

CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS
ESTACIÓN EXPERIMENTAL DEL ZAIDÍN



UNIVERSIDAD DE GRANADA
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR I



**CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA Y MOLECULAR DEL
SISTEMA DE DOS COMPONENTES TODS/TODT DE
Pseudomonas putida DOT-T1E**

Tesis Doctoral

Jesús Lacal Romero
2008

**CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA Y MOLECULAR DEL
SISTEMA DE DOS COMPONENTES TODS/TODT DE
Pseudomonas putida DOT-T1E**

Memoria que presenta el licenciado
en Biología, Jesús Lacal Romero,
para aspirar al Título de Doctor

Fdo.: Jesús Lacal Romero

Vº Bº del Director

Vº Bº del Director

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

Fdo.: Tino Krell
Doctor en Bioquímica
Científico titular del C.S.I.C.

Universidad de Granada
2008

Esta Tesis Doctoral ha sido realizada en el
Departamento de Protección Ambiental de la
Estación Experimental del Zaidín (C.S.I.C.), Granada.

A mis padres
A Mercedes

AGRADECIMIENTOS

A lo largo de mi estancia en la Estación Experimental del Zaidín he tenido el privilegio de trabajar dentro de un grupo de investigación de excepcional calidad humana y profesional. En el grupo de Degradación de Tóxicos Orgánicos en el que he trabajado, tengo que destacar la figura y el papel que el profesor Juan Luis Ramos ha tenido en esta Tesis Doctoral. Siempre le estaré agradecido por haber confiado en mí a la hora de abordar este proyecto, por contagiarme con su ilusión, buen hacer, constancia y sacrificio. A Tino Krell, mi otro padre científico y a quien le debo también su ilusión por la ciencia, su forma de llevar a cabo nuevas ideas y su actitud siempre tan positiva y generosa. Gracias por una enseñanza de calidad.

A los profesores de la Universidad de Granada Dr. Enrique Iañez y Dr. José Antonio Lupiañez por darme a conocer de la existencia de la EEZ y recomendarme para realizar la Tesis Doctoral en dicha institución.

A Pieter, por su tiempo y dedicación durante mis comienzos como becario. A María y a Quina por su estupenda acogida cuando llegué a la EEZ. A Ana D., Rebeca y Juan, por los buenos momentos compartidos. A Sergio, por sus charlas, su ingenio, sus juergas y por habernos llevado al monte aquella noche.

A Patri D. y Euge por vuestro rigor científico, ayuda desinteresada y tan buenos consejos. Pero sobre todo por vuestra amistad y empatía. Es un placer trabajar con vosotras. A Sandy y Craig, igualmente os agradezco vuestros consejos, buen humor y amistad.

A Maribel, Estrella, Mari Trini, Silvia, Ana y Manolo por su apoyo logístico y tutorial. A Dietmar, por sacar tiempo para el grupo de inglés y a MIAO por su ayuda aportada en el laboratorio. Gracias también a Carmen Lorente y María Fándila por su asistencia técnica.

A María Angustias y el personal que ha trabajado durante mi estancia en el mantenimiento y orden de materiales de uso común que nos facilita a todos la vida y nos ahorra tanto tiempo. A Patri B., por su buena acogida cuando llegué al minilab. A Antonio Caballero, Wilson, y Javi por su compañerismo y entusiasmo por la investigación. A Chechu por sus acertados consejos y estar siempre dispuesto a ayudar. A Andreas por su colaboración en este proyecto. A Tesi, por sus charlas científicas y personales y su buen rollo. A Ana Hurtado por ser secuencialmente importante y su humor granaíno. A Paola y África por su aportación e interés en esta Tesis durante su breve pero especial incursión en nuestro laboratorio. Gracias también a Patricia Marín y Toñi por la ayuda prestada. A Fátima, Miguel, María y Vanina por vuestros consejos o ayuda cuando la he necesitado.

A Rebecca y Juan Parales por compartir sus conocimientos sobre quimiotaxis, su calurosa acogida en su grupo de la Universidad de California, Davis, por todo el tiempo que me han dedicado y por su amistad. A Xianxian, Kou-San, Joseph, Chad, Christy, Paulina, Krissy, Kara y en especial a Tiffany, por hacer mi estancia en Davis, una experiencia inolvidable.

A Marisela y Paloma, del Instituto de Ciencias de Materiales "Nicolás Cabrera" de la Universidad Autónoma de Madrid por su dedicación y entusiasmo en nuestra colaboración, por enseñarme los fundamentos de la AFM, y por esas imágenes tan preciosas que obtuvimos. También gracias por vuestra calurosa acogida.

A Gabi, Estela y Paco de la Universidad de Granada por su colaboración en la obtención de cristales de TodT.

A mis amigos, María, Platero, Roberto, Luiso, Guada, Bea, Laura, Yoya, Raquel y Fabián de la promoción de Biología del 97, que sufrimos juntos el plan nuevo y disfrutamos como nadie de esos magníficos 5 años de carrera. Gracias por vuestro interés en mi trabajo, estar siempre que os necesito y aguantarme cada vez que hablo de la *putida* esa. En parte esta tesis ya comenzó con vosotros.

A Mercedes, mi chica favorita y la que ha vivido más de cerca esta tesis, tanto para lo bueno como para lo regular. Gracias por estar a mi lado, comprenderme y quererme. Gracias también por todo tu apoyo, que ha sido de gran ayuda, y animarme a seguir en este mundillo.

A mi familia, en especial a mis padres, Jesús e Irene, a los que les agradezco su amor incondicional, su esfuerzo en mi educación, y su ayuda en todo lo que al alcance de su mano ha estado. Gracias por hacerme la vida más fácil. A mi hermana Irene, y a mi abuela Encarna, por su interés en mi trabajo. También a Carmen María y Águeda por darme ánimos y hacerme sentir tan bien en lo que trabajo.

Por último, quiero agradecer a todas aquellas personas de la EEZ con las que he tenido la oportunidad de interactuar y colaborar, y que desinteresadamente me han dedicado su tiempo. De todos un poco me llevo conmigo.

ÍNDICE

	Página
APÉNDICE	
ABREVIATURAS	i
ÍNDICE DE FIGURAS	ii
ÍNDICE DE TABLAS	iv
INTRODUCCIÓN	1
1. El género <i>Pseudomonas</i>	4
1.1. Clasificación y taxonomía	5
1.2. Ecología	6
1.3. Degradación de tolueno	8
1.4. Quimiotaxis hacia compuestos aromáticos	12
2. <i>Pseudomonas putida</i>	17
2.1. <i>Pseudomonas putida</i> DOT-T1E	19
2.1.1. Ruta TOD	20
2.1.2. Sistema de dos componentes TodS/TodT	21
3. Sistemas de dos componentes	23
3.1. Quinasas sensoras	27
3.2. Reguladores de respuesta	29
II. OBJETIVOS	33
III. RESULTADOS:	37
III. CAPÍTULO 1. The TodS-TodT two-component regulatory system recognizes a wide range of effectors and works with DNA-bending proteins.	39
RESUMEN	39
SUMMARY	41
INTRODUCTION	41
RESULTS	41
Effector profile of the TodS–TodT system	42
Isothermal titration calorimetry	42
Modulation of basal autophosphorylation activity of TodS by	

toluene and rate of dephosphorylation	43
TodS–TodT transphosphorylation activity	43
IHF participates in the activation of P_{todX}	43
IHF binds to P_{todX} <i>in vitro</i>	44
Redefining the TodT-binding region in P_{todX}	44
Activation from the P_{todX} promoter requires contacts with the α -subunit of RNA Polymerase	44
<i>In vitro</i> transcription assays	45
DISCUSSION	45
MATERIALS AND METHODS	45
REFERENCES	46
III. CAPÍTULO 2. Hierarchical binding of the TodT response regulator to its multiple recognition sites at the <i>tod</i> pathway operon promoter.	47
RESUMEN	47
SUMMARY	49
INTRODUCTION	50
RESULTS	51
TodT is a monomer in solution	51
Identification of an additional TodT binding site in the P_{todX} promoter	52
The three TodT boxes identified <i>in vitro</i> have a positive effect in P_{todX} transcription	53
Thermodynamic characterization of the molecular interactions between TodT and the C-TodT protein with individual TodT boxes	55
The C-terminal end of TodT binds to target DNA but does not promote transcription <i>in vitro</i>	56
DISCUSSION	56
The P_{todX} promoter exhibits features of -10 extended promoters	56
Multiple binding sites for TodT at P_{todX}	57
TodT belongs to the NarL family of activators	57
MATERIALS AND METHODS	58
REFERENCES	59

III. CAPÍTULO 3. Two levels of cooperativity in the binding of TodT to the <i>tod</i> operon promoter.	63
RESUMEN	63
SUMMARY	65
INTRODUCTION	65
RESULTS	67
TodT binds specifically to the P_{todX} promoter target and shows cooperativity	67
Binding of TodT to individual sites and to consecutive target pseudopalindromes reveals positive cooperative interactions	67
C-TodT binds DNA in a similar fashion as TodT	68
Minimal DNA length for C-TodT binding	69
Binding of TodT to P_{todX} promoter induces bending	70
DISCUSSION	72
MATERIALS AND METHODS	73
REFERENCES	74
III. CAPÍTULO 4. A plasmid confers hyper-chemotaxis phenotype to <i>Pseudomonas putida</i> strains: Implications for biodegradation of organic solvents.	77
RESUMEN	77
SUMMARY	79
INTRODUCTION	79
MATERIALS AND METHODS	80
RESULTS	81
<i>Pseudomonas putida</i> DOT-T1E is hyper-chemotactic towards organic solvents	81
A plasmid confers hyper-chemotactic behaviour of <i>Pseudomonas putida</i> towards organic solvents	83
Chemotaxis was independent of preinduction with toluene and of catabolite repression of P_{todX}	83
The two-component system TodS/TodT is not involved in chemotaxis	84
The search for the toluene chemoreceptor: identification of an	

MCP involved in succinate chemotaxis	84
DISCUSSION	85
REFERENCES	86
IV. DISCUSIÓN GENERAL	89
V. CONCLUSIONES	105
VI. BIBLIOGRAFÍA DE LA INTRODUCCIÓN Y DISCUSIÓN	109

ABREVIATURAS

ADN	ácido desoxirribonucleico
AFM	microscopía de fuerzas atómicas (del inglés, <i>atomic force microscopy</i>)
ARNr	ácido ribonucleico ribosómico
ATP	adenosina trifosfato
bZIP	motivo de cremallera de leucina (del inglés, <i>basic leucine zipper domain</i>)
αCTD	extremo carboxilo terminal de la subunidad alpha de la ARNP
C-terminal	extremo carboxilo
C-TodT	fragmento carboxilo terminal de TodT (aminoácidos 154-206)
ΔG	cambio de energía libre de Gibbs
ΔH	cambio de entalpía
ΔS	cambio de entropía
Da	Dalton
HPK	proteína histidina kinasa (del inglés, <i>histidine protein kinase</i>)
HTH	hélice-giro-hélice (del inglés, <i>helix-turn-helix</i>)
IHF	factor de integración (del inglés, <i>integration host factor</i>)
ITC	calorimetría de titulación isotérmica (del inglés, <i>isothermal titration calorimetry</i>)
kb	kilobase(s)
LB	Luria-Bertani
Mb	megabase(s)
MCP	proteínas aceptoras de grupos metilo (del inglés, <i>methyl-accepting chemotaxis protein</i>)
N-terminal	extremo amino
ORF	fase de lectura abierta (del inglés, <i>open reading frame</i>)
PAS	del inglés (Par-ARNT-Sim),
pb	pare(s) de base(s)
ppm	partes por millón
RND	(del inglés, <i>resistance-modulation-cell division</i>)
RNAPσ⁷⁰	RNAP asociada a σ ⁷⁰
RR	reguladores de respuesta
TCE	tricloroetileno
TNT	2,4,6-trinitrotolueno

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
INTRODUCCIÓN	1
Figura 1. Rutas aerobias de degradación de tolueno.	9
Figura 2. Esquema del sistema quimiosensor de <i>Escherichia coli</i> .	15
Figura 3. Genes implicados en la regulación y degradación de tolueno.	20
Figura 4. Representación esquemática de TodS.	21
Figura 5. Representación esquemática de TodT.	22
Figura 6. Representación esquemática de la organización modular de los sistemas de dos componentes más representativos.	25
Figura 7. Reacciones de la transducción del grupo fosforilo.	26
RESULTADOS	
CAPÍTULO 1. The TodS-TodT two-component regulatory system recognizes a wide range of effectors and works with DNA-bending proteins.	39
Figure 1. Induction of P_{todX} by TodS-TodT in response to a wide range of aromatics.	42
Figure 2. Isothermal titration calorimetry data for the binding of toluene to TodS and its recombinant fragments NTodS and CTodS.	42
Figure 3. The catalytic properties of TodS.	43
Figure 4. Identification of TodT and IHF-binding sites at P_{todX} .	44
Figure 5. Specific binding of TodT to P_{todX} EMSA for the binding of TodT to a 352-bp DNA fragment containing the P_{todX} promoter.	44
Figure 6. <i>In vitro</i> transcription from P_{todX} .	45
CAPÍTULO 2. Hierarchical binding of the TodT response regulator to its multiple recognition sites at the <i>tod</i> pathway operon promoter.	47
Figure 1. Schematic representation of the functional domains of TodS and TodT.	50
Figure 2. Sequence of P_{todX} promoter.	50
Figure 3. Determination of the oligomeric state of TodT by analytical gel filtration.	51
Figure 4. Microcalorimetric analysis of the reaction of TodT with carbamoyl phosphate.	52

Figure 5. Identification of a third TodT binding site at P_{todX} .	52
Figure 6. β -Galactosidase activity determined in <i>P. putida</i> DOT-T1E (pMIR66) harbouring the wild-type P_{todX} promoter and its mutant derivatives with altered TodT boxes fused to <i>lacZ</i> .	54
Figure 7. Specific binding of TodT to P_{todX} and its mutant variants in EMSA.	54
Figure 8. Footprint of TodT on P_{todX} mutant variants.	54
Figure 9. Microcalorimetric titrations of TodT with 20-mer DNA fragments containing box 1, 2 or 3 and with non-specific DNA.	55
CAPÍTULO 3. Two levels of cooperativity in the binding of TodT to the <i>tod</i> operon promoter.	63
Figure 1. Electrophoretic mobility shift assay (EMSA) of TodT binding to P_{todX} DNA.	66
Figure 2. Microcalorimetric tirations of TodT with 20-mer DNA fragments containing Box-1, its two half-palindrome derivatives and a 41-bp segment containing Boxes-1 and -2.	67
Figure 3. Microcalorimetric titrations of C-TodT with 20-mer DNA fragments containing TodT Box-1 and its optimized palindromic sequence mutant derivatives.	70
Figure 4. DNase I footprint analysis of TodT and C-TodT binding to the P_{todX} promoter.	70
Figure 5. Atomic force microscopy structural characterization of TodT-DNA complexes.	71
CAPÍTULO 4. A plasmid confers hyper-chemotaxis phenotype to <i>Pseudomonas putida</i> strains: Implications for biodegradation of organic solvents.	77
Figure 1. Schematic drawing of the domain arrangement of the sensor kinase TodS.	80
Figure 2. Chemotactic behaviour of different wild-type and mutant strains of <i>P. putida</i> towards toluene.	82
Figure 3. Chemotactic response of <i>P. putida</i> DOT-T1E mutants deficient in <i>todS</i> and/or <i>todT</i> .	84
Figure 4. Chemotactic response of <i>P. putida</i> KT2440R Δ pp4658 towards malate, succinate and toluene.	85

ÍNDICE DE TABLAS

	Página
INTRODUCCIÓN	1
Tabla 1. Especies de <i>Pseudomonas</i> agrupadas según el grado de identidad de sus ARNr.	5
RESULTADOS	
CAPÍTULO 1. The TodS-TodT two-component regulatory system recognizes a wide range of effectors and works with DNA-bending proteins.	39
Table 1. Bacterial strains and plasmids used in this study.	42
CAPÍTULO 2. Hierarchical binding of the TodT response regulator to its multiple recognition sites at the <i>tod</i> pathway operon promoter.	47
Table 1. Bacterial strains and plasmids used in this study.	53
Table 2. Oligonucleotides used in this study.	55
Table 3. Thermodynamic parameters derived from the calorimetric titration of TodT and C-TodT with its DNA binding sites.	56
CAPÍTULO 3. Two levels of cooperativity in the binding of TodT to the <i>tod</i> operon promoter.	63
Table 1. Oligonucleotides used for isothermal titration calorimetry assays.	68
Table 2. Thermodynamic parameters from the calorimetric titration of TodT and C-TodT with different DNA fragments.	69
Table 3. Thermodynamic parameters for C-TodT with the Box 1 oligomer and its derived oligomer variants.	69
Table 4. Bacterial strains and plasmids used in this study.	71
CAPÍTULO 4. A plasmid confers hyper-chemotaxis phenotype to <i>Pseudomonas putida</i> strains: Implications for biodegradation of organic solvents.	77
Table 1. Bacterial strains and plasmids used in this study.	81

INTRODUCCIÓN

Aunque la primera bacteria fue observada por Anton van Leeuwenhoek en 1683, el término bacteria, derivado del griego βακτήριον -α, bacterion -a, que significa bastón pequeño, no fue introducido hasta el año 1828 por Ehrenberg. Posteriormente, Louis Pasteur (1822-1895) y Robert Koch (1843-1910) fueron de los primeros defensores de la teoría germinal de las enfermedades infecciosas y así, sucesivamente, el conocimiento compartido de ramas propias de la biología, como la microbiología, la bioquímica y la biología molecular, ha propiciado un espectacular avance en técnicas y métodos de estudio, lo que ha facilitado la generación de conocimiento por parte de los investigadores.

Las bacterias son organismos aparentemente sencillos ya que carecen de núcleo, de orgánulos y de formaciones protoplasmáticas. La mayoría presentan un tamaño 10 veces menor que el de las células eucariotas, es decir, entre 0.5 y 5 micrómetros. Sin embargo, algunas especies como *Thiomargarita namibiensis* y *Epulopiscium fishelsoni* llegan a alcanzar los 0.5 mm, lo cual las hace visibles al ojo humano. En el otro extremo, se encuentran las bacterias más pequeñas conocidas, entre las que cabe destacar las pertenecientes al género *Mycoplasma*, las cuales llegan a medir solo 0.3 micrómetros, es decir, tan pequeñas como los virus más grandes. Algunas especies presentan cápsula y otras son capaces de evolucionar a esporas. Suelen presentar un único cromosoma y en muchas especies es frecuente la presencia de plásmidos.

La pared celular está compuesta generalmente por carbohidratos, entre los que destaca la mureína un polisacárido complejo, lípidos y aminoácidos, esta pared se puede teñir de forma selectiva con la tinción de Gram, lo que permite la división de las bacterias en dos grupos, las bacterias Gram positivas y las bacterias Gram negativas, según se tiñan de azul violeta o rojo, respectivamente.

Su morfología no es constante y a menudo, una misma especie adopta distintos tipos morfológicos, es lo que se conoce como pleomorfismo. Existen tres tipos fundamentales de bacterias: los cocos o formas esféricas, entre los que se encuentran los diplococos, los estreptococos, y los estafilococos, según si las bacterias se agrupan de a dos, en cadena o en racimo respectivamente; en forma de bastoncillo, son los bacilos; y con formas helicoidales: espiroquetas, espirilos y vibrios. Entre las formaciones propias de la célula bacteriana destacan los flagelos y las cápsulas.

1. El género *Pseudomonas*

Pseudomonada literalmente significa «falsa unidad», derivado del griego *pseudo* (*ψευδο* 'falso') y *monas* (*μονάς / μονάδα* 'una sola unidad'). El término “monada” se usaba en la microbiología antigua para nombrar a los organismos unicelulares. Las *Pseudomonas* son bacilos Gram negativos, rectos o ligeramente curvados (0.5-0.8 μm x 1-3 μm), que se encuadran dentro del grupo γ de las proteobacterias, generalmente son móviles gracias a los flagelos polares que poseen aunque en algunas cepas se han descrito flagelos laterales. Normalmente son oxidasa positivos, catalasa positivos y aerobios estrictos, aunque recientemente se han descrito *Pseudomonas* formadoras de biopelículas que pueden utilizar el nitrato como aceptor de electrones (Hassett *et al.*, 2002). El catabolismo de la glucosa se realiza por la ruta de Entner-Doudoroff y el ciclo de los ácidos tricarboxílicos. Algunas especies del género son psicrófilas pero no se han descrito especies termófilas ni acidófilas. Otras sintetizan sideróforos, que son fluorescentes bajo longitudes de onda corta (254 nm), de color amarillo-verdoso conocidos como pioverdinas y piocianinas (pigmento azul soluble característico de la mayoría de cepas de *P. aeruginosa*, *P. putida* y *P. fluorescens*), particularmente cuando se cultivan en condiciones limitantes de hierro. No forman esporas ni fermentan azúcares. Su contenido en G+C en el genoma oscila entre el 58-69 %. La mayoría de las cepas son resistentes a la penicilina y a casi todos los antibióticos beta-lactámicos, aunque algunas son sensibles a piperacilina, imipenem, tobramicina, o ciprofloxacina (Ryan y Ray, 2004).

Es común la presencia de plásmidos, confiriendo normalmente resistencia a antibióticos y agentes antibacterianos. Se han identificado 13 grupos compatibles de plásmidos en *Pseudomonas*. El grupo IncP-1 contiene los denominados plásmidos de amplio espectro de hospedador, es decir, se transfieren a casi todas las cepas de especies Gram negativas, mientras que el grupo IncP-2, contiene más de la mitad de los plásmidos transmisibles entre especies de *Pseudomonas* identificados para este género. Además de la variedad de marcadores que confieren resistencia a antibióticos y compuestos químicos simples como mercurio y boro, muchos plásmidos del grupo IncP-2 confieren resistencia a telurito. En dicho grupo se encuentran además los plásmidos de mayor tamaño, algunos superando las 300 kb. En el grupo de los plásmidos IncP-9 se han identificado un buen número de plásmidos catabólicos,

contribuyendo significativamente a la diversidad nutricional del género *Pseudomonas*. Por ejemplo, los plásmidos NAH, SAL y TOL, portan los genes implicados en la degradación de naftaleno, salicilato y tolueno respectivamente (Levchuk *et al.*, 2006, Yen y Gunsalus, 1982, Greated *et al.*, 2002). Además de conferir resistencia a agentes tóxicos, algunos plásmidos de *Pseudomonas* confieren resistencia a agentes físicos tales como temperatura, osmolaridad y radiación ultravioleta, también frente a bacteriófagos y bacteriocinas. Se han descrito también algunos plásmidos capaces de movilizar el cromosoma bacteriano (Ramos-González *et al.*, 1994).

1.1. Clasificación y taxonomía

La clasificación y taxonomía de *Pseudomonas* ha estado en continuo cambio a medida que las técnicas comparativas de alineamiento de ARN ribosómico (ARNr) 16S mejoraban. De acuerdo con Palleroni y colaboradores (1973), las especies del género *Pseudomonas* se clasificaron dentro de cinco grupos basados en la homología del ARNr (Tabla 1). Posteriormente, a principios de los años 90, los miembros del grupo I se mantuvieron como pertenecientes al género *Pseudomonas*, pero las cepas adscritas a los grupos II, III, IV y V pasaron a considerarse como nuevos o preexistentes géneros.

Grupos	Especies integrantes
I	<i>P. aeruginosa</i> , <i>P. fluorescens</i> , <i>P. putida</i> , <i>P. chlororaphis</i> , <i>P. syringae</i> , <i>P. cichorii</i> , <i>P. stutzeri</i> , <i>P. mendocina</i> , <i>P. alcaligenes</i> , <i>P. pseudoalcaligenes</i> , <i>P. agarici</i> , <i>P. angulata</i> , <i>P. fragi</i> , <i>P. synxantha</i> , <i>P. taetrolens</i> , <i>P. mucidolens</i> , <i>P. oleovorans</i> , <i>P. resinovorans</i>
II	<i>P. (Burkholderia) cepacia</i> , <i>P. gladioli</i> , <i>P. caryophylli</i> , <i>P. (Alcaligenes) pseudomallei</i> , <i>P. mallei</i> , <i>P. (Ralstonia) solanacearum</i> , <i>P. (Ralstonia) pickettii</i> , <i>P. pyrrocinia</i> , <i>P. andropogonis</i>
III	<i>P. (Comamonas) acidovorans</i> , <i>P. (Comamonas) testosteroni</i> , <i>P. saccharophila</i> , <i>P. facilis</i> , <i>P. delafieldii</i> , <i>P. alboprecipitans</i> , <i>P. palleronii</i>
IV	<i>P. diminuta</i> , <i>P. vesicularis</i>
V	<i>Pseudomonas</i> spp., <i>X. (Xanthomonas) maltophilia</i> , <i>P. geniculata</i> , <i>P. gardneri</i>

Tabla 1. Especies de *Pseudomonas* agrupadas según el grado de identidad de sus ARNr. Los grupos II, III, IV y V, están actualmente ubicados en nuevos géneros de *alpha* proteobacteria, cuyo nuevo nombre se presenta entre paréntesis.

1.2. Ecología

Las especies del género *Pseudomonas* tienen unos requisitos nutricionales muy simples. En el laboratorio se pueden cultivar en medio mínimo con alguna materia orgánica en solución como fuente de carbono, a pH neutro, temperaturas del intervalo mesófilo y en general, sin añadir factores de crecimiento. En la naturaleza, las especies saprófitas de *Pseudomonas* son ubicuas, encontrándolas particularmente en agua y suelo, pudiendo aislarse directamente en los habituales medios de cultivo usados en laboratorio con agar como soporte. Las especies patógenas pueden afectar a plantas, animales o humanos, siendo *P. aeruginosa* el patógeno oportunista más frecuentemente aislado en estos dos últimos. Al igual que las especies saprófitas, *P. aeruginosa* es ubicua, se puede encontrar en suelo, agua, comida, y en la superficie de plantas y animales. Se ha descubierto recientemente que esta especie también se puede comportar como patógena de plantas. Algunas especies sintetizan una cápsula de exopolisacáridos que facilita la adhesión celular, la formación de biopelículas y protege de la fagocitosis por los glóbulos blancos de los mamíferos (Ryan y Ray, 2004), de los anticuerpos o del complemento, aumentando así su patogenicidad. Existen también especies capaces de deteriorar leche no pasteurizada y otros productos de uso diario (Madigan y Martinko, 2005).

Las *Pseudomonas* son capaces de procesar, integrar y reaccionar frente a una amplia variedad de condiciones cambiantes en el medio ambiente, y muestran una alta capacidad de reacción a señales físico-químicas y biológicas. Se han descrito cepas capaces de adquirir resistencia a metales pesados, disolventes orgánicos y detergentes, lo cual les permite explotar una amplia gama de fuentes de carbono como nutrientes, así como colonizar ambientes y nichos que difícilmente son colonizables por otros microorganismos. Gracias a la combinación de procesos metabólicos donde se obtiene una degradación parcial o total de estos contaminantes, se puede conseguir su destrucción o conversión en productos menos dañinos. Este procedimiento es conocido como biodegradación y su aplicación más directa es la biorremediación. Además de su uso en biorremediación, las especies del género *Pseudomonas* se emplean en distintos procesos industriales, tales como la fabricación de bioplásticos o en técnicas de biocontrol. Recientemente investigadores de la Universidad de Dublín, descubrieron que *P. putida* es capaz de convertir aceite de estireno en plástico biodegradable que se

puede aplicar en el reciclaje del papel de aluminio de poliestireno, no biodegradable de otra manera. Así mismo, se ha descrito la conversión de tolueno en catecoles y semialdehídos del ácido mucónico para la síntesis de compuestos de interés industrial y farmacéutico (Rojas *et al.*, 2004). También hay que destacar que una variante recombinante en *P. putida* fue el primer microorganismo utilizado en producir el colorante índigo.

Gracias a la versatilidad metabólica de estos microorganismos y a la capacidad de formar biopelículas, no es de extrañar que se hayan aislado bacterias de este género tanto en suelos limpios, como en suelos contaminados por productos biogénicos y xenobióticos. La ubicuidad de las bacterias del género *Pseudomonas* y su capacidad para explotar una amplia variedad de nutrientes, refleja un sistema de adaptación al medio ambiente que no encuentra parangón en las bacterias de otros géneros. Por ello se considera a las bacterias del género *Pseudomonas*, un paradigma de versatilidad metabólica, y microorganismos clave, en el reciclado de materia orgánica en los compartimentos aerobios de los ecosistemas, jugando un papel esencial en la mejora y el mantenimiento de la calidad medioambiental.

Una de las líneas de investigación más importantes de los últimos años llevada a cabo en especies de *Pseudomonas putida*, ha sido el estudio de la regulación transcripcional de las rutas catabólicas de hidrocarburos aromáticos. Aunque en el siglo pasado se liberaron grandes cantidades de hidrocarburos aromáticos como consecuencia de la actividad industrial, la mayoría de estos compuestos se encuentran en el medio ambiente como consecuencia de la pirólisis natural de material orgánico (Dagley, 1971). La mayoría de los contaminantes, pueden ser clasificados como compuestos alifáticos o aromáticos, que contienen diferentes grupos funcionales, tales como: -OH, -Cl, -NH₂, -NO₂ y -SO₃. Comportándose como donadores de electrones, estos contaminantes son oxidados como consecuencia del metabolismo microbiano, y en el mejor de los casos, son mineralizados. El tolueno, como uno de los compuestos aromáticos más simples estructuralmente y de origen natural, está ampliamente distribuido en los ambientes naturales. Debido a que los organismos han estado en contacto con éste y con otros compuestos estructuralmente parecidos a lo largo de la evolución, es natural que las bacterias hayan desarrollado la capacidad para degradar este tipo de compuestos aromáticos.

1.3. Degradación de tolueno

El tolueno o metilbenceno ($C_6H_5CH_3$), es un compuesto orgánico volátil presente de forma natural en el petróleo crudo y en el árbol Tolú (*Myroxylon balsamum*), de donde deriva su nombre (Henri Etienne Sainte-Claire Deville obtuvo tolueno por primera vez en 1844 mediante destilación seca del bálsamo de dicho árbol). El tolueno es una importante materia prima industrial, a partir de la cual se obtienen derivados del benceno, el ácido benzoico, el fenol, la caprolactama (molécula clave en la síntesis del nylon), la sacarina, medicamentos, colorantes, perfumes, 2,4,6-trinitrotolueno (TNT) y detergentes. Se adiciona a los combustibles como antidetonante y se usa en la fabricación de pinturas, diluyentes de pinturas, barniz para las uñas, lacas, adhesivos y caucho, y en la imprenta y el curtido de cueros. Artificialmente, el tolueno se produce durante la manufactura de gasolina y de otros combustibles a partir de petróleo crudo y en la manufactura de coque a partir de carbón. Además se obtiene como subproducto en la generación de etileno y de propeno. La producción mundial anual de tolueno es de 12 millones de toneladas según datos del 2006 de la KEMI *Swedish Chemicals Agency*.

La exposición a niveles bajos o moderados de tolueno puede producir cansancio, confusión, debilidad, pérdida de la memoria, náuseas, pérdida del apetito y pérdida de la audición y la vista. Los vapores de tolueno presentan un ligero efecto narcótico e irritan los ojos. Inhalar niveles altos de tolueno puede hacer que uno se sienta mareado o soñoliento, pudiendo causar, pérdida del conocimiento y, en casos extremos, la muerte. La Administración de Seguridad y Salud Ocupacional de EEUU (*OSHA*, por sus siglas en inglés) ha establecido como límite permitido en el área de trabajo 200 ppm de tolueno en el aire, pudiendo olerse cuando su concentración es superior a 8 ppm.

Desde un punto de vista termodinámico, el tolueno es un compuesto extremadamente estable como resultado de la alta energía de resonancia del anillo de benceno, sin embargo, los microorganismos han desarrollado una estrategia común para atacar el anillo aromático antes de romperlo, que consiste en la incorporación de dos grupos hidroxilo que desestabiliza la estructura resonante químicamente estable de la molécula. Para ello, las bacterias han desarrollado distintos mecanismos moleculares que conducen a la formación de un compuesto di-hidroxlado. Hasta la fecha se han descrito en bacterias cinco rutas aerobias para la degradación de tolueno, derivando en

codifica las enzimas implicadas en la conversión de tolueno a benzoato (Harayama *et al.*, 1986). La información para la transformación de benzoato hasta intermediarios del ciclo de Krebs está codificada en el operón “*meta*”. Éste tiene un tamaño de 11 kb y lleva la información de 13 genes *xyWXYZLTEGFJQKIH* siendo uno de los operones de mayor tamaño entre los descritos en procariontes (Harayama *et al.*, 1990) y porta la información genética necesaria para la degradación de los benzoatos y metilbenzoatos hasta acetaldehído y piruvato (Harayama *et al.*, 1984). En 3' con respecto al operón “*meta*” existen dos genes reguladores *xyIS* y *xyIR* que están implicados en el control transcripcional de los genes del operón “*upper*” y “*meta*” (Ramos *et al.*, 1990, Marqués *et al.*, 1998). Estos genes reguladores se transcriben desde promotores independientes y divergentes.

Otra de las rutas existentes para la degradación de tolueno es la ruta TOD, que fue descrita por primera vez para la cepa *Pseudomonas putida* F1 (Gibson *et al.*, 1970). Esta cepa degrada tolueno a través de una ruta en la que en el primer paso se forma el compuesto *cis*-2-3-dihidro-2,3-dihidroxitolueno, a través de una reacción de dioxigenación llevada a cabo por la tolueno dioxigenasa. Todos los genes para el catabolismo de tolueno se localizan en un único operón de 10.3 kb en el orden *todXFC1C2BADEGIH* (Figura 3) (Lau *et al.*, 1997, Menn *et al.*, 1991, Mosqueda *et al.*, 1999, Wang *et al.*, 1995, Zylstra y Gibson, 1989, Zylstra *et al.*, 1988) que se induce por tolueno (Finette y Gibson, 1988, Wang *et al.*, 1995). Estos genes se han clonado y secuenciado (Lau *et al.*, 1994 y 1997, Menn *et al.*, 1991, Zylstra y Gibson, 1989) y también se han caracterizado bioquímicamente y genéticamente (Finette *et al.*, 1984, Gibson *et al.*, 1990). En la figura 1 se presenta el esquema completo de la ruta. En 3' respecto al gen *todH*, se ha encontrado un operón dicistrónico que contiene los genes *todST*, cuyos productos génicos forman un sistema de dos componentes implicado en la regulación la ruta de degradación de tolueno en las cepas *P. putida* F1 y *P. putida* DOT-T1E (Lau *et al.*, 1997, Mosqueda *et al.*, 1999).

La ruta TMO se ha descrito en *Pseudomonas mendocina* KR1 (Whited y Gibson, 1991). El paso inicial de esta ruta consiste en la conversión de tolueno en *p*-cresol mediante la tolueno-4-mono-oxigenasa. Esta ruta al igual que la ruta *tod* está codificada en el cromosoma de la bacteria (Wright y Olsen, 1994), y los genes que codifican la tolueno-4-mono-oxigenasa, *tmoABDCEF*, se han clonado y secuenciado.

Las otras dos rutas adicionales para la degradación de tolueno fueron descritas en principio para cepas originalmente consideradas *Pseudomonas* aunque posteriormente fueron reclasificadas como *Ralstonia pickettii* y *Burkholderia cepacia*. La primera degrada tolueno mediante la ruta TBU, donde el tolueno es convertido por la tolueno 3-mono-oxigenasa en *m*-cresol y posteriormente 3-metilcatecol. *B. cepacia* degrada tolueno a través de un sistema enzimático denominado tolueno 2-mono-oxigenasa (Shields *et al.*, 1989) para rendir posteriormente 3-metilcatecol. Se sabe que la ruta de degradación está codificada por el plásmido TOM (Shields *et al.*, 1995). También se ha descrito una ruta de degradación ligeramente diferente a las anteriores en la cepa *P. stutzeri* OX1, una cepa capaz de degradar *o*-xileno a través de una reacción inicial que implica dos mono-oxigenaciones sucesivas del anillo aromático llevadas a cabo por la enzima tolueno-*o*-xileno-mono-oxigenasa (ToMO) (Cafaro *et al.*, 2004). También es capaz de oxidar *o*-, *m*-, y *p*-xileno, 2,3- y 3,4-dimetilfenol, tolueno, cresol, benceno, naftaleno y estireno (Bertoni *et al.*, 1996, Cafaro *et al.*, 2004).

Aunque hay distintas rutas para la conversión de tolueno a intermediarios dihidroxilados, el número de estrategias para la rotura del anillo aromático se ha limitado a dos posibilidades, rotura del anillo en *ortho* o *meta*. Cuando el anillo aromático es abierto entre los dos carbonos con sustituyentes hidroxilo, se produce el ácido *cis,cis*-mucónico, y esta reacción se conoce como la rotura en *ortho* (Ornston, 1966). Por otro lado, cuando el anillo se abre entre un carbono con un grupo hidroxilo y un carbono no hidroxilado, la fisión se conoce como *meta* y el producto que se forma es el semialdehído del ácido mucónico (Dagley, 1971). Como regla general, los catecoles con sustituyentes alquílicos se degradan vía *meta*, mientras que los catecoles sin sustituyentes o halo substituidos se degradan vía *ortho* (Harayama, 1989, Mars, 1997, Reineke *et al.*, 1982). Una característica común para todas las rutas de degradación de tolueno en bacterias es que los genes implicados en las distintas reacciones suelen estar organizados en unidades transcripcionales de tipo operón.

1.4. Quimiotaxis hacia compuestos aromáticos

La quimiotaxis es un sistema de respuesta sensorial de locomoción, gobernado químicamente, que tienen algunos microorganismos flagelados para detectar y responder a favor o en contra de un gradiente químico. El control de la motilidad celular, permite a las células libres desplazarse hacia un ambiente favorable en nutrientes, pH, temperatura, oxígeno y a veces de densidad celular (Salman y Libchaber, 2007, Hong *et al.*, 2004). La motilidad y la quimiotaxis son necesarias para muchas especies patógenas en la colonización e invasión del hospedador. Así, *Helicobacter pylori* se dirige a la mucosa del estómago (Pittman *et al.*, 2001), la forma libre de *Vibrio anguillarum* a la superficie del pez (O'Toole *et al.*, 1999) y *Agrobacterium tumefaciens* a las heridas de plantas (Kim y Farrand, 1998). La quimiotaxis también es necesaria en el establecimiento de asociaciones simbióticas, como la formación de nódulos en las raíces de leguminosas por especies del género *Rhizobium*. Estas plantas producen exudados que contienen moléculas que pueden actuar como señales quimioatrayentes y que son capaces de inducir la expresión en estas bacterias de genes relacionados con la formación de estas asociaciones simbióticas (Miller *et al.*, 2007).

La quimiotaxis también puede intervenir y tener un importantísimo valor en la supervivencia de la bacteria si ésta es capaz de detectar compuestos tóxicos y así alejarse de ellos, o bien acercarse y usarlos como fuente de carbono y energía (Parales y Harwood, 2002). Sin embargo, ha sido investigada solamente en unos pocos microorganismos, en comparación con el gran número de cepas conocidas capaces de degradar dichos compuestos (Gordillo *et al.*, 2007, Pandey *et al.*, 2002, Parales, 2004, Leungsakul, *et al.*, 2005). Recientemente, de los pocos genes conocidos que están implicados en la quimiotaxis hacia hidrocarburos, se ha demostrado que la mayoría están relacionados con los genes implicados en las vías catabólicas de dichos hidrocarburos, por lo que las bacterias parecen responder frente a atrayentes que puedan ser degradados y/o reconocidos por las enzimas de la correspondiente ruta catabólica. Sin embargo, el proceso de degradación *per se* no siempre se requiere para la respuesta quimiotáctica (Pandey *et al.*, 2002, Parales, 2004). En *P. putida* F1, se ha visto que mutantes defectivos en la tolueno dioxigenasa, los cuales no pueden crecer en tolueno como única fuente de carbono, son quimiotácticos hacia tolueno. En esta misma cepa, mutantes en el sistema de dos componentes TodS/TodT, proteínas esenciales para la

expresión del operón *tod*, no exhiben quimiotaxis hacia tolueno (Parales *et al.*, 2000). A raíz de estos resultados, se ha sugerido que la proteína sensora TodS podría funcionar mediando coordinadamente la regulación entre la expresión de los genes necesarios para la respuesta quimiotáctica y aquellos para la degradación del correspondiente sustrato (Parales *et al.*, 2000). También hay que tener en cuenta que la formación de biopelículas supone una estrategia de supervivencia para las bacterias (Johnson, 2007) y que la quimiotaxis podría estar influyendo en dicho fenómeno (Li *et al.*, 2007), probablemente afectando a la agregación a las superficies.

Desde el punto de vista de la biorremediación no se han publicado muchos trabajos que realmente demuestren la posible utilidad de la quimiotaxis con dicho propósito. La primera evidencia del papel de la quimiotaxis en la biorremediación se observó en *P. putida* G7, la cual era quimiotáctica hacia naftaleno y degradaba este compuesto a mayor velocidad que cuando se comparaba con un mutante deficiente en la quimiotaxis hacia dicho compuesto (Law y Aitken, 2003). Otros trabajos posteriores que demuestran la importancia de la quimiotaxis en la biodegradación están centrados en la degradación de bifenilos policlorados y clorobenzoatos por *Pseudomonas* sp. B4 (Gordillo *et al.*, 2007) y la biodegradación de los explosivos cíclicos nitramina por *Clostridium* sp. EDB2 (Bhushan, *et al.*, 2004).

El mecanismo molecular que gobierna la quimiotaxis se ha estudiado en detalle en *Salmonella enterica* y *Escherichia coli* (Figura 2) y actualmente sirven de modelo para explicar cómo funcionan las rutas de transducción (Stock y Surette, 1996, Macnab, 1996, Bourret y Stock, 2002, Bren y Eisenbach, 2000). En *E. coli*, las células nadan hacia los atrayentes y en contra de los repelentes regulando la frecuencia de cambio entre la rotación flagelar hacia la izquierda (en contra de la agujas del reloj) o hacia la derecha, de manera que la rotación flagelar hacia la izquierda es mayor cuando la bacteria detecta un aumento de la concentración del atrayente (Berg, 1993). En un ambiente homogéneo, la dirección hacia la que nadan las bacterias, cambia cada segundo, lo que produce un movimiento al azar. En un ambiente no homogéneo, la frecuencia de los cambios en la dirección del movimiento es controlada por los estímulos positivos o negativos extracelulares. En la quimiotaxis intervienen quimiorreceptores transmembrana, los llamados MCP (del inglés, *methyl-accepting chemotaxis protein*), que detectan el gradiente quimiotáctico en función del tiempo e

interaccionan con proteínas del citoplasma para modular el movimiento de los flagelos. Las células están equipadas con aproximadamente 10000 proteínas quimiorreceptoras, que forman amplias zonas de detección tanto en uno como en ambos polos de la célula y unen los ligandos a través de dominios periplásmicos N-terminal (Maddock y Shapiro, 1993, Sourjik y Berg, 2000, Wadhams *et al.*, 2000). Las secuencias de los dominios N-terminal varía significativamente de unas especies a otras e incluso de unos receptores a otros. Esta alta diversidad no es sorprendente ya que cada receptor debe unir distintos ligandos y cada especie puede tener nichos diferentes. Los dominios C-terminal de los quimiorreceptores son citoplásmicos y sus secuencias están altamente conservadas (Morgan *et al.*, 1993). En *E. coli* forman estables complejos ternarios con la histidina quinasa CheA (del sistema de dos componentes CheA/CheY-CheB) y CheW (Falke y Hazelbauer, 2001). Estos dominios citoplásmicos están sujetos a metilación y desmetilación por la metiltransferasa CheR y la metilesterasa CheB respectivamente, modulando su actividad.

El comportamiento natatorio de *E. coli* está dictado por la concentración intracelular de la forma fosforilada del regulador de repuesta CheY, el cual se une a la base del motor flagelar dirigiendo su rotación hacia la derecha (Figura 2) (Silversmith *et al.*, 2003). CheY es fosforilada en el aspartato 57 por su quinasa sensora CheA y es desfosforilada por la fosfatasa CheZ. La quinasa sensora CheA se asocia con la porción citoplásmica de quimiorreceptores transmembrana y se autofosforila, según sea la ocupación de los sitios extracelulares de unión de los receptores con moléculas atractantes o repelentes. Por su parte, CheZ interacciona con CheY mediante una doble interacción proteína-proteína que requiere la implicación de la hélice C-terminal de CheZ para acoplar ambas proteínas y la disposición de un sitio activo para la desfosforilación, lo que podría terminar con la señal quimiotáctica (Guhaniyogi *et al.*, 2008, Silversmith *et al.*, 2003). CheZ es la fosfatasa en *E. coli* pero muchas otras bacterias, entre las que se incluye *Bacillus subtilis*, usan miembros fosfatasa de la familia CheC-FliY-CheX para dicho propósito (Muff *et al.*, 2007). La maquinaria flagelar es sintetizada a través de una activación génica secuencial, iniciada por la expresión del regulador transcripcional FlhDC (Kalir *et al.*, 2001). Esta activación secuencial permite de forma ordenada y sincronizada la expresión y ensamblaje de los componentes del flagelo, que se compone de una compleja base y un filamento (Zaslaver *et al.*, 2004, Kalir *et al.*, 2001).

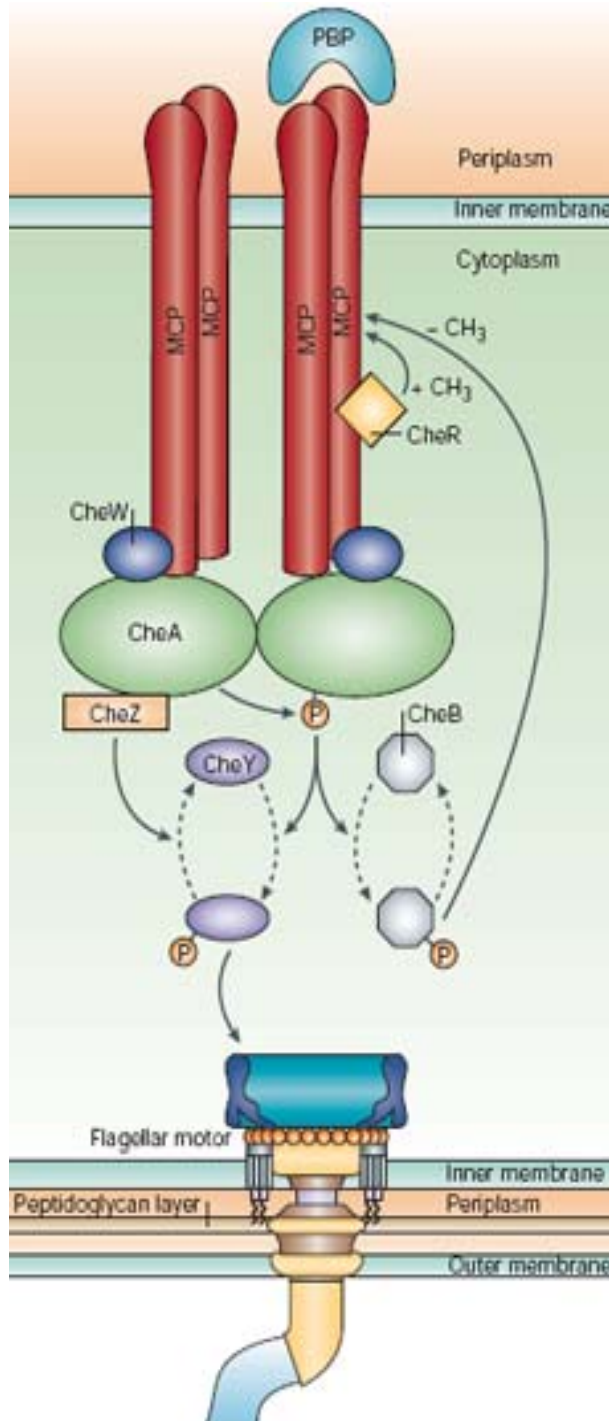


Figura 2. Esquema del sistema quimiosensor de *Escherichia coli*. En rojo se muestran dos dimeros de quimiorreceptores (MCPs), uno de los cuales está interaccionando con la proteína periplásmica de unión (PBP). Además, se muestra la interacción de dos monómeros de la proteína CheW y un dímero de CheA con el dominio citoplásmico de la MCP, aunque esta estequiometría no está aún del todo definida. Una disminución en la concentración del atrayente induce la *trans*-autofosforilación del dímero CheA, el cual fosforila al regulador de respuesta CheY. CheY-P se une al motor flagelar para cambiar la dirección de rotación. CheA también fosforila a otros reguladores de respuesta tales como la metiltransferasa constitutiva, CheB. CheB-P, compite con la metiltransferasa constitutiva, CheR, para controlar el grado de metilación de glutamatos específicos en las MCP. Esto resetea la señalización del receptor y permite de nuevo adaptarse a la concentración del atrayente para poder sentir nuevos cambios. La desfosforilación de CheY es acelerada por la fosfatasa CheZ. Figura tomada de Wadhams y Armitage, 2004.

