

Expresión génica en bacterias de interés medioambiental: de la degradación de contaminantes a la biología de sistemas

E.M. Camacho, I. Canosa, R. de Dios, A. Flores, B. Floriano, I. García-Romero, Y.E. González-Flores, G. Martín, C. Medina, M. Rebollo, F. Reyes-Ramírez y E. Santero

Centro Andaluz de Biología del Desarrollo, CSIC, Junta de Andalucía, Universidad Pablo de Olavide. Sevilla

esansan@upo.es



Foto de grupo. De izquierda a derecha: De pie, Marina Rebollo, Yolanda E. González, Ruben de Dios Barranco, Francisca Reyes, Carlos Medina, Amando Flores, Inés Canosa y Eduardo Santero. Agachadas, Inmaculada García, Guadalupe Martín, Eva Camacho y Belén Floriano.

La utilización de bacterias para la degradación biológica de compuestos orgánicos es de gran interés debido a: (i) el incremento paulatino del problema de contaminación en el medio debido a la actividad industrial

y, (ii) la enorme versatilidad catabólica de las bacterias. Sin embargo, la biodegradación bacteriana suele estar limitada por la existencia de una fuerte regulación de la expresión de los genes de degradación, lo que hace que

las rutas estén inactivas en la mayor parte de las condiciones ambientales. Así, el reto para diseñar procesos de biodegradación eficientes es comprender el comportamiento celular de las bacterias y su adaptación a las condiciones ambientales en su conjunto, es decir, como un sistema. Para este tipo de estudios es necesario aplicar tecnologías que generan datos a gran escala (genómica, transcriptómica, proteómica y metabolómica) e integrar los mismos para entender globalmente los comportamientos bacterianos, poder predecirlos y poder modificarlos. Además, la caracterización del mecanismo molecular de regulación permite el diseño de sistemas de expresión heteróloga más eficientes y de aplicación en un mayor número de hospedadores.

ACTIVIDADES CIENTÍFICAS DEL GRUPO HASTA EL MOMENTO (DE DÓNDE VENIMOS)

Los principales temas de interés de nuestro grupo de investigación en este campo han sido:

1. **Caracterización bioquímica y genética completa de la ruta de degradación de tetralina en bacterias.** Esta caracterización se ha llevado a cabo en dos bacterias, *Sphingopyxis macrogolítabida* estirpe TFA (Gram negativa) (López-Sánchez et al, 2010) y *Rhodococcus* sp. estirpe TFB (Gram positiva) (Tomás-Gallardo et al, 2009). En TFB se han estudiado también la degradación de ftalato y naftaleno (Tomás-Gallardo et al, 2014).
2. **Elucidación de los mecanismos moleculares que regulan los genes de degradación de tetralina (*thn*).** Se ha demostrado la implicación de la tetralina como molécula inductora y las proteínas ThnR y ThnY en la regulación específica de los genes *thn* en TFA (López-Sánchez et al, 2009) y de un sistema de dos componentes (ThnSR) en TFB (Tomás-Gallardo et al, 2009, 2012). Además, en TFA se ha descrito un novedoso mecanismo por el que la ruta de degradación se comunica con el sistema regulador para impedir la expresión gratuita de los genes *thn* en presencia de moléculas similares a la tetralina pero que no son sustrato de la ruta (Ledesma et al, 2011, 2013). En cuanto a la regulación global, los genes de degradación de tetralina están sujetos a represión catabólica (mecanismo que jerarquiza el uso de fuentes de carbono). En TFA se ha estudiado la conexión de la acumulación de gránulos de reserva en el interior celular con la capacidad de expresión de estos genes en presencia de fuentes preferenciales de carbono (Martín-Cabello et al, 2011). En TFB se ha propuesto la implicación de un regulador de la familia CRP/Fnr en dicha regulación (Tomás-Gallardo et al, 2012).
3. Hemos estudiado también la **regulación global del metabolismo del nitrógeno en *Pseudomonas putida*** identificando a NtrC como el regulador global de la asimilación de distintas fuentes de nitrógeno.

