre σ^S . Un trabajo realizado en *P. aeruginosa* demostró que la sobreexpresión de *relA* activaba prematuramente la transcripción de *rpoS* (van Delden *et al.*, 2001).

IV. Los polihidroxicanoatos (PHAs)

IV.1. Generalidades

La gran mayoría de los seres vivos acumulan diferentes sustancias de reserva energética cuando existe un exceso de recursos en su entorno. Durante períodos de escasez nutricional estas sustancias de reserva son "consumidas" para poder sobrevivir. Esta estrategia de previsión de las condiciones futuras constituye una ventaja selectiva importante para la evolución y el mantenimiento de la vida en la Tierra.

Entre las sustancias de reserva acumuladas por los organismos procariotas se encuentran los polihidroxicanoatos (PHAs). Estos polímeros son acumulados por la mayoría de las bacterias en condiciones limitantes de nutrientes esenciales para el crecimiento (como ser nitrógeno combinado, sulfuro o fosfatos) y exceso en la fuente de carbono (Schlegel *et al.*, 1961). Cuando la fuente de carbono externa se agota, o si el nutriente limitante es suministrado nuevamente, el PHA es depolimerizado y posteriormente metabolizado como fuente de carbono y energía (Merrick y Doudoroff, 1964; Foster *et al.*, 1994).

Los PHAs se depositan intracelularmente en forma de cuerpos de inclusión y pueden llegar a representar más del 90% del peso seco celular (Figura 4).

El primer PHA en ser descubierto fue el poli(3-D-hidroxibutirato) (PHB), un homopolímero que fue aislado y caracterizado por Lemoigne (Lemoigne, 1926). Este polímero fue detectado por primera vez en *Bacillus megaterium*, encontrándose luego en una extensa variedad de especies bacterianas.

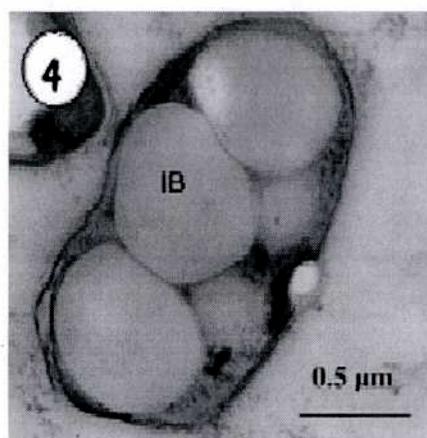


Figura 4. Gránulos de PHA en *P. putida*. IB, gránulo de PHA (*inclusion body*). Imagen tomada de Kinkle *et al.*, 2000.

IV.2. Estructura y propiedades de los PHAs

Los polihidroxicanoatos (PHAs) son polímeros lineales de (R)-3-hidroxiácidos (Figura 5). En estos polímeros, el grupo carboxilo de un monómero forma un enlace tipo éster con el grupo hidroxilo del monómero siguiente.

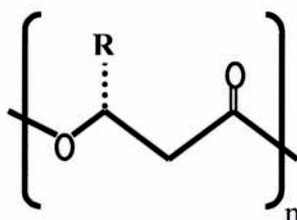


Figura 5. Estructura general de los polihidroxicanoatos.

Los PHAs pueden encontrarse como homopolímeros, polímeros integrados por hidroxiácidos idénticos, o como heteropolímeros formados por dos o más clases de monómeros diferentes. Existe una gran diversidad en cuanto a los ácidos hidroxicanoicos que integran los polihidroxicanoatos, lo cual determina que existan una enorme variedad de biopolímeros con propiedades físicas y químicas diferentes.

La composición monomérica de estos poliésteres depende de la cepa bacteriana que los sintetiza y de la fuente de carbono que se suministra para su acumulación. De acuerdo con el número de carbonos de sus monómeros constituyentes, los PHAs se clasifican en:

- PHA de longitud de cadena corta o PHA_{LCC}: Constituido por monómeros de 3 a 5 átomos de carbono.
- PHA de longitud de cadena mediana o PHA_{LCM}: Constituido por monómeros de 6 a 15 átomos de carbono.
- PHA de longitud de cadena larga o PHA_{LCL}: Constituido por monómeros de más de 15 átomos de carbono.

Los PHAs han cobrado una gran importancia durante los últimos años en el campo de la industria debido a sus propiedades termoplásticas. Por este motivo, han sido considerados como posibles sustitutos de los plásticos derivados del petróleo.

Además de sus propiedades termoplásticas, los PHAs poseen otras características interesantes: su biodegradabilidad y el hecho que pueden ser producidos a partir de recursos renovables. Su producción fermentativa utiliza productos derivados de la agricultura como fuente de carbono. En la naturaleza los microorganismos son capaces de degradar los PHAs, mediante la acción de PHA depolimerasas y PHA hidrolasas extracelulares, hasta CO₂ y agua. De esta manera, mientras que los plásticos derivados de hidrocarburos utilizan las escasas reservas petroquímicas del planeta, la producción de PHA se basa en la utilización de recursos renovables.

Sin embargo, la sustitución de los plásticos derivados del petróleo por los termoplásticos derivados de los PHAs no es aún redituable económicamente debido a los altos costos de manufactura de estos últimos. Por este motivo, gran parte de las investigaciones realizadas sobre los PHAs en los últimos años se han concentrado en reducir los costos de producción y aumentar la productividad utilizando diversas estrategias, entre las que se encuentran el rastreo de nuevas cepas productoras (Kranz *et al.*, 1997; Pettinari *et al.* 2001), la optimización de las estrategias de cultivo, (Durner *et al.*, 2001), la implementación del uso de sustratos de bajo costo (Pozo *et al.*, 2002), la generación de mutantes de alta capacidad de acumulación (Page *et al.*, 1992) y la producción de PHA utilizando cepas de *E. coli* recombinantes (Hang *et al.*, 2002).

IV.3. Síntesis y degradación de PHAs de cadena mediana (PHA_{LCM}) en *Pseudomonas*.

IV.3.1. Características de los PHA_{LCM}

Las mayoría de las especies de *Pseudomonas* sintetizan PHA_{LCM}. La composición monomérica está determinada por el sustrato agregado al medio de cultivo, lo cual a su vez determina las propiedades físicas y plásticas del material.

En particular, *P. putida* GPo1 cultivada con octano o ácido octanoico sintetiza un copolímero de 3-hidroxihexanoato y 3-hidroxi octanoato en una relación de 1:9 (Lageveen *et al.*, 1988).

Por otra parte, la capacidad de las *Pseudomonas* de incorporar una gran variedad de grupos funcionales a los PHAs extiende el rango de propiedades físicas y de aplicaciones de estos poliésteres.

IV.3.2. Biosíntesis de PHA_{LCM} en *P.putida* GPo1

Los PHAs de longitud de cadena mediana fueron descubiertos en 1983 cuando Witholt y colaboradores observaron, mediante microscopia electrónica, inclusiones intracelulares en *P. putida* GPo1 cultivada con octano como fuente de carbono (De Smet *et al.*, 1983). Esta bacteria es capaz de crecer con alcanos de largo de cadena mediana porque contiene un plásmido catabólico denominado OCT que codifica para enzimas involucradas en la oxidación de los alcanos (Grund *et al.*, 1975). Estudios posteriores demostraron que el PHA acumulado por *P. putida* GPo1 era un copolímero, y que su composición monomérica estaba directamente relacionada con la estructura del alcano o alqueno utilizado para su crecimiento (Brandl *et al.*, 1988; Lageveen *et al.*, 1988). Se observó que los monómeros constituyentes del PHA tenían el mismo largo que la fuente de carbono o se habían acortado en 2, 4 ó 6 átomos de carbono. La composición de los PHAs y su relación directa con el sustrato utilizado para el crecimiento, sugirió que la vía biosintética de los PHA_{LCM} era un camino metabólico derivado de la vía de oxidación de los ácidos grasos (Figura 6). En esta vía biosintética los ácidos grasos son degradados por remoción de unidades de C₂ como acetil-CoA. Los

acil-CoAs son oxidados a 3-cetoacilCoA vía intermediarios de 3-hidroxiacilCoA, que son utilizados como sustrato por la PHApolimerasa_{lcm} para sintetizar el polímero. La PHApolimerasa_{lcm} es específica para (R)-3-hidroxi-alcanoil-CoAs de C₆ a C₁₄, con preferencia por monómeros de C₈, C₉ y C₁₀ (Lageveen *et al.*, 1988).

En un trabajo posterior, se demostró que otras *Pseudomonas* fluorescentes pertenecientes al grupo de homología de rRNA I (Palleroni *et al.*, 1973), como *P. aeruginosa*, *P. fluorescens* y otra cepa de *P. putida* denominada KT2442, también eran capaces de producir PHA_{LCM} utilizando ácidos grasos como fuente de carbono (Huisman *et al.*, 1989).

La cepa GPo1 es incapaz de sintetizar PHAs a partir de fuentes de carbono no relacionadas, como ser carbohidratos. Esto es una característica excepcional, ya que todas las cepas de *Pseudomonas* fluorescentes pertenecientes al grupo de homología rRNA I analizadas hasta el momento, sintetizan PHA_{LCM} a partir de distintos hidratos de carbono (Haywood *et al.*, 1990; Timm y Steinbüchel, 1992). En un trabajo realizado con *P. putida* KT2440 cultivada con glucosa como fuente de carbono, se demostró que los monómeros utilizados para la síntesis de PHA provenían de intermediarios de la síntesis de novo de ácidos grasos (Huijberts *et al.*, 1994). Posteriormente se demostró que existía una proteína denominada PhaG, que tenía la función de transferir los (R)-3-hidroxiacil-ACP generados por la síntesis de novo de ácidos grasos a la coenzima A, produciendo de esta manera los (R)-3-hidroxiacil-CoA utilizados para la síntesis de PHA (Rehm *et al.*, 1998). Lo mismo se encontró luego en *P. aeruginosa* (Hoffmann *et al.*, 2000). El gen que codifica para la enzima PhaG está presente en *P. putida* GPo1, pero aparentemente el gen no se expresa en presencia de glucosa (Hoffmann *et al.*, 2000).

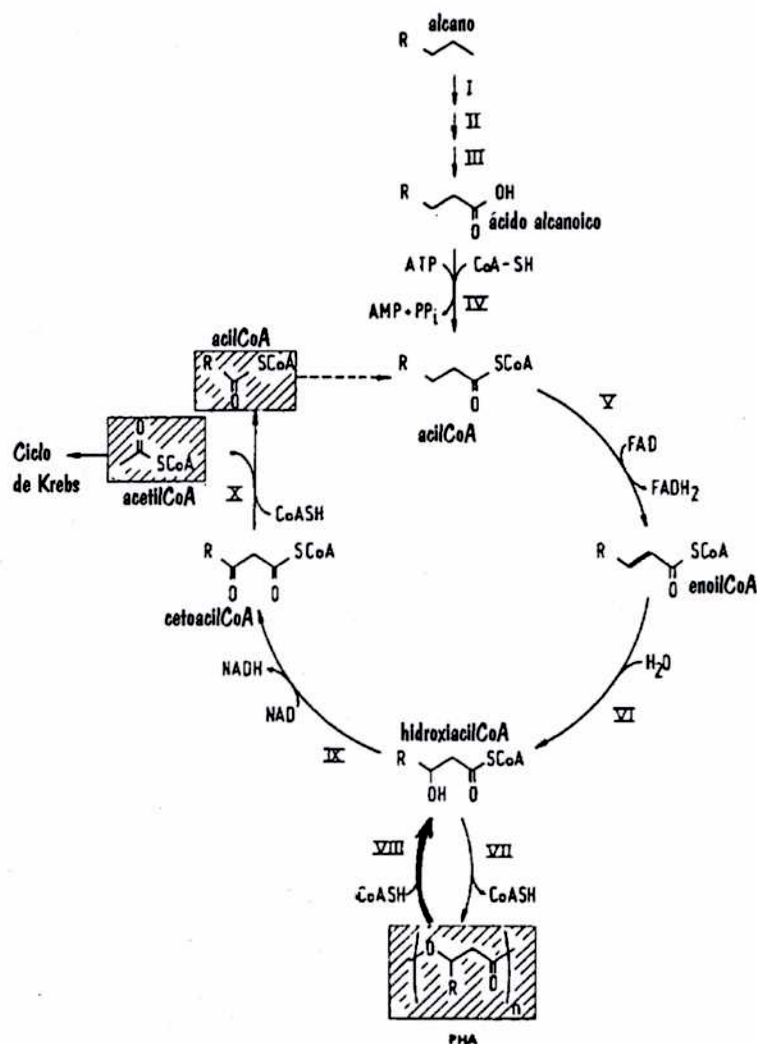


Figura 6. Ruta de síntesis de PHA en *P. putida* GPo1 cuando se cultiva con *n*-alcanos o 1-alquenos como fuente de carbono. I. alcano hidrolasa, II. alcanoal deshidrogenasa, III. alcanoal deshidrogenasa, IV. acilCoA sintetasa, V. acilCoA deshidrogenasa, VI. enoilCoA hidratasa, VII. PHA sintetasa, VIII. PHA depolimerasa, IX. 3-hidroxiacilCoA deshidrogenasa, X. 3-cetoacilCoA tiolasa. (Lageveen *et al.*, 1988).

IV.3.3. Genes involucrados en la síntesis de PHA_{LCM} en *P. putida* GPo1

En *P. putida* GPo1 (Huisman *et al.*, 1991) los genes involucrados en la síntesis de PHA se encuentran agrupados en el locus *pha*. Este locus consta de seis genes (Figura 7):

- Los genes *phaC1* y *phaC2*, que codifican para dos PHA sintetisas o PHA polimerasas. Ambas enzimas poseen una muy pequeña diferencia en cuanto a la especificidad de sustrato (Huisman *et al.*, 1992).

- El gen *phaZ*, que codifica para una PHA depolimerasa intracelular (Huisman *et al.*, 1992).

- El gen *phaD*, que codifica para una proteína de función desconocida, pero con un papel importante en la biosíntesis del PHA, ya que mutantes de *P. putida* deficientes en esta proteína acumulan un 20% menos de PHA_{LCM} que la cepa salvaje (Klinke *et al.*, 2000).

- El gen *phaF*, que actúa como un regulador de la transcripción de los genes *pha* (Prieto *et al.*, 1999).

- El gen *phaI*, con función desconocida hasta el momento (probable función regulatoria) (Prieto *et al.*, 1999).

Existen dos promotores que se encuentran río arriba del gen *phaC1* que tienen secuencia consenso para promotores dependientes de σ^{70} y σ^{54} (Huisman *et al.*, 1991) (Región *Pc_I* en Figura 7). No se sabe con exactitud si esta región promotora dirige únicamente la expresión del gen *phaC1* o de todos los genes *pha* como si fuera un operón. Existen evidencias que indican que los genes *phaC1* y *phaZ* se transcribirían en la misma unidad, pero como también se han encontrado transcritos del tamaño del gen *phaC1* solamente, se sugirió que parte del transcripto finaliza al final del gen *phaC1* y otra parte continua hasta el final del gen *phaZ* (Prieto *et al.*, 1999).

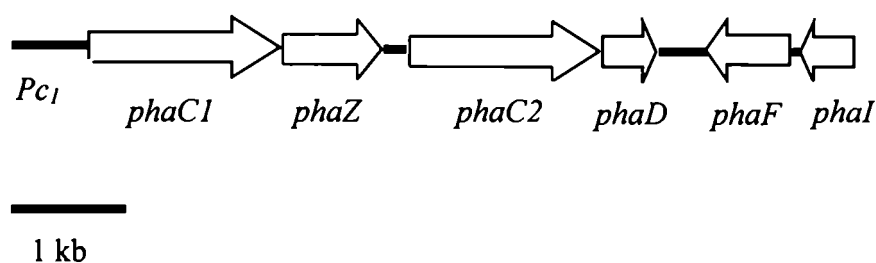


Figura 7. Organización de los genes *pha* en *P. putida* GPO1.

IV.3.4. Proteínas asociadas al gránulo de PHA en *P. putida* GPo1

Los gránulos de PHA se encuentran formados por poliésteres, proteínas y lípidos. Según un trabajo de Witholt y colaboradores realizado en *P. putida* GPo1 los gránulos nativos de PHA se encuentran rodeados por una monocapa lipídica en la cual se encuentran inmersas las enzimas PHA polimerasas y la PHA depolimerasa (Preusting *et al.*, 1991). El análisis de las inclusiones de PHA en distintas especies bacterianas confirmó este modelo de monocapa (Mayer y Hoppert, 1997). Además de estas enzimas, existen otras proteínas denominadas phasinas que forman una capa proteica en la superficie del gránulo que funciona como interface entre el citoplasma hidrofílico y el centro hidrofóbico de las inclusiones de PHA (Fuller *et al.*, 1992).

IV.3.5. Metabolismo del PHA en *Pseudomonas* - Factores involucrados en la Regulación.

La regulación del metabolismo del PHA puede tener lugar a distintos niveles:

- Activación de la expresión de los genes *pha* por señales ambientales, tales como escasez de nutrientes.
- Activación de las enzimas involucradas en la síntesis de PHA por componentes celulares específicos o metabolitos intermediarios.
- Inhibición de las enzimas que intervienen en vías metabólicas competitivas, lo cual resulta en un enriquecimiento de intermediarios que son utilizados para la síntesis de PHA.
- Una combinación de todos los anteriores.

IV.3.5.1. Regulación de los genes *pha* a nivel transcripcional

La bacteria *P. putida* GPo1 acumula PHA solamente cuando se le suministran alcanos o ácidos alcanóicos en exceso y en condiciones de limitación de algún nutriente esencial para el crecimiento (De Smet *et al.*, 1983). Los porcentajes más altos de acumulación de PHA se encontraron cuando se utilizó nitrógeno como nutriente

limitante (Lageveen *et al.*, 1988). Además de la limitación de nitrógeno, la activación del promotor que dirige la expresión de los genes involucrados en la síntesis de PHA depende de la fuente de carbono presente en el medio de cultivo. Cuando se utiliza glucosa o ácido cítrico el promotor se encuentra poco activado. Su actividad aumenta marcadamente en presencia de alcanos, ácidos alcanoicos u otros sustratos relacionados con los monómeros constituyentes del PHA.

Witholt y colaboradores encontraron una proteína denominada PhaF que estaría involucrada en la regulación transcripcional de los genes *pha*. Según el modelo esquematizado en la Figura 8, la proteína PhaF se une al DNA en ausencia de sustratos necesarios para la síntesis de PHA, inhibiendo la transcripción de los genes *pha*. En presencia de ácido octanoico, la proteína PhaF se une a los gránulos de PHA en formación, despegándose del DNA, lo cual aumenta la expresión de los genes *pha*. (Prieto *et al.*, 1999).

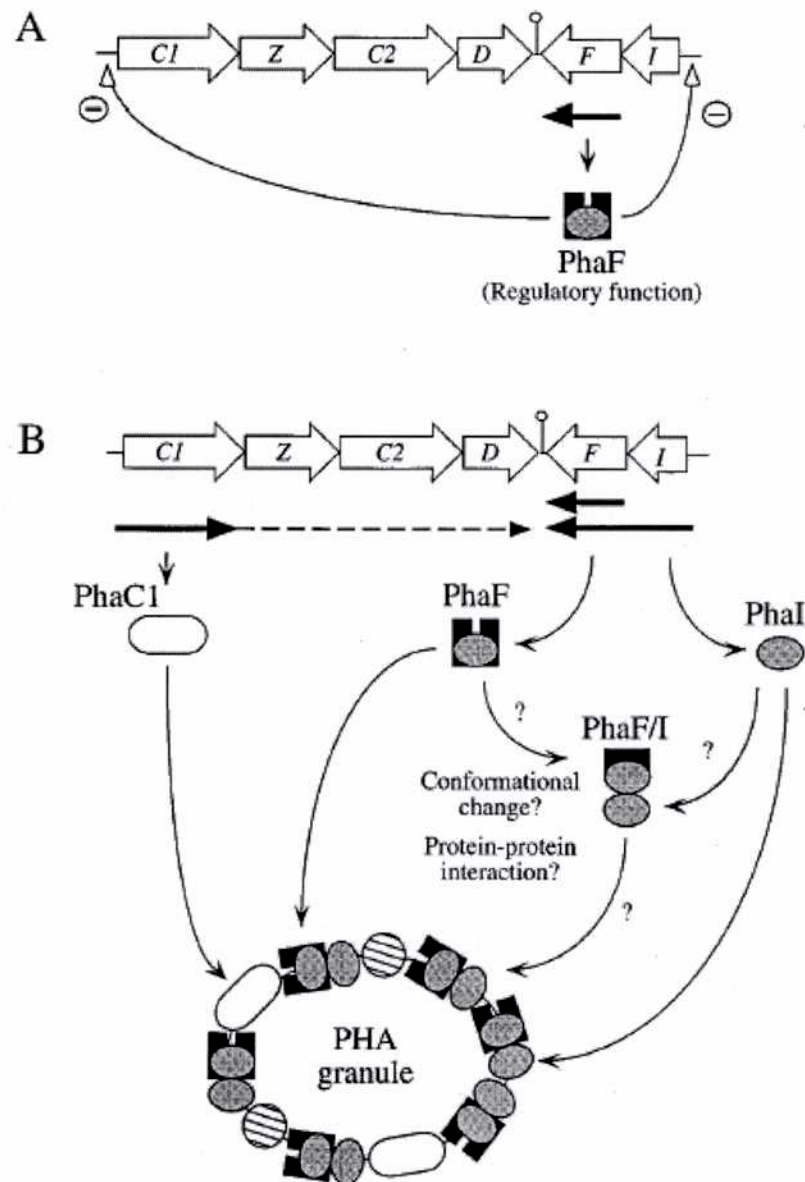


Figura 8. Modelo hipotético de regulación de los genes *pha* propuesto por Prieto *et al.* En la parte A se representa la función represora de la proteína PhaF que ocurre cuando *P. putida* GPo1 se cultiva con sustratos que no pueden ser utilizados para la síntesis del polímero. En la parte B se representa la inducción de la expresión de los genes *phaC1*, *phaI* (este último de función desconocida) y *phaF* en presencia de ácido octanoico, y la asociación posterior de las proteínas codificadas por dichos genes a los gránulos de PHA. En flechas negras, se encuentran dibujados los transcritos *phaC1*, *phaF* y *phaI*. Las flechas discontinuas representan eventos improbables. Los círculos rayados en los gránulos de PHA representan a la proteína PhaC2, y los círculos sombreados a la proteína PhaZ.

IV.3.5.2. Regulación de la degradación de PHA.

Los primeros trabajos en los cuales se estudió la degradación de PHA en *Pseudomonas* demostraron que estas bacterias reprimían la expresión del gen que codifica para la PHA depolimerasa en presencia de una fuente de carbono soluble que les permitiera el crecimiento a altas velocidades. Una vez que los nutrientes se agotaban, cesaba la represión de la síntesis de la PHA depolimerasa (Schirmer *et al.*, 1993; Foster *et al.*, 1995). Sin embargo en *P. putida* GPo1 se encontró que la inhibición de la síntesis de proteínas no afectaba la degradación de PHA, por lo cual se sugirió que la PHA depolimerasa se encontraba siempre presente y activa, y que el polímero era sintetizado y degradado de manera simultánea (Zinn, 1998). Doi obtuvo una conclusión similar con respecto al metabolismo del PHA en la bacteria *Ralstonia eutropha* (Doi, 1995). En trabajos más recientes, se encontraron resultados que indicarían que durante la síntesis de PHA la enzima PHA depolimerasa se encuentra siempre activa en distintos grados (Prieto *et al.*, 1999; Klinke *et al.*, 2000).

V. Importancia de la utilización del PHA en la supervivencia bacteriana y en la resistencia al estrés.

La acumulación y posterior degradación de polímeros de reserva intracelulares, tales como los PHA, ha sido considerada una estrategia utilizada por las bacterias para incrementar su supervivencia en ambientes cambiantes. Los PHAs son utilizados como fuente de carbono y energía en condiciones de escasez de nutrientes (Matin *et al.*, 1979; Kjelleberg *et al.*, 1993), como fuente de carbono y energía para el enquistamiento y la esporulación (Anderson y Dawes, 1990), para la degradación de compuestos tóxicos (Godoy *et al.*, 2003), y como fuente de poder reductor (Henrysson y McCarty, 1993).

En caso de agotamiento de la fuente de carbono externa, tanto las *Pseudomonas* como aquellas otras bacterias capaces de sintetizar PHA pueden recurrir a la degradación del polímero previamente acumulado. Hayward y colaboradores (1959) observaron que el contenido intracelular de PHA de especies de *Pseudomonas*, *Rhizobium* y *Spirillum* alcanzaba un máximo y luego disminuía cuando la bacteria alcanzaba la fase estacionaria del crecimiento.

Trabajos realizados en el laboratorio con cepas salvajes y deficientes en la síntesis de PHB de *Ralstonia eutropha* y *Bacillus megaterium*, demostraron que aquellas cepas capaces de sintetizar el polímero de reserva tenían mayor supervivencia en agua de río y mayor capacidad de competencia con las bacterias autóctonas, que sus correspondientes mutantes (López *et al.*, 1995). Conclusiones similares se obtuvieron cuando se analizó la supervivencia de *B. megaterium* utilizando microcosmos de suelo (López *et al.*, 1998). Estos experimentos sugirieron que la síntesis y utilización del polímero disminuía la supervivencia y la capacidad de competencia bacteriana en ambientes naturales. A partir de estos resultados, se decidió analizar el efecto de la degradación de PHA en la supervivencia. Para esto, se comparó la supervivencia en agua de río de una cepa salvaje de *P. putida*, con la supervivencia de una cepa mutante en la enzima PHA depolimerasa. Los resultados obtenidos con estas cepas demostraron que la incapacidad de degradación de PHA representaba una desventaja para la supervivencia, tanto en agua de río estéril, como en agua de río con la comunidad bacteriana natural (Ruiz *et al.*, 1999). Además se comprobó que la deficiencia en la capacidad de degradación de PHA, tenía un efecto negativo sobre el desarrollo de resistencia al estrés. Se observó que la mutante deficiente en la depolimerasa de PHA mostraba una menor supervivencia a la exposición al etanol y al estrés térmico luego de varios días de permanencia en agua de río. Dado que, tanto la entrada en la fase estacionaria como las condiciones de deficiencias nutricionales encontradas en el ambiente confieren resistencia a múltiples agentes de estrés, los resultados obtenidos con las cepas de *P. putida* indicaban que existiría una alteración en la respuesta al estrés ante la incapacidad de utilizar PHA.

VI. Hipótesis de trabajo

Los resultados descriptos en la sección anterior, demuestran que los PHAs juegan un papel importante en la supervivencia bacteriana ante condiciones de limitación de nutrientes como las que existen en ambientes naturales. Sin embargo, se desconocen los mecanismos mediante los cuales la capacidad de utilización de PHA favorecería la supervivencia de las bacterias ante condiciones desfavorables. Resultados obtenidos por

Hippe en 1967, sugirieron que existía una asociación entre la utilización de PHA y la fosforilación oxidativa.

Considerando que el ppGpp es una molécula involucrada en la respuesta desencadenada ante condiciones de estrés, y teniendo en cuenta los resultados de Hippe y los resultados del laboratorio que indicaban que la utilización de PHA incrementaba notoriamente la resistencia a estrés, se estableció la siguiente hipótesis de trabajo: En condiciones de estrés nutricional la energía derivada de la degradación de PHA podría ser utilizada para la síntesis de nucleótidos, entre ellos la alarmona ppGpp, lo cual provocaría un incremento en los niveles intracelulares de dicha molécula. A su vez, niveles más elevados de ppGpp podrían traducirse en mayor inducción de σ^S , lo cual tendría como resultado una mayor tolerancia al estrés.

Materiales y Métodos

I. Cepas bacterianas y plásmidos utilizados

Durante el desarrollo del trabajo experimental se utilizaron cepas de *Escherichia coli*, *Pseudomonas putida* y *Salmonella thyphimurium*.

La cepa de *S. thyphimurium* se utilizó como control en los experimentos de cuantificación de ppGpp.

El genotipo de las distintas cepas bacterianas se detalla en la Tabla 3. Las características de los plásmidos utilizados en este trabajo se mencionan en la Tabla 4.

Tabla 3. Cepas utilizadas

Cepa	Características relevantes	Referencia y/o fuente
<i>P. putida</i>		
GPO1	plásmido OCT, PHA ⁺	Schwartz y McCoy, 1973
GPO500	Mutante <i>phaZ</i> de GPO1. Incapaz de degradar PHA.	Huisman <i>et al.</i> , 1991
GPO1 50-9	Mutante <i>rpoS</i> de GPO1. Obtenida por interrupción del gen con un casete de kanamicina.	Este trabajo
KT2440	<i>hsdMR</i>	Franklin, <i>et al.</i> , 1981
<i>E. coli</i>		
DH5 α	<i>recA1</i> , Δ <i>lacU169</i> , ϕ 80 <i>lac</i> Δ (<i>lacZ</i>)M15	Bethesda Research Laboratories
S17-1	<i>recA</i> , <i>pro</i> , <i>thi</i> . Contiene los genes <i>tra</i> del plásmido RP4 integrados al cromosoma.	Simon <i>et al.</i> , 1983
CC118 λ pir	Δ (<i>ara-leu</i>) <i>araD</i> Δ <i>lacX74</i> <i>galE</i> <i>galK</i> <i>phoA</i> <i>thi-1</i> <i>rpsE</i> <i>rpoB</i> <i>argE</i> (Am) <i>recA1</i> . Lisógena para λ pir	Herrero <i>et al.</i> , 1990
S17-1 λ pir	Tp ^r Sm ^r <i>hsdR</i> M ⁺ , RP4::2-Tc::Mu::Km Tn7 Lisógena para el fago λ pir	de Lorenzo y Timmis, 1994
M15	Sm ^r <i>thi mtl</i> Δ <i>lac</i>	Qiagen
<i>S. thyphimurium</i>		
<i>argC95</i>	<i>argC95</i>	Sanderson y Roth, 1988

OCT: plásmido natural que permite el crecimiento con alcanos de 6 a 12 carbonos.