La unión a los ligandos y la liberación de los quimiorreceptores resulta en cambios conformacionales que van a modular el estado de fosforilación de CheA. Un incremento en la concentración del atrayente, inhibe la autofosforilación de CheA, reduciéndose la concentración de CheY-P y por tanto la frecuencia de cambio de rotación del flagelo. Esto causa que la bacteria nade en esa dirección más tiempo. La fosforilación de CheB y por tanto su actividad también disminuyen, lo que permite a la metiltransferasa CheR incrementar la metilación de las MCPs. MCPs altamente

metiladas, están mucho más capacitadas para estimular la autofosforilación de CheA, incluso en la presencia continuada del quimioatrayente, así que esto devuelve a CheA a su estado previo al estímulo y la bacteria a su frecuencia habitual de cambios de dirección. También se ha propuesto un segundo nivel de organización, en base a estudios cristalográficos de fragmentos del quimiorreceptor y a estudios de *cross-linking* de mutantes en los receptores con sustituciones de cisteína, que podría estar compuesto por dos monómeros de CheW, un dímero de CheA y un trímero de receptores diméricos (Park *et al.*, 2006). Estos sistemas quimiotácticos, aunque en general tienen este funcionamiento, pueden ser más o menos complejos según la especie. En *B. subtilis*, CheR, CheB, CheV y CheC son proteínas que parecen ser importantes en el proceso de adaptación a la respuesta quimiotáctica (Karatan *et al.*, 2001, Kirsch *et al.*, 1993, Rosario *et al.*, 2005, Rosario *et al.*, 2006). Para dar lugar a esa adaptación, la metiltransferasa CheR y de la metilesterasa CheB añaden y retiran respectivamente grupos metilo de las MCP. La implicación de CheV y CheC aun no está clara. Se sugiere también que las interacciones cooperativas entre proteínas en los grupos de receptores juega un papel crucial en el procesamiento de la señal durante la quimiotaxis en bacterias (Sourjik, 2004).

Los transportadores de *p*-hidroxibenzoato en *P. putida* PRS2000 (Harwood *et al.*, 1994) y 2, 4-diclorofenoxiacetato en *Ralstonia eutropha* JMP123 (pJP4) (Hawkins y Harwood, 2002), codificados por los genes *pcaK* y *tfdK* respectivamente, se ha determinado que eran necesarios para la respuesta quimiotáctica hacia estos compuestos, aunque no está claro si estas proteínas son quimiorreceptores o si juegan un papel indirecto en la quimiotaxis. Estos genes son cotranscritos con los correspondientes genes catabólicos, expresándose solamente en presencia del substrato atrayente. Recientemente se ha identificado a la proteína NbaY, homóloga del quimiorreceptor NahY, como el primer quimiorreceptor del metabolismo de nitroaromáticos en *Pseudomonas fluorescens* KU-7 (Iwaki *et al.*, 2007). En este caso también se cotranscribe con sus respectivos genes catabólicos el gen *nbaY*, que se encuentra en 3' respecto al gen *nbaA*, que codifica la 2-nitrobenzoato nitroreductasa necesaria para la degradación de 2-nitrobenzoato.

Entre los mutantes sensibles a disolventes orgánicos aislados tanto en la cepa *P. putida* S12 como en *P. putida* DOT-T1E, se encontraron mutaciones en la ruta de biosíntesis del flagelo. En el caso de la cepa S12, tanto mutaciones en proteínas estructurales del flagelo, en el activador transcripcional FleQ como en el factor sigma FliA de la ARN polimerasa específico para los genes del flagelo, dieron una disminución de la expresión de los genes *srpABC* (genes de eflujo de disolventes), resultando en una reducción de la tolerancia hacia disolventes orgánicos (Kieboom *et al.*, 2001). La relación entre motilidad y tolerancia a tolueno ha sido investigada en la cepa DOT-T1E y el resultado obtenido indica que el aparato de exportación flagelar juega directa o indirectamente un papel en la tolerancia a tolueno (Segura *et al.*, 2001, Segura *et al.*, 2004).

2. *Pseudomonas putida*

Pseudomonas putida, es una de las especies de mayor interés industrial entre las bacterias del género *Pseudomonas*, ya que unido a su potencial de degradación de compuestos aromáticos y xenobióticos, presenta la capacidad de colonizar el sistema radicular de plantas, formar biopelículas y de ser manejable desde el punto de vista genético. Desde mediados de los años 80, especies del género *Pseudomonas* están siendo aplicadas a semillas de cereales y a suelos para prevenir el crecimiento o colonización de patógenos, en lo que ha venido a llamarse biocontrol (Berg *et al.*, 2001, Renault *et al.*, 2007, Keane *et al.*, 2008). Una de las cepas mejor estudiadas en este sentido es *P. putida* KT2440, derivada de la cepa *P. putida* mt-2 aislada originalmente en Japón (Nakazawa, 2002, Williams and Murray, 1974). Esta última porta el plásmido TOL, pWW0, que codifica una de las rutas de degradación de tolueno y xilenos mejor caracterizadas en el ámbito de la biodegradación. En 1981 el comité de ADN recombinante de los Institutos de la Salud de EEUU certificó que la cepa *P. putida* KT2440 curada del plásmido TOL no es patógena para animales y plantas, y se puede considerar como un hospedador seguro en la clonación de genes de bacterias del suelo.

El genoma completo de *P. putida* KT2440 se encuentra disponible en bases de datos de libre acceso, lo que constituye una herramienta muy valiosa para el análisis funcional de la información genética del microorganismo (Nelson *et al.*, 2002). Otras

cepas de *Pseudomonas* cuyos genomas han sido secuenciados son: *P. aeruginosa* PAO1 (2000), *P. fluorescens* Pf-5 (2005), *P. syringae* DC3000 (2003), *P. syringae* B728a (2005), *P. syringae* 1448A (2005), *P. fluorescens* PfO-1, *P. entomophila* L48 y *P. aeruginosa* PH7. Otra cepa que se ha secuenciado recientemente es *P. putida* F1 (2007), cuyo genoma comprende 6.2 Mb. *P. putida* F1 fue aislada de una cala contaminada en Urbana, Illinois (EEUU) mediante enriquecimiento con etilbenceno como única fuente de carbono y energía. Esta cepa es una de las mejor estudiadas en el campo de la degradación de hidrocarburos por bacterias. Se han escrito alrededor de 200 artículos sobre varios aspectos de la fisiología, de la enzimología, y de la genética del *P. putida* F1 tanto por los microbiólogos y los bioquímicos, además de estudios más aplicados llevados a cabo por los químicos y los ingenieros ambientales que utilizaban *P. putida* F1 y sus enzimas para los usos en biorremediación. Además de degradar tolueno, benceno y *p*-cimeno, el amplio espectro de sustratos de la tolueno dioxigenasa, hace que F1 pueda oxidar tricloroetileno (TCE), indol, nitrotoluenos, clorobencenos, clorofenoles y muchos otros sustratos aromáticos (Zylstra y Gibson, 1991). Aunque *P. putida* F1 no puede utilizar TCE como fuente de carbono y energía, es capaz de degradar y desintoxicar TCE en presencia de una fuente de carbono adicional.

Los estudios realizados sobre la tolerancia a hidrocarburos en *Pseudomonas* se han llevado a cabo principalmente en tres cepas de *Pseudomonas putida*: *P. putida* S12, que degrada estireno (Hartmans *et al.*, 1990) y las cepas degradadoras de tolueno *P. putida* F1 (Gibson *et al.*, 1990) y *P. putida* DOT-T1E (Ramos *et al.*, 1995). Curiosamente, tanto en la cepa DOT-T1E como en la cepa F1, la expresión de los genes necesarios para el catabolismo del tolueno están bajo el control de un sistema regulador de dos componentes, TodS/TodT, muy similar al descrito en la cepa S12 para el control del catabolismo de estireno, StyS/StyR (Laut *et al.*, 1997, Mosqueda *et al.*, 1999, Velasco *et al.*, 1998). Además, ambos sistemas reguladores, TodS/TodT y StyS/StyR, responden a tolueno y estireno (Alonso *et al.*, 2003, Cho *et al.*, 2000, Mosqueda *et al.*, 1999).

2.1. *Pseudomonas putida* DOT-T1E

Pseudomonas putida DOT-T1E es una cepa resistente a rifampicina derivada de la cepa tolerante a disolventes *P. putida* DOT-T1 que se aisló de la planta de tratamiento de aguas residuales de Granada por la doctora Duque en el año 1995 (Ramos *et al.*, 1995). El tolueno y otros disolventes como benceno, estireno y xilenos, con un coeficiente de partición en la mezcla octanol-agua ($\log P_{o/w}$ value) entre 1.5 y 4, son extremadamente tóxicos para las células porque se acumulan en la membrana citoplásmica, desorganizando su estructura e impidiendo realizar sus funciones vitales (de Smet *et al.*, 1978, Sikkema *et al.*, 1992). *Pseudomonas putida* DOT-T1E es altamente tolerante a disolventes orgánicos gracias a la disminución de la concentración de los disolventes en el interior celular, lo que se consigue mayormente limitando la entrada del disolvente mediante bombas de eflujo de la familia RND (del inglés, Resistance-Nodulation-cell Division) que expulsan los tóxicos hacia el exterior (Ramos *et al.*, 2002). Este papel es desempeñado fundamentalmente por la bomba de eflujo TtgGHI, que es una de las tres bombas de eflujo que se han encontrado en esta cepa (Rojas *et al.*, 2001). Las otras dos bombas de eflujo son TtgABC y TtgDEF. TtgABC presenta al igual que TtgGHI un mayor espectro de especificidad de sustratos, extruyendo además de disolventes, antibióticos como cloranfenicol y tetraciclina, mientras que TtgDEF está principalmente implicada en la extrusión de compuestos aromáticos (Duque *et al.*, 2001, Mosqueda *et al.*, 1999, Mosqueda *et al.*, 2000, Rojas *et al.*, 2001). La tolerancia de esta cepa frente al tolueno y otros compuestos altamente tóxicos de similar naturaleza implica dos tipos de respuesta. Una a corto plazo basada en el incremento de la rigidez de la membrana celular mediante la rápida transformación al ácido graso insaturado ácido 9-*cis*-hexadecenoico (C16:1,9 *cis*) en su isómero *trans* (Juntter, Ramos *et al.*, 1999). La respuesta a largo plazo implica además de los cambios en ácidos grasos, alteraciones en el nivel de los grupos de cabeza polares de los fosfolípidos donde la cardiolipina aumenta en detrimento de la fosfatidiletanolamina (Bernal *et al.*, 2007). Ambas respuestas conllevan el aumento de rigidez de la membrana celular, y por tanto, una barrera física que dificulta la entrada de los disolventes al interior celular.

2.1.1. Ruta TOD

Pseudomonas putida DOT-T1E es capaz de usar el tolueno, benceno y etilbenceno como única fuente de carbono y energía a partir de la ruta TOD. El primer paso de esta ruta se lleva a cabo por la tolueno dioxigenasa, enzima heteromultimérica codificada por los genes *todC1C2BA*. La tolueno dioxigenasa consta de tres elementos funcionales que son: una flavoproteína con actividad reductasa, codificada por el gen *todA*, una ferredoxina codificada por el gen *todB* y un tercer componente constituido por una proteína con hierro y azufre que posee, una subunidad grande (*todC1*) y otra pequeña (*todC2*) (Gibson *et al.*, 1990), cuyo papel es atacar el anillo de tolueno. Tras la formación del *cis*-tolueno dihidrodiol, la enzima *cis*-dihidrodiol deshidrogenada (codificada por el gen *todD*) reduce NAD^+ a NADH y oxida el *cis*-tolueno dihidrodiol a 3-metilcatecol. La enzima 3-metilcatecol 2,3-dioxigenasa, codificada por el gen *todE*, transforma al 3-metilcatecol en 2-hidroxi-6-oxohepta-2,4-dienoato (HOHD). Los genes *todFGIH* codifican las enzimas necesarias del paso del HOHD hasta piruvato y acetil-CoA.

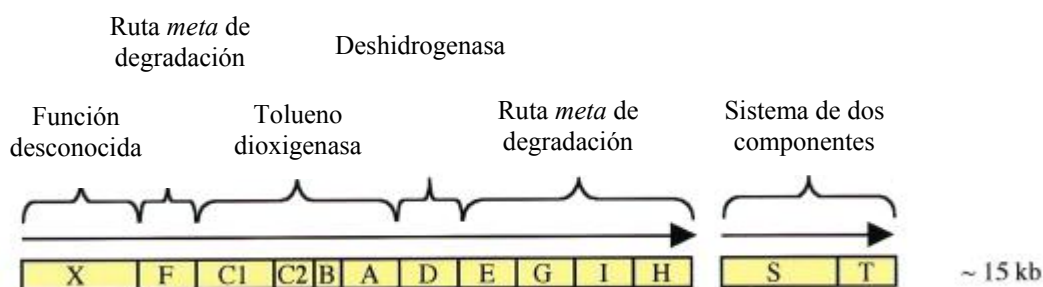


Figura 3. Genes implicados en la regulación y degradación de tolueno.

Wang y colaboradores (1995) y Mosqueda y colaboradores (1999), identificaron un promotor en 5' respecto al gen *todX* denominado P_{todX} , cuya regiones -10 y -35 mostraron homología con promotores de *Pseudomonas putida* dependientes de sigma 70 (Domínguez-Cuevas y Marqués, *Pseudomonas* Vol. 2). La expresión de este promotor es inducible y consta de tres regiones, el sitio de unión de la ARN polimerasa, una región rica en AT en la zona de -40 y una secuencia invertida (ATAAAGTTTAT) alrededor del sitio -120, el cual se consideró el sitio de unión de TodT (Lau *et al.*, 1997). Se ha visto que la expresión del promotor P_{todX} tiene lugar en presencia de tolueno, etilbenceno, xilenos, estireno y otros hidrocarburos aromáticos, aunque el tolueno siempre ha resultado ser el mejor inductor.

2.1.2. Sistema de dos componentes TodS/TodT

En 3^o respecto al gen *todH*, se ha encontrado un operón bicistrónico, *todST*, cuyos productos génicos activan la expresión de la ruta de degradación de tolueno en *P. putida* F1 así como en *P. putida* DOT-T1E, siendo la expresión del promotor que controla los genes *todST* constitutiva (Mosqueda *et al.*, 1999). Los genes *todS* y *todT* codifican dos proteínas que muestran alta similitud con miembros de la superfamilia de los sistemas de transducción de señales de dos componentes encontrados tanto en procariontes como en eucariotes (Appleby *et al.*, 1996; Parkinson y Kofoid, 1992; Reizer y Saier, 1997, Ulrich *et al.*, 2005).

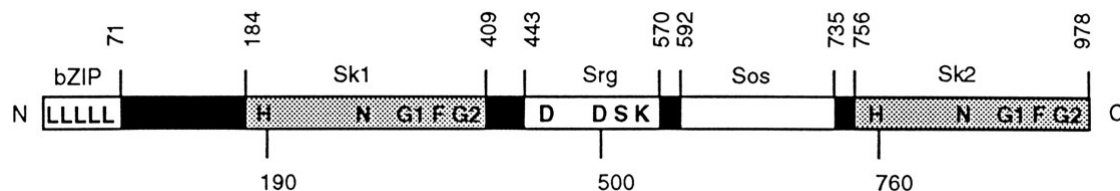


Figura 4. Representación esquemática de TodS. bZIP se caracteriza por la repetición de leucinas (L) y por estar precedido por aminoácidos cargados positivamente. Sk1 y Sk2 son dos dominios histidina quinasa que conservan en su secuencia el siguiente bloque de aminoácidos: **H** (HE-PL), **N** (Q-N-NA), **G1** (D-G-G), **F** (F-PF) y **G2** (G-GLGL) (Parkinson y Kofoid, 1992). Srg es el dominio regulador interno y contiene los residuos conservados DDSK característicos de los reguladores de respuesta en bacterias (Volz, 1993). Las histidinas (H) 190 y 760 y el aspartato (D) 500, son los posibles aminoácidos de TodS implicados directamente en la fosforilación. El dominio Sos presenta similitud de secuencia con el dominio sensor de oxígeno de la proteína FixL de *Rhizobium meliloti* (Lois *et al.*, 1993) y similares en *Azorhizobium caulinodans* (AcORF1) (Kahn, 1993). Figura según Lau y colaboradores, 1997.

TodS es una proteína de 108 kDa que muestra similitud con las proteínas sensoras híbridas histidina-quinasa, en particular a StyS (41% de identidad), TutC (49% de identidad), TmoS (82% de identidad) y BpdS que regulan la degradación aeróbica de estireno en *Pseudomonas* sp. Y2 (Velasco *et al.*, 1998), catabolismo anaeróbico de tolueno en *Thauera aromatica* T1 (Coschigano y Young, 1997), catabolismo aeróbico de tolueno en *Pseudomonas mendocina* KR1 (Ramos-González *et al.*, 2002) y bifenilo y policlorobifenilo por *Rhodococcus* sp. M5 (Labbè *et al.*, 1997) respectivamente. La principal característica de estas proteínas que las convierte únicas entre los sistemas de dos componentes bacterianos es la presencia doble de un motivo histidina-quinasa. Se ha propuesto que la presencia de este motivo duplicado histidina-quinasa, implica el funcionamiento de ésta como un sensor que responde tanto a la presencia de tolueno como a estrés oxidativo, aunque existen otras posibilidades que aún no se han estudiado. El extremo amino terminal de TodS (aminoácidos 1 a 71) se asemeja a la región básica

de la cremallera de leucina (bZIP, del inglés *basic region leucine zipper*) que interviene en la dimerización y unión a ADN en determinadas proteínas (Lau *et al.*, 1997). Si bien este dominio es común entre factores transcripcionales de eucariotas, rara vez se ha encontrado en procariotas (Hurst, 1994). Este motivo bZIP consiste en una región con varios residuos básicos que probablemente contactan con el ADN y cuatro leucinas cada siete aminoácidos. Evidencias indirectas sugieren que en TodS, esta cremallera de leucina media la dimerización, la cual sería necesaria para una posible unión al ADN, tal y como se ha propuesto por Lau y colaboradores (1997). TodS contiene además un dominio receptor interno y dos posibles dominios de entrada de señal, consistentes en los dominios PAS. Si bien estos dominios de TodS son candidatos a recibir la señal, no hay evidencias experimentales que demuestren que la proteína TodS sensa directamente las moléculas inductoras.

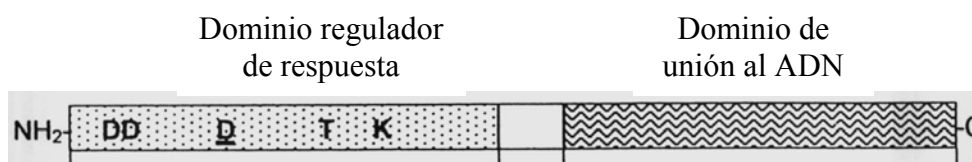


Figura 5. Representación esquemática de TodT. En el dominio de regulador se presentan los aminoácidos conservados típicos del dominio regulador de respuesta en bacterias. El aspartato D, es el que se supone implicado en recibir el grupo fosfato de la histidina quinasa.

El gen *todT* codifica una proteína de 23 kDa (206 aa) que muestra una considerable similitud con los principales reguladores de respuesta de los sistemas de dos componentes, como por ejemplo los reguladores de respuesta StyR (Velasco *et al.*, 1998, Leoni *et al.*, 2003), TmoT (Ramos-González *et al.*, 2002) y TutB (Coschigano y Young, 1997) asociados con las histidina quinasa StyS, TmoS y TutC, respectivamente. El análisis de la secuencia de TodT indica que esta proteína está formada por un dominio receptor N-terminal que acepta el grupo fosforilo que le transfiere el sensor TodS una vez fosforilado. Estos reguladores parecen contener una cavidad ácida con tres residuos Asp que permiten la recepción del grupo fosforilo (Baikalov *et al.*, 1996; Parkinson y Kofoid, 1992; Volz, 1993). El extremo carboxilo de TodT contiene una secuencia que tiene 17 de los 19 residuos consenso de la región de unión a ADN de los miembros de la familia de reguladores LuxR/FixJ (Pao y Saier, 1995; Reizer y Saier, 1997) también conocido como dominio HTH. Aparentemente un elemento de unión tipo “linker Q” (Wootton y Drummond, 1989) sería responsable de la unión entre el dominio receptor de la señal y el módulo de unión a ADN. La forma

fosforilada de TodT al parecer activa la expresión de los genes estructurales del operón *tod* (Lau *et al.*, 1997).

Está claro es que el sistema formado por los genes *todST* interviene en la regulación de la expresión del operón *tod*, aunque todavía no se ha determinado el mecanismo de acción de este sistema. La quinasa híbrida TodS uniría ATP para autofosforilarse en presencia de tolueno en alguna de las dos posibles histidinas conservadas, H-190 y la H-760. TodT como regulador de respuesta seguramente recibiría el grupo fosforilo de la proteína sensora en el aspartato conservado 57 para posteriormente mediar la activación de la transcripción del promotor P_{todX} . Aunque hay evidencias bioquímicas que soportan esta hipótesis (Lau *et al.*, 1997), apenas hay evidencias *in vivo* que soporten esta idea. Además, el comportamiento fisiológico de este sistema bajo diferentes condiciones de cultivo así como los mecanismos precisos mediante el cual la presencia de tolueno conduce a cambios en la expresión de los genes *tod in vivo* aun no se ha terminado de esclarecer.

3. Sistemas de dos componentes

Los sistemas de transducción de señales de dos componentes constituyen el principal mecanismo mediante el cual las bacterias contienen y responden a los cambios ambientales (Hoch y Silhavy, 1995, Stock *et al.*, 2000, Ulrich *et al.*, 2005). Mediante estos sistemas las bacterias detectan fluctuaciones en condiciones tanto físicas como químicas del entorno bacteriano lo que frecuentemente conlleva cambios en la expresión génica que aumentan las posibilidades de supervivencia. Estos sistemas están presentes en la mayoría de los procariotas y algunas arqueas, también en eucariotas como plantas, hongos y levaduras (West y Stock, 2001, Wadhams y Armitage, 2004), aunque en estos últimos predominan las Ser/Thr/Tyr quininas. Los sistemas de dos componentes regulan diversas respuestas en diferentes organismos entre los que se incluyen: adquisición de nutrientes: nitrógeno, fósforo y carbono; metabolismo energético; virulencia: transferencia de plásmidos, producción de toxinas, factores de adherencia; adaptación a condiciones físicas o químicas del ambiente: pH, osmolaridad, luz; complejas rutas de desarrollo: quimiotaxis, esporulación y producción de células

natatorias (Calva y Oropeza, 2006, Foussard, *et al.*, 2001, Skerker *et al.*, 2005, Stock *et al.*, 2000).

Los genes que codifican las proteínas de sistemas de dos componentes están presentes en casi todas las bacterias y constituyen normalmente menos del 1% de sus genomas (Ulrich *et al.*, 2005, Ashby 2004). En *E. coli* hay 30 histidinas quinazas y 32 reguladores de respuesta (Mizuno T., 1997). Sin embargo, el número de sistemas de dos componentes varía según la especie. Desde cero en *Mycoplasma genitalium* hasta los 80 encontrados en especies de *Synechocystis*, en los que estas proteínas constituyen aproximadamente el 2.5% del genoma (Mizuno *et al.*, 1996). En contra de los cientos de proteínas de sistemas de dos componentes identificados en procariotas, solamente unos pocos se han encontrado en eucariotas. Sin embargo, en eucariotas la mayoría de las histidina quinazas son exclusivamente híbridas.

Los primeros ejemplos de sistemas de dos componentes vinieron del estudio de los sistemas: EnvZ/OmpR, osmorregulación en *E. coli*; PhoR/PhoB, metabolismo de fosfato en *E. coli*; NtrB/NtrC, asimilación de nitrógeno en varias bacterias; DctB/DctD, transporte dicarboxilato en *Rhizobium leguminosarum*; VirA/VirG, virulencia por *Agrobacterium tumefaciens*. Comparando la secuencia de los reguladores de respuesta OmpR, PhoB, NtrC, DctD y VirG se determinó un segmento de unos 125 aminoácidos que se podía considerar conservado entre estas proteínas. También se encontró conservado en las proteínas Spo0A y Spo0F implicadas en esporulación así como en CheY y CheB implicadas en quimiotaxis. Posteriormente se descubrió que un segundo, aunque diferente segmento homólogo estaba presente entre las histidina quinazas: EnvZ, PhoR, NtrB, DctB y VirA así como probablemente en CheA.

Tras notar que estas proteínas reguladoras trabajaban en parejas, estos motivos homólogos entre proteínas se consideraron mediadoras en un evento de transducción de señal mediante algún tipo de mecanismo bioquímico se suponía conservado. Al mismo tiempo que se formulaba esta hipótesis, se descubrió que la proteína NtrB era aparentemente una quinasa que fosforilaba a NtrC, y que NtrC fosforilada era la forma activa del regulador que estimulaba la transcripción (Ninfa y Magasanik, 1986). Para distinguir estos sistemas, en los que la función sensora reside en otro polipéptido diferente del regulador de respuesta, de los clásicos sistemas de un componente, en los

que la función sensora y de respuesta reside en la misma proteína, la expresión de los dos componentes se usó en el título del primer artículo que describía esta hipótesis (Nixon *et al.*, 1986). En el caso de sistemas de transducción de señales de dos componentes implicados en la degradación de compuestos aromáticos en bacterias, el primero descrito fue el sistema TodS/TodT de *Pseudomonas putida* F1 (Lau *et al.*, 1997).

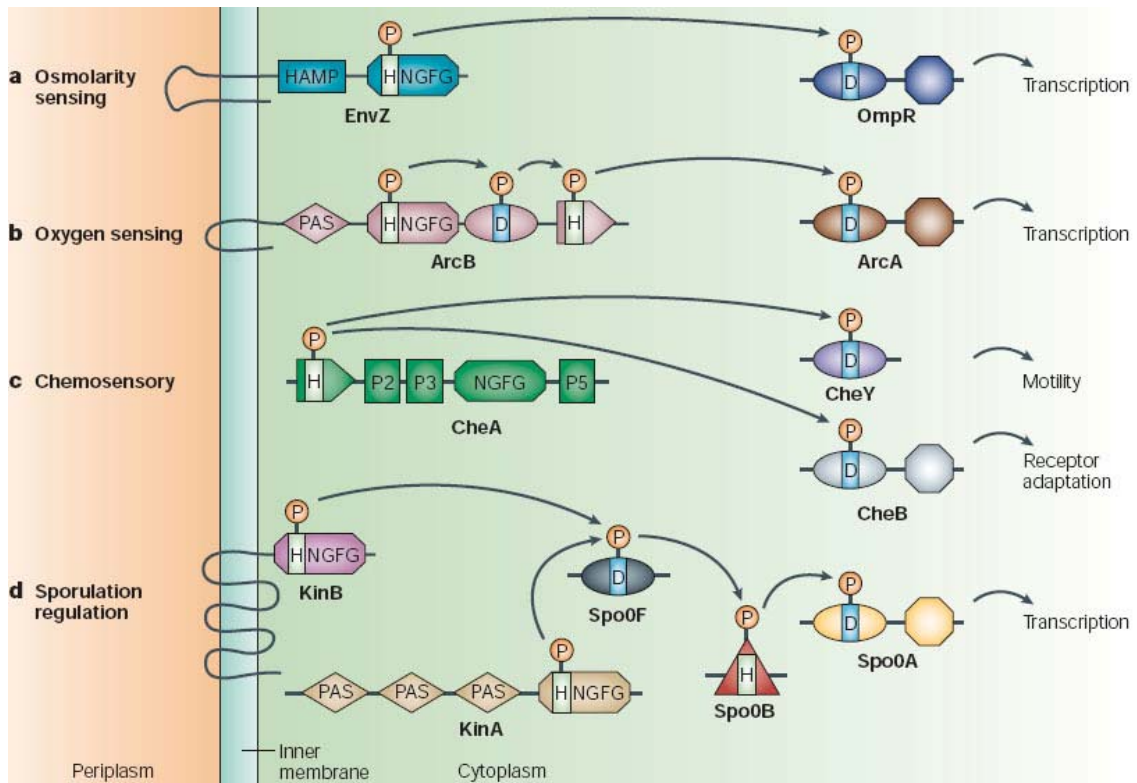


Figura 6. Representación esquemática de la organización modular de los sistemas de dos componentes más representativos. a) El sistema EnvZ/OmpR de *Escherichia coli* responde a cambios de osmolaridad y está implicado en la regulación de la expresión de dos proteínas de membrana externa, OmpF y OmpC. b) El sistema ArcB/ArcA de *E. coli* está formado por ArcB una proteína unida a membrana que sensa cambios en el estado redox de los componentes de la cadena respiratoria de transporte de electrones a través de su dominio PAS. El grupo fosforilo es transferido desde la histidina del dominio quinasa a un determinado aspartato en su dominio regulador interno, de aquí se transfiere al dominio fosfotransferasa C-terminal, para posteriormente, fosforilar al regulador transcripcional ArcA. ArcA regula la expresión génica en condiciones de microaerobiosis. c) CheA y CheB están implicados en la respuesta quimiosensora de *E. coli*. CheA es una proteína dimérica y soluble que sensa los cambios en el exterior de la célula a través de quimiorreceptores transmembrana, lo que induce su auto-transfosforilación. Son dos los reguladores de respuesta que compiten por este grupo fosforilo: CheY, que se une y controla al motor flagelar y CheB, que controla la adaptación de los quimiorreceptores. d) Parte del complejo sistema que regula la esporulación en *Bacillus subtilis*. Spo0F es regulado por dos histidina quinasa, una tiene múltiples dominios transmembrana (KinB), la otra es soluble y presenta numerosos dominios PAS (KinA). Spo0F fosforila indirectamente a Spo0A (regulador transcripcional) Spo0B mediante.

Estos sistemas están formados como su nombre indica por dos proteínas: una histidina quinasa que detecta las señales del medio ambiente, y un regulador de respuesta que en la mayoría de los casos es un regulador transcripcional, cuya actividad es controlada por la primera (Laub y Goulian, 2007). Los sistemas de dos componentes

transducen la señal frecuentemente por medio de un mecanismo de fosforilación/desfosforilación (Kleerebezem *et al.* 1997, Laub *et al.*, 2007). La histidina quinasa transfiere el grupo fosforilo al regulador de respuesta en una reacción catalizada por el regulador de respuesta. El equilibrio de la primera reacción está favoreciendo el estado no fosforilado de la proteína. A diferencia de la típica cascada de las quinasas, en las que una proteína fosforila a múltiples proteínas, en los sistemas de dos componentes, el regulador de respuesta transfiere estequiométricamente el grupo fosforilo desde la histidina fosforilada en la histidina quinasa a un residuo de aspartato conservado en su dominio regulador. Por lo tanto, el control en un sistema de dos componentes está ligado a la habilidad de la histidina quinasa de regular el estado de fosforilación de su regulador de respuesta. Los dominios reguladores de los reguladores de respuesta se encuentran en equilibrio entre dos estados conformacionales, inactivo y activo. La fosforilación del regulador deriva el equilibrio hacia la forma activa. Además de dirigir la reacción de fosforilación, muchas histidina quinasa poseen actividad fosfatasa, lo que les permite desfosforilar a sus respectivos reguladores de respuesta.

1. Autofosforilación: $\text{HK-His} + \text{ATP} \leftrightarrow \text{HK-His}\sim\text{P} + \text{ADP}$
2. Transfosforilación: $\text{HK-His}\sim\text{P} + \text{RR-Asp} \leftrightarrow \text{HK-His} + \text{RR-Asp}\sim\text{P}$
3. Defosforilación: $\text{RR-Asp}\sim\text{P} + \text{H}_2\text{O} \leftrightarrow \text{RR-Asp} + \text{P}_i$

Figura 7. Reacciones de la transducción del grupo fosforilo. El mecanismo de transducción de señal del grupo fosforilo en los sistemas de dos componentes conlleva tres reacciones de fosfotransferencia y al menos dos proteínas como intermediarios. En primer lugar, el grupo fosforilo en posición γ del ATP es transferido a la histidina conservada de la histidina quinasa. Posteriormente, el regulador cataliza la transferencia de dicho grupo fosforilo de la histidina al aspartato conservado dentro de su propio dominio regulador. Finalmente, el grupo fosforilo es transferido desde el aspartato fosforilado a agua en una reacción de hidrólisis. Las tres reacciones requieren la presencia de iones metálicos divalentes, siendo presumiblemente el Mg^{2+} el catión relevante *in vivo*.

Si bien esta es la definición clásica de sistemas de dos componentes, se han descrito distintos tipos de complejidad entre los mismos (Parkinson *et al.*, 1992, Mascher *et al.*, 2006). La cascada de fosforilación también puede diferir de unos sistemas a otros incluyendo proteínas reguladoras adicionales y dominios fosfotransferasa y dominios fosfatasa. Los análisis filogenéticos sugieren que las histidina quinasas eucariotas evolucionaron a partir de un único organismo procarionta representado por un grupo de histidina quinasas híbridas bacterianas (BarA, RcsC, ArcB). La localización y la posición relativa de los dominios codificados dentro de los genes de sistemas de dos componentes afecta a la función (y por tanto a su retención) de las quinasas híbridas resultado de la fusión génica (Cock y Whitworth, 2007). Los

reguladores de respuesta procarióticos son predominantemente factores de transcripción (al menos 25 de 32 en *E. coli*), mientras que solo se conoce un caso en eucariotas (*S. cerevisiae* SKN7).

A pesar de que los sistemas de dos componentes son la principal ruta de señalización en eubacteria y que desde mediados de los años 90 se ha incrementado el número de rutas de degradación de hidrocarburos reguladas por sistemas de dos componentes en procariotas, en la regulación de genes para la degradación de compuestos aromáticos solo se han visto implicados en la degradación de tolueno y estireno en varias cepas de *Pseudomonas* (O' Leary, 2002, Panke, 1999, Santos, 2000, Velasco *et al.*, 1998, Lau *et al.*, 1997, Ramos-González *et al.*, 2002), de degradación de bifenilo en *Hrodococcus* sp. M5 (Labbè *et al.*, 1997), y la degradación anaerobia de tolueno en las cepas desnitrificantes *Thauera* T1 y *T. aromatica* K172 (Leuthner, 1998, Coschigano, *et al.*, 1997).

3.1. Quinasas sensoras

Las proteínas sensoras pertenecen a la familia de proteínas histidina quinasa (HPK). Este tipo de proteínas son las sensoras de algún tipo de estímulo ambiental y su función esencial es la de autofosforilarse y transferir el fosfato al correspondiente segundo miembro de la pareja (Khorchid y Ikura, 2006, Foussard *et al.*, 2001). El tamaño de las histidina quinasas oscilan normalmente entre los 40 y los 110 kDa aunque las hay mayores como es el caso de la proteína BpdS, de 170 kDa implicada en la degradación de bifenilo.

La mayoría de las histidina quinasas tienen una región N-terminal que atraviesa dos veces la membrana, generando un dominio periplásmico que puede sensar señales extracelulares. La secuencia de este dominio sensor, varía en longitud y en aminoácidos de unas proteínas a otras. Esta diversidad probablemente refleja el amplio espectro de estímulos ambientales que elicitó respuestas reguladoras específicas en las bacterias. Dicho dominio sensor normalmente está localizado en el extremo amino terminal, inmerso en el espacio periplásmico, aunque algunas histidina quinasas de membrana, lo presentan en el citoplasma. Algunas histidina quinasas carecen de dominios

periplásmico y transmembrana, como es el caso de CheA y NtrB. CheA interacciona con receptores transmembrana, mientras que NtrB interacciona con sensores citoplásmicos. Algunas otras histidina quinasa transmembrana, tienen varias regiones transmembrana, como PrrB y KinB, que presentan cuatro y seis hélices transmembrana respectivamente (Ma *et al.*, 1997, Potter *et al.*, 2006). Otras histidina quinasa tienen varios dominios citoplásmicos, como es el caso de ArcB, que tiene un dominio PAS, un dominio regulador de respuesta y un dominio fosfotransferasa citoplásmicos. Atendiendo a esta mayor complejidad de dominios estructurales y funcionales, las histidina quinasa se pueden clasificar en varias subfamilias: las clásicas u ortodoxas, y las híbridas. Frente a las histidina quinasa sensoras clásicas, de la que EnvZ es representativa, las histidina quinasa híbridas, se encuentran solamente en algunos procariontes y en la mayoría de los sistemas eucariotas, constituyen el resto de histidina quinasa y contienen múltiples sitios donadores y aceptores de grupos fosfato. ArcB de *E. coli*, implicada en el control del sistema redox anóxico, es un modelo representativo de la mayoría de las histidina quinasa híbridas (Ishige K, Nagasawa S, Tokishita S, Mizuno T. 1994). La gran diversidad de quinasa híbridas está representada por TodS (Lau *et al.*, 1997). Los dos dominios histidina quinasa que posee TodS, pertenecen a diferentes familias, la 1ª y la 4 respectivamente (Grebe y Stock, 1999), lo que indica que no son el resultado de una duplicación génica, sino probablemente derivan a partir de la fusión de dos genes distintos que codificaban distintas histidina quinasa. Estas proteínas o dominios adicionales ofrecen un mayor control de la transducción de la señal y por tanto de la ruta de regulación. Se ha sugerido que la mayor complejidad de estos sistemas de regulación sobre un sistema de dos componentes puede ser el resultado de la necesidad de integrar en una misma ruta de regulación las señales positivas y negativas del sistema (Djordjevi y Stock, 1998).

La región citoplásmica C-terminal comprende un dominio de unión o también conocido como HAMP (del inglés, histidine kinases, adenylyl cyclases, metil-binding proteins and phosphatases domain), un dominio de dimerización y un dominio quinasa que interacciona con su respectivo regulador de respuesta. El núcleo quinasa, tiene unos 350 aminoácidos y es donde se une el ATP y se dirige la transfosforilación. Este dominio tiene cinco motivos conservados conocidos como las cajas H, N, G1, F y G2 (Parkinson y Kofoid, 1992, Swanson *et al.*, 1994). La histidina que recibe el grupo fosforilo del ATP está localizada en la parte central de la caja H, mientras que las cajas

N, G1, F y G2 definen nucleotide binding cleft y la actividad catalítica. En la mayoría de las histidina quinasa la caja H forma parte del dominio de dimerización. Las otras cuatro cajas están generalmente contiguas aunque el espacio entre los motivos es variable.

Las histidina quinasa son catalíticamente similares a las Ser/Thr/Tyr quinasa, aunque difieren desde el punto de vista químico. Estas quinasa crean fosfoésteres mientras que las histidina quinasa crean fosforamidatos. La hidrólisis de estos últimos tiene una mayor energía libre negativa que la de los fosfoésteres, y su uso en los sistemas biológicos es diferente (Stock *et al.*, 1990). El empaquetamiento del dominio catalítico es único y diferente del que tiene lugar en las Ser/Thr/Tyr quinasa (Ninfa *et al.*, 1987). La mayoría de las quinasa actúan en forma dimérica y se ha demostrado que la fosforilación de la histidina del sitio activo ocurre en *trans* dentro del dímero (Ninfa, *et al.*, 1993 y Swanson *et al.*, 1993, Surette *et al.*, 1996). La fosforilación de la His puede tener lugar tanto la posición N1 como en la N3 del anillo de imidazol, sin embargo, en todas las histidina quinasa caracterizadas hasta ahora, solo se ha observado la fosforilación en el N3. Se han descrito varios dominios para las histidina quinasa, siendo los más frecuentes los dominios PAS (la proteína period clock de *Drosophila* (PAR), vertebrate aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator (ARNT), y *Drosophila* single-minded protein (SIM)), GAF y HAMP (del inglés, *histidina kinase*, *adenyl cyclase*, *MCP* y *phosphatase*, o *P-type linker*).

3.2. Reguladores de respuesta

En la mayoría de los sistemas procariontes, los reguladores de respuesta de los sistemas de dos componentes constituyen el elemento final de la ruta de transducción de la señal, funcionando como mecanismos activados por fosforilación que ejecutan respuestas adaptativas. El regulador de respuesta cataliza la transferencia del grupo fosforilo desde la histidina fosforilada de la histidina quinasa a un aspartato en su dominio regulador. El tamaño medio de los reguladores de respuesta es de unos 25 kDa y normalmente comparten un mismo tipo de dominio amino terminal, denominado dominio receptor, que incluye el aspartato que recibe el fosfato de la proteína sensora correspondiente. El dominio C-terminal, presenta mayor variabilidad y suele estar

implicado en unión al ADN. Este tipo de proteínas reguladoras, frecuentemente, tras fosforilarse, actúan como activadores de la transcripción de ciertos operones. Los reguladores que actúan como activadores de la transcripción suelen incluir un dominio carboxilo terminal constituido por un motivo hélice-giro-hélice, capaz de interactuar con ciertas secuencias de ADN, activando o reprimiendo la transcripción de determinados genes (Stock *et al.*, 2000). Según sea el dominio C-terminal de la proteína, los reguladores de respuesta se pueden clasificar fundamentalmente en tres subfamilias atendiendo a su similitud con los dominios C-terminal de las proteínas OmpR, NarL o NtrC de *E. coli*. Respecto al catabolismo de compuestos aromáticos, son tres las familias de reguladores: LysR, Sigma54/NtrC y AraC/XylS (Ramos *et al.*, 1990).

Se han identificado y clasificado en base a la organización de sus dominios, 4610 reguladores de respuesta codificados en el genoma de 200 especies de bacterias y arqueas (Galperin 2006). Las familias de reguladores transcripcionales OmpR, NarL y NtrC, comprenden casi el 60% de los reguladores de respuesta, mientras que los reguladores transcripcionales con otros dominios de unión tales como LytTR, AraC, Spo0A, Fis, YcbB, RpoE y MerR, conforman un 6% del total. El resto está representado por el dominio REC (dominio aceptor de grupos fosfato de tipo CheY, aproximadamente el 14%) y por dominios enzimáticos (GGDEF, EAL, HD-GYP, CheB, CheC, PP2C y HisK), de unión a ARN (ANTAR y CsrA), de unión a ligandos o proteínas (PAS, GAF, TPR, CAP_ED y HPT) y a nuevos dominios de función desconocida (Galperin 2006). La lista completa de estos reguladores estudiados está disponible en http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Complete_Genomes/RRcensus.html. La combinación entre la abundancia y la diversidad estructural de los dominios de las proteínas reguladoras sugiere que las fusiones entre los dominios REC y varios dominios de salida de la señal es un mecanismo evolutivo ampliamente distribuido que permite a las bacterias regular la transcripción, actividades enzimáticas, y la interacción entre proteínas en respuesta a cambios ambientales.

La proteína que ha servido de modelo para el dominio regulador es CheY. En ésta, el sitio de fosforilación es el aspartato 57, que junto al aspartato 12 y 13 forman un bolsillo ácido en la estructura tridimensional facilitando la captación del grupo fosforilo. Otros dos residuos también conservados, la treonina 87 y la lisina 109, completan el

conjunto de residuos conservados en torno al centro activo del dominio regulador. Los grupos carboxilo de los aspartatos, están implicados en la interacción con Mg^{2+} que es necesario para la transferencia del grupo fosforilo y la desfosforilación (Lukat, 1990, Lukat, 1991, Needham, 1993). La fosforilación del aspártico es diferente de la que tiene lugar en la Ser/Thr, donde se altera la actividad de la proteína mediante efectos electrostáticos (Hurley *et al.*, 1990, Johnson y O'Reilly, 1996). La hidrólisis de dichos grupos ha sido utilizada para detectar la presencia del grupo fosforilo en el aspartato de los reguladores, siendo la vida media del grupo fosforilo según el regulador desde segundos hasta horas. Pequeñas moléculas como el acetyl fosfato, carbamoyl fosfato, imidazol fosfato y fosforamidato, pueden servir como fosfodonadores a los reguladores de respuesta (Lukat *et al.*, 1992, Wolfi *et al.*, 2005), lo que demuestra que pueden catalizar la transferencia del grupo fosforilo independientemente de la presencia de la histidina quinasa. Se ha propuesto que existe por tanto una conexión funcional entre el estado metabólico de la bacteria y la regulación ya que la concentración de acetyl fosfato es dependiente del estado energético de la célula. También se ha demostrado que la mayoría de los reguladores de respuesta pueden catalizar su autodesfosforilación, limitando la vida media de la forma fosforilada. La fosforilación provoca cambios conformacionales que afectan a una amplia superficie en los reguladores. Estas alteraciones moleculares en la superficie del regulador, permiten distintos tipos de interacciones intra o intermoleculares a través de las cuales la proteína ejerce su acción.

En este estudio de Tesis Doctoral, se ha caracterizado en detalle el regulador de respuesta TodT y su correspondiente histidina quinasa TodS, las cuales están implicadas en la regulación de la ruta de degradación de tolueno, benceno y etilbenceno en la cepa *Pseudomonas putida* DOT-T1E. Para ello, se ha utilizado un conjunto de aproximaciones experimentales de carácter multidisciplinar que han permitido establecer las bases del mecanismo por el que opera este sistema y cuyos resultados se presentan y discuten en esta Tesis Doctoral.

OBJETIVOS

A lo largo de esta Tesis Doctoral hemos estudiado la regulación de los genes implicados en el metabolismo de tolueno en *Pseudomonas putida* DOT-T1E partiendo de trabajos anteriores en esta cepa (Mosqueda *et al.*, 1999) en los cuales se describía que el metabolismo del tolueno tenía lugar mediante la ruta TOD y cuya regulación ocurría a través de un sistema de dos componentes *todST* (Lau *et al.*, 1997) situado aguas abajo del operón catabólico, dependiente de la presencia de tolueno y otros sustratos de dicha ruta catabólica. Como parte de los objetivos generales del grupo de investigación de Degradación de Tóxicos Orgánicos, se estableció el esclarecer las vías que la cepa *P. putida* DOT-T1E utiliza para la regulación de la ruta TOD e iniciar el estudio en detalle del sistema de dos componentes TodS/TodT de esta cepa y en especial, el estudio del regulador TodT. Así mismo, se consideró caracterizar el promotor del operón catabólico. Por otro lado, distintos grupos han puesto de manifiesto que en las potenciales aplicaciones de bacterias sobre contaminantes, se puede requerir su migración quimiotáctica (REF). En este sentido, nos planteamos avanzar en el conocimiento del comportamiento quimiotáctico de esta cepa frente a compuestos aromáticos. Con el fin de esclarecer el sistema de regulación de la degradación de tolueno en las bacterias de la especie *P. putida* DOT-T1E y el papel que juega el sistema de dos componentes TodS/TodT en la degradación de tolueno y la respuesta quimiotáctica hacia este aromático por dicha cepa, se plantearon los siguientes objetivos:

- I. Caracterización bioquímica y funcional del sistema de dos componentes TodS/TodT de *P. putida* DOT-T1E.
- II. Caracterización bioquímica y funcional del regulador TodT en su interacción con el promotor P_{todX} .
- III. Quimiotaxis de *P. putida* DOT-T1E hacia tolueno y posible implicación del sistema de regulación TodS/TodT.

RESULTADOS

The TodS-TodT two-component regulatory system recognizes a wide range of effectors and works with DNA-bending proteins

Jesús Lacal, Andreas Busch, María-Eugenia Guazzaroni, Tino Krell, and Juan L. Ramos

Las proteínas TodS y TodT forman un novedoso sistema regulador de dos componentes que es altamente específico para tolueno y otros aromáticos. En este sistema, TodS es la proteína sensora, la cual contiene dos dominios potenciales de recepción de señal, cada uno de los cuales incluye un dominio histidina kinasa. Este sistema regula la expresión de los genes implicados en la degradación de tolueno, benceno y etilbenceno a través de la ruta de la tolueno dioxigenasa. A diferencia del reducido rango de sustrato de la ruta catabólica, el perfil de efectores de TodS es amplio. TodS presenta *in vitro* una cierta actividad basal de autofosforilación, la cual aumenta en presencia de efectores. El tolueno se une a TodS con alta afinidad ($K_D = 684 \pm 13$ nM) y con una estequiometría de 1:1. El análisis de las versiones truncadas de TodS revelan que el tolueno se une al dominio de recepción de señal N-terminal ($K_D = 2.3 \pm 0.1$ μ M) pero no al dominio C-terminal. TodS transfosforila a TodT, la cual se une a dos sitios de unión en el ADN bastante similares localizados en las posiciones -107 y -85 del promotor. La proteína IHF (del inglés, *integration host factor*) juega un papel crucial en el proceso de activación y se une entre el sitio activador de TodT y la región -10 del promotor. En un mutante deficiente en IHF, la expresión del promotor *tod* disminuye 8 veces. Ensayos de transcripción *in vitro* confirmaron el papel previamente determinado *in vivo* de TodS, TodT e IHF. Se presenta un modelo funcional en el que IHF favorece el contacto entre el activador TodT, unido aguas arriba, y la subunidad alpha de la ARN polimerasa unida aguas abajo en el promotor. Una vez que estos contactos están establecidos, el operón *tod* se transcribe eficientemente.

Proceedings of the National Academy of Sciences
Vol. 103, Nº 21, pp. 8191-8196, Mayo de 2006

The TodS–TodT two-component regulatory system recognizes a wide range of effectors and works with DNA-bending proteins

Jesús Lacal, Andreas Busch, María-Eugenia Guazzaroni, Tino Krell, and Juan L. Ramos[†]

Department of Environmental Protection, Estación Experimental del Zaidín, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, E-18008 Granada, Spain

Communicated by David T. Gibson, University of Iowa, Roy J. and Lucille A. Carver College of Medicine, Iowa City, IA, April 10, 2006 (received for review March 7, 2006)

The TodS and TodT proteins form a previously unrecognized and highly specific two-component regulatory system in which the TodS sensor protein contains two input domains, each of which are coupled to a histidine kinase domain. This system regulates the expression of the genes involved in the degradation of toluene, benzene, and ethylbenzene through the toluene dioxygenase pathway. In contrast to the narrow substrate range of this catabolic pathway, the TodS effector profile is broad. TodS has basal autophosphorylation activity *in vitro*, which is enhanced by the presence of effectors. Toluene binds to TodS with high affinity ($K_d = 684 \pm 13$ nM) and 1:1 stoichiometry. The analysis of the truncated variants of TodS reveals that toluene binds to the N-terminal input domain ($K_d = 2.3 \pm 0.1$ μ M) but not to the C-terminal half. TodS transphosphorylates TodT, which binds to two highly similar DNA binding sites at base pairs –107 and –85 of the promoter. Integration host factor (IHF) plays a crucial role in the activation process and binds between the upstream TodT boxes and the –10 hexamer region. In an IHF-deficient background, expression from the *tod* promoter drops 8-fold. *In vitro* transcription assays confirmed the role determined *in vivo* for TodS, TodT, and IHF. A functional model is presented in which IHF favors the contact between the TodT activator, bound further upstream, and the α -subunit of RNA polymerase bound to the downstream promoter element. Once these contacts are established, the *tod* operon is efficiently transcribed.