NtrC no solo actúa activando rutas de asimilación de fuentes alternativas de nitrógeno, cuando este elemento se encuentra limitante en el medio, sino también es capaz de reprimir directamente la expresión de otros genes (Hervás et al, 2009, 2010). Además, se ha estudiado el sistema de dos componentes CbrAB que actúa de manera coordinada con NtrC pero que, además, controla aspectos muy importantes en la relación de la bacteria con el medio tales como la quimiotaxis y la resistencia a tóxicos (Amador et al, 2010). Además, CbrB controla la expresión de pequeños RNA reguladores (CrcZ y CrcY) implicados en represión catabólica (García-Mauriño et al, 2013). Mediante una aproximación metabolómica hemos descrito los cambios clave que revelan la adaptación metabólica de *P. putida* en condiciones de limitación de carbono (Valentini et al, 2014).

4. La utilización de los elementos que dirigen la expresión génica de genes de degradación se ha concretado en el exitoso **desarrollo de una colección de vectores de expresión inducibles por ácido acetilsalicílico** (aspirina) en bacterias patógenas intracelulares atenuadas (Medina et al, 2011) para su utilización como agentes terapéuticos (Mesa-Pereira et al, 2013, 2014). De esta manera, infectando a un hospedador con estas bacterias, podemos controlar la expresión de diferentes proteínas con cantidades terapéuticas de aspirina. Es la parte más aplicada de nuestra ciencia que ha dado lugar a dos patentes.
5. A su vez, hemos desarrollado un **sistema de expresión patentado** que permite expresar heterológicamente los genes de metagenotecas ubicados en fragmentos de gran tamaño, lo que solventa el principal problema del análisis metagenómico funcional. (Terrón-González et al, 2013, 2014).

ACTIVIDADES CIENTÍFICAS DEL GRUPO EN EL FUTURO (HACIA DÓNDE VAMOS)

En los dos últimos años de actividad, venimos aplicado las técnicas ómicas para entender los comportamientos de las bacterias de manera global. Pretendemos seguir avanzando en la caracterización funcional de *Sphingopyxis macrogolítabida* TFA, que incluye estudios transcriptómicos mediante dRNAseq en distintas condiciones, la reconstrucción de su metabolismo aerobio y anaerobio y la regulación por pequeños ARNs y la proteínas Hfq, así como por factores sigma de función extracitoplásmica. A su vez pretendemos completar la caracterización del regulon CbrAB de *Pseudomonas putida*

ADEMÁS, TRABAJAMOS CON EMPRESAS (I+D+I)

En los últimos años hemos desarrollado contratos de I+D+i con empresas como Biomedal, Canagrosa y Abengoa Research. Los trabajos de mayor aplicación han resultado en 3 patentes.

