

**CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS**



**ESTACIÓN EXPERIMENTAL DEL ZAIDÍN**



**UNIVERSIDAD DE GRANADA**



**Estudio del metabolismo del formaldehído en  
*Pseudomonas putida* KT2440.**

**TESIS DOCTORAL**

**Amalia Roca Hernández**

**2009**

Editor: Editorial de la Universidad de Granada  
Autor: Amalia de la Arrix Roca Hernández  
D.L.: GR 3961-2009  
ISBN: 978-84-692-7840-6



**Estudio del metabolismo del formaldehído en *Pseudomonas putida* KT2440.**

Memoria que presenta la licenciada en Ingeniería Agronómica, Amalia Roca Hernández, para aspirar al Título de Doctora

Fdo.: **Amalia Roca Hernández**

Vº Bº El Director

Fdo: **Juan Luís Ramos Martín**

Doctor en Biología

Profesor de Investigación del C.S.I.C.

EEZ-CSIC / UGR

2009





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



**A MI HERMOSA Y NUMEROSA FAMILIA**

**A MI PRINCIPE DE MAINE....**



## I. ÍNDICE



## ÍNDICE GENERAL

	<u>PÁG</u>
<b>I. ÍNDICE</b> .....	<b>Xii</b>
<b>ABREVIATURAS</b> .....	<b>Xii</b>
<b>INDICE DE FIGURAS</b> .....	<b>XV</b>
<b>INDICE DE TABLAS</b> .....	<b>XVii</b>
<b>II. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
1. FORMALDEHÍDO: SÍNTESIS, PROPIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS Y TOXICIDAD.....	3
2. EL GÉNERO PSEUDOMONAS .....	7
2.1. <i>PSEUDOMONAS PUTIDA</i> KT2440 .....	12
3. METABOLISMO DEL FORMALDEHÍDO .....	15
3.1 RUTA CÍCLICA OXIDATIVA DE LA RIBULOSA MONOFOSFATO (RUMP) .....	18
3.2 OXIDACIÓN DE FORMALDEHÍDO DEPENDIENTE DE TETRAHIDROFOLATO (H <sub>4</sub> F).....	20
3.3 OXIDACIÓN DE FORMALDEHÍDO DEPENDIENTE DE TETRAHIDROMETANOPTERIN (H <sub>4</sub> MPT).....	21
3.4 OXIDACIÓN DE FORMALDEHÍDO DEPENDIENTE DE TIOL (MICOTIOL-GLUTATIÓN) .....	22
3.5 OXIDACIÓN DE FORMALDEHÍDO POR FORMALDEHÍDO DESHIDROGENASA LIGADA A NAD <sup>+</sup> .....	24
4. METABOLISMO DEL FORMALDEHIDO EN PSEUDOMONAS PUTIDA .....	25
4.1.1 FORMALDEHÍDO DESHIDROGENASA INDEPENDIENTE DE GLUTATIÓN .....	27
4.1.2 ESTRUCTURA DE LA PFDH .....	29
4.2.1 FORMATO DESHIDROGENASA (FDH) .....	30
4.2.2 ESTRUCTURA DE LA PFDH .....	34
<b>III. OBJETIVOS</b> .....	<b>43</b>



<b>IV. RESULTADOS</b> .....	<b>47</b>
CAPÍTULO 1: RESPUESTAS FISIOLÓGICAS DE <i>PSEUDOMONAS PUTIDA</i> KT2440 FRENTE A FORMALDEHIDO DURANTE SU DETOXIFICACION .....	49
CAPÍTULO 2: REDUNDANCIA DE ENZIMAS PARA LA DETOXIFICACION DE FORMALDEHIDO EN <i>PSEUDOMONAS PUTIDA</i> .....	65
CAPÍTULO 3: PAPEL “IN VIVO” DE FdhD Y FmdD EN EL METABOLISMO DEL FORMATO EN <i>PSEUDOMONAS PUTIDA</i> : REDUNDANCIA Y EXPRESIÓN EN FASE ESTACIONARIA.....	77
<b>V. DISCUSIÓN GENERAL</b> .....	<b>87</b>
<b>VI. CONCLUSIONES</b> .....	<b>105</b>
<b>VII. MATERIAL SUPLEMENTARIO</b> .....	<b>109</b>
MATERIAL SUPLEMENTARIO DE LA INTRODUCCIÓN.....	111
MATERIAL SUPLEMENTARIO DEL CAPÍTULO 1.....	112
MATERIAL SUPLEMENTARIO DEL CAPÍTULO 2.....	113
MATERIAL SUPLEMENTARIO DEL CAPÍTULO 3.....	115
MATERIAL SUPLEMENTARIO DE LA DISCUSIÓN.....	123
<b>VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>130</b>

## Abreviaturas

Abreviaturas	Significado
<b>aa</b>	Aminoácido
<b>ADN</b>	ácido desoxirribonucleico
<b>ADN<sub>asa</sub></b>	desoxirribonucleasa
<b>ADN<sub>c</sub></b>	ADN complementario
<b>ARN</b>	ácido ribonucleico
<b>ARNm</b>	ARN mensajero
<b>ARNr</b>	ARN ribosómico
<b>ARNt</b>	ARN transferente
<b>ATP</b>	adenosina trifosfato
<b>CPM</b>	Cuentas por minuto
<b>Da</b>	dalton o g/mol
<b>KDa</b>	Kilodalton
<b>dNTPs</b>	desoxinucleótidos trifosfato
<b>DO<sub>660</sub></b>	turbidez medida a 660 nm
<b>DTT</b>	di-tiotreitol
<b>EDTA</b>	tetra acetato de etilendiamina
<b>Fig</b>	Figura
<b>GSH</b>	Glutación
<b>HCOH</b>	Formaldehído
<b>HCOOH</b>	Ácido fórmico o formato
<b>HCOH</b>	Formaldehído
<b>HCOOH</b>	Ácido fórmico o formato
<b>HTH</b>	Hélice-giro-hélice
<b>Kb</b>	Kilobase(s)
<b>K<sub>D</sub></b>	constante de disociación al equilibrio
<b>LB</b>	Luria-Bertani
<b>MFE</b>	Mínima energía libre
<b>MIC</b>	Concentración mínima inhibitoria
<b>NADH</b>	Dinucleótido nicotinamida adenina
<b>NADP</b>	Dinucleótido nicotinamida adenina fosfato
<b>nt</b>	Nucleótido
<b>ONPG</b>	o-nitrofenilgalactopiranosido

---

<b>Abreviaturas</b>	<b>Significado</b>
<b>ORF</b>	Marco abierto de lectura (del inglés, open reading frame)
<b>pb</b>	pares de bases
<b>RNAP<math>\sigma^{70}</math></b>	RNAP asociada a $\sigma^{70}$
<b>RNAP<math>\sigma^{54}</math></b>	RNAP asociada a $\sigma^{54}$
<b>SECIS</b>	Secuencia de inserción de selenocisteína
<b>SDS</b>	dodecilsulfato sódico
<b>v/v</b>	volumen/volumen
<b>X-gal</b>	5-bromo 4-cloro 3 indolil $\beta$ -D- galactopiranosido

## ÍNDICE DE FIGURAS

INTRODUCCIÓN		PAG.
Figura 1	Papel central del formaldehído en el metabolismo de bacterias metilotrofas aerobias.....	15
Figura 2	Representación de las reacciones que se producen en la vía oxidativa ribulosa monofosfato.....	18
Figura 3	Metabolismo del formaldehído en <i>M. extorquens</i> AM1, representación de las rutas para la conversión del formaldehído dependientes de H4MPT y H4F.....	20
Figura 4	Fases de oxidación del formaldehído a través de la formaldehído deshidrogenasa dependiente de glutatión.....	23
Figura 5	Diagrama de cintas del complejo PFDH.....	30
Figura 6	Estructura del complejo Fdh-N.....	35
Figura 7	Representación de cintas de la subunidad $\alpha$ .....	36
Figura 8	Estructura de la subunidad $\beta$ .....	38
Figura 9	Estructura de la subunidad $\gamma$ .....	39
MATERIAL SUPLEMENTARIO DE LA INTRODUCCIÓN		
Figura 1	Análisis filogenético de la secuencia de aminoácidos de la proteína HPS (A) y la proteína PHI (B) empleando el programa CLUSTAL W del servidor DDBJ.....	110
CAPÍTULO 1		
Figure 1.	Growth of <i>P. putida</i> KT2440 in the presence of low H <sup>14</sup> COH concentrations and production of <sup>14</sup> CO <sub>2</sub> .....	54
Figure 2	Killing kinetics of <i>P. putida</i> KT2440 upon exposure to different HCOH concentrations.....	54
Figure 3	Selected gene categories of <i>P. putida</i> KT2440 that showed upregulated expression in response to formaldehyde.....	56
Figure 4	Killing kinetics of <i>P. putida</i> KT2440 and isogenic mutants upon exposure to HCOH concentrations.....	58
CAPÍTULO 2		
Figure 1.	Physical organization of genes encoding enzymes for formaldehyde and formate metabolism.....	71
Figure 2	Operon structure of genes encoding enzymes for formaldehyde metabolism.....	71
Figure 3	Transcription initiation point of the four transcriptional units of the genes involved in formaldehyde metabolism.....	72
Figure 4	Alignment of the promoters of the genes involved in formaldehyde metabolism.....	72
Figure 5	Time course expression from the PP0328 promoter along the growth curve.....	72
Figure 6	Exponential- and stationary-phase levels of expression in the parental KT2440 strain and the isogenic rpoS-deficient background.....	73

MATERIAL SUPLEMENTARIO CAPÍTULO 2	
Figura 1	Evolución de la expresión de PP0489 (A) y PP2183 (B) a lo largo de la curva de crecimiento..... 112
CAPÍTULO 3	
Figure 1.	Physical and transcriptional organization of genes surrounding <i>Pseudomonas putida</i> ORF PP0257..... 81
Figure 2	Determination of the transcription start point of <i>fdhD</i> ..... 81
Figure 3	Expression level of PP0257 measured as b-galactosidase under different growth conditions and in different host backgrounds..... 82
Figure 4	Construction of a PP0257 mutant knock-out by site-directed mutagenesis..... 83
MATERIAL SUPLEMENTARIO CAPÍTULO 3	
Figura 1	Alineamientos entre las secuencias de las proteínas FmdD de <i>P. putida</i> KT2440 y FdhE de <i>E. coli</i> K-12..... 114
Figura 2	Alineamientos de las secuencias de las proteínas FdhD de <i>P. putida</i> KT2440 y FdhD de <i>E. coli</i> K-12..... 115
Figura 3	Evolución de la expresión de <i>fdhD</i> (PP0257) a lo largo de la curva de crecimiento..... 116
DISCUSIÓN GENERAL	
Figura 1	Ruta biosintética para la incorporación de selenocisteína..... 122
Figura 2	Modelos de las estructuras secundarias de las bSECIS de las formato deshidrogenasas de <i>E. coli</i> <i>fdhF</i> y <i>fdnG</i> ..... 123
Figura 3	Modelos de las estructuras secundarias de las bSECIS de las formato deshidrogenasas <i>fdhF</i> de <i>E. coli</i> y <i>fdmA</i> de <i>P. putida</i> KT2440..... 124
Figura 4	Modelo estructural del consenso bSECIS y restricciones mínimas de la ORF..... 125
Figura 5	Alineamientos entre las secuencias de las proteínas FmdA (PP0489) de <i>P. putida</i> KT2440 y FDOG de <i>E. coli</i> K-12..... 126
Figura 6	El ARNm específico del péptido señal <i>fdnG</i> puede ser empaquetado en una estructura tallo-lazo..... 127
Figura 7	Modelos de las estructuras secundarias de 17 primeros codones de las formato deshidrogenasas <i>fdhF</i> , <i>fdnG</i> , <i>fdoG</i> de <i>E. coli</i> y <i>fdmA</i> de <i>P. putida</i> KT2440..... 128

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>INTRODUCCIÓN</b>		<b>PAG.</b>
Tabla 1	Propiedades físico-químicas del formaldehído.....	3
Tabla 2	Características generales de genomas de especies representativas del género <i>Pseudomonas</i> .....	11
<b>CAPÍTULO 1</b>		
Table 1	Strains used in this study.....	53
Table 2	Genes upregulated in <i>P. putida</i> KT2440 (pWW0) 20 min after the addition of HCOH.....	55
Table 3	Doubling time of <i>P. putida</i> and its isogenic mutants in the presence of formaldehyde.....	57
<b>MATERIAL SUPLEMENTARIO CAPÍTULO 1</b>		
Table 1	Gene downregulated in <i>P. putida</i> KT2440 (pWW0) 20 min after the addition of HCOH.....	111
<b>CAPÍTULO 2</b>		
Table 1	Genes potentially able to encode formaldehyde dehydrogenase/formate dehydrogenase.....	69
Table 2	Plasmids and strains used in this study.....	69
Table 3	Maximal mineralization of <sup>14</sup> C -formaldehyde by the wild type and isogenic <i>P. putida</i> mutants.....	73
Table 4	Effect of high formaldehyde concentrations on the lag phase and doubling time in the exponential phase.....	74
<b>MATERIAL SUPLEMENTARIO CAPÍTULO 2</b>		
Tabla 1	Cebadores empleados en este estudio.....	113
<b>CAPÍTULO 3</b>		
<b>MATERIAL SUPLEMENTARIO CAPÍTULO 3</b>		
Tabla 1	Porcentaje de identidad y similitud del ORF PP0492 (FmdD) respecto a otros microorganismos.....	117
Tabla 2	Porcentaje de identidad y similitud del ORF PP0257 (FdhD) respecto a otros microorganismos.....	118
Tabla 3	Mineralización máxima de [ <sup>14</sup> C] formaldehído y [ <sup>14</sup> C] formato de la cepa silvestre KT2440 y los mutantes isogénicos PP0492 y PP0257.....	119
Tabla 4	Nivel de supervivencia a choques de HCOH 10 mM en la cepa parental y los mutantes en los distintos genes implicados en el metabolismo del HCOH.....	120
Tabla 5	Efecto de concentraciones elevadas de formaldehído en la fase de latencia y en el tiempo de duplicación de la fase exponencial.....	121



## **II. INTRODUCCIÓN**





## 1. FORMALDEHÍDO: síntesis, propiedades físico-químicas y toxicidad

El formaldehído (HCOH) es un gas inflamable, volátil, incoloro y muy soluble en agua. Posee un olor penetrante e irritante. Es un producto químico industrial importante cuya síntesis tiene lugar por oxidación del metanol. El formaldehído pertenece a la familia de los compuestos orgánicos volátiles o “VOCs” y se registra con el nombre de formaldehído o aldehído fórmico, como nombre químico adopta el de metanal; otros sinónimos o nombres comerciales que recibe son los de formalin, metilaldehido, oxometano, óxido de metileno, oximetilen, hidrato de formil, formol, fanoform, BFV, Formalith, Ivalon, Lysoform, Morbucid, Superlysoform, Tannosynt, Antverruc, Sandoval y Vobaderin.

Las soluciones acuosas comerciales contienen entre el 35 y el 55% de formaldehído, pero dado que tiende a polimerizarse, se estabilizan con metanol, hecho que provoca un aumento de su inflamabilidad. La solución acuosa de formaldehído al 37% se denomina formalina; ésta contiene además entre el 10 y el 15% (vol/vol) de alcohol metílico (metanol) para inhibir su polimerización a paraformaldehído (Coldiron *et al.*, 1983). Las propiedades físico-químicas básicas del formaldehído se recogen en la Tabla 1.

**Tabla 1. Propiedades físico-químicas del formaldehído.**

<b>Nº CAS</b>	50-00-0
<b>Fórmula empírica:</b>	CH <sub>2</sub> O
<b>Masa molecular relativa:</b>	30,03 g
<b>Densidad:</b>	0,8153 g/cm <sup>3</sup> (líquido a -20°C)
<b>Densidad relativa del gas:</b>	1,04
<b>Punto de ebullición:</b>	-19,2°C (sustancia pura)
<b>Punto de fusión:</b>	-92,0 -118,0°C
<b>Punto de inflamación:</b>	32-61°C (solución acuosa)
<b>Temperatura de ignición:</b>	300-430°C (solución acuosa)
<b>Límites de explosividad:</b>	7-73 % V
<b>Solvólisis:</b>	En agua se disuelve por completo, fácilmente soluble en éter, alcohol y otros solventes polares.
<b>Factores de conversión:</b>	1 mg/m <sup>3</sup> = 0,80 ppm 1 ppm = 1,25 mg/m <sup>3</sup>

La producción industrial de formaldehído es superior a 10 millones de toneladas anuales, de los cuales 3 millones se producen sólo en Europa. El formaldehído es considerado una de las materias primas más importantes y presenta múltiples aplicaciones, estos dos hechos justifican que alcance accidentalmente la biosfera y por ello se le califica como contaminante ubicuo (Fernández *et al.*, 1995; Uotila y Koivusalo, 1989). El formaldehído posee cinco aplicaciones industriales básicas:

- 1) Como materia prima en la producción de resinas de tipo urea-formaldehído y fenol-formaldehído (Stayner *et al.*, 1993).
- 2) Como materia prima en la producción de productos químicos industriales (Kirk y Othmer, 1980).
- 3) Como bactericida o fungicida.
- 4) Como componente en la formulación de artículos tipo cosméticos, champús y productos farmacéuticos.
- 5) Como fijador y conservante tisular. Su poder de fijación se basa en que reacciona con las proteínas produciendo entrecruzamientos entre las cadenas peptídicas o entre éstas y los grupos amino del ADN.

El formaldehído es también un producto de la combustión incompleta de combustibles fósiles como la gasolina y diesel; forma parte del humo del tabaco y de la quema de leña y, está presente en las emisiones gaseosas de las centrales termoeléctricas. Además, se puede producir por vía biológica en rutas de degradación de compuestos que contienen grupos metoxilos como la pectina y la lignina (Orita *et al.*, 2006), la demetilación oxidativa de aminoácidos y osmoprotectores o la oxidación de muchos compuestos de un solo carbono como el metanol, metilaldehídos y metano (Correia, 1995; Dahl *et al.*, 1983; Handler *et al.*, 1941; Jones *et al.*, 1978; Ling y Tung, 1948).

Cabe remarcar que el HCOH se considera un factor de riesgo laboral de tipo químico, y causa síntomas severos en humanos expuestos a elevadas concentraciones (Alexandersson *et al.*, 1982; Marsh, 1982; Olsen y Dossing 1982).

Las rutas primarias de la exposición humana potencial al formaldehído son inhalación, contacto cutáneo e ingestión. Los efectos comunes de la exposición a este aldehído son varios síntomas agudos, como vómitos, irritación de los ojos y edema pulmonar. También se puede manifestar irritación de garganta, vértigo, dolor abdominal, diarrea, daño renal, aparición de una neumonía secundaria, y, en casos extremos, colapso cardiovascular y acidosis metabólica. Hay suficientes pruebas sobre la carcinogenicidad del formaldehído en animales. Sin embargo, la Agencia Internacional para la Investigación del cáncer (IARC) limita la evidencia sobre su carcinogenicidad en humanos, (IARC, 1995), aunque se ha descrito que el formaldehído es un agente mutagénico que podría inducir la aparición de tumores en humanos (Grafstrom *et al.*, 1985; Craft *et al.*, 1987).