Tabla 4. Plásmidos utilizados

Plásmido	Características relevantes	Referencia y/o fuente
pGEc422	Inserto de 3,1 kb con los genes <i>phaC1</i> y <i>phaZ</i> de <i>P. putida</i> GPo1 en pGEM-7Zf(+). Amp ^r	Huisman <i>et al.</i> , 1991
pBBR1MCS-2	Amplio rango de huésped, <i>lacPOZ'</i> , <i>mob</i> RP4, Km ^r	Kovach <i>et al.</i> , 1995
pKNG101	<i>oriR6K</i> , <i>mob</i> RK2, <i>sacBR</i> , <i>luxAB</i> Amp ^r , Sm ^r	Kaniga <i>et al.</i> , 1991
pUC4K	Vector de clonado con el gen Km ^r de Tn903, Amp ^r , Km ^r	Vieira y Messing (1982)
pGEM-T easy	Vector de clonado para productos de PCR, Amp ^r	Promega
pQE31	ColE1, vector de expresión His ₆ , Amp ^r	Qiagen
pREP-4	<i>lacI</i> , replicón p15A, Km ^r	Qiagen
pmPpCZ	pBBR1MCS-2 con el fragmento <i>EcoRI</i> - <i>ClaI</i> de pGEc422 que contiene a los genes <i>phaC1</i> y <i>phaZ</i> de <i>P. putida</i> GPo1.	Este trabajo
pGrpoSKT2440	pGEM-T easy con el fragmento de 1,2 kb que contiene al gen <i>rpoS</i> de <i>P. putida</i> KT2440, obtenido mediante PCR.	Este trabajo
pGrpoSKT2440 (BK)	pGEM-T easy con el gen <i>rpoS</i> de <i>P. putida</i> KT2440 (1kb) obtenido mediante PCR con los cebadores con sitios de restricción para <i>BamHI</i> y <i>KpnI</i> .	Este trabajo
pGrpoS::Km ^r	pGrpoSKT2440 con el gen <i>rpoS</i> interrumpido en el sitio <i>PmlI</i> por el casete de Km del pUC4K.	Este trabajo
pKNGrpoS::Km ^r	pKNG101 con el fragmento de 2,2 kb <i>ApaI</i> - <i>SalI</i> de pGrpoS:: Km ^r	Este trabajo
pGrpoSGPo1	pGEM-T easy con el fragmento de aproximadamente 1,6 kb del gen <i>rpoS</i> de <i>P. putida</i> GPo1 amplificado por PCR.	Este trabajo
pQrpoS	pQE31 con el fragmento <i>BamHI</i> - <i>KpnI</i> de pGrpoSKT2440(BK).	Este trabajo

II. Medios de cultivo y condiciones de crecimiento

La composición de los medios de cultivo utilizados para el crecimiento de *E. coli* o *Pseudomonas* sp. se detallan en el Anexo, al igual que la composición de los todos los *buffers* y soluciones utilizadas durante el desarrollo del trabajo experimental.

II.1. Medios de cultivo y condiciones de crecimiento para *Escherichia coli*.

Las cepas de *E. coli* se cultivaron en medio LB agar o LB caldo con agitación a una temperatura de 37°C. Cuando fue necesario se agregaron los siguientes antibióticos: Amp 100 µg/ml, Km 50 ó 25 µg/ml, Sm 100 µg/ml.

II.2. Medios de cultivo y condiciones de crecimiento para *Pseudomonas putida*.

II.2.1. Condiciones generales

Para el crecimiento de las cepas de *Pseudomonas putida* se utilizaron los siguientes medios: LB, CN, ME, 0,5NE₂ y 0,5NE₂P. Los medios: ME, 0,5NE₂ y 0,5NE₂P se suplementaron siempre con caprilato (octanoato) de sodio 0,5 ó 0,25%, según el caso.

Para el crecimiento de las cepas portadoras de plásmidos el medio fue suplementado con Km a una concentración de 50 µg/ml para el caso de los medios ricos y 10µg/ml ó 25 µg/ml en los medios mínimos.

Los cultivos líquidos se realizaron en Erlenmeyers, con agitación y a una temperatura de 32°C.

Para el crecimiento en placa, las bacterias se incubaron a 32°C durante toda la noche en Agar Nutritivo o durante 48 hs en ME sólido suplementado con caprilato de sodio 0,25%.

II.2.2. Condiciones particulares según el experimento

II.2.2.1. Cultivos de *P. putida* para medición de ppGpp y ATP.

Se utilizaron como inóculo 2 ó 3 colonias crecidas en una placa de ME caprilato de sodio 0,25%, para realizar un precultivo de 25 ml del mismo medio en Erlenmeyers de 250 ml. Luego de 24 horas de incubación estos precultivos fueron utilizados para inocular los cultivos en los cuales se llevaron a cabo las mediciones de contenido intracelular de nucleótidos, proteínas y PHA. Los mismos se realizaron en Erlenmeyers de 1 litro con 250 ml de medio 0,5NE₂P con caprilato de sodio 0,25% y se crecieron con agitación constante a 300 rpm.

El medio 0,5NE₂P posee una concentración de nitrógeno limitante, lo cual junto con la utilización del caprilato de sodio como única fuente de carbono favorece la acumulación de PHA. Además, posee una baja concentración de fosfatos, lo cual lo hace un medio apropiado para realizar marcaciones con ³²P.

II.2.2.2. Condiciones de crecimiento de *P. putida* GPo500 para aislamiento de PHA.

Se realizaron cultivos de 10 ml en ME 0,5% caprilato de sodio que fueron crecidos durante toda la noche. La totalidad del cultivo se utilizó para inocular 100 ml de otro cultivo en el mismo medio, el cual se incubó durante 24 horas. A continuación, con este cultivo se inoculó 1 litro de 0,5NE₂ caprilato de sodio 0,5%. Luego de 24 horas de crecimiento a 32°C, las células se centrifugaron, se lavaron con solución fisiológica (cloruro de sodio 0,09%) y se guardaron toda la noche a -70°C para su posterior liofilización.

II.2.2.3. Curvas de crecimiento en ME suplementado con caprilato de sodio 0,25% ó 0,5%.

Para inocular los cultivos en ME suplementado con caprilato de sodio, se utilizaron precultivos crecidos en el mismo medio durante toda la noche. Los cultivos se inocularon de manera de tener una DO_{580nm} inicial menor a 0,1. A intervalos regulares de tiempo se tomaron muestras a las cuales se les determinó la DO_{580nm} y en algunos

casos también se realizó el recuento en placa para determinar el número de ufc/ml. Los volúmenes de las muestras extraídas no superaron el 0,5% del total.

II.2.2.4 Curvas de crecimiento en CN.

Se realizaron precultivos en CN crecidos durante toda la noche para inocular los cultivos del mismo medio en los cuales se llevaron a cabo las mediciones de DO_{580nm} a distintos intervalos de tiempo. Las muestras de los cultivos no superaron el 0,5% del volumen total.

II.2.2.5 Cultivos para ayuno en carbono

Las células se cultivaron en 10 ml de ME con caprilato de sodio 0,25% durante toda la noche. A la mañana siguiente, este cultivo se utilizó para inocular 110 ml de ME caprilato de sodio 0,25% en Erlenmeyers de 500 ml, de manera de obtener una DO_{580nm} inicial menor a 0,1. Los cultivos se crecieron hasta la fase estacionaria temprana ($DO_{580nm} \cong 0,8$) con agitación constante a 300 rpm.

Para realizar el ayuno en carbono se procedió de la siguiente manera: se centrifugaron 100 ml de cultivo a 6000 rpm, se lavó el *pellet* con ME sin el agregado de fuente carbonada y se resuspendió en 100 ml del mismo medio. Las bacterias se incubaron en Erlenmeyers de 500 ml a 32°C con agitación constante a 400 rpm.

II.3. Mantenimiento de cepas

Las cepas de *E.coli* se conservaron en punciones de LB agar blando a temperatura ambiente o congeladas a -20°C en LB caldo suplementado con 15% de glicerol.

Las cepas de *Pseudomonas* sp. se conservaron en punción a temperatura ambiente y congeladas a -70°C en LB caldo o ME con caprilato de sodio 0,25%, con el agregado de glicerol en el caso de la conservación en frío.

III. Ensayos de resistencia a estrés

Estos ensayos se realizaron con cultivos de *P. putida* en fase exponencial o estacionaria, así también como con células de *P. putida* expuestas a condiciones de ayuno en carbono a diferentes tiempos (tal como se describió en la sección II.2.2.5).

III.1. Ensayos de resistencia a estrés oxidativo

III.1.1. Ensayos de resistencia por recuento en placa

Se tomó 1 ml de cada cultivo y se diluyó 10^3 veces en ME sin citrato. Al tiempo cero del experimento, las células fueron diluidas diez veces más en ME sin citrato con 3mM de H_2O_2 (Merck). La exposición al agua oxigenada se realizó a 30°C en tubos Eppendorf. Se tomaron alícuotas de 0,1 ml de dichas diluciones a distintos tiempos y se sembraron por triplicado en placas de Agar Nutritivo que se incubaron a 32°C durante 48 hs. Posteriormente se realizó el recuento de células viables a partir del número de unidades formadoras de colonias (ufc).

III.1.2. Ensayos de resistencia por tamaño del halo de inhibición

Para probar la sensibilidad al H_2O_2 de la cepa *P. putida* 50-9 se utilizaron cultivos en fase exponencial ($DO_{580nm} \cong 0,3$) o estacionaria ($DO_{580nm} \cong 1,0$), crecidos en LB a 32°C. Alícuotas de 0,1 ml de estos cultivos se sembraron en placas de LB. En el centro de cada placa sembrada, se colocó un disco estéril de 6 mm de papel Whatman impregnado en 0,01 ml de una solución 3mM de H_2O_2 . Luego de 24 hs de incubación a 32°C se midió el tamaño del halo formado alrededor del disco (halo de inhibición), lo cual se tomó como medida de la sensibilidad al agente oxidante.

III.2. Ensayos de resistencia a estrés térmico

Se diluyó 1 ml de cultivo 10^3 veces en ME sin citrato precalentado a 30°C. Al tiempo cero del experimento las células se diluyeron diez veces más en ME sin citrato precalentado a 47°C. Se tomaron alícuotas de 0,1 ml de las diluciones a diferentes tiempos y después se procedió como se describió en la sección III.1.1.

IV. Cuantificación de ppGpp y ATP

IV.1. Marcado de cultivos

IV.1.1 Marcado de cultivos de *P. putida*

A distintos tiempos, se tomaron alícuotas de 1 ml de los cultivos parentales indicados en II.2.2.1, que se incubaron en presencia de 0,1 mCi/ ml de $[^{32}\text{P}]\text{Na}_2\text{HPO}_4$ durante 2 horas a 32°C para permitir la síntesis de compuestos de fósforo-32.

IV.1.2. Marcado del cultivo de *Salmonella typhimurium argC95*.

La cepa *S. typhimurium argC95* se utilizó para identificar la mancha correspondiente al ppGpp. Al ser esta cepa auxótrofa para arginina, la ausencia de dicho aminoácido en el medio incrementa fuertemente la síntesis de ppGpp por inducción de la respuesta estricta.

Se utilizó la técnica de marcación de Cashel (1969), empleando cepas cultivadas de acuerdo al protocolo de Bochner y Ames (1982). Se partió de un cultivo estacionario en medio MOPS (Ver anexo) adicionado con 0,04% de glucosa, 0,2M de fosfato de potasio y 20µg/ml de arginina crecido a 37°C, sin agitación. Este cultivo se diluyó al 20% con medio MOPS fresco suplementado como se indicó arriba y se incubó a 37°C durante aproximadamente 3,5 hs ($\text{DO}_{580\text{nm}} \cong 0,4 - 0,5$). Luego se tomaron 3 ml de dicho cultivo, que se dividieron en dos tubos Eppendorf. Las células se lavaron con MOPS, glucosa 0,4%, 0,2 mM fosfato de potasio, con o sin el agregado de 20 µg/ml de arginina. A

continuación, se volvieron a centrifugar y se resuspendieron en el mismo medio de lavado, con o sin el agregado de arginina a una $DO_{580nm} = 1,5$. Se tomaron 0,2 ml de esta suspensión y se agregó 1 ml de MOPS con 0,4% de glucosa, 0,2 mM de fosfato y 30 $\mu\text{Ci/ml}$ de $[^{32}\text{P}]\text{Na}_2\text{HPO}_4$, en presencia o ausencia de arginina. Los cultivos se incubaron a 37°C durante 30 minutos con agitación.

IV.2. Preparación del extracto ácido y corrida de las muestras

Se realizó una extracción con ácido fórmico de las células marcadas según lo detallado en IV.1.1 y IV.1.2. Para esto, a 0,2 ml de los cultivos marcados se agregaron 0,02 ml de ácido fórmico 11N y se incubó en hielo durante 30 minutos. El extracto se centrifugó durante 5 minutos a 12000 rpm a 4°C y el sobrenadante se sembró en placa de polietileniminocelulosa utilizando fosfato de potasio 1,5 M pH 3,4 como *buffer* de corrida. Una vez finalizada la cromatografía, la placa se secó y se expuso durante 24 hs a una placa radiográfica.

Las manchas correspondientes a ppGpp y ATP fueron identificadas, recortadas de la placa y posteriormente cuantificadas utilizando un contador de centelleo Metrolab Modelo 3000. La mancha correspondiente al ppGpp se identificó como se indicó en IV.1.2 y la correspondiente al ATP fue ubicada en la placa de acuerdo al trabajo de Bochner y Ames (1982).

V. Extracción, detección y cuantificación de PHA

V.1. Tinciones específicas para visualizar las inclusiones de PHA: Coloración fluorescente con Azul del Nilo A (Nile Blue A)

El colorante Azul del Nilo A es una oxazina básica soluble en agua y en alcohol etílico. La forma oxazona (Nile pink) se forma por la oxidación espontánea del Azul del Nilo A en solución acuosa, y es soluble en lípidos neutros que se encuentran en estado líquido a la temperatura de la coloración (Ostle y Holt, 1982).

El procedimiento utilizado para la coloración fue el siguiente:

Se coloreó con una solución acuosa al 1% de Azul del Nilo A (Sigma) un extendido de células, sumergiendo el portaobjetos en jarritos “coplin” con el colorante a 55°C durante 10 minutos.

Luego de eliminar con agua corriente el exceso de colorante se lavó con solución acuosa de ácido acético al 8% durante 1 minuto y se dejó secar. Se observó el preparado re-hidratado y cubierto con cubreobjeto al microscopio bajo una longitud de onda de 460 nm.

Los gránulos de PHA se observaron como partículas fluorescentes de color naranja brillante.

V.2. Extracción de PHA de *P. putida* GPo500

Debido a que no se contaba con un patrón de PHA de C-6 y C-8, como el producido por *P. putida* durante el crecimiento con caprilato de sodio, se procedió a realizar el aislamiento de dicho polímero a partir de cultivos de *P. putida* GPo500 para poder utilizarlo posteriormente como patrón para la cuantificación del contenido intracelular de PHA mediante cromatografía gaseosa. La purificación se realizó a partir de la cepa deficiente en la enzima PHA depolimerasa, ya que la incapacidad para degradar el polímero permitía un mayor porcentaje de acumulación.

El protocolo utilizado fue similar al realizado por Lageveen *et al.* (1998) con algunas modificaciones. El PHA se extrajo a partir de 2 g. de células liofilizadas utilizando cloroformo como solvente y utilizando un aparato de extracción Soxhlet. La suspensión se mantuvo en reflujo durante 8 horas. Luego, se dejó enfriar a temperatura ambiente y se pasó por un filtro de celulosa para eliminar los restos celulares. A continuación, el extracto se evaporó en Rotavap hasta un volumen de 10 ml, aproximadamente. Posteriormente se colocó la mezcla en un vaso de precipitados, se agregaron 10 vol. de etanol y se dejó precipitando durante toda la noche. Al día siguiente, se eliminó el sobrenadante y se dejó en la estufa para eliminar el etanol. Luego el precipitado se disolvió en 10 ml de cloroformo y se colocó en una placa de Petri de vidrio. Al día siguiente se obtuvo una película transparente del polímero.

V.3. Cuantificación de PHA

Para cuantificar el contenido de PHA intracelular, las muestras fueron sometidas a metanólisis para formar los correspondientes monómeros esterificados (Brandl *et al.*, 1988) y luego analizadas mediante cromatografía gaseosa (Braunegg *et al.*, 1978).

V.3.1. Preparación y metanólisis de las muestras

Los *pellets* de las muestras a analizar fueron liofilizados, realizándose luego el cálculo del peso seco para cada uno de ellos. Al mismo tiempo se pesó 1 g de PHA (obtenido como se indicó en V.2) para preparar el patrón de corrida. A las muestras y al patrón se les agregó 1 ml de una solución 15% de H₂SO₄ concentrado en metanol y luego 1 ml de cloroformo. Esta mezcla se incubó durante 140 minutos a 100°C, luego de lo cual se agregaron 0,5 ml de agua destilada y se mezcló agitándose vigorosamente durante 20 segundos. Se dejó en reposo hasta que se separaron las fases y se transfirió la fase orgánica a otro tubo que se guardó a -20°C hasta el momento de la corrida cromatográfica.

V.3.2. Análisis por cromatografía gaseosa

Los productos de la metanólisis fueron analizados por separación isotérmica en columna de vidrio de 1,80 m rellena con 10% Carbowax 20M-TPA en Chromosorb W-AW de malla 80/100.

Se utilizó un cromatógrafo Gow-Mac serie 550, equipado con ionizador de llama. Como gas transportador se empleó nitrógeno a un flujo de 25 ml/min., siendo las temperaturas del inyector, columna y detector 200°C, 170°C y 230°C, respectivamente. Los datos fueron analizados mediante un integrador Spectraphysics. La cuantificación se realizó por comparación de las áreas de los picos obtenidos en las muestras con la solución patrón de PHA.

VI. Manipulación de proteínas

VI.1. Preparación de extractos celulares

Los *pellets* se lavaron con *buffer* fosfato 100mM - pH 7,5 (Na_2PO_4 87mM, KH_2PO_4 13 mM), se centrifugaron a 12000 rpm durante 5 minutos y se resuspendieron en 1 ml del mismo *buffer* al cual se le adicionó PMSF (fluoruro de fenilmetilsulfonilo) a una concentración final 1mM. La ruptura de las células se realizó por sonicación (Ultrasonic Homogenizer - Cole Parmer Instrument Co, Chicago, USA). Se utilizaron seis rondas de sonicación de 10 segundos cada una, con intervalos de 10 segundos a 4°C entre cada una de ellas.

Para eliminar los restos celulares, los extractos se centrifugaron a 12000 rpm durante 30 minutos a 4°C. Los lisados se conservaron a -70°C hasta su utilización.

VI.2. Determinación de la concentración de proteínas

En los experimentos de cuantificación de ppGpp y ATP las proteínas se midieron según el método de Lowry *et al.* (1951).

Para realizar los ensayos de *Inmunoblot* y para cuantificar la proteína purificada Rposhisx6, se utilizó el método de Bradford (1976). Se utilizó albúmina cristalina de suero bovino como estándar.

VI.3. Electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE)

La electroforesis se realizó a temperatura ambiente en una unidad de electroforesis vertical (10 x 10 cm x 1mm) de acuerdo al protocolo de Laemmli (1970), utilizando un gel de corrida al 10% y un gel concentrador al 4,5%. Las soluciones madres se describen en el anexo, así como el *buffer* de corrida. Las electroforesis se llevaron a cabo a amperaje constante de 20mA hasta que las muestras atravesaran el gel concentrador, para luego aumentarse a 25mA.

VI.4. Tinción de geles de poliacrilamida con Coomasie Blue R-250.

Los geles se tiñeron en una solución de 0,2% de Coomasie Brilliant Blue R-250 en 45% de metanol y 10% de ácido acético durante una hora. Para decolorar, se dejaron durante toda la noche en una solución de 45% de metanol y 10% de ácido acético.

VI.5. Técnica de *Inmunoblot*

VI.5.1. Transferencia de proteínas a membranas de nitrocelulosa

Una vez corrido el gel, el mismo se sumergió en *buffer* de transferencia durante 30 minutos. La membrana de nitrocelulosa se recortó de acuerdo al tamaño del gel (7 x 5,5 cm) y se sumergió primero en agua deionizada durante 5 minutos y luego en *buffer* de transferencia durante 20 minutos. A continuación se armó el sándwich de transferencia de la siguiente manera:

papeles Whatman 0,3 embebidos en *buffer* de transferencia (x2)
+
membrana
+
gel
+
papeles Whatman 0,3 embebidos en *buffer* de transferencia (x2)

El sándwich se colocó en un aparato de transferencia, con 1,2 litros de *buffer* a 4°C y se corrió a 80 mA durante una hora.

Una vez finalizada la transferencia, la membrana se lavó con agua destilada y se tiñó con una solución de 0,5% Rojo Ponceau S en 1% de ácido acético durante 10 minutos para visualizar las proteínas totales transferidas a la membrana. Al mismo tiempo, el gel se tiñó con solución de Coomasie Brilliant Blue R-250 para verificar la transferencia de las proteínas del gel.

VI.5.2. Revelado utilizando un antisuero anti-RpoS

Luego de la tinción con Rojo Ponceau S, se lavó la membrana varias veces con agua deionizada para eliminar el colorante. Para realizar el bloqueo, la membrana se incubó durante toda la noche en TBS Tween 0,5% con 5% leche descremada en la heladera. Al día siguiente la membrana se lavó dos veces con TBS y a continuación se incubó con agitación y a temperatura ambiente durante 1 hora con una dilución apropiada del antisuero anti-RpoS en TBSTween 0,1% con 5% leche descremada. Luego, se realizaron 3 lavados con TBSTween 0,5% y un último lavado con TBS. Posteriormente, se incubó durante 1 hora con una dilución 1/5000 en TBSTween 0,1% con 5% leche descremada del anticuerpo secundario IgG anti-ratón conjugado a fosfatasa alcalina (NEN Life Sciences Products). Luego, se realizaron 4 lavados al igual que en el caso anterior. Se reveló con una solución de NTB (nitroblue tetrazolium) y BCIP (5-bromo-4-cloro-3-indolil-fosfato) (PerkinElmer Life Sciences, Inc.) y se detuvo la reacción lavando con agua.

VI.5.3. Análisis semi-cuantitativo de la proteína RpoS

Para estimar la cantidad de la proteína RpoS en los experimentos de *Inmunoblot*, se digitalizó la membrana con un analizador de imágenes luminiscentes LAS-1000 plus (FujiFilm) y posteriormente se cuantificó utilizando el *software* Image Gauge Ver. 3.12 (Fuji Photo Film CO, LTD).

VII. Técnicas Moleculares

VII.1. Aislamiento de DNA cromosómico

El aislamiento de DNA cromosómico a partir de cultivos de 2 ml en LB caldo de las distintas cepas de *P. putida* se realizó utilizando el protocolo que se describe a continuación:

Los cultivos fueron centrifugados a 8000 rpm durante 20 minutos y los *pellets* obtenidos fueron resuspendidos en 0,3 ml de LB caldo adicionado con SDS a una

concentración final de 0,1 %. Luego de la resuspensión, se agregó un vol. de fenol saturado en Tris, pH 8. A continuación, se colocaron los tubos en un agitador con adaptador para tubos de microcentrifuga y se agitaron a 40 Hertz durante 2 hs. Luego, se centrifugó en microcentrifuga a 13000 rpm por 15 minutos, se extrajo la fase superior (acuosa) y se la pasó a tubos limpios. Se agregó un volumen de fenol: cloroformo: isoamílico (25 : 24 : 1) y se agitó como antes a 40 Hertz por 10 minutos. Se extrajo nuevamente la fase superior y se la trasvasó a un tubo limpio para luego agregar un volumen de cloroformo: isoamílico (24 : 1). Se agitó suavemente por inversión y luego de centrifugar durante 5 minutos se volvió a extraer la fase acuosa. Se agregaron 0,6 volúmenes de isopropanol, se agitó por inversión y se centrifugó durante 30 minutos. Luego de un lavado con etanol 70%, se dejó secar el *pellet* a temperatura ambiente por 20 minutos para luego resuspenderlo en 0,05 ml de H₂O deionizada estéril. Finalmente, se agregó RNAsa a una concentración final de 10µg/ml y se incubó a 37 °C por 1h.

VII.2. Aislamiento de DNA plasmídico

El aislamiento de DNA plasmídico a partir de cepas de *E. coli* se realizó utilizando el *kit* CONCERT High Purity plasmid miniprep system (GibcoBRL) o el *kit* Wizard PCR Preps DNA Purification System (Promega).

Cuando los aislamientos de plásmidos se realizaron con el fin de verificar construcciones se utilizó el siguiente protocolo rápido: Se resuspendió el *pellet* (de 2 ml de cultivo en LB) en 0,15 ml de *Buffer* 1. Se agregaron 0,15 ml de *Buffer* 2. Se mezcló por inversión de 4 a 5 veces y se incubó a temperatura ambiente durante 5 minutos. Se agregaron 0,15 ml de *Buffer* 3 frío, y luego de mezclar por inversión, se incubó en hielo durante 5 minutos. Se centrifugó a 13000 rpm en microcentrifuga durante 10 minutos y el sobrenadante se pasó a un tubo limpio. Para precipitar, se adicionaron 0,9 ml de etanol absoluto. Se volvió a centrifugar durante 20 minutos. Se descartó el sobrenadante y se dejó secar, para luego resuspenderlo en 0,02 ml de agua deionizada.

VII.3. Digestión con enzimas de restricción

La digestión con enzimas de restricción (New England Biolabs o Promega) se realizó de acuerdo al protocolo de Sambrook *et al.* (1989). Cuando fue necesario, las enzimas se inactivaron por calentamiento a 65°C durante 10 minutos.

VII.4. Tratamiento de extremos cohesivos con la enzima *Mung Bean*

La enzima *Mung Bean* (New England Biolabs) es una endonucleasa que degrada extensiones de cadena simple de moléculas de DNA o RNA.

El tratamiento con esta enzima se realizó sobre un fragmento de DNA digerido con *Sall* con el objeto de obtener extremos romos para una posterior reacción de ligado. Se utilizaron 2 unidades de la enzima de NEB por cada microgramo de DNA en la reacción. Se incubó durante 30 minutos a 30°C y posteriormente la enzima se inactivó con el agregado de SDS al 1%. A continuación el fragmento de DNA tratado se purificó con el *kit* Wizard de Promega antes de proceder a la reacción de ligado.

VII.5. Purificación y recuperación de DNA

Se utilizaron los *kits* comerciales de Qiagen (Qiaex II gel extraction kit) y Bio-Rad (Prep-A-Gene DNA purification system) para la purificación de fragmentos de DNA tratados con enzimas de restricción en mezcla de reacciones o en geles de agarosa, así como también para la purificación de los fragmentos amplificados por PCR.

VII.6. Análisis de la secuencia de DNA y diseño de cebadores

La búsqueda de sitios de restricción se realizó utilizando el programa YELLYFISH (Biowire.com Inc., www.jellyfish.labvelocity.com).

El diseño de cebadores se realizó con la asistencia del programa OLIGO (National Biosciences Inc., Plymouth, MN, EEUU. WWW.oligo.net).

VII.7. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

VII.7.1. PCR "tradicional"

Se utilizaron de 50 a 100 ng de DNA cromosómico para hacer las reacciones de amplificación por PCR en un volumen final de 0,05 ml. Las concentraciones de los reactivos en la mezcla de reacción fueron las siguientes: 0,2 mM de cada deoxinucleósido trifosfato, 0,75 μ M de cada cebador (salvo para la amplificación del gen *rpoS* de *P. putida* GPo1, donde la concentración utilizada fue el doble), 2,5 mM de $MgCl_2$, 1X de buffer de amplificación de PCR, 0,5 unidades de *Taq* DNA polimerasa (Promega, New England Biolabs, GIBCO BRL). Los productos obtenidos se corrieron en geles de agarosa al 1% y se visualizaron por tinción con bromuro de etidio. Como marcadores de peso molecular se utilizaron el λ HindIII (New England Biolabs) y las escaleras de DNA de 1 kb de BRL y 100 pb de Invitrogen.

VII.7.2. PCR de colonias

El *screening* de las supuestas mutantes *rpoS* de *P. putida*, se realizó mediante amplificación por PCR del gen en cuestión a partir de las colonias crecidas en la placa de selección, utilizando el protocolo de López *et al.* (1995). Se tomó material de cada colonia y se resuspendió en tubos Eppendorf con 0,5 ml de TE (10 mM Tris-HCl pH 8, 0,1mM EDTA). A continuación los tubos se sumergieron en un baño de agua hirviendo durante 10 minutos para romper las células. El lisado resultante se mezcló brevemente y se centrifugó para bajar las gotas resultado de la condensación. Se utilizó una alícuota de 0,01 de cada muestra para realizar la reacción de PCR

♣ rpoSup y rpoSlow

-Paso inicial de desnaturalización: 5 minutos a 95°C

-35 ciclos de amplificación:

paso de desnaturalización: 60 segundos a 95°C

paso de unión del cebador al DNA molde: 30 segundos a 62°C

paso de síntesis: 60 segundos a 72°C

-Etapa final de síntesis: 5 minutos a 72°C

♣ rpoSBam y rpoSKpn

-Paso inicial de desnaturalización: 5 minutos a 95°C

-35 ciclos de amplificación:

paso de desnaturalización: 60 segundos a 95°C

paso de unión del cebador al DNA molde: 30 segundos a 62°C

paso de síntesis: 60 segundos a 72°C

-Etapa final de síntesis: 5 minutos a 72°C

♣ ErpoS2up y ErpoS2low

-Paso inicial de desnaturalización: 5 minutos a 95°C

-35 ciclos de amplificación:

paso de desnaturalización: 60 segundos a 95°C

paso de unión del cebador al DNA molde: 30 segundos a 53°C

paso de síntesis: 60 segundos a 72°C

-Etapa final de síntesis: 5 minutos a 72°C

♣ rpoS2up y fdxA

-Paso inicial de desnaturalización: 5 minutos a 95°C

-35 ciclos de amplificación:

paso de desnaturalización: 45 segundos a 95°C
paso de unión del cebador al DNA molde: 30 segundos a 43°C
paso de síntesis: 60 segundos a 72°C

-Etapa final de síntesis: 10 minutos a 72°C

♣ rpoS2up y rpoS2low

-Paso inicial de desnaturalización: 5 minutos a 95°C

-35 ciclos de amplificación:

paso de desnaturalización: 45 segundos a 95°C
paso de unión del cebador al DNA molde: 30 segundos a 43°C
paso de síntesis: 60 segundos a 72°C

-Etapa final de síntesis: 10 minutos a 72°C

VII.8. Reacciones de ligado

VII.8.1. Ligado de productos de PCR

Los productos de PCR se ligaron al vector pGEM-T easy de Promega siguiendo las instrucciones del fabricante.

VII.8.2. Ligado de fragmentos de DNA digeridos enzimáticamente

Fragmentos de DNA con extremos romos o cohesivos se ligaron con alguno de los diversos vectores plasmídicos descritos en la Tabla 4. Se utilizó la enzima T4 DNA ligasa de NEB. La relación de extremos moleculares (DNA inserto/DNA vector) fue de 3 : 1. La reacción se llevó a cabo de 16 a 18 hs a 16°C.

VII.9.1. Geles de agarosa

Los geles de agarosa fueron preparados según las indicaciones de Sambrook *et al.* (1989). La concentración de los geles de agarosa varió entre 1% y 2%, según el tamaño del fragmento a analizar. Las electroforesis se realizaron utilizando *buffer* TAE a 100 V en cubas de Sigma (Sigma Chemical Company, St. Luis, USA). Como marcadores de peso molecular se utilizó DNA del fago λ digerido con *HindIII* (NEB), la escalera de 1 kb de BRL o 100 pb de Invitrogen.