Pseudomonas | sensor kinase | toluene dioxygenase | transcriptional regulator

Many *Pseudomonas putida* strains are able to use benzene, toluene, and ethylbenzene as the sole carbon and energy source through the toluene dioxygenase (TOD) pathway (1). In this pathway, the aromatic hydrocarbons are oxidized to their corresponding substituted catechols, which are further metabolized to Krebs cycle intermediates (1, 2). The catabolic genes of the TOD pathway form the operon *todXFC1C2BADEGIH*, which is transcribed from a single promoter called P_{todX} , located upstream from the *todX* gene (1–3). The *todST* genes are found downstream and form an independent operon that is expressed constitutively (2, 3).

TodS and TodT have been proposed to form a two-component regulatory system (TCS) that regulates the *tod* catabolic operon in *P. putida* F1 (3). TodT shows all of the characteristics of a response regulator, whereas sequence-based domain predictions indicate that the 108-kDa TodS belongs to a family of sensor histidine kinases that have not been studied at the biochemical level. TodS is predicted to comprise two supradomains, each containing a PAS/PAC sensory domain and a histidine kinase domain. The supradomains are separated by the receiver domain of a response regulator. In contrast to other histidine kinases, TodS apparently lacks transmembrane regions (3). The mode of action of this previously unrecognized type of histidine kinase has yet to be established. On the basis of moderate sequence similarity with the heme-binding oxygen sensor FixL, the C-terminal supradomain of TodS was proposed to be involved in oxygen sensing (3). Choi *et al.*

(4) isolated TodS mutants that recognized aromatic compounds that are not effectors of the wild-type protein. Mutations were scattered along the C-terminal half of TodS.

The TodT protein was shown to bind to the Tod box centered at base pair –107 in the P_{todX} promoter (3). This site is located far from the downstream RNA polymerase-binding site. The P_{todX} promoter exhibits a well defined –10 base pair region, although there is no base pair –35 consensus region, consistent with the fact that P_{todX} belongs to the “extended promoter” type that resembles *P. putida* σ^{70} -dependent promoters (5). Because TodT binds far from the RNA polymerase-binding site, we hypothesize that DNA bending is required for transcription activation, which implies that the activation mechanism involves a direct contact between TodT and the RNA polymerase. This type of enhancer-activation system is well documented for regulators of the NtrC family working in conjunction with RNA polymerase/ σ^{54} (6, 7).

This study was undertaken to characterize this previously unrecognized TCS. We first addressed questions related to signal sensing and transmission, such as the definition of the effector profile of TodS, the thermodynamic characteristics of the interaction of TodS with aromatic hydrocarbons, the modulatory effect of effector binding on the autophosphorylation activity of TodS, and the detection of TodS–TodT transphosphorylation activity. We then explored the interaction of TodT with P_{todX} and the involvement of DNA-bending proteins such as IHF in the mechanism of transcriptional activation. A functional model for transcription activation mediated by this TCS is discussed.

Results

P. putida DOT-T1E grows on toluene, ethylbenzene, and benzene. We had previously generated *todT* and *todS* mutants of this strain, which failed to grow on the above hydrocarbons as the sole carbon source (2). The chromosomal *todT* mutation was complemented by the *todT* gene supplied in trans in pJLC1. However, the *todS* mutant was complemented by pMIR66 (bearing *todST*) only. These results indicated that both TodS and TodT are needed for induction of the TOD pathway.

P. putida KT2440 does not have the *tod* genes on its chromosome and cannot grow on toluene. We transferred pMIR77 ($P_{todX}::lacZ$) to this strain, and, regardless of the presence of toluene, no β -galactosidase expression took place. When KT2440 (pMIR77) was transformed with pMIR66, induction took place in response to toluene, and β -galactosidase levels reached 4,500 Miller units. However, when the plasmid bore a mutation in *todS* (pJLC1) or *todT* (pJLC2), no induction from P_{todX} occurred (Table 1). There-

Conflict of interest statement: No conflicts declared.

Abbreviations: CTD, C-terminal domain; CToDS, C-terminal TodS fragment; IHF, integration host factor; NTodS, N-terminal TodS fragment; TCS, two-component regulatory system; TOD, toluene dioxygenase.

[†]To whom correspondence should be addressed at: Estación Experimental del Zaidín, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Calle Professor Albareda 1, E-18008 Granada, Spain. E-mail: jlramos@eez.csic.es

© 2006 by The National Academy of Sciences of the USA

Table 1. Bacterial strains and plasmids used in this study

Strains/Plasmids	Relevant characteristics	Refs.
<i>E. coli</i> DH5 α F'	F'/ <i>hsdR17</i> , <i>recA1</i> , <i>gyrA</i>	28
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	F ⁻ , <i>ompL</i> , <i>hsdS_B</i> (r ⁻ _B m ⁻ _B)	28
<i>P. putida</i> DOT-T1E	Tol ⁺ , wild type	29
<i>P. putida</i> DOT-T1E	DOT-T1E, <i>todS</i> ::Km, Tol ⁻ <i>todS</i> T	30
<i>P. putida</i> DOT-T1E	DOT-T1E, <i>todT</i> ::Km, Tol ⁻ Δ <i>todT</i>	This work
<i>P. putida</i> KT2440	Tol ⁻ , Cm ^R	31
<i>P. putida</i> KT2440-IHF3	KT2440, <i>ihfA</i> ::Km	31
pBSaphA	Ap ^R , <i>aphA3</i> cassette from pU18K	32
pET-28b ⁺	Km ^R , protein expression vector	28
pET11c- <i>ihfABhis</i>	Ap ^R , <i>ihfA</i> and His-tagged <i>ihfB</i> genes	33
pMIR77	Tc ^R , <i>P_{todX}</i> :: <i>lacZ</i>	30
pJLC77	Tc ^R , mutant <i>P_{todX}</i> :: <i>lacZ</i>	This work
pMIR66	Gm ^R , containing the <i>todS</i> genes	30
pJLC1	pMIR66, <i>todS</i> :: <i>aphA3</i>	This work
pJLC2	pMIR66, <i>todT</i> :: <i>aphA3</i>	This work
pJLTodT	pET28b containing <i>todT</i> gene	This work
pTod5	pET28b containing <i>todS</i> gene	This work
pCTod5	pET28 ⁺ : <i>todS</i> ; encoding CTod5	This work
pNTod5	pET28 ⁺ : <i>todS</i> ; encoding NTod5	This work
pREII α	Ap ^R , <i>ropA</i>	19, 20
pREII α - Δ 235	Ap ^R , RpoA Δ 235 residues	19, 20
pREII α -289A	Ap ^R , codifies RpoAL289A	19, 20
pREII α -291A	Ap ^R , codifies RpoAK291A	19, 20

Ap^R, Cm^R, Gm^R, Km^R, Rif^R, Tc^R indicate resistance to ampicillin, chloramphenicol, gentamicin, kanamycin, rifampicin, and tetracycline, respectively. Tol⁺ and Tol⁻ indicate either that the strain grows or fails to grow on toluene, respectively.

fore, although *P. putida* codifies for a large number of TCSs encoded in its chromosome (8, 9), our results indicate that the TodS–TodT interaction is highly specific and that the Tod regulatory proteins cannot be replaced by proteins of any other TCS.

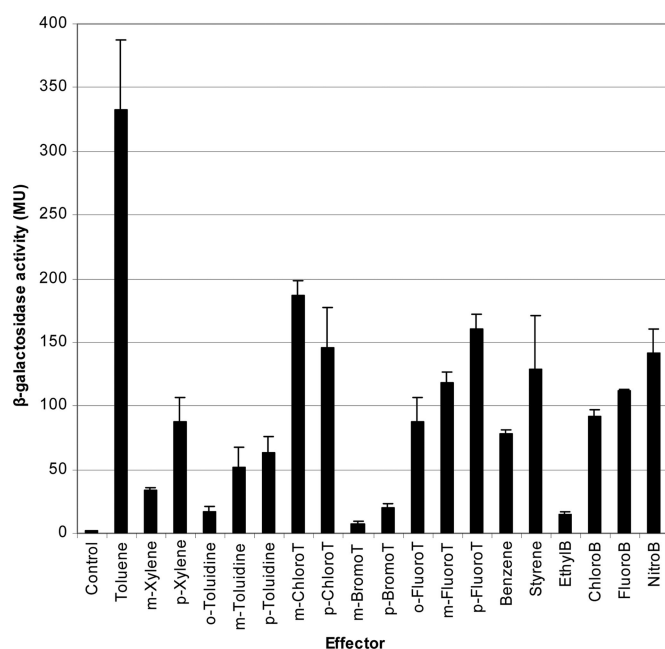


Fig. 1. Induction of *P_{todX}* by TodS–TodT in response to a wide range of aromatics. *P. putida* DOT-T1E bearing pMIR77 (*P_{todX}*::*lacZ*) was grown on M9 medium with 1 mM of the indicated effector. When turbidity of the cultures was 0.8, β -galactosidase activity was determined. Tested compounds that did not induce were as follows: *o*-xylene, *m*- and *p*-ethyltoluene; *o*-, *m*-, and *p*-nitrotoluene; *o*-chloro-, *o*-, *m*-, and *p*-iodotoluene; propyl-, butyl-, and isobutylbenzene; 1,2,3-, 1,3,5-, 1,2,4-trimethylbenzene; and benzamide. T, toluene; B, benzene.

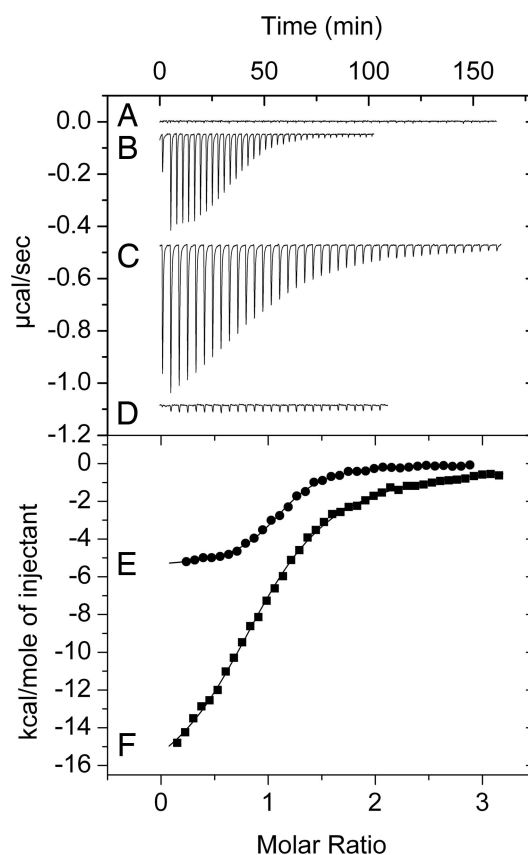


Fig. 2. Isothermal titration calorimetry data for the binding of toluene to TodS and its recombinant fragments NTodS and CTodS. (Upper) Heat changes are shown. (Lower) Integrated peak areas are shown. (A) Titration of buffer with 1 mM toluene. (B) Titration of 15 μ M TodS with 1 mM toluene. (C) Titration of 12 μ M NTodS with 0.8 mM toluene. (D) Titration of 8 μ M CTodS with 1 mM toluene. Integrated peak areas are shown for heat changes in B (E) and C (F).

Effector Profile of the TodS–TodT System. The range of effectors recognized by catabolic pathway regulators is typically larger than the range of substrates metabolized by the pathway (10–13). To identify the range of aromatic compounds that activate transcription from *P_{todX}* we measured induction by using the *P_{todX}*::*lacZ* fusion. Basal activity was 1.9 ± 0.7 Miller units, but the addition of benzene to the culture led to an almost 50-fold increase in activity (Fig. 1). Then we analyzed benzene derivatives with different substituents. The data indicated that a short lateral chain, such as in toluene, increased the activation of *P_{todX}* significantly, whereas longer alkyl chains resulted in a significant decrease in the inducing capability of *P_{todX}*. This finding is exemplified by ethylbenzene, which was a poor effector, whereas *n*-propylbenzene showed no inducer activity (Fig. 1). Chloro-, fluoro-, and nitrobenzene significantly induced expression from *P_{todX}* (Fig. 1).

Because toluene was the best tested effector, we evaluated different substituents in the aromatic ring at C2, C3, and C4. A number of substituents were permissible at positions 3 and 4 in the aromatic ring of toluene, allowing for methyl, amino, fluoro, bromo, and chloro substitutions (Fig. 1). In contrast, in position 2, only fluoro and amino substituents were permitted. This result evidenced that the regulator profile was significantly broader than the substrate range accepted by the pathway.

Isothermal Titration Calorimetry. Purified His-tag TodS protein was used to determine the thermodynamic parameters for the binding of toluene and ethylbenzene. Fig. 2 shows that the heat changes

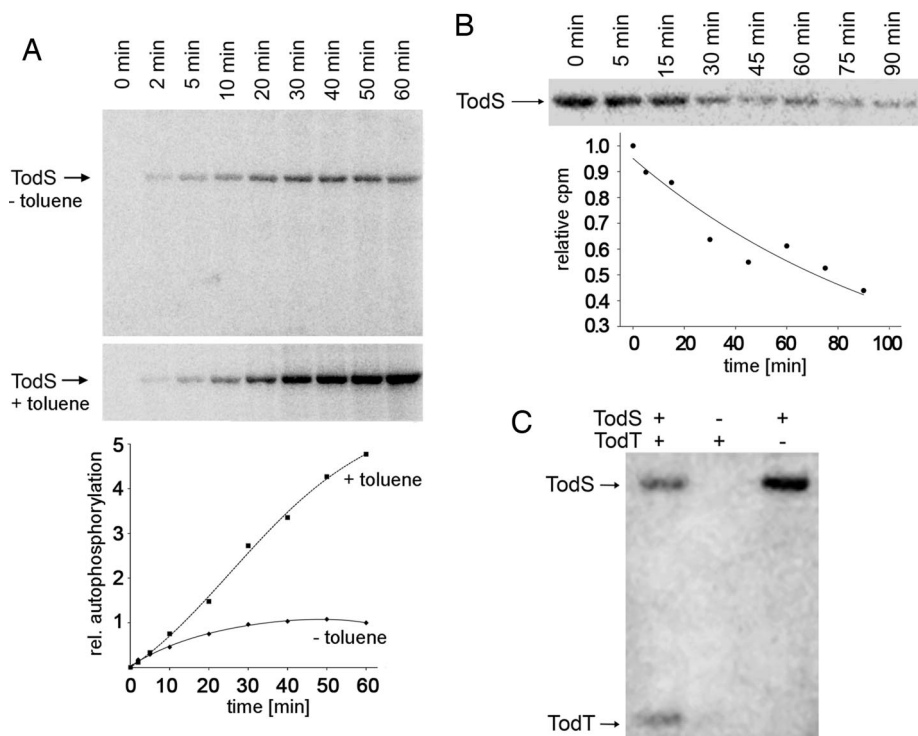


Fig. 3. The catalytic properties of TodS. (*A Upper*) Autophosphorylation in the presence and absence of toluene. Experiments were carried out in parallel, and the graph (*A Lower*) shows the densitometric analysis of the gels. (*B*) Dephosphorylation kinetics. (*C*) Transphosphorylation to TodT. Conditions for these assays are described in *Materials and Methods*.

obtained for the injection of toluene into buffer were negligible. Binding of toluene to TodS (Fig. 2*B*) was driven by favorable enthalpy ($\Delta H = -5.5 \pm 0.1$ kcal/mol) and entropy ($T\Delta S = 2.9 \pm 0.1$ kcal/mol) changes. Binding was tight, with a dissociation constant of 684 ± 13 nM, and the TodS:toluene binding stoichiometry was 1:1. Ethylbenzene binds to TodS in a similar fashion ($\Delta H = -3.6 \pm 0.1$ kcal/mol; 1 kcal = 4.18 kJ) but with lower affinity ($K_d = 3.1 \pm 0.2$ μ M).

Because TodS contains two PAS/PAC-type input domains, to identify the toluene-binding domain, two truncated variants of TodS were created. The N-terminal TodS fragment (NTodS), comprising residues 1–584, contained the N-terminal PAS/PAC-histidine kinase domains and the receiver domain of a response regulator, whereas the C-terminal TodS fragment (CTodS), comprising residues 452–978, contained the receiver domain of a response regulator followed by the PAS/PAC-histidine kinase domains located at the C terminus of TodS. We purified both TodS variants and found that toluene bound to NTodS with a very favorable enthalpy change ($\Delta H = -18.3 \pm 0.2$ kcal/mol), an affinity of 2.3 ± 0.1 μ M, and a 1:1 stoichiometry (Fig. 2*C*), whereas purified CTodS did not interact with the effector (Fig. 2*D*).

Modulation of Basal Autophosphorylation Activity of TodS by Toluene and Rate of Dephosphorylation. A typical property of histidine kinases is the capacity to autophosphorylate in the presence of ATP. TodS was incubated with 50 μ M [γ - 32 P]ATP, and samples were taken at different times and analyzed (Fig. 3*A Upper*). Densitometric analysis revealed that phosphorylation in the absence of effectors reached a plateau at ≈ 30 min, indicative of an equilibrium between phosphorylation and dephosphorylation (Fig. 3*A Bottom*). In a parallel assay, phosphorylation was done in the presence of 100 μ M toluene. After 50 min of incubation, autophosphorylation activity was ≈ 5 times as high as the basal level (Fig. 3*A*).

In a subsequent experiment, TodS was autophosphorylated in the presence of toluene, and, after 50 min, a 500-fold molar excess of unlabeled ATP was added. Samples were taken at different times and analyzed by SDS/PAGE to measure the rate of dephosphorylation. TodS dephosphorylates with a half-life of ≈ 70 min (Fig.

3*B*), which is similar to the half-life of other sensor kinases (14). As mentioned above, TodS contains two sensor domains that probably sense two different signals. In this study, we demonstrate that the addition of a single signal, i.e., toluene, suffices to activate this regulatory system.

TodS–TodT Transphosphorylation Activity. The *in vivo* data suggested that TodS–TodT forms a TCS. Attempts were thus made to detect transphosphorylation *in vitro*. Purified TodS and TodT and a mixture of both proteins were incubated in the presence of radioactive ATP for 50 min. As illustrated in Fig. 3*C*, when alone, TodS was autophosphorylated by ATP, which was not the case for TodT when it was alone. However, a band corresponding to TodT appeared in the mixture of both proteins, demonstrating phosphorylation through TodS. This phosphorylation was confirmed by the fact that the band corresponding to TodS had become fainter (Fig. 3*C*).

IHF Participates in the Activation of P_{todX} . Lau *et al.* (3) demonstrated that the TodT-binding box was located far upstream from the RNA polymerase-binding site and was centered at base pair -107 with respect to the transcription start point. This finding implies that activation requires DNA bending to allow productive contacts between the transcriptional regulator and RNA polymerase bound in the downstream element. IHF is involved in DNA bending and in the activation and repression of a number of promoters in which the regulator-binding site is located far from the transcription start point (6, 7). A potential IHF site (AAAAACAATA) was detected between -43 and -34 in P_{todX} , which matched the consensus defined for IHF (6). To study the involvement of IHF in transcription activation, we transferred pMIR66 and pMIR77 into the wild-type KT2440 strain and its isogenic IHF mutant strain and measured the expression from P_{todX} in response to toluene. In both backgrounds, basal expression was similarly low (≈ 2 Miller units). In response to toluene in the culture medium, β -galactosidase levels in KT2440 reached values of $\approx 4,500$ units; however, induction in the IHF mutant strain was 1/8 of that found in the wild type, which supports a direct role for IHF in the activation of P_{todX} .

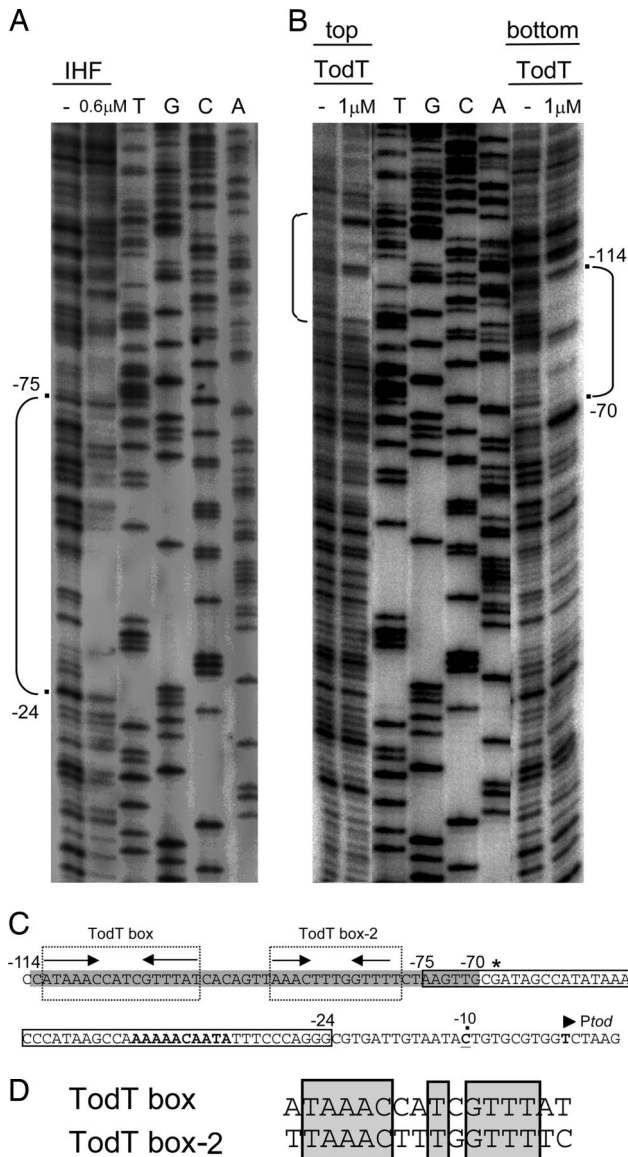


Fig. 4. Identification of TodT and of IHF-binding sites at P_{todX} . DNase I footprints of IHF (A) and TodT (B). Brackets indicate the protected area. (C) Sequence of P_{todX} . The gray shading indicates the region protected by TodT. The dotted outline boxes indicate the two TodT-binding sites. Arrows represent palindromic sequences; the asterisk marks a hyperreactive G; sequences matching the IHF consensus sequence are in bold. The narrow box indicates the fragment protected by IHF. The transcription start site is indicated by an arrowhead, and the -10 base pair position in the promoter is marked with a dot and underlined. (D) Sequence alignment of the two TodT binding sites. Conserved nucleotides are boxed.

To verify the role of IHF, we constructed pJLC77 carrying a P_{todX}^* mutant with an altered IHF site fused to *lacZ*, and β -galactosidase activity was measured in *P. putida* DOT-T1E in the exponential phase after induction with toluene. Activity levels with the mutant promoter were 8-fold lower than those obtained with the wild-type promoter (data not shown).

IHF Binds to P_{todX} in Vitro. To confirm that IHF binds P_{todX} in vitro, we carried out EMSA with increasing IHF concentrations and a 352-bp ^{32}P -labeled P_{todX} promoter or the P_{todX}^* with an altered IHF site. No binding of IHF to the mutant P_{todX}^* promoter was found (data not shown). In contrast, 100 nM IHF retarded 80% of the

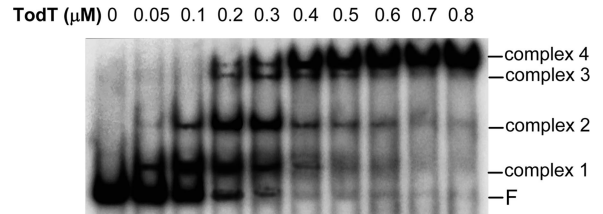


Fig. 5. Specific binding of TodT to P_{todX} EMSA for the binding of TodT to a 352-bp DNA fragment containing the P_{todX} promoter. F, free DNA.

wild-type P_{todX} promoter. From the EMSA, we estimated that the apparent affinity of IHF for its target was ≈ 70 nM (data not shown). DNase I footprint assays revealed that IHF protected the -24 to -75 base pair region of P_{todX} (Fig. 4A and C), which includes the region identified *in silico*.

Redefining the TodT-Binding Region in P_{todX} . We used EMSA to study the binding of TodT to P_{todX} (Fig. 5). We observed four bands corresponding to TodT–DNA complexes, which might be indicative of the existence of multiple TodT-binding sites. To identify the TodT-binding site(s), DNase I footprint assays were carried out with $1 \mu M$ TodT. As shown in Fig. 4B and C, the region between base pairs -114 and -70 was protected by TodT. This fragment contained the TodT box centered at base pair -107 , as described in ref. 3. However, there was clear evidence that protection went beyond this site. Inspection of the sequence downstream from the TodT box revealed a second palindromic fragment, termed “TodT box-2” (Fig. 4C). Sequence alignment of the two TodT boxes revealed a high degree of identity (Fig. 4D), and we hypothesize that TodT box-2 represents a second binding site for TodT. The consensus sequence between the two TodT boxes (AAACNNT-NGTTT) can be considered a specific TodT-binding motif.

Activation from the P_{todX} Promoter Requires Contacts with the α -Subunit of RNA Polymerase. A number of positive transcriptional regulators interact with the α -subunit of RNA polymerase (15, 16). To test whether this interaction occurs in the case for TodT, experiments were carried out in *Escherichia coli* with defects in the α -subunits bearing pMIR66 and pMIR77. This approach was based on an experimental set-up in which most of the RNA polymerase pool contained a mutant subunit (15–17). The assays were designed to primarily detect a negative effect on transcription. We first tested activation in a mutant background in which α -C-terminal domain (CTD) lacked 235 residues and found that activity from P_{todX} was $\approx 50\%$ of that in the wild type. This observation is consistent with data obtained for other promoters, such as *mtr* regulated by TyrR (18), the TOL plasmid P_m promoter (17), and the *rha* promoter of *E. coli* (15). Subsequently, we used a series of point mutants exhibiting alanine substitutions (19, 20). TodT-dependent transcription from P_{todX} was significantly affected in a background in which α -CTDL289A or α -CTDK291A mutants were overproduced, because activity decreased by $\approx 40\%$ with respect to the wild type. Overproduction of α -CTD carrying other mutations did not affect the level of expression from P_{todX} . Therefore, the drop in activity in the two α -CTD mutants seems to result from decreased interactions of α -CTD with TodT. This finding is in agreement with previous studies showing that the patch of residues around position 289 are involved in interactions between the α -CTD and the MetR regulator of *E. coli* and the bacteriophage P2 Ogr protein (21).

In Vitro Transcription Assays. The results obtained *in vitro* and *in vivo* indicated that expression from P_{todX} requires that TodT be activated by TodS through transphosphorylation in response to toluene. Expression from P_{todX} also involves DNA bending in a process assisted by IHF. To provide unequivocal evidence, we performed

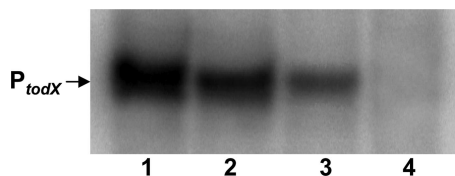


Fig. 6. *In vitro* transcription from P_{todX} . Transcription assays were performed as described in *Materials and Methods*. The assay performed in the presence of 1.5 μ M TodS and TodT, 50 nM IHF, and 150 μ M toluene is shown in lane 1. In lane 4, TodTD57A replaced TodT. IHF and toluene were omitted in lanes 2 and 3, respectively.

in vitro transcription assays with linear P_{todX} DNA. Fig. 6 shows that efficient transcription from P_{todX} took place in the presence of RNA polymerase, TodS, TodT, IHF, and toluene (Fig. 6, lane 1). However, when TodS, TodT, or toluene was omitted, hardly any or no transcription from P_{todX} occurred (for absence of toluene, see Fig. 6, lane 3). In the absence of IHF, expression from P_{todX} was ≈ 20 –30% of that observed in the complete system (Fig. 6, lane 2). To further confirm that the phosphorylated TodT protein is the activating form of the response regulator, we replaced, in the *in vitro* transcription assay, the TodT protein by a mutant variant that retained the ability to bind target DNA but in which the phosphoaccepting Asp-57 was replaced by alanine. When this mutant regulator was used in *in vitro* transcription assays, no transcript was seen (Fig. 6, lane 4).

Discussion

Soil bacteria sense and respond to environmental cues through a number of TCSs (9). Analyses of annotated bacterial genomes revealed that soil bacteria possess ≈ 50 TCSs per genome, which is far greater than the average for other bacteria (22). The soil bacterium *P. putida* KT2440 was shown to have 93 TCSs (8). The large number of structurally similar proteins in a single organism raises the question of specificity of each of these regulatory systems. Here we report assays with *todS* and *todT* mutants that demonstrate that there is no functional interaction between either of the two proteins with other histidine kinases or with transcriptional regulators. We have concluded that the interaction of TodS with TodT is highly specific.

The TOD catabolic enzymes metabolize benzene, toluene, and ethylbenzene. These substrates were found to induce P_{todX} (Fig. 1); however, they induce it to a different degree. Toluene was the most efficient effector of all of the molecules tested, benzene was found to be a good inducer, and the inducing effect of ethylbenzene was modest. Our results showed that there was a high degree of tolerance to different substituents on the aromatic ring and that substitutions in the 3 and 4 positions were better tolerated than substitutions at position 2. This finding suggests that TodS is a protein with broad effector-recognition properties, which is unusual for sensor histidine kinases.

The affinity of TodS for toluene ($\approx 0.7 \mu$ M) is significantly higher than the binding of effector molecules to other histidine kinase sensors. For instance, CitA has a K_d of 5.5 μ M for the binding of citrate (23), and NarX and PhoQ have apparent affinities of $\approx 35 \mu$ M for nitrate and $\approx 300 \mu$ M for Mg^{2+} ions, respectively (24, 25). The high affinity of TodS for toluene assures that bacteria activate transcription and use it as a carbon source at very low concentrations, as expected for a volatile chemical.

TodS contains two signal-sensing domains. Isothermal titration calorimetry showed that toluene bound to NTodS with an affinity of $2.3 \pm 0.1 \mu$ M, whereas no binding was observed with CTodS. This observation provided direct proof that toluene binds to the N-terminal sensor domain. At first sight, our data may appear inconsistent with the findings by Choi *et al.* (4), who showed that TodS mutants within the C-terminal half had a wider effector

specificity range. Although we demonstrated that toluene binds to the N-terminal supradomain, an indirect role of the C-terminal region in toluene sensing is likely. This proposal is deduced from the larger enthalpy changes observed for toluene binding to NTodS ($\Delta H = -18.3 \pm 0.2$ kcal/mol) than for the wild-type TodS ($\Delta H = -5.5 \pm 0.1$ kcal/mol).

On the basis of sequence similarity to the heme-binding, oxygen-sensing domain of FixL, it was suggested that the C terminus of TodS was also a heme-containing sensor domain (3). Heme-binding proteins, recombinantly produced in *E. coli*, copurify with heme and show characteristic absorption peaks between 400 and 600 nm (26). Spectral analysis of purified and active TodS showed no maximum peaks in this wavelength range, indicating that it is unlikely that TodS exhibits a heme group.

The TodS protein has a low but measurable basal level of autophosphorylation. We showed that the addition of toluene increases autophosphorylation and results in TodS phosphotransfer to TodT. Phosphorylated TodT functions as the positive regulator. This phenomenon has been corroborated in *in vitro* transcription assays, because, in the absence of TodT or in the presence of mutant TodTD57A, no transcription took place (Fig. 6).

EMSA studies revealed the presence of four retarded bands, indicating that multiple TodT monomers interact with their target DNA. The footprint analyses revealed the existence of two binding sites of similar size and sequence (Fig. 4). The four bands observed in EMSA may be the result of the binding of one TodT monomer per half site in each of the two TodT boxes identified here. Our EMSA and footprint results differ from those originally reported by Lau *et al.* (3), which showed only two retarded bands corresponding to only one TodT binding site. This discrepancy could be due to the fact that, in the initial study, a recombinant TodT-GST fusion protein was used (3). Because GST is similar in size to TodT, this fusion protein may have caused steric hindrance, preventing other TodT molecules from binding to the proximal Tod box-2.

Expression from P_{todX} in an IHF-deficient background was very low and probably reflected the limitations imposed by the absence of the bending protein. Indeed, IHF binds to P_{todX} and protects the region between base pairs -24 and -75 , which is consistent with IHF-mediated DNA bending, allowing a direct interaction between TodT bound to the -85 to -107 boxes and RNA polymerase bound to the downstream promoter site (6). On the basis of the observation that expression from P_{todX} decreased in mutant backgrounds that express RpoA variants, the structure of α -CTD was resolved and shown to be compactly folded and to contain four α -helices (27). TodT seems to interact with residues in α -helix 3 (residues 286–292), a subset of residues also identified in interactions with other positive regulators (21).

Our results support the following model for the mechanism of transcription activation from P_{todX} by the TodS–TodT TCS. TodS exhibits basal autophosphorylation activity, which increases in the presence of toluene. Increased autophosphorylation increases the rate of transphosphorylation of TodT, which is persistently bound to its target sequences in the P_{todX} promoter. Phosphorylation of TodT probably induces conformational changes, which allow or alter the interaction with RNA polymerase in a process assisted by IHF. Once the RNA polymerase–IHF–TodT–*P* scaffold is formed, the *tod* operon is read.

Materials and Methods

Bacterial Strains, Culture Media, and Plasmids. The bacterial strains and plasmids used are shown in Table 1 (28–33). *E. coli* strains were grown at 30°C in LB or 2 \times YT medium (for recombinant protein expression) with shaking. *P. putida* was grown on M9 minimal medium with glucose.

β -Galactosidase Assays. To quantify the expression from the TOD pathway promoter, we used pMIR77 [$P_{todX}::lacZ$ (30)] and a mutant P_{todX}^* promoter carrying an altered IHF site (AAAGAGGATA,

mutations are underlined) in pJLC77 ($P_{todX}^*::lacZ$). Bacterial strains were grown on M9 minimal medium with the appropriate antibiotics without or with the inducer. β -galactosidase activity was determined in permeabilized cells (34).

Construction of *todS* and *todT* Mutants in pMIR66. The *todS* and *todT* genes in plasmid pMIR66 were disrupted by using the *aphA3* kanamycin (Km)-resistance cassette, which produced no polar effects (32). The resulting plasmids were called pJLC1 (*todS::Km*) and pJLC2 (*todT::Km*).

Overexpression and Purification of TodT, TodS, CTodS, NTodS, and IHF. *todS*, *todT*, and the *todS* mutant variants were cloned independently in pET28b⁺ to yield plasmids pTodS, pJLTodT, pCTodS, and pNTodS, which allow the overexpression of these proteins with a His-6 tag. These proteins were purified by using HisTrap columns (Amersham Biosciences). IHF was purified after overexpression of the *ihfA* and *ihfB* genes, as described by Ilves *et al.* (33).

EMSA. A 352-bp DNA fragment containing the P_{todX} promoter was amplified by PCR from pMIR77 and end-labeled with ³²P as described. Approximately 2 nM labeled DNA ($\approx 1.5 \times 10^4$ cpm) was incubated with the indicated amounts of purified TodT or IHF for 30 min at 30°C in 10 μ l of binding buffer [50 mM Tris-HCl, pH 8.0/100 mM KCl/1 mM DTT/10 mM MgCl₂/10% (vol/vol) glycerol] containing 20 μ g/ml poly(dI-dC) and 200 μ g/ml BSA. Electrophoresis in PAGE was done as described in ref. 35.

DNase I Footprint. The DNA fragment and buffer used for EMSA was also used for footprinting assays. Approximately 10 nM ($\approx 10^5$ cpm) labeled probe was incubated in the presence and absence of IHF (0.6 μ M) or TodT (1 μ M). Reactions were incubated for 30 min before treatment with DNase I (10^{-5} units/ μ l). Then DNA was precipitated, suspended in 10 mM Tris/0.1 mM EDTA (pH 8), heated at 90°C for 3 min, and analyzed by using 6.5% (wt/vol) PAGE.

In Vitro Transcription Assays. Reactions (20 μ l) were performed in 25 mM Tris-HCl/9 mM MgCl₂/100 mM KCl (pH 7.5) containing 50 nM σ^{70} -holoenzyme, 20 units of RNasin (Promega), and 5 nM linear P_{todX} DNA template (680 bp). The mixtures were incubated

for 10 min at 30°C before the addition of 0.1 mM ATP, CTP, and GTP, 0.05 mM UTP, and 3.6 μ Ci of [α -³²P]UTP (10 μ Ci/ μ l) (1 Ci = 37 GBq). After a 20-min incubation, the reactions were chilled at 4°C, and 4 μ l of formamide sequencing dye was added. Samples were separated in a 6.5% (wt/vol) PAGE.

Isothermal Titration Calorimetry. Measurements were done on a VP microcalorimeter (Microcal, Amherst, MA) at 25°C. TodS was dialyzed against 50 mM Tris-HCl/250 mM KCl/2 mM MgCl₂/2 mM DTT/0.1 mM EDTA, pH 7.5. One millimole toluene and ethylbenzene solutions were made up in dialysis buffer. The titrations involved 1.6- μ l injections of toluene or ethylbenzene into a solution of 12–15 μ M TodS. Titration curves were fitted by a nonlinear least-squares method (ORIGIN software; Microcal) to a function for the binding of a ligand to a macromolecule (36).

In Vitro Phosphorylation Assays. Autophosphorylation of TodS. Assays were done in 50 mM Tris-HCl, pH 7.5/200 mM KCl/2 mM MgCl₂/0.1 mM EDTA/10% (vol/vol) glycerol/10 mM DTT. The autophosphorylation assay was performed at 24°C with 85 pmol purified TodS in a final reaction volume of 100 μ l in the presence and absence of toluene (100 μ M). Reactions were initiated by adding radiolabeled ATP (5 nmol ATP containing 1 μ Ci [γ -³²P]ATP), and 7.5- μ l samples were removed at different times. The reaction was stopped by adding 2 \times SDS sample buffer and transferring onto ice. All samples were run on SDS/7.5% (wt/vol) PAGE.

Dephosphorylation of TodS. Protein was autophosphorylated in the presence of 100 μ M toluene, as detailed above, for 50 min. A 500-fold molar excess of ATP was added, and samples were removed at different times before analysis by SDS/PAGE.

Transphosphorylation of TodS–TodT. A mixture of TodS (11 μ M) and TodT (55 μ M) was incubated in a final volume of 20 μ l, as described above, for autophosphorylation of TodS. In parallel, TodS and TodT were individually submitted to the same treatment. After 50 min, samples were analyzed by SDS/10% (wt/vol) PAGE.

We thank K. Shashok for improving our use of English and C. Lorente for secretarial assistance. This work was supported by Ministry of Science and Education Grants BIO2003-00515 and GEN2001-4698-CO5-03 and Ministry of the Environment Grant VEM2004-08560.

- Zylstra, G. J. & Gibson, D. T. (1989) *J. Biol. Chem.* **264**, 14940–14941.
- Mosqueda, G., Ramos-González, M. I. & Ramos, J. L. (1999) *Gene* **232**, 69–76.
- Lau, P. C. K., Wang, Y., Patel, A., Labbé, D., Bergeron, H., Brousseau, R., Konishi, Y. & Rawlings, M. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 1453–1458.
- Choi, E. N., Cho, M. C., Kim, Y., Kim, C.-K. & Lee, K. (2003) *Microbiology* **149**, 795–805.
- Domínguez-Cuevas & Marqués, S. (2004) *Pseudomonas* (Kluwer, Dordrecht, The Netherlands), Vol. 2, pp. 319–345.
- Pérez-Martín, J. & de Lorenzo, V. (1997) *Annu. Rev. Microbiol.* **51**, 593–628.
- Berger, D., Naberhaus, F. & Kustu, S. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 103–107.
- Nelson, K. E., Weinel, C., Paulsen, I. T., Dodson, R. J., Hilbert, H., dos Santos, V. A. P., Fouts, D. E., Gill, S. R., Pop, M., Holmes, M., *et al.* (2002) *Environ. Microbiol.* **4**, 799–808.
- Ventre, I., Filloux, A. & Lazdunski, A. (2004) *Pseudomonas* (Kluwer, Dordrecht, The Netherlands), Vol. 2, pp. 257–289.
- Ramos, J. L., Michán, C., Rojo, F., Dwyer, D. & Timmis, K. N. (1990) *J. Mol. Biol.* **211**, 373–382.
- Shingler, V. & Pavel, H. (1995) *Mol. Microbiol.* **17**, 505–513.
- Delgado, A., Salto, R., Marqués, S. & Ramos, J. L. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 5144–5150.
- Tropel, D. & van der Meer, J. R. (2004) *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **68**, 474–500.
- Potter, C. A., Ward, A., Laguri, C., Williamson, M. P., Henderson, P. & Phillips-Jones, M. K. (2002) *J. Mol. Biol.* **320**, 201–213.
- Holcroft, C. C. & Egan, S. M. (2000) *J. Bacteriol.* **182**, 3529–3535.
- Busby, S. & Ebright, R. H. (1997) *Mol. Microbiol.* **23**, 853–859.
- Ruiz, R., Marqués, S. & Ramos, J. L. (2003) *J. Bacteriol.* **185**, 3036–3041.
- Yang, J., Murakami, K., Camakaris, H., Fujita, N., Ishihama, A. & Pittard, A. J. (1997) *J. Bacteriol.* **179**, 6187–6191.
- Tang, H., Severinov, K., Goldfarb, A., Fenyo, D., Chait, B. & Ebright, R. H. (1994) *Genes Dev.* **8**, 3058–3067.
- Zhou, Y., Merkel, T. J. & Ebright, R. H. (1994) *J. Mol. Biol.* **243**, 603–610.
- Savery, N. J., Rhodus, V. A., Wing, H. J. & Busby, S. J. W. (1995) *Biochem. J.* **309**, 77–83.
- Ashby, M. K. (2004) *FEMS Microbiol. Lett.* **231**, 277–281.
- Gerharz, T., Reinelt, S., Kaspar, S., Scapozza, L. & Bott, M. (2003) *Biochemistry* **42**, 5917–5924.
- Lee, A. I., Delgado, A. & Gunsalus, R. P. (1999) *J. Bacteriol.* **181**, 5309–5316.
- Lesley, J. A. & Waldburger, C. D. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 30827–30833.
- Nakamura, H., Kumita, H., Imai, K., Iizuka, T. & Shiro, Y. (2004) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**, 2742–2746.
- Jeon, Y. H., Negishi, T., Yamazaki, T., Fujita, N., Ishihama, A. S. & Kyogaku, Y. (1995) *Science* **270**, 1495–1497.
- Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A. & Struhl, K. (1991) *Current Protocols in Molecular Biology* (Wiley, New York).
- Ramos, J. L., Duque, E., Huertas, M. J. & Haidour, A. (1995) *J. Bacteriol.* **177**, 3911–3916.
- Ramos-González, M. I., Olson, M., Gatenby, A. A., Mosqueda, G., Manzanera, M., Campos, M. J., Vilchez, S. & Ramos, J. L. (2002) *J. Bacteriol.* **184**, 7062–7067.
- Marqués, S., Gallegos, M. T., Manzanera, M., Holtel, A., Timmis, K. N. & Ramos, J. L. (1998) *J. Bacteriol.* **180**, 2889–2894.
- Ménard, R., Sansonetti, P. J. & Parsot, C. (1993) *J. Bacteriol.* **175**, 5899–5906.
- Ilves, H., Horak, R., Teras, R. & Kivisaar, M. (2004) *Mol. Microbiol.* **51**, 1773–1785.
- Platt, T., Meueler-Hill, B. & Miller, J. (1972) in *Experiments in Molecular Genetics*, ed. Miller, J. (Cold Spring Harbor Lab. Press, Woodbury, New York) pp. 352–355.
- Guazzaroni, M. E., Terán, W., Zhang, X., Gallegos, M. T. & Ramos, J. L. (2004) *J. Bacteriol.* **186**, 2921–2927.
- Wiseman, T., Williston, S., Brandts, J. F. & Lin, L. N. (1989) *Anal. Biochem.* **179**, 131–137.

Hierarchical binding of the TodT response regulator to its multiple recognition sites at the *tod* pathway operon promoter

Jesús Lacal, María-Eugenia Guazzaroni, Andreas Busch, Tino Krell, and Juan L. Ramos

Las proteínas TodS y TodT forman un sistema regulador de dos componentes altamente específico que controla la expresión de los genes implicados en la degradación de tolueno, benceno y etilbenceno a través de la ruta de la tolueno dioxigenasa (TOD). Los genes catabólicos de la ruta TOD se transcriben desde un único promotor denominado P_{todX} una vez que el regulador TodT es fosforilado por la kinasa sensora TodS en respuesta a los substratos de dicha ruta. En este capítulo mostramos que TodT es un monómero en solución y que se une específicamente a tres sitios en el promotor P_{todX} , centrados en las posiciones -57, -85 y -106, respecto al sitio de inicio de la transcripción. Los sitios -85 y -106 son pseudopalíndromos, mientras que el sitio -57 es la mitad de un palíndromo. La unión de TodT a sus dianas en el ADN es secuencial, como se muestra con los geles en retardo y ensayos de improntas *in vitro*. La afinidad de unión de TodT a cada sitio, determinada por titulación calorimétrica isotérmica, es $1.8 \pm 0.2 \mu\text{M}$, $5 \pm 0.4 \mu\text{M}$ y $6.3 \pm 0.8 \mu\text{M}$ para los sitios -106, -85 y -57 respectivamente, y con una estequiometría de unión de 1 monómero de TodT por cada mitad de los elementos palindrómicos. Mediante análisis mutacional de dichos sitios de unión se encontró que los tres sitios contribuyen positivamente a la transcripción desde P_{todX} , siendo el sitio de mayor importancia el más alejado con respecto al elemento extendido -10 del promotor. C-TodT, una variante truncada de TodT que contiene el dominio C-terminal de la proteína y que porta el dominio de unión al ADN, se une *in vitro* a los tres sitios con afinidades parecidas a las de la proteína no truncada. Sin embargo, C-TodT, a diferencia de TodT, no activa la transcripción de P_{todX} *in vitro*. En este capítulo discutimos las consecuencias de la organización de los sitios de unión en el control transcripcional y el papel del dominio N-terminal de TodT como elemento necesario para las debidas interacciones con otros elementos transcripcionales.

Hierarchical Binding of the TodT Response Regulator to Its Multiple Recognition Sites at the *tod* Pathway Operon Promoter

Jesús Lacal, María Eugenia Guazzaroni, Andreas Busch, Tino Krell and Juan L. Ramos*

Department of Environmental Protection, Estación Experimental del Zaidín, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Calle Profesor Albareda, 1, E-18008 Granada, Spain

Received 29 August 2007;
received in revised form 30 November 2007;
accepted 4 December 2007
Available online 8 December 2007

The TodS and TodT proteins form a highly specific two-component regulatory system that controls the expression of genes involved in the degradation of toluene, benzene, and ethylbenzene via the toluene dioxygenase pathway. The catabolic genes of the toluene dioxygenase pathway are transcribed from a single promoter called P_{todX} once the response regulator TodT is phosphorylated by the TodS sensor kinase in response to pathway substrates. We show here that TodT is a monomer in solution and that it binds to three specific sites in the P_{todX} promoter, centered at -57, -85, and -106 with respect to the transcription start site. The -85 and -106 sites are pseudopalindromic, whereas the -57 site is half a palindrome. TodT binding to its target sites is sequential, as shown by electrophoresis mobility gel shift assays and footprinting. The binding affinity values of TodT, as determined by isothermal titration calorimetry, are 1.8 ± 0.2 , 5 ± 0.4 , and 6.3 ± 0.8 μM for the -106, -85, and -57 sites, respectively, and the binding stoichiometry is one monomer per half-palindromic element. Mutational analysis revealed that all three sites contribute to P_{todX} strength, although the most relevant site is the distal one with respect to the -10 extended element of the downstream promoter element. The C-TodT [C-terminal TodT fragment (amino acids 154–206)], a truncated variant of TodT that contains the C-terminal half of the protein bearing the DNA binding domain, binds *in vitro* to all three sites with affinity similar to that of the full-length protein. However, C-TodT, in contrast to the full-length regulator, does not activate *in vitro* transcription from P_{todX} . We discuss the consequences of the organization of the binding sites on transcriptional control and propose that the N-terminal domain of TodT is necessary for appropriate interactions with other transcriptional elements.

© 2007 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: TodT; *Pseudomonas*; response regulator; sensor kinase; DNA–protein interactions

Edited by J. Karn

Introduction

Bacteria frequently respond to environmental cues by changing their pattern of transcription.¹ One of

*Corresponding author. E-mail address: jlramos@eez.csic.es.