La toxicidad del formaldehído radica en su reactividad con los grupos amino y sulfhidrilo de las moléculas biológicas causando alquilación, mutaciones y entrecruzamientos que destruyen la función de membranas, proteínas y ácidos nucleicos (Heck *et al.*, 1990; Ma *et al.*, 1988), de este modo, en la célula, el formaldehído reacciona con las proteínas produciendo entrecruzamientos entre los distintos componentes celulares (Hayat, 1981). La formación de enlaces cruzados ADN-proteínas se suele utilizar como biomarcador de la exposición a formaldehído (Shaham *et al.*, 1996). En estudios *in vivo* se ha descrito que el formaldehído induce roturas de cadena sencilla en el ADN (Magaña-Schwencke *et al.*, 1978), transversiones de pares de bases AT a GC (Liber *et al.*, 1989) y deleciones (Le *et al.*, 1990). También se ha detectado la formación de micronúcleos en tejidos que han estado expuestos a formaldehído (Migliore *et al.*, 1989; Suruda *et al.*, 1993).

La presencia de formaldehído en aguas residuales procedentes de la síntesis química de distintos productos sintéticos es una causa importante de contaminación medioambiental (Adroer *et al.*, 1990). Entre los procesos más contaminantes se incluyen la fabricación de maderas de contrachapado y de moquetas basadas en materiales como resinas de fenol-formaldehído y resinas de *p*-tert-butifenol-formaldehído (Shinagawa *et al.*, 2008).

El formaldehído se ha considerado desde hace décadas como un excelente desinfectante y se ha empleado por sus propiedades para inactivar bacterias, hongos, levaduras, y mohos (Trujillo y Lindell, 1973). A elevadas concentraciones es un agente biocida potente y por ello se emplea en la inactivación selectiva de esporas de *Bacillus anthracis* y *Bacillus subtilis* en suelos y suspensiones líquidas (Manchee *et al.*, 1994; Sagripanti y Bonifacino, 1996). Los primeros estudios de Nelly (1963) revelaron que el formaldehído tenía actividad bacteriostática a concentraciones subletales debido a su capacidad para interrumpir el crecimiento y para interferir en la biosíntesis de metionina. De esta forma su aplicación se hace extensiva a la desinfección de tanques de aguas residuales, particularmente a pHs alcalinos (Sobsey *et al.*, 1974), la esterilización de laboratorios y superficies de trabajo (Taylor *et al.*, 1969), el control de contaminación microbiológica en industrias de maquinaria (Selvaraju *et al.*, 2005) y la desinfección en cámaras de seguridad microbiológica, procedimiento que se suele realizar después de efectuar operaciones como el cambio de filtros (Everall *et al.*, 1982). Por otro lado, es importante reseñar la existencia de casos de contaminaciones por formaldehído en peces globo de piscifactorías en las que se empleaba formaldehído para prevenir el crecimiento de lombrices parasitas (Shinagawa *et al.*, 2008).

En ciertos microorganismos el formaldehído es un subproducto del metabolismo de la histidina, colina y de compuestos químicos aromáticos metoxilados derivados de plantas como el vanilato, veratrato y cafeato (Mitsui *et al.*, 2000; Jiménez *et al.*, 2004). El HCOH se ha detectado además como un subproducto del metabolismo de ciertos compuestos xenobióticos como el explosivo hexahidro-1,3,5-triazina (RDX) (Fournier *et al.*, 2004), el glifosato (N-fosfometilglicina) (Shinabarger y Braymer, 1986), la atropina (Long *et al.*, 1997) y la metanamina (Musher y Griffith, 1974).

El carácter contaminante y tóxico del formaldehído hace que sea de interés la búsqueda de herramientas biotecnológicas para su eliminación, por ejemplo “mediante el uso de bacterias capaces de mineralizarlo”.

## 2. El género *Pseudomonas*: Clasificación y taxonomía

Las bacterias del género *Pseudomonas* se consideran habitantes ubicuos del medio ambiente, ya que es posible encontrarlas en todo tipo de suelos y aguas de distintas latitudes. Éste género lo describió por primera vez en 1894 W. Migula como “Células con órganos polares para su movilidad. Algunas especies forman esporas, aunque en general es un evento anómalo”. En 1986 Palleroni, propuso cinco grupos taxonómicos dentro de éste género basándose en análisis de hibridación ADN-ADN. Posteriormente la secuenciación de los genes que codifican los ARNr 16S confirmó la diversidad entre los miembros de estos grupos, y el grupo I del ARNr se consideró que correspondía al de las verdaderas *Pseudomonas*, motivo por el cual hubo que reclasificar cepas de otros grupos en nuevos géneros bacterianos. Dentro del grupo de las *Pseudomonas* “verdaderas” se incluyen las especies *P. aeruginosa*, *P. fluorescens*, *P. stutzeri* y *P. putida* entre otras (Palleroni y Moore, 2004). Aunque hay más de 200 especies agrupadas en este género, sólo se conocen tres que operen como oportunistas o patógenas para el hombre: *P. aeruginosa*, *P. mallei* y *P. pseudomallei* (estas dos últimas cepas se han reclasificado dentro del género *Burkholderia*). Por otro lado hay que destacar la existencia de especies patógenas de plantas como *P. syringae*. Sin duda alguna el grupo de cepas de mayor interés para aplicaciones medioambientales a día de hoy son las cepas que estimulan el crecimiento de plantas como *P. fluorescens* (Lugtenberg, 1999). La clasificación taxonómica actual del género *Pseudomonas* es la siguiente:

Reino: Bacteria

Filo: Proteobacteria

Clase: Gamma Proteobacteria

Orden: Pseudomonadales

Familia: Pseudomonadaceae

Género: ***Pseudomonas***

Las estirpes del género *Pseudomonas*, son bacilos, rectos o ligeramente curvados (0,5-0,8  $\mu\text{m}$  x 1-3  $\mu\text{m}$ ), gram negativos, quimiorganotróficos y aerobios estrictos, aunque se han descrito *Pseudomonas* que pueden utilizar el nitrato como aceptor de electrones (Hassett *et al.*, 2002). La ubicuidad de estas bacterias y la capacidad para crecer en medios de cultivo muy simples han hecho que se las considere protagonistas en el proceso de mineralización de materia orgánica en el medioambiente, un papel que fué ya demostrado a principios del siglo pasado por den Dooren de Jong (1926). Son móviles, con flagelos, generalmente polares, aunque se han descrito algunas cepas que poseen flagelos laterales (Palleroni, 1984).

El género *Pseudomonas* incluye bacterias saprofitas del suelo y del agua, que intervienen en los ciclos del carbono y del nitrógeno. Gracias a su gran versatilidad metabólica son capaces de asimilar distintas fuentes de carbono, rasgo que subraya la gran utilidad de algunas estirpes en la biodegradación de xenobióticos (Gibson *et al.*, 1984; Ramos *et al.*, 1994, Timmis *et al.*, 1988; Parales y Haddock, 2004).

Las *Pseudomonas* son generalmente oxidasa positivos, catalasa positivos y metabolizan la glucosa mediante la ruta de Entner-Doudoroff y el ciclo de los ácidos tricarbóxicos (Phibbs *et al.*, 1970, 1978; del Castillo *et al.*, 2007). Dentro de este género no se han descrito especies termófilas ni acidófilas, aunque si algunas especies psicrófilas.

En el género *Pseudomonas* se han definido estirpes que sintetizan sideróforos, particularmente cuando se cultivan en condiciones limitantes de hierro. Estos pigmentos, de color amarillo-verdoso, son fluorescentes bajo longitudes de onda corta (254 nm) y son conocidos como pioverdinas y piocianinas. Este tipo de compuestos son característicos de la mayoría de cepas de *P. aeruginosa*, *P. putida* y *P. fluorescens*.

Los integrantes del género *Pseudomonas* no forman esporas ni fermentan azúcares. El contenido en G+C del genoma oscila entre el 58 y el 69%. La mayoría de las cepas son resistentes a la penicilina y a muchos antibióticos beta-lactámicos, aunque algunas son sensibles a piperacilina, imipenem, tobramicina, o ciprofloxacina (Ryan y Ray, 2004).

Un rasgo común entre los miembros del género es la presencia de plásmidos que le confieren resistencia a antibióticos y agentes antibacterianos. Se han identificado 13 grupos de plásmidos compatibles en *Pseudomonas*. (Greated *et al.*, 2002; Levchuck *et al.*, 2006). En el grupo IncP-1 es frecuente encontrar plásmidos denominados de amplio espectro de hospedador, que se pueden transferir a otras especies de bacterias gram negativas, mientras que el grupo IncP-2, contiene más de la mitad de los plásmidos transmisibles sólo entre especies de *Pseudomonas*. En este grupo se encuentran los plásmidos de mayor tamaño, superando algunos las 300 kb. Estos plásmidos suelen conferir resistencia a antibióticos y compuestos químicos como mercurio y boro, o incluso resistencia a telurito. Dentro del grupo de plásmidos IncP-9 se han identificado un conjunto numeroso de plásmidos catabólicos que contribuyen significativamente a la diversidad nutricional del género (Greated *et al.*, 2002; Levchuck *et al.*, 2006).

Las especies del género *Pseudomonas* poseen unos requisitos nutricionales sencillos, rasgo que les permite ser cultivadas en el laboratorio 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. Por otro lado, se ha confirmado por medio de la aplicación de medios químicamente definidos con compuestos orgánicos simples, que una de las cualidades más notables de los miembros de este género es su versatilidad nutricional (den Dooren de Jong, 1926; Palleroni, 1986; Stainer *et al.*, 1966).

Dentro de los compuestos orgánicos empleados como fuentes de carbono y energía por muchas especies de *Pseudomonas* se encuentran hidrocarburos lineales y aromáticos, ácidos alifáticos, aminas, amidas, aminoácidos, alcoholes y compuestos aromáticos. El potencial catabólico de los miembros de este género se ha visto corroborado por la existencia de una amplia batería de rutas y enzimas catabólicos codificados por sus genomas (Jiménez *et al.*, 2002; Nelson *et al.*, 2002).



La reciente secuenciación del genoma de seis especies diferentes de *Pseudomonas* ha abierto nuevos frentes para entender la singular capacidad adaptativa de este género oportunista con importantes repercusiones tanto en el ámbito ecológico-agronómico como en el clínico. Los genomas recientemente descritos son los de las bacterias patógenas oportunistas como *P. aeruginosa* PAO1 (Stover *et al.*, 2000) y *P. entomophila* L48 (Vodovar *et al.*, 2006); dos especies patógenas de vegetales como *P. syringae* pv. tomato DC3000 (Buell *et al.*, 2003) y *P. syringae* pv. *syringae* B728a (Feil *et al.*, 2005), y tres bacterias inocuas como *P. putida* KT2440 (Nelson *et al.*, 2002), *P. fluorescens* Pf-5 (Paulsen *et al.*, 2006), y *P. putida* W619 (van der Lelie, 2009 pendiente de publicación, <http://genome.jgi-psf.org/psepw/psepw.home.html>). Un rasgo común entre estas especies es el gran tamaño de sus genomas (entre 6 y 7 x 10<sup>6</sup> pb), con unos 5500 genes por genoma. El análisis comparativo de estos genomas sugiere que estas especies comparten un conjunto de 2000 genes del total que los conforman. La función de cerca de la mitad de los genes es desconocida, por otro lado podemos destacar la presencia de un amplio conjunto de genes implicados en sistemas de transporte (más de 300) y porinas, y una elevada proporción de genes reguladores, por ejemplo en *P. putida* KT2440 450 ORF (ORF del inglés open reading frame, marco abierto de lectura) codifican reguladores transcripcionales, con 24 factores sigmas, 19 de ellos de tipo ECF (del inglés *extracytoplasmic function*) y 55 sensores de sistemas de dos componentes (Nelson *et al.*, 2002; Martínez-Bueno *et al.*, 2002). Todas estas características explican la singular ubicuidad de estas especies y reflejan la capacidad de integración de señales y de adaptación a cambios ambientales que presentan estos microorganismos.

La mayoría de los miembros de este género poseen un gran número genes que codifican mono y dioxigenasas que son de interés para fabricación de compuestos de valor añadido en procesos industriales (Hüsken *et al.*, 2001 y 2002; Rojas *et al.*, 2004; Neumann *et al.*, 2005). Algunas *Pseudomonas* del suelo sintetizan productos tóxicos para otros microorganismos o son capaces de quelar hierro, características que las hacen útiles en procesos de biocontrol (Shoda, 2000; Walsh *et al.*, 2001, Kiely *et al.*, 2006).

La comparación genómica entre cepas patógenas y cepas inocuas indica que las cepas no virulentas no portan los genes que codifican exotoxinas, enzimas hidrolíticas específicas y sistemas de secreción tipo III. Por otro lado hay que destacar que las cepas virulentas y no virulentas comparten otras propiedades como adhesión y biosíntesis de polímero, pili tipo IV, adhesinas, proteínas relacionadas con estrés, etc. (Nelson *et al.*, 2002). En la Tabla 2 se muestran algunos rasgos generales de genomas de distintas especies de *Pseudomonas*.

**Tabla 2. Características generales de genomas de especies representativas del género *Pseudomonas*.**

Característica	<i>Pe</i>	<i>Pp</i>	<i>Pf</i>	<i>Pa</i>	<i>Pst</i>
Tamaño (Mb)	5,9	6,2	7,1	6,3	6,4
GC (%)	64,2	61,6	63,3	66,6	58,4
Número de CDS	5169	5420	6144	5570	5615
Capacidad codificante (%)	89,1	87,7	88,8	89	86,8
Operones de ARNr	7	7	5	4	5
ARNt	78	74	71	63	63
Proteínas con función conocida (%)	67,1	65,8	62,2	54,2	61
Proteínas con función desconocida					
Proteínas hipotéticas conservadas (%)	25,3	19,1	32,5	13,8	17
Proteínas hipotéticas (%)	7,5	15,1	5,3	31,9	22

Características generales de los genomas de *P. entomophila* L48A (*Pe*), *P. putida* (*Pp*), *P. fluorescens* Pf-5 (*Pf*), *P. aeruginosa* PAO1 (*Pa*) y *P. syringae* pv. tomato DC3000. Obtenido de Vodovar *et al.*, 2006.

Existe un gran interés en explotar las características de estas bacterias por sus posibles aplicaciones en biotecnología, en biorremediación de lugares contaminados (Dejonghe *et al.*, 2001; Timmis *et al.*, 1994), para mejorar la calidad de combustibles (Galán *et al.*, 2000), para la producción de bioplásticos (Olivera *et al.*, 2001) y en procesos de biocontrol; como agentes promotores del crecimiento de plantas o en el control de plagas en plantas (Walsh *et al.*, 2001).

## 2.1. *Pseudomonas putida*

*Pseudomonas putida* pertenece al grupo de las *Pseudomonas* “fluorescentes”, denominadas así por su capacidad para producir pigmentos que emiten fluorescencia. Son bacterias quimiorganotróficas, con un metabolismo muy versátil y son capaces de adaptar su forma de vida a hábitats muy diferentes. Estas bacterias se han aislado a partir de suelos; tanto naturales, como agrícolas y suelos industriales contaminados, así como de aguas continentales. Esta especie bacteriana es capaz de colonizar la rizosfera de plantas y, además, posee un gran potencial biorremediador de suelos contaminados, factores que la han hecho susceptible de ser objeto de estudio para el desarrollo de nuevos biopesticidas y agentes de biorremediación (Espinosa-Urgel *et al.*, 2002; Segura *et al.*, 2009).

La cepa *P. putida* KT2440 empleada en este trabajo deriva de la cepa *P. putida* mt-2. Los primeros estudios de esta cepa se remontan al año 1963 en Japón, donde fue aislada por el grupo de Hosakawa (Nozaki *et al.*, 1963). Se identificó como una cepa capaz de degradar *meta*-toluato, de donde derivó la designación mt-2. La estirpe fue inicialmente clasificada como *Pseudomonas arvilla* y no fue hasta 1974 cuando se ubicó dentro de la especie *Pseudomonas putida* (Williams y Murray, 1974). En 1975, Worsey y Williams observaron que la cepa mt-2 portaba el plásmido TOL (pWW0), el cual contiene los genes que codifican las enzimas necesarias para la degradación de toluenos y xilenos (Worsey y Williams, 1975).

La cepa *Pseudomonas putida* KT2440 se describió en 1981 (Bagdasarian *et al.*, 1981) como un derivado de mt-2 curado del plásmido pWW0 y presuntamente deficiente en el mecanismo de restricción de ADN exógeno. La cepa se ha utilizado en la expansión de rutas catabólicas con fines degradativos (Bagdasarian y Timmis, 1982; Ramos *et al.*, 1994) y como hospedador en la clonación y expresión de genes heterólogos para su utilización en procesos de biotransformación de compuestos químicos con valor añadido (Delgado *et al.*, 1992; Kraak *et al.*, 1997; Kellerhals *et al.*, 1999) o de interés farmacológico (Tan *et al.*, 1997).

El genoma de *P. putida* KT2440, secuenciado por Nelson *et al.* (2002), consta de un único cromosoma de 6,18 Mb, que presenta un contenido en G+C del 61,6%. No obstante, hay que mencionar que existen 105 islas genómicas con un contenido distinto en G+C (Weinel *et al.*, 2002). Estas islas genómicas están principalmente implicadas en procesos como el transporte y degradación de compuestos orgánicos, el transporte de iones y la síntesis y secreción de metabolitos secundarios. La versatilidad metabólica de las cepas de *P. putida* se encuentra frecuentemente ligada a plásmidos que contienen genes cuyos productos se encargan de canalizar distintos sustratos hacia el metabolismo central. Por ejemplo, el plásmido TOL (Williams & Murray, 1974), el plásmido NAH7 (Dunn & Gunsalus, 1973) y el plásmido CAM (Rheinwald *et al.*, 1973), los cuales portan los genes implicados en el catabolismo de toluenos/xilenos, naftaleno y alcanfor, respectivamente.

Hay varios aspectos que favorecen el espectro nutricional de KT2440 y le permiten reproducirse en distintos ambientes y metabolizar una amplia gama de compuestos naturales y sintéticos. Así el genoma de *P. putida* codifica un gran número de transportadores de compuestos aromáticos (dos Santos *et al.*, 2005); y un gran número de rutas de degradación de distintos compuestos orgánicos, entre los que se incluyen productos naturales como los derivados de la degradación de la lignina, que constituyen una importante fuente de carbono para organismos asociados a la rizosfera (Jiménez *et al.*, 2002) o xenobióticos como nitroaromáticos (Van Dillewijn *et al.*, 2008).