Los geles se tiñeron con solución de bromuro de etidio (0,5 μ g/ml) durante 15 minutos. El DNA se visualizó con un transiluminador de luz UV y los geles se fotografiaron con una cámara digital Kodak Digital Science CD120.

VII.9.2. Geles de agarosa de bajo punto de fusión

Para el aislamiento y purificación de fragmentos de DNA se utilizaron geles de agarosa 1 % en TAE de bajo punto de fusión. Las condiciones empleadas en la corrida fueron las mismas que para los geles convencionales de agarosa (sección anterior), a excepción que la solidificación de los geles se realizó en frío (4°C).

VII.9.3. Cuantificación de DNA en geles de agarosa

El DNA en los geles de agarosa se cuantificó utilizando el 1D Image Analysis Software (Kodak Digital Science) y utilizando como patrón 100 ng de λ *HindIII*.

VIII. Técnicas genéticas

VIII.1. Transformación de *E.coli*

VIII.1.1. Preparación de células competentes

Partiendo de una colonia aislada de *E.coli* crecida en LB con el antibiótico correspondiente, se inoculó un cultivo de 2 ml en medio SOB. El cultivo se incubó durante toda la noche a 37°C y con 0,5 ml de este cultivo se inoculó otro de 50 ml del mismo medio. Luego de 2 horas de incubación a 37°C, el cultivo se incubó a 4°C durante 5 minutos y después se centrifugó a la misma temperatura para bajar las células. El *pellet* se resuspendió en 16 ml de TFBII frío, se incubó por 5 minutos a 4°C y se volvió a centrifugar en frío para luego resuspender el *pellet* obtenido en 2 ml de TFBII frío. Luego de 10 minutos a 4°C, las células competentes se alicuotaron y se conservaron a -70°C hasta el momento de su utilización.

VIII.1.2. Transformación

Se mezcló el DNA con 0,05 ml de células competentes. La transformación se realizó en un ciclador Minicycler™ (MJ Research), utilizando el siguiente programa: 40 minutos a 4°C, 2 minutos a 45°C y finalmente 10 minutos a 4°C. Se agregaron 0,9 ml de LB caldo y se incubó de 1 a 2 hs a 37°C con agitación. Posteriormente, se sembraron 0,01 ml del cultivo en medio LB suplementado con el antibiótico correspondiente y se incubó durante toda la noche a 37°C. En caso de que fuera necesario, a las placas se les agregó X-β-Gal. (5-bromo-4-cloro-3indolil-β-D-galactopiranósido) 40 µg/ml.

VIII.2. Ensayos de Conjugación

VIII.2.1. Conjugación de S17-1 pBBR1MCS-2 y S17-1 pmPpCZ con *P. putida* GPo1 y GPo500.

El plásmido vector pBBR1MCS-2 y el plásmido pmPpCZ, que lleva los genes *phaCI* y *phaZ* de *P. putida* GPo1, fueron introducidos por conjugación tanto en *P. putida* GPo1 como en *P. putida* GPo500.

Para realizar la conjugación se utilizaron cultivos de la cepas dadoras (*E. coli* S17-1 pBBR1MCS-2 o *E. coli* S17-1 pmPpCZ) y las cepas receptoras (*P. putida* GPo1 o GPo500) crecidos durante toda la noche en LB caldo, con el agregado de antibióticos a las cepas de *E. coli*. Se tomaron 0,1 ml de cultivo de la cepa dadora y 0,2 ml de la receptora (relación dador : receptor 1 : 2) y la mezcla se centrifugó a 8000 rpm durante 5 minutos. A continuación el *pellet* mixto se resuspendió en 5 ml de una solución de SO₄Mg 10 mM y se sembraron 0,1 ml de esta resuspensión en placas de LB que se incubaron durante 16 hs a 32°C, tiempo durante el cual ocurre la conjugación. Al día siguiente el césped se levantó con 3 ml de SO₄Mg 10 mM y se sembraron 0,1 ml de diluciones al décimo y al centésimo en las placas de selección de ME suplementado con caprilato de sodio 0,25% y kanamicina 25 µg/ml. Dichas placas fueron incubadas a 32°C hasta que se observaron colonias aisladas. En el medio utilizado para la selección sólo pueden crecer aquellas células de *P. putida* que incorporaron el plásmido, dado que esta bacteria es sensible a Km y *E. coli* es incapaz de crecer en ME, ya que no puede utilizar ninguna de las fuentes de carbono que posee este medio.

Las colonias obtenidas fueron purificadas por pasaje al mismo medio, y posteriormente se analizó su fenotipo para la degradación de PHA como se indica en VIII.3.

VIII.2.2. Conjugación de S17-1 λ pir pKNGrpoS::Km^r con *P. putida* GPo1.

El vector suicida pKNG101 con el gen *rpoS* de *P. putida* KT2440 interrumpido con un casete de Km se introdujo en *P. putida* GPo1 con el objetivo de obtener una cepa mutante para el gen *rpoS* por recombinación homóloga entre los dos alelos. Este vector permite la selección positiva de dobles recombinantes basado en su resistencia a sacarosa, debido a la letalidad condicional de los genes *sacBR* presentes en pKNG101 (Kaniga *et al.*, 1991)

El protocolo de conjugación fue similar al detallado en el punto anterior con la siguiente modificación: la mezcla de conjugación de células dadoras y receptoras en SO₄Mg 10 mM fue pasada por un filtro de 0,45 μ m para favorecer el contacto célula-célula. El filtro se depositó en una placa de LB y se incubó a 32°C durante toda la noche. Al día siguiente, el filtro se resuspendió en 1 ml de SO₄Mg 10 mM, y se sembraron 0,2 y 0,4 ml en placas de selección: ME suplementado con caprilato de sodio 0,25%, kanamicina 25 μ g/ml y sacarosa 5%. Las placas se incubaron a 32°C durante 2 días, después de los cuales aparecieron las primeras colonias. A continuación las colonias se analizaron por réplica en placa para seleccionar la pérdida del plásmido suicida (colonias Sac^r, Km^r, Sm^s).

VIII.3. Complementación de la mutante *P. putida* GPo500

La complementación de la mutante *P. putida* GPo500 mediante la introducción del plásmido pmPpCZ se analizó de la siguiente manera: Se utilizaron cultivos de 2 ml de las transconjugantes obtenidas en VIII.2.1. crecidos durante toda la noche en ME suplementado con caprilato 0,25% y Km 10 μ g/ml. Luego se realizó el ayuno en carbono de las células siguiendo el procedimiento detallado en II.2.2.5, pero utilizando un volumen de medio de 2 ml. Luego de 2 hs en el medio sin carbono, se realizó una coloración de Azul del Nilo para determinar la presencia de inclusiones de PHA. La ausencia de los gránulos de PHA indicaba complementación positiva.

inducir la expresión de la proteína. El cultivo se incubó durante 4 horas más, luego de las cuales las células se centrifugaron a 7000 rpm durante 10 minutos y el *pellet* se lavó con *buffer* fosfato 100 mM, pH 7,5. El *pellet* se guardó a -20°C hasta el día siguiente.

X.2. Preparación de lisados en condiciones desnaturalizantes

El *pellet* de células se descongeló en hielo y se resuspendió en 10 ml de *buffer* de lisis. A continuación se agitó a baja velocidad durante 20 minutos a temperatura ambiente hasta que la solución quedó translúcida. El lisado se centrifugó a temperatura ambiente a 14000 rpm durante 25 minutos y el sobrenadante obtenido se guardó a -20°C hasta la purificación.

X.3. Purificación de la proteína en condiciones desnaturalizantes

La purificación se realizó utilizando el *kit* Qiaexpress (Qiagen) en condiciones desnaturalizantes teniendo en cuenta las indicaciones del proveedor y optimizando las condiciones. Al lisado obtenido en el paso anterior se le agregó β -mercaptoetanol a una concentración final de 10 mM para reducir los puentes disulfuro y así disminuir la aparición de contaminantes. Posteriormente se agregaron 0,2 ml de agarosa Ni-NTA (Níquel-Ácido Nitrilotriacético) y la mezcla se mantuvo durante 1 hora en un agitador rotatorio a temperatura ambiente. Luego de la unión de la proteína a la resina, la mezcla se lavó 4 veces con 1 ml de *buffer* C para eliminar las proteínas inespecíficas. La proteína recombinante se eluyó con 4 fracciones de 0,125 ml de *buffer* D, seguido por 4 fracciones del mismo volumen en *buffer* E. Todas las fracciones se analizaron por SDS-PAGE.

XI. Obtención y titulación del antisuero de ratón anti-RpoS.

XI.1. Obtención del antisuero

Para fabricar el antisuero se utilizaron 3 hembras de ratón de la cepa CF1 que fueron inmunizadas vía intraperitoneal con dosis de 25 µg de la proteína RpoShisx6 purificada, que se administró emulsionada con adyuvante de Freund. Dos de los ratones se inmunizaron con 4 dosis, con intervalos de una semana. La tercera hembra se inmunizó con 2 dosis, con intervalos de 20 días. Tres días antes del sangrado a blanco, a cada ratón se le aplicó un *booster* del antígeno vía endovenosa. Cada antisuero fue titulado por separado como se describe a continuación.

XI.2. Titulación de la concentración de antisuero anti-RpoS a utilizar en la técnica de *Inmunoblot*

El antisuero se tituló mediante la técnica de *Inmunoblot* utilizando 30 µg de proteínas totales transferidas a la membrana de nitrocelulosa. Dicho extracto se obtuvo de 30 ml de cultivo de *P. putida* GPo1 crecido en ME caprilato de sodio 0,25% durante 8 horas ($DO_{580nm}=1,2$)

Los tres antisueros de ratón anti-RpoS se juntaron y se mezclaron alternativamente, probándose diversas diluciones de cada uno individualmente y de las mezclas, para ver cual daba mejor señal con el menor inespecífico. El anticuerpo secundario anti-Ratón conjugado a fosfatasa alcalina se utilizó a una dilución constante de 1/5000.

Anexo

I. Medios de cultivo

Caldo nutritivo (CN) (por litro) (Merck)

peptona de carne	5 g
extracto de carne	3 g

Lysogeny broth (LB) (por litro) (Miller, 1972)

triptona	10 g
ClNa	10 g
extracto de levadura	5 g

Medio E (ME) (por litro) (Vogel y Bonner, 1956)

$C_6H_5O_7Na_3$ (ácido cítrico, sal de sodio)	2 g
K_2HPO_4 anhidro	10 g
$NaH_2N_4PO_4 \cdot 4 H_2O$	3,5 g

Luego de autoclavar se agregaron:

Solución de $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$ 1M	0,800 ml
MT microelementos*	1 ml

***MT microelementos (por litro) (Lageveen *et al.*, 1988)**

$FeSO_4 \cdot 7 H_2O$	2,78 g
$MnCl_2 \cdot 4 H_2O$	1,98 g
$CoSO_4 \cdot 7 H_2O$	2,81 g
$CaCl_2 \cdot 2 H_2O$	1,47 g
$CuCl_2 \cdot 2 H_2O$	0,17 g
$ZnSO_4 \cdot 7 H_2O$	0,29 g en 1N HCl.

Medio E sin citrato

Medio E sin el agregado de citrato de sodio.

Medio 0,5NE₂ (por litro) (Huisman *et al.*, 1992)

$NaH_2N_4PO_4 \cdot 4 H_2O$	1,75 g
$K_2HPO_4 \cdot 3 H_2O$	7,5 g
KH_2PO_4	3,7 g
extracto de levadura	1 g

Luego de autoclavar se agregaron:

Solución de $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ 1M..... 1 ml

MT microelementos..... 1 ml

Medio 0,5NE₂P (por litro) (Modificado del medio 0,5NE₂ de Huisman *et al.*, 1992 para realizar marcado de cultivos con ³²P)

$\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3 \text{H}_2\text{O}$ 0,5 g

KH_2PO_4 0,24 g

NH_4Cl0,45 g

NaCl0,5 g

extracto de levadura 1 g

Luego de autoclavar se agregaron:

Solución de $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ 1M 1 ml

MT microelementos..... 1 ml

Medio Mínimo MOPS (por litro, 10X) (Neidhardt *et al.*, 1974)

MOPS 83,72 g

tricina 7,17 g

Se agregaron aproximadamente 300 ml de agua deionizada y luego se ajustó el pH a 7,4 con KOH 10N. Se llevó a un volumen de 440 ml y posteriormente se adicionaron las siguientes soluciones:

$\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ 0,01 M 10 ml

NH_4Cl 1,9 M.....50 ml

K_2SO_4 0,276 M..... 10 ml

$\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ 0,02M 0,25 ml

MgCl_2 2,5 M 2,1 ml

NaCl 5 M 100 ml

Solución de micronutrientes ⊗ 0,2 ml

Agua deionizada 387 ml

Se esterilizó por filtración

Solución de micronutrientes ⊗ (para 50 ml)

$(\text{NH}_4)_6(\text{Mo}_7)\text{O}_{24}$ 0,09 g

H_3BO_3 0,062 g

CoCl ₂	0,018 g
CuSO ₄	0,006 g
MnCl ₂ . 4 H ₂ O.....	0,055 g
ZnSO ₄ . 7 H ₂ O	0,012 g

SOB (Medio de crecimiento para preparar *E.coli* competentes) (por litro) (Hanahan *et al.*, 1991)

Tryptona.....	20 g
Extracto de levadura	5 g
NaCl.....	0,58 g
KCl.....	0,19 g

Luego de autoclavar se agregó:

Solución de MgSO ₄ . 7 H ₂ O 2M.....	10 ml
--	-------

Medios sólidos

Se agregaron a los medios anteriormente descriptos 15 g de agar por cada litro de medio.

Para preparar LB agar blando, se agregaron 7,5 g de agar por cada litro de medio.

II. Buffers y soluciones utilizadas para manipulación de proteínas

•SDS PAGE (Laemmli, 1970)

Solución de acrilamida 30% (para 500 ml)

Acrilamida	146 g
N, N'-Metilen-bisacrilamida.....	4 g

Buffer gel separador (4X, para 500 ml)

Tris base.....	90, 83 g
SDS	2 g
Se lleva a pH 8,8 con HCl	

Buffer gel concentrador (4X, para 500 ml)

Tris base.....	30, 23 g
SDS	2 g
Se lleva a pH 6,8 con HCl	

Gel separador (10%) (para 25 ml)

Buffer gel separador 4X.....	6,25 ml
Solución de acrilamida: bisacrilamida.....	8,35 ml
Persulfato de amonio 10%.....	0,130 ml
TEMED.....	0,014 ml
Agua deionizada	10, 5 ml

Gel concentrador (5%) (para 10 ml)

Buffer gel concentrador 4X	2,5 ml
Solución de acrilamida: bisacrilamida.....	1,7 ml
Persulfato de amonio 10%.....	0,04 ml
TEMED.....	0,02 ml
Agua deionizada	5,8 ml

Buffer de corrida (por litro)

Tris base.....	3 g
Glicina.....	14,4 g
SDS	1 g

Buffer de siembra (4X, para 10 ml)

Tris 0, 25M, pH 6,8	5 ml
SDS	0,6 g
sacarosa.....	4 g
Azul de bromofenol	0,004 g
2-mercaptoetanol	2 ml

•Buffer de transferencia a membranas de nitrocelulosa (por litro)

Tris base.....	5.8 g
Glicina.....	2.88 g
SDS	0.37 g
Metanol	200 ml

•Soluciones para revelado *Inmunoblot***TBS 1X**

Tris. HCl 10 mM pH 8,0
ClNa 150 mM

III. *Buffers* utilizados para la manipulación de DNA

• Extracción rápida de DNA plasmídico (Birnboim y Doly, 1979)

Buffer 1

Tris·Cl 25 mM, pH 8,0
EDTA 10 mM
glucosa 50 mM
RNasa A 100 µg/ml

Buffer 2

NaOH 200 mM
SDS 1%

Buffer 3

Acetato de potasio 3.0 M, pH 5,5

• Corrida de geles de agarosa

TAE 50X (por 1 litro) (Sambrook *et al.*, 1989)

Tris base.....	242 g
Acido acético glacial.....	57, 1ml
EDTA 0,5 M pH 8,0	100 ml

Buffer de siembra 6X (por 100 ml) (Sambrook *et al.*, 1989)

Azul de bromofenol	0,25 g
Sacarosa	40 g

IV. *Buffers* utilizados para la preparación de *E.coli* competentes

Buffer de transformación I (TFBI)

Acetato de potasio 30 mM
MnCl₂ 50 mM
KCl 100 mM
CaCl₂ 10 mM
glicerol 15%

Se esterilizó por filtración.

Buffer de transformación II (TFBII)

MOPS-Na pH 7,0 10 mM
CaCl₂ 7,5 mM
KCl 10 mM

glicerol 15%

Se ajustó a pH 6,1 con KOH y se esterilizó por filtración.

V. Buffers utilizados para la purificación de la proteína RpoShisx6 en condiciones desnaturalizantes

(Modificados de Qiagen- QIAexpress system)

Buffer de lisis (por litro)

NaH ₂ PO ₄ . H ₂ O	13,8 g
Tris base.....	1,2 g
Urea.....	480, 5 g

Se ajustó el pH a 8,0 con NaOH y se llevó a volumen final.

Buffer de lavado - Buffer C (por litro)

NaH ₂ PO ₄ . H ₂ O	13,8 g
Tris base.....	1,2 g
Urea.....	480, 5 g
Tween 20.....	20 ml

Se ajustó el pH a 6, 3 con HCl y se llevó a volumen final

Buffer de Elución- Buffer D (por litro)

NaH ₂ PO ₄ . H ₂ O	13,8 g
Tris base.....	1,2 g
Urea.....	480, 5 g
Tween 20.....	20 ml

Se ajustó el pH a 5,9 con HCl y se llevó a volumen final

Buffer de Elución- Buffer E (por litro)

NaH ₂ PO ₄ . H ₂ O	13,8 g
Tris base.....	1,2 g
Urea.....	480, 5 g
Tween 20.....	20 ml

Se ajustó el pH a 4,5 con HCl y se llevó a volumen final

Resultados

I. Acumulación de nucleótidos (ATP y ppGpp) en *P. putida* durante la degradación de PHA.

El primer paso para testear nuestra hipótesis de trabajo consistió en evaluar si los niveles de ppGpp en *P. putida* GPo1 se incrementaban durante la degradación de PHA. Por este motivo, se decidió diseñar un experimento que permitiera comparar los niveles intracelulares de ppGpp en la cepa salvaje de *P. putida* GPo1 y en la cepa mutante en la enzima PHA depolimerasa, *P. putida* GPo500, durante la degradación del polímero.

I.1. Condiciones de crecimiento y acumulación de PHA para las cepas de *P. putida* GPo1 y GPo500.

Para poder cuantificar los niveles intracelulares de ppGpp durante la depolimerización de PHA en *P. putida*, fue necesario utilizar condiciones de cultivo especiales que permitieran la acumulación de PHA y su posterior degradación. Además resultaba necesario conocer la cinética del proceso de acumulación y degradación del polímero para establecer los tiempos adecuados para la medición de ppGpp. Para cumplir con estos objetivos se realizó una curva de crecimiento de las cepas de *P. putida* GPo1 y GPo500 utilizando el medio 0,5NE₂P suplementado con caprilato de sodio 0,5%. La presencia de caprilato (octanoato) de sodio como fuente de carbono y la baja concentración de nitrógeno en el medio inducen la acumulación del polímero, que comienza a degradarse una vez agotada la fuente carbonada.

En la Figura 9 se encuentran graficadas las curvas de crecimiento para ambas cepas, conjuntamente con los porcentajes de PHA acumulados relativos al peso seco celular. El porcentaje de polímero acumulado aumenta con el crecimiento, tanto para la cepa salvaje como para la mutante, obteniéndose los máximos porcentajes de acumulación del polímero durante la fase estacionaria, tal como está descrito por Lageveen *et al.* (1988).

Al observar la curva de acumulación de PHA de la cepa GPo1, puede verse que el máximo porcentaje de acumulación ocurre a las 23 horas de haberse iniciado el experimento y que el mismo corresponde a un valor de 50 % del peso seco,

aproximadamente. A partir de ese momento la cantidad de PHA comienza a disminuir hasta alcanzar un valor de 4%. Esto se debe a que el polímero acumulado es utilizado como fuente de carbono y energía durante la fase estacionaria tardía.

Para la cepa GPo500, el máximo porcentaje de PHA alcanzado corresponde a casi un 55% del peso seco, manteniéndose aproximadamente constante hasta el final del experimento. Estos resultados coinciden con lo esperado para esta cepa, que no es capaz de utilizar el polímero acumulado debido a que posee una mutación en la enzima encargada de la depolimerización de PHA.

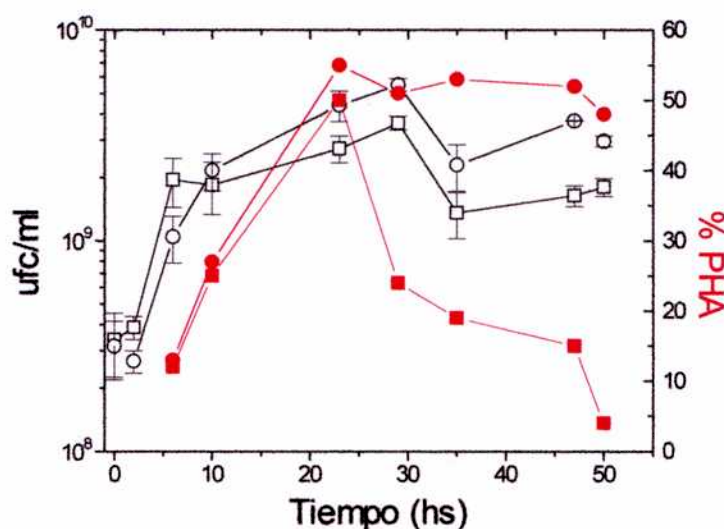


Figura 9. Curva de crecimiento y acumulación de PHA de *P. putida* GPo1 y GPo500. Las bacterias se cultivaron en medio 0,5NE₂P suplementado con caprilato de sodio 0,5% con agitación a 32°C. Se muestran los valores de ufc/ml (□: GPo1 ○: GPo500) y el contenido de PHA (■:GPo1 ●: GPo500) de las muestras tomadas a distintos tiempos. El contenido de PHA fue calculado como el porcentaje del peso seco celular.

1.2. Medición de los niveles intracelulares de ppGpp en *P. putida* GPo1 y GPo500.

Tomando en cuenta el resultado de la sección anterior, se procedió a cuantificar el nivel intracelular de ppGpp (Figura 10) a distintos tiempos durante el proceso de acumulación y degradación de PHA en medio 0,5NE₂P, tanto en la cepa salvaje de *P. putida* como en aquella incapaz de degradar el polímero acumulado. En la Figura 10 se observa que en *P. putida* GPo1, existió un marcado aumento en el nivel intracelular de

ppGpp a las 30 hs de iniciado el experimento, el cual coincidió con el comienzo de la degradación de PHA. En la cepa mutante, GPo500, se observó una pequeña disminución en el porcentaje de PHA (de 62 % a 42%), que podría deberse a degradación no específica por otras lipasas. A su vez, esta disminución en el contenido de PHA también coincidió con un leve pico en el nivel intracelular de ppGpp.

Este experimento se realizó por duplicado y en ambos casos se obtuvo un pico en el nivel intracelular de ppGpp aproximadamente 5 horas después del comienzo de la degradación del polímero en la cepa salvaje, mientras que en la cepa mutante el contenido de ppGpp no mostró variaciones importantes.

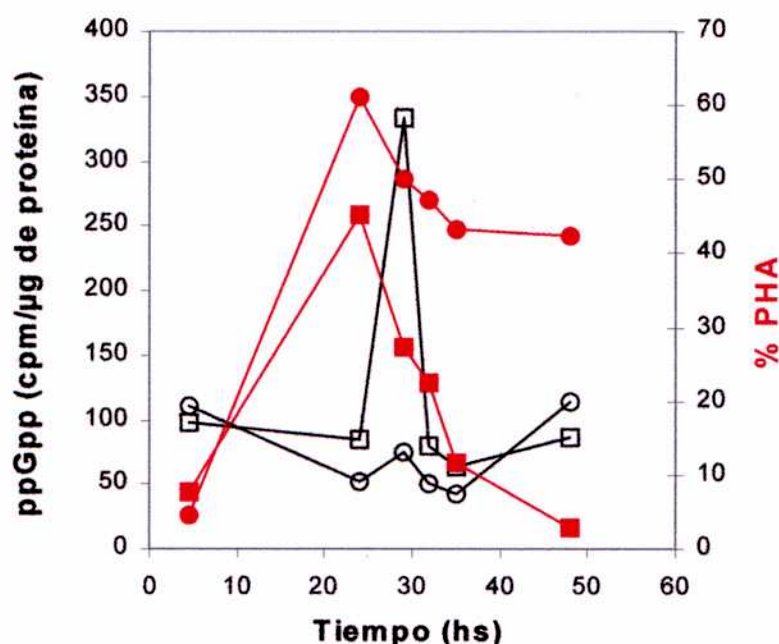


Figura 10. Nivel intracelular de ppGpp y contenido de PHA en *P. putida* GPo1 y GPo500. Las células se cultivaron en 0,5NE₂P suplementado con caprilato de sodio 0,5%. A distintos tiempos se tomaron muestras para la cuantificación de ppGpp (□: GPo1 ○: GPo500) y el porcentaje de PHA (■: GPo1 ●: GPo500). Cada valor corresponde al promedio de la medición realizada sobre dos muestras independientes.

1.3. Complementación de la mutación *phaZ*.

Con el objetivo de comprobar si el aumento transitorio en el nivel intracelular de ppGpp estaba asociado a la capacidad de degradación de PHA, se decidió realizar la complementación de la mutación *phaZ* para cuantificar posteriormente los niveles

intracelulares de ppGpp en la cepa de *P. putida* GPo500 complementada con el gen que codifica para la depolimerasa de PHA.

Como se mencionó en la Introducción, en *P. putida* GPo1 existe un promotor, denominado *Pc_I*, ubicado río arriba del gen *phaC1* (que codifica para una PHA sintetasa), que aparentemente dirige la expresión de los genes *phaC1* y *phaZ*. Por este motivo, para realizar la complementación de la mutación *phaZ*, se utilizó un plásmido movilizable y capaz de replicar en *P. putida* que llevaba un fragmento de 3,1 kb que incluía al promotor *Pc_I* y a los genes *phaC1* y *phaZ* de *P. putida* GPo1. Dicho plásmido, denominado pmPpCZ, fue introducido por conjugación en *P. putida* GPo500. A esta misma cepa también se le introdujo el plásmido sin el inserto (plásmido vector) Por otro lado, el plásmido pmPpCZ también se introdujo en *P. putida* GPo1 (Figura 11).

Luego de la conjugación se obtuvieron varias transconjugantes, y se seleccionaron aquellas que presentaban el fenotipo esperado (de acuerdo al procedimiento descrito en la sección VIII.3 de Materiales y Métodos), es decir capacidad de degradación de PHA para aquellas que portaban el gen *phaZ* e incapacidad de degradación para aquellas que portaban el plásmido vector. Una vez corroborado el fenotipo, se utilizaron algunas de estas transconjugantes para realizar una curva de crecimiento en 0,5NE₂P con caprilato de sodio 0,5% y se seleccionaron tres que presentaban velocidad de crecimiento similar para realizar los experimentos posteriores.

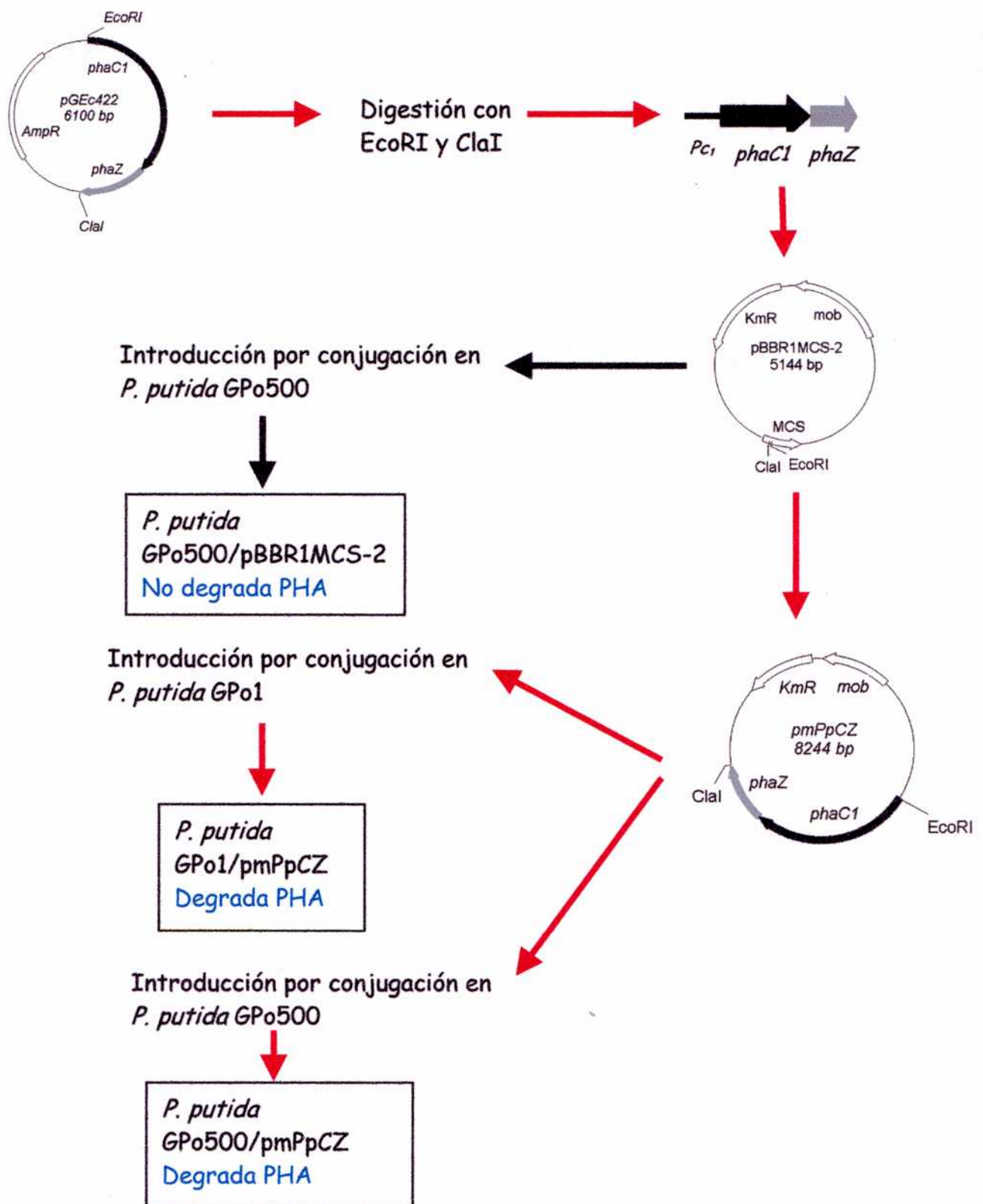


Figura 11. Esquema de la construcción del plásmido pmPpCZ y su posterior introducción en las cepas de *P. putida*.