PUBLICACIONES ÚLTIMOS 5 AÑOS

- Amador CI, Canosa I, Govantes F, Santero E.** (2010). Lack of CbrB in *Pseudomonas putida* affects not only amino acids metabolism but also different stress responses and biofilm development. *Environ. Microbiol.* 12:1748-1761.
- Hervás AB, Canosa I, Little R, Dixon R, Santero E.** (2009). NtrC-dependent regulatory network for nitrogen assimilation in *Pseudomonas putida*. *J. Bacteriol.* 191:6123-6135.
- Hervás AB, Canosa I, Santero E.** (2010). Regulation of glutamate dehydrogenase expression in *Pseudomonas putida* results from its direct repression by NtrC under nitrogen-limiting conditions. *Mol. Microbiol.* 78:305-319.
- Ledesma-García L, Rivas-Marín E, Floriano B, Bernhardt R, Ewen KM, Reyes-Ramírez F, Santero E.** (2011). ThnY is a ferredoxin reductase-like iron-sulfur flavoprotein that has evolved to function as a regulator of tetralin biodegradation genes expression. *J. Biol. Chem.* 286:1709-1718.
- Ledesma-García L, Reyes-Ramírez F, Santero E.** (2013). The ferredoxin ThnA3 negatively regulates tetralin biodegradation gene expression via ThnY, a ferredoxin reductase that functions as a regulator of the catabolic pathway. *PLoS One*, 8:e73910. doi: 10.1371/journal.pone.0073910.
- López-Sánchez A, Rivas-Marín E, Martínez-Pérez O, Floriano B, Santero E.** (2009). Co-ordinated regulation of two divergent promoters through higher-order complex formation by the LysR-type regulator ThnR. *Mol. Microbiol.* 73:1086-1100.
- López-Sánchez A, Floriano B, Andújar E, Hernández MJ, Santero E.** (2010). Tetralin-induced and ThnR regulated aldehyde dehydrogenase and beta-oxidation genes in *Sphingomonas macrogotitabida* strain TFA. *Appl. Environ. Microbiol.* 76:110-118.
- Martín-Cabello G, Moreno-Ruiz E, Morales V, Floriano B, Santero E.** (2011). Involvement of poly(3-hydroxybutyrate) synthesis in catabolite repression of tetralin biodegradation genes in *Sphingomonas macrogotitabida* strain TFA. *Environ. Microbiol. Reports.* 3:627-631.
- Medina C, Camacho EM, Flores A, Mesa-Pereira B, Santero E.** (2011). Improved expression systems for regulated expression in *Salmonella* INFECTING EUKARYOTIC CELLS. *PLoS One.* 6:e23055.
- Mesa-Pereira B, Medina C, Camacho EM, Flores A, Santero E.** (2014). Improved cytotoxic effects of *Salmonella*-producing cytosine deaminase in tumour cells. *Microb. Biotechnol.* DOI: 10.1111/1751-7915.12153.
- Mesa-Pereira B, Medina C, Camacho EM, Flores A, Santero E.** (2013). Novel tools to analyze the function of *Salmonella* effectors show that SvpB ectopic expression induces cell cycle arrest in tumor cells. *PLoS One*, 8:e78458. doi: 10.1371/journal.pone.0078458.
- García-Mauriño SM, Pérez-Martínez I, Amador CI, Canosa I, Santero E.** (2013). Transcriptional activation of the CrcZ and CrcY regulatory RNAs by the CbrB response regulator in *Pseudomonas putida*. *Mol. Microbiol.* 89:189-205.
- Terrón-González L, Medina C, Limón-Mortés MC, Santero E.** (2013). Heterologous viral expression systems in fosmid vectors increase the functional analysis potential of metagenomic libraries. *Sci. Reports.* 3:1107.
- Terrón-González L, Genilloud O, Santero E.** (2014). Potential and limitations of metagenomic functional analyses. Chapter 1. Pp. 1-43. *In: Metagenomics, Methods, Applications and Perspectives.* Benedetti, C. (Ed.). Nova Publishers, New York. ISBN: 978-63321-698-3 (eBook).
- Tomás L, Santero E, Floriano B.** (2009). Molecular and biochemical characterization of the tetralin degradation pathway in *Rhodococcus* sp. strain TFB. *Microb. Biotechnol.* 2:262-273
- Tomás-Gallardo L, Santero E, Floriano B.** (2012). Involvement of a putative cyclic amp receptor protein (CRP)-like binding sequence and a CRP-like protein in glucose-mediated catabolite repression of thn genes in *Rhodococcus* sp. strain TFB. *Appl. Environ. Microbiol.* 78:5460-2
- Tomás-Gallardo L, Gómez-Álvarez H, Santero E, Floriano B.** (2014). Combination of degradation pathways for naphthalene utilization in *Rhodococcus* sp. strain TFB. *Microb. Biotechnol.* 7:100-103
- Valentini M, Garcia-Mauriño SM, Pérez-Martínez I, Santero E, Canosa I, Lapouge K.** (2014). Hierarchical management of carbon sources is regulated similarly by the CbrA/B system in *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas putida*. *Microbiology.* DOI: 10.1099/mic.0.078873-0.

COLILOQUIO by Victor