La anotación inicial del cromosoma de KT2440 proponía 5.420 marcos abiertos de lectura, de éstos 80 aparecen truncados o alterados como consecuencia de la inserción de transposones o elementos móviles. A su vez, se han identificado 804 copias de un elemento específico de 35 pb conocido como REP (Aranda *et al.*, 2002). Se trata de un palíndromo con una orientación definida cabeza-cola cuya función se desconoce hasta la fecha actual.

Por otro lado también se han identificado 184 genes que codifican proteínas relacionadas con elementos móviles, 82 genes que codifican transposasas, 8 intrones de grupo II y tres genomas de bacteriófagos. De los 5.420 marcos abiertos de lectura predichos, 600 aparecen anotados como proteínas hipotéticas o proteínas de función desconocida, aunque cabe destacar que en muchos casos puede tratarse de artefactos producto de los algoritmos utilizados en la predicción de genes (dos Santos *et al.*, 2005).

Aproximadamente el 12% del genoma codifica sistemas de transporte, como por ejemplo, los transportadores de tipo ABC que constituyen la principal familia de transportadores presentes en KT2440. Además, esta cepa es capaz de protegerse frente a compuestos tóxicos exportándolos a través de bombas de extrusión como las bombas RND (del inglés, *RESISTANCE, NODULATION, CELL DIVISION*) y los transportadores MFS (Ramos *et al.*, 2002). Igualmente se han identificado genes que codifican mono- y dioxigenasas, oxidorreductasas, ferredoxinas, citocromos, deshidrogenasas, proteínas del metabolismo del azufre y glutathion-S-transferasas, factores sigmas alternativos, reguladores y sistemas de respuesta a estrés (Nelson *et al.*, 2002). En el genoma de KT2440 además se han propuesto 330 genes asociados a la biosíntesis y degradación de componentes de la superficie celular, genes involucrados en la interacción planta-bacteria en la rizosfera, genes implicados en la biogénesis de fimbrias tipo IV y al menos cuatro operones que participan en la biosíntesis del flagelo (Rodríguez-Herva *et al.*, 2009), de fibras rizadas y pili tipo I. Todos estos rasgos genéticos le confieren la capacidad de adherirse a distintos tipos de superficies (Espinosa-Urgel *et al.*, 2002).

### 3. Metabolismo del formaldehído

Ya que el formaldehído se produce naturalmente, los microorganismos han desarrollado diferentes mecanismos para contrarrestar su toxicidad. Estos mecanismos implican su fijación a través de un conjunto de rutas metabólicas, y su detoxificación a través de su oxidación a formiato y  $\text{CO}_2$ .

Las bacterias metilotrofas aerobias son capaces de usar compuestos reducidos de un solo carbono como sustrato de crecimiento, entre estos compuestos se encuentran el metanol, metano, metanosulfonato y otros sulfuros metilados y metil aminas (Figura 1), y los hidrocarburos halogenados clorometano, bromometano y diclorometano. Estas bacterias se han adscrito tanto a las  $\alpha$ ,  $\beta$  como  $\gamma$ -proteobacterias y al grupo de bacterias gram positivas. Un rasgo esencial del metabolismo de las bacterias metilotrofas es que el flujo de carbono procede del intermediario central formaldehído (Figura 1), el cual es altamente tóxico debido a su reactividad no específica con proteínas y ácidos nucleicos, como se ha descrito anteriormente.

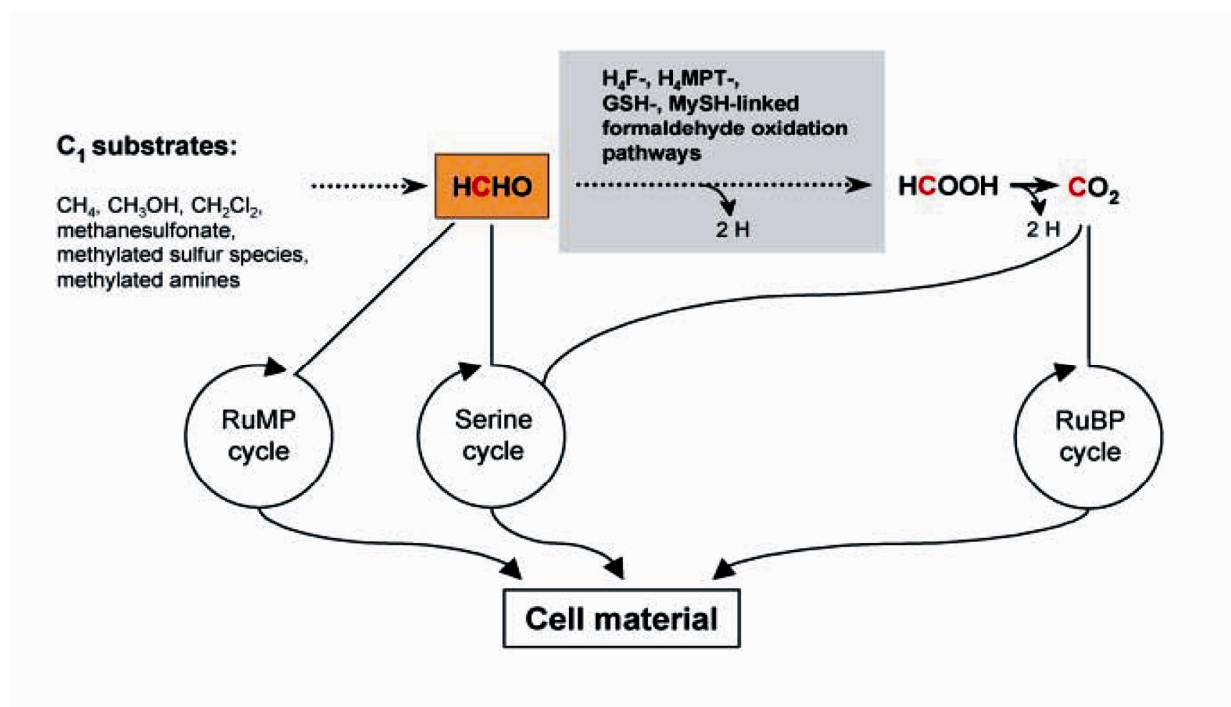


Figura 1. Papel central del formaldehído en el metabolismo de bacterias metilotrofas aerobias. Obtenido de Vorholt *et al.*, 2002.

Un reto clave para estos organismos es conseguir maximizar el flujo de formaldehído para, a la vez prevenir su acumulación intracelular por encima de niveles tóxicos (Marx *et al.*, 2003). Se ha descrito en metilotrofos típicos que si se detiene el metabolismo del formaldehído totalmente, la concentración de formaldehído citoplasmático puede alcanzar una concentración de hasta 100 mM (Attwood y Quayle, 1984; Lindstrom, 2001).

Dependiendo de la cepa bacteriana el formaldehído formado durante el crecimiento en presencia de compuestos tipo C<sub>1</sub> reducidos está implicado en la asimilación de carbono, en el metabolismo energético o en ambos (Figura 1). Por ejemplo, en organismos metilotrofos el formaldehído formado durante la oxidación del metanol puede ser asimilado y entrar a formar parte de los esqueletos carbonados de la célula empleando la ruta de las serinas o el ciclo ribulosa monofosfato, o bien puede ser oxidado a formato para obtener energía por medio de la formaldehído deshidrogenasa (Anthony, 1982; Hanson y Hanson, 1996). El papel del formaldehído como intermediario central metabólico en estos microorganismos se ve reflejado en la gran variedad de enzimas oxidantes de formaldehído identificadas en este grupo microbiano (Zahn *et al.*, 2001).

Atendiendo a la naturaleza del aceptor de electrones, las enzimas capaces de oxidar formaldehído pueden dividirse en dos grupos: las dependientes de NAD(P)<sup>+</sup> y las dependientes de otros cofactores. Entre las enzimas que utilizan NAD(P)<sup>+</sup> como aceptor de electrones se distinguen varias clases en función del tipo de cofactor secundario empleado en la reacción de oxidación. Entre éstos se distinguen los compuestos tipo tiol, tetrahidrofolato y metilen tetrahidrometanopterinina (Attwood, 1990; Chistoserdova *et al.*, 1998; Johnson *et al.*, 1964; Marison *et al.*, 1980; Marison *et al.*, 1982; Speer y Lidstrom, 1994; Stirling y Dalton, 1978; Tate y Dalton, 1999; Vorholt *et al.*, 1998; Vorholt *et al.*, 1999).

El metabolismo del formaldehído tiene lugar en el periplasma o en el citoplasma de la célula y existen diferentes mecanismos para llevar a cabo dicho proceso, éstos son más o menos complejos y suelen estar implicados en la generación de equivalentes reducidos para la respiración aeróbica o implican la asimilación de este compuesto tipo C<sub>1</sub>. Las rutas descritas son:

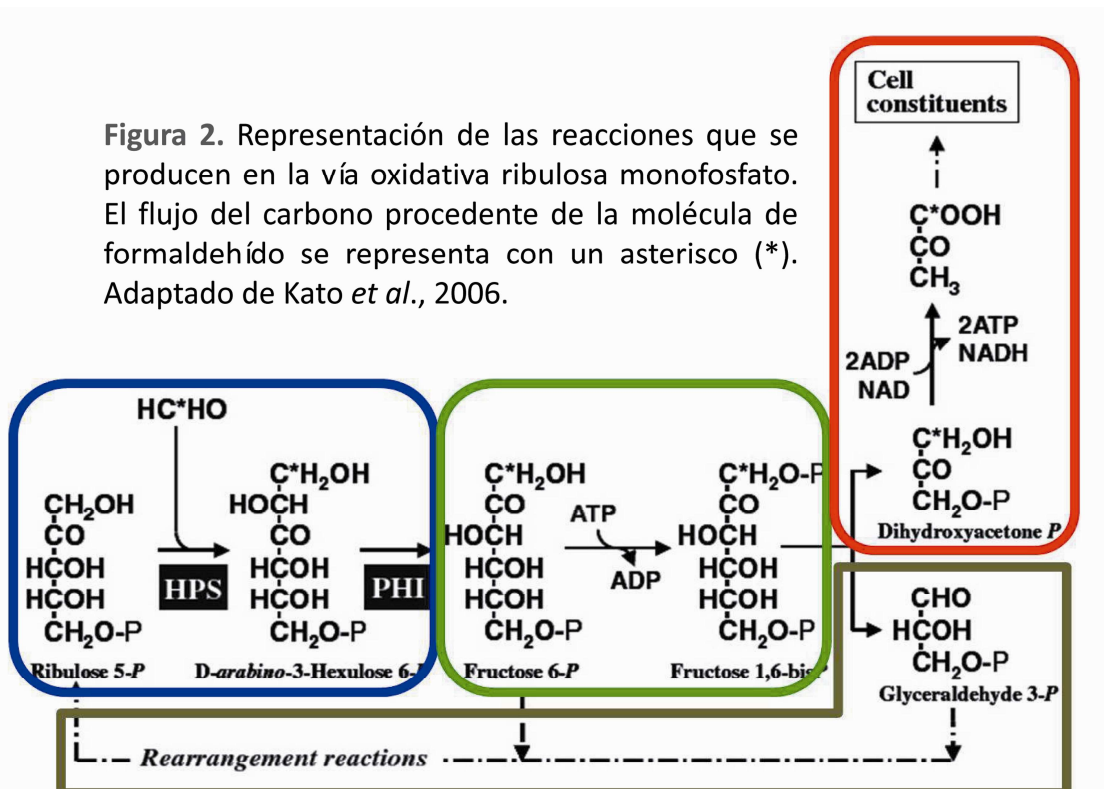
- 1. Ruta cíclica oxidativa de la ribulosa monofosfato (RuMP)**
- 2. Oxidación de formaldehído dependiente de tetrahidrofolato (H<sub>4</sub>F)**
- 3. Oxidación de formaldehído dependiente de tetrahidrometanopterin (H<sub>4</sub>MPT)**
- 4. Oxidación de formaldehído dependiente de tiol (micotiol-glutati6n)**
- 5. Oxidaci6n de formaldehído por formaldehído deshidrogenasa ligada a NAD<sup>+</sup>**

Todas estas rutas tienen en com6n, salvo en caso de la ruta RuMP y quiz6s tambi6n para la oxidaci6n de formaldehído dependiente de micotiol, que convergen en formato, que es despu6s oxidado a CO<sub>2</sub> por la formato deshidrogenasa. La oxidaci6n de formaldehído vía formaldehído deshidrogenasa ligada a NAD(P)<sup>+</sup> no suele ser espec6fica para el formaldehído y no se induce por metanol. Hace algunos a6os se purific6 una formaldehído deshidrogenasa independiente de glutati6n (DL-FalDH) asociada a membrana en *Methylococcus capsulatus* (Bath). La DL-FalDH es espec6fica de formaldehído y cumple un papel fisiol6gico importante en condiciones de concentraciones elevadas de cobre (Zahn *et al.*, 2001). Se ha descrito que la DL-FalDH requiere la presencia de una prote6na de bajo peso molecular llamada “modifina” para llevar a cabo la oxidaci6n del formaldehído (Tate y Dalton, 1999), pero se desconoce si el papel de esta deshidrogenasa es el detoxificar el formaldehído o participar en el metabolismo energ6tico del microorganismo.



### 3.1. Ruta cíclica oxidativa ribulosa monofosfato (RuMP)

La ruta de la ribulosa monofosfato para la fijación del formaldehído se ha descrito en un amplio abanico de bacterias que crecen en compuestos tipo  $C_1$  (Quayle y Ferenci, 1978), y recibe este nombre porque la primera transformación que se produce al comienzo de la misma es una reacción de condensación entre el formaldehído libre y un azúcar fosfato. Esta ruta asimilatoria para compuestos tipo  $C_1$  también se ha descrito en levaduras y recibe el nombre de la ruta de la xilulosa (Kato *et al.*, 2006). La ruta de la RuMP de bacterias metilotrofas puede dividirse en tres fases y tiene lugar conforme al esquema de reacciones mostrado en la Figura 2. Las dos primeras reacciones de esta ruta, la condensación de formaldehído con la ribulosa 5-fosfato y su ulterior isomerización a fructosa 6-fosfato, son exclusivas de la ruta y están catalizadas por las enzimas 3-hexulosa-6-fosfato sintasa (HPS) y 6-fosfo-3-hexuloisomerasa (PHI). Posteriormente se produce la fisión de la fructosa 6-fosfato para generar dos triosas fosfato, el gliceraldehído 3-fosfato (GAP) y la dihidroxiacetona fosfato (DHAP). En la última etapa de la ruta el GAP entra en diferentes reacciones de reorganización necesarias para regenerar ribulosa 5-fosfato, mientras que la DHAP entra en la ruta central para síntesis de constituyentes celulares.



Mitsui y colaboradores describieron en 2000 un conjunto de genes que codifican las enzimas de la ruta RuMP en la bacteria metilotrofa facultativa *Mycobacterium gastri* MB19. En esta bacteria los genes que codifican la PHI y la HPS, se han denominado *rmpB* y *rmpA*, respectivamente. Ambos genes forman un operón que se expresa en células cultivadas en metanol y metilamina. El gen *rmpR* codifica una proteína reguladora de unión a ADN que probablemente participa en la regulación de la transcripción del operon *rmpB-rmpA*. Por otro lado, Yasueda y colaboradores (1999) encontraron genes que codificaban las formas enzimáticamente activas de HPS y PHI en *Bacillus subtilis*, estos genes estaban anotados como *yckG* (HPS) y *yckF* (PHI) y se expresaban en presencia de formaldehído.

Chistoserdova y colaboradores describieron en 1998 la existencia de un conjunto de genes que codifican enzimas que permiten el metabolismo compuestos tipo C<sub>1</sub> en el cromosoma de *Methylobacterium extorquens* AM1. Una bacteria metilotrofa aerobia facultativa que posee la ruta de las serinas para la asimilación de formaldehído. Estas enzimas únicamente habían sido descritas antes en el metabolismo anaerobio de organismos acetogénicos y metanogénicos (Schwörer, *et al.*, 1993; Wolfe, 1991; Vorholt *et al.*, 1995).

Mitsui y colaboradores (2000) realizaron un análisis filogenético de las secuencias aminoacídicas de las proteínas HPS y PHI de bacterias y arqueas e identificaron tres agrupaciones distintas para cada proteína. Su estudio reveló que el grupo 1 de HPS y el grupo 1 de PHI, estaban constituidos por proteínas de microorganismos metanógenicos como *Methanobacterium thermoautotrophicum* ΔH y *Methanococcus jannaschii*, acetogénicas como *Archaeoglobus fulgidus* e hipertermófilas como *Pyrococcus horikoshii*, mientras que en el grupo II se agrupaban proteínas de bacterias gram positivas y en el grupo III tanto bacterias gram positivas como gram negativas (material suplementario de la introducción figura 1).

### 3.2. Oxidación de formaldehído dependiente de tetrahidrofolato ( $H_4F$ )

La conversión de copuestos tipo  $C_1$  por enzimas con tetrahidrofolato ( $H_4F$ ) es muy importante para todos los microorganismos, ya que son utilizados para distintos procesos biosintéticos esenciales como la síntesis de purinas y pirimidinas (Vorholt, 2002). Las enzimas dependientes de  $H_4F$  se expresan generalmente a bajos niveles para equilibrar el número de reacciones biosintéticas, pero en el caso de las bacterias metilótrofas que utilizan la ruta de las serinas para la asimilación de carbono, los niveles de dichas enzimas se inducen durante el crecimiento en metanol y metilamina (Marison y Attwood, 1982).

El esquema de reacciones que se producen durante la oxidación de formaldehído dependiente de  $H_4F$  se presentan en la Figura 3A, esta ruta se inicia con la condensación espontánea de  $H_4F$  y formaldehído para rendir  $N^5-N^{10}$  metileno  $H_4F$ , el cual o bien se condensa con glicina para producir serina, o bien se oxida a metenil- $H_4F$  por medio de la metileno- $H_4F$  deshidrogenasa específica de NADP, (MtdA) (Figura 3A). Posteriormente el metenil  $H_4F$  se hidroliza por medio de la metenil- $H_4F$  ciclohidrolasa (Fch) a formil- $H_4F$ , que es entonces oxidado a formato mediante la acción de la formil- $H_4F$  sintetasa (FtfL). Finalmente el formato se oxida a  $CO_2$  a través de la formato deshidrogenasa (FDH) (Laukel *et al.*, 2003).