I.3.1. Análisis de la acumulación y degradación de PHA en *P. putida* GPo1/pmPpCZ, GPo500/pmPpCZ y GPo500/pBBR1MCS-2.

Para analizar la cinética del proceso de acumulación y degradación de PHA de las cepas de *P. putida* que contenían el plásmido pmPpCZ, las bacterias se cultivaron en 0,5NE₂P suplementado con caprilato de sodio a una concentración de 0,5% y Km a una concentración de 10 µg/ml. En estas condiciones, la degradación de PHA comenzaba a observarse recién luego de 48 hs de cultivo. Esto indicaba que existían diferencias con respecto a la cinética de acumulación y depolimerización observada en la cepa salvaje, GPo1 (Figura 9), que podrían adjudicarse a la presencia de los genes que codifican para las enzimas PHA sintetasa y PHA depolimerasa en un plásmido de mediano número de copias. Para acortar el tiempo transcurrido hasta el comienzo de degradación de PHA, se decidió disminuir la concentración de caprilato de sodio a 0,25 %. Utilizando estas condiciones, la degradación de PHA comenzaba luego de 24 hs de incubación en el medio utilizado y presentaba una cinética parecida a la obtenida anteriormente para la cepa GPo1 sin el plásmido pmPpCZ.

En la Figura 12 se observa que para todas las cepas el máximo contenido de PHA se alcanza luego de 23 hs de cultivo, cuando las bacterias llegan a la fase estacionaria. La cepa *P. putida* GPo500 con el plásmido vector pBBR1MCS-2, mantiene constante su porcentaje de PHA en alrededor de un 27%. Las cepas *P. putida* GPo1 y GPo500 con el plásmido pmPpCZ muestran, como era de esperar, una disminución en el contenido del poliéster. El porcentaje máximo de PHA alcanzado por ambas cepas se encuentra alrededor de un 20%. Dicho porcentaje comienza a disminuir después de las 24 hs de cultivo, alcanzando un valor de aproximadamente 1% luego de 46 hs de cultivo. Cabe destacar, que los porcentajes máximos de PHA alcanzados son menores a los obtenidos para las cepas GPo1 y GPo500 sin el plásmido pmPpCZ. Esto podría atribuirse al menor contenido de caprilato de sodio (fuente de carbono utilizada para sintetizar PHA) en el medio de cultivo.

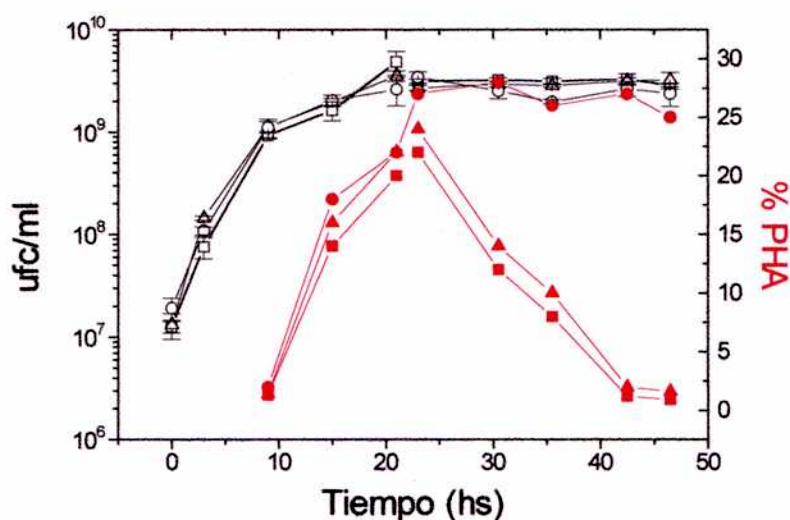


Figura 12. Curva de crecimiento y acumulación de PHA de *P. putida* GPo1/pmPpCZ, GPo500/pmPpCZ y GPo500/pBBR1MCS-2. Las bacterias se cultivaron en medio 0,5NE₂P suplementado con caprilato de sodio 0,25% y Km 10 µg/ml, con agitación a 32°C. Se muestran los valores de ufc/ml (□: GPo1/pmPpCZ ○: GPo500/pBBR1MCS-2 △: GPo500/pmPpCZ) y el contenido de PHA (■: GPo1/ pmPpCZ ●: GPo500/pBBR1MCS-2 ▲: GPo500/ pmPpCZ) de las muestras tomadas a distintos tiempos.

1.3.2. Niveles intracelulares de ppGpp y ATP en *P. putida* GPo1/pmPpCZ, GPo500/pmPpCZ y GPo500/pBBR1MCS-2.

Una vez conocida la cinética del proceso de acumulación y degradación de PHA en las bacterias portadoras del plásmido pmPpCZ, se procedió a analizar el comportamiento de las mismas en relación a la acumulación de ppGpp durante la depolimerización.

Los resultados que se muestran en la Figura 13A indican que existe un aumento en el nivel intracelular de este nucleótido aproximadamente 5 horas después del comienzo de la degradación de PHA. Esto ocurre, tanto para la cepa GPo1 portadora del plásmido pmPpCZ, como para la cepa mutante complementada, GPo500/pmPpCZ. Los niveles de ppGpp en la cepa de *P. putida* GPo500 con el plásmido vector permanecieron constantes, al igual que el contenido de PHA.

Durante la fase exponencial de crecimiento también se observaron pequeños aumentos en los niveles de ppGpp en las distintas cepas, sin embargo en este caso los precursores para la síntesis de este nucleótido pueden provenir de otras vías metabólicas.

Los máximos contenidos de PHA alcanzados se encontraron entre el 13 % y el 19%.

El aumento en el nivel de ppGpp observado en las cepas GPo1 y GPo500 portadoras del plásmido pmPpCZ resultó menor al obtenido en la cepa GPo1 en el experimento anterior. En dicho experimento la cepa GPo1 acumuló alrededor de un 45% de PHA (Figura 10).

Este experimento se realizó por duplicado, observándose en ambos casos un pico en el nivel intracelular de ppGpp posterior al comienzo de la degradación de PHA.

En la Figura 13B se muestran los resultados de la medición de los niveles de ATP. En las bacterias capaces de degradar el polímero acumulado (GPo1/ pmPpCZ y GPo500/ pmPpCZ) existió un pequeño incremento en el nivel de ATP cuando comenzaba a degradarse el polímero. Esto no ocurría en GPo500/pBBR1MCS-2. Cabe destacar, que los niveles intracelulares de ATP en las bacterias capaces de depolimerizar PHA fueron siempre mayores a los observados para la cepa mutante.

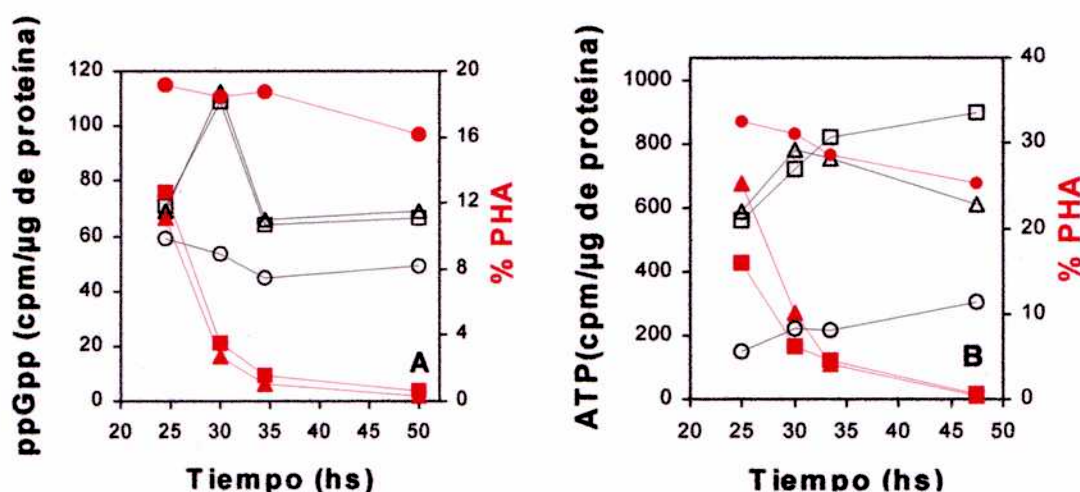


Figura 13. Niveles intracelulares de ppGpp (A) o ATP (B) (símbolos vacíos) y contenido de PHA (símbolos rojos) en *P. putida* GPo1/pmPpCZ (cuadrados), GPo500/pmPpCZ (triángulos) y GPo500/pBBR1MCS-2 (círculos). Las bacterias se cultivaron en 0,5NE₂P suplementado con caprilato de sodio 0,25% y Km 10 μg/ml, con agitación a 32°C. Cada valor en el gráfico, corresponde al promedio de la medición realizada sobre dos muestras independientes.

II. Resistencia al estrés y nivel intracelular de RpoS en *P. putida* durante la degradación de PHA.

Como se mencionó en la Introducción, entre los genes inducidos por ppGpp se encuentra el gen que codifica para el factor sigma de fase estacionaria, RpoS.

En función de los resultados descriptos en la sección anterior y considerando que, de acuerdo con resultados previos, la capacidad de degradación de PHA aumentaba la supervivencia y la resistencia al estrés en aguas naturales; el siguiente paso fue determinar si existía un incremento en el contenido intracelular de σ^S durante la degradación del polímero de reserva, lo cual daría lugar a su vez a un aumento en la resistencia al estrés. Para cumplir con este objetivo se decidió analizar el nivel intracelular de σ^S durante la degradación de PHA mediante la técnica de *ImmunoBlot*, así como también evaluar la resistencia a estrés térmico y oxidativo en las mismas condiciones.

Para realizar el mencionado análisis fue necesario estudiar previamente algunos aspectos de la Respuesta general a estrés en *P. putida* cultivada en distintos medios, y en distintas fases del crecimiento.

A su vez, para realizar el *ImmunoBlot* fue necesario obtener un antisuero capaz de reconocer la proteína RpoS de *P. putida* GPo1.

II.1. Obtención del antisuero anti-RpoS

Para obtener el antisuero anti-RpoS de *P. putida* se construyó una proteína recombinante RpoShisx6 a partir de la secuencia del gen *rpoS* de otra cepa de *P. putida* denominada KT2440. Se decidió utilizar la secuencia del gen *rpoS* de *P. putida* KT2440 debido a que dicha secuencia se encontraba ya publicada y hasta el momento no se había logrado clonar aún el gen homólogo en *P. putida* GPo1.

II.1.1. Clonado del gen *rpoS* de *P. putida* KT2440 mediante PCR. Construcción y expresión de la proteína RpoShisx6.

Para amplificar el gen *rpoS* de *P. putida* KT2440 se utilizaron los cebadores **rpoSup** y **rpoSlow** que fueron diseñados en base a las secuencias adyacentes a dicho gen, que estaba ya publicada (Ramos-González y Molin, 1998). Como era de esperar, se obtuvo un fragmento de amplificación de alrededor de 1200 pb (Figura 14A).

Para verificar que se trataba del gen buscado, se realizó otra reacción de PCR utilizando cebadores que habían sido diseñados en base a la región más conservada del gen *rpoS* de *Pseudomonas* (Canosa *et al.*, 1999). Dichos cebadores amplificaban un fragmento interno del gen de alrededor de 270 pb. Como se puede visualizar en la Figura 14B, se obtuvo un fragmento del tamaño esperado, lo cual confirmó que el fragmento clonado correspondía al gen *rpoS*.

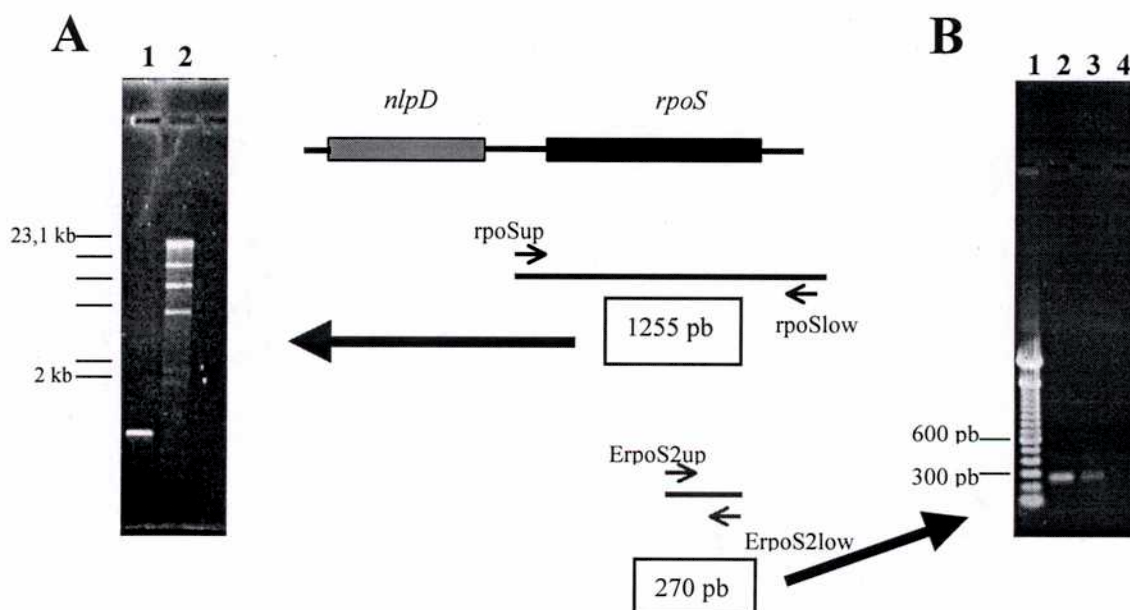


Figura 14. (A) Amplificación mediante PCR del gen *rpoS* de *P. putida* KT2440. La amplificación se realizó utilizando los cebadores *rpoSup* y *rpoSlow*. Calle 1: fragmento obtenido a partir de DNA de *P. putida* KT2440, calle 2: λ HindIII, calle 3: control negativo de PCR. (B). Amplificación por PCR utilizando cebadores internos (*ErpoS2up* y *ErpoS2low*) Calle 1: marcador de 100 pb de Invitrogen, calle 2: fragmento obtenido utilizando el fragmento de 1255 pb obtenido en (A), calle 3: fragmento obtenido a partir de DNA de *P. putida* KT2440, calle 4: control negativo.

Para obtener la proteína recombinante RpoShisx6 se utilizó la estrategia que se detalla a continuación, y que se esquematiza en la Figura 15. El fragmento con el gen

rpoS se clonó en el plásmido pGEM-T easy de Promega. Este clon se utilizó como DNA molde para realizar otra PCR utilizando cebadores con secuencias para sitios de restricción que permitieran su posterior clonado en el plásmido de expresión pQE31. Como resultado de esta PCR, se obtuvo un fragmento de alrededor de 1 kb. Dicho fragmento se clonó en el plásmido pGEM-T easy y posteriormente se digirió con las enzimas *BamHI* y *KpnI* para su subclonado en el plásmido pQE31. Se obtuvieron varios subclones, que se denominaron pQrpoS del número 1 al número 4. Con estos cuatro clones se realizaron cultivos para inducir, mediante el agregado de IPTG, la expresión de la proteína recombinante según como se detalló en la sección X.1 de Materiales y Métodos. En la Figura 16 se muestra el extracto proteico de uno de los clones, antes y después de la inducción por IPTG.

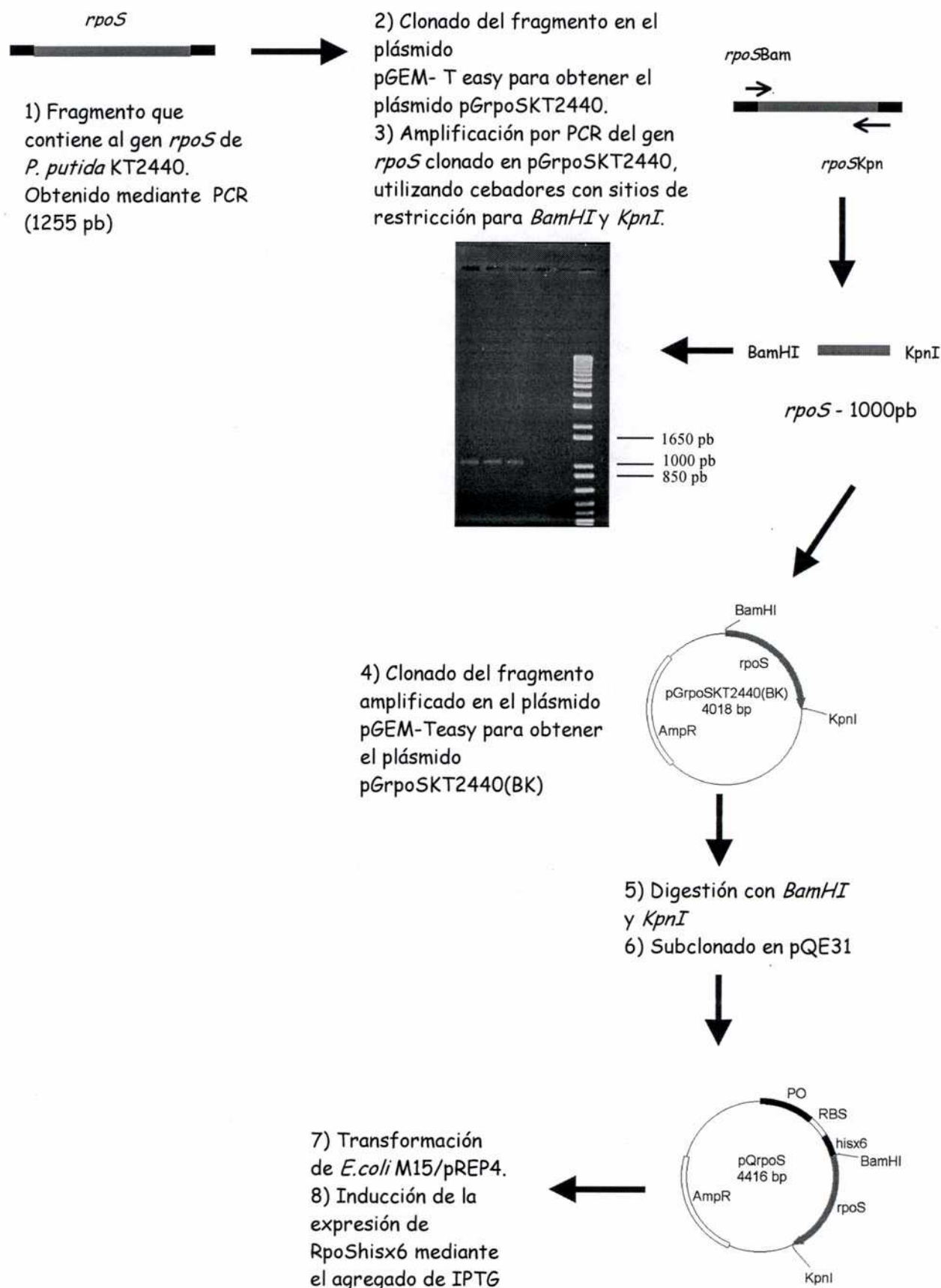


Figura 15. Construcción del plásmido de expresión pQrpoS. El gen *rpoS* se representa en gris. PO: región promotora y operadora bajo el control de lactosa o IPTG. RBS: sitio de unión al ribosoma. En el gel se muestra el fragmento de amplificación obtenido con los cebadores *rpoSBam* y *rpoSKpn*.

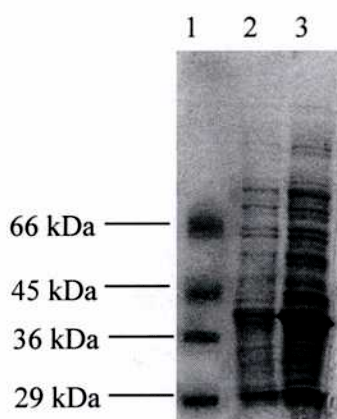


Figura 16. Inducción de la expresión de la proteína RpoShisx6 mediante IPTG.
Calle 1: marcador de peso molecular de SIGMA, calle 2: extracto de proteínas de *E. coli* con el plásmido pQrpoS antes de la inducción, calle 3: el mismo extracto luego de la inducción con IPTG.

II.1.2. Purificación de la proteína RpoShisx6.

La purificación de la proteína RpoShisx6 se realizó utilizando una columna de Sepharosa acoplada a Ni-NTA (níquel-ácido nitrilotriacético). En este tipo de superficie el hexapéptido de histidina de la proteína recombinante queda inmovilizado por interacción con la carga positiva del ion Níquel. La elución de la proteína de la columna se realiza utilizando un *buffer* de pH ácido.

El primer intento de purificación de la proteína recombinante se realizó en condiciones nativas. Sin embargo, en estas condiciones fue imposible obtener el pegado de la proteína a la columna, probablemente porque la proteína nativa adoptaba una conformación que escondía el hexapéptido de histidina.

La purificación en condiciones desnaturalizantes se realizó agregando β -mercaptoetanol y Tween 20 al *buffer* de elución, ya que de otra manera la proteína eluía con muchos contaminantes. En la Figura 17 A se muestra el gel de SDS-PAGE correspondiente a los distintos pasos de purificación de la proteína RpoShisx6. La proteína purificada tenía un peso molecular entre 36 y 45kDa (el peso molecular estimado es de 38 kDa) (Figura 17B).

La proteína purificada se utilizó para inocular ratones con el objetivo de obtener un antisuero anti-RpoS para ser utilizado en los experimentos de *ImmunoBlot*.

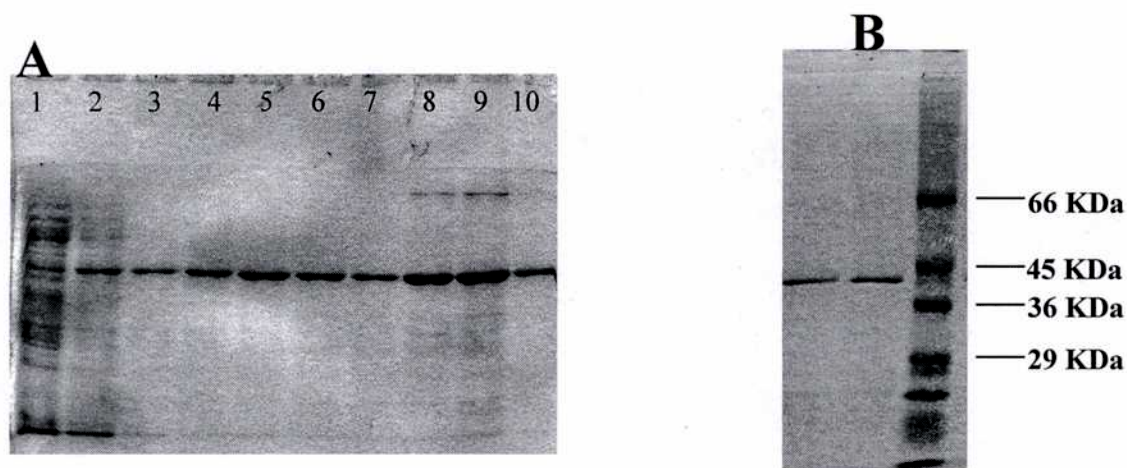


Figura 17. (A) Gel de SDS-PAGE con las fracciones correspondientes a la purificación de la proteína RpoShisx6. Calle 1: porción del extracto no unido a la columna, calle 2: eluido del primer lavado a pH 6,3, calle 3: eluido del segundo lavado a pH 6,3, calles 4 a 7: eluido a pH 5,9; calles 8 a 10: fracciones eluidas a pH 4,5. **(B)** Proteína RpoShisx6 purificada junto al marcador de peso molecular.

II.1.3. Titulación del antisuero anti-RpoS

Los antisueros se titularon mediante la técnica de *ImmunoBlot*, utilizando como fuente de antígeno extractos proteicos de *P. putida* GPo1 crecida en ME caprilato de sodio 0,25% hasta una DO_{580nm} de aproximadamente 0,8.

Se obtuvieron 2 antisueros de ratón anti-RpoS. Ambos revelaban una banda de aproximadamente 40 kDa. Uno de ellos presentaba un título de 1/300 y el otro tenía un título de 1/1200. Este último fue el que se utilizó para todos los experimentos de *ImmunoBlot*.

II.2. Construcción de la mutante *rpoS* *P. putida* 50-9.

Con el objetivo de obtener un control que pudiera ser utilizado para confirmar la detección de la proteína RpoS mediante *ImmunoBlot* con el antisuero obtenido, se decidió construir una mutante *rpoS* de *P. putida* GPo1.

Dado que el clonado del gen *rpoS* de *P. putida* GPo1 estaba resultando difícil, y teniendo en cuenta el alto grado de homología entre las secuencias de *rpoS* de diferentes especies de *Pseudomonas*, se decidió utilizar el gen de *P. putida* KT2440 para la construcción de la mutante.

II.2.1. Interrupción del gen *rpoS* utilizando un casete con resistencia a kanamicina. Construcción del vector pGrpoS::Km^r

La estrategia utilizada para la construcción de la mutante *rpoS* consistió en la interrupción del gen clonado con un casete de kanamicina y su posterior inserción en el cromosoma de *P. putida* GPo1 mediante recombinación homóloga (Figura 18).

Analizando la secuencia del gen *rpoS* de *P. putida* KT2440, se encontró un sitio de restricción para la enzima *PmlI* aproximadamente en la mitad del gen *rpoS*. Dicha enzima corta el DNA generando extremos romos.

Para realizar la interrupción del gen, se utilizó un fragmento del plásmido pUC4K que contiene el gen de resistencia a kanamicina (casete kanamicina). Para liberar dicho fragmento, el plásmido pUC4K se digirió con la enzima *Sall*. Posteriormente el casete cortado con *Sall* se trató con la endonucleasa *Mung Bean* para generar extremos romos y poder realizar el ligado del casete así tratado con el plásmido pGrpoSKT2440 cortado con la enzima *PmlI*. Con este ligado, se transformó *E. coli* DH5 α y se seleccionó por resistencia a Amp y Km.

Como resultado de la transformación se obtuvo una colonia. Para verificar que se trataba del clon con la construcción buscada, se realizó la extracción plasmídica y se digirió con *EcoRI*. Como resultado de la digestión se obtuvieron 2 fragmentos, uno de 3000 pb correspondiente al vector y otro de aproximadamente 2500 pb, que correspondía al gen *rpoS* de *P. putida* KT2440 interrumpido con el casete de Km (Figura 18). Dicho plásmido fue denominado pGrpoS::Km^r.

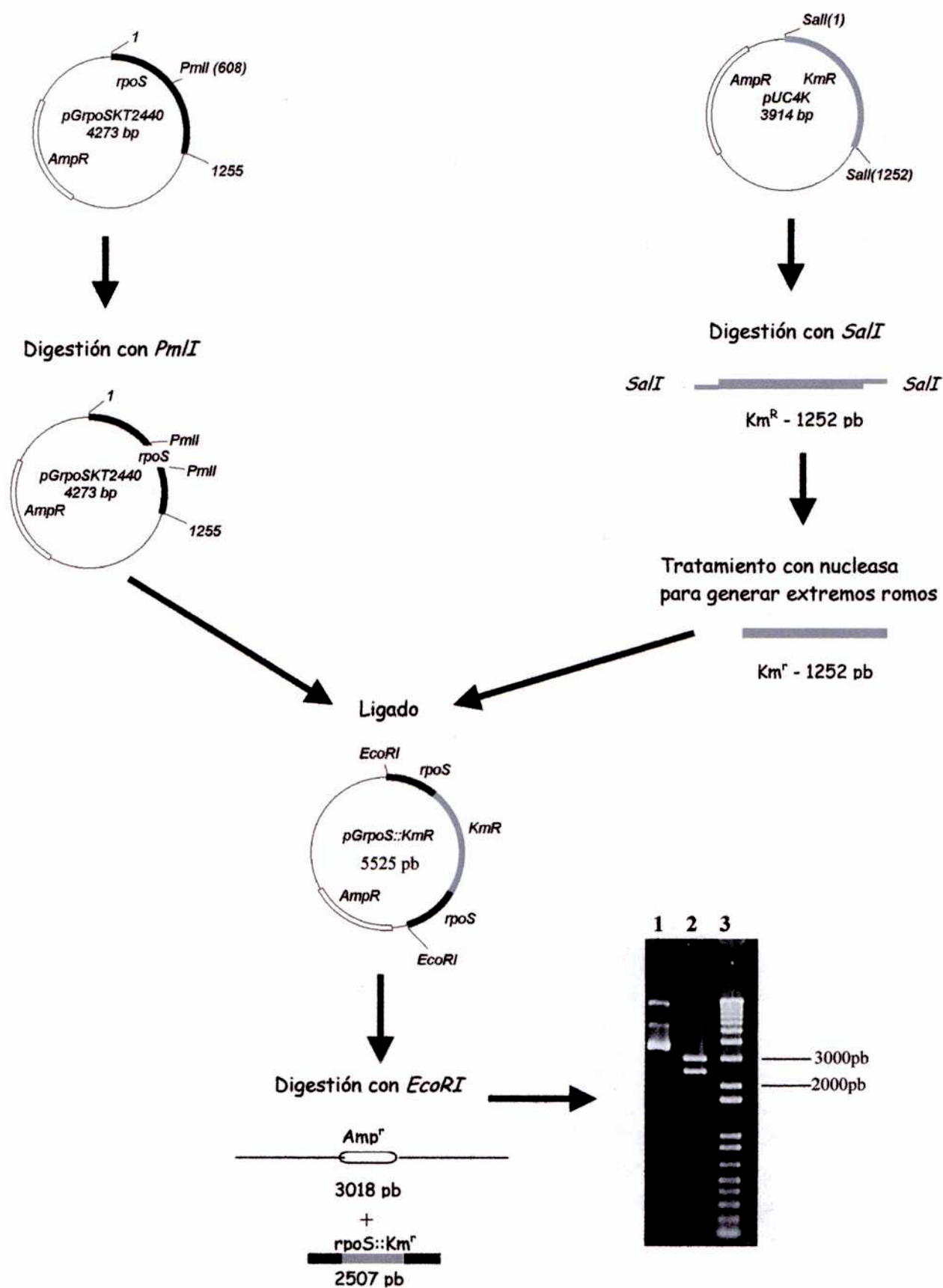


Figura 18. Construcción del plásmido *pGrpoS::Km^r*. En el gel se muestran los fragmentos obtenidos como resultado de la digestión con *EcoRI*. Calle 1: *pGrpoS::Km^r* sin cortar, calle 2: el mismo plásmido cortado con *EcoRI*, calle 4: marcador de 1 kb de BRL.

II.2.2. Construcción del plásmido pKNGrpoS::Km^r y pasaje por conjugación a *P. putida* GPo1.