Abbreviations used: C-TodT, C-terminal TodT fragment (amino acids 154–206); EMSA, electrophoretic mobility shift assay; HTH, helix–turn–helix; IHF, integration host factor; ITC, isothermal titration calorimetry; RR, response regulator; TCS, two-component regulatory system.

the systems bacteria most frequently use to sense chemical or physical changes in the environment is the two-component regulatory system (TCS), which typically consists of a histidine protein kinase that functions as an environmental sensor and a response regulator (RR) that mediates the transcriptional process.^{2–6} The sensor kinase is usually autophosphorylated in response to cognate signals and subsequently transfers the phosphate to the RR protein. These regulators act as phosphorylation-activated switches that often mediate a cellular response through transcriptional regulation.^{7,8} Among the processes regulated by TCS in bacteria are host

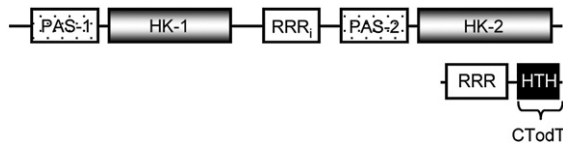


Fig. 1. Schematic representation of the functional domains of TodS and TodT. The upper scheme shows the 108-kDa TodS protein that comprises an N-terminal domain and a C-terminal PAS sensor domain that in each case is followed by a histidine kinase (HK) domain linked by a central RR domain (RRR_i).^{5,18} The lower scheme shows the 28-kDa TodT protein that comprises a phosphorylation RR domain (RRR) at its N-terminus and an HTH DNA binding domain located at its C-terminus.⁵

invasion, drug resistance, Mg²⁺ homeostasis, motility, phosphate uptake, carbon utilization (cellobiose, phenol, etc.), osmoregulation, and nitrogen fixation.^{9–15}

A number of strains of the species *Pseudomonas putida* use toluene through the toluene dioxygenase pathway.^{16,17} Expression of the catabolic *todXFC1C2BADEGIH* operon takes place from a single promoter termed P_{todX}, located upstream from the *todX* gene.^{5,17–19} Its activation is mediated by the TodS/TodT TCS in response to toluene and other aromatic hydrocarbons.^{5,18–20} The *todST* genes, located downstream from *todH*, form an independent operon that is expressed constitutively.^{18,19}

TodS is a 108-kDa protein that belongs to a subfamily of sensor histidine kinases that comprises two supradomains, each containing a PAS sensor domain and a histidine kinase domain.^{21–23} These supradomains are separated by the receiver domain of an RR (Fig. 1). TodT exhibits high sequence similarity to StyR (47.4% identity), which is the RR of the StyS/StyR TCS present in several *Pseudomonas* species for styrene degradation.^{24–26} Elucidation of the three-dimensional structure of StyR showed that it is composed of an N-terminal regulatory domain and a C-terminal DNA binding domain, both separated by an α -helical linker region.²⁷ The C-

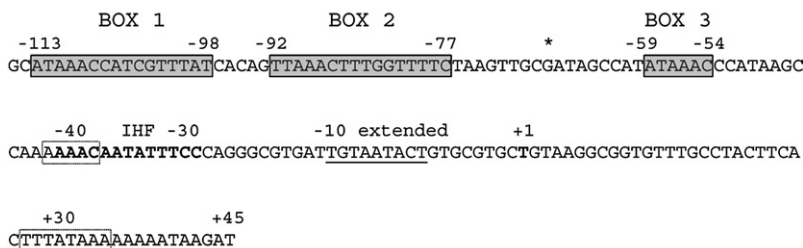
terminal DNA binding domain of StyR is structurally homologous to the FixJ/NarL family of regulators^{28,29} and is composed of four α -helices (α 6– α 9 in the three-dimensional structure of the protein); of these helices, α 8 is the one that recognizes its cognate target sites in DNA.²⁷ In TodT, the C-terminal domain has about 65 amino acids and contains a helix–turn–helix (HTH) domain¹⁸ that is highly similar to StyR.

The molecular mode of action of the TodS/TodT TCS has been studied in *P. putida* F1 and DOT-T1E strains.^{5,18,20} TodS exhibits basal autophosphorylation activity that increases in the presence of toluene and is translated as an increase in the rate of transphosphorylation of TodT.^{5,20} TodT-P is the active form of the RR that induces RNA polymerase to transcribe from the P_{todX} promoter.

The P_{todX} promoter structure resembles that of the “extended promoter” type recognized by σ^{70} , namely, a relatively well-defined -10-bp hexamer with a GT sequence upstream from the -10 hexamer.^{30–34} As in other -10 extended promoters, no conserved -35 consensus region was found in P_{todX} (see Fig. 2). This type of extended promoter has been reported to be under the control of positive regulators that bind to sites close to the -35 hexamer and thus recruit RNA polymerase.^{30,35,36} However, our earlier studies on P_{todX} identified two TodT binding sites located far from the -35 region that were centered at -85 and -106 (Fig. 2 and Ref. 5). We also identified an integration host factor (IHF) binding site centered at -38 in P_{todX} (Fig. 2) and proposed that IHF bends P_{todX} to allow interactions between TodT-P bound far upstream from the RNA polymerase site and the RNA polymerase bound at the -10 region.

This study was undertaken to elucidate the interaction of TodT with P_{todX} *in vivo* and *in vitro*. Our new set of results identified a third half-site binding site for TodT that is closer to the -35 region as compared with the other two binding sites identified previously. Microcalorimetric analysis, electrophoretic mobility shift assay (EMSA), and

(a)



(b)

```

BOX 1  ATAAACCATCGTTTAT
BOX 2  TTAACACTTTGGTTTTC
BOX 3  ATAAACCCATAAGCCA

```

Fig. 2. Sequence of P_{todX} promoter. (a) Nucleotide sequence of P_{todX} between -115 and +45. Gray boxes show the two pseudopalindromic regions (BOX 1 and BOX 2) recognized by the TodT regulator identified previously⁵ and the half-site identified in this study (BOX 3). Empty boxes show potential TodT binding sites identified *in silico* that were however not bound by TodT. The IHF binding site is shown in bold. The -10 extended region is underlined. The +1 transcription start point is indicated. (b) Alignment of the TodT binding sites identified previously (TodT box 1 and TodT box 2) with the TodT box 3 identified in this study.

footprint analysis revealed that TodT binding to its target sites is hierarchical, exhibiting the highest affinity for the most distal site. Mutational analysis indicated that all three sites contribute to the strength of P_{todX} . A mutant variant of TodT called C-TodT [C-terminal TodT fragment (amino acids 154–206)] bound to all three sites *in vitro* with an affinity similar to that of the full-length protein. However, unlike the wild-type protein, C-TodT does not promote *in vitro* transcription, which suggests that the N-terminal domain of TodT is important for interactions with the transcriptional machinery.

Results

TodT is a monomer in solution

We previously showed that the apparent TodT binding targets were two pseudopalindromes located far upstream (between -77 and -113) from the RNA polymerase binding site (Fig. 2 and Ref. 5). This type of DNA target element is often recognized by dimeric proteins or even higher-order polymeric forms.^{37–39} On the other hand, StyR, a protein highly homologous to TodT, was suggested to be a monomer in solution and a dimer upon phosphorylation.^{25,26} To determine the oligomeric state of TodT, we tested a homogenous protein sample by gel permeation chromatography, as described in Materials and Methods, and found that TodT eluted as a single symmetrical peak (Fig. 3). When we plotted the resulting elution volume of TodT onto the calibration curve, an apparent molecular mass of 28 kDa was obtained (Fig. 3), which is consistent with TodT being a monomer in solution.

Although isothermal titration calorimetry (ITC) is frequently used to study binding interactions, this technique can also be employed to monitor chemical reactions. Such experiments consist typically of an injection of one large aliquot of protein into a substrate solution.⁴⁰ To this end, TodT and C-TodT were thoroughly dialyzed into the buffer specified in the legend to Fig. 4. Initial experiments involved the injection of 50 μ l of 19 μ M TodT into the dialysis buffer (Fig. 4). A small exothermic signal was observed upon injection, and once the injection was completed, the heat signal moved back to the baseline in consistency with heats corresponding solely to heats of dilution. The following experiment involved the injection of the same protein into the dialysis buffer containing 2 mM carbamoyl phosphate (continuous line in Fig. 4). A large exothermic signal was recorded upon injection, which decreased rapidly after the injection process was completed. Therefore, this event is assumed to correspond to the binding of carbamoyl phosphate to TodT. Most importantly, the heat signal did not return to the baseline following the completion of the binding process, and a constant heat change of around -0.15 μ cal/s was registered. This ongoing heat release is proposed to correspond to a chemical

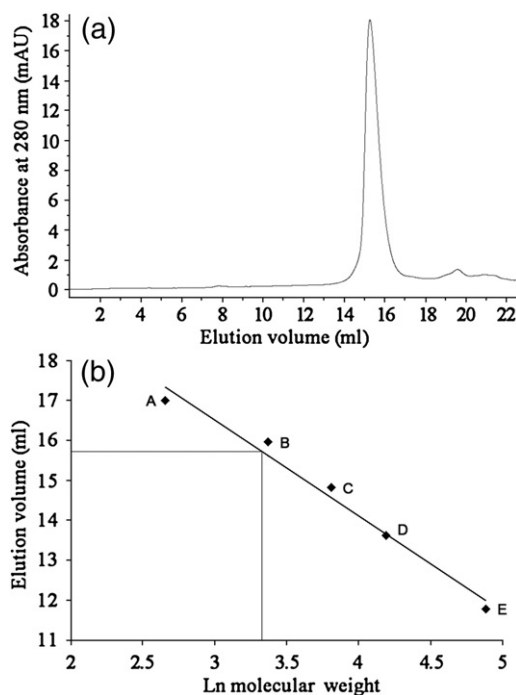


Fig. 3. Determination of the oligomeric state of TodT by analytical gel filtration. (a) Chromatogram from the analysis of 28 μ M purified TodT. (b) Calibration curve using protein standards: lactalbumin (A; 14 kDa), carbonic anhydrase (B; 29 kDa), chicken egg albumin (C; 45 kDa), bovine serum albumin monomer (D; 66 kDa), and bovine serum albumin dimer (E; 132 kDa). Shown is a linear regression of the resulting five elution volumes. The elution volume and the corresponding molecular mass of TodT are indicated.

reaction, most probably the phosphotransfer from carbamoyl phosphate to the phosphoaccepting D57 of TodT.

This interpretation is supported by two other control experiments. Previous assays revealed that D57 is the phosphoacceptor group in TodT. We carried out the same assay with carbamoyl phosphate and C-TodT. The injection of C-TodT into the dialysis buffer containing 2 mM carbamoyl phosphate showed negligible heat changes (Fig. 4), which point towards the absence of binding or chemical reactions. In another control experiment, TodT was heated to 95 $^{\circ}$ C for 5 min, causing the irreversible denaturation of the protein. Injection of this TodT sample produced a thermogram (not shown) similar to the one obtained for the injection of C-TodT, implying that TodT phosphorylation occurs only with the folded protein. This series of results supports that TodT is efficiently phosphorylated by carbamoyl phosphate.

When TodT-P was submitted to gel filtration analysis, a single peak was observed, which corresponded to TodT-P eluting as a 28-kDa protein. To obtain further support to claim that phosphorylated TodT is a monomer and since the theoretical isoelectric point of TodT is rather basic (pI , ~7.8), we analyzed the oligomeric form of TodT-P using native

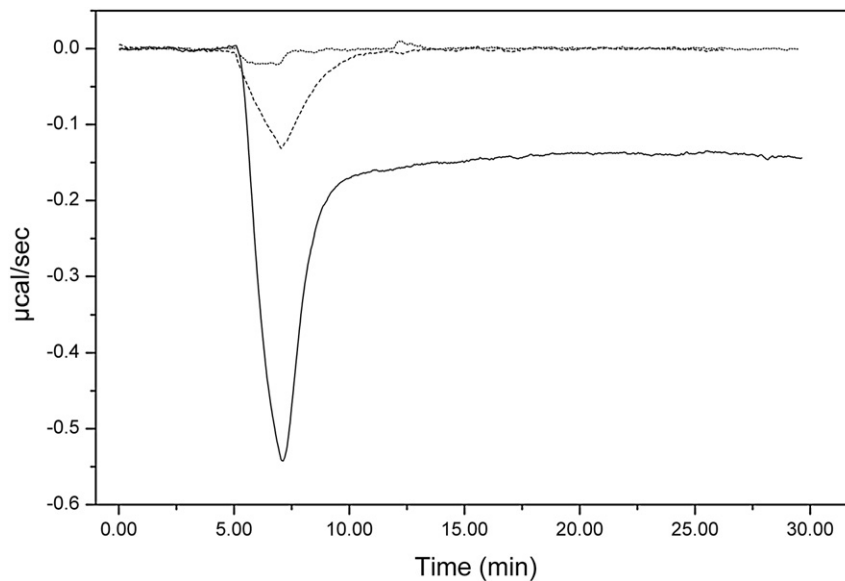


Fig. 4. Microcalorimetric analysis of the reaction of TodT with carbamoyl phosphate. TodT and C-TodT were dialyzed overnight into the following buffer: 43 mM Tris/HCl, 200 mM KCl, 300 mM imidazole, 10 mM MgCl₂, 10% (vol/vol) glycerol, and 1 mM DTT, pH 7.3. At 25 °C, a single 50- μ l aliquot of protein (19 μ M) was injected into the sample cell-containing dialysis buffer with or without 2 mM carbamoyl phosphate. Dashed line indicates injection of TodT into dialysis buffer; continuous line, injection of TodT into dialysis buffer containing 2 mM carbamoyl phosphate; and dotted line, injection of C-TodT into dialysis buffer containing 2 mM carbamoyl phosphate.

gel electrophoresis†. The results showed no difference in migration between TodT and TodT-P, suggesting that phosphorylated and nonphosphorylated TodT forms are monomeric. We also tested the TodT sample treated with carbamoyl phosphate in cross-linking assays with glutaraldehyde. We found that much of the protein (>80%) appeared as a monomer when separated in PAGE gels. The rest of the sample was assumed to represent dimers, trimers, and tetramers according to random cross-linking of monomers (not shown). Furthermore, when TodT was phosphorylated with the TodS sensor kinase and [³²P]ATP and then subjected to cross-linking assays, the TodT protein also behaved as a monomer (not shown).

Identification of an additional TodT binding site in the P_{todX} promoter

Based on the monomeric state of TodT, we hypothesized that each of the half-sites of the two previously identified pseudopalindromes might constitute the target of a single TodT monomer. We aligned the two previously identified TodT boxes (boxes 1 and 2 in Fig. 2b), which yielded a conserved consensus palindrome 5'-TAAACN₄-GTTTA/T-3'. Using the half-motif 5'-TAAAC-3' sequence, we carried out a detailed *in silico* analysis of P_{todX} between -280 and +90 to search for additional potential TodT recognition sites. This analysis revealed three additional half-sites between -59

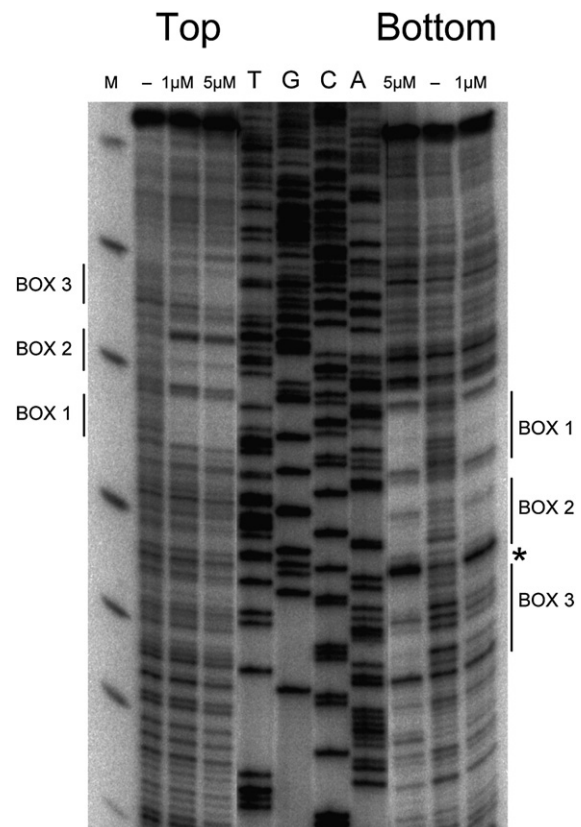


Fig. 5. Identification of a third TodT binding site at P_{todT}. DNase I footprint analyses were carried out as detailed in Materials and Methods in the absence of TodT (lanes marked with -) or in the presence of 1 and 5 μ M TodT as indicated. The DNA sequence ladder is marked TGCA. Vertical lines indicate the region protected by TodT, which corresponded to BOX 1, BOX 2, and BOX 3. The asterisk marks a hyperactive G at -68.

† According to the protocol available at http://wolfson.huji.ac.il/purification/Protocols/PAGE_Acidic.html

and -54, -42 and -38, as well as +31 and +35. It should be noted that no adjacent complementary mirror image of these sequences was found, which means that these sequences are not part of a palindrome or a pseudopalindrome. In addition, the -42 to -38 half-site is part of the IHF binding site previously found by footprint analysis (Fig. 2a).

To test recognition by TodT of all of these new putative half-site binding sites, we carried out footprint analyses along the 352-bp fragment containing the P_{todX} promoter with 1 and 5 μ M of TodT. The footprint revealed that a G at -68 was hyperreactive (see bottom strand in Fig. 5) and that the higher the TodT concentration was, the stronger the intensity of the band was. At the lowest concentration of TodT (1 μ M), we found protection only in 5' with respect to G -68, corresponding to the two previously identified sites (-113/-98, called TodT box 1, and -92/-77, called TodT box 2) (see Fig. 5). At a higher concentration of TodT (5 μ M), protection in 3' with respect to G -68 was found. This new protected region covered -54 to -59 (Fig. 5) and was called TodT box 3. Within this segment was the 5'-TAAAC-3' motif identified by DNA alignment of sequences in boxes 1 and 2. The footprint ruled out the possibility of the potential TodT box overlapping the site recognized by IHF and the site located downstream from +1 and between +31 and +35.

The three TodT boxes identified *in vitro* have a positive effect in P_{todX} transcription

The newly identified TodT box 3 is the most proximal to the RNA polymerase binding site, and its potential role in the transcription of the *tod* promoter might have been previously overlooked. To investigate the physiological relevance of the three binding sites identified for TodT *in vitro*, we

constructed P_{todX} promoter variants containing several point mutations in each of the three TodT boxes, as described in Materials and Methods. The introduced mutations changed TodT box 1 from 5'-CATAAACCATCGTTTATC-3' to 5'-CACAGATCATCGCTTCTC-3', TodT box 2 from 5'-GTAAACTTTGGTTTT-3' to 5'-GTCAGATTTGGCTTT-3', and box 3 from 5'-CCATATAAACCC-3' to 5'-CCATACAGATCC-3'. We then fused the mutant promoters to *lacZ* in pMP220.⁴¹ The resulting P_{todX}^* :*lacZ* fusions were transformed in DOT-T1E (pMIR66), and β -galactosidase assays were carried out with cells growing in the absence and those growing in the presence of toluene. [Plasmid pMIR66 (Table 1), bearing the *todS/todT* genes, guarantees that the amount of both TodS and TodT proteins allows maximal levels of transcription and that, because of the absence of limitations in the transcriptional processes, the quality of the binding sites for TodT can be evaluated more critically.] For all constructions, the basal levels of activity in the absence of toluene were measured and found to be around 40 Miller units in all cases. In the presence of toluene, we found that the mutations in P_{todX} resulted in decreased β -galactosidase activity, although the magnitude of the decrease was influenced by the site of the mutation (see Fig. 6). The decrease in β -galactosidase expression with the P_{todX}^* mutant bearing a mutated TodT box 1 was almost 20-fold (mutant in pJLC10) compared with the wild-type promoter. The effect was less notable with the P_{todX} mutants in the other two TodT boxes: the decrease in β -galactosidase activity was almost 3-fold for a mutant in box 2 (see pJLC20) and was about 1.6-fold for a mutant in box 3 (see pJLC30). Since TodT box 2 and TodT box 3 seemed to play a minor role, we generated a double mutant such that TodT boxes 2 and 3 were mutated as in plasmid pJLC23. *P. putida* DOT-T1E (pJLC23, pMIR66)

Table 1. Bacterial strains and plasmids used in this study

	Relevant characteristics	Reference
<i>Strain</i>		
<i>E. coli</i> DH5 α F'	F' / <i>hsdR17, recA1, gyrA</i>	42
<i>E. coli</i> BL21(DE3)	F ⁻ , <i>ompL, hsdS_B (r⁻_Bm⁻_B) gal, dam, met</i>	43
<i>P. putida</i> DOT-T1E	Tol ⁺ , wild type, Rif ^R	44
<i>P. putida</i> DOT-T1E <i>todST</i>	DOT-T1E, <i>todST</i> : :Km, Tol ⁻	45
<i>Plasmid</i>		
pET28b(+)	Km ^R , protein expression vector	Novagen
pMP220	Tc ^R , <i>lacZ</i> promoter probe	41
pMIR77	Tc ^R , P_{todX}^* : : <i>lacZ</i>	45
pMIR66	Gm ^R , containing the <i>todST</i> genes	45
pJLTodT	pET28b containing <i>todT</i> gene	5
pJLTodTcTer	pET28b encoding C-TodT	This work
pJLC10	Tc ^R , box 1 mutant in P_{todX}^* : : <i>lacZ</i>	This work
pJLC20	Tc ^R , box 2 mutant in P_{todX}^* : : <i>lacZ</i>	This work
pJLC30	Tc ^R , box 3 mutant in P_{todX}^* : : <i>lacZ</i>	This work
pJLC23	Tc ^R , double box 2 and box 3 mutant in P_{todX}^* : : <i>lacZ</i>	This work
pTE103	Plasmid with a strong T7 terminator downstream from the site for cloning the promoters to be studied	43
pTE77	<i>todX</i> promoter cloned into pTE103	This work

Gm^R, Km^R, Rif^R, and Tc^R indicate resistance to gentamicin, kanamycin, rifampicin, and tetracycline, respectively. In addition, Tol⁺ indicates that the strain grows on toluene, whereas Tol⁻ indicates that the strain cannot use toluene as the sole carbon and energy source.

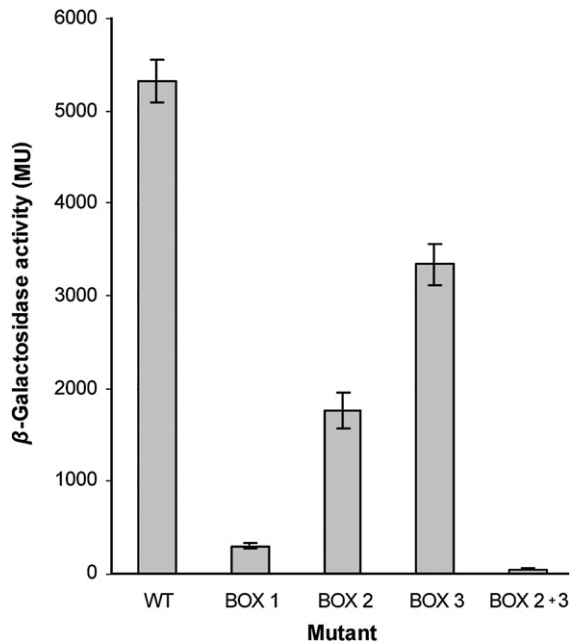


Fig. 6. β -Galactosidase activity determined in *P. putida* DOT-T1E (pMIR66) harboring the wild-type P_{todX} promoter and its mutant derivatives with altered TodT boxes fused to *lacZ*. Bacterial cells were grown in minimal medium as described in Materials and Methods. Plasmids pMIR77, pJLC10, pJLC20, pJLC30, and pJLC23 bore the wild-type (WT) promoter, a promoter with mutations at box 1 (BOX 1), a promoter with mutations at box 2 (BOX 2), a promoter with a mutation at box 3 (BOX 3), and a promoter with double mutations at box 2 and box 3 (BOX 2+3), respectively. β -Galactosidase levels corresponded to cultures grown in the presence of toluene for 4 h. Data are the mean \pm SD of three to five assays.

exhibited very low β -galactosidase activity levels in the presence of toluene (Fig. 6). This indicates that mutations in the two TodT binding sites that are most proximal to the RNA polymerase binding sites strongly reduced expression from P_{todX} , which

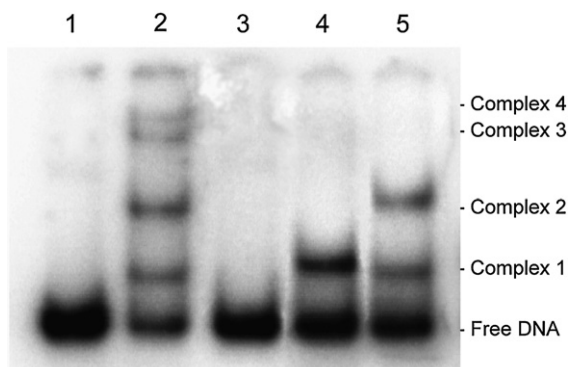


Fig. 7. Specific binding of TodT to P_{todX} and its mutant variants in EMSA. Incubation conditions and electrophoresis of DNA-protein complexes were as described in Materials and Methods. Lane 1, control DNA without protein; lane 2, wild-type DNA promoter with TodT; lane 3, TodT box 1 mutant with TodT; lane 4, TodT box 2 mutant promoter with TodT; and lane 5, TodT box 3 mutant promoter with TodT.

suggests that the two proximal boxes are important for efficient transcription.

To further analyze how the mutations in the different TodT boxes affect TodT binding to the mutant promoters, EMSAs were carried out with the wild-type promoter and mutants in each of the TodT binding boxes. In these assays, 250 nM TodT was added to 32 P-labeled 352-bp wild-type or mutant promoters (2 nM). For the wild-type promoter, we observed four retarded bands (Fig. 7), whereas no retarded band was obtained for the mutant promoter in TodT box 1 (Fig. 7). For the mutant in TodT box 2, only one retarded band appeared, whereas for the

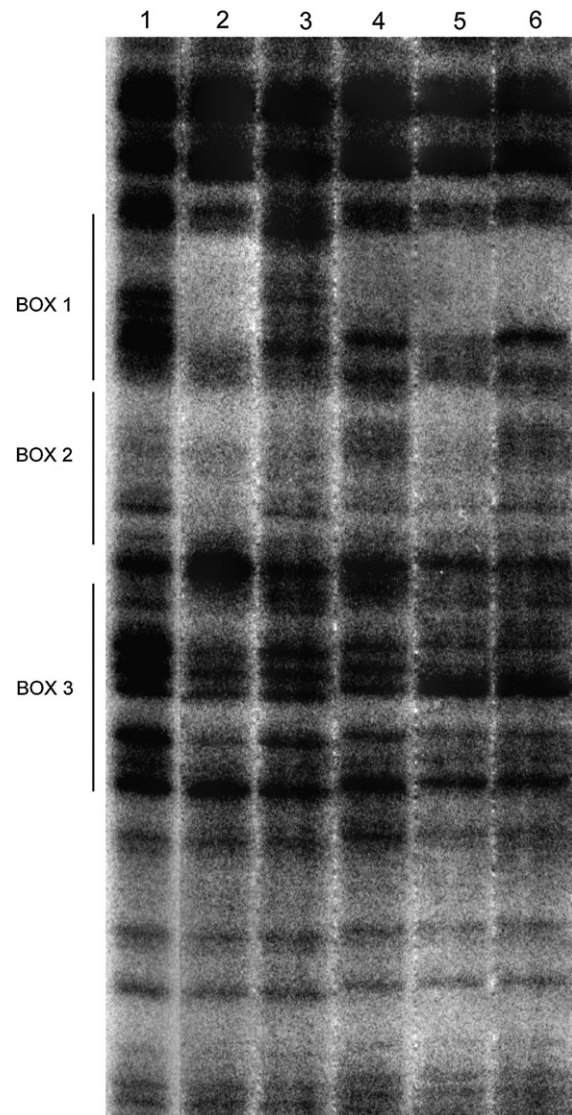


Fig. 8. Footprint of TodT on P_{todX} mutant variants. Conditions for DNase I footprint analyses are described in Materials and Methods. The DNA source was a 352-bp DNA fragment containing the wild-type TodT sequence in the absence of TodT (lane 1) or with 5 μ M TodT (lane 2). Assays were also done with 5 μ M TodT and a 352-bp DNA fragment bearing the P_{todX} promoter with mutations in BOX 1 (lane 3), BOX 2 (lane 4), BOX 3 (lane 5), and BOX 2 and BOX 3 (lane 6). Vertical lines indicate the region protected by TodT in BOX 1, BOX 2, and BOX 3.

mutant in TodT box 3, two retarded bands were clearly distinguished (Fig. 7). With the double mutant in TodT boxes 2 and 3, we observed a single retarded band (not shown). Since no retarded band was observed in the P_{todX} promoter with an altered TodT box 1, we suggest that TodT binding to this site is a necessary prerequisite for binding at the remaining sites, which is consistent with positive cooperativity. To further confirm the results of the EMSAs, we carried out DNase I footprint assays with mutant DNA fragments bearing mutated box 1, box 2, box 3, or boxes 2 and 3. The footprint confirmed the EMSA results: for a mutant in box 1, no protection at all by TodT was observed throughout the length of the P_{todX} promoter (Fig. 8). For the mutant in box 2, we found protection in box 1 but not in box 3, which is in agreement with the single retarded band seen in EMSA when the fragment used was the mutant in box 2 or boxes 2 and 3. For the mutant in box 3, two protection areas (Fig. 8) were observed in accordance to the two retarded bands seen in EMSA.

Thermodynamic characterization of the molecular interactions between TodT and the C-TodT protein with individual TodT boxes

To gain further insights into the interactions of TodT with its target binding sites, we investigated the affinity of TodT for each of these sites. To this end, a solution of 8 μ M TodT was subjected to microcalorimetric titration with a 20-bp nonspecific DNA duplex (see sequence in Table 2) and specific DNA duplexes corresponding to each of the three individual TodT binding sites (see sequence in Table 2). The titration of TodT with the nonspecific DNA duplex showed small and uniform peaks representing heats of dilution only (Fig. 9, top panel). Titration curves of TodT with DNA duplexes corresponding to TodT box 1, box 2, and box 3 gave rise to endothermic heat signals (Fig. 9). The derived thermodynamic parameters are shown in Table 3. These demonstrate that TodT binds, under the experimental conditions used, specifically to the three boxes and not to nonspecific DNA sequences.

Interaction of TodT with the three TodT binding sites was in all cases driven by favorable entropy changes ($T\Delta S$ between 34 and 44 kcal/mol), which were counterbalanced by unfavorable enthalpy

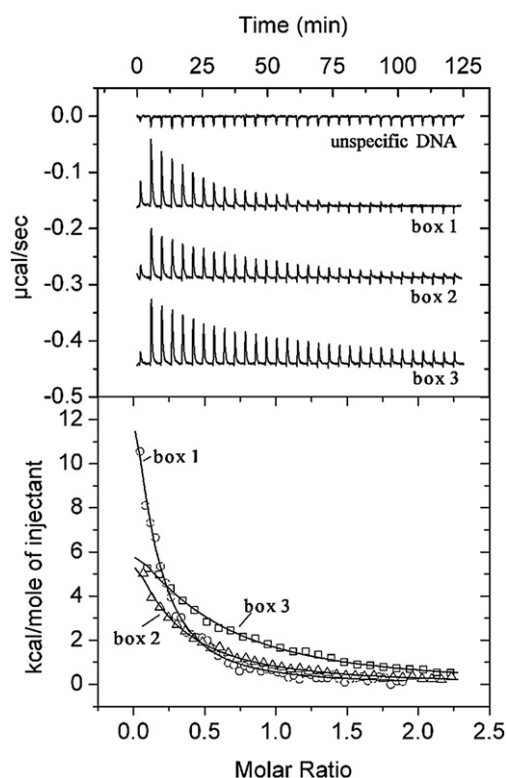


Fig. 9. Microcalorimetric titrations of TodT with 20-mer DNA fragments containing box 1, 2, or 3 and with nonspecific DNA. The upper panel shows raw ITC data; nonspecific DNA: titration of 9 mM TodT with 9.6- μ l aliquots of a 20-mer nonspecific DNA (60 mM; see Table 2 for sequence); box 1: titration of 9 mM TodT with 94 μ M of a 20-mer oligonucleotide corresponding to the sequence of box 1 (injection volume=4.8 μ l); box 2: titration of 9 mM TodT with 92 μ M of a 20-mer oligonucleotide corresponding to the sequence of box 2 (injection volume=8.0 μ l); and box 3: titration of 6.4 mM TodT with 77 μ M of a 20-mer oligonucleotide corresponding to the sequence of box 3 (injection volume=9.6 μ l). The lower panel shows integrated and, for dilution, corrected peak areas, analyzed according to the one-binding-site model developed by ORIGIN (Microcal Software Inc., Northhampton, MA).

changes (27–37 kcal/mol). This tendency is frequently observed for DNA–protein interactions. The enthalpic and entropic values observed for boxes 1 and 2 were very similar, indicating a similar mode of binding. TodT bound with the highest affinity to box

Table 2. Oligonucleotides used in this study

Oligonucleotide	Sequence (5'–3') ^a	Used for/Position
Todbox1	GCATAAACCATCGTTTATCA	20-mer containing TodT box 1 for ITC
Todbox2	AGTTAAACTTTGGTTTCTA	20-mer containing TodT box 2 for ITC
Todbox3	ATATAAACCCATAAGCCAAA	20-mer containing TodT box 3 for ITC
NSD	CCAAAAACAATATTCCCA	20-mer nonspecific for TodT, used in ITC assays
Box 1 left	GCATAAACCATCGTTTATCA	20-mer containing the left pseudopalindromic half and a random sequence on the right-hand portion
Box 1 right	GATGGATTCATCGTTTATCA	20-mer containing the right pseudopalindromic half and a random sequence on the left-hand part

^a Complementary oligonucleotides were used for the annealing to generate double-stranded DNA.

Table 3. Thermodynamic parameters derived from the calorimetric titration of TodT and C-TodT with its DNA binding sites

DNA	Ligand	K_D (μM)	K_A (M^{-1})	ΔH (kcal/mol)	$T\Delta S$ (kcal/mol)	ΔG (kcal/mol)
Box 1	TodT	1.8 ± 0.2	$(5.5 \pm 0.5) \times 10^5$	36.5 ± 7	44.2 ± 7	-7.7 ± 0.1
Box 2	TodT	5 ± 0.4	$(2.0 \pm 0.2) \times 10^5$	35.9 ± 17	43.0 ± 17	-7.1 ± 0.1
Box 3	TodT	6.3 ± 0.8	$(1.6 \pm 0.2) \times 10^5$	27.4 ± 8	34.4 ± 10	-7.0 ± 0.1
Box 1 left	TodT	8.3 ± 0.6	$(1.2 \pm 0.1) \times 10^5$	10.9 ± 1	17.7 ± 0.7	-6.8 ± 0.1
Box 1 right	TodT	6.7 ± 0.6	$(1.5 \pm 0.1) \times 10^5$	11.7 ± 0.1	18.6 ± 1	-6.9 ± 0.1
Box 1	C-TodT	0.72 ± 0.04	$(1.4 \pm 0.1) \times 10^6$	12.9 ± 0.1	21.1 ± 0.2	-8.2 ± 0.1
Box 2	C-TodT	5.3 ± 0.5	$(1.9 \pm 0.2) \times 10^5$	10.0 ± 0.7	17.1 ± 0.7	-7.1 ± 0.1
Box 3	C-TodT	8.3 ± 0.6	$(1.2 \pm 0.1) \times 10^5$	23.6 ± 0.3	30.4 ± 1	-6.8 ± 0.1
Box 1 left	C-TodT	4.0 ± 0.3	$(2.5 \pm 0.2) \times 10^5$	9.9 ± 0.3	17.1 ± 0.3	-7.2 ± 0.1
Box 1 right	C-TodT	7.5 ± 0.7	$(1.3 \pm 0.1) \times 10^5$	7.7 ± 0.6	14.5 ± 0.6	-6.8 ± 0.1

Assay conditions are given in Materials and Methods.

1 ($K_D = 1.8 \pm 0.2 \mu\text{M}$). The K_D values of boxes 2 and 3 were 5 ± 0.4 and $6.3 \pm 0.8 \mu\text{M}$, respectively, which are in agreement with the hierarchical sequence of site occupation in the footprint assay. We determined the binding stoichiometry from these titration data and found that two monomers bound to box 1, two monomers bound to box 2, and one monomer bound to box 3.

Because we found that TodT is a monomer and that it recognizes box 3, which corresponds to the left half-palindrome of boxes 1 and 2, we decided to test the binding of TodT to each of the half-motifs in TodT box 1 as representative of each of the submotifs recognized by TodT. These assays were carried out as above except that 20-mer oligonucleotides conserved the left (box 1 left in Tables 2 and 3) or right (box 1 right in Tables 2 and 3) submotif. We found that TodT bound to each of the half-palindromes, albeit, in general, with significantly lower affinity (two- to fourfold) as compared with when the true pseudopalindrome was present. This indicated a potential positive cooperative effect in the binding of two TodT monomers to each side of the box.

The C-terminal end of TodT binds to target DNA but does not promote transcription *in vitro*

Modelling of TodT based on the three-dimensional structure of StyR suggested that the TodT protein contains two domains, an N-terminal input domain containing the phosphoaccepting aspartate and a C-terminal DNA binding domain containing the HTH motif. The DNA binding domain was produced as a recombinant protein (amino acids 154–206) called C-TodT to study the effect of the N-terminal domain on DNA binding of TodT. This protein was purified to homogeneity, and we analyzed its interaction with the three TodT boxes by ITC. The derived thermodynamic parameters are shown in Table 3. The mode of binding was similar to that observed with the full-length protein: The process was driven by entropy changes and counterbalanced by unfavorable enthalpy changes. The K_D values determined for C-TodT were in the same range as those determined for the full-length protein. These data are consistent with a mechanism

by which the presence of the N-terminal domain in the full-length protein does not modulate the affinity of the DNA binding domain at the C-terminal end of the protein.

We further tested whether C-TodT was functionally active in promoting transcription *in vitro*. To this end, we performed *in vitro* transcription assays with linear P_{todX} DNA under the conditions described in Materials and Methods. The data showed that efficient transcription from P_{todX} took place in the presence of RNA polymerase, TodS, TodT, IHF, and toluene. However, when TodT was replaced by C-TodT, no transcription from P_{todX} occurred (not shown).

Discussion

The P_{todX} promoter exhibits features of –10 extended promoters

The conventional model for promoter recognition by σ^{70} is the binding of two regions upstream from the transcription start point, named –10 and –35 because of their spacing relative to the first transcribed base.⁴⁶ The initiation complex is further stabilized by the C-terminal domain of the two α -subunits of the core enzyme, which can interact directly either with upstream DNA or with regulatory proteins.⁴⁷ To add to the complexity of the system, in the case of the so-called –10 extended promoters, which are well characterized in *Escherichia coli*, recognition of the –10 alone is enough for initiation to occur.^{31,33,34}

P_{todX} promoter anatomy revealed that it belongs to the set of –10 extended promoters.³⁰ P_{todX} exhibits the highly conserved TG sequence immediately upstream from the –10 hexamer, the sequence being TGnTATAAT. In the hexamer, the fourth nucleotide (in P_{todX} , it corresponds to position –8 with respect to the transcription start point) is a T, as is also the case in 83 other –10 extended promoters in *E. coli*.³⁰ A typical feature of –10 extended promoters is the absence of a defined –35 region, which is often compensated by the presence of a binding site for transcriptional regulators, as is the case for P_{todX} .

Multiple binding sites for TodT at P_{todX}

We previously reported that TodT binds to two upstream activator sequences located at -92/-77 and -113/-98 and that contacts with the RNA polymerase bound to the promoter downstream element were mediated by an IHF-induced bend. Although all previous experimental evidence supported this model,⁵ in this study, we found that TodT is a monomer in solution and that it also binds to a half-site located between -54 and -59. However, no mirror image of this sequence was found, which rules out the existence of a third pseudopalindrome. The combination of palindromes and half-site binding sites has been found in bacterial promoters where regulators bind multiple sites and different binding positions can affect promoter activity, an example of this being the *pca* operon of *Acinetobacter*, in which palindromes and half-sites combine.^{48,49}

In this study, we analyzed the transcriptional relevance of the three TodT binding sites.⁵ In a series of assays in which we used P_{todX} variants, we disrupted one or two TodT boxes at once. Our results indicated that each of the TodT boxes had a positive effect on promoter strength, although the different TodT boxes contribute differentially to transcription activation. The *in vivo* results indicated that the most distal TodT box 1 is the most critical, whereas mutations in any of the other two boxes had similar and more modest effects. In agreement with this observation is the fact that our ITC data showed that TodT exhibited significantly higher affinity (about threefold) for TodT box 1 than for the other two boxes. Furthermore, TodT box 1 seems to be critical for TodT binding to the other boxes, because we found in EMSA that TodT did not bind to the other two target boxes in P_{todX} when TodT box 1 was mutated. This set of results is evidence not only of the potential hierarchical recognition of sites but also that TodT box 1 nucleates the transcriptional scaffold necessary for P_{todX} expression, since in mutant promoters deprived of TodT box 1, TodT did not bind to the other two TodT boxes. Hierarchical binding of OmpR to multiple binding sites has also been described in the regulation of the *E. coli* porin *ompF* and *ompC* genes, which exhibit at least three upstream binding sites.⁵⁰⁻⁵² In this case, the hierarchy was as that for TodT: The OmpR-P protein bound to the most distal site first, then to the middle site, and lastly to the proximal RNA polymerase binding site.⁵²⁻⁵⁴ Moreover, disruption of the farthest high-affinity site caused the loss of OmpR activity and disrupted hierarchical binding in the entire OmpF region.^{52,53}

We obtained a series of apparently contradictory results when we compared the K_D values for TodT box 2 and TodT box 3 with the footprinting results. The footprint analysis revealed that TodT at low concentrations binds primarily to TodT box 1 and box 2 (see Fig. 3), whereas binding to TodT box 3 was only observed at higher TodT concentrations despite the fact that the apparent affinity *in vitro* of

TodT for box 3 was similar to that for box 2. We attribute this discrepancy between the footprints and the ITC assays to the fact that TodT binds in a positively cooperative way to boxes 1 and 2: Initial binding at box 1 is followed by binding at box 2. With the footprint assay, this cooperativity is obvious at low TodT concentrations in which box 1 and box 2 are simultaneously protected. In this regard, since our biochemical data suggested that TodT is always a monomer, cooperative binding should be transmitted via DNA distortion.

The adjacent location of the IHF site and TodT box 3 may explain why TodT box 3 is a half-site. IHF was shown to induce an almost 180° DNA bend.⁵⁵ Modelling of the DNA bend suggests that two TodT monomers would fail to enter the curved region due to steric hindrance. Therefore, the proximal location of TodT box 3, the IHF binding site, and the downstream element of the promoter suggest potential TodT/IHF interactions and interactions between TodT and the α -subunits of RNA polymerase. In this connection, the TodT monomer bound to box 3 may play a transcriptional role different from that of the TodT bound to pseudopalindromes further upstream. This is consistent with the idea that the transcriptional factors tend to cluster around the -35 region, as might be expected from the contact with the C-terminal domain of the α -subunit.⁵⁶ Without DNA bending, activators bound at a distance more than 20 bases upstream would have difficulty interacting with the C-terminal domain of the α -subunit.^{56,57} The mechanism of transcription activation by TodT may involve the sequential binding of TodT to its binding sites, and, together with IHF, it appears to generate a scaffold that can give rise to a complex set of interactions with RNA polymerase to favor transcription from P_{todX} .

TodT belongs to the NarL family of activators

Two members of the NarL family, NarL of *E. coli* and StyR of *Pseudomonas* sp. Y, have been crystallized and shown to be composed of two domains, an N-terminal one at which phosphorylation occurs and the DNA binding domain at the C-terminal end.^{27,58} Phosphorylation of the RRs can have different outcomes. In the case of NarL, the nonphosphorylated full-length NarL protein did not bind to its DNA sequence in the promoter,^{9,59} whereas phosphorylation led to DNA binding.⁵⁸ Removal of the N-terminal domain of NarL resulted in a C-NarL protein that binds DNA with a similar affinity to the phosphorylated full-length NarL protein.⁵⁸ Phosphorylation of RRs has been shown to promote dimerization (and activation) of StyR and FixJ, as a result of modification of the protein structure at a specific surface location.^{24,60,61} Both monomeric and dimeric StyR species bound specifically to the P_{styA} promoter; however, the dimeric form shifts more than 90% of the P_{styA} probe at a concentration ~10-fold lower than that with the monomeric species. In contrast to NarL and StyR, phosphorylation of TodT failed to significantly alter affinity for its target

sequences. Also consistent with these findings is that C-TodT, a truncated variant of TodT, bound to the TodT DNA boxes with a similar affinity to that of the full-length protein (see Table 3). This suggests that the N-terminal end of TodT does not influence binding to target sequences regardless of its phosphorylation state. However, C-TodT did not promote transcription *in vitro* from P_{todX} and a TodT mutant lacking the phosphoaccepting aspartate was unable to stimulate transcription. Hence, phosphorylation of TodT could cause conformational changes in the N-terminal domain, which may favor interactions with RNA polymerase. Although the mentioned regulators belong to the same family, defined on the basis of sequence similarities, it is obvious that there are striking differences in their mode of action.

In summary, the P_{todX} promoter belongs to the “–10 extended promoter” type and does not exhibit a defined –35 motif. Instead, this region contains an IHF binding site plus a proximal half-site for TodT. Mutations in the IHF binding site⁵ or in the –54/–59 region (TodT box 3) affect P_{todX} transcription probably because they alter interactions with RNA polymerase and DNA structure. Further upstream are two pseudopalindromes, each of which is recognized by two TodT monomers. Binding to the farthest site facilitates entry into box 2 and box 3, whereupon, we suggest, a complex scaffold is formed and P_{todX} is transcribed upon activation of TodT by phosphorylation, a process mediated by TodS in response to toluene.

Materials and Methods

Bacterial strains and plasmids

The relevant characteristics of the bacterial strains and plasmids used in this study are listed in Table 1.

Recombinant DNA techniques

Preparation of plasmid DNA, purification of DNA fragments, and restriction, ligation, and transformation of *E. coli* were carried out with standard procedures.⁶² PCR amplifications were performed with *Eurotaq* polymerase (Euroclone) and the pMIR77 ($P_{todX}::lacZ$) plasmid as the DNA template (Table 1). The sequences of oligonucleotides used for amplification in this study will be provided on request. Automated DNA sequencing was done with a Perkin Elmer 3100 autoanalyzer.

Site-directed mutagenesis of the P_{todX} promoter and determination of β -galactosidase activity

We generated three mutant promoters with changes around positions –106, –85, and –57 and another mutant in which changes at –85 and –57 were combined. The mutant promoters were generated with overlapping PCR mutagenesis, as described before,⁶³ and were fused to *lacZ* in pMP220 to respectively produce pJLC10, pJLC20, pJLC30, and pJLC23.

P. putida DOT-T1E cells harboring pMIR66 and pMIR77 or the pJLC series were grown overnight at 30 °C in M9

minimal medium with 0.5% (wt/vol) glucose and 10 μ g/ml of tetracycline to measure β -galactosidase activity. Cultures were then diluted 100-fold in the same medium supplemented or not with 1.5 mM toluene. When the cultures reached a turbidity of about 0.8 ± 0.05 at 600 nm, β -galactosidase activity was determined in permeabilized whole cells as previously described,^{45,63} and activity was expressed in Miller units.

Protein purification

For recombinant protein production of TodT and C-TodT, *E. coli* BL21(DE3) transformed with pJLTodT or pJLTodTCter was grown in 2-L Erlenmeyer flasks containing 500 ml of two times YT (yeast extract and tryptone) medium at 30 °C with 25 μ g/ml of kanamycin until the culture reached turbidity at an OD_{600} of 0.4–0.5. Protein production was induced by adding 0.1 mM IPTG, and growth was continued at 16 °C overnight prior to cell harvest by centrifugation at 10,000g for 10 min. All subsequent manipulations were carried out at 4 °C. Cell pellets were resuspended in buffer A [50 mM NaH_2PO_4/Na_2HPO_4 , 0.1 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), 1 mM β -mercaptoethanol, 1 mM DTT, 300 mM NaCl, 10 mM imidazole, and 10% (wt/vol) glycerol, pH 7.5] and broken in a French press at 1000 psi. After centrifugation at 20,000g for 45 min, the supernatant was loaded onto 5 ml of HisTrap HP (Amersham Pharmacia Biotech) and eluted with an imidazole gradient of 45–500 mM. Fractions containing TodT or C-TodT were then dialyzed against buffer containing 50 mM NaH_2PO_4/Na_2HPO_4 , 0.1 mM EDTA, 1 mM β -mercaptoethanol, 1 mM DTT, 500 mM NaCl, and 10% (wt/vol) glycerol, pH 7.5, concentrated to 0.75 ml, and loaded onto a Superdex-200 16/20 gel filtration column (Amersham Biosciences). Gel filtration was carried out at a flow rate of 2 ml/min. The proteins were then concentrated to 4 mg/ml and frozen at –80 °C.

Analytical gel filtration chromatography

Analytical gel filtration chromatography using an Åkta FPLC system (Amersham Biosciences) was carried out to determine the oligomeric state of TodT in solution. Experiments were carried out at room temperature. Purified TodT protein at a concentration of 28 μ M was loaded onto a Superdex-200 10/300 GL column (Amersham Biosciences) equilibrated in buffer [50 mM phosphate, 0.1 mM EDTA, 1 mM DTT, 500 M NaCl, 10 mM $MgCl_2$, and 10% (wt/vol) glycerol, pH 7.6]. Protein was eluted with a constant flow rate of 0.75 ml/min, and the absorbance of the eluate was monitored at 280 nm. The column was calibrated with α -lactalbumin (14.2 kDa), carbonic anhydrase (29 kDa), chicken egg albumin (45 kDa), and bovine serum albumin (66 and 132 kDa) (Sigma). Aliquots of the peak fractions were analyzed by SDS-PAGE according to standard protocols. The molecular mass of TodT was inferred by plotting the elution volume of TodT and marker proteins against the log molecular mass of marker proteins, according to instructions provided by Amersham Biosciences.