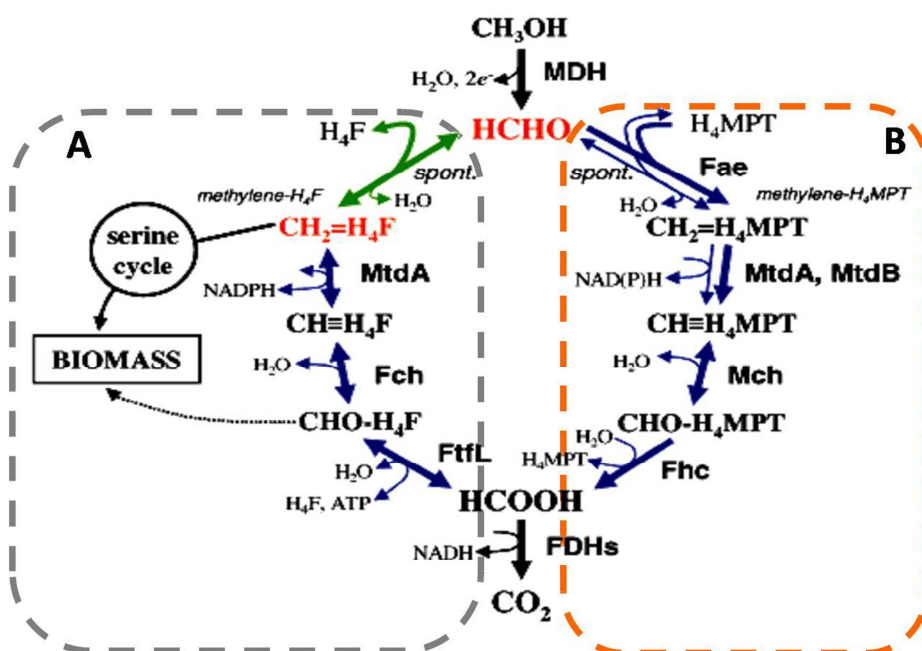


Figura 3. Metabolismo del formaldehído en *M. extorquens* AM1.

Representación de las rutas para la conversión del formaldehído dependientes de  $H_4MPT$  y  $H_4F$ . Adaptado de Marx *et al.*, 2005.

### 3.3. Oxidación de formaldehído dependiente de tetrahidrometanopterin (H<sub>4</sub>MPT)

Las reacciones dependientes de tetrahidrometanopterin (H<sub>4</sub>MPT) fueron descubiertas en arqueas metanogénicas sulfato-reductoras y se pensaba que solo ocurrían en el grupo de los microorganismos anaerobios estrictos donde forman parte de la ruta para el metabolismo energético (Thauer, 1998). Análisis de la distribución de las enzimas dependientes de H<sub>4</sub>MPT han revelado que estas enzimas están presentes en todas las proteobacterias metilótrofas descritas que asimilan formaldehído por la ruta de las serinas o de la ribulosa monofosfato y también en la cepa autotrófica *Xanthobacter* (Vorholt *et al.*, 1999). Una de las enzimas que participan en la ruta, la H<sub>4</sub>MPT-ciclohidrolasa (Mch), está evolutivamente relacionada con la Mch de arqueas metanogénicas sulfato-reductoras, habiéndose sugerido que las bacterias metilótrofas han adquirido las enzimas dependientes de H<sub>4</sub>MPT por transferencia horizontal de genes de una arquea ancestral (Vorholt *et al.*, 1999).

La oxidación de HCOH dependiente de H<sub>4</sub>MPT se inicia con la condensación de formaldehído con el cofactor pterina para formar N<sup>5</sup>, N<sup>10</sup>-metilen-H<sub>4</sub>MPT (Figura 3B). Aunque esta reacción de condensación se produce de forma espontánea, se ha descrito una enzima, la enzima activadora de formaldehído (Fae), que es necesaria para el crecimiento metilótrófico de estos microorganismos y acelera la reacción de condensación (Vorholt *et al.*, 2000; Marx *et al.*, 2003 (a y b)). El N<sup>5</sup>, N<sup>10</sup>-metilen-H<sub>4</sub>MPT es oxidado a N<sup>5</sup>, N<sup>4</sup>-metenil-H<sub>4</sub>MPT<sup>+</sup> a través de la acción de una o dos metilen-H<sub>4</sub>MPT deshidrogenasas. Luego el N<sup>5</sup>, N<sup>4</sup> metenil-H<sub>4</sub>MPT<sup>+</sup> se hidroliza a N<sup>5</sup>-formil-H<sub>4</sub>MPT mediante la H<sub>4</sub>MPT-ciclohidrolasa (Mch) y éste se transforma a formato por medio del complejo formiltransferasa/hidrolasa (Fhc). En el último paso del ciclo, al igual que en vía oxidativa anterior, el formato es oxidado a CO<sub>2</sub> por medio de la formato deshidrogenasa.

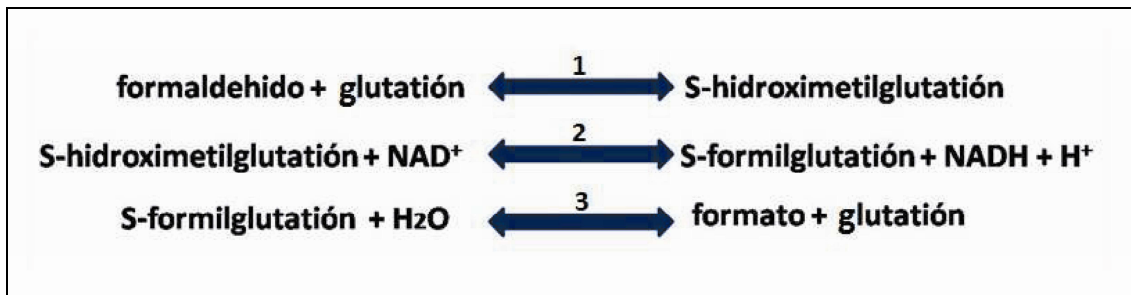
En *M. extorquens* AM1 se han descrito dos metilen-H<sub>4</sub>MPT deshidrogenasas dependientes de distintos nucleótidos piridin. Una es la metilen-H<sub>4</sub>MPT deshidrogenasa que utiliza exclusivamente NADP<sup>+</sup> y se denomina MtdA. La otra es una metilen-H<sub>4</sub>MPT deshidrogenasa dependiente de NAD(P)<sup>+</sup> denominada MtdB, que es específica para el metilen-H<sub>4</sub>MPT, pero puede emplear como aceptor de electrones tanto NAD<sup>+</sup> como NADP<sup>+</sup> (Hagemeyer *et al.*, 2000).

### **3.4. Oxidación de formaldehído dependiente de tiol (micotiol-glutati3n).**

La oxidaci3n de HCOH ligada a glutati3n (GSH) es el sistema enzimático de conversi3n de formaldehído más extendido, ya que se ha descrito en bacterias (metilotrofas y no metilotrofas), mamíferos, plantas y levaduras, donde tienen un papel general en la detoxificaci3n de HCOH (Gutheil *et al.*, 1997).

La conversi3n de formaldehído dependiente de glutati3n comienza con una reacci3n espontánea del formaldehído con el glutati3n para rendir el hemiacetal S-hidroxiometilglutati3n (Figura 4 (1)). No se ha descrito la existencia de ninguna enzima que participe en esta reacci3n. No obstante en *P. denitrificans* se ha identificado una enzima, la enzima activadora de formaldehído dependiente de GSH (Gfa) que acelera la reacci3n espontánea de condensaci3n (Goenrinch *et al.*, 2002).

El hemiacetal S-hidroxiometilglutati3n se hidroliza por la acci3n de la formaldehído deshidrogenasa dependiente de glutati3n (FALDH) a S-formilglutati3n, en una reacci3n dependiente de NAD<sup>+</sup> (Figura 4 (2)). El S-formilglutati3n es a continuaci3n hidrolizado por la S-formilglutati3n hidrolasa (EC 3.1.2.12) a formato y glutati3n (Figura 4 (3)) (Uotila y Koivusalo, 1974).



**Figura 4.** Fases de oxidación del formaldehído a través de la formaldehído deshidrogenasa dependiente de glutatión (FALDH).

La FALDH pertenece a la familia de las alcohol deshidrogenasas de clase III dependientes de zinc. Esta enzima se ha caracterizado en *Paracoccus denitrificans* y en *Rhodococcus sphaeroides*, donde se induce en condiciones de crecimiento metilotrófico. Los estudios realizados hasta la fecha la implican en la conversión no asimilatoria de formaldehído a CO<sub>2</sub> (van Ophem y Duine, 1994; Ras *et al.*, 1995; Barbel *et al.*, 1996; Harms *et al.*, 1996; Barber y Donohue, 1998; Goenrinch *et al.*, 2002).

El glutatión es abundante en todo tipo de células eucariotas y procariotas (Meister, 1988) y, su concentración se ha estimado que puede ser de 0,1 mM a 10 mM, por lo que cabe esperar que la mayoría del formaldehído que se genera en la célula esté unido reversiblemente a GSH para formar S-hidroximetilglutatión.

Algunas bacterias gram positivas poseen otro tiol en lugar de glutatión, el llamado micotiol (MySH) (Spies y Steenkemp, 1994). Se ha descrito una formaldehído deshidrogenasa dependiente de NAD<sup>+</sup> y micotiol (MD-FalDH) en bacterias gram positivas metilotrofas como *Amycolatopsis methanolica* y *Rhodococcus erythropolis*, que también está implicada en la conversión no asimilatoria de formaldehído. Esta enzima no tiene actividad hidrolítica hacia el S-formil-micotiol (van Ophem *et al.*, 1992).

### 3.5. Oxidación de formaldehído por formaldehído deshidrogenasa dependiente de NAD<sup>+</sup>.

La oxidación de formaldehído a través de formaldehído deshidrogenasas dependientes del cofactor NAD<sup>+</sup>, se ha estudiado en numerosos organismos metanotrofos (Anthony, 1982; Johnson y Quayle, 1964; Patel *et al.*, 1980; Stirling, 1978), y en algunas bacterias metilotrofas. En bacterias metilotrofas generalmente cultivadas con compuestos C<sub>1</sub>, la actividad formaldehído deshidrogenasa dependiente de NAD<sup>+</sup> es baja o nula (Anthony, 1975, 1982, 1996; Attwood y Quayle, 1984; Attwood, 1990; Johnson y Quayle, 1964; Klein *et al.*, 1994; Marison y Attwood, 1980, 1982; Patel *et al.*, 1980), por lo que se considera que no juega un papel fisiológico significativo en el metabolismo del formaldehído. En contraste con las bacterias metilotrofas, la actividad formaldehído deshidrogenasa dependiente de NAD<sup>+</sup> de *Pseudomonas* sp. cepa RJ1 (Metha, 1975) y de *Hypomicrobium zaravarzinii* zv 580 (Klein *et al.*, 1994) es alta cuando las bacterias se cultivan en presencia de compuestos de tipo C<sub>1</sub> y presentan una actividad óptima con formaldehído.

Ando y colaboradores describieron en 1979 que la formaldehído deshidrogenasa dependiente de NAD<sup>+</sup> de la cepa *P. putida* C-83 era un enzima capaz de catalizar la oxidación irreversible de formaldehído a formato sin adición externa de glutatión, pero requería NAD<sup>+</sup> como aceptor de electrones. Tras el primer paso de oxidación, el formato, al igual que en muchas de las rutas anteriores, es oxidado a CO<sub>2</sub> a través de la formato deshidrogenasa (Adroer *et al.*, 1990). Tanto esta ruta como las enzimas implicadas en la misma serán detalladas en el próximo apartado por ser ésta la ruta de oxidación de formaldehído existente en *Pseudomonas putida* KT2440, la cepa en estudio del presente trabajo.

#### 4. Metabolismo del formaldehído en *Pseudomonas putida*

Las bacterias del género *Pseudomonas* se encuentran dentro del grupo de microorganismos capaces de metabolizar formaldehído a través de la formaldehído deshidrogenasa. Se han descrito varios tipos de formaldehído deshidrogenasa dentro de este género:

1) Formaldehído deshidrogenasa de *Pseudomonas methanica*, es una enzima dependiente de  $\text{NAD}^+$  y glutatión (GSH) (Johnson y Quayle, 1964).

2) Aldehído deshidrogenasa de *Pseudomonas* sp. AM1, *Pseudomonas* sp. RJ1, *P. extorquens*, y *P. methanica*, en este caso las enzimas son inespecíficas e independientes de  $\text{NAD}^+$ , y funcionan con diclorofenol indofenol (DCPIP) como aceptor de electrones (Johnson y Quayle, 1964, Metha, 1974).

3) La formaldehído deshidrogenasa de *Pseudomonas putida* C-83, es un enzima dependiente de  $\text{NAD}^+$  que no requiere la adición externa de GSH. Esta enzima se inhibe por  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Pd}^{2+}$ ,  $\text{Hg}^{2+}$ , *p*-cloromercuribenzoato y es activa frente a formaldehído, acetaldehído, propionaldehído, glioxal y piruvaldehído (Ando *et al.*, 1979). Este mismo tipo de formaldehído deshidrogenasa fue descrita anteriormente en *Pseudomonas* sp. MS por Kung y Wagner (1970). Esta bacteria podía crecer en compuesto tipo  $\text{C}_1$  como metilamina, dimetilamina y trimetilamina, y aunque ni el formaldehído ni el formato eran capaces de soportar su crecimiento, los oxidaba rápidamente. Además los autores señalaron la presencia de otra enzima, la metilamina oxidasa, que oxidaba la metilamina a  $\text{CO}_2$  en ausencia de un aceptor de electrones.

Goldberg y Mateles describieron en 1975 que *Pseudomonas* C utilizaba metanol, formaldehído y formato como única fuente de carbono. Esta bacteria poseía la facultad de emplear diferentes rutas asimilatorias de carbono en función del sustrato de crecimiento. Así, utilizaba la ruta de la alulosa (ciclo de la ribosa fosfato) y la ruta de las serinas para la fijación de formaldehído y carbono, respectivamente.



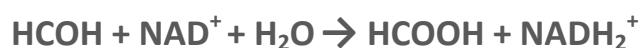
Cuando *Pseudomonas C* se cultivaba en metanol se detectaba actividad hexosa fosfato sintetasa, indicando la presencia de la ruta de la alulosa para la asimilación de carbono; mientras que si las células se cultivaban con formaldehído o formato como única fuente de carbono se detectaba actividad glicerato deshidrogenasa (dependiente de NADH), que implicaba a la ruta de las serinas para la asimilación de estos compuestos. Por otro lado, cuando *Pseudomonas C* era cultivada con metanol y formaldehído, o metanol y formato la asimilación de carbono parecía producirse a través de la ruta de la alulosa. En conjunto estos resultados parecen indicar que el metanol induce la síntesis de hexosa fosfato sintetasa (alulosa) y reprime la síntesis de glicerato deshidrogenasa en esta bacteria.

Kato y colaboradores describieron en 1984 una cepa de *Pseudomonas putida*, denominada F61, que catalizaba la conversión de formaldehído a metanol y ácido fórmico. Esta enzima se denominó formaldehído dismutasa y era capaz de realizar la dismutación estequiométrica del formaldehído, reacción conocida como “reacción de Cannizaro”.

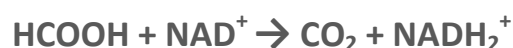
Por otro lado, Adroer y colaboradores describieron en 1990 que *Pseudomonas putida* A2 tenía la capacidad del dismutar formaldehído y emplear los productos de su degradación (metanol y ácido fórmico) como fuente de carbono. Esta actividad se atribuyó a la presencia de una formaldehído dismutasa que se expresaba de forma constitutiva y no requería la adición de ningún aceptor de electrones. En esta cepa la degradación de metanol y ácido fórmico no empezaba hasta que se hubiera agotado el formaldehído en el medio y presentaba un patrón diaúxico (primero se consumía el ácido fórmico y después el metanol).

Se han descrito algunas especies de *Pseudomonas* capaces de degradar formaldehído y ácido fórmico en medios sintéticos y aguas residuales generadas en la producción de metilaminas. De este modo, el consorcio bacteriano formado por las estirpes *P. putida*, *P. cepacia* y *Trichosporon penicillatum*, eran capaces de eliminar en medios sintéticos hasta 1000 mg/l de formaldehído en 18-24 horas y 500 mg/l de ácido fórmico en 12-18 horas (Glancer-Šoljan *et al.*, 2001).

El metabolismo del formaldehído en la cepa *Pseudomonas putida* KT2440 no ha sido estudiado anteriormente pero los trabajos realizados en bacterias de su misma especie revelan que *Pseudomonas putida* es capaz de oxidar el formaldehído y la enzima clave para llevar a cabo dicho proceso es la formaldehído deshidrogenasa independiente de glutatión (*fdhA*) (Ogushi *et al.*, 1984). Esta enzima se ha cristalizado en *Pseudomonas putida* (PFDH) y cataliza el paso de formaldehído a ácido fórmico mediante la reacción siguiente:



El ácido fórmico obtenido tras la oxidación de formaldehído, es subsecuentemente oxidado mediante la enzima formato deshidrogenasa (FDH) a  $\text{CO}_2$  a través de la reacción siguiente:



#### **4.1.1. Formaldehído deshidrogenasa independiente de glutatión**

Las aldehído deshidrogenasas (ADHs) de mamífero se han definido en base a propiedades físico-químicas y funcionales (Strydom y Valle, 1984): las ADHs de clase I son catiónicas y altamente sensibles a la inhibición por 4-metil-pirazol. Las ADHs de clase II son también catiónicas pero insensibles al inhibidor anterior.

Las ADHs de clase III son proteínas aniónicas y son insensibles al 4-metil-pirazol. Las ADHs de clase I y II muestran actividad frente al etanol, mientras que las de la clase III muestran actividad formaldehído deshidrogenasa dependiente de glutatión. Funcionalmente, la PFDH es similar a las ADHs de clase III (formaldehído deshidrogenasa dependiente de glutatión, GSH-FDH), puede catalizar la oxidación de alcoholes de cadena larga como el *n*-pentanol pero es inactiva frente al etanol (Ito *et al.*, 1994).

Las ALDHs bacterianas se dividen en dos grupos diferentes de acuerdo con la especificidad que muestran por sus sustratos. Enzimas como la lactoaldehído deshidrogenasa de *Escherichia coli* K12 (Baldomá y Aguilar, 1987) se encuentran dentro del grupo de ALDHs que muestran alta especificidad de sustrato. Las enzimas con baja especificidad se encuentran agrupadas dentro de las ALDHs inespecíficas (EC 1.2.1.3) (Sophos y Vasiliou, 2003). Además, se ha descrito que algunas enzimas microbianas clasificadas dentro de este grupo, como las de *Rhodococcus* sp. (Nagy *et al.*, 1995), *Vibrio harveyi* (Bognar y Meighen, 1978) y *Acinetobacter* sp. (Ishige *et al.*, 2000), la especificidad del enzima aumenta con la longitud de la cadena carbonada del aldehído empleado como sustrato.

La comparación de secuencias de aminoácidos muestra que la formaldehído deshidrogenasa de *Pseudomonas putida* (PFDH; EC1.2.1.46) está relacionada con la familia de las alcohol deshidrogenasas de cadena media que contienen zinc. Esta familia de proteínas utiliza NADH o NADPH como cofactor y suelen ser diméricas o tetraméricas. Cada monómero suele tener entre 350 y 400 residuos aminoácidos y está compuesto de 2 dominios, el dominio catalítico y el dominio de unión a cofactor. El dominio de unión a cofactor tiene una estructura supersecundaria común llamada plegamiento de Rossman ( $\beta\alpha\beta\alpha\beta$ )<sub>2</sub>.

La PFDH de *P. putida* es una metaloenzima de 42 kDa de peso molecular siendo, en su forma activa, un homotetrámero constituido por subunidades de 398 aminoácidos y dos iones de zinc (uno catalítico y otro estructural) (Ito *et al.*, 1994).