Con el objetivo de transferir el gen *rpoS* interrumpido por el casete de Km a *P. putida* GPo1, se realizó un subclonado del fragmento rpoS::Km^r del plásmido pGrpoS::Km^r al plásmido pKNG101. Este último vector es un plásmido movilizable, incapaz de replicar en ausencia de la proteína π (codificada por el gen *pir*), y que además permite la selección positiva de dobles recombinantes por resistencia a sacarosa debido a la letalidad condicional de los genes *sacBR* (Kaniga *et al.*, 1991). Para realizar este subclonado el fragmento rpoS::Km^r fue liberado del plásmido pGrpoS::Km^r por corte con las enzimas *Apal* y *Sall*, y luego ligado en los sitios homólogos presente en el vector pKNG101. Como resultado se obtuvo el plásmido pKNGrpoS::Km^r.

El plásmido pKNGrpoS::Km^r fue introducido por conjugación en *P. putida* GPo1 utilizando a la cepa *E. coli* S17-1 λ pir como dadora. La selección se realizó en ME caprilato de sodio 0,25 %, suplementado con Km 25 μ g/ml y 10% de sacarosa. Posteriormente se realizó una réplica en placa de las colonias obtenidas para ver cuales de estas colonias eran resistentes a Km y sacarosa, y a su vez sensibles a Sm. Este fenotipo, estaría indicando la pérdida del vector pKNG101 y la adquisición de la resistencia a Km por recombinación homóloga con el gen *rpoS*. Se pasaron 200 colonias por réplica en placa, cuatro de las cuales resultaron resistentes a Km y sacarosa, y sensibles a Sm.

II.2.3. Verificación del genotipo de las mutantes *rpoS* mediante PCR.

Para verificar la interrupción del gen *rpoS* en el genoma de *P. putida* GPo1 se realizó una PCR utilizando oligonucleótidos degenerados, denominados rpos2up y rpos2low, que se diseñaron en base a las secuencias del gen *rpoS* de *P. putida* KT2440, *P. fluorescens* Pf-5 y *P. aeruginosa* PAO-1.

El cebador rpos2up se une al DNA 580 pb antes del sitio donde se encuentra introducido el casete de Km, y el cebador rpos2low lo hace 333 pb después. El fragmento esperado de amplificación del gen *rpoS* salvaje utilizando estos cebadores es

de 913 pb, mientras que si se encuentra el casete de Km interrumpiendo el gen el fragmento esperado es de 2165 pb.

En la Figura 19 se muestra el resultado de la amplificación por PCR de varias colonias transconjugantes Km^r , Sac^r y Sm^s . Como puede observarse, dos de esas colonias dan un fragmento de amplificación que correspondería al tamaño esperado del gen *rpoS* interrumpido por el casete de Km, mientras que el resto de las colonias dan un fragmento de amplificación que corresponde al gen *rpoS* salvaje.

Una de las colonias que presentaban la inserción del casete de Km en el gen *rpoS* se seleccionó para continuar con el análisis fenotípico. A esta cepa de *P. putida*, mutante en el gen *rpoS* se la denominó *P. putida* UBA 50-9.

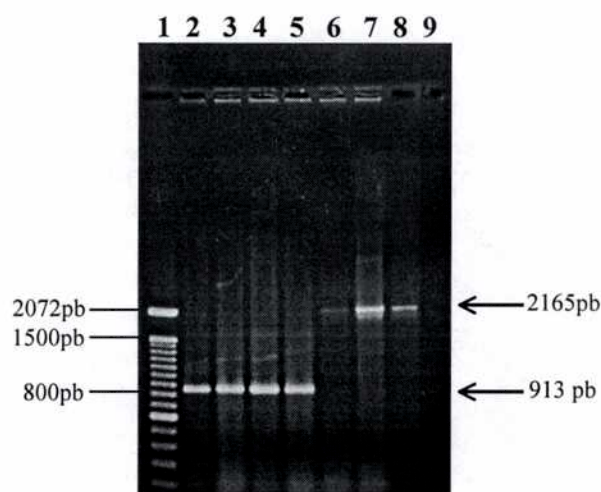


Figura 19. Verificación del genotipo de las supuestas mutantes *rpoS* mediante PCR.
 Calle 1: marcador de 100 pb de Invitrogen, calle 2: fragmento obtenido utilizando DNA de *P. putida* GPO1, calle 3 a 5: colonias con genotipo salvaje (fragmento de 913 pb), calle 6 y 7: colonias con genotipo mutante (inserción del casete, fragmento de 2165 pb), calle 8: fragmento obtenido utilizando el plásmido PKNGrpoS:: Km^r , calle 9: control negativo.

II.2.4 Verificación del fenotipo de la mutante *rpoS* *P. putida*

UBA 50-9.

Las mutantes *rpoS* se caracterizan por su sensibilidad a la exposición al agua oxigenada. El gen *katE*, que codifica para una catalasa, se induce mediante RpoS durante la entrada en fase estacionaria. Por este motivo se probó la tolerancia a H_2O_2 de

cultivos en fase de crecimiento exponencial y en fase estacionaria de *P. putida* GPo1 y *P. putida* 50-9 (Tabla 8).

En células en fase de crecimiento exponencial no se observó diferencia en cuanto a la tolerancia a H_2O_2 entre la mutante *rpoS* y su cepa parental. Sin embargo, cuando se utilizaron células en fase estacionaria, el halo de inhibición de la cepa mutante como resultado de la exposición al agente oxidante resultó aproximadamente 20% mayor que el halo de inhibición para la cepa salvaje.

Fase de crecimiento y fenotipo	Sensibilidad al H_2O_2 (diámetro del halo de inhibición en mm)
Exponencial	
RpoS ⁺	19,7 ± 0,5
RpoS ⁻	18,8 ± 0,6
Estacionario	
RpoS ⁺	27,1 ± 0,3
RpoS ⁻	21,3 ± 0,5

Tabla 8. Sensibilidad al estrés oxidativo de *P. putida* GPo1 y su correspondiente mutante *rpoS* *P. putida* UBA 50-9. Se tomó el diámetro en milímetros del halo de inhibición como medida de la sensibilidad a H_2O_2 . Los valores corresponden a medias ± 1SD.

II.2.5. Observación de la acumulación de PHA en las mutantes para el gen *rpoS*.

Si bien las mutantes *rpoS* fueron aisladas en medio mínimo, posteriormente resultó muy difícil hacerlas crecer en dicho medio. Esto resultó extraño, ya que no está descrito que las mutantes *rpoS* tengan dificultades para crecer en medio mínimo y en general las velocidades de crecimiento de dichas mutantes no difieren con las de las cepas salvajes para este gen.

A pesar de eso, se decidió observar si las cepas mutantes para *rpoS* acumulaban PHA normalmente. Para la acumulación del polímero, tanto la cepa *P. putida* UBA 50-9 como la otra mutante *rpoS* obtenida se cultivaron en ME suplementado con caprilato de sodio 0,25%. El crecimiento fue muy lento, obteniéndose una $DO_{580nm} = 0,8$ recién después de 2 días de incubación a 30°C. A esta densidad óptica, las cepas mutantes para *rpoS* eran capaces de acumular PHA, de acuerdo con la observación microscópica de las células teñidas con Azul del Nilo.

II.3. Detección de la proteína RpoS mediante *InmunoBlot*.

Una vez obtenida la mutante *rpoS* de *P. putida*, se procedió a realizar la prueba con el antisuero anti-RpoS. Para la detección de σ^S se utilizaron cultivos en fase estacionaria crecidos en LB caldo, ya que, como se mencionó anteriormente, dicho factor de transcripción se induce durante la entrada en fase estacionaria.

En la Figura 20 se observa el gel de SDS-PAGE (Figura 20 A) y el correspondiente *InmunoBlot* (Figura 20 B) utilizando el antisuero anti-RpoS, de extractos celulares de *P. putida* GPo1, *P. putida* UBA 50-9 y de la proteína RpoShisx6 purificada. En la Figura 20 B se puede visualizar que el extracto correspondiente a *P. putida* GPo1 muestra una banda de tamaño similar a la de la proteína RpoShisx6 cuando se expone al antisuero anti-RpoS. No se obtuvo ninguna banda cuando se utilizó un extracto proveniente de la cepa mutante UBA 50-9. Esto indica que el antisuero estaría reconociendo la proteína buscada.

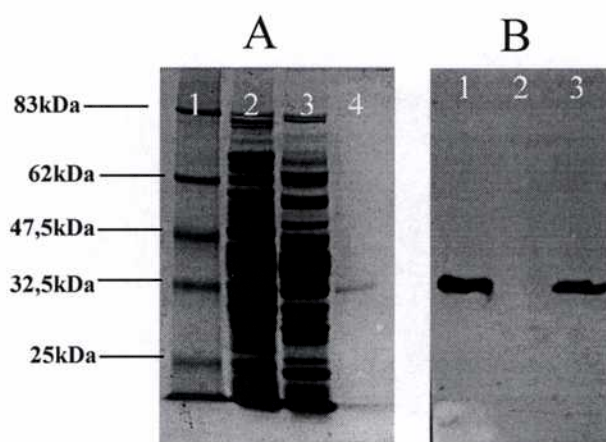


Figura 20. Gel de SDS-PAGE y correspondiente *Inmunoblot* de extractos de *P. putida* GPo1 y *P. putida rpoS* 50-9 utilizando el antisuero anti-RpoS de *P. putida* KT2440. (A). Gel de SDS-PAGE teñido con azul de Coomassie. Calle 1: marcador preteñido de NEB, calle 2: 30 μ g de extracto proteico de *P. putida* GPo1 crecida en LB caldo durante 16 hs, calle 3: 30 μ g de extracto proteico de *P. putida* 50-9 crecida en LB caldo durante 16hs, calle 4: 0,2 μ g de RpoShisx6 purificada. (B) *Inmunoblot* con antisuero anti-RpoS. Calle 1: RpoShisx6, calle 2: extracto de *P. putida* 50-9, calle 3: extracto de *P. putida* GPo1.

II.4. Clonado del gen *rpoS* de *P. putida* GPo1 mediante PCR.

Paralelamente a la construcción de la mutante *rpoS* y a la fabricación de la proteína recombinante Rposhisx6 se realizó el clonado del gen *rpoS* de *P. putida* GPo1 mediante amplificación por PCR. Para diseñar los cebadores utilizados para la reacción de PCR, se realizó un alineamiento de las secuencias correspondientes al gen *rpoS* de varias *Pseudomonas*. Uno de estos cebadores se diseñó en base a la comparación de las secuencias flanqueantes al extremo 5' del gen y se denominó **rpoS2up**. Dado que la secuencia adyacente al extremo 3' de *rpoS* se hallaba poco conservada, se decidió analizar si existía homología en la secuencia del gen adyacente. Analizando la región flanqueante al gen *rpoS* de las especies de *Pseudomonas* fluorescentes presentes en bases de datos, se encontró que en todas las especies el gen adyacente hacia el extremo 3' era el gen *fdxA*, el cual codifica para una ferredoxina. Este gen se encuentra codificado en la cadena de DNA complementaria a la que codifica para σ^S . La comparación de la secuencia carboxi-terminal de la proteína FdxA entre *P. syringae*, *P. putida* KT2440 y WCS358, *P. aeruginosa* y *P. fluorescens* mostró una alta homología, lo cual permitió el diseño del otro cebador que se utilizó en la PCR, al cual se lo llamó **fdxA** (Figura 21A).

La amplificación por PCR del DNA de *P. putida* GPo1, utilizando los cebadores mencionados y las condiciones que se detallaron en Materiales y Métodos, generó dos fragmentos de distinta intensidad. El fragmento de mayor intensidad tenía un tamaño de aproximadamente 1400 pb y el de menor intensidad, 1600 pb (Figura 21B). El tamaño esperado de amplificación de acuerdo con la secuencia de *P. putida* WCS358 era de 1588 pb.

Para realizar la identificación de los fragmentos obtenidos, se realizó una segunda PCR utilizando como molde cada uno de estos fragmentos por separado. Los cebadores utilizados para esta PCR fueron diseñados por Canosa *et al.* (1999) en base a la región más conservada de *rpoS* entre las especies de *Pseudomonas* (Ramos González y Molin, 1998). Estos cebadores, denominados **ErpoS2up** y **ErpoS2low**, fueron los mismos que se utilizaron en la sección II.1.1 para la amplificación del fragmento interno del gen *rpoS* de *P. putida* KT2440. Como se puede observar en la Figura 21C, el único fragmento que dio amplificación positiva fue el fragmento de mayor tamaño. Dicho fragmento se clonó en el plásmido pGEM-T easy de Promega y se envió a secuenciar a la compañía Anagen.

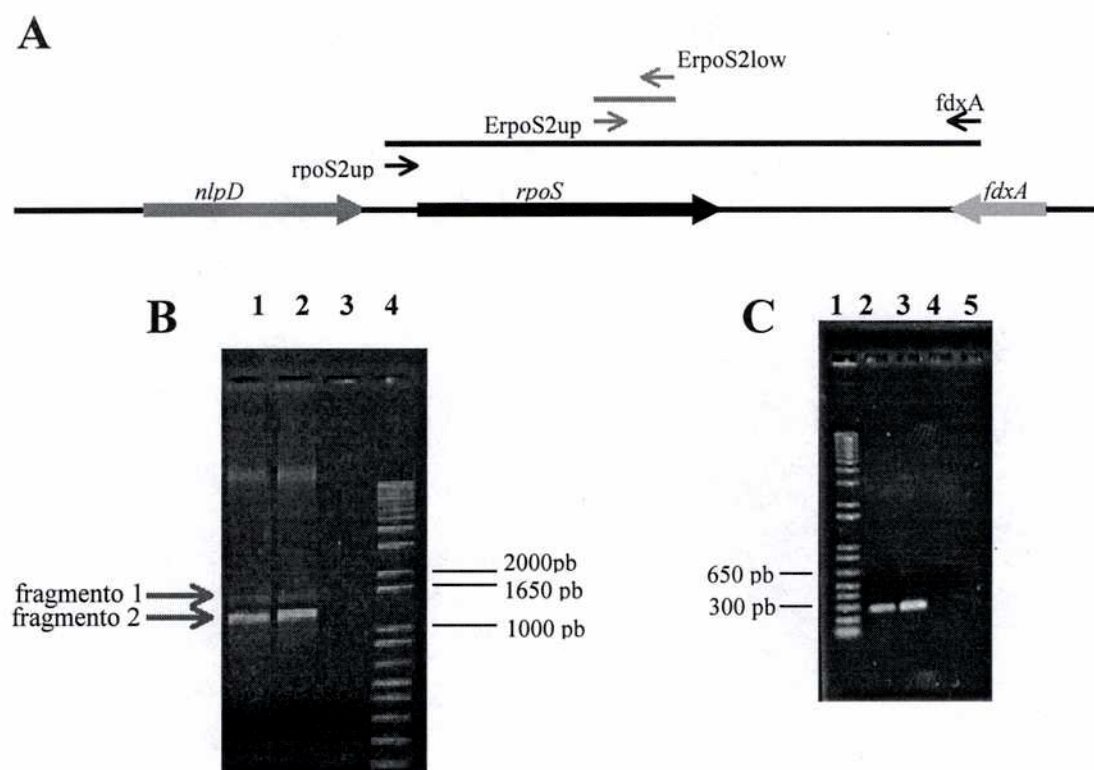


Figura 21. (A) Representación esquemática del gen *rpoS* y su región adyacente, junto con los cebadores utilizados para la amplificación de dicho gen. (B). Fragmentos obtenidos mediante amplificación por PCR utilizando los cebadores *rpoS2up* y *fdxA*. Calle1: fragmento obtenido a partir de DNA de *P. putida* GPo1, calle 2: fragmento obtenido utilizando como molde DNA de *P. putida* KT2440, calle 3: control negativo de PCR, calle 4: marcador de 1kb de BRL. (C). Amplificación por PCR utilizando los cebadores internos (*ErpoS2up* y *ErpoS2low*) para el gen *rpoS*. DNA utilizado como molde en cada caso: calle2: DNA de *P. putida* GPo1, calle 3: fragmento 1 obtenido en (B), calle 4: fragmento 2 obtenido en (B), calle 5: control negativo (H_2O).

La secuenciación del gen *rpoS* se realizó por caminado cromosómico, es decir a partir de la secuencia inicial obtenida utilizando los cebadores universales M13, se diseñaron nuevos cebadores (internos) y se continuó la secuenciación. Además de los cebadores universales (M13F y M13R) se utilizaron un total de 4 cebadores para la secuenciación completa del gen en las dos direcciones.

En la Figura 22 se muestra la secuencia completa del gen *rpoS* de *P. putida* GPo1, que posee un tamaño de 1007 pb. Este gen codifica para una proteína de un tamaño estimado de 38 kDa.

```

tcgaactcaccaaaggactataacaatggctctcagtaaagaagtgcgggagtttgacatc
R T H Q R T I T M A L S K E V P E F D I
gacgatgacctgcttctgatggagacgggtatcgttttggaacggatgtggtgtcagac
D D D L L L M E T G I V L E T D V V S D
gaacctgctgtatcttcgggttcggacgagggccaagtgcgggctcttcgctcaagcaacac
E P A V S S V R T R A K S G S S L K Q H
aagtatatcgattacagccgggctcgatgccacccagttgtatctcaacgagatcgga
K Y I D Y S R A L D A T Q L Y L N E I G
ttctcgctctgcttttcgcccgaagaggaagtgcattttgcgcgcctgtcgcaaaagggc
F S P L L S P E E E V H F A R L S Q K G
gacctgcccggcgaagcgcgatgatcgaaagcaacctgcgcctgggttgtaaaaattgcc
D P A G R K R M I E S N L R L V V K I A
cgctggtacgtgaaccgcccgtgctgctgctcgacctgatcgaggagggcaacctgggg
R R Y V N R G L S L L D L I E E G N L G
ctgatccgtgcccgcgagaagttcgacccggagcgtgggtttccgggttctcgacctatgcg
L I R A V E K F D P E R G F R F S T Y A
acctgggtggattcgccagaccatcgagcgggcatcatgagccagaccgcaccattcg
T W W I R Q T I E R A I M S Q T R T I R
ttgccgttccacgtggtcaaggaactgaacgtctacctgcgcgcctgcgcgcgagctgacc
L P F H V V K E L N V Y L R A A R E L T
cagaaactggaccacgaacctcgcgcagaagaaatcgccacctgctggagaaaacgggtc
Q K L D H E P S P E E I A T L L E K P V
gccgaggtcaagcgcgatgctgggcctgaacgagcgggtgtcttcgggtggatgtgtcgtc
A E V K R M L G L N E R V S S V D V S L
ggcccggattcggacaagacctgctcgataacctgaccgacgaccgcccgaccgaccgg
G P D S D K T L L D T L T D D R P T D P
tgccaactgctgcaggatgacgacctgtgcgagagcatcgaccaatgggtgggcgagttg
C E L L Q D D D L S Q S I D Q W L G E L
accgacaagcagcgtgaagtgggtggcgcgcctttggcctgcgcgggcatgaaagcagc
T D K Q R E V V R R F G L R G H E S S
acctggaagatgtaggcctggagattggcctgacctgagcgggtgcggcagatccag
T L E D V G L E I G L T R E R V R Q I Q
gttgaggggctcgagcgtttgctgagatcctcgagaagaacggcctgtccagtgagtcg
V E G L E R L R E I L E K N G L S S E S
ttgttccagtagcggaagcctgcaacacaaaacgccccgatgatttcggggcggtttttgt
L F Q - R K P A T Q N A P M I S G R F C

```

Figura 22. Secuencia nucleotídica del gen *rpoS* de *P. putida* GPo1. En letra gris se muestra la secuencia codificante. La secuencia sombreada corresponde a la secuencia de Shine Dalgarno.

Las secuencias depositadas en las bases de datos que mostraron mayor porcentaje de identidad con la secuencia de *rpoS* de *P. putida* GPo1 fueron las secuencias de *rpoS* correspondientes a dos cepas de *P. putida* aisladas de suelo, KT2440 (92% de identidad) y WCS358 (91% de identidad) (Tabla 9).

Asimismo, al realizar el alineamiento de la secuencia deducida de aminoácidos de σ^S de *P. putida* GPo1 con secuencias de RpoS de otras *Pseudomonas* y de enterobacterias, se observó que la mayor identidad corresponde a las secuencias de RpoS de *P. putida* KT2440 (Identidad: 98%, Similitud: 99%) y *P. putida* WCS358 (Identidad: 97%, Similitud: 99%). El porcentaje de identidad del RpoS de *P. putida*

GPo1 con la secuencia de la proteína homóloga en enterobacterias se encuentra alrededor del 66 % (porcentaje de similitud de 77%) (Tabla 9).

El alto porcentaje de identidad entre la secuencia de *rpoS* de *P. putida* GPo1 y la de *P. putida* KT2440, sustentó la utilización del gen *rpoS* de KT2440 para la construcción tanto de la mutante *rpoS*, como de la proteína recombinante RpoShisx6 a partir de la cual se obtuvo el antisuero anti-RpoS utilizado en este trabajo.

Si bien se logró secuenciar el gen *rpoS* completo, no fue posible obtener la secuencia de DNA adyacente al extremo 3' de dicho gen. Esto podría deberse al alto contenido G+C de la región (alrededor de un 50% en otras especies de *Pseudomonas*) y a la probable presencia de secuencias terminadoras de la transcripción.

Tabla 9. Porcentajes de identidad y similitud del gen *rpoS* y de la secuencia aminoacídica del factor sigma RpoS de *P. putida* GPo1 con otros genes *rpoS* y secuencias aminoacídicas de RpoS presentes en bases de datos.

Microorganismo	% de identidad en la secuencia de DNA	Proteína	
		% Identidad	% Similitud
<i>P. putida</i> KT2440	92	98	99
<i>P. putida</i> WCS358	91	97	99
<i>P. chlororaphis</i>	85	92	95
<i>P. fluorescens</i>	84	91	95
<i>P. syringae</i> pv. <i>tomato</i>	82	90	94
<i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i>	83	90	93
<i>P. tolaasii</i>	85	89	94
<i>P. aeruginosa</i>	84	86	93
<i>A. vinelandii</i>	83	85	92
<i>S. flexneri</i>	83	66	77
<i>E. coli</i>	83	66	77
<i>S. typhimurium</i>	83	66	77

II.5. Análisis del contenido intracelular de σ^S en *P. putida* GPo1 y GPo500 en distintas condiciones de crecimiento.

II.5.1. Nivel intracelular de σ^S en *P. putida* GPo1 durante el crecimiento en medio mínimo.

Como se mencionó en la Introducción, existen varios factores que controlan el nivel de σ^S durante el crecimiento. A su vez, el contenido intracelular de este factor de transcripción también se ve influenciado por el medio de cultivo utilizado para el crecimiento bacteriano.

El medio mínimo utilizado para realizar el estudio del nivel intracelular de RpoS fue Medio E suplementado con caprilato de sodio 0,25%. El caprilato de sodio es utilizado para la acumulación de PHA por parte de las cepas de *P. putida*. Debido a la relación carbono: nitrógeno de este medio, diferente a la del medio 0,5NE₂ utilizado previamente, la degradación del polímero recién se observa después de 50 hs de cultivo a 32°C.

Para analizar el contenido intracelular de σ^S en *P. putida* GPo1 durante el crecimiento en ME suplementado con caprilato 0,25%, se realizó una curva de crecimiento de esta bacteria en dicho medio, y se determinó el contenido de RpoS a distintos tiempos, mediante la técnica de *InmunoBlot*. El resultado se puede observar en la Figura 23. Durante la fase logarítmica de crecimiento (3 y 5 horas) se detectaron niveles bajos de σ^S . Como era de esperar, el contenido de esta proteína se incrementó durante la entrada en la fase estacionaria (aproximadamente, luego de 7 horas de cultivo). En la fase estacionaria tardía (24 horas) el nivel intracelular de RpoS mostró una leve disminución, probablemente debido a degradación de la proteína.

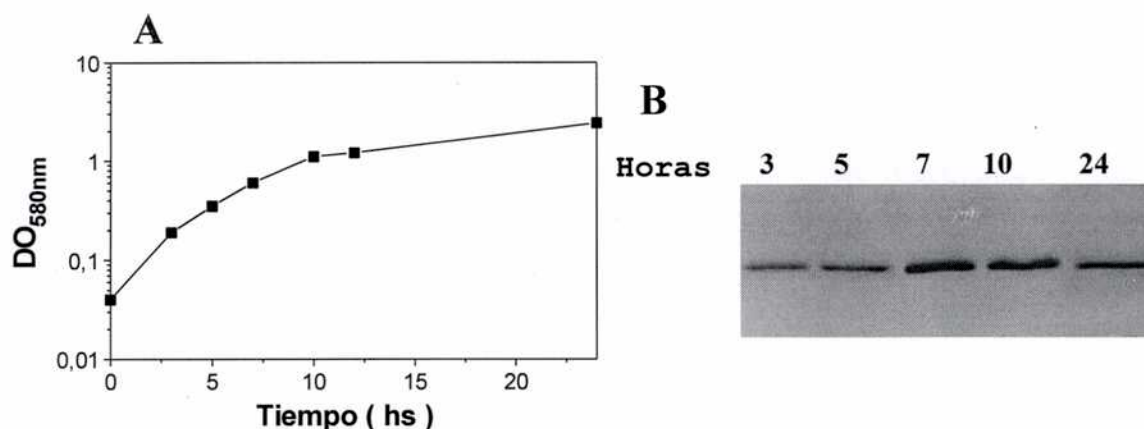


Figura 23. (A) Curva de crecimiento de *P. putida* GPo1 en ME suplementado con caprilato de sodio 0,25%. **(B)** Análisis de *Inmunoblot* del contenido de RpoS en *P. putida* GPo1 cultivada en ME suplementado con 0,25% de caprilato de sodio durante 3, 5, 7, 10 y 24 hs. El *Inmunoblot* se realizó con anticuerpos policlonales anti-RpoS de *P. putida* KT2440 y en cada calle se sembraron 30 µg de proteínas totales.

II.5.2. Comparación del nivel intracelular de σ^S en *P. putida* GPo1 y GPo500 cultivadas en medio rico y medio mínimo.

A continuación, se analizó el contenido intracelular de RpoS durante el crecimiento en medio rico y en medio mínimo. En este caso, además de la cepa de *P. putida* GPo1, también se utilizó la cepa mutante en la enzima PHA depolimerasa, GPo500, para determinar si existía alguna diferencia en el nivel intracelular de σ^S de las dos cepas. Para esto se realizaron curvas de crecimiento de ambas cepas en ME suplementado con 0,25% caprilato de sodio y en Caldo Nutritivo, y se tomaron muestras en fase exponencial y estacionaria para realizar el *InmunoBlot* con el antisuero anti-RpoS.

Las cepas de *P. putida* cultivadas en ME, caprilato de sodio 0,25% son capaces de acumular PHA, mientras que no pueden hacerlo cuando se crecen utilizando CN como medio de cultivo.

En la Figura 24 se muestra la curva de crecimiento en CN para *P. putida* GPo1 y GPo500 (Figura 24A) y el correspondiente *InmunoBlot* de las muestras tomadas en fase exponencial ($DO_{580nm} \cong 0,4$) y fase estacionaria ($DO_{580nm} \cong 1,0$) (Figura 24B). Se observó un nivel muy bajo de σ^S durante la fase exponencial de crecimiento (calles 1 y

3). Dos horas después de la entrada en fase estacionaria el contenido intracelular de RpoS aumentó marcadamente para las dos cepas (calles 2 y 4).

El nivel de σ^S también se vio incrementado durante la entrada en fase estacionaria cuando las bacterias se cultivaron en medio mínimo (Figura 25B, calles 2 y 4). Sin embargo, durante la fase exponencial de crecimiento en medio mínimo (Figura 25B, calles 1 y 3), el contenido de RpoS resultó mucho mayor que el observado durante la fase exponencial en medio rico (Figura 24B, calles 1 y 3).

La cepa salvaje y la cepa mutante *phaZ* mostraron niveles similares de RpoS durante el crecimiento en ambos medios.

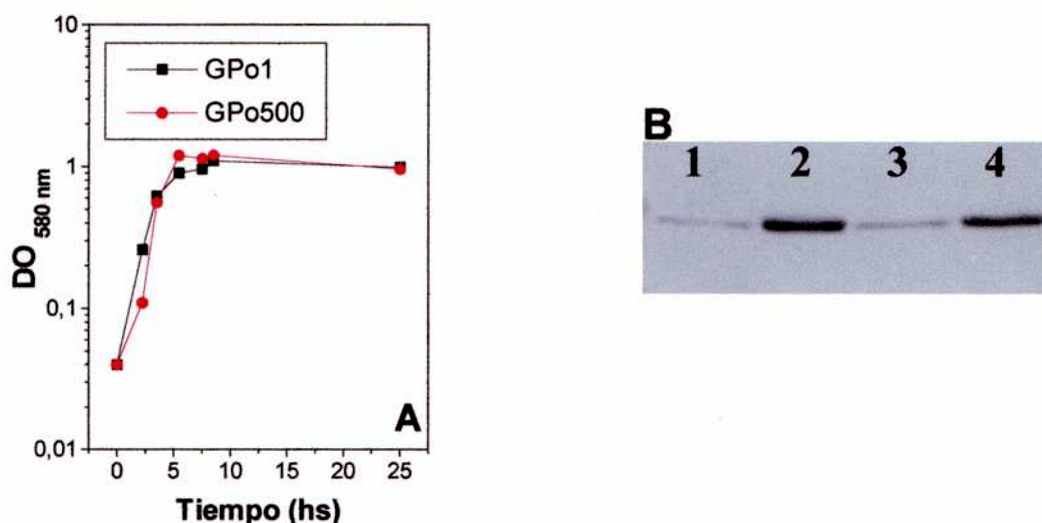


Figura 24. (A) Curvas de crecimiento de *P. putida* GPo1 y GPo500 cultivadas en CN. **(B)** Contenido de RpoS en *P. putida* GPo1 y GPo500 durante la fase exponencial (calle 1: *P. putida* GPo1, calle 3: *P. putida* GPo500) y la fase estacionaria de crecimiento (calle 2: *P. putida* GPo1, calle 4: *P. putida* GPo500) en CN. Para el análisis mediante *Immunoblot* se utilizaron 40 μ g de proteínas totales por calle y antisuero anti-RpoS. Para preparar los extractos proteicos se tomaron muestras de los cultivos cuando estos alcanzaron una $DO_{580nm} \cong 0,4$ (fase exponencial) y dos horas después de la entrada en fase estacionaria ($DO_{580nm} \cong 1,0$).