TodT phosphorylation and chemical cross-linking

TodT (20 μ M) was phosphorylated with a 10³-fold molar excess of carbamoyl phosphate (20 mM) in phosphorylation buffer [20 mM Pipes, 10 mM magnesium acetate, 10 mM KCl, 170 mM NaCl, and 5% (vol/vol)

glycerol, pH 7.5]. The phosphorylation reaction was carried out at 25 °C for 80 min, and then EDTA, pH 8.0, was added at a final concentration of 30 mM to reduce dephosphorylation.

Glutaraldehyde was then added to reach a final concentration of 0.1–0.5% (vol/vol), and the cross-linking reaction was incubated at 25 °C for 10 min. The reaction was terminated by adding 2 µl of 1 M Tris-HCl, pH 8.0, and 6 µl four times SDS gel loading buffer. The samples were then heated at 100 °C for 5 min before separation by SDS-10% PAGE.

DNase I footprinting

A 352-bp DNA fragment containing the wild-type P_{todX} promoter was amplified by PCR from pMIR77 with the primer 5'-GCTCTAGAGGTCTGAGGTTTTCATCGAC-3' to label the top strand and the primer 5'-AAGCTTCATGCCTGCAGGC-3' to label the bottom strand. The DNA was labeled with [α - 32 P]deoxy-ATP. The probes (0.5 nM) were mixed with different amounts of TodT (0.5–5 µM) in TodT binding buffer [50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 100 mM KCl, 1 mM DTT, 10 mM MgCl₂, and 10% (vol/vol) glycerol] containing 20 µg/ml of poly(dI-dC) and 200 µg/ml of bovine serum albumin. DNA-protein complexes were allowed to form at 30 °C for 30 min in 10-µl (total volume) reaction mixtures. DNase I (0.4 U; Roche Biochemicals) was then added to the reaction mixtures; 4 min later, the reactions were stopped by adding 2 µl of 500 mM EDTA solution. DNA from the footprinting mixtures was phenol-chloroform extracted, ethanol precipitated, and dissolved in 12 µl of sequence loading buffer. After 3 min of denaturation at 95 °C, DNA was loaded onto a 6.5% (wt/vol) DNA sequencing gel. A+G Maxam-Gilbert reactions were carried out with the same probes, and the mixtures were loaded onto the gels along with the footprinting samples.

EMSA

A 352-bp DNA fragment containing the P_{todX} wild-type promoter or its variants was amplified by PCR from pMIR77, pJLC10, pJLC20, and pJLC30 using the appropriate primers. Amplified DNA was isolated from agarose gels and end-labeled with 32 P as described before.⁶² About 2 nM labeled DNA ($\sim 1.5 \times 10^4$ cpm) was incubated with 250 nM purified TodT for 30 min at 30 °C in 10 µl of the binding buffer. Electrophoresis in nondenaturing polyacrylamide gels and analyses were done as previously described.⁶²

In vitro transcription assays

Reactions (20 µl) were performed in 25 mM Tris-HCl, 9 mM MgCl₂, and 100 mM KCl, pH 7.5, containing 50 nM σ^{70} -holoenzyme, 20 U of RNasin, and 5 nM circular P_{todX} DNA template (pTE77). The mixtures were incubated for 10 min at 30 °C prior to the addition of ATP, CTP, GTP (final concentration of 0.1 mM), UTP (final concentration of 0.05 mM), and 3.6 µCi of [α - 32 P]UTP. After incubation for another 20 min, the reactions were stopped by chilling to 4 °C, and 4 µl of formamide sequencing dye was added. Samples were separated by 6.5% (wt/vol) SDS-PAGE.

ITC

Measurements were recorded on a VP microcalorimeter (Microcal Software Inc.) at 25 °C. Annealing of DNA was

done as described by Guazzaroni *et al.*⁶⁴ TodT, C-TodT, and the 20-mer DNA duplex samples were thoroughly dialyzed against 43 mM Tris-HCl, 80 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT, and 10% (vol/vol) glycerol, pH 6.5. A typical experiment consisted of an injection of 9.6-µl aliquots of 60–80 µM DNA into a 6–9 µM protein solution. The heat changes measured after DNA was injected into buffer were subtracted from raw titration data prior to data analysis with ORIGIN software (Microcal Software Inc.). Titration curves were fitted by a nonlinear least squares method to a function for the binding of a ligand to a macromolecule.⁶⁵ From the curve thus fitted, the parameters ΔH (reaction enthalpy), K_A (binding constant, $K_A=1/K_D$), and N (reaction stoichiometry) were determined. From the values of K_A and ΔH , the change in free energy (ΔG) and entropy (ΔS) were calculated with the following equation: $\Delta G = -RT \ln K_A = \Delta H - T\Delta S$, where R is the universal molar gas constant and T is the absolute temperature.

Acknowledgements

This work was supported by a grant from the Spanish Ministry of Science and Education (CICYT BIO-2006-05668) to J.L.R. and grants from the Junta de Andalucía to J.L.R. (CIV344) and T.K. (CIV1912). We thank Ana Hurtado for helping with DNA sequencing, Carmen Lorente and M. Mar Fandila for providing secretarial assistance, and K. Shashok for improving the use of the English language in the manuscript.

References

- Ramos, J. L., Gallegos, M. T., Marqués, S., Ramos-González, M. I., Espinosa-Urgel, M. & Segura, A. (2001). Responses of Gram-negative bacteria to certain environmental stressors. *Curr. Opin. Microbiol.* **4**, 166–171.
- Bijlsma, J. J. & Groisman, E. A. (2003). Making informed decisions: regulatory interactions between two-component systems. *Trends Microbiol.* **11**, 359–366.
- Elsen, S., Swem, L. R., Swem, D. L. & Bauer, C. E. (2004). RegB/RegA, a highly conserved redox-responding global two-component regulatory system. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **68**, 263–279.
- Kern, D., Volkman, B. F., Luginbuhl, P., Nohaile, M. J., Kustu, S. & Wemmer, D. E. (1999). Structure of a transiently phosphorylated switch in bacterial signal transduction. *Nature*, **402**, 894–898.
- Lacal, J., Busch, A., Guazzaroni, M. E., Krell, T. & Ramos, J. L. (2006). The TodS-TodT two-component regulatory system recognizes a wide range of effectors and works with DNA-bending proteins. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **103**, 8191–8196.
- Mascher, T., Helmann, J. D. & Uuden, G. (2006). Stimulus perception in bacterial signal-transducing histidine kinases. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **70**, 910–938.
- Jones, D. F., Stenzel, R. A. & Donohue, T. J. (2005). Mutational analysis of the C-terminal domain of the *Rhodobacter sphaeroides* response regulator PrrA. *Microbiology*, **151**, 4103–4110.
- Ventre, I., Filloux, A. & Lazdunski, A. (2004). Two-component signal transduction systems: a key to the

- adaptative potential of *Pseudomonas aeruginosa*. In *Pseudomonas: Virulence and Gene Regulation* (Ramos, J. L., ed), vol. II, chapter 9, pp. 257–288, Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, NY.
9. Blanco, A. G., Sola, M., Gomis-Ruth, F. X. & Coll, M. (2002). Tandem DNA recognition by PhoB, a two-component signal transduction transcriptional activator. *Structure*, **10**, 701–713.
 10. Eldalak, A. & Hullet, F. M. (2007). Cys303 in the histidine kinase PhoR is crucial for the phosphotransfer reaction in the PhoPR two-component system in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **189**, 410–421.
 11. Hirooka, K., Kunikane, S., Matsuoka, H., Yoshida, K. -I., Kumamoto, K., Tojo, S. & Fujita, Y. (2007). Dual regulation of the *Bacillus subtilis* regulon comprising the *lmrAB* and *yxgH* operons and *yxgF* gene by two transcriptional repressors, LmrA and YxgF, in response to flavonoids. *J. Bacteriol.* **189**, 5170–5182.
 12. Kivistik, P. A., Putrins, M., Püvi, K., Ilves, H., Kivisaar, M. & Horak, R. (2006). The ColRS two-component system regulates membrane functions and protects *Pseudomonas putida* against phenol. *J. Bacteriol.* **188**, 8109–8117.
 13. McKessar, S. J. & Hakenbeck, R. (2007). The two-component regulatory system TCS08 is involved in cellobiose metabolism of *Streptococcus pneumoniae* R6. *J. Bacteriol.* **189**, 1342–1350.
 14. McPhee, J. B., Bains, M., Winson, G., Lewenza, S., Kwasnicka, A., Brazas, M. D. *et al.* (2006). Contribution of the PhoP–PhoQ and PmrA–PmrB two-component regulatory systems to Mg²⁺-induced gene regulation in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **188**, 3995–4006.
 15. Stock, A. M., Robinson, V. L. & Goudreau, P. N. (2000). Two-component signal transduction. *Annu. Rev. Biochem.* **69**, 183–215.
 16. Segura, A., Rojas, A., Hurtado, A., Huertas, M. J. & Ramos, J. L. (2003). Comparative genomic analysis of solvent extrusion pumps in *Pseudomonas* strains exhibiting different degrees of solvent tolerance. *Extremophiles*, **7**, 371–376.
 17. Zylstra, G. J. & Gibson, D. T. (1989). Toluene degradation by *Pseudomonas putida* F1. Nucleotide sequence of the *todC1C2BADE* genes and their expression in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **264**, 14940–14946.
 18. Lau, P. C. K., Wang, Y., Patel, A., Labbé, D., Bergeron, H., Brousseau, R. *et al.* (1997). A bacterial basic region leucine zipper histidine kinase regulating toluene degradation. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **94**, 1453–1458.
 19. Mosqueda, G., Ramos-González, M. I. & Ramos, J. L. (1999). Toluene metabolism by the solvent-tolerant *Pseudomonas putida* DOT-T1 strain, and its role in solvent impermeabilization. *Gene*, **232**, 69–76.
 20. Busch, A., Lacial, J., Marcos, A., Ramos, J. L. & Krell, T. (2007). Bacterial sensor kinase TodS interacts with agonistic and antagonistic signals. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **104**, 13774–13779.
 21. Bourret, R. B. (2006). Census of prokaryotic senses. *J. Bacteriol.* **188**, 4165–4168.
 22. D'Souza, M., Glass, E. M., Syed, M. H., Zhang, Y., Rodriguez, A., Maltsev, N. & Galperin, M. Y. (2007). SENTRA: a database of signal transduction proteins for comparative genome analysis. *Nucleic Acids Res.* **35**, D271–D273.
 23. Galperin, M. Y. (2006). Structural classification of bacterial response regulators: diversity of output domains and domain combinations. *J. Bacteriol.* **188**, 4169–4182.
 24. Leoni, L., Ascenzi, P., Bocedi, A., Rampioni, G., Castellini, L. & Zennaro, E. (2003). Styrene-catabolism regulation in *Pseudomonas fluorescens* ST: phosphorylation of StyR induces dimerization and cooperative DNA-binding. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **303**, 926–931.
 25. Leoni, L., Rampioni, G., Di Stefano, V. & Zennaro, E. (2005). Dual role of response regulator StyR in styrene catabolism regulation. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**, 5411–5419.
 26. Leoni, L., Rampioni, G. & Zennaro, E. (2007). Styrene, an unpalatable substrate with complex regulatory networks. In *Pseudomonas: A Model System in Biology* (Ramos, J. L. & Filloux, A., eds), vol. V, chapter 3, pp. 59–88, Springer, Dorchester, The Netherlands.
 27. Milani, M., Leoni, L., Rampioni, G., Zennaro, E., Ascenzi, P. & Bolognesi, M. (2005). An active-like structure in the unphosphorylated StyR response regulator suggests a phosphorylation-dependent activation mechanism. *Structure*, **13**, 1289–1297.
 28. Cui, Y., Chatterjee, A., Hasegawa, H. & Chatterjee, A. K. (2006). *Erwinia carotovora* subspecies produce duplicate variants of ExpR, LuxR homologs that activate *rsmA* transcription but differ in their interactions with *N*-acylhomoserine lactone signals. *J. Bacteriol.* **188**, 4715–4726.
 29. von Bodman, S. B., Ball, J. K., Faini, M. A., Herrera, C. M., Minogue, T. D., Urbanowski, M. L. & Stevens, A. M. (2003). The quorum sensing negative regulators EsaR and ExpR_{Ecc} homologues within the LuxR family, retain the ability to function as activators of transcription. *J. Bacteriol.* **185**, 7001–7007.
 30. Shultzaberger, R. K., Chen, Z., Lewis, K. A. & Schneider, T. D. (2006). Anatomy of *Escherichia coli* sigma-70 promoters. *Nucleic Acids Res.* **35**, 771–788.
 31. Barne, K. A., Bown, J. A., Busby, S. J. & Minchin, S. D. (1997). Region 2.5 of the *Escherichia coli* RNA polymerase σ^{70} subunit is responsible for the recognition of the 'extended -10' motif at promoters. *EMBO J.* **16**, 4034–4040.
 32. Hook-Barnard, I., Johnson, X. B. & Hinton, D. M. (2006). *Escherichia coli* RNA polymerase recognition of a σ^{70} -dependent promoter requiring a -35 DNA element and an extended -10 TGn motif. *J. Bacteriol.* **188**, 8352–8359.
 33. Keilty, S. & Rosenberg, M. (1987). Constitutive function of a positively regulated promoter reveals new sequences essential for activity. *J. Biol. Chem.* **262**, 6389–6395.
 34. Kumar, A., Malloch, R. A., Fujita, N., Smillie, D. A., Ishihama, A. & Hayward, R. S. (1993). The minus 35-recognition region of *Escherichia coli* sigma 70 is essential for initiation of transcription at an "extended minus 10" promoter. *J. Mol. Biol.* **232**, 406–418.
 35. Collado-Vides, J., Magasanik, B. & Gralla, J. G. (1991). Control site location and transcriptional regulation in *Escherichia coli*. *Microbiol. Rev.* **55**, 371–394.
 36. Rhodius, V. A. & Busby, S. J. (1998). Positive activation of gene expression. *Curr. Opin. Microbiol.* **1**, 152–159.
 37. Nixon, B. T., Ronson, C. W. & Ausubel, F. M. (1986). Two component regulatory systems responsive to environmental stimuli share strongly conserved domains with the nitrogen assimilation regulatory genes *ntxB* and *ntxC*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **83**, 7850–7854.
 38. Pérez-Martín, J. & de Lorenzo, V. (1997). Clues and consequences of DNA bending in transcription. *Annu. Rev. Microbiol.* **51**, 593–628.
 39. Tropel, D. & van der Meer, J. R. (2004). Bacterial transcriptional regulators for degradation pathways

- of aromatic compounds. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **68**, 474–500.
40. Todd, M. J. & Gomez, J. (2001). Enzyme kinetics determined using calorimetry: a general assay for enzymatic activity? *Anal. Biochem.* **296**, 179–187.
41. Spaink, H. P., Okker, R. J. H., Wijffelman, C. A., Pees, E. & Lugtenberg, B. (1987). Promoters in the nodulation region of the *Rhizobium leguminosarum* Sym plasmid pRL1J1. *Plant Mol. Biol.* **9**, 27–39.
42. Raleigh, E. A., Trimarchi, R. & Revel, H. (1989). Genetics and physical mapping of *merA* (*rglA*) and *mcrB* (*rglB*) loci of *Escherichia coli* K12. *Genetics*, **122**, 279–296.
43. Studier, F. W., Rosenberg, A.-H., Dunn, J. J. & Dubendoff, J. W. (1990). Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. *Methods Enzymol.* **185**, 60–89.
44. Ramos, J. L., Duque, E., Huertas, M. J. & Haïdour, A. (1995). Isolation and expansion of the catabolic potential of a *Pseudomonas putida* strain able to grow in the presence of high concentrations of aromatic hydrocarbons. *J. Bacteriol.* **177**, 3911–3916.
45. Ramos-González, M. I., Olson, M., Gatenby, A. A., Mosqueda, G., Manzanera, M., Campos, M. J. *et al.* (2002). Cross-regulation between a novel two-component signal transduction system for catabolism of toluene in *Pseudomonas mendocina* and the TodST system from *Pseudomonas putida*. *J. Bacteriol.* **184**, 7062–7067.
46. Hawley, D. K. & McClure, W. R. (1983). Compilation and analysis of *Escherichia coli* promoter DNA sequences. *Nucleic Acids Res.* **11**, 2237–2255.
47. Benoff, B., Yang, H., Lawson, C. L., Parkinson, G., Liu, J., Blatter, E. *et al.* (2002). Structural basis of transcription activation: the CAP- α CTD-DNA complex. *Science*, **297**, 1562–1566.
48. Gerischer, U., Segura, A. & Ornston, L. N. (1998). PcaU, a transcriptional activator of genes for protocatechuate utilization in *Acinetobacter*. *J. Bacteriol.* **180**, 1512–1524.
49. Guo, Z. & Houghton, J. E. (1999). PcaR-mediated activation and repression of *pca* genes from *Pseudomonas putida* are propagated by its binding to both the -35 and the -10 promoter elements. *Mol. Microbiol.* **32**, 253–263.
50. Aiba, H., Nakasai, F., Mizushima, S. & Mizuno, T. (1989). Phosphorylation of a bacterial activator protein, OmpR, by a protein kinase, EnvZ, results in stimulation of its DNA-binding ability. *J. Biochem.* **106**, 5–7.
51. Harrison-McMonagle, P., Denissova, N., Martínez-Hackert, E., Ebright, R. H. & Stock, A. M. (1999). Orientation of OmpR monomers within an OmpR:DNA complex determined by DNA affinity cleaving. *J. Mol. Biol.* **285**, 555–566.
52. Yoshida, Y., Qin, L., Egger, L. A. & Inouye, M. (2006). Transcription regulation of *ompF* and *ompC* by a single transcription factor, OmpR. *J. Biol. Chem.* **281**, 17114–17123.
53. Bergstrom, L. C., Qin, L., Harlocker, S. L., Egger, L. A. & Inouye, M. (1998). Hierarchical and co-operative binding of OmpR to a fusion construct containing the *ompC* and *ompF* upstream regulatory sequences of *Escherichia coli*. *Genes Cells*, **3**, 777–788.
54. Harlocker, S. L., Bergstrom, L. & Inouye, M. (1995). Tandem binding of six OmpR proteins to the *ompF* upstream regulatory sequence of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **270**, 26849–26856.
55. Rice, P. A., Yang, S., Mizuchi, K. & Nash, H. A. (1996). Crystal structure of an IHF-DNA complex: a protein-induced DNA U-turn. *Cell*, **87**, 1296–1306.
56. Busby, S. & Ebright, R. H. (1999). Transcription activation by catabolite activator protein (CAP). *J. Mol. Biol.* **293**, 199–213.
57. Hagerman, P. J. (1988). Flexibility of DNA. *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* **17**, 265–286.
58. Maris, A. E., Sawaya, M. R., Kaczor-Grzeskowiak, M., Jarvis, M. R., Bearson, S. M., Kopka, M. L. *et al.* (2002). Dimerization allows DNA target site recognition by the NarL response regulator. *Nat. Struct. Biol.* **9**, 771–778.
59. Walthers, D., Tran, V. K. & Kenney, L. J. (2003). Interdomain linkers of homologous response regulators determine their mechanism of action. *J. Bacteriol.* **185**, 317–324.
60. Birck, C., Chen, Y., Hulett, F. M. & Samana, J. P. (2003). The crystal structure of the phosphorylation domain in PhoP reveals a functional tandem association mediated by an asymmetric interface. *J. Bacteriol.* **185**, 254–261.
61. Birck, C., Mourey, L., Gouet, P., Fabry, B., Schumacher, J., Rousseau, P. *et al.* (1999). Conformational changes induced by phosphorylation of the FixJ receiver domain. *Structure Fold. Des.* **7**, 1505–1515.
62. Sambrook, J., Fritsch, E. F. & Maniatis, T. (1999). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
63. González-Pérez, M. M., Ramos, J. L., Gallegos, M. T. & Marqués, S. (1999). Critical nucleotides in the upstream region of the XylS-dependent TOL *meta*-cleavage pathway operon promoter as deduced from analysis of mutants. *J. Biol. Chem.* **274**, 2286–2290.
64. Guazzaroni, M. E., Krell, T., Felipe, A., Ruíz, R., Meng, C., Zhang, X. *et al.* (2005). The multidrug efflux regulator TtgV recognizes a wide range of structurally different effectors in solution and complexed with target DNA: evidence from isothermal titration calorimetry. *J. Biol. Chem.* **280**, 20887–20893.
65. Wiseman, T., Williston, S., Brandts, J. F. & Lin, L. N. (1989). Rapid measurement of binding contacts and heats of binding using a new titration calorimeter. *Anal. Biochem.* **179**, 131–137.

Two levels of cooperativity in the binding of TodT to the *tod* operon promoter

Jesús Lacal, María-Eugenia Guazzaroni, Paloma Gutiérrez del Arroyo, Andreas Busch, Marisela Vélez, Tino Krell, and Juan L. Ramos

El sistema regulador de dos componentes TodS/TodT controla la expresión de los genes *tod* para la degradación de tolueno en *Pseudomonas putida*. Este hidrocarburo aromático estimula la autofosforilación de TodS, la cual aumenta la transfosforilación de TodT y da lugar a la activación de la transcripción a partir del promotor P_{todX} . La proteína TodT no fosforilada se une a dos pseudopalíndromos (Box-1 y Box-2) y a medio palíndromo, identificado como Box-3. Cada monómero de TodT reconoce cada mitad palindrómica de 9 nucleótidos en Box-1 y en Box-2. Los valores de afinidad para las secuencias mitad palindrómicas son menores que para los pseudopalíndromos de 18 pares de bases, indicando cooperatividad positiva en el reconocimiento dentro del pseudopalíndromo por dos monómeros de TodT. La afinidad de TodT por los fragmentos de ADN que contienen dos cajas vecinas, tanto la Box-1 más Box-2 como la Box-2 más Box-3, es mayor que la afinidad para las cajas individuales, sugiriendo un nivel adicional de cooperatividad que puede estar mediado por la conformación del ADN. La unión de TodT a P_{todX} provoca la curvatura del ADN y la formación de una estructura de anclaje, tal y como se observa por microscopía de fuerzas atómicas. C-TodT, una variante de TodT que comprende solamente el dominio de unión a ADN, interacciona con el ADN tal y como se ha descrito anteriormente para la proteína completa TodT, sugiriendo que los elementos clave para la cooperatividad residen en este dominio. C-TodT no dobla el AND, no conduce a la formación de la estructura de anclaje y tampoco promueve la transcripción.

Artículo enviado a Molecular Microbiology, 2008

Two levels of cooperativity in the binding of TodT to the *tod* operon promoter

Jesús Lacal,¹ María-Eugenia Guazzaroni,¹ Paloma Gutiérrez del Arroyo,^{2,3} Andreas Busch,¹ Marisela Vélez,² Tino Krell¹ and Juan L. Ramos¹

¹Department of Environmental Protection, Estación Experimental del Zaidín, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, 18008 Granada, Spain

²Instituto de Ciencias de los Materiales Nicolás Cabrera, Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma de Madrid, E-28049, Cantoblanco, Madrid, Spain

³Centro Nacional de Biotecnología, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, E-28049 Cantoblanco, Madrid, Spain

Summary

The TodS/TodT two-component regulatory system controls the expression of the *tod* genes for the degradation of toluene in *Pseudomonas putida*. This aromatic hydrocarbon stimulates TodS autophosphorylation, which enhances TodT transphosphorylation and triggers transcription activation from the P_{todX} promoter. Nonphosphorylated TodT binds to two pseudopalindromes (Box-1 and Box-2) and to a half-palindrome formerly known as Box-3. Each TodT monomer recognizes each 9-nucleotide half-palindrome in Boxes-1 and -2. Affinity values for the half-palindromic sequences are lower than for 18-nucleotide pseudopalindromes, indicating positive cooperativity in intrabox recognition by the two TodT monomers. Affinity of TodT for DNA fragments containing two vicinal boxes, either Box-1 & Box-2 or Box-2 & Box-3, is higher than affinity for the individual boxes, suggesting an additional level of cooperativity that may be mediated by DNA conformation. Binding of TodT to P_{todX} leads to DNA bending and to the formation of a scaffold structure, as visualized by atomic force microscopy. C-TodT, a TodT variant comprising only its DNA-binding domain, interacts with DNA as described above for the full TodT protein, suggesting that the key elements for cooperativity reside in this domain. C-TodT does not bend DNA, it does not produce a scaffold structure and fails to promote transcription.

Introduction

Bacteria of the genus *Pseudomonas* are ubiquitous soil and water inhabitants that have been frequently associated to the biogenic carbon cycle because of their ability to mineralize a large number of natural and man-made aromatic compounds, including toxic organic solvents. When *Pseudomonas* is exposed to these kinds of chemicals it faces an interesting dilemma: whether to run away from the toxic compound or to stay, resist and consume this nonpalatable chemical. Transcriptomic assays revealed that upon exposure of *Pseudomonas putida* KT2440 to toluene, biosynthesis of the flagellar apparatus was inhibited (Domínguez-Cuevas *et al.*, 2006) and a series of stress proteins were induced along with resistance-nodulation-division family (RND) efflux pumps (Segura *et al.*, 2005; Rojas *et al.*, 2001; Wery *et al.*, 2001; Isken and de Bont, 1996). Together with induction of the efflux pumps, changes in the composition of membrane lipids took place to adapt bacteria to the presence of the toxic compound, making the cell more impermeable to toluene (Junker and Ramos, 1999; Heipieper *et al.*, 1994; Bernal *et al.*, 2007). Both impermeabilization and efflux pump activation are, however, expensive processes in terms of energy consumption and seem to be the “toll” bacteria have to pay to survive harsh conditions.

Carbon skeletons and energy can be derived from toluene and related highly-reduced substrates via their oxidation to Krebs cycle intermediates. To this end bacteria induce the TOD pathway enzymes encoded within the inducible *tod* catabolic operon, *todXFC1C2BADEGIH*, and convert the aromatic hydrocarbon to TCA cycle intermediates (Finette *et al.*, 1984; Zylstra *et al.*, 1988; Zylstra and Gibson, 1989; Mosqueda *et al.*, 1999; Ramos-González *et al.*, 2001).

The *todST* genes form an operon located immediately downstream from the *tod* operon (Lau *et al.*, 1997; Mosqueda *et al.*, 1999), and these genes encode the TodS/TodT two-component system (TCS) (Busch *et al.*, 2007; Lacal *et al.*, 2006; Lacal *et al.*, 2008; Lau *et al.*, 1997; Ramos-González *et al.*, 2001) that regulates expression of the P_{todX} promoter. Expression of the *todST* operon is constitutive (Mosqueda *et al.*, 1999). The *todS* gene encodes a sensor histidine kinase that binds toluene with high affinity (around 700 nM) (Busch *et al.*, 2007), enhancing autophosphorylation

and the subsequent transphosphorylation of TodT (Lacal *et al.*, 2006). TodT is the transcriptional response regulator (RR) that interacts with its specific targets on the P_{todX} promoter, activating transcription of the catabolic operon (Lacal *et al.*, 2006; Lacal *et al.*, 2008). TodT has two domains: a conserved N-terminal domain (NTD) involved in reception of the phosphoryl group from the sensor kinase (related to the CheY family of signal receptor kinases), and a C-terminal DNA binding domain, which contains a helix-turn-helix (HTH) similar to the one found in transcription regulators of the LuxR/FixJ family of RRs. Unphosphorylated TodT binds to its target DNA sequences in P_{todX} with affinities in the low micromolar range, and exhibits no transcriptional activity. In response to the presence of effectors, the so-called “phosphate cascade” is activated, leading to the phosphorylation of TodT and transcription stimulation from P_{todX} .

Previous DNaseI footprinting assays revealed that TodT protects three specific sites in the P_{todX} promoter, similarly oriented and centered at -57, -85 and -106 with respect to the main transcription start site. These three TodT sites were termed TodT Box-3, Box-2 and Box-1, respectively. TodT Box-1 and Box-2 are 16-base-pair pseudopalindromes, whereas TodT Box-3 is a half-pseudopalindrome (Lacal *et al.*, 2008). Interaction of regulatory proteins and complex promoters with multiple binding sites sometimes involves cooperativity

(Harlaker *et al.*, 1995). Earlier work at our lab revealed that TodT produced four retard bands with P_{todX} in EMSA (Lacal *et al.*, 2008). If TodT had bound to each site independently we would have obtained at least 5 retarded bands, but as mentioned above, we only obtained four retarded complexes (Lacal *et al.*, 2008), which was considered preliminary evidence of potential cooperativity in the binding of TodT to its target promoter. This was further supported by footprints of each of the bands, which revealed that complex I represented binding at Box-1, whereas complex II corresponded to the simultaneous occupation of Boxes-1 and -2. Complex III, in turn, represented further binding of TodT to Box-3. Footprint analyses of complex IV failed to reveal any further binding of TodT to the promoter region, so we assumed it represented a high-order complex state.

We designed the present study to define the minimal DNA requirements for high affinity binding, and to investigate the potential cooperativity of TodT monomers in binding to target sequences. Our results support two levels of cooperativity in the binding of TodT to the *tod* operon, one that involves the cooperativity of two monomers to bind pseudopalindromes in Box-1 and Box-2, and a second one involving interbox cooperativity possibly mediated by DNA conformation.

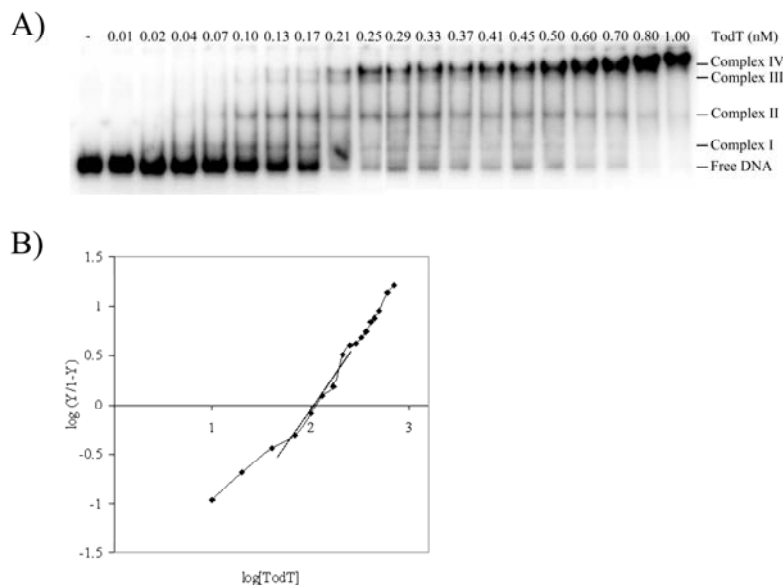


Fig. 1. Electrophoretic mobility shift assay (EMSA) of TodT binding to P_{todX} DNA. A) The indicated amounts of purified TodT were incubated with ^{32}P end-labeled P_{todX} DNA for 30 min. Samples were fractionated by electrophoresis on a 5% (wt/vol) polyacrylamide gel, dried, and autoradiographed. Complex I (TodT bound to Box-1), Complex II (TodT bound to Box-1 and Box-2), Complex 3 (TodT bound to Box-1, Box-2 and Box-3) and Complex IV (a higher order of complex 3). B) Densitometric analysis of the EMSA results for the P_{todX} promoter. The Hill coefficient is defined as the slope of the curve at the interception with the X-axis. The linear fit was based on the three data points above and below the X-axis.

Results

TodT binds specifically to the P_{todX} promoter target and shows cooperativity.

To obtain quantitative data on the binding of TodT to its target DNA we carried out a series of electrophoretic mobility shift assays (EMSAs) with a fixed amount of a 352-bp DNA sequence bearing the P_{todX} promoter, and a broad range of TodT concentrations (10 – 1000 nM). As previously described (Lacal *et al.*, 2008), we found that up to four different complexes were formed (Fig. 1A). Densitometric analysis of three different gels was used to determine the amount of free and bound DNA, and the latter was considered the sum of all the retarded complexes of a given protein concentration (Fig. 1B). The data were fitted to the Hill equation to assess the potential binding cooperativity. The calculated Hill coefficient was 1.4 ± 0.05 , which supports that TodT binds cooperatively to the P_{todX} promoter.

As in many other response regulators, the active transcriptional form of TodT is the phosphorylated one. To test whether phosphorylation of TodT increased cooperativity, EMSA experiments similar to those reported above were also done with TodT, but in the presence of an excess of TodS, toluene (100 μ M) and ATP (1 mM). We had previously demonstrated that under these conditions TodT was phosphorylated by TodS (Lacal *et al.*, 2006). In these assays the formation of complexes and the proportion of the different complexes were similar (not shown) to that observed in Figure 1A, which suggests that complex formation is independent from TodT phosphorylation.

In short, this new set of EMSA results along with the calculated values for a Hill coefficient >1 reinforce the original hypothesis that the binding of TodT to its target promoter involves positive cooperativity, a phenomenon that is analyzed in greater detail below.

Binding of TodT to individual sites and to consecutive target pseudopalindromes reveals positive cooperative interaction

We proceeded to determine the affinity of TodT to its five potential recognition sites independently. The 20-bp Box-1 and Box-2 sites were considered to be made up of two 10-bp subsites. To establish whether intrabox cooperativity existed in binding to Box-1 and Box-2, we designed 20-mer oligomer duplexes that maintained a half-site for each box while the other half was replaced with a random sequence (5'-GATGGATTCA-3') (see Table 1). The nomenclature used was as follows: Box-1-left, DNA duplex bearing the native left half-site; the right part was replaced with the random sequencementioned above. Box-1-right, DNA duplex

bearing the native right half-site; the left part was replaced with a random sequence (see Table 1). The same applied to Box-2. For Box-3 we used the same sequence limits as for the fragment just mentioned.

TodT was submitted to isothermal titration calorimetry (ITC) with all five 20-mer duplexes (see Fig. 2 for Box-1 left and Box-1 right analyses). TodT was found to bind to all five DNA fragments, and the corresponding affinity ranged from 4.3 to 11.0 μ M (Table 2). Binding was characterized by endothermic heat changes (Fig. 2 upper panel), indicative of an entropy-driven binding interaction, as was reported for the native Boxes-1, -2 and -3 (Lacal *et al.*, 2008).

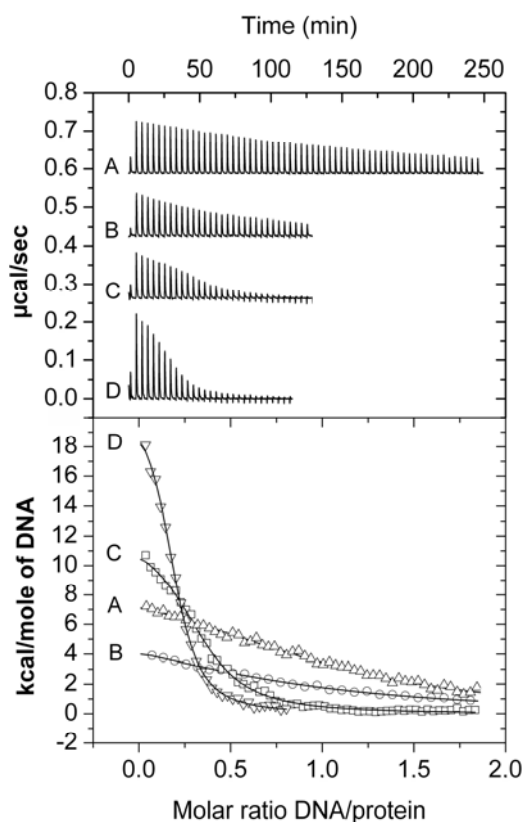


Fig. 2. Microcalorimetric titrations of TodT with 20-mer DNA fragments containing Box-1, its two half-palindrome derivatives and a 41-bp segment containing Boxes-1 and -2. The upper panel shows the raw isothermal titration calorimetry data for the titration of 10 μ M TodT with the following DNA fragments: A) 4.8 μ l aliquots of 90 μ M Box-1 left, B) 9.6 μ l aliquots of 90 μ M Box-1 right, C) 4.8 μ l aliquots of 80 μ M Box-1, D) 4.8 μ l aliquots of Box 1 and Box 2 (80 μ M). Lower panel: Integrated peak areas and areas corrected for dilution. Data were fitted using the one-binding site model of ORIGIN (MicroCal, MA, USA). The derived thermodynamic parameters are shown in Table 2.

Table 1. Oligonucleotides used for isothermal titration calorimetry assays.

Oligonucleotide	Sequence (5'-3') ^a	Reference
Todbox-1	GCATAAACCATCGTTTATCA	Lacal <i>et. al.</i> , 2008
Todbox-2	AGTTAAACTTTGGTTTTCTA	Lacal <i>et. al.</i> , 2008
Todbox-3	ATATAAACCCATAAGCCAAA	Lacal <i>et. al.</i> , 2008
Box-1 left	GCATAAACCATCGTTTATCA	Lacal <i>et. al.</i> , 2008
Box-1 right	GATGGATTCATCGTTTATCA	Lacal <i>et. al.</i> , 2008
Box-2 left	AGTTAAACTTGATGGATTCA	This study
Box-2 right	GATGGATTCATGGTTTTCTA	This study
Box-3 left	ATATAAACCCGATGGATTCA	This study
Box-1-18 bp	CATAAACCATCGTTTATC	This study
Box-1-16 bp	ATAAACCATCGTTTAT	This study
Box-1-1C	GCATAAACGATCGTTTATCA	This study
Box-1-2C	GCATAAACCATGGTTTATCA	This study
Box-1-2C-18 bp	CATAAACCATGGTTTATC	This study
Box-1&2	GCATAAACCATCGTTTATCACAGTTAAACTTTGGTTTTCTA	This study
Box-2&3	AGTTAAACTTTGGTTTTCTAAGTTGCGATAGCCATATAAAC CCATAAGCCAAA	This study

a. Complementary oligonucleotides were used to obtain duplex DNA fragments.

In previous studies with ITC we determined the affinity constant of TodT for each of the individual TodT boxes using 20-mer DNA duplexes. The data (Table 2) showed that the affinity for TodT binding was higher than that observed with the series of half-palindromes. This was particularly pronounced with Box-1, since TodT affinity for each individual half-palindrome was in the range of 6.7 μ M to 8.3 μ M (Table 2), which is considerably lower than the affinity for full Box-1 (1.8 \pm 2 μ M) (Table 2). The overall affinity of TodT for Box-2 was also higher than for Box-2-right, but only slightly higher than for Box-2-left (Table 2 and Fig. 2). The fact that TodT exhibited higher affinity for full Boxes-1 and -2 than for the corresponding DNA fragments containing the individual subsites suggests that TodT monomers bind cooperatively.

We also tested interbox cooperative binding of TodT using oligonucleotides bearing TodT Box-1 & Box-2 and Box-2 & Box-3. To this end we generated two fragments of the P_{todX} promoter; a 41-bp one that covered Box-1 & Box-2 (Box-1 & -2 in Table 2) and a 53-bp duplex DNA (Box-2 & -3) that covered the stretch comprising Box-2 and Box-3 (Table 2). The titration curve for the Box-1 and Box-2 fragment is shown in Figure 2, and data for Box-1 and Box-2 and the 53-bp DNA fragment (Box-2 & Box-3) are presented in Table 2. The steeper slope of the titration curve of the DNA fragment bearing Box-1 & Box-2 reflected an event of higher affinity (0.53 \pm 0.05 μ M) than that of Boxes-1 & -2 individually (See Figure 2 and Table 2). This indicated that binding of TodT to Box-1 facilitates the recognition and binding of TodT to Box-

2. We subsequently measured the binding of TodT to a 53-base-pair double strand oligonucleotide bearing TodT Box-2 and Box-3. As in the above data, the affinity for this DNA duplex was slightly higher than the mean affinities to Boxes-2 and -3 separately, which was also indicative of positive cooperativity.

C-TodT binds DNA in a similar fashion as TodT

TodT shares 43% sequence identity with StyR, whose 3D structure has been solved (Milani *et al.*, 2005). The StyR-based homology model of TodT shows two globular domains separated by a long helix. We showed before that the TodT C-terminal domain is able to bind to P_{todX} , although it does not promote transcription from P_{todX} . Here we now probed further into the interactions of C-TodT with its target sequences. To this end the ITC assays presented above for TodT were repeated with C-TodT. The affinity of C-TodT for the five DNA fragments each containing an individual recognition site were in the same range as those for the full-length protein (See Table 2).

The binding affinity of C-TodT for Box-1 was almost 3-fold higher, whereas affinities for Boxes-2 and -3 were similar to those of the full-length protein. Most importantly, C-TodT bound more tightly to Boxes-1 & -2 and Boxes-2 & -3 than to the DNA fragments containing only one box, confirming the positive cooperativity effect seen for TodT.

We also determined the K_D values for each of the half-boxes with C-TodT. We found that for Box-1-left and

Table 2. Thermodynamic parameters from the calorimetric titration of TodT and C-TodT with different DNA fragments.

DNA	TodT			C-TodT		
	K_D (μM)	$K_D/K_{D\text{WT}}^a$	ΔH (kcal/mol)	K_D (μM)	$K_D/K_{D\text{WT}}^a$	ΔH (kcal/mol)
Box-1 left ^b	8.3 ± 0.6	4.6	10.9 ± 0.7	4.0 ± 0.3	5.5	9.9 ± 0.3
Box-1 right ^b	6.7 ± 0.6	3.7	11.7 ± 0.1	7.5 ± 0.7	10.4	7.7 ± 0.6
Box-2 left	4.3 ± 0.5	0.9	3.8 ± 0.4	11.1 ± 0.1	2.1	13.8 ± 0.2
Box-2 right	11 ± 3	2.2	9.9 ± 0.4	8.5 ± 0.9	1.6	5.4 ± 0.4
Box-3 left	6 ± 1	1	2.6 ± 0.3	8.8 ± 0.6	1	9.6 ± 0.6
Box-3 right	No binding			No binding		
Box-1 ^b	1.8 ± 0.2	-	37 ± 7	0.72 ± 0.04	-	12.9 ± 0.1
Box-2 ^b	5 ± 0.4	-	36 ± 17	5.3 ± 0.5	-	10.0 ± 0.7
Box-3 ^b	6.3 ± 0.8	-	27 ± 8	8.3 ± 0.6	-	23.6 ± 0.3
Box-1&2	0.53 ± 0.05	0.3 (Box 1) 0.1 (Box 2)	23 ± 1	0.32 ± 0.02	0.4 (Box 1) 0.06 (Box 2)	21.2 ± 0.1
Box-2&3	4.2 ± 0.4	0.8 (Box 2) 0.7 (Box 3)	24.6 ± 3.8	3.1 ± 0.3	0.6 (Box 2) 0.4 (Box 3)	29 ± 2

^a $K_D/K_{D\text{WT}}$ ^b These data have been previously reported in Lacal *et al.*, 2008.

Box-1-right, affinity decreased by about 6- and 10-fold, respectively, compared to affinity for the complete Tod Box-1 oligomer (Table 1). With Box-2 half-site oligomers we found that the decrease in affinity with C-TodT was more modest (around 2-fold, see Table 2). On the other hand, affinity of the Box-3-left oligomer was similar to the Box-3 DNA fragment, and no binding was obtained in the Box-3-right titration. These results were expected since the Box-3 motif is a half-palindrome. This set of results is consistent with Box-1 being the most critical for recruitment of TodT and the establishment of positive cooperativity.

Minimal DNA length for C-TodT binding

Since TodT and C-TodT exhibited similar affinity for target sequences, we designed a series of assays with the C-TodT version to determine the minimal sequence fragment that would allow cooperative binding of the transcriptional regulator. In these assays shortened versions of Box-1 were prepared and called Box-1-18 bp and Box-1-16 bp (Table 1). TodT bound to Box-1-18 bp with a slightly reduced affinity compared to the 20-mer Box-1 (Table 3). However, no binding was observed for Box-1-16 bp. The 18-mer fragment can thus be considered the minimal fragment that allows TodT recognition.

Table 3. Thermodynamic parameters for C-TodT with the Box 1 oligomer and its derived oligomer variants.

DNA	K_D (μM)	$K_D/K_{D\text{WT}}$	K_A (M^{-1})	ΔH (kcal/mol)	$T\Delta S$ (kcal/mol)	ΔG (kcal/mol)
Box 1 (20 bp) ^a	0.72 ± 0.04	-	$(1.4 \pm 0.1) \times 10^6$	12.9 ± 0.1	20.9 ± 0.2	-8.0 ± 0.1
Box1 18 bp	1.1 ± 0.1	0.7	$(8.8 \pm 0.3) \times 10^5$	16.1 ± 0.1	23.8 ± 0.1	-7.7 ± 0.1
Box1 16 bp	No binding					
Box1-1C 20 bp	0.28 ± 0.01	2.5	$(3.6 \pm 0.1) \times 10^6$	14.1 ± 0.1	22.6 ± 0.1	-8.5 ± 0.1
Box1-2C 20 bp	0.16 ± 0.01	5	$(6.2 \pm 0.2) \times 10^6$	16.0 ± 0.1	24.9 ± 0.1	-8.9 ± 0.1
Box1-2C 18 bp	0.61 ± 0.02	1.1	$(1.6 \pm 0.1) \times 10^6$	17.9 ± 0.1	25.6 ± 0.1	-7.7 ± 0.1

^a These data have been previously reported in Lacal *et al.*, 2008.

The palindromic sequence of Box-1 contains one mismatch, and therefore the palindrome can be optimized by mutating either the left hand side of the pseudopalindrome (Box1-1C 20 bp) or the right hand side (Box1-2C 20 bp, Table 1). Microcalorimetric titration of these fragments revealed that TodT bound both optimized fragments with a higher affinity than to the wild type 20-mer sequence (Fig. 3 and Table 3). This was particularly pronounced for Box 1-2C-20 bp, which exhibited a 5-fold increase when compared to Box-1. Using a smaller fragment of 18 bp also resulted in a reduction in affinity (Table 3).

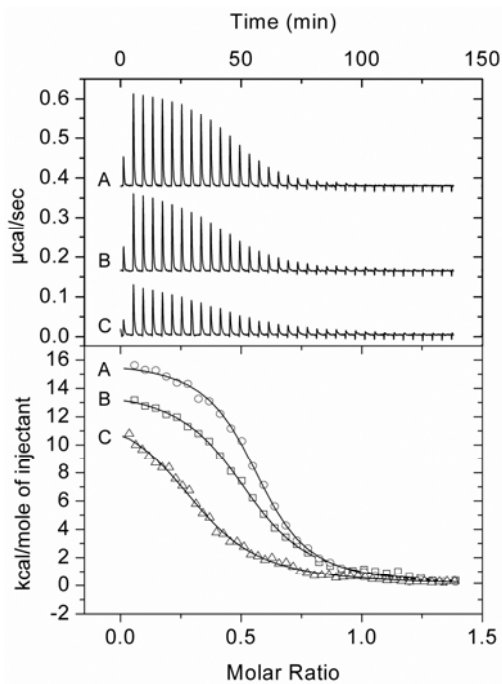


Fig. 3. Microcalorimetric titrations of C-TodT with 20-mer DNA fragments containing TodT Box-1 and its optimized palindromic sequence mutant derivatives. Upper panel: Raw isothermal titration calorimetry data. Titration of 7 μM C-TodT with Box-1-2C oligomer (90 μM) (A), with Box-1-1C oligomer (90 μM) (B) and titration of 10 μM C-TodT with 80 μM of Box1 oligomer (C). DNA injections were 4.8 μl aliquots in all assays. Lower panel: Integrated peak areas and areas fitted using the one-binding site model of ORIGIN (MicroCal. Inc., Northampton, MA, USA). Symbols: circles, Box-1-2C oligomer; squares, Box-1-1C oligomer; triangles, Box-1 oligomer. Thermodynamic parameters are shown in Table 3.

Binding of TodT to P_{todX} promoter induces bending

The results above support that TodT and C-TodT have comparable DNA binding properties; however, C-TodT fails to promote transcription (Lacal *et al.*, 2008). To dissect this phenomenon further we first carried out

EMSA in which a 352-bp fragment bearing P_{todX} was incubated with up to 100 μM C-TodT. Surprisingly, we found that C-TodT was not able to retard DNA in shift assays. Since the ITC results revealed that C-TodT recognizes the target box sequences in P_{todX} , we decided to carry out a foot-print assay with TodT and C-TodT (Fig. 4). The results revealed that both proteins covered the same three binding sites; however, the footprint with C-TodT revealed that hypermethylation of G-68 does not occur (Fig. 4, compare lane 2 [C-TodT] and lane 3 [TodT]). This nucleotide is located between TodT Box-2 and TodT Box-3, leaving an 8-bp gap between the two boxes (See Fig. 5C), which is consistent with the hypothesis that the DNA bends at this point. This may indicate that C-TodT fails to induce DNA bending, which might also account for the lack of DNA gel shift in EMSA, suggesting that a supercomplex is not formed and that a scaffold may be necessary to promote transcription.

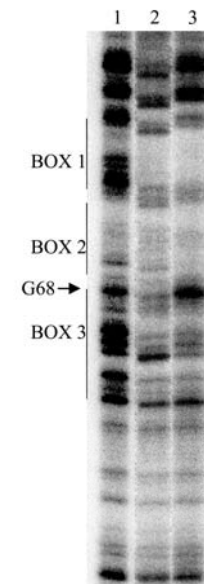


Fig. 4. DNase I footprint analysis of TodT and C-TodT binding to the P_{todX} promoter. Details for the footprint analysis are given in the text. The footprint corresponded to the bottom strand. The concentrations of C-TodT and TodT were 5 μM and DNA was labeled with ^{32}P -ATP. In each assay about 10^5 cpm were used. Lane 1, free DNA; lane 2, C-TodT; lane 3, TodT.