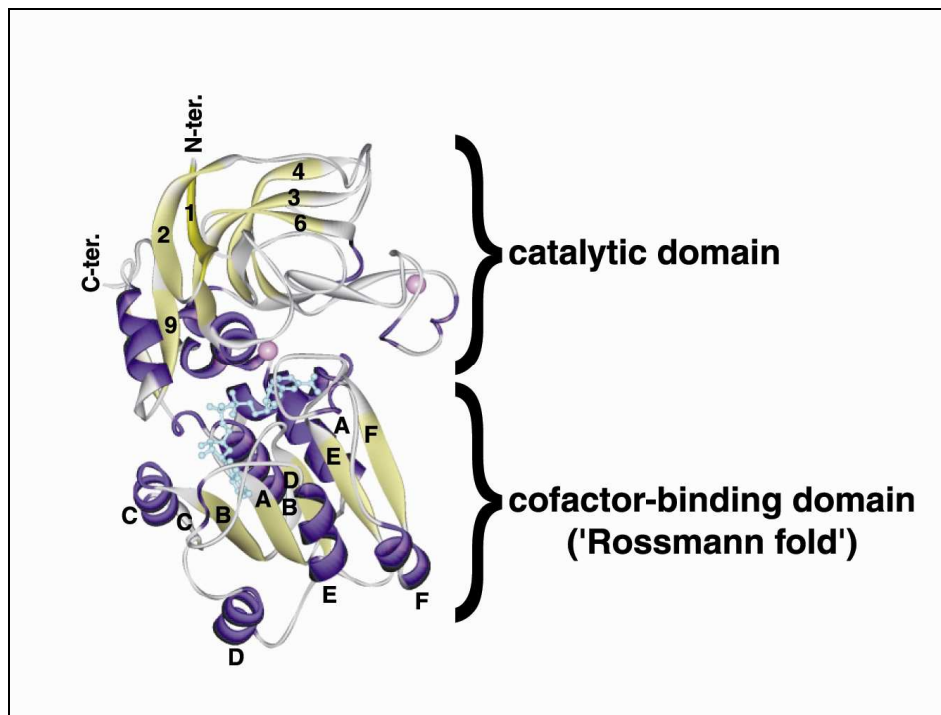
La PFDH cataliza la dismutación eficiente de un amplio número de aldehídos, donde 2 moléculas de aldehído se transforman en sus correspondientes derivados carboxilados y alcoholes, pero no es activa frente propanal o aldehídos de cadena larga. Dicha reacción de dismutación tiene lugar en ausencia de NAD<sup>+</sup> lo que sugiere que la PFDH tiene un cofactor nucleotídico intrínseco que se encuentra unido covalentemente, esta propiedad contrasta con las ADHs comunes en las que el NAD(P)H no se une de forma covalente (Tanaka, *et al.*, 2003).

### **4.1.2. Estructura de la PFDH**

Estructuralmente, la PFDH presenta en cada una de sus unidades cristalográficas independientes, una molécula de  $\text{NAD}^+$ , 2 iones de zinc y todos los átomos no hidrogenados salvo en la región amino terminal (N-terminal) (Ser1) y carboxilo terminal (C-terminal) (Ala398). Además, posee un total 967 moléculas de agua y 2 iones sulfato por cada unidad asimétrica (ASU). Cada subunidad de la PFDH contiene dos dominios que están separados por una hendidura que contiene un bolsillo que acomoda al cofactor  $\text{NAD}^+$ . Uno de los dominios es responsable de la unión a cofactor y el otro suministra los grupos necesarios para la unión a sustrato y le confiere especificidad. Los dos dominios presentan diferentes tamaños, el dominio catalítico es algo mayor y contiene 231 residuos, mientras que el dominio de unión a cofactor contiene 167 residuos.

El dominio catalítico consta de los residuos 1-170 y 338-398. Como se observa en la Figura 5, el núcleo estructural está compuesto principalmente de cadenas plegadas en capas  $\beta$ . Este dominio muestra además 5  $\alpha$ -hélices alineadas en la superficie de la molécula, externas a las estructuras  $\beta$ . El análisis estructural confirmó la presencia de 2 iones de zinc firmemente unidos al dominio catalítico.

Fujii y colaboradores (2004) describieron que la mutación Cys46A e His67A, dos aminoácidos relacionados con la unión de los iones de zinc, conducía a la pérdida de actividad PFDH, corroborando el papel del Zn en el mecanismo catalítico. Otros autores advirtieron anteriormente que los residuos Cys97, Cys100, Cys103, y Cys111 estaban asociados con el zinc estructural (Ogushi *et al.*, 1986; Tsuru *et al.*, 1997).



**Figura 5. Diagrama de cintas del complejo PFDH.** La molécula de  $\text{NAD}^+$  y los iones de Zn se muestran como modelos “bolas y bastones” respectivamente. La Figura muestra las  $\alpha$ -hélices (violeta) y las capas- $\beta$  (amarillo) y también se señalan las regiones N-terminal (N-ter.) y C-terminal (C-ter.). Se pueden observar los dos dominios de la subunidad, dominio catalítico (*catalytic domain*) y el dominio de unión a cofactor (*cofactor-binding domain*). El dominio de unión a cofactor muestra la estructura supersecundaria llamada plegamiento de Rossman  $(\beta\alpha\beta\alpha\beta)_2$ . Obtenido de Tanaka, *et al.*, 2003.

#### **4. 2.1. Formato deshidrogenasa (FDH)**

Las enzimas capaces de oxidar el ácido fórmico se han identificado en microorganismos de diferentes taxones y en plantas superiores (Popov y Lazmin, 1994). Las formato deshidrogenasas catalizan la oxidación de formato a  $\text{CO}_2$  y  $2 \text{H}^+$  y se dividen en dos grandes familias, la primera familia contiene a las formato deshidrogenasas dependientes de  $\text{NAD}^+$  (EC1.2.1.2.), mientras que la otra familia agrupa a las independientes de  $\text{NAD}^+$ .

Las enzimas dependientes de  $\text{NAD}^+$ , catalizan la conversión de formato a  $\text{CO}_2$  con la reducción concomitante de  $\text{NAD}^+$  a  $\text{NADH}$ . Estas enzimas juegan un papel crucial en el catabolismo de compuestos de tipo  $\text{C}_1$  en bacterias y levaduras metilotrofas (Popov y Lazmin, 1994), al catalizar el último paso del catabolismo de dichos compuestos y suministrar energía y equivalentes de reducción a estos organismos (Anthony, 1975; Rodionov, 1981). Por otro lado las FDHs juegan un papel regulatorio importante en el metabolismo del formaldehído de levaduras metilotrofas en función de los niveles internos de  $\text{NADH}$ . Así, cuando la célula se satura de equivalentes reducidos, se inhiben estas enzimas y la mayoría del formaldehído pasa a tener fines asimilatorios. Sin embargo, cuando el estado energético de la célula es bajo, cesa esta inhibición y el formaldehído se oxida a  $\text{CO}_2$  para suministrar poder reductor (Izumi *et al.*, 1987; Anthony, 1975).

Las FDHs dependientes de  $\text{NAD}^+$  comprenden un grupo heterogéneo de enzimas que proceden de la superfamilia de las deshidrogenasas 2-hidroxiácido D-especificas dependientes de  $\text{NAD(P)}^+$  (Vinals *et al.*, 1993). Estas enzimas están presentes en diversos organismos como bacterias, levaduras, hongos y plantas.

La mayoría de las FDHs dependientes de  $\text{NAD}^+$  caracterizadas hasta la fecha no contienen grupos prostéticos ni iones metálicos en su sitio activo, normalmente las enzimas de organismos eucarióticos y de algunas bacterias metilotrofas tienen masas moleculares comprendidas entre 70 y 100 kDa y suelen estar compuestas de dos subunidades idénticas (Schutte *et al.*, 1976; Kato *et al.*, 1974; Hou *et al.*, 1982; Allais *et al.*, 1983; Avilova *et al.*, 1985; van Dijken *et al.*, 1976; Izumi *et al.*, 1987; Peacock y Boutler, 1970; Uotila y Koivusalo, 1979; Farinelli *et al.*, 1983; Colas des Francs-Small *et al.*, 1993; Egorov *et al.*, 1979; Asano *et al.*, 1988; Lida *et al.*, 1992; Tishkov, 1993). Estas enzimas muestran una actividad específica relativamente baja, una baja afinidad por el ion formato y son catalíticamente funcionales en un amplio rango de pH. Las secuencias de aminoácidos de FDHs de fuentes evolutivamente distantes muestran similitudes entre el 40 y el 50% y presentan estructuras altamente conservadas, además, todas las FDHs conocidas exhiben alta preferencia por  $\text{NAD}^+$  sobre  $\text{NADP}^+$  (Serov *et al.*, 2002).

La enzima de *Pseudomonas oxalaticus* es el único ejemplo de FDH dependiente de  $\text{NAD}^+$  con una organización molecular diferente, ya que tiene una masa molecular mucho mayor (315 kDa), una compleja estructura cuaternaria de tipo  $2\alpha 2\beta$  y contiene varios grupos prostéticos como hierro, sulfuro ácido-lábil, y dos moléculas de mononucleótido de flavina (Muller *et al.*, 1978). De acuerdo con su estructura y composición y otras características como labilidad en presencia de oxígeno y elevada actividad específica y afinidad por formato, la FDH de *P. oxalaticus* se parece a las enzimas independientes de  $\text{NAD}^+$  y constituye una subclase aparte de FDHs.

Las FDHs poseen un interés comercial considerable como catalizadores para la regeneración de coenzimas reducidos en la síntesis de compuestos biológicamente activos. El empleo de FDHs bacterianas como sistema de generación de energía posee varias ventajas, como el bajo coste de sustrato, la volatilidad del producto de reacción, propiedad que facilita su eliminación, y la elevada estabilidad que poseen estas enzimas en comparación con las de otros organismos (Shinoda *et al.*, 2001, Serov *et al.*, 2002).

La otra gran familia, FDHs independientes de  $\text{NAD}^+$ , incluye un grupo diverso de proteínas que contienen metales conjugados con grupos sulfoferricos. Estas proteínas presentan, en función del microorganismo al que pertenecen, diferentes papeles fisiológicos, localización celular, especificidad de sustrato, naturaleza del aceptor de electrones, contenido y tipo del grupo prostético (Andersen y Ljungdahl, 1974; Yamamoto *et al.*, 1983; Liu y Mortenson, 1984; Jones y Stadtman, 1981; Schauer y Ferry, 1982; Enoch y Lester, 1975; Cox *et al.*, 1981; Kroger *et al.*, 1979; Riederer-Henderson y Peck, 1986). Además, se distinguen por su elevada masa molecular, compleja estructura cuaternaria, presencia de varios grupos prostéticos y su labilidad frente a oxígeno (Popov y Lazmin, 1994). Esta familia comprende enzimas independientes de  $\text{NAD}^+$  que contienen un complejo conjunto de centros redox con sitios activos sensibles al  $\text{O}_2$ . Estos incluyen los metales de transición como el molibdeno o el tungsteno, iones no hemo y cofactores del tipo del dinucleótido molibdopterin guanina (MGD) (Jormakka *et al.*, 2003). Las FDHs pueden ser monoméricas, diméricas o triméricas, y suelen contener tungsteno o molibdeno en sus

sitios activos y un residuo intrínseco de selenocisteína (Sec). Hasta ahora se ha resuelto la estructura de algunas subunidades catalíticas de microorganismos como *Shewanella massilia* y *Alcaligenes faecalis* (Schindelin *et al.*, 1996, Dias *et al.*, 1999, Czjzek *et al.*, 1998; Ellis *et al.*, 2001), y las de 3 FDHs; dos de *E. coli* (Fdh-H y Fdh-N) y una de *Desulfovibrio gigas* (Boyington *et al.*, 1997; Jormakka, *et al.*, 2002; Raaijmakers *et al.*, 2002). Hay que remarcar que aunque estas enzimas estén relacionadas y sean similares estructuralmente, la composición de las subunidades y el tipo de cofactor suele variar entre ellas.

*Escherichia coli* posee una cadena respiratoria modular capaz de generar energía y facilitar el crecimiento con un amplio espectro de donadores de electrones. Bajo condiciones de crecimiento anaerobio, el formato se genera a partir de la rotura hemolítica del piruvato por medio de la piruvato formato-liasa (PFL) y se transloca al periplasma donde actúa como donador de electrones para las formato deshidrogenasas respiratorias electrogénicas (Sawers, 1994; Uden y Bongaerts, 1997; Richardson, 2000).

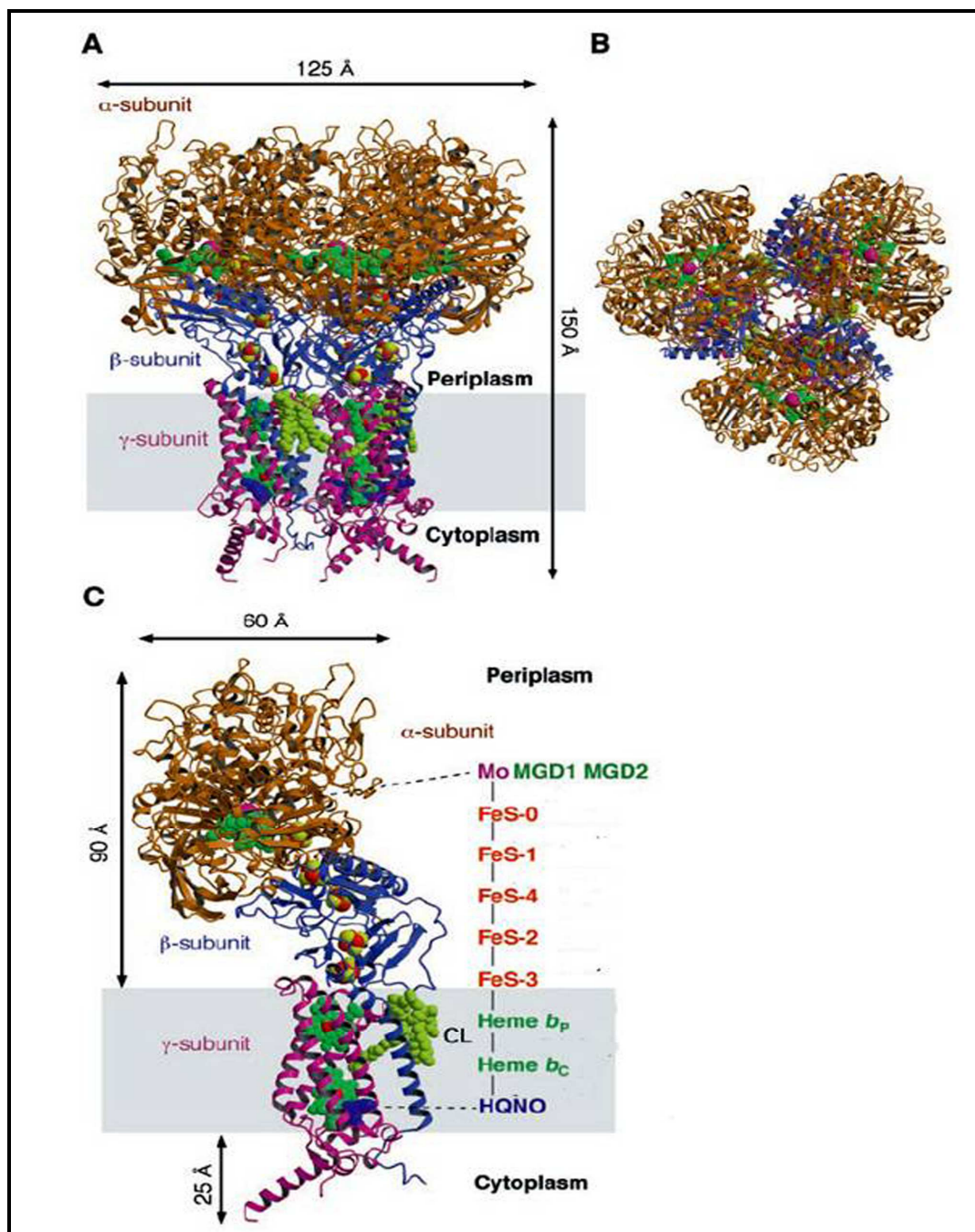
*Escherichia coli* sintetiza 3 isoenzimas formato deshidrogenasa. Dos de éstas, la formato deshidrogenasa-N (FdnGHI) y la formato deshidrogenasa-O (FdoGHI), son enzimas respiratorias unidas a membrana con sus subunidades catalíticas localizadas en la cara periplasmática de la membrana citoplasmática (Enoch y Lester, 1975; Jormakka *et al.*, 2002). La tercera isoenzima, formato deshidrogenasa-H (FdhF), se localiza en la cara citoplasmática de la membrana interna donde, junto con una hidrogenasa, forma parte del complejo formato hidrogenilasa (Boyington *et al.*, 1997; Raaijmakers y Romão, 2006). Los genes *fdnGHI* codifican la formato deshidrogenasa-N (Fdh-N) y se expresan a máximo nivel en condiciones anaerobias y en presencia de nitrato (por ello lo de la designación-“N”); mientras que los genes *fdoGHI* codifican la formato deshidrogenasa-O (Fdh-O) y se expresan constitutivamente a bajo nivel en todas las condiciones de crecimiento (Berg *et al.*, 1991; Abaibou *et al.*, 1995). Las subunidades catalíticas de ambas isoenzimas son proteínas homólogas que contiene una serie de cofactores metálicos, un cofactor dinucleótido *bis*-molibdopterin guanina, selenocisteína y un grupo [4Fe-4S] (Sawers, 1994).



La Fdh-N de *E. coli* es la FDH mas estudiada. Además es una componente de la ruta respiratoria de nitrato, donde bajo condiciones anaerobias la oxidación de formato está acoplada a la reducción de nitrato vía quinonas. La Fdh-N está constituida por 3 subunidades: la **subunidad  $\alpha$  catalítica (FdnG)**, que coordina un factor bis-MGD y un grupo [4Fe-4S] y contiene además un residuo intrínseco de selenocisteína; la **subunidad  $\beta$  (FdnH)**, que consta de una hélice transmembrana (TMH), coordina 4 grupos [4Fe-4S] y media la transferencia de electrones entre las subunidades  $\alpha$  y  $\gamma$ ; y la **subunidad integral de membrana  $\gamma$  (FdnI)**, que posee 4 TMH coordinadas con 2 grupos hemo. La secuencia del gen estructural de la subunidad catalítica  $\alpha$ , contiene un codón ópalo (UGA) en fase que especifica la incorporación de una selenocisteína (Sec) (Berg *et al.*, 1991). Varios estudios han puesto de manifiesto que la discriminación entre codones UGA selenocisteína y codones UGA stop requiere algo más que el codón UGA Sec en sí mismo, ya que es necesaria la existencia de una estructura de tipo tallo-lazo en el ARNm inmediatamente adyacente al codón UGA Sec cuya presencia obliga a la distinción entre un codón UGA Sec y un codón UGA stop (Thanbichler *et al.*, 2001; Lescure *et al.*, 2002). Dicho tipo de estructura recibe el nombre de SECIS (del inglés *selenocysteine insertion sequence*, secuencia de inserción de selenocisteína) (Krol, 2002).