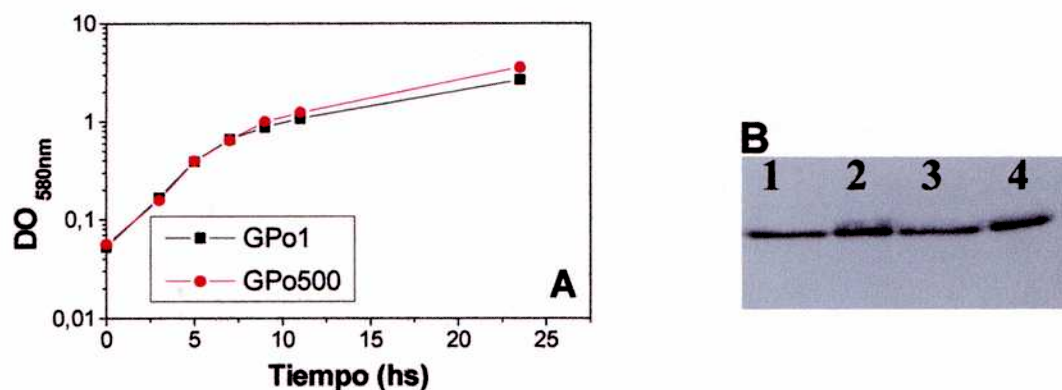


Figura 25. (A). Curva de crecimiento de *P. putida* GPo1 y GPo500 en ME suplementado con 0,25% caprilato de sodio. **(B).** Contenido intracelular de RpoS de *P. putida* GPo1 y GPo500 durante la fase exponencial (calle 1: *P. putida* GPo1, calle 3: *P. putida* GPo500) y la fase estacionaria de crecimiento (calle 2: *P. putida* GPo1, calle 4: *P. putida* GPo500) en ME, caprilato de sodio 0,25%. Para el análisis de *Immunoblot* se utilizaron las condiciones que se detallaron en la Figura anterior. Para preparar los extractos proteicos se tomaron muestras de los cultivos cuando estos alcanzaron una $DO_{580nm} \cong 0,4$ (fase exponencial) y dos horas después de la entrada en fase estacionaria ($DO_{580nm} \cong 1,6$).

II.6. Resistencia al estrés en *P. putida* GPo1 y GPo500 durante el ayuno en carbono.

De acuerdo con resultados previos, la cepa capaz de degradar el PHA acumulado mostraba mayor tolerancia a la exposición al etanol y al choque térmico que la cepa mutante en la depolimerasa de PHA, cuando ambas cepas se mantenían durante varios días en microcosmos de agua de río.

Para analizar con más precisión la tolerancia al estrés de ambas cepas durante la depolimerización de PHA, era necesario establecer las condiciones adecuadas para tal fin. Como primer paso se decidió realizar un ayuno múltiple de cultivos de *P. putida* GPo1 y GPo500 con PHA acumulado, de manera de obtener una rápida degradación del polímero ante la ausencia de la fuente carbonada y así poder analizar el fenotipo de resistencia durante el proceso de depolimerización de PHA.

Para realizar el ayuno múltiple, células de *P. putida* GPo1 y GPo500 cultivadas en ME caprilato de sodio 0,25% hasta una $DO_{580nm}=0,8$, se mantuvieron durante varios días en solución fisiológica (NaCl 0,09%), con agitación a 32°C. En estas condiciones, se analizaron dos parámetros: la presencia de los gránulos de PHA, mediante tinción de

Azul del Nilo y la resistencia a dos tipos de estrés: térmico y oxidativo. Se observó que la degradación de PHA en la cepa salvaje ocurría muy lentamente, ya que la tinción de Azul del Nilo mostró que aún existían células con gránulos del poliéster luego de 13 días de permanencia en solución fisiológica. La resistencia al estrés resultó similar para ambas cepas luego de 1, 6 y 13 días de permanencia en solución fisiológica.

Dado que el diseño experimental anterior no resultaba el más adecuado para nuestros propósitos, se decidió realizar un ayuno en carbono de las células bacterianas utilizando el medio mínimo de crecimiento E (ME) sin el agregado de fuente carbonada y así evaluar lo que ocurría con la degradación del polímero en esas condiciones. En la Tabla 10 se muestra el contenido de PHA de *P. putida* GPo1 y GPo500 antes y después del ayuno en carbono. El contenido de PHA de la cepa mutante antes del ayuno en carbono se encuentra alrededor del 3%, permaneciendo prácticamente invariable luego de 16 hs en medio sin carbono. En la cepa salvaje el PHA es rápidamente degradado, ya que luego de 1,5 hs en ME sin carbono, la cantidad de poliéster disminuye marcadamente. El contenido de PHA inicial es de 2%, disminuye a 0,2% luego de 1,5 horas y no se detecta luego de 16 horas de incubación en medio sin carbono.

En la Figura 26 se muestra la tinción de Azul del Nilo de las células de *P. putida* GPo1 y GPo500 antes de ser sometidas al ayuno en carbono y después de 1,5 hs en medio sin carbono. De acuerdo con la intensidad de fluorescencia se puede observar que en la cepa salvaje el nivel de PHA disminuye marcadamente luego de 1,5 hs de ayuno en carbono, mientras que la cepa mutante no muestra cambio en cuanto a los gránulos de PHA.

Tiempo de ayuno en carbono (hs)	Contenido de PHA (% de peso seco celular)	
	Cepa de <i>P.putida</i>	
	GPo1	GPo500
0	2,2	3,0
0,5	0,8	2,7
1,5	0,2	2,5
16	ND	2,8

Tabla 10. Contenido de PHA de *P. putida* GPo1 y GPo500 durante el ayuno en carbono. Cada valor es el promedio de dos determinaciones.

ND: no detectado

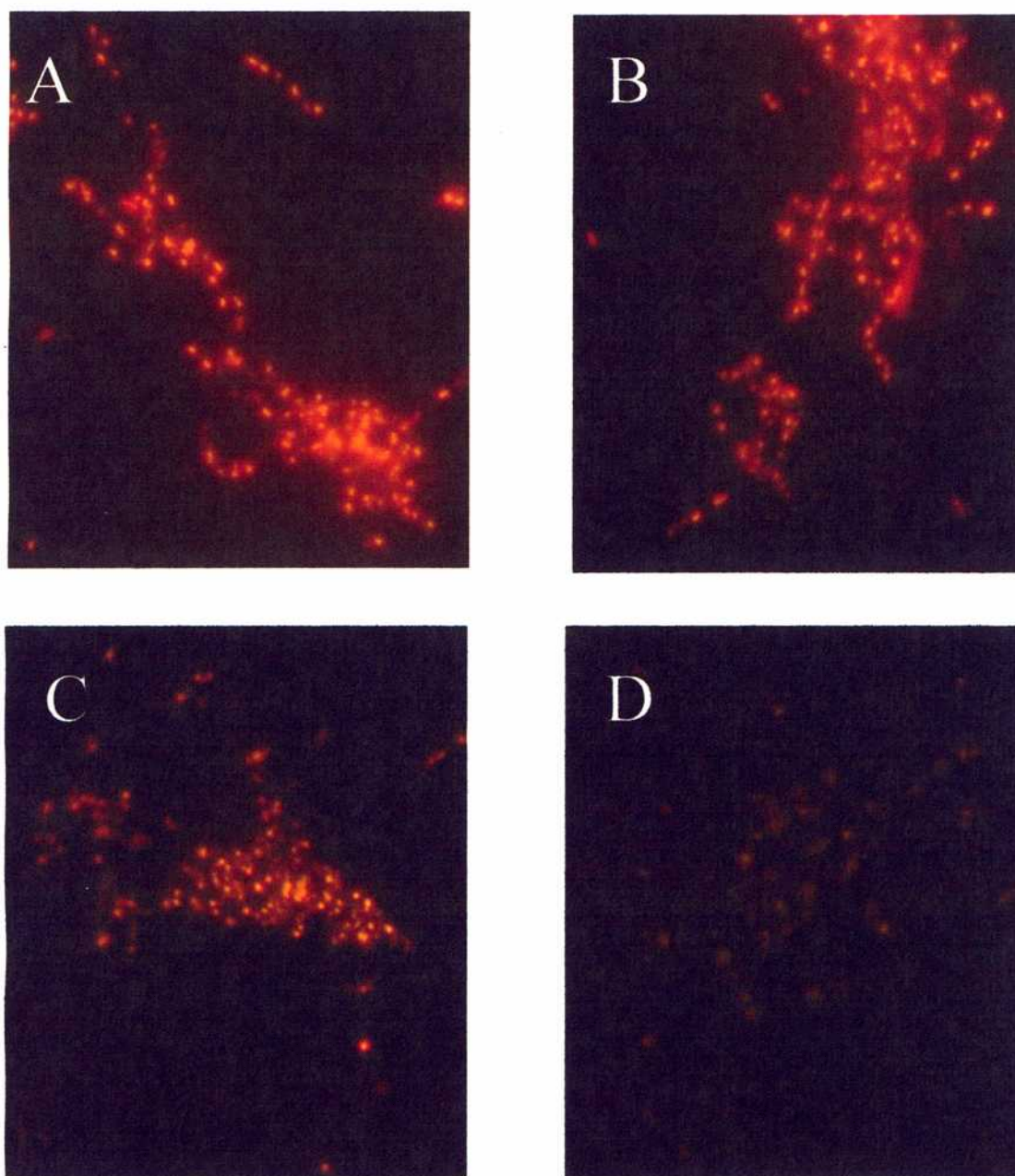


Figura 26. Células de *P. putida* GPo1 y GPo500 teñidas con Azul del Nilo antes y después del ayuno en carbono. Los extendidos de células se observaron al microscopio a una longitud de onda de 460nm y a un aumento de 1000x. (A) Células provenientes de cultivo de *P. putida* GPo500 cultivada en ME suplementado con 0,25% de caprilato de sodio (B) Células de *P. putida* GPo500 luego de 1,5 hs de ayuno en carbono. (C) Células provenientes de cultivo de *P. putida* GPo1 en ME suplementado con 0,25% de caprilato de sodio (D) Células de *P. putida* GPo1 luego de 1,5 hs en medio sin carbono.

Teniendo en cuenta el momento en el cual comenzaba a degradarse el PHA, se realizaron experimentos de resistencia a estrés térmico y oxidativo en ambas cepas a distintos tiempos durante el ayuno en carbono, para ver si se observaban diferencias en la tolerancia al estrés.

En la Figura 27 se muestran los resultados de los experimentos de resistencia a estrés oxidativo realizados con ambas cepas. La tolerancia a la exposición al H_2O_2 de los cultivos en fase estacionaria (antes del pasaje a medio sin carbono) resultó similar para ambas cepas de *P. putida*, tal como se observa en la Figura 27A. Sin embargo, luego de 1,5 horas en medio sin carbono la cepa mutante, GPo500, mostró menor resistencia al estrés oxidativo que la cepa salvaje. Luego de 25 minutos de exposición a H_2O_2 el porcentaje de supervivencia de *P. putida* GPo500 hambreada en carbono durante 1,5 horas fue de aproximadamente 0,17%, mientras que la cepa salvaje mostró alrededor de un 5% de supervivientes (Figura 27B). Después de 16 horas sin carbono, la resistencia al estrés oxidativo resultó similar para ambas cepas (Figura 27C)

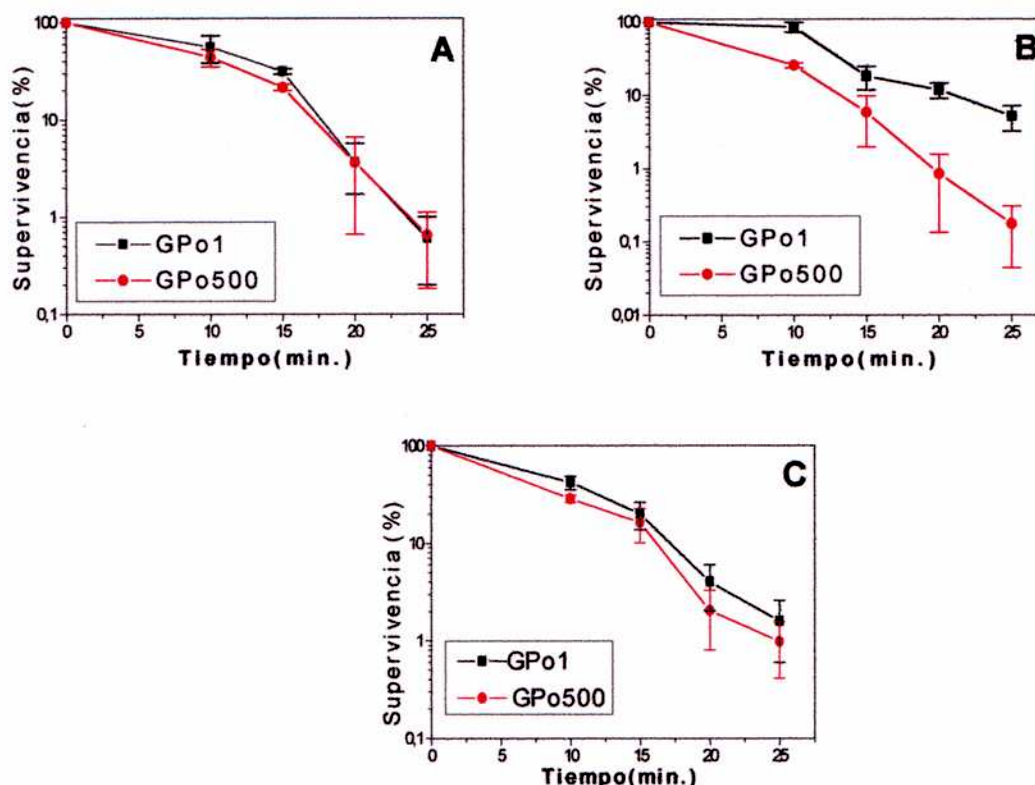


Figura 27. Resistencia al estrés oxidativo. (A) Tolerancia a la exposición al H₂O₂ de cultivos de *P. putida* GPo1 y GPo500 crecidos a 32°C en ME suplementado con 0,25% caprilato de sodio. Las bacterias se cultivaron hasta una DO_{580nm}=0,8 y posteriormente fueron expuestas a una concentración de 3mM de H₂O₂ durante distintos tiempos. El porcentaje de supervivientes se determinó mediante recuento del número de ufc. (B) Tolerancia al estrés oxidativo de *P. putida* GPo1 y GPo500 ayunadas en carbono durante 1,5 hs. Los cultivos crecidos como se indicó en (A) se centrifugaron, se lavaron con ME sin fuente de carbono, se resuspendieron en el mismo medio y se mantuvieron con agitación a 32°C. Luego de 1,5 hs de ayuno en carbono se realizó la exposición al agente oxidante para determinar el porcentaje de supervivientes. (C). Tolerancia al estrés oxidativo de *P. putida* GPo1 y GPo500 ayunadas en carbono durante 16 hs como se indicó en (B). El 100% de supervivientes corresponde al número de células viables antes de la exposición al H₂O₂ (aproximadamente 3x10⁴ ufc/ml). Los valores representan las medias ± el desvío estándar (SD) de tres experimentos independientes.

La Figura 28 muestra los resultados obtenidos para el estrés térmico. Al igual que lo ocurrido con el estrés oxidativo, la resistencia al choque térmico a 47°C resultó similar para ambas cepas, tanto antes del ayuno en carbono (Figura 28A), como después de 16 hs en ME sin carbono (Figura 28C). En cambio, luego de 1,5 horas en medio sin carbono la resistencia al estrés térmico resultó notoriamente mayor para la cepa GPo1, observándose un 3% de células supervivientes luego de 12 minutos a 47°C, contra un 0,04% de supervivencia para la cepa mutante en la depolimerasa de PHA (Figura 28B).

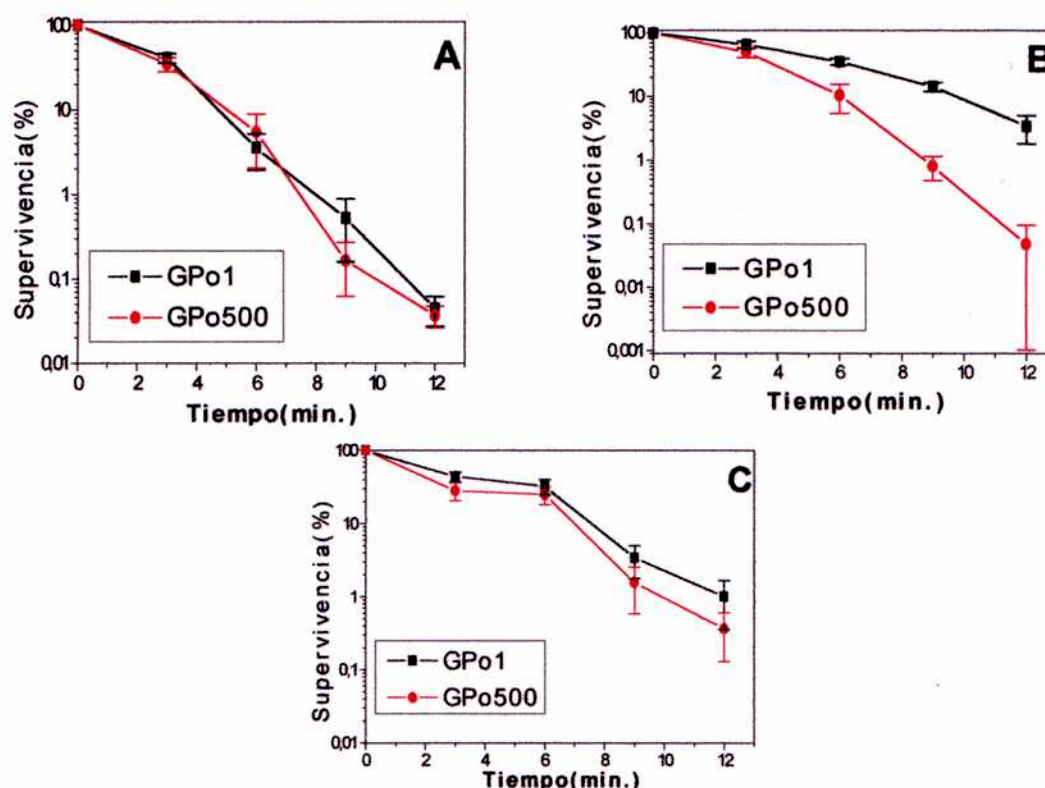


Figura 28. Resistencia al estrés térmico. (A) Tolerancia al choque térmico de cultivos de *P. putida* GPo1 y GPo500 crecidos a 32°C en ME suplementado con 0,25% caprilato de sodio. Las bacterias se cultivaron hasta una $DO_{580nm}=0,8$ y posteriormente fueron expuestas a una temperatura de 47°C durante distintos tiempos. El porcentaje de supervivientes se determinó mediante recuento del número de ufc. (B) Tolerancia al choque térmico de *P. putida* GPo1 y GPo500 ayunadas en carbono durante 1,5 hs. Los cultivos crecidos como se indicó en (A) se centrifugaron, se lavaron con ME sin fuente de carbono, se resuspendieron en el mismo medio y se mantuvieron con agitación a 32°C. Luego de 1,5 hs de ayuno en carbono se realizó la exposición a 47°C para determinar el porcentaje de supervivientes. (C). Tolerancia al choque térmico de *P. putida* GPo1 y GPo500 ayunadas en carbono durante 16 hs como se indicó en (B). El 100% de supervivientes corresponde al número de células viables antes de la exposición a 47°C (aproximadamente 3×10^4 ufc/ml). Los valores representan las medias $\pm$ el desvío estándar (SD) de tres experimentos independientes.

Estos resultados muestran que existen diferencias en la resistencia al estrés entre las dos cepas durante el período de degradación de PHA. Luego de 2 horas de incubación en ME sin carbono no se observaron gránulos de PHA en la células, lo cual indica que durante esa fracción de tiempo existe una activa depolimerización de PHA provocada por la ausencia de la fuente carbonada. Las mayores diferencias en cuanto a la resistencia al estrés se observan durante este período de tiempo (luego de 1,5 hs de incubación en medio sin carbono). Después de 16 hs de ayuno en carbono, la cepa

salvaje ya ha agotado completamente sus reservas de PHA. La tolerancia al estrés en estas condiciones es similar para ambas cepas.

II.7. Nivel intracelular de σ^S en *P. putida* GPo1 y GPo500 durante ayuno en carbono.

Los resultados descriptos en la sección anterior mostraron que en condiciones de ayuno en carbono, la degradación de PHA incrementaba la resistencia al estrés. A continuación se procedió a analizar el contenido intracelular de la proteína σ^S mediante *Immunoblot* en la cepa de *P. putida* salvaje y en la mutante *phaZ* para ver si también se encontraban diferencias en el contenido intracelular de dicha proteína.

En la Figura 29A, se muestra el resultado del *Immunoblot* utilizando el antisuero anti-RpoS. Los cultivos en fase estacionaria de *P. putida* GPo1 y GPo500 poseen cantidades similares de σ^S (calles 1 y 2). Después de 30 minutos de ayuno en carbono se observa que el nivel de RpoS es levemente mayor en la cepa salvaje que en la mutante (calles 3 y 4). La diferencia en el contenido de σ^S entre las dos cepas se incrementa luego de 90 minutos sin fuente de carbono (calles 5 y 6). Luego de 960 min. (16 hs) de ayuno en carbono la proteína RpoS es prácticamente indetectable, probablemente debido a existe degradación de la misma (calles 7 y 8). Los gráficos de barras de la Figura 29B representan el contenido de RpoS para cada tiempo de ayuno en carbono relativos al contenido antes del ayuno en carbono para cada cepa.

En la Figura 29B también se graficaron los porcentajes de PHA relativos al peso seco, antes (tiempo 0) y durante el ayuno en carbono. El contenido de PHA en la cepa GPo1, se reduce en un 46% después de 30 minutos de ayuno en carbono, y 74% luego de 90 minutos. Mientras tanto, en la cepa mutante los niveles de PHA se encuentran alrededor del 3% durante todo el experimento.

De la observación de la Figura 29B se puede concluir que durante el ayuno en carbono, existe un aumento en el nivel intracelular de σ^S en ambas cepas de *P. putida*. Sin embargo, el contenido de σ^S es menor en la cepa incapaz de degradar el PHA.

Además del análisis del contenido de RpoS también se realizaron experimentos de resistencia a estrés térmico y oxidativo, tanto antes como después de 90 minutos en el medio sin carbono. Los resultados obtenidos fueron similares a los descriptos en la sección anterior, es decir no se encontraron diferencias en la tolerancia al estrés de los

cultivos en fase estacionaria de ambas cepas, pero sí se observó una mayor sensibilidad al estrés en la cepa mutante, GPo500, luego de 90 minutos de ayuno en carbono.

El mayor contenido de RpoS de la cepa GPo1 en comparación con la cepa GPo500 durante la degradación de PHA, explicaría la mayor tolerancia al calor y al peróxido de hidrógeno observados en la cepa salvaje.

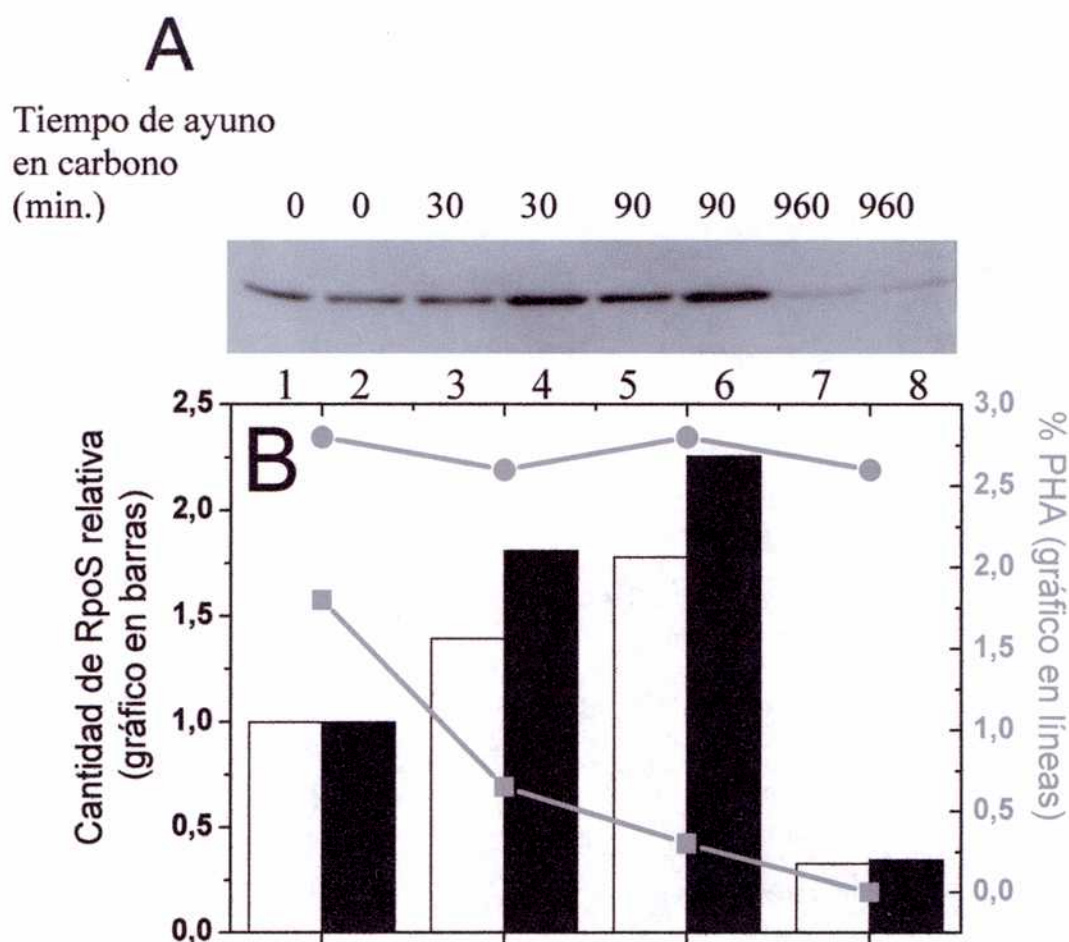


Figura 29. Comparación del contenido intracelular de RpoS de *P. putida* GPo1 y GPo500 durante ayuno en carbono. (A) Calles 1 y 2: cultivos en fase estacionaria de GPo500 y GPo1, respectivamente. Calles 3 a 8: *P. putida* GPo500 (calles 3, 5 y 7) y GPo1 (calles 4, 6 y 8) sometidas a ayuno en carbono durante 30, 90 y 960 minutos. El experimento se repitió por duplicado, obteniéndose resultados similares. **(B).** Estimación del contenido de RpoS de la Fig. 29 A (barras blancas: GPo500, barras negras: GPo1), y porcentaje de PHA (●: GPo500, ■: GPo1). La membrana de *Immunoblot* se digitalizó con el analizador de imágenes luminiscentes LAS1000 plus, y las bandas se cuantificaron por densitometría utilizando el software Image Gauge Ver. 3.12 (Fuji Photo Film CO LTD). El contenido de RpoS para cada cepa se grafica relativo al contenido de RpoS antes del ayuno en carbono (Figura 29 A, calles 1 y 2).

II.8. Resistencia al estrés y nivel intracelular de σ^S en *P. putida* GPo500/pBBR1MCS-2 y GPo500/pmPpCZ durante ayuno en carbono.

A continuación se analizó el nivel de RpoS y el fenotipo de resistencia a estrés en la cepa mutante GPo500 complementada por introducción del plásmido pmPpCZ, que lleva los genes *phaC1* y *phaZ* de *P. putida* GPo1.

En la Tabla 11 se muestran los valores de porcentaje de PHA para la cepa GPo500 con el plásmido pmPpCZ y para la misma cepa con el plásmido vector (pBBR1MCS-2). Para la cepa GPo500/ pmPpCZ, se obtuvo una reducción en el contenido de PHA de alrededor de un 42%, 80% y 90%, después de 30, 90 y 120 minutos de ayuno en carbono, respectivamente.

El cultivo estacionario en ME suplementado con 0,25% de caprilato de sodio de la cepa mutante complementada con el gen *phaZ* acumuló un porcentaje mayor de PHA (5%) que el acumulado por la cepa salvaje, GPo1 (2,2% - Tabla 10). A su vez, en la cepa mutante complementada el contenido de PHA luego de 90 minutos en medio sin carbono, se encontró alrededor del 1% (Tabla 11) en comparación con el 0,2% observado en la cepa salvaje, GPo1 (Tabla 10). Por este motivo en la cepa GPo500 complementada se monitoreó el contenido de σ^S a tiempos más extensos que los utilizados para la cepa salvaje.

En la Figura 30, puede observarse que la complementación de la mutación *phaZ* incrementa los niveles de RpoS durante el ayuno en carbono. Después de 60, 90 y 120 minutos de ayuno en carbono, el contenido de σ^S de la cepa mutante portadora del plásmido con el gen que codifica para la PHA depolimerasa (calles 5, 7 y 9) resultó mayor que el contenido de σ^S de la misma cepa con el plásmido vector (calles 6, 8 y 10).

Tiempo de ayuno en carbono (min.)	Contenido de PHA (% de peso seco celular)	
	<i>P. putida</i> GPo500	
	pmPpCZ	pBBR1MCS-2
0	4,6	3,4
30	2,9	3,1
60	1,6	3,5
90	0,98	3,7
120	0,52	3,4

Tabla 11. Contenido de PHA de *P. putida* GPo500 con el plásmido pBBR1MCS-2 (plásmido vector) y con el plásmido pmPpCZ (plásmido con los genes *phaC1* y *phaZ*). Cada valor es el promedio de dos determinaciones.

A

Tiempo de ayuno
en carbono
(min.)