To further analyze DNA bending induced by TodT, we characterized the structure of the complexes in solution with atomic force microscopy (AFM) (Fig. 5). We found two types of TodT-DNA complexes with extended and hair-pinned configurations. The extended complexes are illustrated in Figure 5A. Measuring the distance from the bound protein to either end of the DNA showed that the protein is located at a position corresponding to Boxes-1 and -2. The hairpin structures are illustrated in Figure 5B. In such complexes the protein is bound over a region corresponding to all three binding boxes. The bend in the hairpin is located exactly between Box-2 and Box-3, where the hypermethylation described above was observed. These findings support the suggestion that a higher-order structure must be formed in order for transcription to be promoted.

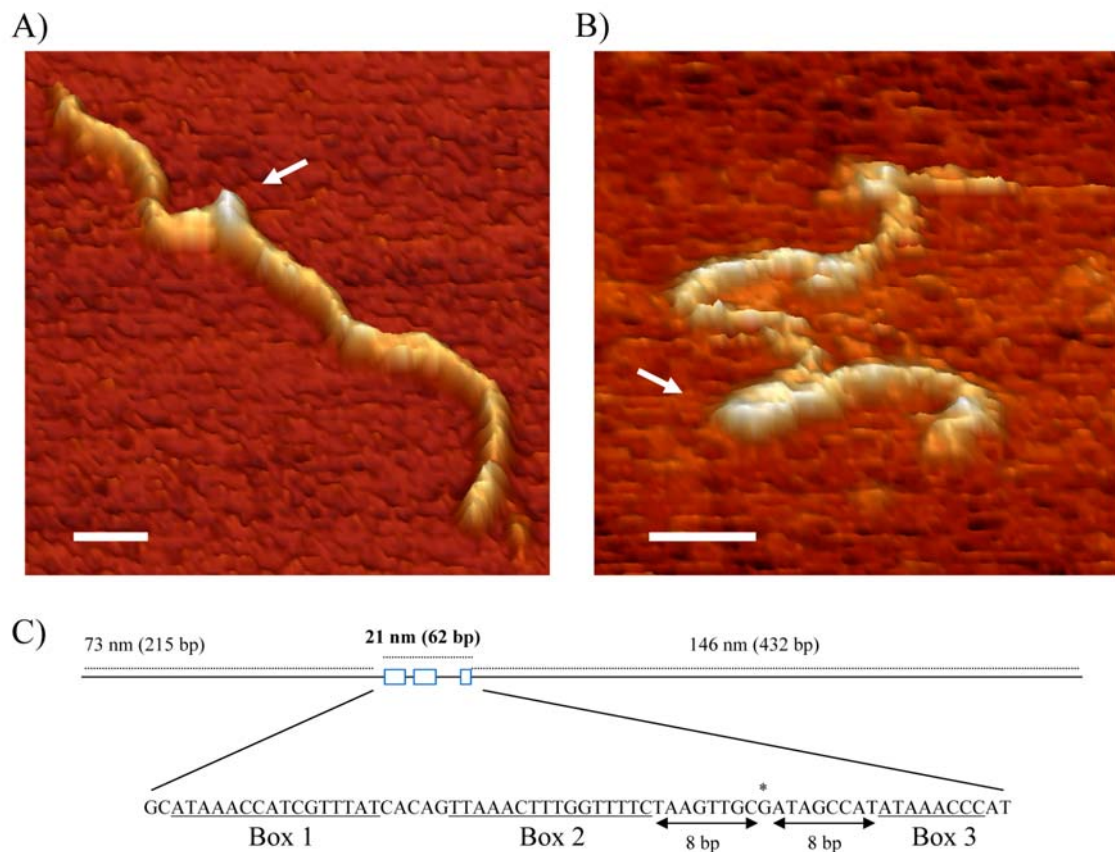


Fig. 5. Atomic force microscopy structural characterization of TodT-DNA complexes. Structures found for TodT-DNA samples. A, “Type II” complexes with the DNA region corresponding to Boxes-1 & -2 covered by TodT. B, A higher-order structure with a hairpin-like configuration where all binding sites are occupied by the TodT protein. This may be associated with complex IV described in the text. (Scale bars represent 28 nm). C, Scheme of the fragment used, specifying distances (in bp and nm) and the DNA sequence of the three TodT boxes. The asterisk indicates the hyperreactive G found in TodT footprinting assays.

Although C-TodT bound to its target promoter, no similar hairpin structures were found in C-TodT-DNA complexes (data not shown).

Table 4. Bacterial strains and plasmids used in this study.

Strains	Relevant characteristics	References
<i>E. coli</i> DH5 α F'	F' / <i>hsdR17</i> , <i>recA1</i> , <i>gyrA</i>	Raleigh <i>et al.</i> , 1989
<i>E. coli</i> BL21(DE3)	F', <i>ompL</i> , <i>hsdS_B</i> ($r_B^- m_B^-$), <i>gal</i> , <i>dam</i> , <i>met</i>	Studier <i>et al.</i> , 1990
<i>P. putida</i> DOT-T1E	Tol ⁺ , wild type, Rif ^R	Ramos <i>et al.</i> , 1995
Plasmids		
pET-28b(+)	Km ^R , protein expression vector	Novagen
pJLTodT	pET28b containing <i>todT</i> gene	Lacal <i>et al.</i> , 2006
pJLCTodTcter	pET28b encoding C-TodT	Lacal <i>et al.</i> , 2008
pMIR77	Tc ^R , <i>lacZ</i> promoter probe	Ramos-González <i>et al.</i> , 2002
Abbreviations: Km ^R and Rif ^R resistance to kanamycin and rifampicin respectively. Tol ⁺ indicates that the strain grows on toluene.		

Discussion

A large proportion of two-component regulatory systems are made up of a sensor kinase and a response regulator; this type of TCS is involved in the transcriptional control of different cellular processes. The mechanism by which most of these systems operate is based on signal sensing by the sensor kinase, which modulates its autophosphorylation and transphosphorylation activities. However, different RRs have been shown to operate by different mechanisms. One of such mechanisms is that observed for NarL in which the full-length nonphosphorylated protein fails to bind to its target promoter. However, upon phosphorylation full-length NarL binds to its target promoter with high affinity (0.15 nM). A recombinant variant of NarL made up solely of the DNA binding domain bound its target promoter with high affinity (Maris *et al.*, 2002). These results suggested that the N-terminal receiver domain inhibited DNA binding. This inhibition can be relieved by either phosphorylation or removal of the domain. Other series of regulators (i.e., RegA, CovR, DcuR or SphR) bind to their target site regardless of its phosphorylation state (Bird *et al.*, 1999; Gao *et al.*, 2005; Janausch *et al.*, 2004; Suzuki *et al.*, 2004), although typically phosphorylation enhances affinity. Some RRs recognize single sites in their cognate promoter(s), while others recognize multiple sites. For example, OmpR binds in a hierarchical manner to three binding sites called F1, F2 and F3 in the *ompF* promoter, and C1, C2 and C3 in the *ompC* promoter (Yoshida *et al.*, 2006). Electrophoretic mobility shift assays of the interaction of OmpR with its promoter identified three complexes, and showed that binding to the F1 site first was a requisite for their formation (Harlocker *et al.*, 1995). This mode of binding has also been reported for RamR binding to the C1, C2 and C3 palindromes in the *ramC* promoter (O'Conner & Nodwell, 2005).

The present study was based on our previous observation that TodT, like OmpR, binds hierarchically to three different DNA binding sites on the P_{todX} promoter with different binding affinities in the following order: TodT Box-1 > TodT Box-2 \geq TodT Box-3 (Lacal *et al.*, 2008 and Table 2). In addition, we show that binding to Box-2 and Box-3 was highly dependent on TodT binding to TodT Box-1 (Lacal *et al.*, 2008). This implies that TodT binding to Box-1 influences binding to TodT Box-2 and Box-3. One of the goals of this study was thus to determine whether binding to the different targets took place in a cooperative manner or via a different type of mechanism. Our results support two steps in cooperativity, the first one predominantly for the binding of two TodT monomers to Box-1 (and also to Box-2, but not as marked as for Box-1) and the second

one involving interbox cooperativity, in which DNA conformation might play a role. The fact that TodT binds with positive cooperativity to P_{todX} guarantees that the protein, which is made at low concentrations, binds to all of its targets in the P_{todX} promoter. This in turn facilitates *in vivo* transcription in response to toluene upon phosphorylation by TodS (Mosqueda *et al.*, 1999). In this study we show that two TodT monomers bound cooperatively to half-palindromes in Box-1 and Box-2. However, in experiments with 10-bp subsites corresponding to each subsite at Box-1 and Box-2, we noticed that affinity of TodT for the upstream Box-1-left was weaker than that for the downstream Box-1-right, suggesting that binding to Box-1 is initiated by TodT interacting with the right subsite. On the other hand TodT had higher affinity for the Box-2-left subsite than for its cognate Box-2-right subsite. Therefore, although the entire event reflects cooperativity the process can be seen as quantum discontinuous binding, with binding to the right subsite of Box-1 as the ultimate target for TodT to initiate the scaffold that leads to transcription promotion. Quantum discontinuous binding has also been reported for the binding of the OmpR regulator to its multiple sites in the *ompF* and *ompC* promoters (Yoshida *et al.*, 2006). Our series of ITC assay with TodT target sequences of different lengths revealed that cooperative binding of TodT to Box-1 requires a minimal nucleotide sequence of 18 bp. In this connection it is worth mentioning that the minimum sequence identified for NarL in the co-crystal structure with its target operator is 19 bp long (Maris *et al.*, 2002).

Our early footprint analysis revealed that at low TodT concentrations (e.g., 1 μ M) TodT bound to Box-1 and Box-2, but not to Box-3. This was surprising since the K_D for Box-2 and Box-3 separately was similar. Furthermore, we found that binding to Box-2 required the occupancy of Box-1, and reasoned that binding to TodT Box-1 facilitated cooperative binding of TodT at Box-2. Our results in Table 2 show that this is the case, since affinity of TodT for an oligonucleotide bearing Box-1 and Box-2 occurred as a single event with a K_D of 0.5 μ M, which is higher than the affinity for individual boxes. Also, binding of TodT to Box-2 enhanced binding to Box-3, although not with the same degree as for Box-1 and Box 2.

We have also shown in this study that C-TodT binds similarly to each half-element of all 3 boxes, as well as to the complete Box-1 and Box-2 or their combination. This was interpreted as evidence that all elements for cooperativity reside at the C-terminal end of TodT. The general similarity in the affinities observed for TodT and C-TodT illustrates well that the structural determinants for DNA recognition reside in the DNA binding domain. The fact that the absence of the receiver domain does not impact significantly on DNA

binding is also consistent with the notion that its phosphorylation does not alter its affinity for DNA. However, in the absence of the NTD domain we did not detect retarded bands in EMSA when the target DNA fragment was titrated with C-TodT, nor did we find hairpin structures when DNA:C-TodT complexes were analyzed with AFM. This suggested that the NTD domain is important for the stability of the scaffold formed with DNA—a proposal supported by our demonstration that full-length TodT triggers the bending of the promoter, whereas C-TodT does not. We suggest that the C-terminal domain of TodT is involved in binding cooperatively to its target DNA, whereas the N-terminal part of TodT is critical for activation via phosphorylation by helping to build the scaffold, which in turn permits the required interactions between the TodT monomers, integration host factor protein and the RNA polymerase complex.

Materials and methods

Bacterial strains and plasmids

The relevant characteristics of the bacterial strains and plasmids used in this study are listed in Table 4.

Recombinant DNA techniques

Preparation of plasmid DNA, purification of DNA fragments and transformation of *E. coli* were carried out with standard procedures (Sambrook *et al.*, 1989). PCR amplifications were performed using *Eurotaq* polymerase (Euroclone) and the pMIR77 ($P_{todX}::lacZ$) plasmid as the DNA template. The primer sequences used for amplification in this study will be provided on request.

Protein purification

His-tagged TodT and C-TodT proteins were prepared and purified as described by Lacal *et al.* (2008).

Electrophoretic mobility shift assay (EMSA)

A 352-bp DNA fragment containing the P_{todX} wild-type promoter was amplified by PCR from pMIR77 using Ptdx1 (5'-GCTCTAGAGGTCTGAGGTTTTTCATCGAC-3') and Ptdx2 (5'-GGGGTACCAATTACAATCCTTCCACATC-3') primers. Amplified DNA was separated on 0.8%

agarose gels, extracted and end-labeled with ^{32}P as described before (Ausubel *et al.*, 1994). Conditions for EMSA assays were exactly as described by Lacal *et al.* (2008).

Isothermal titration calorimetry (ITC)

Measurements were performed on a VP-microcalorimeter (MicroCal, Northampton, MA, USA) at 25 °C. TodT, C-TodT and the 20-mer DNA duplex samples were thoroughly dialyzed in 43 mM Tris-HCl (pH 6.5), 80 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT and 10% (vol/vol) glycerol. Experiments consisted of the injection of 4.8- to 9.6- μl aliquots of 60 to 90 μM DNA into a 6- to 10- μM protein solution. Data were corrected using the heat changes from the injection of DNA into buffer. Titration curves were fitted by a nonlinear least squares method, and data were analyzed using the “one-binding-site model” of the MicroCal version by Wiseman *et al.* (1989). From these curves we calculated the parameters ΔH (reaction enthalpy), K_A (binding constant, $K_A=1/K_D$), and N (reaction stoichiometry). From the values of K_A and ΔH , the change in free energy (ΔG) and entropy (ΔS) were calculated using the equation: $\Delta G = -RT \ln K_A = \Delta H - T\Delta S$, where R is the universal molar gas constant, and T the absolute temperature.

DNase I footprinting

DNase I footprinting was carried out as described previously by Lacal *et al.* (2008). The probes (0.5 nM) were mixed with different amounts of TodT and C-TodT (up to 5 μM) in binding buffer (50 mM Tris-HCl, pH 8.0; 100 mM KCl; 1 mM DTT, 10 mM MgCl₂ and 10% [vol/vol] glycerol).

Atomic force microscopy (AFM)

DNA protein samples were prepared by mixing either TodT or C-TodT with 25 nM of a 709-bp DNA fragment containing the P_{todX} promoter in binding buffer (43 mM Tris-HCl, 20 mM MgCl₂, 10 mM KCl, 10% glycerol, pH 6.8) at room temperature for 30 min. The mixture was then deposited for 1 min onto freshly cleaved mica (Agar Scientific Limited, Stansted, UK) in the presence of 5 mM NiCl₂ at a final DNA concentration of 2.5 nM, and thoroughly washed with buffer before processing for image acquisition. Protein:DNA ratios ranged from 40:1 up to 100:1. At these ratios the expected distribution based on EMSA results (Fig. 1A) included all four complexes I, II, III

and IV. The stringent requirements for high resolution AFM imaging prevented us from incubating at higher protein ratios.

The 709-bp DNA fragment containing all three TodT binding sites was obtained by PCR and covered from –327 to +382 nucleotides with respect to the P_{todX} promoter transcription start site. The binding sequence was asymmetrically located in the fragment, so that Box-1 was located 1/3 away from the 5'-end of the upper strand, as depicted in Figure 5C.

Images were acquired in solution (incubation buffer) with a Nanotec Electrónica Atomic Force Microscope operating in jumping mode, using silicon nitride cantilevers (0.76-0.05 N/m, Olympus OMCL-RC800PSA). All images were processed with WSxM software (Nanotec Electrónica, Tres Cantos, Spain) (Horcas *et al.*, 2007).

Acknowledgments

This work was supported by grants from the Spanish Ministry of Science and Education (CICYT BIO-2006-05668, BFU 2005-0487-C02-02, CSD 2007-00010) and grants CIV344 and CIV1912 from Junta de Andalucía to Juan L. Ramos and Tino Krell respectively. Paloma Gutiérrez is recipient of a pre-doctoral I3P scholarship from the CSIC. We would like to thank Carmen Lorente and M. Mar Fandila for secretarial assistance, as well as Karen Shashok for improving the language in the final version of this manuscript.

References

Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R.E, Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A., and Struhl, K. (ed.). (1994) Current protocols in molecular microbiology. John Wiley & Sons, New York, N.Y.

Bernal, P., Segura, A, and Ramos, J.L. (2007) Compensatory role of the *cis-trans*-isomerase and cardiolipin synthase in the membrane fluidity of *Pseudomonas putida* DOT-T1E. *Environ Microbiol* **9**: 1658-1664.

Bird, T. H., Du, S., and Bauer, C.E. (1999) Autophosphorylation, phosphotransfer, and DNA-binding properties of the RegB/RegA two-component regulatory system in *Rhodobacter capsulatus*. *J Biol Chem* **274**: 16343-16348

Busch, A., Lacal, J., Martos, A., Ramos, J.L., and Krell, T. (2007) The bacterial TodS sensor kinase interacts with agonists and antagonists. *Proc Natl Acad Sci USA* **104**: 13774-13779.

Domínguez-Cuevas, P., González-Pastor, J. E., Marqués, S., Ramos, J. L. and de Lorenzo. V. (2006) Transcriptional tradeoff between metabolic and stress-

response programs in *Pseudomonas putida* KT2440 cells exposed to toluene. *J Biol Chem* **281**:11981-11991.

Finette, B.A., Subramanian, V., and Gibson, D.T. (1984) Isolation and characterization of *Pseudomonas putida* PpF1 mutants defective in the toluene dioxygenase enzyme system. *J Bacteriol* **160**:1003-1009.

Gao, J., Gusa, A.A., Scott, J.R., and Churchward, G. (2005) Binding of the global response regulator protein CovR to the *sag* promoter of *Streptococcus pyogenes* reveals a new mode of CovR-DNA Interaction. *J Biol Chem* **280**: 38948-38956

Harlocker, S. L., Bergstrom L., and Inouye, M. (1995) Tandem binding of six OmpR proteins to the *ompF* upstream regulatory sequence of *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **270**: 26849-26856.

Heipieper, H. J., and de Bont, J. A. (1994) Adaptation of *Pseudomonas putida* S12 to ethanol and toluene at the level of fatty acid composition of membranes. *Appl Environ Microbiol* **60**: 4440-4444.

Horcas, I., Fernández, R., Gómez-Rodríguez, J.M., Colchero, J., Gómez-Herrero, J., and Baró, A.M. (2007) WSxM: a software for scanning probe microscopy and a tool for nanotechnology. *Rev Sci Instrum* **78**: 013705.

Isken, S., and de Bont, J. A. (1996) Active efflux of toluene in a solvent-resistant bacterium. *J Bacteriol* **178**: 6056-6058.

Janausch, I. G., Garcia-Moreno, I., Lehnen, D., Zeuner, Y., and Gottfried, U. (2004) Phosphorylation and DNA binding of the regulator DcuR of the fumarate-responsive two-component system DcuSR of *Escherichia coli*. *Microbiology* **150**: 877-883.

Junker, F., and Ramos J. L. (1999) Involvement of the *cis/trans* isomerase CtiT1 in solvent resistance in *Pseudomonas putida* DOT-T1E. *J Bacteriol* **181**: 5693-5700.

Lacal, J., Busch, A., Guazzaroni, M. E., Krell, T., and Ramos, J.L. (2006) The TodS-TodT two-component regulatory system recognizes a wide range of effectors and works with DNA-bending proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* **103**: 8191-8196.

Lacal, J., Guazzaroni, M.E., Busch, A., Krell, T., and Ramos, J.L. (2008) Hierarchical binding of the TodT response regulator to its multiple recognition sites at the *tod* pathway operon promoter. *J Mol Biol* **376**: 325-337.

Lau, P.C.K., Wang, Y., Patel, A., Labbé, D., Bergeron, H., Brousseau, R., Konishi, Y., and Rawlings, M. (1997) A bacterial basic region leucine zipper histidine kinase regulating toluene degradation. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**: 1453-1458.

Maris, A. E., Sawaya, M.R., Kaczor-Grzeskowiak, M., Jarvis, M. R., Bearson, S. M. et al. (2002) Dimerization allows DNA target site recognition by the NarL response regulator. *Nat Struct Biol* **9**: 771-778.

Milani, M., Leoni, L., Rampioni, G., Zennaro, E., Ascenzi, P., and Bolognesi, M. (2005) An active-like

- structure in the unphosphorylated StyR response regulator suggests a phosphorylation-dependent allosteric activation mechanism. *Structure* **13**: 1289-1297.
- Mosqueda, G., Ramos-González, M. I., and Ramos, J.L. (1999) Toluene metabolism by the solvent-tolerant *Pseudomonas putida* DOT-T1E strain, and its role in solvent impermeabilization. *Gene* **232**: 69-76.
- O'Connor, T.J., and Nodwell, J.R. (2005) Pivotal roles for the receiver domain in the mechanism of action of the RamR protein of *Streptomyces coelicolor*. *J Mol Biol* **351**: 1030-1047
- Raleigh, E. A., Trimarchi, R., and Revel, H. (1989) Genetic and physical mapping of the mcrA (*rglA*) and mcrB (*rglB*) loci of *Escherichia coli* K-12. *Genetics* **122**: 279-296.
- Ramos, J.L., Duque, E., Gallegos, M.T., Godoy, P., Ramos-González, M.I., Rojas, A., Terán, W., Segura, A. (2002) Mechanisms of solvent tolerance in Gram-negative bacteria. *Ann Rev Microbiol* **56**: 743-768.
- Ramos, J.L., Duque, E., Huertas, M.J., and Haïdour, A. (1995) Isolation and expansion of the catabolic potential of a *Pseudomonas putida* strain able to grow in the presence of high concentrations of aromatic hydrocarbons. *J Bacteriol* **177**: 3911-3916.
- Ramos-González, M.I., Godoy, P., Alaminos, M., Ben-Bassat, A., and Ramos, J.L. (2001) Physiological characterization of *Pseudomonas putida* DOT-T1E tolerance to *p*-hydroxybenzoate. *Appl Environ Microbiol* **67**: 4338-4341.
- Rojas, A., Duque, E., Mosqueda, G., Golden, G., Hurtado, A., Ramos, J.L., Segura, A. (2001) Three efflux pumps are required to provide efficient tolerance to toluene in *Pseudomonas putida* DOT-T1E. *J Bacteriol* **183**: 3967-3973.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., and T. Maniatis (1989) Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Segura, A., Duque, E., Rojas, A., Godoy, P., Delgado, A., Hurtado, A., Cronan, J., and Ramos, J.L. (2004). Fatty acid biosynthesis is involved in solvent tolerance in *Pseudomonas putida* DOT-T1E. *Environ Microbiol* **6**: 416-423.
- Segura, A., Godoy, P., van Dillewijn, P., Hurtado, A., Arroyo, N., Santacruz, S., and Ramos, J.L. (2005) Proteomic analysis reveals the participation of energy- and stress-related proteins in the response of *Pseudomonas putida* DOT-T1E to toluene. *J Bacteriol* **187**: 5937-5945.
- Suzuki, S., Ferjani, A., Suzuki, I., and Murata, N. (2004) The SphS-SphR two component system is the exclusive sensor for the induction of gene expression in response to phosphate limitation in *Synechocystis*. *J Biol Chem* **279**: 13234-13240
- Studier, F. W., Rosenberg, A. H., Dunn, J. J., and Dubendorff, J. W. (1990) Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. *Methods Enzymol* **185**: 60-89.
- Wery, J., Hidayat, B., Kieboom, J., and de Bont, J.A. (2001) An insertion sequence prepares *Pseudomonas putida* S12 for severe solvent stress. *J Biol Chem* **276**: 5700-5706.
- Wiseman, T., Williston, S., Brandts, J. F., and Lin, L.N. (1989) Rapid measurement of binding constants and heats of binding using a new titration calorimeter. *Anal Biochem* **179**: 131-137.
- Yoshida, T., Qin, L., Egger, L.A., and Inouye, M. (2006) Transcription regulation of *ompF* and *ompC* by a single transcription factor, OmpR. *J Biol Chem* **281**: 17114-17123
- Zylstra, G.J., and Gibson, D.T. (1989) Toluene degradation by *Pseudomonas putida* F1. Nucleotide sequence of the *todC1C2BADE* genes and their expression in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **264**: 14940-14946.
- Zylstra, G.J., McCombie, W.R., Gibson, D.T., and Finette, B.A. (1988) Toluene degradation by *Pseudomonas putida* F1: genetic organization of the *tod* operon. *Appl Environ Microbiol* **54**: 1498-1503.

**A plasmid confers hyper-chemotaxis phenotype to *Pseudomonas putida* strains:
Implications for biodegradation of organic solvents**

Jesús Lacal, Rebecca Parales, Tino Krell and Juan L. Ramos

Se han descrito varias bacterias del suelo con capacidad de responder quimiotácticamente hacia distintos compuestos aromáticos. Típicamente, con los ensayos de gota de agarosa, se ve que las bacterias forman una banda de células a una cierta distancia de la gota que contiene inmovilizado el hidrocarburo. En el presente estudio, también se observó este fenómeno de quimio-atracción para las cepas *Pseudomonas putida* F1 y KT2440 hacia diferentes compuestos aromáticos, así como hacia intermediarios del metabolismo de la glucosa. A diferencia de éstas, la cepa *P. putida* DOT-T1E presentó un fenotipo quimiotáctico alterado, ya que las células se acumulaban directamente en la superficie de la gota conteniendo hasta un 10 % (v/v) de tolueno. Se encontró que el determinante para este fenotipo híper-quimiotáctico estaba asociado con el plásmido pGRT1, el cual está presente en DOT-T1E y ausente en el resto de cepas analizadas. El análisis de la variante de DOT-T1E curada de dicho plásmido, resultó en la pérdida del fenotipo híper-quimiotáctico, mientras que a las células de KT2440 que se les transfirió el plásmido pGRT1, adquirieron dicho fenotipo. El plásmido pGRT1 porta los genes de la bomba de eflujo TtgGHI, la cual es la principal responsable de la alta resistencia a disolventes de la cepa DOT-T1E. El comportamiento quimiotáctico hacia tolueno de una cepa conteniendo una variante de pGRT1 mutada en los genes *ttgGHI* fue el mismo que para aquellas que contenían el plásmido silvestre completo, lo que indica, que los distintos fenotipos quimiotácticos observados no son debidos a la resistencia a tolueno. Se discute la relevancia de este fenotipo híper-quimiotáctico con objeto de su aplicación en bioremediación. Además, demostramos que el sistema de dos componentes TodS/TodT, no está implicado en la respuesta quimiotáctica hacia disolventes orgánicos.

Artículo en preparación

2008

A plasmid confers hyper-chemotaxis phenotype to *Pseudomonas putida* strains: Implications for biodegradation of organic solvents

Jesús Lacal¹, Rebecca Parales², Juan L. Ramos¹, and Tino Krell¹

1. Department of Environmental Protection, Estación Experimental del Zaidín, CSIC, 18008 Granada, Spain

2. Section of Microbiology, University of California, Davis, California 95616, USA

Abstract

Several soil bacteria were shown previously to be chemotactically attracted towards different aromatic compounds. Typically, in agarose plug assays bacteria were found to form a band of cells at a distance of the plug containing the immobilised hydrocarbon. In the present study this phenotype was also observed for the chemoattraction of *Pseudomonas putida* strains F1 and KT2440 to different aromatic compounds as well as to intermediates of the glucose metabolism. In contrast, *P. putida* strain DOT-T1E had an altered chemotaxis phenotype since cells accumulated directly on the surface of the plug containing up to 10 % (v/v) of toluene. The determinant for this hyper-chemotaxis phenotype was found to be associated with the plasmid pGRT1 which is present in DOT-T1E but absent from the other strains analysed. The analysis of a plasmid-free variant of strain DOT-T1E resulted in the loss of the hyper-chemotaxis phenotype, whereas KT2440 cells, into which pGRT1 was transferred, had acquired this phenotype. Plasmid pGRT1 harbours the genes for the efflux pump TtgGHI which is largely responsible for remarkable solvent resistance of strain DOT-T1E. The chemotactic behaviour towards toluene of a strain containing a pGRT1 variant encoding non-functional *ttgGHI* was indistinguishable from strains containing the wild-type plasmid, indicating that differential chemotaxis phenotypes are not founded in a differential resistance towards toluene. The relevance of this hyper-chemotaxis phenotype for bioremediation purposes is discussed. Furthermore, we demonstrate that the TodS/TodT two-component system is not involved in the chemotactic response towards organic solvents.

Introduction

Organic solvents such as toluene or benzene are toxic to life and the toxicity of a given solvent correlates with the logarithm of its partition coefficient in *n*-octanol and water (log Pow). Organic solvents with a log Pow between 1.5 and 4.0 are extremely toxic for microorganisms and other living cells because they partition preferentially in the cytoplasmic membrane, disorganizing its structure and impairing vital functions (Ramos *et al.*, 2002).

Despite the fact that toluene has a log Pow of 2.5, *Pseudomonas putida* strain DOT-T1E is able to live in a toluene-saturated environment and is thus highly resistant to this compound (Ramos *et al.*, 1995). The resistance was found to be based on the action of three RND efflux pumps which expulse the solvent from the cell (Rojas *et al.*, 2001). Apart from its resistance, this strain is also capable of degrading toluene, benzene and ethylbenzene into TCA cycle intermediates making use of the TOD degradation pathway (Zylstra and Gibson, 1989). The genes of this pathway form the operon *todXFC1C2BADEGIH* which is transcribed from a single promoter termed P_{todX} , located upstream the *todX* gene (Lacal *et al.*, 2006; Lau *et al.*, 1997; Mosqueda *et al.*, 1999; Zylstra and Gibson, 1989). This promoter is controlled by the two-component system TodS/TodT (Lau *et al.*, 1997, Lacal *et al.* 2006). The sensor kinase TodS is atypical since it contains two segments containing each a PAS type sensor domain and an autokinase domain (Fig. 1). Based on this double domain arrangement it has been proposed that this protein might have a dual function (Lau *et al.*, 1997). The implication of TodS in regulating P_{todX} expression in response to organic solvents is well established: compounds such as toluene were found to bind to the N-terminal PAS-domain (Fig. 1) which results in an increase in TodS autophosphorylation and transphosphorylation towards its cognate response regulator TodT. TodT binds to P_{todX} and the

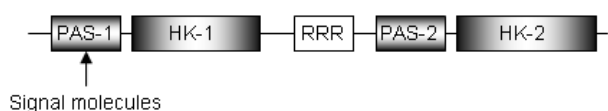


Fig. 1. Schematic drawing of the domain arrangement of the sensor kinase TodS. RRR: response regulator receiver; HK, histidine kinase; PAS, sensor domain of PAS type.

phosphorylated form of this protein activates transcription (Lacal *et al.*, 2006, Busch *et al.*, 2007, Lacal *et al.*, 2008).

Bacterial chemotaxis, the movement under the influence of a chemical gradient, either towards (positive chemotaxis for nutrients) or away (negative chemotaxis in the case of toxins) from the gradient helps bacteria to find optimal conditions for growth and survival (Pandey and Jain, 2002, Baker *et al.*, 2005). This seems to be paradoxical in the context of *P. putida* DOT-T1E since toluene is at the same time toxin and nutrient. Parales *et al.* (2000) demonstrated that toluene-degrading bacteria such as *P. putida* F1 are chemotactic towards toluene and other aromatic compounds. The authors have furthermore noticed that *P. putida* F1 mutants deficient in *todS* and *todT* have lost their chemotactic phenotype towards organic solvents. In the well-studied chemotaxis system of *E. coli* attractant binding occurs at an MCP (methylaccepting chemotaxis protein) chemotaxis receptor which transmits the resulting stimulus to the CheA sensor kinase. In the light of the finding that mutants deficient in TodS lose their chemotactic capacities towards organic solvents, Parales *et al.* (2000) suggested that TodS instead of an MCP might function as the chemoreceptor.

Pseudomonas putida DOT-T1E is highly resistant to organic solvents and is able to efficiently degrade some of them. This strain is thus a candidate for a biotechnological exploitation aimed at the bioremediation of organic toxins. A major limitation of bioremediation has been shown to be the bioavailability of the organic contaminants (Head, 1998). Chemotaxis has been found to increase bioavailability. This is exemplified by a study by Law and Aitken (2003) who demonstrate that *P. putida* G7, shown to be chemotactic to naphthalene, is able to degrade more efficiently this compound than a mutant strain deficient in chemotaxis to naphthalene. Furthermore, to improve access to adsorbed pollutants, degradative bacteria need to find and attach to surfaces possibly through biofilm formation (Pandey and Jain, 2002). For several microorganisms chemotaxis was found to play an important role in biofilm formation (Singh *et al.*, 2006, O'Toole and Kolter, 1998; Pratt and Kolter, 1998) which helps the bacterium to move towards the adsorbed nutrient. It is therefore of interest to investigate the chemotactic behaviour and the capacity

to form biofilm for bacteria with potential use in bioremediation.

This study thus aims at characterising the chemotactic behaviour of *P. putida* DOT-T1E and to define the role of TodS/TodT in this process. Surprisingly, this study resulted in the demonstration of a novel chemotaxis phenotype which is quite different to the one observed for other members of the genera. The biotechnological implications of this discovery are discussed.

Materials and Methods

Growth of bacterial strains. *Pseudomonas putida* wild type and mutant strains were grown in minimal medium MSB (Stanier *et al.*, 1966) supplemented with 40 mM pyruvate. Growth was either carried out in the absence (uninduced condition) or presence of toluene (induced) which was provided in the vapour phase. The growth medium of *P. putida* DOT-T1E *todST* harboring pMIR66 and derivatives was supplemented with 100 µg/ml gentamycin. Bacteria and plasmids used in this study are listed in Table 1.

Optimization of cell motility. Prior to chemotaxis assays the motility of the different strains was optimized using 1 : 10 diluted LB agar plates. Cells were placed into the centre of the plate. Due to the low density of the swimming plate, cells moved outwards. After growth for 48 - 72 hours most mobile cells present in the fringe of the growth zone were again transferred to the centre of a fresh plate. The procedure was repeated twice so that more than 80 % of the cells were mobile.

Chemotaxis assays. Agarose plug assays were carried out as previously described (Parales *et al.*, 2000). In short, the mixture to generate the agarose plug contained the following: 2 % (w/v) low-melting-temperature OmniPur agarose (EMD), chemotaxis buffer (40 mM K₂HPO₄/KH₂PO₄, 0.05% [w/v] glycerol, 10 mM EDTA, pH 7.0), the chemoattractant and a trace of Coomassie blue to provide contrast. A 9 µl drop of this liquefied mixture was placed on a microscope slide, and a coverslip supported by two plastic strips was then placed on top to form a chamber. Cells were harvested at an OD₆₆₀ of 0.3 to 0.7, resuspended in chemotaxis buffer to an OD₆₆₀ of 0.7, and then introduced into the chemotaxis chamber surrounding the agarose plug. The following control was carried out in parallel with each series of experiment: assays with plugs containing chemotaxis buffer served as negative control, whereas the chemotaxis in response to 2 mM succinate was the positive control.

For capillary assays, capillaries with a volume of 1 µl contained 2% low-melting-temperature agarose dissolved in chemotaxis buffer and 10 % (vol/vol) of the

Table 1. Bacterial strains and plasmids used in this study.

Strains	Features	Source of reference
<i>P. putida</i> DOT-T1E	Tol ^{R+} , Rif ^R	Ramos <i>et al.</i> , 1995
<i>P. putida</i> DOT-T1E <i>todST</i>	Tol ^{R-} , Rif ^R , Km ^R , <i>todST</i> ::Km	Ramos-González <i>et al.</i> , 2002
<i>P. putida</i> DOT-T1E <i>todT</i>	Tol ^{R-} , Rif ^R , Km ^R , <i>todT</i> ::Km	Mosqueda <i>et al.</i> , 1999
<i>P. putida</i> DOT-T1E-100	Spontaneous Tol ^{S+} derivative of DOT-T1E, Rif ^R	Rodríguez-Herva <i>et al.</i> , 2007
<i>P. putida</i> DOT-T1E-PS28	Tol ^{S+} , Rif ^R , Sm ^R , <i>ttgH</i> ::ΩSm	Rojas <i>et al.</i> , 2001
<i>P. putida</i> F1	Tol ^{S+}	Gibson <i>et al.</i> , 1968
<i>P. putida</i> KT2440	mt-2 pWW0 cured, Tol ^{S-}	Franklin <i>et al.</i> , 1981
<i>P. putida</i> KT2440R	Tol ^{S-} , Rif ^R derivative of KT2440	Espinosa & Ramos, 2004
<i>P. putida</i> KT2440R PP2643	Tol ^{S-} , Rif ^R	This study
<i>P. putida</i> KT2440R PP4658	Tol ^{S-} , Rif ^R	This study

Plasmids		
pMIR66	Gm ^R , containing the <i>todST</i> genes	Ramos-González <i>et al.</i> , 2002
pJLC1	pMIR66, <i>todS</i> :: <i>aphA-3</i>	Lacal <i>et al.</i> , 2006
pJLC2	pMIR66, <i>todT</i> :: <i>aphA-3</i>	Lacal <i>et al.</i> , 2006
pGRT1	Large self-transmissible plasmid	Rodríguez-Herva <i>et al.</i> , 2007
pGRT1::Δ <i>ttgV</i>	pGRT1, <i>ttgV</i> :: <i>aphA-3</i> , Km ^R	Rojas <i>et al.</i> , 2003

Abbreviations: Gm^R, Km^R, Rif^R, Sm^R, resistance to, gentamicin, kanamycin, rifampicin and streptomycin respectively. Tol⁺ indicates that the strain grows on toluene, Tol⁻ indicates that the strain cannot use toluene as the sole carbon and energy source. Tol^R and Tol^S stand for tolerance and sensitivity, respectively, to > 0.3% (v/v) toluene in liquid medium.

attractant. Freshly grown cells were resuspended in chemotaxis buffer to an OD₆₆₀ of 0.1 and placed into an observation chamber formed by a microscope slide and a coverslip. The capillary containing the attractant was then inserted into the cell suspension.

Verification of the presence of pGRT1 by PCR: The presence or absence of pGRT1 in different bacterial strains was verified by PCR using the oligonucleotides 5'-CTGATCAGGCTGTAAAGTGGCTGG-3' and 5'-GCCCTGCGTTTTAGCGATGGCTTC-3'. In this reaction the plasmid-encoded *lspA* and *orf156* genes, are amplified of 2314 bp length, product to yield a (Rodríguez-Herva *et al.*, 2007). A large bacterial colony was resuspended in 10 μl of water, heated at 100 °C for 10 minutes and centrifuged at 20 000 x g for 2 minutes. Three μl of the resulting supernatant was used as template for PCR amplifications using standard conditions. Reaction products were analysed on 0.8 % (w/v) agarose gels.

Results

***Pseudomonas putida* DOT-T1E is hyper-chemotactic towards organic solvents.** Parales *et al.* (2000) studied the chemotactic response of *P. putida* F1 towards toluene using agarose plug assays. Using this technique a drop of agarose containing the attractant is deposited between two cover slips spaced out by around 1 mm. Subsequently the remaining space between the two

cover slips is filled with a bacterial suspension. Toluene diffuses into the bacterial culture creating a gradient. In the case of *P. putida* F1 Parales *et al.* (2000) observed that bacteria accumulated in a ring surrounding but not touching the toluene-containing agarose plug.

Using the same technique we have analysed the chemotactic behaviour of *P. putida* DOT-T1E. Initial control experiments were aimed at detecting chemotaxis towards succinate and at demonstrating that no chemotaxis occurs in response to chemotaxis buffer. As shown in Fig. 2 ring formation around the succinate containing agarose drop occurred confirming the functionality of motile apparatus of the bacteria. However, when 1 mM toluene was immobilised in the agarose plug, the bacteria were found to assemble on the surface of the agarose plug (Fig. 2). This was in contrast to Parales *et al.* (2000) who found that strain F1 formed a ring at a certain distance with respect to the central plug. Toluene is soluble to around 5 mM in aqueous buffer systems. The agarose plug assays were repeated with toluene concentrations to up to 10 % (v/v). In all cases the cells accumulated immediately at the agarose plug. When other aromatic hydrocarbons, such as *o*-xylene, benzene, ethylbenzene, styrene, *o*-nitrotoluene, *m*-iodotoluene, 1,3,5 TMB, *o*-toluidin and *m*-bromotoluene were tested, a similar behaviour was observed.

To further the understanding of the phenotype observed for strain DOT-T1E, the assays were repeated with strains F1 and KT2440. As shown in Fig. 2, in both

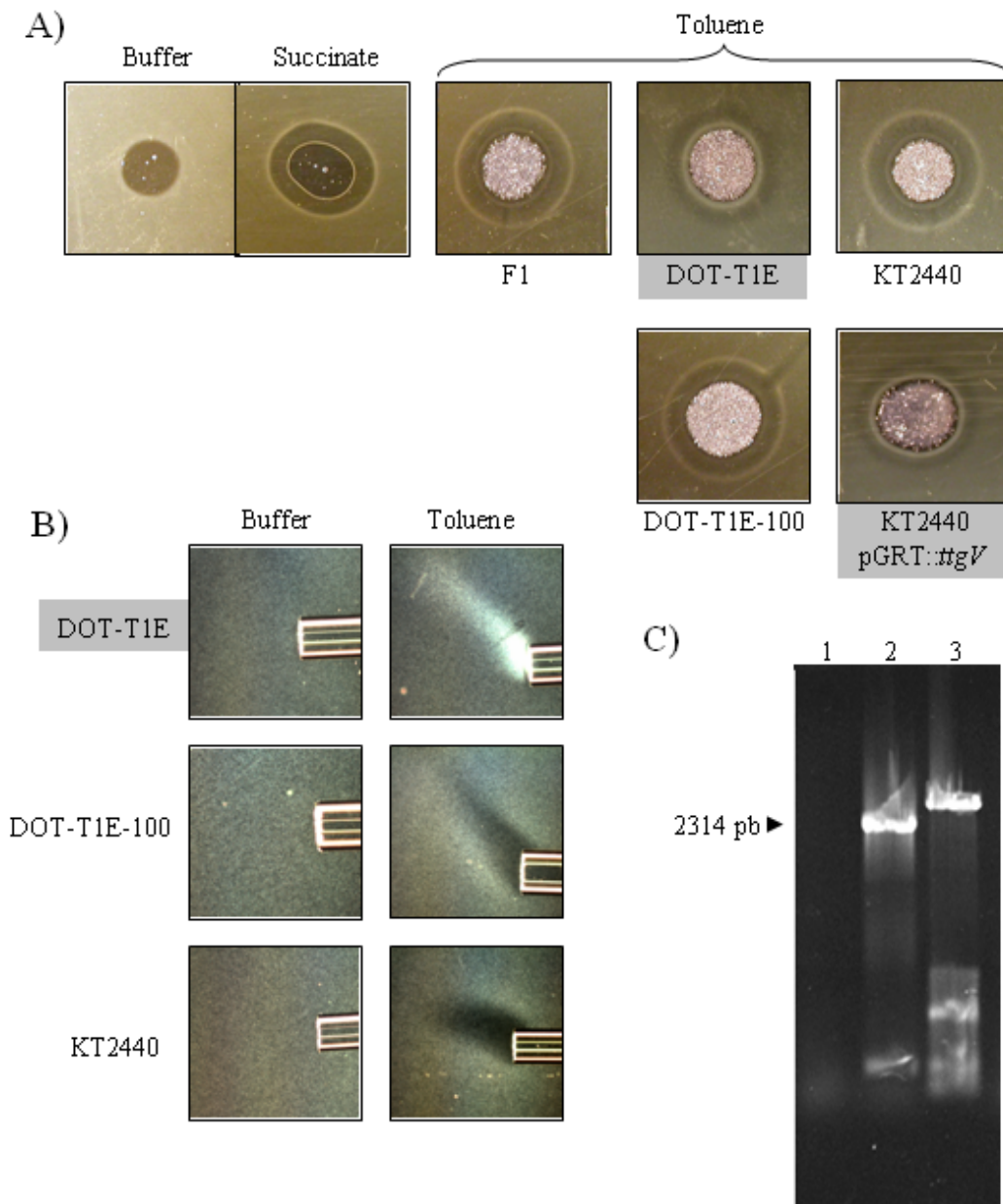


Fig. 2. Chemotactic behaviour of different wild-type and mutant strains of *P. putida* towards toluene. A) Agarose plug assays of strains F1, DOT-T1E and KT2440. Strain DOT-T1E-100 is a derivative of DOT-T1E lacking the large, self-transmissible plasmid pGRT1 (Rodríguez-Hervas *et al.*, 2007). Strain KT2440 (pGRT1-*ttgV::aphA3*) corresponds to the wild type KT2440 strain into which pGRT1 was transferred. Strains presenting the hyper-chemotaxis phenotype are highlighted in grey. Representative controls using buffer and succinate as attractant and strain DOT-T1E are shown. B) Capillary assays of strains DOT-T1E, DOT-T1E-100 and KT2440. In all cases the concentration of toluene and succinate was 10 % (v/v) and 2 mM, respectively. C) PCR of DOT-T1E and DOT-T1E-100 to amplify a 2314 kbp DNA fragment specific to pGRT1 (for more details see Materials and Methods).

cases cells accumulated in a ring at a distance of the plug, which corresponded to the phenotype described by Parales *et al.* (2000) for strain F1.

To exclude the possibility that the observed differences are due to the assay used, the chemotactic behaviour was analysed using capillary assays. Using this

technique a capillary was filled with agarose containing 10 % (v/v) toluene. The opening of the capillary is subsequently submerged into a bacterial solution. In analogy to the agarose plug assay *P. putida* DOT-T1E accumulates at the very mouth of the capillary whereas

P. putida KT2440 forms a cloud at a distance of the capillary (Fig. 2B).

A plasmid confers hyper-chemotactic behaviour of *Pseudomonas putida* towards organic solvents. The phenotype observed for strain DOT-T1E was termed hyper-chemotaxis and subsequent experiments were aimed at identifying its molecular basis. A large, low-copy, self transmissible plasmid termed pGRT1 has been identified in strain DOT-T1E which is absent from strains F1 and KT2440 (Rodríguez-Herva *et al.*, 2007). It was shown that this plasmid is largely responsible for the solvent resistance of this strain. Since this plasmid is absent from strains F1 and KT2440 we hypothesised that it might harbour a determinant which confers the hyper-chemotaxis phenotype to strain DOT-T1E.

Agarose plug assays using toluene as attractant were thus carried out using strain DOT-T1E-100, which lacks plasmid pGRT1. Prior to all assays the presence or absence of pGRT1 was verified by amplifying 2314 kb fragment of this plasmid (Fig. 2C, see Materials and Methods). As shown in Fig. 2A, cells of strain DOT-T1E-100 accumulated in a ring at a distance to the toluene containing agarose plug and did not show the hyper-chemotaxis phenotype of its parental strain harbouring pGRT1. This observation was confirmed by an analysis of strain DOT-T1E-100 by capillary assays (Fig. 2 B). Cells formed a cloud at a distance of the capillary mouth and the phenotype observed was again similar to that of strains F1 and KT2440 (Fig. 2B).

Rodríguez-Herva *et al.* (2007) have shown that pGRT1 replicates in other *Pseudomonas* strains amongst which strain KT2440. To verify whether pGRT1 is responsible for the hyper-chemotaxis phenotype *P. putida* KT2440 carrying a derivative of plasmid pGRT1 was analysed. This plasmid, (pGRT1-*ttgV::aphA3*) contained a kanamycin resistance cassette within the gene *ttgV* to aid selection. TtgV has been extensively studied in our laboratory (Rojas *et al.*, 2003, Guazzaroni *et al.*, 2004, Guazzaroni *et al.*, 2005) and was found to be the repressor of the efflux pump TtgGHI equally encoded on pGRT1. We show below that this efflux pump is not involved in conferring the hyper-chemotaxis phenotype. Most interestingly, strain KT2440 (pGRT1-*ttgV::aphA3*) showed the hyper-chemotaxis phenotype since cells accumulated directly at the agarose plug.

In summary, the removal of pGRT1 from the DOT-T1E resulted in the loss of the hyper-chemotaxis phenotype whereas acquisition of this plasmid by strain KT2440 confers this phenotype to the strain. This is evidence that the hyper-chemotaxis phenotype observed in strain DOT-T1E is associated with pGRT1.

Subsequent attempts were made to identify the gene on pGRT1 responsible for the chemotaxis phenotype. The size of the plasmid of pGRT1 (approximately 120 kb), however, indicates that it might harbour a significant

number of genes. The plasmid was discovered since it harboured the *ttgVW-ttgGHI* gene cluster encoding the transcriptional regulator TtgV which was shown to control the expression of the RND efflux pump TtgGHI (Rojas *et al.*, 2003). This pump expulses organic solvents into the growth medium and is the primary cause for the solvent resistance of *Pseudomonas putida* DOT-T1E. To verify whether the cellular extrusion of the chemoattractant toluene is the reason for the hyper-chemotaxis phenotype mutant strain DOT-T1E-PS28 (Rojas *et al.*, 2001) was analysed. This mutant has a non-functional pump TtgGHI and was found to be sensitive to toluene (Rojas *et al.*, 2001). Agarose plug assays revealed that the chemotactic behaviour of mutant DOT-T1E-PS28 is comparable to its parental strain. This indicates that the function of the TtgGHI efflux pump can not be associated with the hyper-chemotaxis phenotype.