#### **4.2.2. Estructura de la FDH**

La estructura cristalina de Fdh-N es un trímero que en su conjunto posee forma de champiñón (Figura 6A). En total la masa molecular del complejo es de 510 kDa. La distancia existente entre los centros redox dentro de cada monómero sugiere que es la unidad funcional, y se ha propuesto que la formación del trímero es importante para la estabilidad de la proteína. La estructura de la Figura 6A muestra a la subunidad catalítica situada en el espacio periplasmático. Esta subunidad carece de los 33 residuos N-terminales, entre los cuales se distingue la señal de reconocimiento doble arginina translocasa (TAT), que indica que la subunidad catalítica se transloca a través de la membrana por medio de la ruta TAT (Berks, 1996, Sargent *et al.*, 1998, 1999).

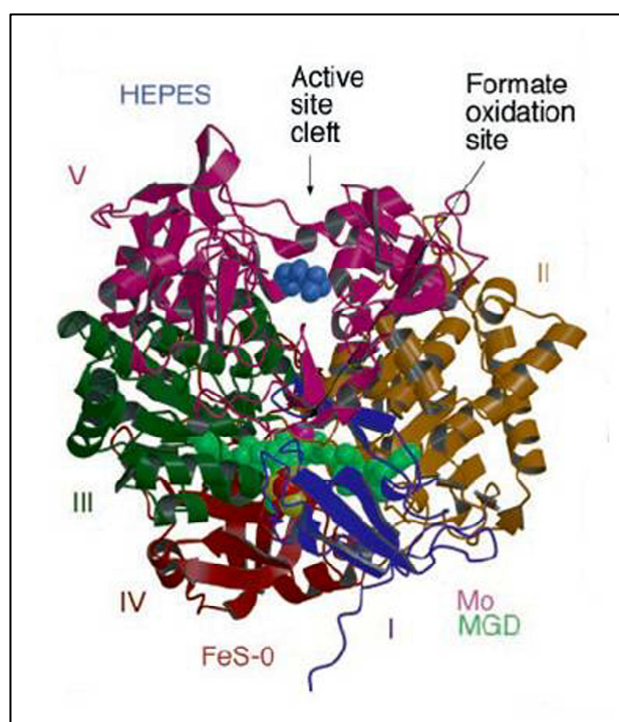


**Figura 6. Estructura de Fdh-N.** Las tres figuras están basadas en la estructura nativa de Fdh-N, excepto para la posición de HQNO. Las subunidades  $\alpha$ ,  $\beta$ , y  $\gamma$  se muestran en marrón, azul y rosa respectivamente. Los grupos hemo y los cofactores MGD se muestran en color verde y el Mo, la cardiolipina (CL) y HQNO se representan en rosa, amarillo y azul oscuro respectivamente. En las figuras también aparecen los 5 grupos [4Fe-4S] (átomos de Fe: color rojo y átomos de S: amarillo). A) Vista paralela a la membrana del trímero Fdh-N. B) Vista del trímero Fdh-N desde el periplasma a lo largo de la membrana. C) Vista del monómero Fdh-N paralela a la membrana. Adaptado de Jormakka *et al.*, 2002.

**La subunidad catalítica  $\alpha$  (FdnG)** consta de 982 residuos y es considerablemente mayor que la de Fdh-H (715 residuos). La subunidad  $\alpha$  de Fdh-N está compuesta por cinco dominios organizados alrededor del cofactor MGD (Figura 7), cuatro de ellos (I-IV) son similares a los dominios de Fdh-H, mientras que el dominio V, localizado entre los dominios III y IV, no aparece en su estructura. La subunidad  $\alpha$  contiene un átomo de molibdeno, un cofactor bis-MGD, 4 grupos [4Fe-4S] y un residuo Sec intrínseco.

El plegamiento total de la subunidad  $\alpha$  es similar a las estructuras de otras FDHs descritas. Tres de los cinco dominios anteriormente nombrados corresponden a tramos de la cadena polipeptídica no contiguos. El dominio I es el dominio de unión al grupo [4Fe-4S], mientras que los dominios II y III están implicados en la coordinación del cofactor bis-MGD. Estos dos dominios forman una hendidura con una abertura similar a un “embudo” que se dirige hacia el átomo de Mo del sitio activo. Dicha abertura contiene residuos cargados positivamente que podrían ser importantes para la incorporación del sustrato. El residuo Sec del sitio activo está implicado en la coordinación del sustrato y parece ser importante para el ajuste del potencial redox del átomo de Mo.

**Figura 7. Representación de cintas de la subunidad  $\alpha$ .** Los 5 dominios poseen los colores siguientes: azul (I), amarillo (II), verde (III), rojo (IV) y rosa (V). El átomo de Mo, el cofactor MGD y la molécula de HEPES se representan en rosa, verde y azul respectivamente. Los grupos Fe-Sulfuro se muestran en rojo (átomos de Fe) y amarillo (átomos de S). Adaptado de Jormakka *et al.*, 2002.

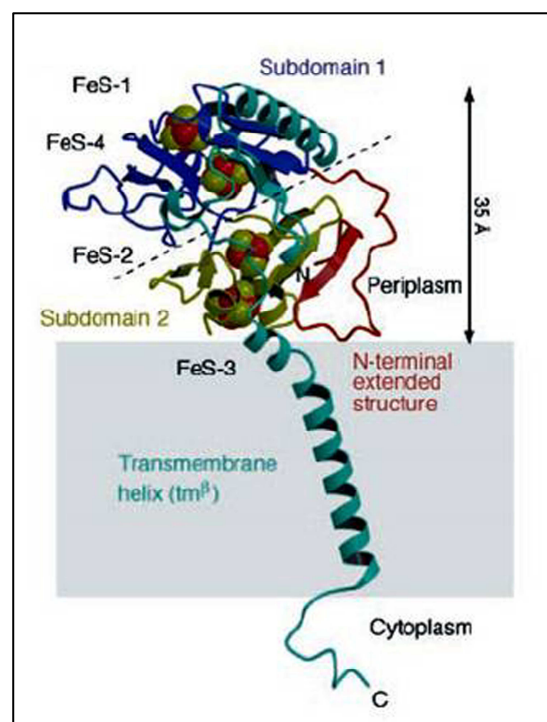


Las subunidades catalíticas FdnG y FdoG se asocian con las proteínas Fe-S homólogas FdnH y FdoH, respectivamente (Jormakka *et al.*, 2002; Richardson y Sawers, 2002). Posteriormente los complejos FdnGH y FdoGH se exportan al periplasma por medio de la ruta para el transporte doble arginina (TAT), un sistema de transporte específico para la translocación transmembranal de proteínas correctamente plegadas (Sargent, 2007a; Stanley *et al.*, 2002). La translocasa TAT reconoce un péptido señal en la región N-terminal con un motivo conservado doble arginina (S/T-R-R-x-F-L-K) (Berks, 1996; Berks *et al.*, 2000). La translocación de Fdh-N y Fdo-G se produce gracias a un péptido señal TAT presente en las subunidades FdnG y FdoG, y ya que las proteínas FdnH y FdoH no lo portan, se ha propuesto que las dianas de las subunidades FdnG y FdoG son suficientes para exportar los complejos heterodiméricos preformados FdnGH y FdoGH a través del canal TAT.

Por otro lado análisis bioinformáticos realizados por Punginelli y colaboradores (2004) sugieren que el ARNm específico de los primeros 17 codones de los genes *fdnG* y *fdoG* forman una estructura estable tallo-lazo que media el control traduccional de la síntesis de Fdh-N y Fdh-O.

**La subunidad  $\beta$  (FdnH)** de Fdh-N contiene 289 residuos, coordina 4 grupos [4Fe-4S] y contiene una TMH en su región su región C-terminal. Los extremos N y C de la subunidad se sitúan en las caras periplasmática y citoplasmática, respectivamente (Figura 8). La región central de la subunidad  $\beta$  procede de la superfamilia de proteínas que unen 4 grupos [4Fe-4S] presentes en algunas oxidorreductasas unidas a membrana donde se pueden incluir la FDH, nitrato reductasa, [NiFe]-hidrogenasa, DMSO reductasa y tiosulfato reductasa (Gross *et al.*, 1998; Meek y Arp, 2000). La subunidad tiene dos subdominios que poseen un empaquetamiento similar al de las ferredoxinas 2 [4Fe-4S], las cuales poseen una simetría local doble entre dos grupos [4Fe-4S].

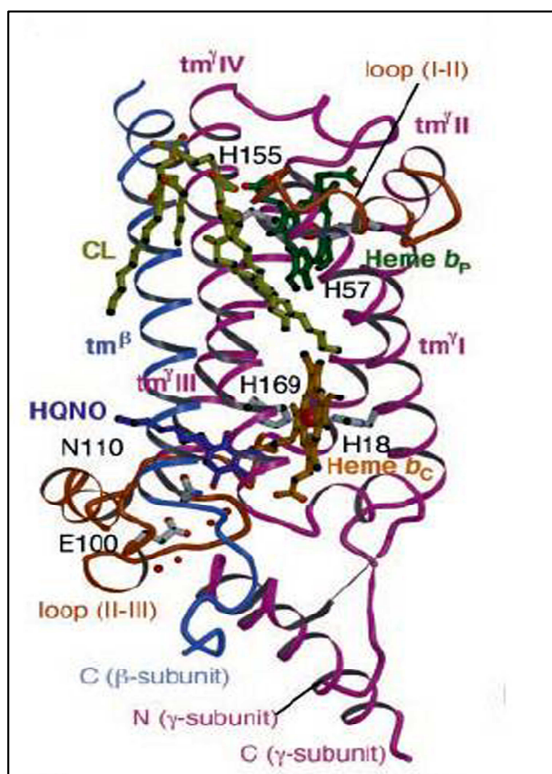
**Figura 8. Estructura de la subunidad  $\beta$ .** La imagen muestra la representación de cintas de la subunidad  $\beta$  vista paralela a la membrana. La línea discontinua representa un eje entre los dos subdominios. La estructura N-terminal extendida (*N-terminal extended structure*), la región interna del subdominio 1 (*subdomain 1*), la región interna del subdominio 2 (*subdomain 2*) y la hélice transmembrana (*transmembrane helix tm $^{\beta}$* ) aparecen en rojo, azul, amarillo y azul cian respectivamente. Adaptado de Jormakka *et al.* (2002).



### **La subunidad integral de membrana $\gamma$ (Fdnl)**

contiene 216 residuos y es un citocromo b unido a membrana con 4 hélices transmembrana (TMHs), situándose los extremos carboxilo y amino en la cara citoplasmática (Figura 9). Esta subunidad contiene dos grupos hemo *b* y un sitio de reducción de menaquinona (MQ). Varios autores han comprobado mediante análisis de secuencias que la [NiFe]-hidrogenasa, y la tiosulfato reductasa tienen subunidades citocromo homólogas a la de Fdh-N. Aunque las 4 TMHs de la subunidad  $\gamma$  están implicadas en el mantenimiento de los dos grupos hemo *b*, solo 3 proporcionan los ligando hemo. El hemo  $b_p$  se sitúa en la cara periplasmática y recibe los electrones de la subunidad  $\beta$ , mientras que el hemo  $b_c$  se sitúa en la cara citoplasmática y transfiere los electrones a la MQ.  $b_p$  está coordinado por los residuos His $^{\gamma 57}$  de  $tm^{\gamma}$  II e His $^{\gamma 155}$  de  $tm^{\gamma}$  IV, y el hemo  $b_c$  por los residuos His $^{\gamma 18}$  de  $tm^{\gamma}$  I e His $^{\gamma 169}$  de  $tm^{\gamma}$  IV.

Estos residuos de histidina están conservados en FDHs, tiosulfato reductasa y hidrogenasa-[NiFe] (Berks *et al.*, 1995), además el patrón de coordinación de esta subunidad es el mismo que el que presenta la hidrogenasa-[NiFe] (Gross *et al.*, 1998; Meek y Arp, 2000). En el modelo que se presenta en la Figura 9, el sitio de unión MQ se caracterizó empleando un análogo de la menasemiquinona, HQNO.



**Figura 9. Estructura de la subunidad  $\gamma$ .**

La figura muestra la vista paralela a la membrana del dominio integral de membrana. Las hélices transmembrana de la subunidad  $\gamma$  aparecen numeradas desde  $tm^{\gamma I}$  hasta  $tm^{\gamma IV}$  y también aparece una de la subunidad  $\beta$  como  $tm^{\beta}$ . La figura presenta los residuos implicados en la unión de los 2 grupos hemo  $b$  y HQNO. Obtenido de Jormakka *et al.* (2002).

Generalmente las molibdoenzimas compuestas de múltiples subunidades precisan la ayuda de proteínas accesorias (llamadas “chaperonas”) que aseguran la inserción correcta de grupos prostéticos, y coordinan el plegamiento, montaje y la exportación de la proteína al periplasma cuando ésta es su localización. Por ejemplo, la molibdo nitrato reductasa (NarGHI), requiere una chaperona esencial llamada NarJ para orquestar la adquisición de su propio cofactor y el ensamblaje de la subunidad (Bertero *et al.*, 2003; Jormakka *et al.*, 2004; Vergnes *et al.*, 2006; Lanciano *et al.*, 2007). De igual manera, las molibdoenzimas exportadas por la ruta TAT, trimetilamina N-óxido (TMAO) reductasa (TorA), dimetil sulfóxido (DMSO) reductasa (DmsABC) y la nitrato reductasa periplasmática (NapA), requieren para su correcta biogénesis las proteínas accesorias TorD, DmsD y NapD, respectivamente (Oresnik *et al.*, 2001; Jack *et al.*, 2004; Hatzixanthis *et al.*, 2005; Maillard *et al.*, 2007).

Se conoce muy poco acerca de los procesos biosintéticos que gobiernan el ensamblaje de las isoenzimas formato deshidrogenasa dependientes de molibdeno. Hace algunos años mediante análisis mutagénicos clásicos se identificaron dos nuevos genes (*fdhE* y *fdhD*) necesarios para la actividad formato deshidrogenasa en *E. coli* (Mandrand-



Berthelot *et al.*, 1988). Los genes *fdhE* y *fdhD* se localizaron adyacentes en 5' y 3' a los extremos del operón *fdoGHI* (Abaibou *et al.*, 1995; Schlindwein *et al.*, 1990; Schlindwein y Mandrand 1991). El gen *fdhD* se transcribe divergentemente con respecto a *fdoG*, mientras que el codón de inicio de *fdhE* solapa con el codón stop de *fdoI* y es por ello, probable, que se co-transcriba con *fdoGHI*. Mandrand-Berthelot y colaboradores (1988) propusieron que el producto del gen *fdhD* era necesario para la actividad de las tres formato deshidrogenasas tanto exportadas como no exportadas. La cepa mutante *fdhE* presentaba un fenotipo deficiente en las actividades de las enzimas respiratorias que se localizan en el periplasma (FdnGHI y FdoGHI), mientras que la actividad de FdhF, enzima no exportada localizada en el citoplasma, no se veía afectada. Análisis en la cepa mutante en *fdhE* posteriores mostraron niveles normales de la subunidad FdnI, sin embargo los niveles de los polipéptidos FdnGH eran indetectables (Mandrand-Berthelot *et al.*, 1988). Posteriormente Stewart y colaboradores (1991) sugirieron que el producto del gen *fdhE* no era necesario para la traducción del operón *fdnGHI*, datos que fueron apoyados por Abaibou y colaboradores (1995) en cuanto al control de la expresión del operón *fdoGHI*. Estos últimos autores sugirieron que las proteínas FdhE y FdhD podrían actuar a nivel post-traduccional para asegurar el correcto procesamiento o montaje de las dos isoenzimas respiratorias (Abaibou *et al.*, 1995).

En conjunto esta serie de resultados implican al producto del gen *fdhE* en un papel específico de la biosíntesis de las subunidades formato deshidrogenasa con diana TAT, esta hipótesis se ha corroborado recientemente por Lüke y colaboradores (2008). Los resultados de estos investigadores sugieren que FdhE se une a las subunidades FdnG y FdoG y no se une a las subunidades FdnH o FdoH, además la unión de FdnH y FdhE a FdnG parece ser mutuamente excluyente, lo que podría indicar que un posible papel de FdhE es el de prevenir interacciones prematuras entre FdnG y FdnH durante el proceso de carga del cofactor.

Diversos análisis de secuencias han mostrado que todas las proteínas FdhE presentan 4 motivos CXXC altamente conservados (Turner *et al.*, 2004), ello indica que estas proteínas pueden portar cofactores metálicos, como grupos Fe-S, iones de Zn (II) o iones de Cu (II) (Sargent, 2007b; Turner *et al.*, 2004). La purificación de la FdhE recombinante realizada por Luke y colaboradores en 2008 demostró que esta proteína es una rubredoxina que contiene hierro férrico ligado a las cadenas laterales de las cisteínas. Estos autores afirmaron además que estas proteínas se pueden purificar tanto como monómero como homodímero, y que los motivos cisteína CXXC, son esenciales para la estabilidad de la proteína (Lüke *et al.*, 2008).

En esta Tesis Doctoral se ha llevado a cabo el estudio del metabolismo del formaldehído y el formato por *Pseudomonas putida* KT2440, habiéndose realizado la primera caracterización a nivel transcriptómico de la respuesta de un microorganismo a formaldehído, un agente altamente toxico.





### **III. OBJETIVOS**



Este trabajo de Tesis Doctoral se encuadró en un proyecto interno del CSIC sobre desarrollo de una planta de tratamiento de residuos de laboratorio. Entre éstos se consideró el agar, la agarosa, etanol, fenol, bromuro de etidio, formaldehído y otros compuestos. Dentro del proyecto nuestro laboratorio se centró en degradación de bromuro de etidio y formaldehído. Los estudios de nuestro de laboratorio habían puesto de manifiesto que la degradación de un contaminante por microorganismos requiere dos propiedades importantes, la tolerancia al mismo y la capacidad de degradación por la cepa o cepas bajo estudio. Aunque en nuestro laboratorio se han aislado cepas de distintos géneros que toleran hasta 10 mg/ml de bromuro de etidio no se han encontrado degradadores de este tóxico. En cambio en nuestro laboratorio se encontró que *Pseudomonas putida* es capaz de tolerar y metabolizar formaldehído.

En base a estos antecedentes se planteó como objetivo general de esta Tesis Doctoral el de caracterizar la respuesta a formaldehído de *Pseudomonas putida* KT2440 y profundizar sobre las vías de mineralización de este tóxico.