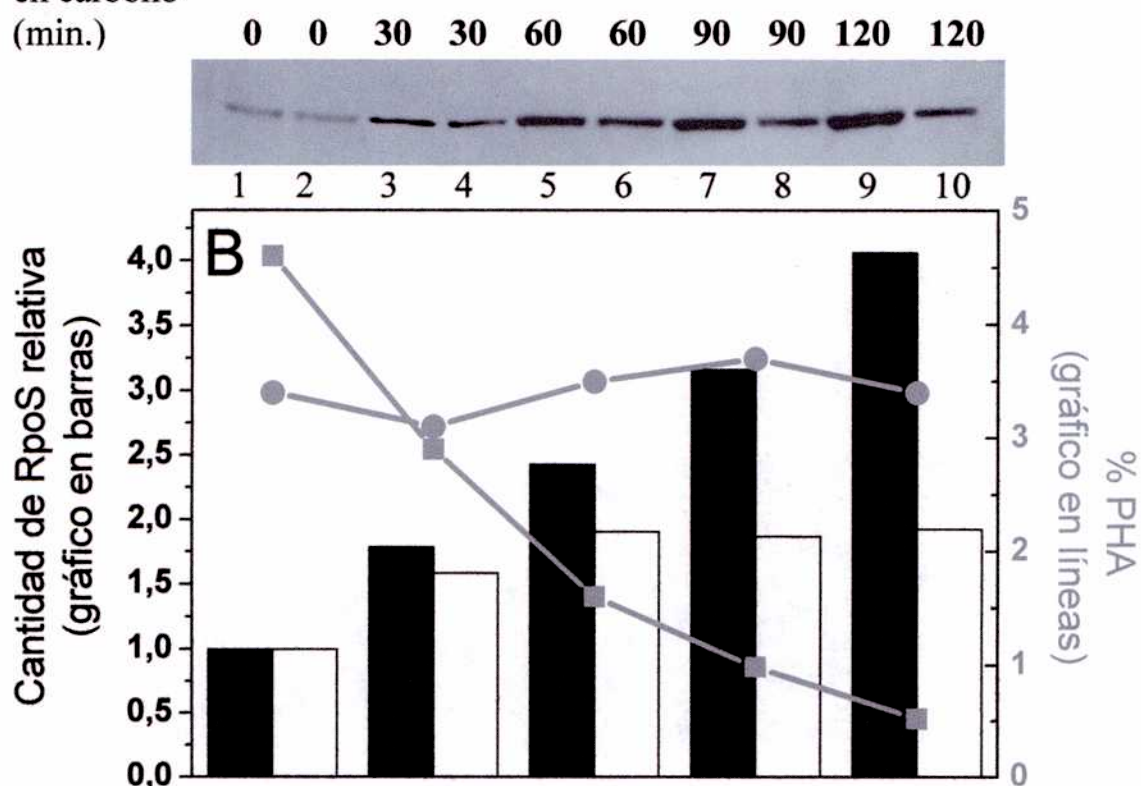


Figura 30. Comparación del contenido intracelular de RpoS de *P. putida* GPo500/pmPpCZ y GPo500/pBBR1MCS-2 durante ayuno en carbono. (A) Calles 1 y 2: cultivos en fase estacionaria de GPo500/pmPpCZ y GPo500/pBBR1MCS-2, respectivamente. Calles 3 a 10: *P. putida* GPo500/pmPpCZ (calles 3, 5, 7 y 9) y GPo500/pBBR1MCS-2 (calles 4, 6, 8 y 10) sometidas a ayuno en carbono durante 30, 60, 90 y 120 minutos. El experimento se repitió por triplicado, obteniéndose resultados similares. (B). Estimación del contenido de RpoS de la Fig. 30A (barras negras: GPo500/pmPpCZ, barras blancas: GPo500/pBBR1MCS-2) y contenido de PHA (■: GPo500/pmPpCZ, ●: GPo500/pBBR1MCS-2). La estimación del contenido de RpoS se realizó igual a lo mencionado en la Figura 29B. El contenido de RpoS para cada cepa se grafica relativo al contenido de RpoS antes del ayuno en carbono (Fig. 30 A, calles 1 y 2).

Los gráficos de la Figura 31 muestran la comparación de la tolerancia al estrés de la cepa GPo500, con y sin el gen que codifica para *phaZ*. Como puede observarse en la Figura 31A, la complementación de la mutación *phaZ* incrementa la supervivencia ante la exposición a H_2O_2 . Lo mismo ocurre con la tolerancia al estrés térmico (Figura 31B) aunque en este caso, no existe tanta diferencia en cuanto al porcentaje de supervivencia como el que se observa para el estrés oxidativo.

A partir de estos resultados, se puede concluir que la complementación de la mutación *phaZ* restaura el fenotipo observado en la cepa salvaje, es decir resulta más resistente al estrés en condiciones de ayuno en carbono. Asimismo, el aumento en la tolerancia al estrés que se observa durante la depolimerización de PHA puede ser explicada por el incremento en las concentraciones intracelulares de RpoS, ya que los niveles de este factor de transcripción son mayores cuando existe depolimerización de PHA.

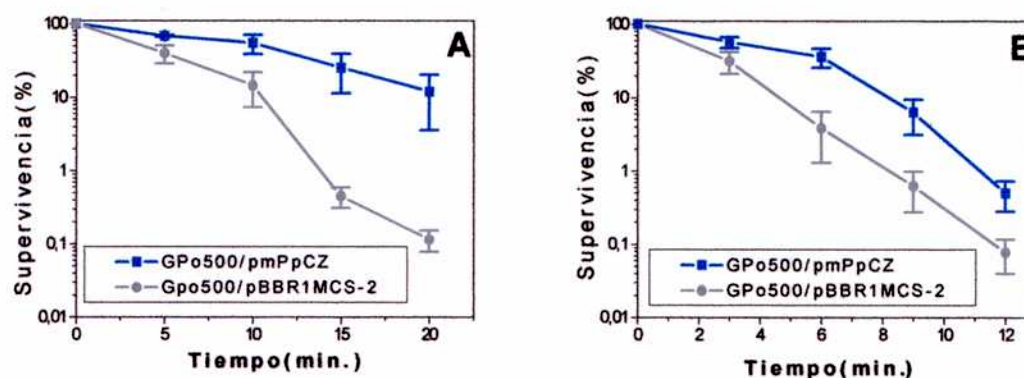


Figura 31. Tolerancia al estrés térmico y oxidativo de *P. putida* GPo500/pBBR1MCS-2 y *P. putida* GPo500/pmPpCZ luego de 120 minutos de ayuno en carbono. (A) Tolerancia a la exposición a 3 mM de H_2O_2 . (B) Tolerancia a la exposición a 47°C. Los valores representan las medias $\pm$ el desvío estándar (SD) de tres experimentos independientes. El 100% de supervivencia corresponde al número de bacterias antes de la exposición al agente estresante (aproximadamente 3×10^4 ufc/ml).

Discusión y Conclusiones

En un medio ambiente cambiante, una respuesta rápida que facilite el reajuste de la célula procariota a nuevas condiciones constituye un mecanismo importante para la supervivencia bacteriana.

La mayoría de los estudios relacionados con la respuesta desencadenada ante factores de estrés en bacterias no esporuladas se ha realizado en enterobacterias, como *E. coli* y *Salmonella*, y en diferentes especies del género *Pseudomonas*. En estas bacterias, condiciones de estrés nutricional o físico-químico inducen la expresión de varios genes con un único objetivo: lograr adaptarse a las nuevas condiciones adversas para poder sobrevivir. Esta adaptación se basa en la síntesis rápida de alarmonas celulares, tales como ppGpp o AMPc, así como también en la inducción del factor sigma de fase estacionaria, σ^S .

La energía necesaria para hacer frente a estos cambios debe ser suministrada por el metabolismo endógeno a partir de constituyentes celulares (tales como proteínas o RNA) y polímeros de reserva.

Los trabajos realizados hasta el momento sobre mecanismos de respuesta al estrés, no han tenido en cuenta la influencia del polihidroxialcanoato; ya sea porque dichos trabajos se realizaban en enterobacterias y estas son incapaces de sintetizar PHA o porque directamente no se analizaba el contenido de PHA de las bacterias en el momento de evaluar la tolerancia al estrés.

En el presente trabajo de tesis se estudió el papel de la utilización de un polímero de reserva (polihidroxialcanoato) en la respuesta de resistencia a estrés en la bacteria *P. putida*. Este estudio comprendió el análisis del efecto de la degradación de PHA en la acumulación de la alarmona ppGpp y en el nivel intracelular del factor σ^S .

I. Niveles intracelulares de guanosina tetrafosfato (ppGpp) y adenosina trifosfato (ATP) durante la degradación de PHA.

Los resultados presentados en la sección I.2. (Figura 10) demostraron que existía un aumento transitorio en el nivel intracelular de ppGpp aproximadamente 5 hs después del comienzo de la degradación de PHA en la cepa salvaje de *P. putida*, mientras que en la

cepa mutante en la depolimerasa de PHA los niveles de este nucleótido permanecían aproximadamente constantes. Para verificar estos resultados, se procedió a realizar la complementación de la mutación *phaZ* y la posterior medición de ppGpp en la cepa mutante complementada (Figura 13). La complementación de la mutación *phaZ* restauró la capacidad de degradación de PHA, pudiéndose observar además, un incremento en el nivel intracelular de ppGpp luego del comienzo de la depolimerización. De acuerdo con la evidencia genética presentada en este trabajo, la degradación de PHA está asociada a un aumento transitorio en el contenido intracelular de ppGpp.

La respuesta estricta se encuentra bien caracterizada en *E. coli*. Un trabajo realizado con *P. aeruginosa* y *P. fluorescens* cultivadas en medio rico, demostró que dichas bacterias acumulaban ppGpp cuando se transferían a un medio sin nitrógeno. En ambas especies existe un aumento en el nivel de ppGpp, cinco a diez minutos después del pasaje a medio sin nitrógeno. Dicha acumulación es seguida de una rápida disminución en el contenido de dicho nucleótido, retornando así a los niveles basales (Greenway y England, 1999). Dado que existe acumulación de ppGpp como resultado de la falta de nitrógeno en el medio, es probable que la acumulación de dicho nucleótido en *Pseudomonas* se vea regulada por el mismo mecanismo encontrado en *E. coli*, que es dependiente de la enzima RelA (ppGpp sintetasa I). La secuenciación de los genomas de varias *Pseudomonas*, demostró que existen genes homólogos al gen *relA* de *E. coli* en *P. aeruginosa*, *P. fluorescens*, *P. syringae* pv *syringae* y *P. putida* KT2440. Utilizando oligonucleótidos degenerados diseñados a partir de la secuencia del gen *relA* de *P. aeruginosa* PAO-1 y *P. putida* KT2440, se logró amplificar en *P. putida* GPol un fragmento que correspondería al gen *relA* (Ruiz, resultados no publicados).

Dado que el pppGpp y el ppGpp se sintetizan por fosforilación de GTP y GDP, respectivamente; la depolimerización de PHA podría proporcionar la energía necesaria para la síntesis de la alarmona ppGpp en determinadas condiciones. El medio utilizado para la síntesis de PHA posee bajas cantidades de nitrógeno, por lo cual es de esperar que luego de un tiempo, la limitación de dicho nutriente induzca la repuesta estricta. La degradación del polímero de reserva, una vez agotada la fuente de carbono, podría proporcionar la energía necesaria para la síntesis de ppGpp, lo cual explicaría el aumento en el nivel intracelular de dicho nucleótido observado posteriormente al comienzo de la degradación del polímero.

Por otro lado, el nivel intracelular de ATP resultó mayor cuando la bacteria era capaz de depolimerizar PHA. Tanto la cepa salvaje de *P. putida* (GPol/ pmPpCZ),

como la cepa con la mutación *phaZ* complementada, (GPo500/pmPpCZ) mostraron niveles mayores de ATP que la cepa mutante, GPo500, con el plásmido vector durante todo el experimento. En *P. putida* GPo1/pmPpCZ y GPo500/pmPpCZ se observó un pequeño aumento en el nivel de ATP un par de horas después del inicio de la degradación de PHA (Figura 13).

De acuerdo con resultados obtenidos por Hippe en *Ralstonia eutropha*, la utilización de PHA se encontraba asociada con la fosforilación oxidativa (Hippe, 1967). Los resultados obtenidos en este trabajo están indicando que la capacidad de degradación de PHA proporcionaría a la célula una mayor energía, que puede ser utilizada para la síntesis de alarmonas celulares, tales como ppGpp.

II. Clonado del gen *rpoS* de *P. putida* GPo1

Para el clonado del gen *rpoS* mediante amplificación por PCR se diseñaron cebadores que hibridaban con las regiones de DNA adyacentes a dicho gen. Para poder amplificar el extremo 3' del gen fue necesario utilizar un cebador que hibridara con el gen *fdxA*, ya que la secuencia flanqueante al extremo carboxi-terminal de RpoS no se encontraba muy conservada entre las distintas especies de *Pseudomonas*. Asimismo, tampoco fue posible amplificar el gen *rpoS* de *P. putida* GPo1 con los cebadores diseñados a partir de las secuencias adyacentes al gen *rpoS* de *P. putida* KT2440.

El tamaño de la región intergénica entre el gen *rpoS* y el gen *fdxA* difiere en distintas especies de *Pseudomonas*. En el caso de *P. putida* GPo1, no nos fue posible secuenciar dicha región intergénica. Tanto en *P. putida* KT2440 (Ramos-González y Molin, 1998), como en *P. fluorescens* Pf-5 (Sarniguet *et al.*, 1995) existe un fuerte terminador de la transcripción Rho-independiente río abajo del gen *rpoS* ($\Delta G^0 \cong -20$ kcal/mol). Esto podría explicar la dificultad para secuenciar la región intergénica en *P. putida* GPo1.

La comparación de la secuencia deducida de aminoácidos de la proteína RpoS de *P. putida* GPo1 con las secuencias de la proteína del mismo nombre en otras bacterias, mostró que los porcentajes más altos de identidad (98 % y 97%) se obtienen con otras *Pseudomonas* aisladas de suelo (*P. putida* KT2440 y *P. putida* WCS358). A su vez, el menor porcentaje de identidad con las especies del género se obtuvo con la secuencia de σ^S de la bacteria patógena oportunista *P. aeruginosa* (86% de identidad).

Resulta importante mencionar que si bien el gen *rpoS* es un gen esencial para la supervivencia bacteriana en condiciones de estrés, el análisis de la secuencia de dicho gen en distintos aislamientos naturales de *E. coli* y *Salmonella* sp. mostró que existen variaciones en la secuencia de *rpoS* (Leclerc *et al.*, 1996; Herbelin *et al.*, 2000). Además, se han observado una gran cantidad de fenotipos como consecuencia de una función alterada de *rpoS* (Benito *et al.*, 1999). Dado que σ^S es un factor de transcripción que compite con el factor *housekeeping* σ^D por la unión a la RNA polimerasa (Farewel *et al.*, 1998), un aumento en la expresión de σ^S lleva a una disminución en la expresión de los genes *housekeeping*. Por lo tanto, teniendo en cuenta que las bacterias de vida libre se encuentran expuestas a distintas condiciones ambientales, la presencia de polimorfismos en el gen *rpoS* depende de la ventaja adaptativa que otorgue el hecho de poseer un gen *rpoS* funcional o no funcional.

III. Resistencia al estrés y nivel intracelular de σ^S en *P. putida* GPo1 y GPo500

III.1. Variaciones en el contenido intracelular de σ^S a lo largo del crecimiento y en distintos medios de cultivo.

Los mecanismos que regulan el nivel intracelular de σ^S son muy complejos y aún no se conocen con exactitud. Bajo diferentes condiciones de crecimiento existen varios mecanismos alternativos para producir un aumento en el nivel intracelular de σ^S (Yamashino *et al.*, 1995; Lee *et al.*, 1995).

Tanto en las enterobacterias *E. coli* y *Salmonella thyphimurium*, (Lange y Hengge-Aronis, 1994; Cunning y Elliot, 1999) como en varias especies de *Pseudomonas*, (Tanaka y Takahashi, 1994; Whistler *et al.*, 1998; Ojangu *et al.*, 2000) está descrito que el nivel de σ^S se incrementa durante la entrada en la fase estacionaria. En *E. coli* cultivada en medio mínimo, la velocidad de síntesis de RpoS aumenta durante la fase exponencial tardía y disminuye rápidamente luego de la entrada en fase estacionaria. Sin embargo la concentración intracelular de σ^S continúa aumentando 2 horas después

del comienzo de la fase estacionaria. Esto se debe fundamentalmente al aumento en la estabilidad de la proteína (Lange y Hengge-Aronis, 1994).

El estudio del nivel intracelular de RpoS mediante *Inmunoblot* en *P. putida* GPo1 cultivada en medio mínimo (sección II.5.2, Figura 25) mostró que el contenido intracelular de esta proteína aumenta durante la entrada en fase estacionaria. En la fase estacionaria tardía, luego de 24 hs de incubación en el medio de crecimiento, el nivel de RpoS muestra una pequeña disminución. Probablemente, varias horas después de la entrada en fase estacionaria la bacteria comience a degradar sus componentes celulares. Esto explicaría esa leve disminución.

Si bien en distintas especies de *Pseudomonas* se han encontrado diversos reguladores de la transcripción de *rpoS*, aún no se ha investigado la existencia de mecanismos de regulación post-transcripcional y post-traducciona. La secuencia amino-terminal de σ^S de *P. putida* es diferente a la secuencia de *E. coli* (Ramos González y Molin, 1998). Dado que esta secuencia está involucrada en la regulación post-transcripcional en *E. coli*, se podría pensar que los mecanismos regulatorios post-transcripcionales en ambos tipos de bacterias son diferentes.

De acuerdo con el análisis de *Inmunoblot* del contenido de RpoS en *P. putida* GPo1 y GPo500 cultivadas en medio rico (Sección II.5.2, Figura 24) el nivel de σ^S durante la fase exponencial de crecimiento es prácticamente indetectable, observándose un marcado aumento en el contenido de dicha proteína luego de la entrada en la fase estacionaria. Durante el crecimiento en medio mínimo el nivel de σ^S durante la fase exponencial es mucho mayor que el observado cuando las células se cultivan en medio rico.

En *E. coli* también se han encontrado diferencias en el contenido de RpoS cuando se utilizan distintos medios de cultivo. Durante el crecimiento en medio rico, σ^S alcanza su máxima concentración celular al comienzo de la fase estacionaria, mientras que cuando la bacteria se cultiva en medio mínimo el nivel de esta proteína continúa en aumento hasta 2 hs después del comienzo de la fase estacionaria. (Lange y Hengge Aronis, 1994). Otro estudio realizado en la misma bacteria con DNA *microarrays* demostró que, tanto la expresión de *rpoS*, como la de los genes dependientes de dicho regulador, resultan mucho mayores cuando *E. coli* se cultiva en medio mínimo (Tao *et al*, 1999). Los autores de este trabajo explican este hecho, argumentando que el crecimiento de *E. coli* en medio mínimo suplementado con glucosa provoca la formación y liberación de

acetato, por lo tanto en dichas condiciones se vuelve fundamental para la célula la protección contra el estrés ácido, en la cual intervienen genes inducidos por σ^S . En el caso de *P. putida* GPo1, el crecimiento en ME suplementado con caprilato de sodio ocurre en condiciones de desbalance nutricional, condiciones en las cuales tiene lugar la acumulación de PHA. Esto podría llegar a explicar que el contenido de RpoS durante la fase exponencial en medio mínimo sea mayor al observado en medio rico.

III.2. Resistencia a estrés y nivel intracelular de σ^S . Relación con la degradación de PHA

III.2.1. La resistencia al estrés se incrementa durante la degradación de PHA

En este trabajo se evaluó la resistencia al estrés durante la degradación de PHA. La estrategia utilizada para provocar la depolimerización consistió en el pasaje de las bacterias con PHA acumulado a un medio sin carbono con el objetivo de inducir una rápida degradación del polímero. De esta manera, luego de 2 horas de incubación en un medio con composición similar al utilizado para el crecimiento y la acumulación del polímero, pero sin el agregado de fuente carbonada, la cepa salvaje de *P. putida* degradaba todo el PHA acumulado. Por otro lado, la incubación de las bacterias en solución fisiológica no provocó una rápida degradación, probablemente debido a la ausencia de nutrientes necesarios para llevar a cabo este proceso.

Al comparar la resistencia al estrés de *P. putida* GPo1 y GPo500 antes, durante y después de la degradación de PHA, se observaron marcadas diferencias en la tolerancia al estrés térmico y oxidativo únicamente durante la degradación del polímero. Durante el período de activa depolimerización del PHA acumulado, la cepa salvaje mostró una tolerancia al estrés mucho mayor que la cepa mutante en la depolimerasa de PHA (sección II.6, Figura 27 y 28). Asimismo, la tolerancia al estrés de la cepa salvaje aumentó durante la degradación de PHA (Figura 27 y 28, A y B) y varias horas después de haber agotado sus reservas de PHA volvió a disminuir (Figura 27 y 28 C). Esto

estaría indicando que, en estas condiciones de ayuno total en carbono, el aumento en la resistencia al estrés es un efecto transitorio.

Sin embargo, experimentos previos de tolerancia a la exposición al etanol y al estrés térmico realizados con *P. putida* GPo1 y GPo500 mantenidas durante 30 días en microcosmos de agua de río, demostraron que existía un incremento gradual en la resistencia al estrés de la cepa salvaje con el tiempo de permanencia en el microcosmos. Si bien no se realizó una medición del contenido intracelular de PHA en dicho experimento, no se visualizaron gránulos de PHA después de 24 hs de permanencia en agua de río. Cuando las bacterias se mantienen en estas condiciones, es probable que exista una acumulación y degradación dinámica de PHA, ya que el polímero puede ir siendo sintetizado a partir del carbono disponible que se genera a partir de la muerte de las células en el microcosmos (que comenzaba a observarse después de 10 días). Además, en los microcosmos no existía una privación total de carbono. Dado que en ambientes naturales las células se encuentran expuestas a condiciones de alternancia con respecto a la disponibilidad de nutrientes, cabe esperar que la acumulación y degradación de PHA sea un proceso dinámico, y que la utilización del polímero sea fundamental para la supervivencia cuando los nutrientes se vuelven escasos.

Por otro lado, la ventaja que otorga la utilización de PHA podría explicar las diferencias encontradas en la supervivencia al ayuno nutricional en distintos medios. En un trabajo realizado con *P. aeruginosa* se observó un mayor porcentaje de supervivientes cuando las bacterias se mantuvieron durante 15 días en ME suplementado con glucosa que cuando se utilizó ME suplementado con succinato o LB (Suh *et al.*, 1999). El crecimiento con glucosa disminuía la sensibilidad al ayuno prolongado. Dado que *P. aeruginosa* es capaz de acumular PHA cuando se cultiva con glucosa, pero no cuando se cultiva con succinato como fuente de carbono o con LB, es muy probable que la diferencia en cuanto a la supervivencia se deba a la capacidad de acumulación y posterior degradación de PHA.

Dadas las potenciales aplicaciones biotecnológicas de las *Pseudomonas* en la agricultura, biocatálisis y bioremediación, el estudio del papel del PHA en la supervivencia de este microorganismo al ayuno en nutrientes resulta de suma importancia. Posteriormente a la realización de este trabajo, se publicaron varias investigaciones orientadas al estudio del rol de la degradación de PHA en bacterias de importancia ecológica. Uno de ellos se realizó con la bacteria fijadora de nitrógeno *Azospirillum brasilense*, microorganismo que es capaz de promover el crecimiento de

las plantas a las cuales vive asociado. En esta bacteria también se utilizó una mutante *phaZ* para evaluar la supervivencia y la tolerancia al estrés. Los resultados demostraron que la cepa capaz de utilizar el PHA era más resistente a estrés térmico, oxidativo, osmótico y a la exposición a la luz UV, que la cepa mutante *phaZ*. Asimismo, tanto la respuesta quimiotáctica a compuestos de carbono, como la supervivencia en soportes utilizados para inoculantes de suelo resultó mayor en la cepa salvaje (Kadouri *et al.*, 2003). Por otro lado, también se estudió el efecto de la utilización del PHA sobre la degradación de compuestos tóxicos en la bacteria *Sphingopyxis chilensis* S37. Los resultados sugirieron que en condiciones de ayuno en carbono la degradación de PHA podría aportar la energía necesaria para biodegradación de clorofenoles (Godoy *et al.*, 2003).

III.2.2. El nivel intracelular de σ^S aumenta durante la degradación de PHA

Como se mencionó previamente en la Introducción, la acumulación, degradación y utilización de PHA bajo condiciones de estrés constituye un mecanismo que favorece la supervivencia y competencia de las bacterias en el ambiente, especialmente cuando las fuentes de carbono y energía son limitantes.

Al igual que lo encontrado en *E. coli*, cuando *P. putida* KT2440 se mantiene en un medio sin carbono se induce un conjunto de proteínas específicas con un patrón temporal (Giskov *et al.*, 1994a). Utilizando una mutante RpoS de *P. putida* KT2440 se demostró que σ^S actuaba como un regulador central de la expresión genética bajo condiciones de ayuno en carbono (Ramos-González y Molin, 1998).

De acuerdo con los resultados presentados en este trabajo, condiciones de ayuno en carbono inducen una rápida degradación del PHA acumulado. A su vez, los resultados obtenidos demuestran que existe un aumento en el contenido intracelular del regulador de la respuesta a estrés, σ^S , cuando tiene lugar la degradación del polímero de reserva bacteriano polihidroxialcanoato. Tanto para la cepa salvaje como para la mutante, los niveles de σ^S se incrementan durante las primeras horas de ayuno en carbono, pero el contenido intracelular de RpoS es mayor en la cepa capaz de depolimerizar PHA (sección II.7, Figura 29).

Al comparar el contenido de σ^S de la cepa GPo500 complementada con el gen *phaZ* con el contenido de RpoS de la misma cepa con el plásmido vector, se observaron marcadas diferencias (sección II.7, Figura 30). En la cepa GPo500 complementada, el nivel de RpoS aumenta conforme el PHA va siendo degradado. Luego de 120 minutos en medio sin carbono, el nivel de σ^S de la cepa mutante complementada fue notoriamente mayor al nivel de RpoS de la cepa GPo500 con el plásmido vector.

Cuando se analizó el contenido de σ^S durante la degradación de PHA en la cepa mutante *phaZ* complementada (Figura 30), se observaron mayores diferencias con respecto a la cepa mutante, que cuando se utilizó la cepa salvaje, GPo1 (Figura 29). Esto es coincidente con el hecho de que la cepa mutante complementada acumula niveles un poco más elevados de PHA que la cepa GPo1 (Tabla 10 y Tabla 11). De acuerdo con estos resultados, un mayor porcentaje de PHA utilizado se relaciona con un mayor contenido de σ^S (Figuras 29 y 30).

La información disponible hasta el momento acerca de mecanismos regulatorios demuestra que la mayoría de las respuestas que se desarrollan ante cambios en los factores ambientales forman parte de redes regulatorias interconectadas entre sí.

El polifosfato, un polímero de reserva de fosfato y energía presente en grandes cantidades en todas las especies bacterianas analizadas (Kulaev y Vegabov, 1983), es capaz de inducir la expresión del gen *rpoS*. A su vez, mutantes deficientes en la enzima encargada de sintetizar polifosfato muestran una disminuida resistencia al estrés (Rao y Kornberg, 1996).

En *P. aeruginosa* la síntesis de alginato, un exopolisacárido, es dependiente del nivel intracelular de GTP. Asimismo, el aumento en la producción de alginato coincide con un aumento en los niveles de polifosfato (Kim *et al.*, 1998). Por otro lado, se encontró que σ^S controla la producción de alginato (Suh *et al.*, 1999)

Un trabajo reciente realizado en *Azotobacter vinelandii* (Peralta-Gil *et al.*, 2002), demostró que la transcripción de los genes involucrados en la síntesis de *pha* tiene lugar a partir de dos promotores, siendo uno de ellos reconocido tanto por el factor de transcripción σ^D como por σ^S . Como resultado, la transcripción de los genes *pha* durante la fase estacionaria es dependiente de RpoS. El análisis del contenido de PHA en la mutante *rpoS* *P. putida* 50-9, demostró que, aparentemente, no existen alteraciones en la acumulación del polímero de reserva. Sin embargo, dada la dificultad de esta

mutante para crecer en medio mínimo no pudieron realizarse estudios más exhaustivos para analizar con precisión lo que ocurre con la acumulación de PHA durante distintas fases de crecimiento.

En *P. putida* mt-2 (cepa de la cual deriva *P. putida* KT2440), se encontró que durante la fase estacionaria de crecimiento el factor σ^S activa la expresión de los genes presentes en el plásmido TOL pWW0, que están involucrados en la conversión de compuestos aromáticos derivados del benceno a intermediarios del ciclo de Krebs (Marques *et al.*, 1995). Lo mismo ocurre con los genes involucrados en la degradación de alcanos presentes en el plásmido OCT de *P. putida* GPo1. La expresión de los genes necesarios para la asimilación de alcanos es baja durante la fase exponencial y aumenta durante la fase estacionaria como resultado de la inducción por σ^S (Canosa *et al.* 1999). A su vez, la actividad del promotor *Pu* presente en el plásmido TOL pWW0, que dirige la expresión de genes necesarios para el crecimiento con tolueno y xilenos, es dependiente de σ^{54} y se encuentra estimulada por ppGpp (Carmona *et al.*, 2000).

Todos estos ejemplos demuestran la complejidad de la interconexión entre mecanismos regulatorios. Dado que el polihidroxialcanoato es un reservorio de carbono, energía y equivalentes de reducción, tanto su síntesis como su degradación tienen un efecto importante sobre el metabolismo central de la célula procariota. Los resultados presentados en la presente tesis demuestran que la utilización del PHA incrementa la resistencia al estrés en condiciones de ayuno en carbono, aparentemente mediante el aumento en los niveles intracelulares del factor sigma de fase estacionaria, σ^S . Dado que también se observó un incremento en el nivel intracelular de ppGpp, que es posterior a la degradación de PHA, existe la posibilidad de que el aumento en el contenido de RpoS se deba al efecto inductor de dicha alarmona. Estos resultados demuestran la influencia del PHA en los complejos mecanismos regulatorios involucrados en la respuesta al estrés, y abren el camino para investigar la conexión entre los factores que regulan la degradación de PHA y las redes regulatorias globales de adaptabilidad bacteriana al ambiente.

IV. Conclusiones

♦ La depolimerización de PHA se induce rápidamente cuando *P. putida* GPo1 se somete a ayuno en carbono.

♦ La degradación de PHA se encuentra asociada a un aumento transitorio en el nivel intracelular de ppGpp.

♦ La capacidad de utilización del PHA acumulado incrementa el nivel intracelular de ATP.

♦ En *P. putida* GPo1, existe un aumento en el contenido intracelular de σ^S durante la entrada en fase estacionaria. A su vez, durante la fase exponencial de crecimiento, el nivel intracelular de este factor de transcripción es mayor cuando las células se crecen en medio rico, que cuando se cultivan en medio mínimo. Esto podría estar indicando que el crecimiento de *P. putida* en medio mínimo activaría en mayor medida las respuestas de resistencia al estrés.

♦ La capacidad de degradación de PHA incrementa la resistencia a estrés térmico y oxidativo, durante el ayuno en carbono.

♦ El nivel intracelular de RpoS durante el ayuno en carbono, es mayor cuando existe degradación de PHA. Dado que la capacidad de degradación de PHA incrementa la tolerancia al estrés, este aumento en la resistencia podría deberse al mayor contenido de σ^S , que traería como resultado una mayor inducción de los genes involucrados en los mecanismos de resistencia.

Considerando que el nivel de ppGpp se incrementa luego de la degradación de PHA y que en *E. coli* dicha molécula se encuentra involucrada en la modulación de los niveles de σ^S , el aumento en el nivel intracelular de σ^S encontrado en *P. putida* durante la depolimerización podría ser el resultado de la acción de la alarmona.