Chemotaxis was independent of preinduction with toluene and of catabolite repression of P_{todX} . The above series of experiments were made with bacterial cultures which were grown in a medium that did not contain toluene. Parales *et al.* (2000) have reported that the chemotactic response observed towards toluene was dependent on pre-induction with toluene. We have repeated chemotaxis experiments using strains DOT-T1E and DOT-T1E-100 precultured in the medium containing toluene supplied in the gas phase. However, chemotactic behaviour was indistinguishable from experiments in which toluene had been omitted for preculture. This does not support the notion that the chemotactic response is inducible by toluene.

There is a significant amount of examples in the literature which demonstrate that the chemotactic response is coordinated with the expression of the catabolic genes (Ditty and Harwood, 2001; Hawkins and Harwood, 2002; Vardar *et al.*, 2005). The promoter P_{todX} , controlling the expression of the *tod* pathway in *P. putida* DOT-T1E was found to be subject to catabolite repression by glucose (unpublished). To establish whether there is a link between catabolite repression and chemotaxis, cultures of strain DOT-T1E in minimal medium M9 supplemented with 0.5 % (w/v) glucose were grown in the presence and absence of toluene supplied in the gas phase. Control cultures, in which glucose was omitted, were grown in parallel. Our previous studies have shown that under these experimental conditions the presence of glucose suppresses almost completely the toluene-mediated upregulation of expression from P_{todX} (unpublished). The resulting cultures were submitted to agarose plug assays containing toluene or succinate. However, the intensity and the rapidity of the chemotactic response was undistinguishable in cultures grown either with or without glucose. This finding is thus consistent with the

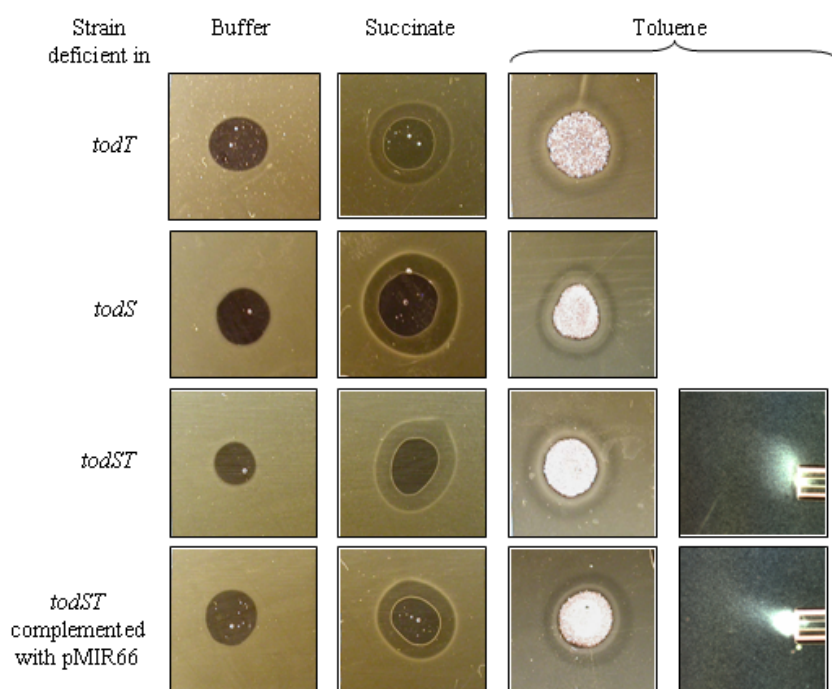


Fig. 3. Chemotactic response of *P. putida* DOT-T1E mutants deficient in *todS* and/or *todT*. Agarose plug and capillary assays in response to 10 % (v/v) toluene and 2 mM succinate. Strain deficient in *todT* corresponds to *P. putida* DOT-T1E Δ *todST* complemented with pJLC2. Strain deficient in *todS* is *P. putida* DOT-T1E Δ *todST* complemented with pJLC1. Plasmid pMIR66 harbours *todS* and *todT* genes (see Table 1 for further detail).

idea that there is no obvious functional link between catabolite repression of toluene degradation and chemotaxis.

The two-component system TodS/TodT is not involved in chemotaxis. The two-component system TodS/TodT was shown to control the expression of the *tod* operon in *P. putida* DOT-T1E. Toluene and any many other mono- and biaromatic compounds were found to bind to TodS triggering a regulatory cascade (Lacal *et al.*, 2006, Busch *et al.*, 2007, Lacal *et al.*, 2008). Parales *et al.* (2000) have shown the chemotactic response of *P. putida* F1 depends on *todS* and *todT* since mutants lacking any of these genes were not chemotactic towards toluene. It was proposed that toluene binding at TodS triggers both, control of P_{todX} as well as the chemotactic response.

We have shown previously that *P. putida* mutants deficient in *todT* or *todS* and *todT* are unable to upregulate the expression from P_{todX} (Lacal *et al.*, 2006). These mutants were analysed using the agarose plug technique. As shown in Fig. 4 cells accumulated at the agarose plug in a similar fashion as the wild type. The rapidity of response was equally similar to the native strain since cell accumulation started to be visible after 10 seconds and reached its maximum after 5 minutes. As expected, complementation with TodS and TodT in *trans* did not alter the chemotactic behaviour (Fig. 3). Mutants were also submitted to capillary assays and results obtained confirm that mutation in *todT* and *todS* does not alter the chemotactic behaviour. Finally, *P.*

putida F1 mutants deficient in *todS* and *todT* were analysed. However, in contrast to Parales *et al.* (2000) both mutants had a chemotaxis phenotype comparable to the wild type strain.

The search for the toluene chemoreceptor: identification of an MCP involved in succinate chemotaxis. As stated above the proposition that TodS is the chemoreceptor for toluene chemotaxis could not be confirmed. It appears thus likely that an MCP is the chemoreceptor for toluene. The MCP which mediates the chemotaxis towards naphthalene in *P. putida* G7 was identified to be the protein NahY (Grimm and Harwood, 1999). We hypothesized that the chemoreceptors of the structurally related naphthalene and toluene in two *P. putida* strains, might share a high degree of sequence similarity. A BLAST with NahY in a database of all translated open reading frames of *P. putida* KT2440 revealed 28 MCP, which share 22 to 35 % sequence identity with NahY. Proteins PP4658 and PP2643 were amongst the proteins with highest similarity to NahY. Mutants of these proteins were available in the *Pseudomonas* stock collection at our institute (Duque *et al.*, 2007) and its chemotactic behaviour was analysed (Fig. 5). The chemotactic behaviour towards toluene, however, was found to be indistinguishable from the wild type. Surprisingly, the KT2440 mutant in PP4658 had a strongly impaired chemotactic behaviour towards succinate (Fig. 4) which has been used as a control in the above experiments. It can thus be hypothesised that PP4658 serves as a

chemoreceptor for succinate. The chemoreceptor of *P. aeruginosa* for malate has been identified recently Alvarez-Ortega and Harwood (2007). We have thus evaluated the chemotaxis of mutant in pp4658 towards malate using agarose plug assays containing 2 mM of this compound. As shown in Fig. 5 the mutant analysed had retained a chemotactic behaviour towards malate. These findings indicate that different chemoreceptors recognize structurally very similar compounds such as succinate and malate.

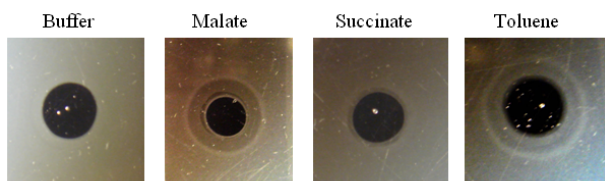


Fig. 4. Chemotactic response of *P. putida* KT2440R PP4658::mini-Tn5 towards malate, succinate and toluene. Agarose plugs contained 2 mM of each chemoattractant.

Discussion

The signal transduction leading to chemotaxis has been extensively studied in *Escherichia coli* and there is evidence that other bacteria such as *Pseudomonas* employ a very similar system (Kato *et al.*, 1999). The central piece of the signalling cascade is formed by sensor kinase CheA and the response regulator CheY which form a two-component system. CheA forms a complex with the coupling protein CheW and a transmembrane chemoreceptor which is typically a methyl-accepting chemotaxis protein or MCP (Baker *et al.*, 2006). The initial step in signal transmission represents the binding of the chemoattractant to the periplasmic part of the MCP. Binding creates a stimulus which is transmitted to the cytosolic part of the MCP causing a reduction of CheA autophosphorylation and consequently a decrease in the concentration of phosphorylated CheY. Phospho-CheY binds to the flagellar motor where it acts as an allosteric regulator promoting clockwise rotation (Alon *et al.*, 1998). The sensitivity of this system is modulated by the methyltransferase CheR and a methyl-erasure CheB that catalyse the methylation and demethylation of specific glutamyl residues in the cytosolic part of the MCP. Attractant binding increases methylation, a process that counteracts the stimulus caused by the attractant binding. This CheR/CheB mediated adaptation process guarantees that the chemotaxis signalling system is in a balanced steady state in an environment characterised by a homogeneous distribution of the chemoattractant (Barkai and Leibler, 1997). However, when the bacterium is exposed to a gradient of chemoattractant

this adaptation system assures that the signalling cascade is induced which permits the bacterium to travel on this attractant gradient.

Agarose plug assays are an elegant means to reproduce chemoattractant gradients in the laboratory. The chemoattractant is immobilised in an agarose plug and diffuses into the surrounding liquid establishing a gradient. When bacteria are exposed to this gradient they frequently assemble in a ring at a distance to the central plug. This implies that the chemotactic movement is stopped at an attractant concentration which appears to be optimal. We have made this observation when analysing chemotaxis towards the control compound succinate as well as for *P. putida* strains F1 and KT2440 towards toluene and other aromatic compounds (Fig. 2). The reasons for this halted chemotaxis are unclear. One could intuitively argue that the chemoattractant might be too toxic for the cell at a closer proximity to the plug. However, there are several arguments against this interpretation. In our experiments succinate was immobilised at a concentration of 2 mM. Ring formation occurred at a significant distance from the plug and it is unlikely that the corresponding succinate concentration is toxic to the cell.

Clues to understanding this phenomenon come from our observation that *Pseudomonas* strains, carrying the plasmid pGRT1, move chemotactically to the very limits of the plug making a direct contact with it. *Pseudomonas putida* DOT-T1E has been extensively studied in our laboratory and pGRT1 was shown to confer solvent resistance to the strain (Rodriguez-Herva *et al.*, 2007). This resistance is primarily due to the action of the TtgGHI efflux pump. A mutant containing an inactivated TtgGHI pump was found to be sensitive to organic solvents whereas the parental strain is highly solvent resistant (Rojas *et al.*, 2001, Ramos *et al.*, 1995). Both strains, differing enormously in their susceptibility to toluene, have been analysed for their chemotactic behaviour towards toluene. Interestingly, both strains had the same, hyper-chemotaxis phenotype. This thus supports the notion that the toxic action of toluene is unlikely to be the reason for the ring formation observed in strains which do not harbour pGRT1. Undoubtedly, the determinant which confers the hyper-chemotaxis phenotype is located on this 120 kb plasmid and current studies in our laboratory are aimed at identifying the gene(s) responsible for this phenotype.

There appear to be different mechanisms of chemotactic response towards aromatic hydrocarbons which differ in whether the chemotactic response is dependent (inducible type) or independent (uninducible type) of a prior growth in a medium containing the chemoeffector. There are examples for both modes: Chemotaxis of *Pseudomonas* sp. strains NCIB 9816-4 and G7 towards

naphthalene was inducible (Grimm and Harwood, 1997) whereas *Pseudomonas* sp. B4 towards biphenyl and chlorobenzoates was intrinsic (Gordillo *et al.*, 2007). Here we show that the chemotaxis of *P. putida* DOT-T1E towards toluene is independent of previous growth in a medium containing this compound. Furthermore, experimental conditions, such as the presence of 0.5 % of glucose, which almost completely suppress the toluene-mediated upregulation of P_{todX} did not alter the chemotaxis phenotype observed in the absence of glucose. This illustrates that the regulation of the expression of the *tod* biodegradation genes and chemotaxis are apparently unlinked.

Prototyp sensor kinases such as PhoQ or FixL (Mascher *et al.*, 2006) possess one PAS type sensor domain and one autocatalytic kinase domain. TodS shows a more complex domain architecture since it contains two sensor and kinase domains (Fig. 1). It was thus proposed that TodS, apart from regulating the expression from P_{todX} , had a secondary function (Lau *et al.*, 1997). The proposition by Lau *et al.* (1997) that TodS is a heme-containing oxygen-sensor protein was not supported by experimental data generated by Lacal *et al.* (2006) who produced active, full-length protein which was heme-free. The report by Parales *et al.* (2000), showing the loss of chemotaxis of *P. putida* F1 towards toluene in *todS* and *todT* mutants, gave another clue to a potential secondary function of TodS. Here we show that *P. putida* strains DOT-T1E and F1 deficient in *todS* and/or *todT* have the same chemotaxis phenotype as the wild-type strain (Fig. 4). These results do thus not support the idea that this two-component system is implicated in chemotaxis towards organic compounds. The chemoreceptor for naphthalene of *P. putida* G7 was identified to be the MCP NahY (Grimm and Harwood, 1999). In the light of this finding it seems thus more likely that an MCP, rather than a sensor kinase, is the chemoreceptor which mediates chemotaxis towards toluene.

Alvarez-Ortega and Harwood (2007) have identified protein PA2652 of *Pseudomonas aeruginosa* to be the chemoreceptor for malate. In this study we have identified protein PP4658 as the chemoreceptor for succinate in *P. putida* KT2440. Both proteins share significant sequence homologies with characterised MCPs of other species. Succinate and malate are structurally very similar compounds and we were surprised to learn that PP4658 is involved in chemotaxis to succinate but not to malate. This indicates that chemotaxis to very similar compounds is mediated by different proteins which is also supported by a sequence analysis of both proteins. A sequence alignment of PP4658 and PA2652 reveals only a modest sequence identity of 26 %. MCPs contain typically two transmembrane regions which flank the periplasmic attractant binding domain. Using the program Tmpred

(Hofmann and Stoffel, 1993) the transmembrane regions of both proteins were predicted which delineate the periplasmic attractant binding domains. Both domains differ significantly in length (255 amino acids for PP4658 and 175 amino acids for pa2652) and share only 13% of sequence identity. Additional studies are necessary to identify whether PP4658 is involved only in chemotaxis towards malate or other compounds such as of the intermediates of the glucose metabolism.

In summary, we report here on the hyper-chemotaxis phenotype of *P. putida* DOT-T1E towards different organic solvents. The determinant causing this phenotype need yet to be identified but is located on plasmid pGTR1. The description of this novel hyper-chemotaxis phenotype is of biotechnological relevance since many environmental pollutants are immobilised or surface bound. The capacity of a degrading bacterium to get to a close vicinity of the pollutants is essential for efficient biodegradation. The identification of the genes causing the hyper-chemotaxis phenotype might thus provide a basis for a more rational engineering of strains for biodegradation purposes.

Acknowledgements. Financial support from the Junta de Andalucía is acknowledged project from excelencia CVI344, CVI1912 and work in J.L. Ramos laboratory is also supported by a CONSOLIDER-C project from the Ministry of Science and Education of Spain.

References

- Alvarez-Ortega, C. and Harwood, C.S. (2007) Identification of a malate chemoreceptor in *Pseudomonas aeruginosa* by screening for chemotaxis defects in an energy taxis-deficient mutant. *Appl Environ Microbiol.* 73, 7793-7795.
- Alon, U., Camarena, L., Surette, M.G., Aguera y Arcas, B., Liu, Y., Leibler, S. and Stock, J.B. (1998) Response regulator output in bacterial chemotaxis. *EMBO J.* 17, 4238-4248.
- Baker, M.D., Wolanin, P.M. and Stock, J.B. (2006) Signal transduction in bacterial chemotaxis. *Bioessays* 28, 9-22.
- Barkai, N. and Leibler, S. (1997) Robustness in simple biochemical networks. *Nature* 387, 913-917.
- Busch, A., J. Lacal, A. Martos, J.L. Ramos and T. Krell (2007) The bacterial sensor kinase TodS interacts with agonistic and antagonistic signals. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104, 13774-13779.
- Ditty, J.L. and Harwood, C.S. (2001) Charged amino acids conserved in the aromatic acid/H⁺ symporter family of permeases are required for 4-hydroxybenzoate transport by PcaK from

- Pseudomonas putida*. J. Bacteriol. 184, 1444-1448.
- Espinosa-Urgel, M. and Ramos, J.L. (2004) Cell density-dependent gene contributes to efficient seed colonization by *Pseudomonas putida* KT2440. Appl Environ Microbiol. 70, 5190-8.
- Franklin, F.C.H., Bagdasarian, M., Bagdasarian, M.M. and Timmis, K.N. (1981). Molecular and functional analysis of the TOL plasmid pWW0 from *Pseudomonas putida* and cloning of genes for the entire regulated aromatic ring meta-cleavage pathway. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78, 7458-7462.
- Gibson, D.T., Kock, J.R. and R.E. Kallio, R.E. (1968) Oxidative degradation of aromatic hydrocarbons by microorganisms. I. Enzymatic formation of catechol from benzene. Biochemistry 7, 2653-2662.
- Grimm, A.C., and Harwood, C.S. (1999) NahY, a catabolic plasmid-encoded receptor required for chemotaxis of *Pseudomonas putida* to the aromatic hydrocarbon naphthalene. J. Bacteriol. 181, 3310-3316.
- Guazzaroni, M.E., Krell, T., Felipe, A., Ruiz, R., Meng, C., Zhang, X., Gallegos, M.T., Ramos, J.L. (2005) The multidrug efflux regulator TtgV recognizes a wide range of structurally different effectors in solution and complexed with target DNA: evidence from isothermal titration calorimetry. J. Biol. Chem. 280, 20887-93.
- Guazzaroni, M.E., Terán, W., Zhang, X., Gallegos, M.T. and Ramos, J.L. (2004) TtgV bound to a complex operator site represses transcription of the promoter for the multidrug and solvent extrusion TtgGHI pump. J. Bacteriol. 186, 2921-2927.
- Hawkins, A.C. and Harwood, C.S. (2002) Chemotaxis of *Ralstonia eutropha* JMP134(pJP4) to the herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetate. Appl. Environ. Microbiol. 68, 968-972.
- Head, I.M. (1998) Bioremediation: towards a credible technology. Microbiology 144, 599-608.
- Hofmann, K. and Stoffel, W. (1993) TMbase - A database of membrane spanning proteins segments. Biol. Chem. Hoppe-Seyler 374, 166.
- Kato, J., Nakamura, T., Kuroda, A. and Ohtake, H. (1999) Cloning and characterization of chemotaxis genes in *Pseudomonas aeruginosa*. Biosci. Biotechnol. Biochem. 63, 155-161.
- Lacal, J., Busch, A., Guazzaroni, M.E., Krell, T. and Ramos, J.L. (2006). The TodS-TodT two-component regulatory system recognizes a wide range of effectors and works with DNA-bending proteins. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 103, 8191-8196.
- Lacal, J., Guazzaroni, M.E., Busch, A., Krell, T. and Ramos, J.L. (2008) Hierarchical binding of the TodT response regulator to its multiple recognition sites at the *tod* pathway operon promoter. J. Mol. Biol. 376, 325-37.
- Lau, P.C.K., Y. Wang, A. Patel, D. Labbé, H. Bergeron, R. Brousseau, Y. Konishi, and M. Rawlings (1997) A bacterial basic region leucine zipper histidine kinase regulating toluene degradation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 94, 1453-1458.
- Law, A.M., and Aitken, M.D. (2003) Bacterial chemotaxis to naphthalene desorbing from a nonaqueous liquid. Appl Environ Microbiol. 69, 5968-5973.
- Mascher, T, Helmann, J.D, and Unden, G. (2006) Stimulus perception in bacterial signal-transducing histidine kinases. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 70, 910-38.
- Mosqueda, G., Ramos-González, M.I. and Ramos, J.L. (1999) Toluene metabolism by the solvent-tolerant *Pseudomonas putida* DOT-T1 strain, and its role in solvent impermeabilization. Gene 232, 69-76.
- O'Toole, G.A. and Kolter, R. (1998) Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. Mol. Microbiol. 30, 295-304.
- Pandey, G. and Jain, R.K. (2002) Bacterial chemotaxis toward environmental pollutants: role in bioremediation. Appl Environ Microbiol. 68, 5789-95.
- Parales, R.E., Ditty, J.L. and Harwood, C.S. (2000) Toluene-degrading bacteria are chemotactic towards the environmental pollutants benzene, toluene, and trichloroethylene. Appl. Environ. Microbiol. 66, 4098-4104.
- Pratt, L.A. and Kolter, R. (1998) Genetic analysis of *Escherichia coli* biofilm formation: roles of flagella, motility, chemotaxis and type I pili. Mol Microbiol. 30, 285-93.
- Ramos, J.L., Duque, E., Gallegos, M.T., Godoy, P., Ramos-Gonzalez M.I., Rojas, A., Teran, W. and Segura, A. (2002) Mechanisms of solvent tolerance in gram-negative bacteria. Annu Rev Microbiol. 56, 743-68.
- Ramos, J.L., Duque, E., Huertas, M.J. and Haidour, A. (1995) Isolation and expansion of the catabolic potential of a *Pseudomonas putida* strain able to grow in the presence of high concentrations of aromatic hydrocarbons. J. Bacteriol. 177, 3911-3916.
- Ramos-González, M.I., Olson, M., Gatenby, A.A., Mosqueda, G., Manzanera, M., Campos, M.J., Vichez, S. and Ramos, J.L. (2002). Cross-regulation between a novel two-component signal

- transduction system for catabolism of toluene in *Pseudomonas mendocina* and the TodST system from *Pseudomonas putida*. J. Bacteriol. 184:7062-7067.
- Rodríguez-Herva, J.J., García, V., Hurtado, A., Segura, A. and Ramos, J.L. (2007) The *tgGHI* solvent efflux pump operon of *Pseudomonas putida* DOT-T1E is located on a large self-transmissible plasmid. Environ Microbiol. 9, 1550-1561.
- Rojas, A., Duque, E., Mosqueda, G., Golden, G., Hurtado, A., Ramos, J.L. and Segura, A. (2001) Three efflux pumps are required to provide efficient tolerance to toluene in *Pseudomonas putida* DOT-T1E. J. Bacteriol. 183, 3967-3973.
- Rojas A., Segura, A., Guazzaroni, M.E., Terán, W., Hurtado, A., Gallegos, M.T., and Ramos, J.L. (2003). *In vivo* and *in vitro* evidence shows that TtgV is the local specific regulator of the TtgGHI multidrug and solvent efflux pump of *Pseudomonas putida*. J. Bacteriol. 185, 4755-4763.
- Singh, R., Paul, D. and Jain, R.K. (2006) Biofilms: implications in bioremediation. Trends Microbiol. 4, 389-397.
- Stanier, R.Y., Palleroni, N. J. and Doudoroff, M. (1966) The aerobic Pseudomonads; a taxonomic study. J. Gen. Microbiol. 43, 159–271.
- Vardar, G., Barbieri, P., and Wood, T.K. (2005) Chemotaxis of *Pseudomonas stutzeri* OX1 and *Burkholderia cepacia* G4 toward chlorinated ethenes. Appl. Microbiol. Biotechnol. 66, 696-701.
- Zylstra, G.J. and Gibson, D.T. (1989) Toluene degradation by *Pseudomonas putida* F1. Nucleotide sequence of the *todC1C2BADE* genes and their expression in *Escherichia coli*. J. Biol. Chem. 264, 14940-14941.

DISCUSIÓN

Los hidrocarburos aromáticos no son solamente compuestos tóxicos para la célula, sino que representan una importante fuente de carbono y energía para los microorganismos que son capaces de degradarlos, especialmente en sitios contaminados. Sin embargo, para su utilización, las células deben hacer frente a su toxicidad y a la demanda extra de energía para sintetizar todas las enzimas necesarias para su transformación en intermediarios que rindan energía. Esta es probablemente la razón de que todos los sistemas para el catabolismo de hidrocarburos, independientemente de su origen evolutivo, estén estrictamente controlados.

En *Pseudomonas*, la mayoría de las rutas catabólicas de compuestos tóxicos están reguladas por mecanismos específicos que responden al substrato en cuestión y que ayudan a acoplar la activación del promotor del operón catabólico a la fisiología celular y a respuestas de estrés (Cases y de Lorenzo, 2001). La respuesta a señales metabólicas está dictada por distintos factores de regulación global (factores sigma, IHF, Crc, CyoB, RelA, PTS) cuya actividad o disponibilidad está determinada por el estado metabólico de la célula (Cases y de Lorenzo, 2005, Shingler, 2003). Por ejemplo, la especificidad de la respuesta quimiotáctica y el amplio espectro de compuestos que son reconocidos por las bombas de eflujo, constituyen un buen compromiso entre la necesidad de hacer frente a la toxicidad de los disolventes y la necesidad de encontrar posibles fuentes de carbono y energía. Poniendo en común todos los ejemplos conocidos se apoya la existencia de una correlación directa entre la extrusión de disolventes, el metabolismo primario, la expresión de genes catabólicos y el sistema flagelar. No obstante, es aun necesario profundizar en el conocimiento básico de las distintas rutas de degradación y sus mecanismos de regulación para así poder aplicar estas bacterias como solución a determinados problemas ambientales.

Caracterización del sistema de dos componentes TodST de *P. putida* DOT-T1E.

El sistema de transducción de señales de dos componentes TodS/TodT es atípico dentro de los mecanismos de regulación bacteriana, fundamentalmente, por dos razones. La primera es que mientras que la mayoría de las rutas de degradación de aromáticos están basados en sistemas de regulación de un solo componente (Diaz, E. 2000 Curr. Opin Biotechnol. 11: 467), la regulación de degradación de tolueno en *P. putida* DOT-

T1E es dependiente del sistema TodS/TodT, que es uno de los 4 sistemas de dos componentes que se han descrito hasta la fecha en bacterias, implicados en la degradación de compuestos aromáticos. Y en segundo lugar, porque la proteína TodS junto con su homólogo StyR, TmoS y y TutC son las únicas proteínas sensoras dentro de los sistemas de dos componentes en bacterias, que contienen dos dominios histidina quinasa. Esta organización atípica de TodS, hace preveer un funcionamiento distinto de los descritos hasta el momento en la respuesta a hidrocarburos aromáticos, y un mecanismo de acción que puede que difiera de los convencionales sistemas de dos componentes. Como se demuestra en esta Tesis Doctoral, la activación del sistema TodS/TodT en presencia tolueno en *Pseudomonas putida* solamente tiene lugar cuando ambas proteínas están presentes, a pesar del alto número de sistemas de dos componentes que operan en esta especie. La presencia en bacterias, de un mayor número de sistemas de un componente implicados en sensar y responder a los hidrocarburos aromáticos, podría ser un rasgo evolutivo adquirido como primera opción de respuesta frente a dichos compuestos en el medio ambiente (Ulrich *et al.*, 2005). Por tanto, la implicación de un sistema de dos componentes, podría ser el resultado de una adaptación a un proceso de regulación más complejo de transmisión de la señal y presumiblemente más evolucionado, que permitiría integrar distintas señales y modular con mayor precisión la transmisión de la señal. Este hecho, podría además estar apoyado por la presencia en TodS de dos dominios PAS de entrada de señal, que modularían la respuesta sensora frente a distintas señales.

El sistema TodS/TodT, altamente específico en su mecanismo de recepción y respuesta a señales ambientales, permitiría a la bacteria un mayor ahorro de energía, activando la ruta *tod* en presencia de los hidrocarburos que esta bacteria es capaz de degradar. Sin embargo, en esta Tesis Doctoral, hemos determinado que la proteína sensora TodS es capaz de detectar y activarse, frente a una amplia gama de compuestos aromáticos, la mayoría de los cuales, posteriormente, no van a poder ser mineralizados por la bacteria (Lacal *et al.*, 2006). Este amplio perfil de efectores de TodS es la primera vez que se ha visto para una histidina quinasa y hace de esta proteína, con propiedades de reconocimiento múltiple de sustrato, un nuevo tipo de histidina quinasa. Se han identificado las señales para relativamente pocos sistemas de dos componentes, y en el caso de que éstas se conozcan, el espectro de señal que la histidina quinasa puede reconocer es bastante restringido, como es el caso de CitA, proteína que regula los

genes del metabolismo de citrato y que solamente es activada por citrato. El hecho de que TodS active la ruta de degradación *tod* en respuesta a compuestos aromáticos no mineralizables por la cepa, es en principio contradictorio ya que la bacteria tiene un gasto de energía que no puede recuperar con la mineralización. A priori, este hecho no debería ser rentable para la célula, pero sin embargo, ocurre. La tolueno dioxigenasa, enzima implicada en el primer paso de la conversión de tolueno, benceno y etilbenceno en *Pseudomonas putida* DOT-T1E, se ha visto que tiene un amplio perfil de sustrato y que podría biotransformar compuestos inicialmente tóxicos para la célula en otros menos tóxicos o incluso compuestos que podrían ser expulsados al exterior más fácilmente o ser mineralizados por otras bacterias del entorno microbiano. Por tanto, se podría estar disminuyendo el nivel de dichos compuestos tóxicos tanto en el citoplasma de la bacteria como en el exterior de la misma. En términos evolutivos, el tener una proteína capaz de reconocer un amplio perfil de efectores, también podría favorecer el reconocimiento de nuevas fuentes de carbono y/o mayor capacidad de adaptación y mutación para sobrevivir biotransformando determinados compuestos tóxicos.

Aunque se han estudiado muchos sistemas de dos componentes, la señal ambiental reconocida por las histidina quinasa, aún es desconocida para la mayoría de los sistemas de dos componentes (Mascher *et al.*, 2006). En esta Tesis Doctoral es la primera vez que se aportan datos de estequiometría y afinidad de unión de una proteína histidina quinasa sensora implicada en la unión a compuestos aromáticos. Se ha demostrado como TodS es capaz de reconocer y unir específicamente tolueno, presentando *in vitro* una alta afinidad de unión (aproximadamente 700 nM) (Lacal *et al.*, 2006). El que TodS pueda ser una proteína soluble y por tanto de localización citoplasmática, y no de membrana, le confiere a la bacteria la capacidad de sensar el tolueno intracelular y activar rápidamente la ruta *tod* para su degradación. Gracias a la alta afinidad de unión de la proteína al tolueno, la bacteria se asegura responder a éste a muy bajas concentraciones. Estudios adicionales llevados a cabo en el grupo de investigación del Doctor Ramos, han permitido identificar la afinidad de unión de TodS hacia otros compuestos aromáticos que se han visto implicados en la activación de la ruta *tod*, así como la identificación de compuestos aromáticos antagonistas, que si bien son capaces de unirse a la proteína sensora, no conducen a la transmisión de la señal, ya que no causan ningún impacto positivo en la autofosforilación (Busch *et al.*, 2007). Una vez identificado el dominio N-terminal de la proteína TodS como el responsable de la

interacción con los efectores, se generó un modelo tridimensional del dominio PAS N-terminal de TodS (aminoácidos 31 al 168) en base a la estructura del dominio PAS responsable del reconocimiento del citrato en la histidina quinasa CitA de la proteína FixL de *Rhizobium meliloti*. En base a ese modelo estructural, se determinó que los aminoácidos F46, I74, F79 y I114, podrían estar implicados en la interacción con dichos efectores. Mutaciones puntuales a alanina en dichos residuos en TodS resultaron en una disminución en la afinidad de unión hacia los efectores (Busch et al., 2007). Todo parece indicar, que existe un bolsillo hidrofóbico formado en el dominio PAS N-terminal de la proteína, con capacidad de reconocer múltiples moléculas efectoras que presenten un anillo aromático en su estructura. Analizando el perfil de sustituyentes de la molécula efectora se puede concluir que el anillo de benceno es la unidad estructural mínima necesaria para conducir a una transmisión de la señal. Además del anillo de benceno, los distintos sustituyentes juegan un papel clave en la transmisión de la señal, aunque no tanto en la unión a la proteína. Ya que compuestos con alta afinidad de unión, no son capaces de transmitir la señal debido a sus sustituyentes, siendo la posición *orto* del anillo aromático la más restrictiva en este sentido. Es de suponer que la posición del anillo aromático en el bolsillo es determinante para, según que sustituyentes, interaccionar con los residuos hidrofóbicos del bolsillo PAS, lo que podría conducir a cambios conformacionales que permitan la transmisión de la señal. Por tanto, los distintos niveles de expresión del promotor determinados *in vivo*, podrían ser el resultado de una mayor autofosforilación de la proteína sensora, una mayor transmisión intramolecular del grupo fosfato, y/o un mejor contacto con el regulador de respuesta, entre otros factores. También se han identificado algunos aminoácidos en el dominio regulador interno y en el dominio PAS C-terminal de TodS como responsables del reconocimiento de otros efectores que no son reconocidos por la proteína silvestre y que por tanto, podrían jugar un cierto papel en la especificidad de efectores de esta quinasa sensora (Choi *et al.*, 2003). Esto parece indicar que podría haber otros aminoácidos además de los del bolsillo de reconocimiento del dominio PAS N-terminal implicados en la transmisión de la señal al regulador de repuesta TodT.

El análisis de la secuencia de TodS usando un programa de predicción de la topología de proteínas (www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/), sugería que TodS no presentaba posibles hélices transmembrana, por lo que la proteína se podría localizar en el citoplasma. Esta predicción ha encontrado apoyo experimental en el hecho de que

TodS se puede purificar a partir de la fracción soluble de proteína y en ausencia de detergentes se alcanza hasta una concentración de 6 mg/ml. De todas formas no se descarta que pueda estar asociada a otras proteínas de membrana, como es el caso de CheA (Levit *et al.*, 2002, Wolanin *et al.*, 2002).

De los datos *in vitro* obtenidos en esta Tesis doctoral se podría especular que *in vivo*, la reacción de autofosforilación estaría favoreciendo un estado menos fosforilado mientras que en presencia de los efectores, la reacción se vería claramente favorecida hacia la autofosforilación. La presencia de efectores constituye el estímulo necesario para la activación de la proteína TodS y por tanto del sistema de transducción de la señal ya que tienen un papel estimulador en la autofosforilación de TodS. Así mismo, TodS es necesaria e imprescindible para la fosforilación y activación del regulador de respuesta TodT, tal y como se demuestra con ensayos de β -galactosidasa *in vivo* y ensayos de transfosforilación y de transcripción *in vitro* (Lacal *et al.*, 2006).

Caracterización de la interacción del regulador TodT con el promotor P_{todX} y la posible implicación de otras proteínas como IHF en el mecanismo de activación transcripcional.

La región de ADN promotora que controla la regulación de la degradación de tolueno se había identificado en *P. putida* DOT-T1E antes del inicio de esta Tesis Doctoral (Mosqueda *et al.*, 1999, Ramos-González *et al.*, 2002). Como se ha mencionado, el sistema de dos componentes TodS/TodT es necesario para la activación del promotor P_{todX} dependiente de tolueno tanto en *Pseudomonas* como en el sistema hospedador heterólogo *E. coli*, con lo que se ha podido determinar su especificidad e identificar que TodT es el principal regulador transcripcional requerido para la activación. En el primer estudio que se llevó a cabo con la proteína TodT de *P. putida* F1, la proteína se demostró que se unía a una región pseudopalindrómica en el promotor del operón catabólico de tolueno, P_{todX} . Así mismo, un mutante alanina en el aspartato 57 de la proteína no respondía a la transmisión de la señal. Sin embargo, el papel de esta proteína en el sistema regulador de dos componentes, así como su estado de fosforilación, su estado oligomérico y el modo de unión al ADN se desconocían y ha sido investigado a lo largo de esta Tesis Doctoral. Como muchos reguladores de

respuesta, TodT puede ser fosforilada *in vitro* por carbamoil fosfato en ausencia de su histidina quinasa sensora. Esto ha hecho posible demostrar que la fosforilación de la proteína no cambia su estado oligomérico. TodT es un monómero y diferencia de otros muchos reguladores de respuesta, en los que la proteína tras fosforilarse se presenta como dímero (Leoni *et al.*, 2003), sugiere que su mecanismo de acción puede ser diferente (Lacal *et al.*, 2008). Tanto TodT como TodT-P pueden unirse específicamente al promotor P_{todX} y además, con una afinidad de unión muy similar (Lacal *et al.*, 2008). Hecho poco común si tenemos en cuenta que la mayoría de los reguladores de respuesta necesitan de la fosforilación, bien para aumentar la afinidad de unión de su dominio C-terminal o bien para liberar de la inhibición que ejerce el dominio N-terminal sobre el C-terminal en la unión al ADN (Stock *et al.*, 2000, Walthers, *et al.*, 2003). TodT se presenta por tanto como una proteína con un mecanismo de acción poco descrito hasta el momento, en el que la proteína estaría unida al ADN específicamente y donde la fosforilación de la misma, más allá de provocar cambios en su estado oligomérico o en su afinidad de unión al ADN, desencadena cambios a favor del inicio de la transcripción (Lacal *et al.*, 2008). Este comportamiento podría ser debido a que el linker de TodT parece ser más largo de lo normal, presentando según el modelo tridimensional de la proteína, una hélice *alpha* y no láminas de hebras β tal y como se ha visto en la mayoría de las estructuras disponibles de los reguladores. Por tanto, la activación de TodT mediada por la aceptación del grupo fosforilo, podría implicar cambios conformacionales que conducen a contactos con la ARN polimerasa para la activación de la transcripción.

El dominio N-terminal (aminoácidos 7 al 121) es el que recibe el grupo fosforilo de la histidina quinasa, siendo el aspartato en posición 57 clave en esta recepción. La sustitución de este aminoácido a alanina impide que la proteína sea fosforilada y por tanto, no puede conducir el inicio de la transcripción. Sin embargo, esta inactivación no afecta a la unión de la proteína al ADN pero seguramente imposibilita su conformación activa y por lo tanto, impide que ésta pueda establecer los correspondientes contactos con la subunidad *alpha* de la ARN polimerasa. El dominio C-terminal (aminoácidos 137 al 202), es estructuralmente homólogo a la subfamilia de reguladores de respuesta FixJ/NarL y contiene el motivo hélice-giro-hélice (HTH) de unión al ADN. Este motivo comprende en TodT del aminoácido 161 al 180 (NKQTALELDISEATVKVHRH) y contiene una secuencia, TVKVH, conservada en los reguladores transcripcionales StyR

y NarL. Ya que NarL está cocrystalizada con el ADN y en dicha estructura esos aminoácidos están implicados en la interacción en el surco mayor del ADN, en TodT es de suponer que también están implicados en el reconocimiento específico de las denominadas TodT Box. Así mismo, las secuencias diana a reconocer por StyR, NarL y TodT, son palíndromos casi perfectos, presentando en el caso de TodT y StyR hasta un 88 % de identidad (14 de 16 nucleótidos).

TodT se une cooperativa y específicamente a dos secuencias pseudopalindrómicas y una secuencia correspondiente a la mitad de un palíndromo, nombradas Box 1, Box 2 y Box 3, centradas respectivamente en la posición -106, -85 y -57 con respecto al punto de inicio de la transcripción en P_{todX} (Lacal *et al.*, 2008). Mediante ensayos de protección de ADNasaI usando como ADN molde mutantes en los distintos sitios de unión de TodT, se pudo concluir que el complejo I se corresponde con la unión de TodT a la Box 1, el complejo II a la unión simultánea de TodT a la Box 1 y Box 2 y el complejo III a la completa ocupación de TodT en Box 1, Box 2 y Box 3. Siendo la estequiometría de unión 2:2:1 moléculas de proteína por cada TodT Box1, Box2 y Box3 respectivamente. El cuarto complejo proponemos que es un estado ordenado del complejo III. Esta unión jerárquica de TodT responde a la distinta afinidad de unión de la proteína por cada TodT box, siendo el sitio Box 1 el de mayor afinidad. La afinidad de unión hacia Box 2 y Box 3 es de unas 2.8 y 3.5 veces menor respectivamente, por lo que existe la posibilidad de que la unión de TodT al sitio de mayor afinidad estimule la unión de TodT a los sitios de menor afinidad (Lacal *et al.*, 2008). Esta ocupación jerárquica del promotor podría depender del nivel de TodT en la célula, lo que constituiría un elemento adicional de control de la ruta *tod*. Si bien las tres TodT box tienen un papel positivo en la transcripción, la Box 1 sirve además como punto de partida de la unión de TodT al ADN, siendo imprescindible para promover su unión al ADN y que tenga lugar la transcripción del operón *tod*. La proteína TodT es monomérica, sin embargo, la protección simultánea en el ADN de las TodT box 1 y posteriormente del TodT box 2 en los ensayos de ADNasa, junto con la aparición de cuatro complejos en vez de cinco en los ensayos de retardo en gel parece indicar que la unión de dos monómeros dentro del palíndromo es cooperativa (Lacal *et al.*, 2008). También mediante ITC se ha analizado la unión de TodT con sus distintos elementos de unión en el ADN, tanto cada mitad de los palíndromos como los palíndromos completos y los resultados indican que a pesar de que la proteína es capaz de unir fragmentos de

cómo mínimo 9 pares de bases, se observa un fenómeno de cooperatividad, determinado por una mayor afinidad de unión y la unión de dos monómeros a cada palíndromo como si de un solo evento se tratara (Lacal *et al.*, 2008). Igualmente cuando se analiza la interacción de TodT con varias TodT box consecutivas (Box 1 más Box 2, o bien, Box 2 más Box 3) igualmente se observa mayor afinidad de unión y un solo evento, y no cuatro eventos que correspondería a la unión de cada monómero por cada elemento. Probablemente la distorsión provocada en el ADN por la unión de TodT a la Box 1 facilita el acceso a la proteína a los otros sitios de unión. En esta Tesis Doctoral se demuestra que la unión de TodT a la Box 1 tiene un efecto positivo en la unión a Box 2 y la unión de TodT en la Box 2, facilita la unión de la proteína a la Box 3 (Lacal *et al.*, 2008). Por tanto, existe una unión cooperativa tanto dentro de cada palíndromo, como entre los sitios Box 1, Box 2 Box 3.

Además de TodT, el regulador global IHF también está implicado en la regulación de P_{todX} (Lacal *et al.*, 2006). Ensayos de protección de ADNasa I mostraron que en la región de ADN protegida por IHF estaba presente su secuencia consenso (5'-WATCAANNNTTR-3'), orientada en la misma dirección con respecto al operón *tod* y centrada en la posición X. Tanto un mutante en el sitio de unión de IHF en el promotor P_{todX} como un mutante deficiente en esta proteína, confirmaron que en este promotor, IHF tiene un papel positivo en la transcripción, favoreciendo tanto en ensayos *in vitro* como *in vivo*, la expresión óptima del promotor P_{todX} . IHF seguramente se una al ADN provocando una curvatura en el mismo de manera que aproximaría los sitios de unión del regulador TodT hacia el sitio de unión de la ARN polimerasa. En *E. coli* se conoce que IHF regula más de 100 genes (Arfin *et al.*, 2000) y que los niveles de proteína están controlados por la alarmona ppGpp, en respuesta a varios tipos de estrés nutricional y ambiental (Aviv *et al.*, 1999). En *Pseudomonas*, el papel fisiológico de IHF a parte de verse visto implicado en la regulación de varios procesos, especialmente en la degradación de compuestos tóxicos (Shingler, 2003), aun queda por demostrar si realmente existe una conexión con la respuesta a estrés.

La secuencia de P_{todX} muestra una serie de características como es la presencia de múltiples sitios de unión del regulador en el promotor, la participación de IHF para rendir niveles óptimos de expresión y una región -10 extendida. Estas características se pueden encontrar también en los promotores *PtmoX* y *PstyA* que controlan los genes del

catabolismo de tolueno y estireno en otras cepas de *Pseudomonas*. El carecer de una región -35 hace de P_{todX} , un promotor débil en cuanto que las secuencias consenso a reconocer por el factor sigma 70 de la ARN polimerasa están poco conservadas. Este hecho garantizaría a la célula un mayor nivel de regulación sobre el promotor P_{todX} de manera que éste solamente entraría en funcionamiento tras la unión de IHF y fundamentalmente tras la activación del regulador de respuesta TodT. En este sentido, la regulación de P_{todX} podría depender de los niveles celulares relativos de TodT-P e IHF, según las condiciones ambientales. Aunque desconocemos el nivel de IHF en nuestra cepa a lo largo de la curva de crecimiento, resultados preliminares en *P. fluorescens* ST, indican que el nivel de IHF no cambia significativamente durante la fase exponencial de crecimiento, tanto en presencia o ausencia de estireno, mientras que si hemos determinado que la cantidad de TodT-P aumenta en presencia de tolueno (Lacal *et al.*, no publicado), lo que sugiere que la forma fosforilada de TodT es el principal elemento regulador que determina el nivel de expresión de P_{todX} según las condiciones de crecimiento. Aunque la holoenzima es capaz de unirse al promotor P_{todX} , la proximidad del sitio de unión tanto de IHF como de TodT a la región -35, podrían estar favoreciendo el reclutamiento de la ARN polimerasa al promotor.

La extensión de la región protegida, mediante ensayos de ADNasa I, fue similar para la dos primeras TodT box, mientras que la extensión de la región protegida para la Box 3 fue mayor de lo que cabría esperar para la mitad de un palíndromo. Ya que TodT se une como monómero al ADN y se descartan sitios adicionales de unión de TodT a lo largo de la secuencia promotora, esta protección en el ADN hacía especular posibles cambios en la estructura del ADN. Así mismo, la existencia de cinco sitios de unión en la región promotora (2 en cada región pseudopalindrómica Box 1 y Box 2, más 1 en la región mitad palindrómica Box 3), no se correspondía con la aparición de hasta un máximo de cuatro complejos en ensayos de retardo en gel. Estos datos sugieren que el promotor P_{todX} puede asumir diferentes estructuras tridimensionales según el número de monómeros que se unan al promotor. En esta Tesis Doctoral, proponemos un modelo de unión de TodT a su promotor en el que los distintos monómero de TodT unidos a los distintos sitios de unión específicos en el ADN, conduce a una supraestructura en forma de horquilla que formaría junto con IHF y la ARN polimerasa el complejo cerrado de inicio de la transcripción (Lacal *et al.*, 2008).

C-TodT, presenta similares afinidades de unión al ADN de como lo hace TodT. Ambas proteínas son capaces de unirse específicamente a las TodT box y además son capaces de unirse cooperativamente (Lacal *et al.*, 2008). Proponemos por tanto, que los elementos necesarios para la unión específica de la proteína a sus dianas en el ADN y la cooperatividad, residen en el dominio C-terminal de TodT. Sin embargo, no ha sido posible obtener complejos ADN-C-TodT en ensayos de retardo en gel, aunque si se pudo identificar la región protegida por la proteína C-TodT en la región promotora mediante footprint, aunque con algunas ligeras diferencias: la huella en la TodT box 3 era menor de la que se obtuvo para la proteína completa y además desaparece la hiperreactividad observada para la G en la posición 68. Estos datos hacían suponer distintos modos de unión al ADN entre ambas proteínas. Para confirmar esta suposición, por AFM se determinó que la proteína C-TodT era capaz de unirse al ADN pero no conducía a la formación de la horquilla típica que se observaba cuando se utilizó la proteína completa. La ausencia de transcripción *in vitro* en presencia de C-TodT junto con esta peculiaridad en su unión al ADN, podría ser debida a que el dominio N-terminal, esta implicado en la formación del complejo cerrado de la transcripción, interaccionando con la ARN polimerasa y estabilizando el complejo (Lacal *et al.*, 2008).

Implicación del sistema TodST y estudio de la quimiotaxis de *P. putida* DOT-T1E hacia compuestos aromáticos.

Estudios previos proponían que el sistema de dos componentes TodS/TodT estaba implicado en la quimiotaxis hacia hidrocarburos aromáticos en *P. putida* F1 (Parales *et al.*, 2000). Sin embargo, estudios realizados en *Pseudomonas putida* DOT-T1E en esta Tesis Doctoral, rechazan la posibilidad de que alguna de estas proteínas esté directa o indirectamente ligada a la quimiotaxis hacia tolueno. Tanto bacterias DOT-T1E deficientes en TodS como en TodT, como dobles mutantes en ambas proteínas, fueron capaces de responder quimotácticamente a los hidrocarburos ensayados. Se abre de nuevo la incógnita de qué tipo de proteínas sensoras, si son proteínas que forman parte de sistemas de dos componentes o son otro tipo de proteínas, las implicadas en la transducción de la señal quimiotáctica hasta la maquinaria flagelar en estas cepas *Pseudomonas* frente a compuestos aromáticos. Partiendo de la misma

observación de Parales y colaboradores, queríamos elucidar si la respuesta quimiotáctica hacia hidrocarburos aromáticos era inducible y si ésta estaba sujeta a represión catabólica. Los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral indican que la respuesta de todas las cepas de *Pseudomonas* ensayadas es constitutiva y que por tanto los genes responsables de la respuesta quimiotáctica forman parte del grupo de genes que la bacteria está expresando constitutivamente. Esta expresión constitutiva indica que la bacteria en todo momento está disponible para responder a los compuestos tóxicos para desencadenar la respuesta quimiotáctica, lo que le permite acercarse o alejarse del compuesto y aumentar las posibilidades de supervivencia. A pesar de que las bacterias responden a los compuestos aromáticos formando un anillo de células a cierta distancia de los mismos, según los ensayos de gota y de capilar, la cepa DOT-T1E sorprendentemente nada hacia el compuesto y se acumula alrededor del mismo entrando en contacto directo con la sustancia tóxica. Este fenómeno de híper-quimiotaxis no ha podido ser aun descrito y explicar a qué responde, aunque si hemos identificado que los genes responsables de este comportamiento híper-quimiotáctico están localizados en el plásmido pGRT1 que porta la bacteria, cuya secuencia se desconoce. Es posible que este plásmido porte algunas enzimas que afectan a la actividad de las MCP que responden frente a compuestos aromáticos y que al carecer de ellas, la bacteria monta esa diferente respuesta quimiotáctica. Una respuesta similar al fenotipo híper-quimiotáctico se ha observado en *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. Esta cepa es repelida por tricloroetileno, siendo tres MCP (PctA, PctB y PctC) los principales quimiorreceptores para la quimiotaxis negativa hacia dicho compuesto, mientras que el triple mutante en estas MCP presenta quimiotaxis positiva hacia dicho compuesto. La búsqueda de potenciales MCP en esta cepa determinó que de los 26 potenciales MCP, el gen *mcpA* (PA0180) codifica el quimiorreceptor para la respuesta quimiotáctica positiva hacia tricloroetileno. Esta proteína, McpA, también detecta tetracloroetileno y dicloroetileno como atrayentes (Kim *et al.*, 2006). Así mismo, la respuesta constitutiva hacia los compuestos aromáticos independientemente de las condiciones de cultivo, indica que el catabolismo y la quimiotaxis de tolueno no están reguladas de una forma coordinada a nivel transcripcional, e igualmente se descarta el papel funcional de los distintos dominios de la proteína sensora TodS en la respuesta quimiotáctica.