**Los objetivos específicos fueron:**

- 1. Análisis transcriptómico de la respuesta de *P. putida* KT2440 a concentraciones subletales de formaldehído.**
- 2. Identificación mediante mutagénesis de genes de este microorganismo cuyos productos son relevantes en la tolerancia a formaldehído.**
- 3. Identificación de los sistemas de detoxificación de formaldehído en *P. putida* KT2440 y**
- 4. Regulación de la expresión de los sistemas de detoxificación.**



## **IV. RESULTADOS**



CAPÍTULO 1: RESPUESTAS FISIOLÓGICAS DE *Pseudomonas putida* A FORMALDEHÍDO DURANTE SU DETOXIFICACIÓN





## **CAPÍTULO 1**

### **Respuestas fisiológicas de *Pseudomonas putida* a formaldehído durante su detoxificación.**

**Amalia Roca, José-Juan Rodríguez Herva, Estrella Duque, y Juan L. Ramos**

*Pseudomonas putida* KT2440 exhibe dos formaldehído deshidrogenasas y dos complejos formato deshidrogenasa, que permiten a la cepa convertir el formaldehído estequiométricamente a CO<sub>2</sub>. La cepa toleraba hasta 1,5 mM formaldehído y moría en la presencia de 10 mM. En presencia de 0,5 mM formaldehído, concentración subletal de este compuesto, la velocidad de crecimiento descendía cerca del 40% con respecto al crecimiento en ausencia del tóxico. Análisis transcriptómicos revelaron que en respuesta a bajas concentraciones de formaldehído, un número limitado de genes se encontraban inducidos (52). Basándonos en la función de estos genes parece que concentraciones subletales de este químico desencadenan una respuesta integral para superar daños en el ADN y proteínas, expulsar este compuesto tóxico y detoxificarlo mediante su conversión a CO<sub>2</sub>. Se ha analizado la inhibición del crecimiento por 1,5 mM HCOH y los niveles de supervivencia a 10 mM HCOH en cepas portadoras de mutaciones en genes inducidos observando que, los mutantes en las bombas de eflujo MexEF/OprN y en los genes implicados en mecanismos de reparación del ADN, *recA* y *uvrB* eran hipersensibles a 10 mM formaldehído, siendo sus ratios de muerte 3 ó 4 órdenes de magnitud superiores al que presentaba la cepa parental. Mutantes en otros genes inducidos morían con ratios de muerte similares o ligeramente superiores al del silvestre. Con respecto a la inhibición del crecimiento, encontramos que los mutantes en el gen implicado en la biosíntesis de glutatión, los genes de respuesta a estrés mediada por las deshidrogenasas 2-hidroxiácido y en las 2 bombas de eflujo de la familia MFS eran incapaces de crecer en presencia de 1,5 mM HCOH. En un análisis independiente se buscaron mutantes hipersensibles a formaldehído, pero que su expresión no cambiara en respuesta a dicho químico. Se identificaron dos mutantes con inserciones en *recD* y *fdhA* que eran incapaces de crecer o que crecían más lentamente en presencia de 1,5 mM HCOH. El mutante *recD* era hipersensible a 10 mM HCOH y moría con ratios mayores que la cepa parental.

*Microbial Biotechnology*

Vol. 1, Nº 2 pp.: 158-169, 2008.



# Physiological responses of *Pseudomonas putida* to formaldehyde during detoxification

Amalia Roca,<sup>1</sup> José-Juan Rodríguez-Herva,<sup>1</sup>  
Estrella Duque,<sup>1</sup> and Juan L. Ramos<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Environmental Protection,  
Consejo Superior de Investigaciones Científicas,  
C/Prof. Albareda, 1, E-18008 Granada, Spain.

<sup>2</sup>Unidad de Química Atmosférica, CSIC-Universidad de  
Huelva, Huelva, Spain.

## Summary

*Pseudomonas putida* KT2440 exhibits two formaldehyde dehydrogenases and two formate dehydrogenase complexes that allow the strain to stoichiometrically convert formaldehyde into CO<sub>2</sub>. The strain tolerated up to 1.5 mM formaldehyde and died in the presence of 10 mM. In the presence of 0.5 mM formaldehyde, a sublethal concentration of this chemical, the growth rate decreased by about 40% with respect to growth in the absence of the toxicant. Transcriptomic analysis revealed that in response to low formaldehyde concentrations, a limited number of genes (52) were upregulated. Based on the function of these genes it seems that sublethal concentrations of HCOH trigger responses to overcome DNA and protein damage, extrude this toxic compound, and detoxify it by converting the chemical to CO<sub>2</sub>. In strains bearing mutations of the upregulated genes we analysed growth inhibition by 1.5 mM HCOH and killing rates by 10 mM HCOH. Mutants in the MexEF/OprN efflux pump and in the DNA repair genes *recA* and *uvrB* were hypersensitive to 10 mM HCOH, the killing rate being three to four orders of magnitude higher than those in the wild-type strain. Mutants in other upregulated genes died at slightly higher or at similar rates to the parental strain. Regarding growth inhibition, we found that mutants in glutathione biosynthesis, stress response mediated by 2-hydroxy acid dehydrogenases and two efflux pumps of the MSF family were unable to grow in the presence of 1.5 mM HCOH. In an independent screening test we searched for mutants which were hypersensitive to formaldehyde, but whose expression did

not change in response to this chemical. Two mutants with insertions in *recD* and *fhdA* were found which were unable to grow in the presence of 1.5 mM HCOH. The *recD* mutant was hypersensitive to 10 mM HCOH and died at a higher rate than the parental strain.

## Introduction

Formaldehyde is an important building block in the manufacture of polymers and is produced at the rate of almost 30 million metric tons per year. However, formaldehyde is also a ubiquitous pollutant, probably because its highly volatile nature facilitates its dispersion through air to soils and waters. Early studies by Neely (1963) revealed that formaldehyde has bacteriostatic activity at sublethal concentrations due to its ability to disrupt growth and interfere with methionine biosynthesis. At higher concentrations formaldehyde is a potent biocidal agent and has thus been used to selectively inactivate *Bacillus anthracis* and *Bacillus subtilis* spores (Manchee *et al.*, 1994; Sagripanti and Bonifacino, 1996) in soil and liquid suspensions. Formaldehyde has also been found to be efficient as a disinfectant in holding-tank sewages, particularly at alkaline pHs (Sobsey *et al.*, 1974), and has been used to sterilize laboratory rooms and working surfaces (Taylor *et al.*, 1969).

In addition to its artificial production by chemical synthesis, formaldehyde is a subproduct in the metabolism of histidine, choline and of a number of plant-derived methoxylated aromatic chemicals such as vanillate, veratrate and caffeate (Mitsui *et al.*, 2000; Jiménez *et al.*, 2004) by certain microorganisms. Formaldehyde has also been found as a subproduct of the metabolism of certain xenobiotic compounds such as the explosive hexahydro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazine (RDX) (Fournier *et al.*, 2004), glyphosate (*N*-phosphonomethylglycine) (Shinabarger and Braymer, 1986), atropine (Long *et al.*, 1997), and methenamine, a compound used to treat urinary track infections (Musher and Griffith, 1974).

Because formaldehyde is produced naturally, microorganisms have evolved different mechanisms to counteract its toxicity. These mechanisms involve fixation through a number of metabolic pathways, and detoxification via oxidation to formate and CO<sub>2</sub>. In a number of microorganisms formaldehyde has been shown to be assimilated via the serine pathway (Myers and Paretsky, 1961; Nester

Received 18 October, 2007; accepted 20 October, 2007. \*For correspondence. E-mail jramos@eez.csic.es; Tel. (+34) 958 181600 ext. 289; Fax (+34) 958 135740.

and Spizien, 1961) or the allulose pathway (ribulose phosphate cycle) (Goldberg and Matelis, 1975). *Burkholderia cepacia* growing on vanillate as a carbon source was shown to induce 3-hexulose-6-phosphate synthase and 6-phospho-3-hexuloisomerase (Mitsui *et al.*, 2000) to fix the formaldehyde produced. This pathway has also been shown to operate in the Gram-positive facultative methylotrophs *Mycobacterium gastri* MB19 (Mitsui *et al.*, 2000), *Bacillus methanolicus* (Jakobsen *et al.*, 2006) and in the archeon *Thermococcus koda* (Orita *et al.*, 2006). In addition, *Burkholderia fungorum* LB400 exhibits multiple pathways for formaldehyde detoxification (Marx *et al.*, 2004).

Kummerle and colleagues (1996) showed that *Escherichia coli* VU3695 bears a plasmid encoding a glutathione- and an NAD<sup>+</sup>-dependent formaldehyde dehydrogenase that conferred a formaldehyde-resistant character to the strain. Similarly, an *fghA* mutant of *Parococcus denitrificans* defective in glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase was found to be unable to grow on methanol because of the accumulation of formaldehyde. In the *Methylobacterium extorquens* facultative methylotroph, inactivation of the H<sub>4</sub>MPT pathway led to increased sensitivity to formaldehyde (Vorholt *et al.*, 2002; Marx *et al.*, 2003).

Our laboratory is interested in applying microbiological and molecular biological findings to the design of a treatment plant to degrade toxic products derived from the work done in molecular biology laboratories. One of the toxic products identified thus far is formaldehyde, which is

## Microarrays revealed *P. putida* responses to toxins 159

often used as a disinfectant or as a cross-linker in the study of protein interactions, in sample fixation for microscopy and in other assays such as in northern blotting. *Pseudomonas putida* KT2440 is a soil microorganism (Table 1 and Ramos-González *et al.*, 1991; Molina *et al.*, 2000; Nakazawa, 2002) able to assimilate histidine and a number of methoxylated lignin-derived products (Jiménez *et al.*, 2004; Duque *et al.*, 2007a). Formaldehyde is produced in the metabolism of these chemicals, and this led us to explore whether *P. putida* KT2440 could metabolize formaldehyde, and to test its tolerance to this toxic compound. We found that strain KT2440 is highly tolerant to formaldehyde and that at the transcriptomic level this microorganism responds to sublethal concentrations of HCOH by upregulating 52 genes that fall within the categories of DNA repair, protein folding, efflux pumps, stress response, general metabolism and proteins of unknown function. We also found that the *recD* gene, whose transcriptional level did not change in response to HCOH, acts as a safeguard in formaldehyde tolerance, and that its inactivation has dramatic effects on the survival of *P. putida* KT2440 in the presence of this toxic compound.

## Results

### *Pseudomonas putida* KT2440 detoxifies formaldehyde

The annotation of the *P. putida* KT2440 genome showed three potential open reading frames (ORFs) that could

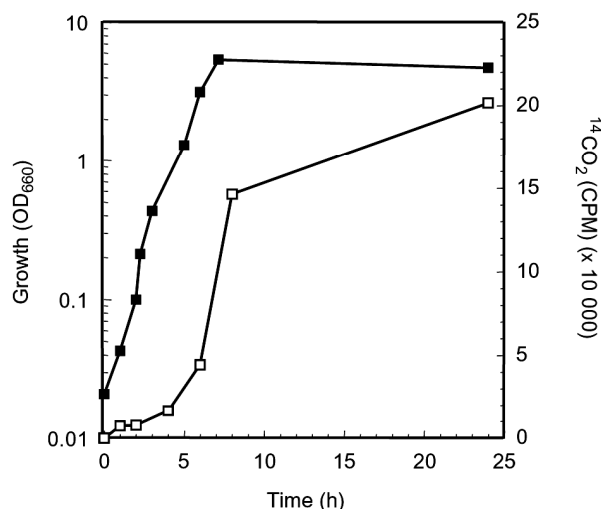
**Table 1.** Strains used in this study.

Strain	Relevant characteristics	Reference
<i>P. putida</i> KT2440	Parental strain	
<i>P. putida</i> KT2440R	Rifampicin resistant, derivative of KT2440	Espinosa-Urgel and Ramos (2004)
Mutant (locus)		
PRCC <i>gshA</i> (PP0243)	Glutamate-cysteine ligase	Duque <i>et al.</i> (2007a)
PRCC <i>fdhD</i> (PP0257)	Formate dehydrogenase accessory protein FdhD	Duque <i>et al.</i> (2007a)
PRCC (PP0566)	Translation initiation factor SU11	Duque <i>et al.</i> (2007a)
PRCC <i>xenB</i> (PP0920)	Xenobiotic reductase B	Duque <i>et al.</i> (2007a)
PRCC <i>argI</i> (PP1000)	Ornithine carbamoyl transferase catabolic	Duque <i>et al.</i> (2007a)
PRCC (PP1616)	D-isomer specific 2-hydroxy acid dehydrogenase family protein	Duque <i>et al.</i> (2007a)
PRCC (PP1617)	Putative esterase	Duque <i>et al.</i> (2007a)
PRCC <i>recA</i> (PP1629)	RecA protein	Duque <i>et al.</i> (2007a)
PRCC (PP1974)	Excinuclease ABC, B subunit	Duque <i>et al.</i> (2007a)
PRCC (PP2426)	D-isomer specific 2-hydroxy acid dehydrogenase	Duque <i>et al.</i> (2007a)
PRCC (PP2646)	Conserved hypothetical protein	Duque <i>et al.</i> (2007a)
PRCC (PP2647)	Major facilitator family transporter	Duque <i>et al.</i> (2007a)
PRCC (PP2695)	Transcriptional regulator LysR family	Duque <i>et al.</i> (2007a)
PRCC <i>mexE</i> (PP3425)	Multidrug efflux RND membrane fusion protein MexE	Duque <i>et al.</i> (2007a)
PRCC (PP3658)	Aromatic compound MFS transporter, putative	Duque <i>et al.</i> (2007a)
PRCC <i>vanA</i> (PP3736)	Vanillate demethylase A	Duque <i>et al.</i> (2007a)
PRCC (PP3970)	Formaldehyde dehydrogenase, putative	Duque <i>et al.</i> (2007a)
PRCC <i>uvrC</i> (PP4098)	Excinuclease ABC, C subunit	Duque <i>et al.</i> (2007a)
PRCC (PP4180)	Conserved hypothetical protein	Duque <i>et al.</i> (2007a)
PRCC (PP4672)	Exodeoxyribonuclease V, alpha subunit	Duque <i>et al.</i> (2007a)
PRCC (PP5107)	Monofunctional biosynthetic peptidoglycan transglycosylase	Duque <i>et al.</i> (2007a)
PRCC (PP5174)	Efflux membrane fusion protein RND family	Duque <i>et al.</i> (2007a)
PRCC (PP5184)	Putative glutamine synthetase	Duque <i>et al.</i> (2007a)

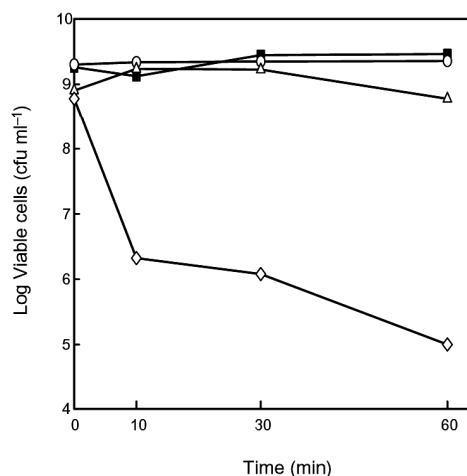
All mutant strains are mini-Tn5 derivatives of KT2440 and are therefore kanamycin resistant.

encode proteins with formaldehyde dehydrogenase activity, and two clusters of genes that could encode potential formate dehydrogenase complexes. Of the three ORFs encoding formaldehyde dehydrogenase, PP0328 and PP3970 were predicted to encode functional proteins, whereas PP1939 was predicted to encode a truncated protein (Nelson *et al.*, 2002). The detoxification pathway from formaldehyde to  $\text{CO}_2$  provides two relevant pieces of physiological data. (i) *Pseudomonas putida* KT2440 cannot use formaldehyde (1 mM) or formate (10 mM) as a carbon source, which is in agreement with the lack of metabolic enzymes for C1 metabolism in the genome of *P. putida* KT2440. (ii) Incubation of *P. putida* KT2440 in LB medium with  $^{14}\text{C}$ -formaldehyde (0.5 mM) led to the complete conversion of the labelled aldehyde into  $^{14}\text{CO}_2$ . In this assay cells grown overnight on LB medium were diluted to an initial turbidity of 0.02 at 660 nm. After 1 h of incubation we added a mixture of  $\text{H}^{14}\text{COH}$  and  $\text{HCOH}$  so that the number of counts per minute (CPM) was about  $2.2 \pm 0.1 \times 10^5$  in the culture medium. Growth and  $\text{CO}_2$  production were monitored. Figure 1 shows that  $^{14}\text{CO}_2$  production and growth were parallel and that more than 95% of the original  $^{14}\text{C}$ -CPM was recovered as  $^{14}\text{CO}_2$ -CPM. No  $^{14}\text{C}$  was incorporated in the cell biomass.

To analyse the response of *P. putida* KT2440 to formaldehyde we first established the strain's level of tolerance to this toxic compound. To this end we tested the effect of increasing concentrations of formaldehyde on growth in LB culture medium, and found that the parental strain grew with a doubling time of about  $1.3 \pm 0.1$  h.



**Fig. 1.** Growth of *P. putida* KT2440 in the presence of low  $\text{H}^{14}\text{COH}$  concentrations and production of  $^{14}\text{CO}_2$ . An overnight culture of KT2440 was diluted 100-fold and supplemented with 0.5 mM  $\text{H}^{14}\text{COH}$  1 h later so that the total  $^{14}\text{C}$  count added was around  $2.2 \pm 0.1 \times 10^5$  CPM.  $^{14}\text{CO}_2$  was collected on a 2 N NaOH solution placed into a tube sealed at the bottom of the culture flask. At the indicated times growth (■) and  $^{14}\text{CO}_2$  (□) were monitored.



**Fig. 2.** Killing kinetics of *P. putida* KT2440 upon exposure to different HCOH concentrations. The parental KT2440 strain was grown to reach the exponential phase (turbidity of  $0.85 \pm 0.05$  at 660 nm), and at  $t = 0$  the culture was divided in four aliquots to which we added nothing (■) or 0.5 mM (○), 1 mM (Δ) or 10 mM (◇) formaldehyde. At the indicated times the number of viable cells was estimated by spreading appropriate dilutions on LB plates.

Formaldehyde concentrations  $\geq 1.6$  mM completely inhibited growth (not shown), although near 100% of the initial cells survived for more than 24 h. Lower concentrations of formaldehyde had less acute effects, i.e. in the presence of 0.5 mM formaldehyde cells grew at a rate of about  $2.1 \pm 0.1$  h, which is about 40% slower than in the absence of the toxic chemical.

We also tested the response of KT2440 cells in the exponential phase to sudden shocks of biocidal concentrations of HCOH (10 mM). We found that the addition of this concentration of HCOH resulted in a steady decrease in viable cells from about  $2 \times 10^9$  colony-forming units (cfu)  $\text{ml}^{-1}$  to about  $10^5$  cfu  $\text{ml}^{-1}$  in 60 min (Fig. 2). The addition of 0.5–1 mM HCOH had no influence on the level of survival (Fig. 2). The above series of results indicated that *P. putida* can withstand up to 1.5 mM HCOH in the culture medium, and that concentrations as low as 0.5 mM do not affect survival but slightly retard growth, indicating that the strain 'senses' this sublethal concentration of HCOH.