Bibliografía

- Aldea M, Garrido T, Hernandez-Chico C, Vicente M, Kushner SR (1989) Induction of a growth-phase-dependent promoter triggers transcription of *bolA*, an *Escherichia coli* morphogene. *Embo J* 8:3923-31
- Almiron M, Link AJ, Furlong D, Kolter R (1992) A novel DNA-binding protein with regulatory and protective roles in starved *Escherichia coli*. *Genes Dev* 6:2646-54
- Anderson AJ, Dawes EA (1990) Occurrence, metabolism, metabolic role, and industrial use of bacterial polyhydroxyalkanoates. *Microbiol. Rev.* 54:450-472.
- Anzai Y, Kim H, Park JY, Wakabayashi H, Oyaizu H (2000) Phylogenetic affiliation of the pseudomonads based on 16S rRNA sequence. *Int J Syst Evol Microbiol* 50:1563-89
- Baptist JN, Gholson RK, Coon MJ (1963) Hydrocarbon oxidation by a bacterial enzyme system. I. Products of octane oxidation. *Biochim. Biophys Acta* 69:40-47
- Becker G, Klauck E, Hengge-Aronis R (1999) Regulation of RpoS proteolysis in *Escherichia coli*: the response regulator RssB is a recognition factor that interacts with the turnover element in RpoS. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:6439-44
- Beltrametti F, Kresse AU, Guzman CA (1999) Transcriptional regulation of the *esp* genes of enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 181:3409-18
- Benito A, Ventoura G, Casadei M, Robinson T, Mackey B (1999) Variation in resistance of natural isolates of *Escherichia coli* O157 to high hydrostatic pressure, mild heat, and other stresses. *Appl Environ Microbiol* 65:1564-9
- Birnboim H, Doly J (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 7:1513-1523
- Bishop RE, Leskiw BK, Hodges RS, Kay CM, Weiner JH (1998) The entericidin locus of *Escherichia coli* and its implications for programmed bacterial cell death. *J Mol Biol* 280:583-96
- Bochner BR, Ames BN (1982) Complete analysis of cellular nucleotides by two-dimensional thin layer chromatography. *J Biol. Chem.* 257:9759 -9769
- Bradford M (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72:248-254
- Brandl H, Gross R, Lenz RW, Fuller RC (1988) *Pseudomonas oleovorans* as a source of poly(3-hydroxyalkanoates) for potential application as biodegradable polyesters. *Appl Environ Microbiol* 54:1977-1982
- Braunegg G, Sonnleitner B, Lafferty RM (1978) A rapid gas chromatographic method for the determination of poly- β -hydroxybutyric acid in microbial biomass. *European J. Appl. Microbial. Biotechnol.* 6:29-37

- Brown L, Gentry D, Elliott T, Cashel M (2002) DksA affects ppGpp induction of RpoS at a translational level. *J Bacteriol* 184:4455-65
- Brown L, Elliott T (1996) Efficient translation of the RpoS sigma factor in *Salmonella typhimurium* requires host factor I, an RNA-binding protein encoded by the *hfq* gene. *J Bacteriol* 178:3763-70
- Canosa I, Yuste L, Rojo F (1999) Role of the alternative sigma factor σ^S in expression of the AlkS regulator of the *Pseudomonas oleovorans* alkane degradation pathway. *J Bacteriol* 181:1748-54
- Carmona M, Rodriguez MJ, Martinez-Costa O, De Lorenzo V (2000) In vivo and in vitro effects of (p)ppGpp on the σ^{54} promoter *Pu* of the TOL plasmid of *Pseudomonas putida*. *J Bacteriol* 182:4711-8
- Cashel M (1969) The control of ribonucleic acid synthesis in *Escherichia coli*. IV. Relevance of unusual phosphorylated compounds from amino acid starved stringent strains. *J Biol. Chem.* 244:3133-3141.
- Cashel M, Gallant J (1969) Two compounds implicated in the function of the RC gene of *E. coli*. *Nature* 221:838-841
- Castanie-Cornet MP, Penfound TA, Smith D, Elliott JF, Foster JW (1999) Control of acid resistance in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 181:3525-35
- Chang YY, Wang AY, Cronan JE, Jr. (1994) Expression of *Escherichia coli* pyruvate oxidase (PoxB) depends on the sigma factor encoded by the *rpoS* (*katF*) gene. *Mol Microbiol* 11:1019-28
- Chatterji D, Ojha AK (2001) Revisiting the stringent response, ppGpp and starvation signaling. *Curr Opin Microbiol* 4:160-5
- Christman MF, Morgan RW, Jacobson FS, Ames BN (1985) Positive control of a regulon for defenses against oxidative stress and some heat-shock proteins in *Salmonella typhimurium*. *Cell* 4141:753-762
- Cunning C, Elliot T (1999) RpoS synthesis is growth rate regulated in *Salmonella typhimurium*, but its turnover is not dependent on acetyl phosphate synthesis or PTS function. *J Bacteriol* 181:4853-62
- de Lorenzo V, Timmis KN (1994) Analysis and construction of stable phenotypes in gram-negative bacteria with Tn5 and Tn10 derived minitransposons. *Methods Enzymol* 235:386-405
- De Smet MJ, Eggink B, Witholt B, Kingma J, Wynberg H (1983) Characterization of intracellular inclusions formed by *Pseudomonas oleovorans* during growth on octane. *J. Bacteriol.* 154:870-878
- Demple B, Halbrook J, Linn S (1983) *Escherichia coli xth* mutants are hypersensitive to hydrogen peroxide. *J Bacteriol* 153:1079-82

Diard S, Carlier JP, Ageron E, Grimont P, Langlois V, Guérin P, Bouvet MM (2002) Accumulation of poly(3-hydroxybutyrate) from octanoate in different *Pseudomonas* belonging to the rRNA homology group I. System. Appl. Microbiol. 25:183-188

Doi Y (1995) Microbial synthesis, physical properties, and biodegradability of polyhydroxyalkanoates. Macromol. Symp. 98:585-599.

Durner R, Zinn M, Witholt B, Egli T (2001) Accumulation of poly[(R)-3-hydroxyalkanoates] in *Pseudomonas oleovorans* during growth in batch and chemostat culture with different carbon sources. Biotechnol Bioeng 72:3

Farewell A, Kvint K, Nystrom T (1998) *uspB*, a new sigmaS-regulated gene in *Escherichia coli* which is required for stationary-phase resistance to ethanol. J Bacteriol 180:6140-7

Foster LJ, Zervas SJ, Lenz RW, Fuller RC (1995) The biodegradation of poly-3-hydroxyalkanoates, PHAs, with long alkyl substituents by *Pseudomonas maculicola*. Biodegradation 6:67-73.

Foster LJ, Lenz RW, Fuller RC (1994) Quantitative determination of intracellular depolymerase activity in *Pseudomonas oleovorans* inclusions containing poly-3-hydroxyalkanoates with long alkyl substituents. FEMS Microbiol Lett. 118:279-82

Franklin FCH, Bagdasarian M, Bagdasarian MM, Timmis KN (1981) Molecular and functional analysis of the TOL plasmid pWW0 from *Pseudomonas putida* and cloning of the genes for the entire regulated aromatic ring *meta* cleavage pathway. Proc Natl Acad Sci U S A 78:7458-7462

Fujita M, Tanaka K, Takahashi H, Amemura A (1994) Transcription of the principal sigma-factor genes, *rpoD* and *rpoS*, in *Pseudomonas aeruginosa* is controlled according to the growth phase. Mol Microbiol 13:1071-7

Fuller RC, O'Donnell JP, Saulnier J, Redlinger TE, Foster JW, Lenz RW (1992) The supramolecular architecture of the poly(hydroxyalkanoate) inclusions in *Pseudomonas oleovorans*. FEMS Microbiol Rev. 103:279-288

Gallant J (1979) Stringent control in *E. coli*. Annu Rev. Genet 13:393-415

Gentry DR, Hernandez VJ, Nguyen LH, Jensen DB, Cashel M (1993) Synthesis of the stationary-phase sigma factor σ^S is positively regulated by ppGpp. J. Bacteriol. 175:7982-7989

Givskov M, Eberl L, Moller S, Molin S (1994a) Responses to nutrient starvation in *Pseudomonas putida* KT2442: Two-dimensional electrophoretic analysis of starvation- and stress- induced proteins. J. Bacteriol. 176:4816-4824

Givskov M, Eberl L, Moller S, Kongbak Poulsen L, Molin S (1994b) Responses to nutrient starvation in *Pseudomonas putida* KT2442: Analysis of general cross-protection, cell shape, and macromolecular content. J. Bacteriol. 176:7-14

- Godoy FA, Bunster M, Matus V, Aranda C, Gonzalez B, Martinez MA (2003) Poly- β -hydroxyalkanoates consumption during degradation of 2,4,6-trichlorophenol by *Sphingopyxis chilensis* S37. *Lett Appl Microbiol* 36:315-20
- Gort AS, Ferber DM, Imlay JA (1999) The regulation and role of the periplasmic copper, zinc superoxide dismutase of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 32:179-91
- Gottesman S (1984) Bacterial regulation: global regulatory networks. *Annu. Rev. Genet.* 18:415-441
- Greenway DL, England RR (1999) ppGpp accumulation in *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas fluorescens* subjected to nutrient limitation and biocide exposure. *Lett Appl Microbiol* 29:298-302
- Grund A, Shapiro J, Fennewald M, Bacha P, Leahy J, Markbreiter K, Nieder M, Toepfer M (1975) Regulation of alkane oxidation in *Pseudomonas putida*. *J. Bacteriol.* 123:546-556
- Hanahan D, Jessee J, Bloom FR (1991) Plasmid transformation of *Escherichia coli* and other bacteria. In: Miller JH (ed) *Methods in Enzymology*, vol 204. Academic Press, Inc., Los Angeles. California
- Hang X, Zhang G, Wang G, Zhao X, Chen G (2002) PCR cloning of polyhydroxyalkanoate biosynthesis genes from *Burkholderia caryophylli* and their functional expression in recombinant *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett* 210:49-54
- Haseltine WA, Bock R (1973) Synthesis of guanosine tetra and pentaphosphate requires the presence of a codon-specific uncharged transfer ribonucleic acid in the acceptor site of ribosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 70:1564-1568
- Hayward AC, Forsyth WGC, Roberts JB (1959) Synthesis and breakdown of poly-beta-hydroxybutyric acid in aerobic gram-negative bacteria. *J Gen Microbiol* 20: 510-18
- Haywood GW, Anderson AJ, Ewing DF, Dawes EA (1990) Accumulation of a polyhydroxyalkanoate containing primarily 3-hydroxydecanoate from simple carbohydrate substrates by *Pseudomonas sp.* strain NCIMB 40135. *Appl. Environ. Microbiol.* 56:3354-3359
- Hengge-Aronis R (2000) The General Stress Response in *Escherichia coli*. In: Storz G, Hengge-Aronis R (eds) *Bacterial Stress Responses*. ASM Press, Washington, D.C., pp 161-178
- Hengge-Aronis R (1996) Regulation of gene expression during entry into stationary phase. In: F.C. Neidhardt RCI, J.L. Ingraham, E.C.C. Lin, K.B. Low, B. Magasanik, W.S. Reznikoff, M. Riley, M. Schaechter, and H.E. Umbarger. (ed) *Escherichia coli* and *Salmonella*: Cellular and molecular biology. A.S.M. Press, Washington DC, pp 1497-1512

- Hengge-Aronis R, Klein W, Lange R, Rimmele M, Boos W (1991) Trehalose synthesis genes are controlled by the putative sigma factor encoded by *rpoS* and is involved in stationary-phase thermotolerance in *Escherichia coli*. J Bacteriol 173:7918-24
- Henrysson T, McCarty PL (1993) Influence of the endogenous storage lipid poly- β -hydroxybutyrate on the reducing power availability during cometabolism of trichloroethylene and naphthalene by resting methanotrophic mixed cultures. Appl. Environ. Microbiol. 59:1602-1606.
- Herbelin CJ, Chirillo SC, Melnick KA, Whittam TS (2000) Gene conservation and loss in the *mutS-rpoS* genomic region of pathogenic *Escherichia coli*. J Bacteriol 182:5381-90
- Herrero M, de Lorenzo V, Timmis KN (1990) Transposon vectors containing non-antibiotic resistance selection markers for cloning and stable chromosomal insertion of foreign genes in gram-negative bacteria. J Bacteriol 172:6557-67
- Hippe H (1967) Abbau und Wiederverwertung von Poly- β -hydroxybuttersäure durch *Hydrogenomonas* H16. Arch. Mikrobiol. 56:248-277
- Hirsch M, Elliott T (2002) Role of ppGpp in *rpoS* stationary-phase regulation in *Escherichia coli*. J Bacteriol 184:5077-87
- Hoffmann N, Steinbüchel A, Rehm B (2000) The *Pseudomonas aeruginosa phaG* gene product is involved in the synthesis of polyhydroxyalkanoic acids consisting of medium-chain-length constituents from non-related carbon sources. FEMS Microbiol. Lett. 184:253-260
- Huijberts GN, de Rijk TC, de Waard P, Eggink G (1994) ¹³C nuclear magnetic resonance studies of *Pseudomonas putida* fatty acid metabolic routes involved in poly(3-hydroxyalkanoate) synthesis. J Bacteriol 176:1661-6
- Huisman GW, Wonink E, de Koning GJM, Preusting H, Witholt B (1992) Synthesis of poly(3-hydroxyalkanoates) by mutant and recombinant *Pseudomonas* strains. Appl Microbiol Biotechnol 38:1-5
- Huisman GW, Wonink E, Meima R, Kazemier B, Terpstra P, Witholt B (1991) Metabolism of poly(3-hydroxyalkanoates) (PHAs) by *Pseudomonas oleovorans*. Identification and sequences of genes and function of the encoded proteins in the synthesis and degradation of PHA. J Biol Chem 266:2191-8
- Huisman GW, de Leeuw O, Eggink G, Witholt B (1989) Synthesis of poly-3-hydroxyalkanoates is a common feature of fluorescent pseudomonads. Appl. Environ. Microbiol. 55:1949-1954
- Ivanova A, Miller C, Glinsky G, Eisenstark A (1994) Role of *rpoS* (*katF*) in *oxyR*-independent regulation of hydroperoxidase I in *Escherichia coli*. Mol Microbiol 12:571-8

- Jenkins DE, Schultz JE, Matin A (1988) Starvation-induced cross protection against heat or H₂O₂ challenge in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 170:3910-3914
- Jishage M, Kvint K, Shingler V, Nystrom T (2002) Regulation of sigma factor competition by the alarmone ppGpp. Genes Dev 16:1260-70
- Jung JU, Gutierrez C, Martin F, Ardourel M, Villarejo M (1990) Transcription of *osmB*, a gene encoding an *Escherichia coli* lipoprotein, is regulated by dual signals. Osmotic stress and stationary phase. J Biol Chem 265:10574-81
- Kadouri D, Jurkevitch E, Okon Y (2003) Involvement of the reserve material poly- β -hydroxybutyrate in *Azospirillum brasilense* stress endurance and root colonization. Appl Environ Microbiol 69:3244-3250
- Kaniga K, Delor I, Cornelis GR (1991) A wide-host-range suicide vector for improving reverse genetics in gram-negative bacteria: inactivation of the *blaA* gene of *Yersinia enterocolitica*. Gene 109:137-41
- Kim HY, Schlichtman D, Shankar S, Xie Z, Chakrabarty AM, Kornberg A (1998) Alginate, inorganic polyphosphate, GTP and ppGpp synthesis co-regulated in *Pseudomonas aeruginosa*: implications for stationary phase survival and synthesis of RNA/DNA precursors. Mol Microbiol 27:717-25
- Kjelleberg S, Albertson, Flardh N, Holmquist L, Jouper-Jaan A, Marouga R, J. O, Svenblad B, Weichart D (1993) How do non-differentiating bacteria adapt to starvation? Antonie van Leeuwenhoek. 63:333-341
- Klinke S, de Roo G, Witholt B, Kessler B (2000) Role of *phaD* in accumulation of medium-chain-length Poly(3-hydroxyalkanoates) in *Pseudomonas oleovorans*. Appl Environ Microbiol 66:3705-10
- Kojic M, Aguilar C, Venturi V (2002) TetR family member *psrA* directly binds the *Pseudomonas rpoS* and *psrA* promoters. J Bacteriol 184:2324-30
- Kojic M, Venturi V (2001) Regulation of *rpoS* gene expression in *Pseudomonas*: involvement of a TetR family regulator. J Bacteriol 183:3712-20
- Kovach ME, Elzer PH, Hill DS, Robertson GT, Farris MA, Roop RM, Peterson KM (1995) Four new derivatives of the broad-host-range cloning vector pBBR1MCS, carrying different antibiotic-resistance cassettes. Gene 166:175-6
- Kranz RG, Gabbert KK, Locke TA, Madigan MT (1997) Polyhydroxyalkanoate production in *Rhodobacter capsulatus*: genes, mutants, expression, and physiology. Appl Environ Microbiol 63:3003-9
- Kulaev IS, Vegabov VM (1983) Polyphosphate metabolism in microorganisms. Adv. Microbiol. 15:731-738.

Kvint K, Farewell A, Nystrom T (2000) RpoS-dependent promoters require guanosine tetraphosphate for induction even in the presence of high levels of σ^S . *J Biol Chem* 275:14795-8

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

Lageveen RG, Huisman GW, Preusting H, Ketelaar P, Eggink G, Witholt B (1988) Formation of polyesters by *Pseudomonas oleovorans*: effect of substrates on formation and composition of poly-(R)-3-hydroxyalkanoates and poly-(R)-3-hydroxyalkenoates. *Appl. Environ. Microbiol.* 54:2924-2932

Lange R, Fischer D, Hengge-Aronis R (1995) Identification of transcriptional start sites and the role of ppGpp in the expression of *rpoS*, the structural gene for the σ^S subunit of RNA polymerase in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 177:4676-80

Lange R, Hengge-Aronis R (1994) The cellular concentration of the σ^S subunit of RNA polymerase in *Escherichia coli* is controlled at the levels of transcription, translation, and protein stability. *Genes Dev* 8:1600-12

Lange R, Hengge-Aronis R (1991) Identification of a central regulator of stationary phase gene expression in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 5:49-59

Lafiti A, Foglino M, Tanaka K, Williams P, Lazdunski A (1996) A hierarchical quorum-sensing cascade in *Pseudomonas aeruginosa* links the transcriptional activators LasR and RhIR (VsmR) to expression of the stationary-phase sigma factor RpoS. *Mol. Microbiol.* 21: 1137-46

LeClerc JE, Li B, Payne WL, Cebula TA (1996) High mutation frequencies among *Escherichia coli* and *Salmonella pathogens*. *Science* 274:1208-11

Lee KH, Schweder T, Lomovskaya O, Matin A (1995) ClpX proteolytic activity plays a major role in lowering sigma-70 levels in exponential phase *Escherichia coli*. Abstract 95th Meeting, Am. Soc. Microbiol., pp 509

Lemoigne M (1926) Produits de déshydratation et de polymérisation de l'acide β -oxybutyrique. *Bull. Soc. Chim. Biol.* 8:770-782

Loewen PC (1992) Regulation of bacterial catalase synthesis. In: Molecular biology of free radical scavenging systems. Scandalios J (ed). Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y., pp 97-115

López NI, Ruiz, J. A. y Méndez, B. S. (1998) Survival of poly-3-hydroxybutyrate - producing bacteria in soil microcosms. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 14:681-684.

Lopez NI, Pettinari MJ, Mendez BS (1996) Monitoring by PCR amplification of the polyphosphate kinase gene added to natural water samples. *Microbiologia* 12:557-62

- López NI, Floccari ME, A. S, García AF, S. MB (1995) Effect of poly(3-hydroxybutyrate) (PHB) content on the starvation- survival of bacteria in natural waters. FEMS. Microbiol. Ecol. 16:95-112.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Far AL, Randall RJ (1951) Protein measure with the Pholin- phenol reagent. J. Biol. Chem. 193:265-267
- Marques S, Gallegos MT, Ramos JL (1995) Role of σ^S in transcription from the positively controlled *Pm* promoter of the TOL plasmid of *Pseudomonas putida*. Mol Microbiol 18:851-7
- Matin A (1991) The molecular basis of carbon-starvation induced general resistance in *Escherichia coli*. Mol. Microbiol. 5:3-10
- Matin A, Veldhuis C, Stegeman V, Veenhuis M (1979) Selective advantage of a *Spirillum* sp. in a carbon-limited environment. Accumulation of poly- β -hydroxybutyric acid and its role in starvation. J. Gen. Microbiol. 112:349-355
- Mayer F, Hoppert M (1997) Determination of the thickness of the boundary layer surrounding bacterial PHA inclusion bodies, and implications for models describing the molecular architecture of this layer. J. Basic Microbiol 37:45-52
- McCann MP, Kidwell JP, A. M (1991) The putative σ factor KatF has a central role in development of starvation-mediated general resistance in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 173:4188-4194
- Merrick JM, Doudoroff M (1964) Depolymerization of poly- β -hydroxybutyrate by an intracellular enzyme system. J. Bacteriol. 88:60-71
- Migula W (1894) Über ein neues System der Bakterien. Arbeiten aus dem bakteriologischen Institut der technischen Hochschule zu Karlsruhe 1:235-238
- Miller JH (1972) Experiments in Molecular Genetics. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Morgan RW, Christman MF, Jacobson FS, Storz G, Ames BN (1986) Hydrogen peroxide-inducible proteins in *Salmonella typhimurium* overlap with heat shock and other stress proteins. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 83:8059-8063
- Muffler A, Traulsen DD, Lange R, Hengge-Aronis R (1996) Posttranscriptional osmotic regulation of the σ^S subunit of RNA polymerase in *Escherichia coli*. J Bacteriol 178:1607-13
- Muffler A, Traulsen DD, Fischer D, Lange R, Hengge-Aronis R (1997) The RNA-binding protein HF-I plays a global regulatory role which is largely, but not exclusively, due to its role in expression of the σ^S subunit of RNA polymerase in *Escherichia coli*. J Bacteriol 179:297-300

Mulvey MR, Loewen PC (1989) Nucleotide sequence of *katF* of *Escherichia coli* suggests KatF protein is a novel sigma transcription factor. *Nucleic Acids Res* 17:9979-91

Neidhardt FC, Bloch PL, Smith D (1974) Culture medium for enterobacteria. *J Bacteriol* 119:736-47

Neidhardt FC, VanBogelen, R. A. y Vaughn V. (1984) The genetics and regulation of heat-shock proteins. *Annu. Rev. Genet.* 18:295-329.

O'Sullivan DJ, O'Gara F (1992) Traits of fluorescent *Pseudomonas* sp. involved in suppression of plant root pathogens. *Microbiol. Rev.* 56:662-676

Ojangu EL, Tover A, Teras R, Kivisaar M (2000) Effects of combination of different -10 hexamers and downstream sequences on stationary-phase-specific sigma factor σ^S -dependent transcription in *Pseudomonas putida*. *J Bacteriol* 182:6707-13

Ostle A, Holt JG (1982) Nile Blue A as a fluorescent stain for poly- β -hydroxybutyrate. *Appl. Environ. Microbiol.* 44:238-241

Page WJ, Manchak J, Rudy B (1992) Formation of poly(hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) by *Azotobacter vinelandii* UWD. *Appl Environ Microbiol* 58:2866-2873

Palleroni NJ, Kunisawa R, Contopoulou R, Doudoroff M (1973) Nucleic-acid homologies in genus *Pseudomonas*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 23:333-339

Peralta-Gil M, Segura D, Guzman J, Servin-Gonzalez L, Espin G (2002) Expression of the *Azotobacter vinelandii* poly- β -hydroxybutyrate biosynthetic *phbBAC* operon is driven by two overlapping promoters and is dependent on the transcriptional activator PhbR. *J Bacteriol* 184:5672-7

Pernesting AK, Melefors O, Georgellis, D (2001) Identification of UvrY as a cognate response regulator for the BarA sensor kinase in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 276: 225-31

Pettinari MJ, Vazquez GJ, Silberschmidt D, Rehm B, Steinbuchel A, Mendez BS (2001) Poly(3-hydroxybutyrate) synthesis genes in *Azotobacter* sp. strain FA8. *Appl Environ Microbiol* 67:5331-4

Pozo C, Martinez-Toledo MV, Rodelas B, Gonzalez-Lopez J (2002) Effects of culture conditions on the production of polyhydroxyalkanoates by *Azotobacter chroococcum* H23 in media containing a high concentration of alpechin (wastewater from olive oil mills) as primary carbon source. *J Biotechnol* 97:125-31

Preusting H, Kingma J, Witholt B (1991) Physiology and polyester formation of *Pseudomonas oleovorans* in continuous two liquid phase cultures. *Enzyme Microb. Technol.* 13:770-780

- Prieto MA, Buhler B, Jung K, Witholt B, Kessler B (1999) PhaF, a polyhydroxyalkanoate-granule-associated protein of *Pseudomonas oleovorans* GP01 involved in the regulatory expression system for *pha* genes. J Bacteriol 181:858-68
- Ramos-González MI, Molin S (1998) Cloning, sequencing, and phenotypic characterization of the *rpoS* gene from *Pseudomonas putida* KT2440. J. Bacteriol. 180:3421-3431.
- Rao NN, Kornberg A (1996) Inorganic polyphosphate supports resistance and survival of stationary-phase *Escherichia coli*. J Bacteriol 178:1394-400
- Rehm BHA, Kruger N, Steinbuchel A (1998) A new metabolic link between fatty acid de novo synthesis and polyhydroxyalkanoic acid synthesis. J. Biol. Chem. 273:24044-24051
- Ruiz JA, Lopez NI, Mendez BS (1999) Polyhydroxyalkanoates degradation affects survival of *Pseudomonas oleovorans* in river water microcosms. Rev Argent Microbiol 31:201-4
- Sak BD, Eisenstark A, Touati D (1989) Exonuclease III and the catalase hydroperoxidase II in *Escherichia coli* are both regulated by the *katF* gene product. Proc Natl Acad Sci U S A 86:3271-5
- Sambrook J, Maniatis T, Fritsch EF (1989) Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Laboratory, Cold Spring Harbor. N.Y.
- Sanderson KE, Roth JR (1988) Linkage map of *Salmonella typhimurium*, edition VII. Microbiol Rev 52:485-532
- Sands MK, Roberts RB (1952) The effect of tryptophan-histidine deficiency in a mutant of *E. coli*. J. Bacteriol. 63:505-511
- Sarniguet A, Kraus J, Henkels MD, Muehlchen AM, Loper JE (1995) The sigma factor σ^s affects antibiotic production and biological control activity of *Pseudomonas fluorescens* Pf-5. Proc Natl Acad Sci U S A 92:12255-9
- Schirmer A, Jendrossek D, Schlegel HG (1993) Degradation of poly(3-hydroxyoctanoic acid) [P(3HO)] by bacteria: purification and properties of a P(3HO) depolymerase from *Pseudomonas fluorescens* GK13. Appl Environ Microbiol 59:1220-7
- Schlegel HJ, Gottschalk G, von Barth R (1961) Formation and utilization of poly- β -hydroxybutyric acid by Knallgas bacteria (*Hydrogenomonas*). Nature 191:463-465
- Schwartz RD, Mc Coy CJ (1973) *Pseudomonas oleovorans* hydroxylation-epoxidation system: additional strain improvements. Appl. Microbiol. 26:217-218.
- Schweder T, Lee KH, Lomovskaya O, Martin A (1996) Regulation of *Escherichia coli* starvation sigma factor (σ^s) by ClpXP protease. J Bacteriol 178:470-6

- Shiba T, Tsutsumi K, Yano H, Ihara Y, Kameda A, Tanaka K, Takahashi H, Munekata M, Rao N, Kornberg A (1997) Inorganic polyphosphate and the induction of *rpoS* expression. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 11210-15
- Simon R, Priefer U, Pühler A (1983) A broad host range mobilization system for in vivo genetic engineering: transposon mutagenesis in gram negative bacteria. *Bio/Technology* 1:784-791.
- Sledjeski D, Gottesman S (1995) A small RNA acts as an antisilencer of the H-NS-silenced *rcaA* gene of *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:2003-7
- Stackebrandt E, Goebel B (1994) Taxonomic note: A place for DNA-DNA reassociation and 16s rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *Int J Syst Evol Microbiol* 44:846-849
- Stanier RY, Palleroni NJ, Doudoroff M (1966) The aerobic pseudomonads: A taxonomic study. *J. Gen. Microbiol.* 43:159-271
- Suh SJ, Silo-Suh L, Woods DE, Hassett DJ, West SE, Ohman DE (1999) Effect of *rpoS* mutation on the stress response and expression of virulence factors in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 181:3890-7
- Tanaka K, Takayanagi Y, Fujita N, Ishihama A, Takahashi H (1993) Heterogeneity of the principal sigma factor in *Escherichia coli*: the *rpoS* gene product, σ^{38} , is a second principal sigma factor of RNA polymerase in stationary-phase *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:3511-5
- Tanaka K, Takahashi H (1994) Cloning, analysis and expression of an *rpoS* homologue gene from *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Gene* 150: 81-5.
- Tao H, Bausch C, Richmond C, Blattner FR, Conway T (1999) Functional genomics: expression analysis of *Escherichia coli* growing on minimal and rich media. *J Bacteriol* 181:6425-40
- Timm, Steinbüchel A (1992) Cloning and molecular analysis of the poly(3-hydroxyalkanoic acid) gene locus of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Eur J Biochem* 209:15-30
- Touati E, Dassa E, Boquet PL (1986) Pleiotropic mutations in *appR* reduce pH 2.5 acid phosphatase expression and restore succinate utilization in CRP-deficient strains of *Escherichia coli*. *Mol Gen Genet* 202:257-64
- Tuveson RW, Jonas RB (1979) Genetic control of near-UV (300-400 nm) sensitivity independent of the *recA* gene in strains of *Escherichia coli* K12. *Photochem Photobiol* 30:667-76
- van Beilen JB, Panke S, Lucchini S, Franchini AG, Röthlisberger M, Witholt B (2001) Analysis of *P.putida* alkane-degradation gene clusters and flanking insertion sequences. Evolution and regulation of the *alk* genes. *Microbiology* 147:1621-1630

- van Delden C, Comte R, Bally AM (2001) Stringent response activates quorum sensing and modulates cell density-dependent gene expression in *Pseudomonas aeruginosa*. J Bacteriol 183:5376-84
- VanBogelen RA, Kelley PM, Neidhardt FC (1987) Differential induction of heat shock, SOS, and oxidation stress regulons and accumulation of nucleotides in *Escherichia coli*. J Bacteriol 169:26-32
- Vieira J, Messing J (1982) The pUC plasmids, an M13mp7-derived system for insertion mutagenesis and sequencing with synthetic universal primers. Gene 19:259-268
- Vogel HJ, Bonner BN (1956) Acetyl-ornithinase of *Escherichia coli*: partial purification and some properties. J. Biol. Chem. 218:97-106
- Walker GC (1984) Mutagenesis and inducible responses to deoxyribonucleic acid damage in *Escherichia coli*. Microbiol. Rev. 48:60-93
- Whistler CA, Corbell NA, Sarniguet A, Ream W, Loper JE (1998) The two-component regulators GacS and GacA influence accumulation of the stationary-phase sigma factor σ^S and the stress response in *Pseudomonas fluorescens* Pf-5. J Bacteriol 180:6635-41
- Yamashino T, Ueguchi C, Mizuno T (1995) Quantitative control of the stationary phase-specific sigma factor, sigma S, in *Escherichia coli*: involvement of the nucleoid protein H-NS. Embo J 14:594-602
- Zhang A, Altuvia S, Tiwari A, Argaman L, Hengge-Aronis R, Storz G (1998) The OxyS regulatory RNA represses *rpoS* translation and binds the Hfq (HF-I) protein. Embo J 17:6061-8
- Zinn M (1998) Dual (C, N) nutrient limited growth of *Pseudomonas oleovorans*. ETH, Zurich