A nivel fisiológico la quimiotaxis puede dar ventajas evolutivas a un microorganismo en el sentido que le confiere la capacidad de rastrear diferentes

sustratos que puede utilizar como fuente de carbono y así dirigirse a ellos, o bien alejarse de aquellos compuestos o ambientes que le resulten desfavorables. Otra ventaja sería que las células móviles que carezcan de estas vías degradativas pero se sientan atraídas por estos lugares contaminados, tendrán más posibilidades de contactar con especies que si tengan estas vías, facilitando la transmisión genética horizontal, sobre todo, si estas vías están codificadas en plásmidos. Este quizás podría ser el caso de nuestra cepa, la cual aparentemente no presenta los genes responsables de la quimiotaxis en las regiones genómicas de la ruta TOD, como parece ser característico, pero sí en el plásmido que esta bacteria porta.

En *Pseudomonas putida* DOT-T1E, cepa estudiada en esta Tesis Doctoral, se ha identificado que en el plásmido pGRT1 que porta esta cepa, están codificadas las proteínas responsables del comportamiento híperquimotáctico hacia compuestos aromáticos. La capacidad de algunos microorganismos para detectar y ser atraídos por diferentes compuestos como podrían ser hidrocarburos, podría tener un papel muy importante a la hora de diseñar sistemas eficientes de biorremediación (Pandey y Jain, 2002). La respuesta quimiotáctica y biodegradadora de la cepa degradadora de bifenilos policlorados y clorobenzoatos, *Pseudomonas* sp. B4, ha sido recientemente estudiada (Gordillo *et al.*, 2007). Los resultados demuestran que la bacteria, además de sensor y responder quimiotácticamente hacia bifenilo, sus cloro derivados y a clorobenzoatos en ensayos de quimiotaxis, mostró una clara ventaja a la hora de degradar estos compuestos respecto a bacterias no móviles de la misma cepa. Estos estudios resaltan la importancia de la quimiotaxis en el proceso de biodegradación. La explicación aparente de esta mejor biodegradación sería que las cepas con alta motilidad serán capaces de entrar en contacto con el compuesto a degradar reduciendo los problemas de biodisponibilidad. Por tanto, la capacidad de *Pseudomonas putida* DOT-T1E de responder frente a un amplio perfil de efectores, la capacidad de formar biofilm, su alta motilidad y su respuesta quimiotáctica, le hacen ser un buen candidato para los procesos de biodegradación.

En este trabajo de Tesis Doctoral se ha caracterizado bioquímica y molecularmente el sistema de regulación de dos componentes TodS-TodT de *Pseudomonas putida* DOT-T1E que controla la expresión del operón *tod*, responsable de la degradación de tolueno, benceno y etilbenceno en esta cepa. TodS es una histidina kinasa sensora que reconoce en su dominio PAS amino terminal una amplia gama de compuestos aromáticos frente a muchos de los cuales la proteína incrementa su autofosforilación para posteriormente transmitir un grupo fosfato al regulador transcripcional TodT. Una vez que el regulador está fosforilado, adquiere su conformación activa y tiene lugar el inicio de la transcripción a partir del promotor P_{todX} , dando lugar a la síntesis de las enzimas del operón *tod*. TodT reconoce hasta cinco sitios distintos en la región promotora agrupados en dos cajas pseudopalindrómicas y una caja mitad palindrómica, a las que la proteína se une cooperativamente, doblando el ADN en forma de horquilla. Para la activación de la transcripción, TodT-P contacta con la subunidad α de la ARN polimerasa y junto con IHF conduce positivamente el proceso de transcripción. Por otro lado, se descarta la implicación del sistema TodST en la respuesta quimiotáctica de la bacteria frente a compuestos aromáticos aunque se ha visto que dicha respuesta está modulada por genes presentes en el plásmido pGRT1 que porta dicha cepa, confiriendo un fenotipo quimiotáctico positivo hacia compuestos aromáticos en aquellas cepas que lo portan.

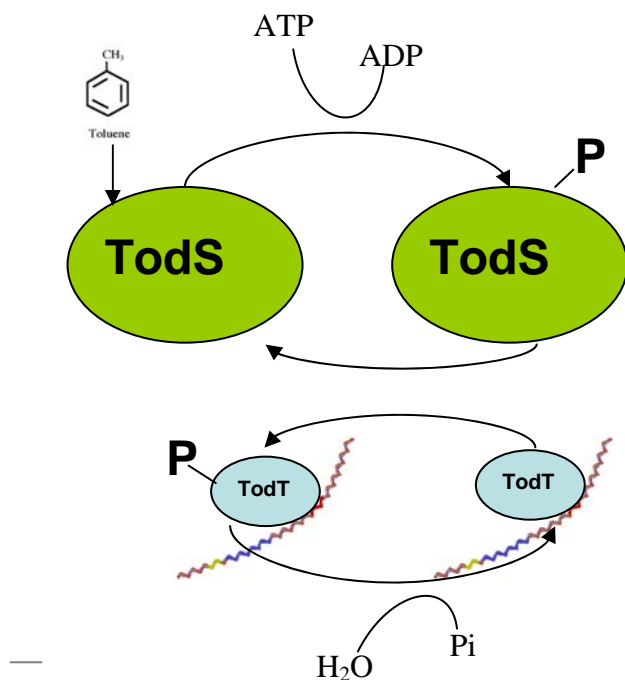


Figura 1. Esquema de la activación del sistema de dos componentes TodS/TodT.

CONCLUSIONES

El conjunto de resultados obtenidos a lo largo de esta Tesis Doctoral se dividen en tres secciones en correspondencia con los objetivos de este trabajo.

I. Caracterización bioquímica y funcional del sistema de dos componentes TodST de *P. putida* DOT-T1E.

1. El catabolismo de tolueno, benceno y etilbenceno en la cepa *Pseudomonas putida* DOT-T1E está específicamente regulado por el sistema de dos componentes TodS/TodT.

2. El sistema regulador TodS/TodT se activa en respuesta a un amplio espectro de compuestos aromáticos. El sensor TodS, interacciona con tolueno a través de su dominio PAS amino terminal, con una afinidad del rango nanomolar y con una estequiometría de unión de una molécula de tolueno por dímero de proteína.

3. El efecto primario de estos efectores en su interacción con la proteína TodS consiste en un aumento de la velocidad de autofosforilación de la proteína y consecuentemente el aumento de la transfosforilación de TodT.

4. La fosforilación de TodT en el aspartato D57 conduce a su conformación activa e interacciona con la subunidad α de la ARN polimerasa iniciando la transcripción del operón catabólico.

II. Caracterización bioquímica y funcional del regulador TodT en su interacción con el promotor P_{todX} .

1. El regulador TodT es un monómero en solución, e independientemente de su estado de fosforilación se une a cinco secuencias diana en la región promotora del operón *tod*. Dichas secuencias diana están agrupadas en dos cajas pseudopalindrómicas y la mitad de un palíndromo, centradas en -106, -85, y -57 con respecto al sitio de inicio de la transcripción.

2. La unión de TodT a las tres TodT box identificadas en la región promotora tiene un papel positivo en la transcripción de P_{todX} aunque la afinidad del regulador por cada caja

es diferente, $1.8 \pm 0.2 \mu\text{M}$, $5 \pm 0.4 \mu\text{M}$ y $6.3 \pm 0.8 \mu\text{M}$, para la caja TodT box 1, box 2 y box 3 respectivamente.

3. La unión de TodT al ADN es cooperativa. Presentando tanto cooperatividad intrapalindrómica como interpalindrómica.

4. El dominio C-terminal de TodT es el responsable de la unión al ADN, uniéndose a las mismas dianas en el ADN y con afinidades similares a las de la proteína TodT completa, aunque a diferencia de ésta, no activa la transcripción del promotor.

5. El dominio N-terminal de TodT es necesario para la formación de supracomplejos moleculares visualizados en forma de horquilla mediante AFM. El análisis de las imágenes sugiere que se forma un complejo en el que TodT unido a sus tres cajas probablemente conduce a la interacción con la ARN polimerasa.

III. Implicación del sistema TodST y estudio de la quimiotaxis de *Pseudomonas putida* DOT-T1E hacia compuestos aromáticos.

1. El sistema TodS/TodT no está implicado en la respuesta quimiotáctica de *P. putida* DOT-T1E hacia compuestos aromáticos.

2. *P. putida* DOT-T1E es hiper-quimiotáctica hacia disolventes orgánicos.

3. El plásmido pGRT1 confiere un comportamiento hiper-quimiotáctico hacia disolventes orgánicos a las cepas de *P. putida* que lo portan.

4. La respuesta quimiotáctica hacia disolventes orgánicos en *P. putida* DOT-T1E es independiente de la exposición previa al tolueno y de la represión catabólica.

BIBLIOGRAFÍA

- Alonso, S., J. M. Navarro-Llorens, A. Tormo, and J. Perera.** 2003. Construction of a bacterial biosensor for styrene. *J Biotechnol* **102**:301-306.
- Appleby J. L., J. S. Parkinson, and R. B. Bourret.** 1996. Signal transduction via the multi-step phosphorelay: not necessarily a road less travelled. *Cell* **86**:845-848.
- Arfin, S. M., A. D. Long, E. T. Ito, L. Toller, M. M. Riehle, E. S. Paegle, and G. W. Hatfield.** 2000. Global gene expression profiling in *Escherichia coli* K12. The effects of integration host factor. *J Biol Chem* **275**:29672-29684.
- Ashby, M. K.** 2004. Survey of the number of two-component response regulator genes in the complete and annotated genome sequences of prokaryotes. *FEMS Microbiol Lett* **231**:277-281.
- Aviv, M., H. Giladi, G. Schreiber, A. B. Oppenheim, and G. Glaser.** 1994. Expression of the genes coding for the *Escherichia coli* integration host factor are controlled by growth phase, *rpoS*, ppGpp and by autoregulation. *Mol Microbiol* **14**:1021-1031.
- Baikalov, I., I. Schröder, M. Kaczor-Grzeskowiak, K. Grzeskowiak, R. P. Gunsalus, and R. E. Dickerson.** Structure of the *Escherichia coli* response regulator NarL. *Biochemistry* **35**:11053-11061.
- Berg, G., A. Fritze, N. Roskot, and K. Smalla.** 2001. Evaluation of potential biocontrol rhizobacteria from different host plants of *Verticillium dahliae* Kleb. *J Appl Microbiol* **91**:963-971.
- Berg, H. C.** 1993. Random walks in biology. Princeton (New Jersey): Princeton University Press; 152 p.
- Berman, H. M., J. Westbrook, Z. Feng, G. Gilliland, T. N. Bhat, H. Weissig, I. N. Shindyalov, and P. E. Bourne.** 2000. The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Re* **28**:235-242.
- Bernal, P., A. Segura, and J. L. Ramos.** 2007. Compensatory role of the *cis-trans*-isomerase and cardiolipin synthase in the membrane fluidity of *Pseudomonas putida* DOT-T1E. *Environ Microbiol* **9**:1658-1664.
- Bertoni, G., F. Bolognese, E. Galli, and P. Barbieri.** 1996. Cloning of the genes for and characterization of the early stages of toluene and *o*-xylene catabolism in *Pseudomonas stutzeri* OX1. *Appl Environ Microbiol* **62**:3704-11.
- Bhushan, B., A. Halasz, S. Thiboutot, G. Ampleman, and J. Hawari.** 2004. Chemotaxis-mediated biodegradation of cyclic nitramine explosives RDX, HMX, and CL-20 by *Clostridium* sp. EDB2. *Biochem Biophys Res Commun* **316**:816-821.
- Bourret, R. B., and A. M. Stock.** 2002. Molecular information processing: lessons from bacterial chemotaxis. *J Biol Chem* **277**:9625-9628.

- Bren, A., and M. Eisenbach.** 2000. How signals are heard during bacterial chemotaxis: protein-protein interactions in sensory signal propagation. *J. Bacteriol.* **182**:6865-6873.
- Busch, A., J. Lacal, A. Martos, J. L. Ramos, and T. Krell.** 2007. Bacterial sensor kinase TodS interacts with agonistic and antagonistic signals. *Proc Natl Acad Sci USA* **104**:13774-13779.
- Cafaro, V., V. Izzo, R. Scognamiglio, E. Notomista, P. Capasso, A. Casbarra, P. Pucci and A. Di Donato.** 2004. Phenol hydroxylase and toluene/*o*-xylene monooxygenase from *Pseudomonas stutzeri* OX1: interplay between two enzymes, *Appl. Environ. Microbiol* **70**:2211–2219.
- Calva, E., and R. Oropeza.** 2006. Two-component signal transduction systems, environmental signals, and virulence. *Microbial Ecol* **51**:166-176.
- Cases, I., and V. de Lorenzo.** 2001. The black cat/white cat principle of signal integration in bacterial promoters. *EMBO J* **20**:1-11.
- Cases, I., and V. de Lorenzo.** 2005. Promoters in the environment: transcriptional regulation in its natural context. *Nat Rev Microbiol* **3**:105-118.
- Cho, M. C., D. O. Kang, B. D. Yoon, and K. Lee.** 2000. Toluene degradation pathway from *Pseudomonas putida* F1: substrate specificity and gene induction by 1-substituted benzenes. *J Ind Microbiol Biotechnol* **25**:163-170.
- Choi, E. N., M. C. Cho, Y. Kim, C. K. Kim, and K. Lee.** 2003. Expansion of growth substrate range in *Pseudomonas putida* F1 by mutations in both *cymR* and *todS*, which recruit a ring-fission hydrolase CmtE and induce the *tod* catabolic operon, respectively. *Microbiology* **149**:795:805.
- Cock, P. J., and D. E. Whitworth.** 2007. Evolution of prokaryotic two-component system signaling pathways: gene fusions and fissions. *Mol Biol Evol* **24**:2355-2357.
- Cornelis, P.** (editor). (2008). *Pseudomonas: Genomics and Molecular Biology*, 1st ed., Caister Academic Press.
- Coschigano, P. W., and L. Y. Young.** 1997. Identification and sequence analysis of two regulatory genes involved in anaerobic toluene metabolism by strain T1. *Appl Environ Microbiol* **63**:652-660.
- Dagley, S.** 1971. Catabolism of aromatic compounds by microorganisms. *Adv Microb Physiol* **6**:1–46.
- de Smet, M. J., J. Kingma, and B. Witholt.** 1978. The effect of toluene on the structure and permeability of the outer and cytoplasmic membranes of *Escherichia coli*. *Biochim Biophys Acta* **506**:64-80.
- Domínguez-Cuevas, P., and S. Marqués.** 2004. Compiling σ^{70} -dependent promoters. *Pseudomonas*, vol 2 pp 319-344.

- Duque, E., A. Segura, G. Mosqueda, and J. L. Ramos.** 2001. Global and cognate regulators control the expression of the organic solvent efflux pumps TtgABC and TtgDEF of *Pseudomonas putida*. *Mol Microbiol* **39**:1100-1106.
- Falke, J. J., and G. L. Hazelbauer.** 2001. Transmembrane signaling in bacterial chemoreceptors. *Trends Biochem Sci* **26**:257-265.
- Finette, B. A., V. Subramanian, and D. T. Gibson.** 1984. Isolation and characterization of *Pseudomonas putida* PpF1 mutants defective in the toluene dioxygenase enzyme system. *J Bacteriol* **160**:1003-1009.
- Finette, B. A., and D. T. Gibson.** 1988. Initial studies on the regulation of toluene degradation by *Pseudomonas putida* F1. *Biocatalyst* **2**:29-37.
- Foussard, M., S. Cabantous, J. Pédelacq, V. Guillet, S. Tranier, L. Mourey, C. Birck, and J. Samama.** 2001. The molecular puzzle of two-component signaling cascades. *Microbes Infect* **3**:417-424.
- Galperin, M. Y.** 2006. Structural classification of bacterial response regulators: diversity of output domains and domain combinations. *J Bacteriol* **188**:4169-4182.
- Gibson, D. T., M. Hensley, H. Yoshioka, and T. J. Mabry.** 1970. Formation of (+)-*cis*-2,3-dihydroxy-1-methylcyclohexa-4,6-diene from toluene by *Pseudomonas putida*. *Biochemistry* **9**:1626-1630.
- Gibson, D. T., G. H. Zylstra, and S. Chauhan.** 1990. Biotransformations catalyzed by toluene dioxygenase from *Pseudomonas putida* F1. In S. Silver, A. M. Chakrabarty, B. Iglewski, and S. Kplan (eds), *Pseudomonas: biotransformations, pathogenesis and evolving biotechnology*, pp. 121-132. American Society for Microbiology, Washington, DC.
- Gordillo, F., F. P. Chávez, and C. A. Jerez.** 2007. Motility and chemotaxis of *Pseudomonas* sp. B4 towards polychlorobiphenyls and chlorobenzoates. *FEMS Microbiology Ecology* **60**:322-328.
- Greated, A., L. Lambertsen, P. A. Williams, and C. M. Thomas.** 2002. Complete sequence of the IncP-9 TOL plasmid pWW0 from *Pseudomonas putida*. *Environ Microbiol* **4**:856-871.
- Grebe, T. W., and J. B. Stock.** 1999. The histidine protein kinase superfamily. *Adv Microb Physiol* **41**:139-227.
- Guazzaroni M. E., W. Terán, X. Zhang, M. T. Gallegos, and J. L. Ramos.** 2004. TtgV bound to a complex operator site represses transcription of the promoter for the multidrug and solvent extrusion TtgGHI pump. *J Bacteriol* **186**:2921-2927.
- Guhaniyogi, J., T. Wu, S. S. Patel, and A. M. Stock.** 2008. Interaction of CheY with the C-terminal peptide of CheZ. *J Bacteriol* **190**:1419-1428.
- Harayama, S., P. R. Lehrbach, and K. N. Timmis.** 1984. Transposon mutagenesis

analysis of *meta*-cleavage pathway operon genes of the TOL plasmid of *Pseudomonas putida* mt-2. J Bacteriol **160**:251-5.

Harayama, S., R. A. Leppik, M. Rekik, N. Mermod, P. R. Lehrbach, W. Reineke and K. N. Timmis. 1986. Gene order of the TOL catabolic plasmid upper pathway operon and oxidation of both toluene and benzyl alcohol by the *xylA* product. J Bacteriol **167**:455-61.

Harayama, S., and M. Rekik. 1989. Bacterial aromatic ring-cleavage enzymes are classified into two different gene families. J Biol Chem **264**:15328-33.

Harayama, S., and M. Rekik. 1990. The *meta* cleavage operon of TOL degradative plasmid pWW0 comprises 13 genes. Mol Gen Genet **221**:113-20.

Hartmans, S., M. J. van der Werf, and J. A. de Bont. 1990. Bacterial degradation of styrene involving a novel flavin adenine dinucleotide-dependent styrene monooxygenase. Appl Environ Microbiol **56**:1347-1351.

Harwood, C. S., N. N. Nichols, M. K. Kim, J. L. Ditty, and R. E. Parales. 1994. Identification of the *pcaRKF* gene cluster from *Pseudomonas putida*: involvement in chemotaxis, biodegradation, and transport of 4-hydroxybenzoate. J Bacteriol **176**:6479-6488.

Hassett, D., J. Cuppoletti, B. Trapnell, S. Lyman, J. Rowe, S. Yoon, G. Hilliard, K. Parvatiyar, M. Kamani, D. Wozniak, S. Hwang, T. McDermott, and U. Ochsner. 2002. Anaerobic metabolism and quorum sensing by *Pseudomonas aeruginosa* biofilms in chronically infected cystic fibrosis airways: rethinking antibiotic treatment strategies and drug targets. Adv Drug Deliv Rev **54**:1425-43.

Hawkins, A. C., and C. S. Harwood. 2002. Chemotaxis of *Ralstonia eutropha* JMP134(pJP4) to the herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetate. Appl Environ Microbiol **68**:968-972.

Hoch, J. A., and T. J. Silhavy. 1995. Two component signal transduction. American Society of Microbiology, Washington D.C.

Hong, C. S., M. Shitashiro, A. Kuroda, T. Ikeda, N. Takiguchi, H. Ohtake, and J. Kato. 2004. Chemotaxis proteins and transducers for aerotaxis in *Pseudomonas aeruginosa*. FEMS Microbiol Lett **231**:247-252.

Hurst, H. C. 1994. Transcription factors. 1: bZIP proteins. Protein Profile **1**:123-168.

Iwaki, H., T. Muraki, S. Ishihara, Y. Hasegawa, K. N. Rankin, T. Sulea, J. Boyd, and P. C. K. Lau. 2007. Characterization of a *Pseudomonas* 2-nitrobenzoate nitroreductase and its catabolic pathway-associated 2-hydroxylaminobenzoate mutase and a chemoreceptor involved in 2-nitrobenzoate chemotaxis. J Bacteriol **189**:3502-3514.

Johnson, L. R. 2007. Microcolony and biofilm formation as a survival strategy for bacteria. J Theor Biol. Nov 5

- Kahn, D.** 1993. Shuffling of an oxygen sensor haem domain. *Mol Microbiol* **8**:786-787.
- Kalir, S., J. McClure, K. Pabbaraju, C. Southward, and M. Ronen.** 2001. Ordering genes in a flagella pathway by analysis of expression kinetics from living bacteria. *Science* **292**:2080–2083.
- Karatan, E., M. M. Saulmon, M. W. Bunn, and G. W. Ordal.** 2001. Phosphorylation of the response regulator CheV is required for adaptation to attractants during *Bacillus subtilis* chemotaxis. *J Biol Chem* **276**:43618-43626.
- Khorchid, A., and M. Ikura.** 2006. Bacterial histidine kinase as signal sensor and transducer. *Int J Biochem Cell Biol* **38**:307-312.
- Keane, A., P. C. Lau, and S. Ghoshal.** 2008. Use of a whole-cell biosensor to assess the bioavailability enhancement of aromatic hydrocarbon compounds by nonionic surfactants. *Biotechnol Bioeng* **99**:86-98.
- Kieboom, J., R. Bruinenberg, I. Keizer-Gunnink, and J. A. de Bont.** 2001. Transposon mutations in the flagella biosynthetic pathway of the solvent-tolerant *Pseudomonas putida* S12 result in a decreased expression of solvent efflux genes. *FEMS Microbiol Lett* **198**:117-122.
- Kim, H., and S. K. Farrand.** 1998. Opine catabolic loci from *Agrobacterium* plasmids confer chemotaxis to their cognate substrates. *Mol Plant Microbe Interact* **11**:131–143.
- Kim, H.-E., M. Shitashiro, A. Kuroda, N. Takiguchi, H. Ohtake, and J. Kato.** 2006. Identification and characterization of the chemotactic transducer in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 for positive chemotaxis to trichloroethylene. *J Bacteriol* **188**:6700-6702.
- Kirsch, M. L., P. D. Peters, D. W. Hanlon, J. R. Kirby, and G. W. Ordal.** 1993. Chemotactic methyltransferase promotes adaptation to high concentrations of attractant in *Bacillus subtilis*. *J Biol Chem* **268**:18610-18616.
- Kirsch, M. L., A. R. Zuberi, D. Henner, P. D. Peters, M. A. Yazdi, and G. W. Ordal.** 1993. Chemotactic methyltransferase promotes adaptation to repellents in *Bacillus subtilis*. *J Biol Chem* **268**:25350-25356.
- Kleerebezem, M., L. E. Quadri, O. P. Kuipers, and W. M. de Vos.** 1997. Quorum sensing by peptide pheromones and two-component signal-transduction systems in Gram-positive bacteria. *Mol Microbiol* **24**:895-904.
- Labbé D., J. Garnon, and P. C. Lau.** 1997. Characterization of the genes encoding a receptor-like histidine kinase and a cognate response regulator from a biphenyl/polychlorobiphenyl-degrading bacterium, *Rhodococcus* sp. Strain M5. *J Bacteriol* **179**:2772-2776.

- Lacal, J., A. Busch, M. E. Guazzaroni, T. Krell, and J. L. Ramos.** 2006. The TodS-TodT two-component regulatory system recognizes a wide range of effectors and works with DNA-bending proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* **103**: 8191-8192.
- Lacal, J., M. E. Guazzaroni, A. Busch, T. Krell, and J. L. Ramos.** 2008. Hierarchical binding of the TodT response regulator to its multiple recognition sites at the *tod* pathway operon promoter. *J Mol Biol* **376**:325-337.
- Lau, P. C., H. Bergeron, D. Labbé, Y. Wang, R. Brousseau and D. T. Gibson.** 1994. Sequence and expression of the *todGIH* genes involved in the last three steps of toluene degradation by *Pseudomonas putida* F1. *Gene* **146**:7-13.
- Lau, P. C., Y. Wang, A. Patel, D. Labbé, H. Bergeron, y R. Brousseau.** 1997. A bacterial basic region leucine zipper histidine kinase regulating toluene degradation. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**:1453-1458.
- Laub, M. T., E. G. Biondi, and J. M. Skerker.** 2007. The molecular puzzle of two-component signaling cascades. *Methods Enzymol* **423**:531-548.
- Laub, M. T., and M. Goulian.** 2007. Specificity in two-component signal transduction pathways. *Annu Rev Genet* **41**:121-145.
- Law, A. M., and M. D. Aitken.** 2003. Bacterial chemotaxis to naphthalene desorbing from a nonaqueous liquid. *Appl Environ Microbiol* **69**:5968-5973.
- Leoni, L., P. Ascenzi, A. Bocedi, G. Rampioni, L. Catellini, and E. Zennaro.** 2003. Styrene-catabolism regulation in *Pseudomonas fluorescens* ST: phosphorylation of StyR induces dimerization and cooperative DNA-binding. *Biochem Biophys Res Comm* **303**:926-931.
- Leoni, L., G. Rampioni, and E. Zennaro.** 2007. Styrene, an unpalatable substrate with complex regulatory networks. *Pseudomonas*, vol 5 pp 59-87.
- Leungsakul, T., B. G. Keenan, B. F. Smets, and T. K. Wood.** 2005. TNT and nitroaromatic compounds are chemoattractants for *Burkholderia cepacia* R34 and *Burkholderia* sp. strain DNT. *Appl Microbiol Biotechnol* **69**:321-325.
- Levchuk, A. A., I. M. Bulyga, T. Iu. Izmalkova, Ia. R. Sevastianovich, I. A. Kosheleva, C. M. Thomas, and M. A. Titok.** 2006. Nah-plasmids of IncP-9 group from natural strains of *Pseudomonas*. *Mol Biol* **40**:835-843.
- Levit, M. N., T. W. Grebe, and J. B. Stock.** 2002. Organization of the receptor-kinase signalling array that regulates *Escherichia coli* chemotaxis. *J Biol Chem* **277**:36748-36754.
- Li, Y., H. Xia, F. Bai, H. Xu, L. Yang, H. Yao, L. Zhang, X. Zhang, Y. Bai, P. E. Saris, T. Tolker-Nielsen, and M. Qiao.** 2007. Identification of a new gene PA5017 involved in flagella-mediated motility, chemotaxis and biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol Lett* **272**:188-195.

- Lois, A. F., G. S. Ditta, and D. R. Helinski.** 1993. The oxygen sensor FixL of *Rhizobium meliloti* is a membrane protein containing four possible transmembrane segments. *J Bacteriol* **175**:1103-1109.
- Ma, S., D. J. Wozniak, and D. E. Ohman.** 1997. Identification of the histidine protein kinase KinB in *Pseudomonas aeruginosa* and its phosphorylation of the alginate regulator *algB*. *J Biol Chem* **272**:17952-1760.
- Macnab, RM.** 1996. Flagella and motility. In: Neidhardt FC, Curtiss R, Ingraham JL, Lin ECC, Low KB, et al., editors. *Escherichia coli* and *Salmonella*: cellular and molecular biology. 2nd ed. Washington (District of Columbia): ASM; pp 123–145.
- Maddock, J. R., and L. Shapiro.** 1993. Polar location of the chemoreceptor complex in the *Escherichia coli* cell. *Science* **259**:1717-1723.
- Madigan, M., and J. Martinko.** (editors). 2005. Brock Biology of Microorganisms, 11th ed., Prentice Hall.
- Marqués, S., M. T. Gallegos, M. Manzanera, A. Holtel, K. N. Timmis, and J. L. Ramos.** 1998. Activation and repression of transcription at the double tandem divergent promoters for the *xylR* and *xylS* genes of the TOL plasmid of *Pseudomonas putida*. *J Bacteriol* **180**:2889-2894.
- Mars, A.E., T. Kasberg, S. R. Kaschabek, M. H. van Agteren, D. B. Janssen, and W. Reineke.** 1997. Microbial degradation of chloroaromatics: use of the *meta*-cleavage pathway for mineralization of chlorobenzene. *J Bacteriol* **179**:4530-7.
- Mascher, T., J. D. Helmann, and G. Unden.** 2006. Stimulus perception in bacterial signal-transducing histidine kinases. *Microbiol Mol Biol Rev* **70**:910-938.
- Menn, F. M., G. J. Zylstra, and D. T. Gibson.** 1991. Location and sequence of the *todF* gene encoding 2-hydroxy-6-oxohepta-2,4-dienoate hydrolase in *Pseudomonas putida* F1. *Gene* **104**:91-4.
- Miller, L. D., C. K. Yost, M. F. Hynes, and G. Alexandre.** 2007. The major chemotaxis gene cluster of *Rhizobium leguminosarum* *bv. viciae* is essential for competitive nodulation. *Mol Microbiol* **63**:348-362.
- Mizuno, T.** 1997. Compilation of all genes encoding two-component phosphotransfer signal transducers in the genome of *Escherichia coli*. *DNA Res* **4**:161-168.
- Mizuno, T., T. Kaneko, and S. Tabata.** 1996. Compilation of all genes encoding bacterial two-component signal transducers in the genome of the cyanobacterium, *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. *DNA Res* **3**:407-414.
- Mohan, S. V., T. Kisa, T. Ohkuma, R. A. Kanaly, and Y. Shimizu.** 2006. Bioremediation technologies for treatment of PAH-contaminated soil and strategies to enhance process efficiency. Springer Netherlands volume 5, number **4**:347-374.

Morgan, D. G., J. B. Baumgartner, and G. L. Hazelbauer. 1993. Proteins antigenically related to methyl-accepting chemotaxis proteins of *Escherichia coli* detected in a wide range of bacterial species. *J Bacteriol* **175**:133–140.

Mosqueda, G., M. I. Ramos-González, and J. L. Ramos. 1999. Toluene metabolism by the solvent-tolerant *Pseudomonas putida* DOT-T1 strain, and its role in solvent impermeabilization. *Gene* **232**:69-76.

Mosqueda, G., and J. L. Ramos. 2000. A set of genes encoding a second toluene efflux system in *Pseudomonas putida* DOT-T1E is linked to the *tod* genes for toluene metabolism. *J Bacteriol* **182**:937-943.

Muff, T. J., R. M. Foster, P. J. Liu, G. W. Ordal. 2007. CheX in the three-phosphatase system of bacterial chemotaxis. *J Bacteriol* **189**:7007-7013.

Nelson, K. E., C. Weinel, I. T. Paulsen, R. J. Dodson, H. Hilbert, V. A. Martins dos Santos, D. E. Fouts, S. R. Gill, M. Pop, M. Holmes, L. Brinkac, M. Beanan, R. T. DeBoy, S. Daugherty, J. Kolonay, R. Madupu, W. Nelson, O. White, J. Peterson, H. Khouri, I. Hance, P. Chris Lee, E. Holtzapple, D. Scanlan, K. Tran, A. Moazzez, T. Utterback, M. Rizzo, K. Lee, D. Kosack, D. Moestl, H. Wedler, J. Lauber, D. Stjepandic, J. Hoheisel, M. Straetz, S. Heim, C. Kiewitz, J. A. Eisen, K. N. Timmis, A. Dusterhöft, B. Tümmeler, and C. M. Fraser. 2002. Complete genome sequence and comparative analysis of the metabolically versatile *Pseudomonas putida* KT2440. *Environ Microbiol* **4**:799-808. Erratum in: *Environ Microbiol.* 2003 **5**:630.

Ninfa, A. J., and B. Magasanik. 1986. Covalent modification of the *glnG* product, NRI, by the *glnL* product, NRII, regulates the transcription of the *glnALG* operon in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**:5909-5913.

Ninfa, A. J., L. J. Reitzer, and B. Magasanik. 1987. Initiation of transcription at the bacterial *glnAp2* promoter by purified *E. coli* components is facilitated by enhancers. *Cell* **50**:1039-1046.

Ninfa, E. G., M. R. Atkinson, E. S. Kamberov, and A. J. Ninfa. 1993. Mechanism of autophosphorylation of *Escherichia coli* nitrogen regulator II (NRII or NtrB): transphosphorylation between subunits. *J Bacteriol* **175**:7024-7032.

Nixon, B. T., C. W. Ronson, and F. M. Ausubel. 1986. Two-component regulatory systems responsive to environmental stimuli share strongly conserved domains with the nitrogen assimilation regulatory genes *ntrB* and *ntrC*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**:7850-7854.

O'Toole, R., S. Lundberg, S. A. Fredriksson, A. Jansson, B. Nilsson, and H. Wolf-Watz. 1999. The chemotactic response of *Vibrio anguillarum* to fish intestinal mucus is mediated by a combination of multiple mucus components. *J Bacteriol* **181**:4308–4317.

Ornston, L. N. 1966. The conversion of catechol and protocatechuate to β -keto adipate by *Pseudomonas putida*. III. Enzymes of the catechol pathway. *J Biol Chem* **241**:3795-3799.

- Palleroni, N. J., R. Kunisawa, R. Contopoulou, and M. Doudoroff.** 1973. Nucleic acid homologies in the genus *Pseudomonas*. *Int J Syst Bact* **23**:333-339.
- Pandey, G., A. Chauhan, S. K. Samanta, and R. K. Jain.** 2002. Chemotaxis of a *Ralstonia* sp. SJ98 toward cometabolizable nitroaromatic compounds. *Biochem Biophys Res Commun* **299**:404-409.
- Pandey, G., and R. K. Jain.** 2002. Bacterial Chemotaxis toward environmental pollutants: role in bioremediation. *Appl Environ Microbiol* **68**:5789-5795.
- Pao, G. M., and Jr M. H. Saier.** 1995. Response regulators of bacterial signal transduction systems: selective domain shuffling during evolution. *J Mol Evol* **40**:136-154.
- Parales, R. E.** 2004. Nitrobenzoates and aminobenzoates are chemoattractants for *Pseudomonas* strains. *Appl Environ Microbiol* **70**:285-292.
- Parales, R. E., J. L. Ditty, and C. S. Harwood.** 2000. Toluene-degrading bacteria are chemotactic towards the environmental pollutants benzene, toluene, and trichloroethylene. *Appl Environ Microbiol* **66**:4098-4104.
- Parales, R. E., and C. S. Harwood.** 2002. Bacterial chemotaxis to pollutants and plant-derived aromatic molecules. *Current Opinion in Microbiology* **5**:266-273.
- Park, S. Y., P. P. Borbat, G. Gonzalez-Bonet, J. Bhatnagar, A. M. Pollard, J. H. Freed, A. M. Bilwes, and B. R. Crane.** 2006. Reconstruction of the chemotaxis receptor-kinase assembly. *Nat Struct Mol Biol* **13**:400-407.
- Parkinson, J. S., and E. C. Kofoid.** 1992. Communication modules in bacterial signaling proteins. *Annu Rev Genet* **26**:71-112.
- Pittman, M. S., M. Goodwin, and D. J. Kelly.** 2001. Chemotaxis in the human gastric pathogen *Helicobacter pylori*: different roles for CheW and the three CheV paralogues, and evidence for CheV2 phosphorylation. *Microbiology* **147**:2493-2504.
- Potter, C. A., E. L. Jeong, M. P. Williamson, P. J. Henderson, and M. K. Phillips-Jones.** 2006. Redox-responsive in vitro modulation of the signalling state of the isolated PrrB sensor kinase of *Rhodobacter sphaeroides* NCIB 8253. *FEBS Lett* **580**:3206-3210.
- Ramos, J. L., C. Michan, F. Rojo, D. Dwyer, and K. Timmis.** 1990. Signal-regulator interactions. Genetic analysis of the effector binding site of xylS, the benzoate-activated positive regulator of *Pseudomonas* TOL plasmid meta-cleavage pathway operon. *J Mol Biol* **211**:373-382.
- Ramos, J. L., E. Duque, M. J. Huertas, and A. Haidour.** 1995. Isolation and expansion of the catabolic potential of a *Pseudomonas putida* strain able to grow in the presence of high concentrations of aromatic hydrocarbons. *J Bacteriol* **177**:3911-3916.
- Ramos, J. L., E. Duque, P. Godoy and A. Segura.** 1998. Efflux pumps involved in toluene tolerance in *Pseudomonas putida* DOT-T1E. *J Bacteriol* **180**:3323-3329.

- Ramos, J. L., E. Duque, M. T. Gallegos, P. Godoy, M. I. Ramos-González, A. Rojas, W. Terán, and A. Segura.** 2002. Mechanisms of solvent tolerance in gram-negative bacteria. *Annu Rev Microbiol* **56**:743-768.
- Ramos-González, M. I., M. A. Ramos-Díaz, and J. L. Ramos.** 1994. Chromosomal gene capture mediated by the *Pseudomonas putida* TOL catabolic plasmid. *J Bacteriol* **176**:4635-4641.
- Ramos-González, M. I., M. Olson, A. A. Gatenby, G. Mosqueda, M. Manzanera, M. J. Campos, S. Vichez, and J. L. Ramos.** 2002. Cross-regulation between a novel two-component signal transduction system for catabolism of toluene in *Pseudomonas mendocina* and the TodST system from *Pseudomonas putida*. *J Bacteriol* **184**:7062-7067.
- Reineke W., D. J. Jeenes, P. A. Williams, and H. J. Knackmuss.** 1982. TOL plasmid pWW0 in constructed halobenzoate-degrading *Pseudomonas* strains: prevention of *meta* pathway. *J Bacteriol* **150**:195-201.
- Reizer J., and Jr M. H. Saier.** 1997. Modular multidomain phosphoryl transfer proteins of bacteria. *Curr Opin Struct Biol* **7**:407-415.
- Renault, D., F. Déniel, E. Benizri, D. Sohier, G. Barbier, and P. Rey.** 2007. Characterization of *Bacillus* and *Pseudomonas* strains with suppressive traits isolated from tomato hydroponic-slow filtration unit. *Can J Microbiol* **53**:784-797.
- Rojas, A., E. Duque, G. Mosqueda, G. Golden, A. Hurtado, J. L. Ramos, and A. Segura.** 2001. Three efflux pumps are required to provide efficient tolerance to toluene in *Pseudomonas putida* DOT-T1E. *J Bacteriol* **183**:3967-3973.
- Rojas, A., E. Duque, A. Schmid, A. Hurtado, J. L. Ramos, and A. Segura.** 2004. Biotransformation in double-phase systems: physiological responses of *Pseudomonas putida* DOT-T1E to a double phase made of aliphatic alcohols and biosynthesis of substituted catechols. *Appl Environ Microbiol* **70**:3637-3643.
- Rosario, M. M., J. R. Kirby, D. A. Bochar, and G. W. Ordal.** 1995. Chemotactic methylation and behavior in *Bacillus subtilis*: role of two unique proteins, CheC and CheD. *Biochemistry* **34**:3823-3831.
- Rosario, M. M., and G. W. Ordal.** 1996. CheC and CheD interact to regulate methylation of *Bacillus subtilis* methyl-accepting chemotaxis proteins. *Mol. Microbiol.* **21**:511-518.
- Ryan, K. J., and C. G. Ray.** (editors). 2004. *Sherris Medical Microbiology*, 4th ed., McGraw Hill.
- Salman, H., and A. Libchaber.** 2007. A concentration-dependent switch in the bacterial response to temperature. *Nat Cell Biol* **9**:1098-1100.

- Segura, A., E. Duque, A. Hurtado, and J. L. Ramos.** 2001. Mutations in genes involved in the flagellar export apparatus of the solvent-tolerant *Pseudomonas putida* DOT-T1E strain impair motility and lead to hypersensitivity to toluene shocks. *J Bacteriol* **187**:5937-5945.
- Segura, A., A. Hurtado, E. Duque, and J. L. Ramos.** 2004. Transcriptional phase variation at the *flhB* gene of *Pseudomonas putida* DOT-T1E is involved in response to environmental changes and suggests the participation of the flagellar export system in solvent tolerance. *J Bacteriol* **186**:1905-1909.
- Shields, M. S., S. O. Montgomery, P. J. Chapman, S. M. Cuskey, and P. H. Pritchard.** 1989. Novel Pathway of Toluene Catabolism in the Trichloroethylene-Degrading Bacterium G4. *Appl Environ Microbiol* **55**:1624-1629.
- Shields, M. S., M. J. Reagin, R. R. Gerger, R. Campbell, and C. Somerville.** 1995. TOM, a new aromatic degradative plasmid from *Burkholderia (Pseudomonas) cepacia* G4. *Appl Environ Microbiol* **61**:1352-6.
- Shingler, V.** 2003. Integrated regulation in response to aromatic compounds: from signal sensing to attractive behaviour. *Environ Microbiol* **5**:1226-1241.
- Sikkema, J., B. Poolman, W. N. Konings, and J. A. de Bont.** 1992. Effects of the membrane action of tetralin on the functional and structural properties of artificial and bacterial membranes. *J Bacteriol* **174**:2986-2892.
- Silversmith, R. E., G. P. Guanga, L. Betts, C. Chu, R. Zhao, and R. B. Bourret.** 2003. CheZ-mediated dephosphorylation of the *Escherichia coli* chemotaxis response regulator CheY: role for CheY glutamate 89. *J Bacteriol* **185**:1495-14502.
- Skerker, J. M., M. S. Prasol, B. S. Perchuk, E. G. Biondi, and M. T. Laub.** 2005. Two-component signal transduction pathways regulating growth and cell cycle progression in a bacterium: a system-level analysis. *PLoS Biol* **3**:1770-1788.
- Sourjik, V.** 2004. Receptor clustering and signal processing in *E. coli* chemotaxis. *Trends Microbiol* **12**:569-576.
- Sourjik, V., and H. C. Berg.** 2000. Localization of components of the chemotaxis machinery of *Escherichia coli* using fluorescent protein fusions. *Mol Microbiol* **37**:740-751.
- Stock, A. M., V. L. Robinson, and P. N. Goudreau.** 2000. Two-component signal transduction. *Annu Rev Biochem* **69**:183-215.
- Stock, J. B., A. M. Stock, and J. M. Mottonen.** 1990. Signal transduction in bacteria. *Nature* **344**:395-400.
- Stock, J. B., and M. G. Surette.** 1996. Chemotaxis. In F. C. Neidhardt, R. Curtiss III, 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 2nd ed ASM Press Washington D. C. pp. 1103-1129.

Swanson, R. V., R. B. Bourret, and M. I. Simon. 1993. Intermolecular complementation of the kinase activity of CheA. *Mol Microbiol* **8**:435-41.

Swanson, R. V., L. A. Alex, and M. I. Simon. 1994. Histidine and aspartate phosphorylation: two-component systems and the limits of homology. *Trends Biochem Sci* **19**:485-490.

Ulrich, L. E., E. V. Koonin, and I. B. Zhulin. 2005. One-component systems dominate signal transduction in prokaryotes. *Trends Microbiol* **13**:52-56.

Velasco, A., S. Alonso, J. L. García, J. Perera, and E. Díaz. 1998. Genetic and functional analysis of the styrene catabolic cluster of *Pseudomonas* sp. Strain Y2. *J Bacteriol* **180**:1063-1071.

Volz, K. 1993. Structural conservation in the CheY superfamily. *Biochemistry* **32**:11741-11753.

Wadhams, G. H., A. C. Martin, and J. P. Armitage. 2000. Identification and localization of a methyl-accepting chemotaxis protein in *Rhodobacter sphaeroides*. *Mol Microbiol* **36**:1222-1233.

Wadhams, G. H., and J. P. Armitage. 2004. Making sense of it all: bacterial chemotaxis. *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**:1024-1037.

Walthers, D., V. K. Tran, and L. J. Kenney. 2003. Interdomain linkers of homologous response regulators determine their mechanism of action. *J Bacteriol* **185**:317-324.

Wang, Y., M. Rawlings, D. T. Gibson, D. Labbe, H. Bergeron, R. Brousseau, and P. C. Lau. 1995. Identification of a membrane protein and a truncated LysR-type regulator associated with the toluene degradation pathway in *Pseudomonas putida* F1. *Mol Gen Genet* **246**:570-579.

West, A. H., and A. M. Stock. 2001. Histidine kinases and response regulator proteins in two-component signalling systems. *Trends Biochem Sci.* **26**:369-376.

Whited, G. M., and D. T. Gibson. 1991. Toluene-4-monooxygenase, a three-component enzyme system that catalyzes the oxidation of toluene to p-cresol in *Pseudomonas mendocina* KR1. *J Bacteriol* **173**:3010-6.

Whited, G. M., and D. T. Gibson. 1991. Separation and partial characterization of the enzymes of the toluene-4-monooxygenase catabolic pathway in *Pseudomonas mendocina* KR1. *J Bacteriol* **173**:3017-20.

Wolanin, P. M., P. A. Thomason, and J. B. Stock. 2002. Histidine protein kinases: key signal transducers outside the animal kingdom. *Genome Biol* **3**:reviews3013.1-3013.8.

Wootton, J. C., and M. H. Drummond. 1989. The Q-linker: a class of interdomain sequences found in bacterial multidomain regulatory proteins. *Protein Eng* **2**:535-543.

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

Wright, A., and R. H. Olsen. 1994. Self-mobilization and organization of the genes encoding the toluene metabolic pathway of *Pseudomonas mendocina* KR1. *Appl Environ Microbiol* **60**:235-42.

Yen K. M., and I. C. Gunsalus. 1982. Plasmid gene organization: naphthalene/salicylate oxidation. *Proc Natl Acad Sci USA* **79**:874-878.

Zaslaver, A., A. E. Mayo, R. Rosenberg, P. Bashkin, and H. Sberro H. 2004. Just-in-time transcription program in metabolic pathways. *Nat Genet* **36**:486-491.

Zylstra, G. J., y D. T. Gibson. 1989. Toluene degradation by *Pseudomonas putida* F1. Nucleotide sequence of the *todC1C2BADE* genes and their expression in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **264**:14940-14946.

Zylstra, G. J., W. R. McCombie, D. T. Gibson, and B. A. Finette. 1988. Toluene degradation by *Pseudomonas putida* F1: Genetic organization of the *tod* operon. *Appl Environ Microbiol* **54**:1498-1503.

Zylstra, G. J., and D. T. Gibson. 1991. Aromatic hydrocarbon degradation: a molecular approach. *Genet. Eng.* **13**: 183-203.

Resumen

El trabajo de esta Tesis Doctoral se enfoca al estudio del sistema de regulación de dos componentes TodS-TodT de *Pseudomonas putida* DOT-T1E. Esta bacteria es muy resistente a compuestos aromáticos y puede usar benceno, tolueno y etilbenceno como única fuente de carbono y energía a través de la ruta TOD. Los genes de esta ruta están agrupados en el denominado operón *tod*, que se transcribe a partir del promotor P_{todX} y cuya expresión está regulada por el sistema de dos componentes TodS/TodT. TodS es una histidina kinasa sensora mientras que TodT es un regulador transcripcional. TodS reconoce en su dominio PAS amino terminal una amplia gama de compuestos aromáticos frente a muchos de los cuales la proteína incrementa su autofosforilación para posteriormente transmitir un grupo fosfato al regulador TodT. Una vez que el regulador está fosforilado, adquiere su conformación activa y tiene lugar el inicio de la transcripción a partir del promotor P_{todX} , dando lugar a la síntesis de las enzimas del operón *tod*. TodT reconoce hasta cinco sitios distintos en la región promotora agrupados en dos cajas pseudopalindrómicas y una caja mitad palindrómica, identificadas como las cajas TodT, a las que la proteína TodT se une cooperativamente. TodT contacta con la subunidad α de la ARN polimerasa en la activación de la transcripción y también está implicada en la formación de una horquilla en el ADN que aproxima las cajas TodT hacia el sitio de unión de la ARN polimerasa. IHF participa positivamente en el proceso de transcripción, probablemente facilitando el doblamiento del ADN. Por otro lado, se descarta la implicación del sistema TodST en la respuesta quimiotáctica de la bacteria frente a compuestos aromáticos aunque se ha visto que dicha respuesta está modulada por genes presentes en el plásmido pGRT que porta dicha cepa, confiriendo un fenotipo quimiotáctico positivo hacia compuestos aromáticos en aquellas cepas que lo portan.