#### Global response of *P. putida* KT2440 to sublethal formaldehyde concentrations

Efficient protection systems involving specific enzymes have emerged throughout evolution as stress responses to the exposure of microorganisms to unfavourable conditions (Mortersz *et al.*, 2004; Palma *et al.*, 2004; Maeda *et al.*, 2008). Based on the physiological data reported above, we decided to establish the global transcriptional response of *P. putida* KT2440 to a sublethal HCOH con-

centration, i.e. 0.5 mM (see *Experimental procedures*). Upon formaldehyde treatment, *P. putida* KT2440 upregulated 52 genes and downregulated 14 (see Table 2 for upregulated genes and Table S1 for downregulated genes). Figure 3 shows the upregulated genes arranged according to general functions, and Table 2 shows the set of specific genes induced, their fold change and their role

category. We were able to distinguish seven specific groups of genes (Fig. 3): DNA repair (Group 1), protein fate (Group 2), stress responses (Group 3), general metabolism (Group 4), membrane proteins (Group 5), regulators (Group 6) and the set of hypothetical proteins plus proteins of unknown function (Group 7). Group 1 includes a set of three enzymes involved in DNA repair.

**Table 2.** Genes upregulated in *P. putida* KT2440 (pWW0) 20 min after the addition of HCOH.

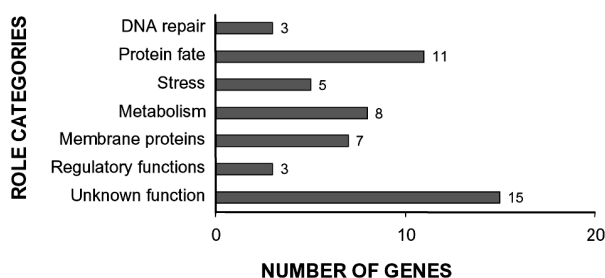
TIGR identifier	Gene product	Gene name	Change (fold)	Role category <sup>a</sup>	Mutant <sup>b</sup>
PP_0088	Conserved hypothetical protein		2.57	7	
PP_0243	Glutamate-cysteine ligase	<i>gshA</i>	2.29	3	Y
PP_0257	Formate dehydrogenase accessory protein FdhD	<i>fdhD</i>	4.64	4	Y
PP_0266	Conserved hypothetical protein		6.85	7	
PP_0565	IPP isomerase type 1 family protein		2.11	7	
PP_0566	Translation initiation factor SU11		2.41	2	Y
PP_0625	ATP-dependent Clp protease, ATP-binding subunit ClpB	<i>clpB</i>	1.87	2	
PP_0840	Serine O-acetyltransferase	<i>cysE</i>	2.10	4	
PP_0864	Ornithine decarboxylase, putative		2.28	4	
PP_0920	Xenobiotic reductase B	<i>xenB</i>	1.89	3	Y
PP_1000	Ornithine carbamoyltransferase	<i>argI</i>	1.84	4	Y
PP_1360	Chaperonin, 10 kDa	<i>groES</i>	3.30	2	
PP_1361	Chaperonin, 60 kDa	<i>groEL</i>	2.40	2	
PP_1383	BenF-like porin		2.22	5	
PP_1410	Conserved hypothetical protein		1.93	7	
PP_1474	Hypothetical protein		2.13	7	
PP_1615	Transcriptional regulator, LysR family		1.95	6	
PP_1616	D-isomer specific 2-hydroxy acid dehydrogenase family protein		9.21	3	Y
PP_1617	Esterase, putative		2.59	7	Y
PP_1629	RecA protein	<i>recA</i>	2.02	1	Y
PP_1639	SprT protein, putative		4.91	3	
PP_1640	Conserved hypothetical protein		3.23	7	
PP_1974	Excinuclease ABC, B subunit	<i>uvrB</i>	2.17	1	Y
PP_1982	Heat-shock protein lbpA	<i>lbpA</i>	8.25	2	
PP_2302	ATP-dependent protease La	<i>lon-2</i>	2.12	2	
PP_2426	D-isomer specific 2-hydroxy acid dehydrogenase family protein		6.11	3	Y
PP_2568	Ring-cleaving dioxygenase		2.06	4	
PP_2646	Conserved hypothetical protein		2.17	7	Y
PP_2647	Major facilitator family transporter		1.85	5	Y
PP_2695	Transcriptional regulator, LysR family		2.12	6	Y
PP_3183	SCO1/SenC family protein/cytochrome c		3.13	5	
PP_3254	Nucleosidase, putative	<i>uvrC</i>	2.07	1	
PP_3269	Conserved hypothetical protein		2.64	7	
PP_3314	Heat shock protein, HSP20 family		1.91	2	
PP_3321	Conserved hypothetical protein		1.89	7	
PP_3349	Major facilitator family transporter		2.11	5	
PP_3425	Multidrug efflux RND transporter, membrane fusion protein MexE	<i>mexE</i>	3.47	5	Y
PP_3427	Multidrug efflux RND outer membrane protein OprN	<i>oprN</i>	3.28	5	
PP_3658	Aromatic compound MFS transporter, putative		3.51	5	Y
PP_3737	Vanillate O-demethylase oxidoreductase	<i>vanB</i>	2.40	4	Y
PP_3773	Hypothetical protein		5.10	7	
PP_3901	Conserved hypothetical protein		1.99	7	
PP_4178	Dienelactone hydrolase family protein		2.90	4	
PP_4180	Conserved hypothetical protein		3.54	7	Y
PP_4725	Dihydrodipicolinate reductase	<i>dapB</i>	2.11	4	
PP_4727	DnaK protein	<i>dnaK</i>	2.33	2	
PP_4728	Heat shock protein GrpE	<i>grpE</i>	3.40	2	
PP_4770	Conserved hypothetical protein		2.23	7	
PP_5000	Heat shock protein HslV	<i>hslV</i>	2.40	2	
PP_5001	Heat shock protein HslVU, ATPase subunit HslU	<i>hslU</i>	2.83	2	
PP_5119	Transcriptional regulator TetR family		2.33	6	
PP_5362	Conserved hypothetical protein		2.37	7	

a. Role categories: 1, DNA repair; 2, protein fate; 3, stress; 4, metabolism; 5, membrane proteins; 6, regulatory functions; 7, hypothetical proteins and proteins of unknown function.

b. Mutants used in this study (available at the PRCC) are indicated by Y (yes).

© 2007 The Authors

Journal compilation © 2007 Society for Applied Microbiology and Blackwell Publishing Ltd, *Microbial Biotechnology*, 1, 158–169



**Fig. 3.** Selected gene categories of *P. putida* KT2440 that showed upregulated expression in response to formaldehyde. Upregulated genes are those that passed the screening criterion of 1.8-fold or greater change in expression level (treatment/control ratio) and had a *P*-value of < 0.05. *P*-values for changes in expression were tested with Student's *t*-test run with Almazen software.

Formaldehyde is known to damage DNA (Englesberg, 1952; Liu *et al.*, 2006), and it is therefore not surprising for this kind of enzymes to be induced in response to formaldehyde. Repair and recombination systems, including *uvrB* (PP1974), *uvrC* (PP3254) and *recA* (PP1629), were induced more than twofold in response to sublethal HCOH concentrations (Table 2).

One of the groups best represented by upregulated genes was the protein fate group (Group 2), which includes a number of chaperones and is related with the well-established fact that aldehydes are highly reactive molecules that inactivate proteins (Liu *et al.*, 2006). Activated genes include *dnaK* (PP4727), *groEL* (PP1361), and a variety of chaperones and proteases (PP0625, PP1360, PP1982, PP2302, PP4728, PP5000 and PP5001) (Table 2). GroEL was shown to be a general stress response protein that is rapidly produced in activated sludge exposed to stress (Duncan *et al.*, 2002). In *E. coli* this chaperone, together with its cofactor GroES, promoted folding and could interact with as many as 250 different proteins (Kerner *et al.*, 2005). Proteolysis is another stress mechanism used by bacteria (Henderson *et al.*, 2006). Transcripts for three ATP-dependent proteases (ClpB, Lon-2, HslUV) were present at significantly higher levels in formaldehyde-treated cells than in control cells (Table 2). The Lon protease can degrade misfolded proteins and ClpB can promote ATP-dependent regulation of unfolding or disassembling proteins.

Group 3 was represented by a set of genes that encode proteins that protect against stress induced by toxic chemicals. The cytotoxic effects of formaldehyde may be increased under conditions in which free radicals are produced (Saito *et al.*, 2005). In our assays two 2-hydroxy acid dehydrogenase family proteins (PP1616 and PP2426) were induced more than sixfold. Other genes whose expression levels increased more than twofold were the *gshA* gene (PP0243), whose gene product is

involved in the biosynthesis of glutathione; the gene-encoding PP1639, a stress protein homologue to the *E. coli* SprT protein; and the xenobiotic reductase, XenB (PP0920). These proteins are involved in responses to oxidative stress (Segura *et al.*, 2005), and some of them work in conjunction to protect biological membranes from degradation through GSH-dependent reduction of peroxidized phospholipids (Ferguson *et al.*, 2006).

Among members of the metabolism group (Group 4), formaldehyde induced expression of one of the formate dehydrogenase genes, PP0257, which was induced more than 4.5-fold (Table 2). This confirms the expected response of KT2440 to HCOH. In certain microorganisms exposure to toxic chemicals leads to the general down-regulation of biosynthetic functions such as general metabolism and nucleotide and nucleic acid metabolism. This is the case in *Nitrosomonas europaea* when exposed to chloroform (Gvakharia *et al.*, 2007) and in *P. putida* exposed to toluene (Domínguez-Cuevas *et al.*, 2006). In contrast to these observations, we found that exposure of *P. putida* to formaldehyde induced a number of genes related to amino acid metabolism and breakdown of vanillic acid. The latter is particularly surprising because formaldehyde is a by-product in the catabolism of vanillic acid, and one would not expect a pathway to be induced by an end-product.

In Group 5 (membrane proteins) three drug transport systems involved in the extrusion of toxic chemicals were induced (Poole, 2004). *Pseudomonas putida* KT2440 has almost 30 extrusion pumps potentially involved in detoxification (Ramos *et al.*, 2001; 2002; Nelson *et al.*, 2002). The *mexEF* pump genes together with the *oprN* gene were induced more than threefold in *P. putida* KT2440 in response to formaldehyde, which indicates that the MexEF/OprN efflux pump (PP3425, PP3427) could indeed be involved in the extrusion of this chemical. Two other potential efflux pumps belong to the major facilitator family and correspond to PP3349, which was induced 2.11-fold, and PP3658, which was induced 3.51-fold.

We found that three regulatory proteins, namely PP1615, PP2695 and PP5119, were upregulated. This set of proteins were members of Group 6, and at present the specific targets controlled by these regulators are unknown, but they may be involved in the control of some of the other upregulated genes. The last group (Group 7) included 15 proteins of unknown function or hypothetical proteins.

#### *Response to formaldehyde of mutants in genes upregulated in response to formaldehyde*

The *Pseudomonas* Reference Culture Collection (PRCC) has constructed a bank of mini-Tn5 mutants of *P. putida* KT2440 (Duque *et al.*, 2007a), in which strains with muta-



**Table 3.** Doubling time of *P. putida* and its isogenic mutants in the presence of formaldehyde.

UP mutant (TIGR identifier)	Gene product	Doubling time (h) <sup>a</sup>
KT2440R		2.1
PP_0243	Glutamate-cysteine ligase	No growth
PP_0257	Formate dehydrogenase FdhD	15.3
PP_0566	Translation initiation factor SUI1	2.4
PP_0920	Xenobiotic reductase B	2.4
PP_1000	Ornithine carbamoyltransferase	No growth
PP_1616	D-isomer specific 2-hydroxy acid dehydrogenase	No growth
PP_1617	Esterase, putative	8.7
PP_1629	RecA protein	2.8
PP_1974	Uvr B	2.2
PP_2426	D-isomer specific 2-hydroxy acid dehydrogenase	9.5
PP_2647	Major facilitator family transporter	8.8
PP_2648	Universal stress protein family	8.2
PP_2695	Transcriptional regulator LysR family	2.5
PP_3425	Multidrug efflux RND membrane fusion protein MexE	4.7
PP_3658	Aromatic compound MFS transporter, putative	14.0
PP_3736	Vanillate demethylase A	17.9
PP_3970	Formaldehyde dehydrogenase	14.4
PP_4098	Excinuclease ABC, C subunit	10.7
PP_4180	Conserved hypothetical protein	No growth
PP_4672	RecD protein	17.1

a. The parental strain or its mutant derivatives were incubated on LB medium with 1.5 mM formaldehyde to an initial turbidity of about 0.05 units at 660 nm. Growth was monitored for at least 24 h and doubling times were estimated at the exponential phase.

tions in around 30% of ORFs have been mapped by sequencing the gene with the mini-Tn5 insertion (Duque *et al.*, 2007a). We requested from this collection all available mutants in genes that are upregulated in response to formaldehyde (marked Y in Table 2). This allowed us to test mutants in all seven groups, including *recA* and *uvrB* mutants in the DNA repair group, and mutants in PP0566 in the protein fate group. In the group of stress functions we requested a *gshA* mutant encoding PP0243, annotated as involved in glutathione biosynthesis, and a mutant in the *xenB* gene encoding PP0920, which is involved in the response to xenobiotics (Segura *et al.*, 2005). In this group we obtained mutants deficient in the synthesis of PP2426 or PP1616, which encodes putative D-isomer-specific 2-hydroxy acid dehydrogenase enzymes, i.e. two of the proteins with the highest induction level (the change was 9.2-fold for PP1616 and 6.11 for PP2426). Within the group of membrane proteins, a mutant with a mini-Tn5 insertion in the *mexE* gene was available; this gene encodes the efflux element of a drug extrusion RND pump. We also requested an *argI* mutant; this gene encodes PP1000, annotated as involved in ammonium detoxification through the arginine pathway. We also included in the series of assays a mutant in PP2695, one of the regulatory proteins. In the group of hypothetical proteins we used mutants deficient in PP1617 and PP2646. In the general metabolism group, a mutant in the *vanB* gene was available.

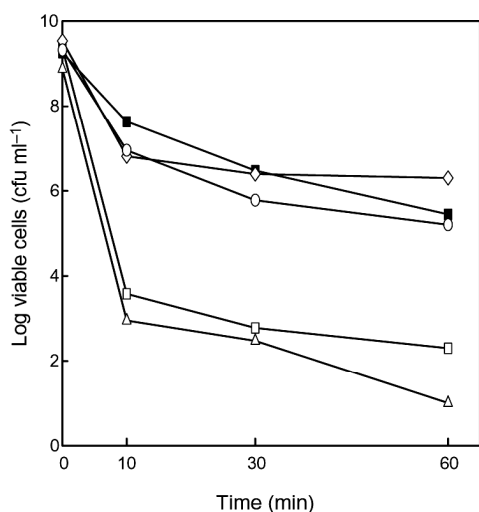
The assays were designed to determine growth rates in the presence of 1.5 mM HCOH and killing kinetics after exposure to 10 mM HCOH. The findings for growth rates

disclosed three types of mutants in upregulated genes. Type 1 included four mutants (PP0243, PP1000, PP1616 and PP4180) (Table 3) that failed to grow at all in the presence of 1.5 mM HCOH. The second type consisted of mutants whose growth rates were at least twofold lower than that of the wild type (PP1617, PP2426, PP2647, PP2648, PP3425, PP3658, PP3736, PP4098 and PP4672), and the third type comprised five mutants that grew at a rate similar to the parental strain (PP0566, PP0920, PP1629, PP1974, PP2695).

The results of the killing kinetics assays distinguished two groups: one group in which the killing rate was similar to that of the wild type, and represented in Fig. 4 by mutants in the *gshA* and *xenB* genes, and another in which the mutants died at a faster rate than the parental strain. This group includes three mutants, namely, mutants deficient in the DNA repair genes *recA* (PP1629) and *uvrB* (PP1974) (see killing kinetics in Fig. 4) and in the MexE efflux pump. All of these mutants were particularly sensitive to HCOH shocks. These results suggest that many upregulated genes indeed play a role in tolerance to formaldehyde.

#### *Mutant response to formaldehyde in downregulated genes*

Two mutants deficient in PP5107 and PP5184 that encode *mtgA*, and one of the three glutamine synthetases, respectively, were available among the set of downregulated genes. These mutants grew in the presence of 1.5 mM HCOH at the same rate as the parental



**Fig. 4.** Killing kinetics of *P. putida* KT2440 and isogenic mutants upon exposure to HCOH concentrations. The parental KT2440 strain (■) and its isogenic mutant in *recD* (Δ), *uwrB* (□), *xenB* (○), and *gshA* (◇) were exposed at  $t = 0$  to 10 mM HCOH. At the indicated times the number of viable cells was estimated by spreading appropriate dilutions on LB plates.

strain, and their killing kinetics were almost identical to that of the parental strain (not shown). This suggests that these gene products play no role in tolerance to formaldehyde.

#### Identification of other potential gene products involved in HCOH tolerance whose transcriptional level did not change in response to this toxic compound

It is known from studies on innate tolerance to drugs that certain genes that encode stress response functions are not regulated. Therefore, these genes cannot be identified with microarray assays, as they will be masked in the set of genes whose variations are considered non-significant. The approach we took consisted on identifying mutants unable to grow in the presence of 0.5 mM HCOH. To this end a bank of 5000 independent mini-Tn5 mutants was constructed, as described in *Experimental procedures*, and tested to find mutants in genes other than those that were upregulated. This allowed us to identify six mutants. Sequencing of the mini-Tn5 insertion site revealed knock-outs in only two new genes. The insertions were in the *recD* gene encoding RecD (PP4672), which is involved in DNA repair and in the *fhdA* gene encoding a glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase (PP3970). These mutants were also exposed to 0.5 mM HCOH (test for growth inhibition) and 10 mM HCOH (to establish their killing kinetics). Figure 4 shows that the killing rate of the *recD* mutant in the presence of 10 mM HCOH was two orders of magnitude faster than in the parental strain. Growth of the *recD* mutant was deficient in the presence

of 0.5 mM HCOH, with a doubling time that was almost eightfold higher than that of the parental strain (Table 3).

As mentioned above, we found a mutant (PP3970) in the formaldehyde to CO<sub>2</sub> pathway was found, and we tested the effect of deficiency in HCOH metabolism in tolerance to this toxic compound. The rate of killing in the presence of 10 mM HCOH was similar to that of the parental strain (Nelson *et al.*, 2002); however, growth was strongly inhibited by 1.5 mM HCOH. The doubling time was above  $14.4 \pm 0.2$  h, which is about sevenfold higher than that of the parental strain.

#### Discussion

We have shown that *P. putida* exhibits an innate level of tolerance to formaldehyde that allows it to grow in the presence of up to 1.5 mM of this compound. This level of resistance is similar to that tolerated by *E. coli* (Kummerle *et al.*, 1996), *Burkholderia* (Marx *et al.*, 2004), *Mycobacterium* (Mitsui *et al.*, 2000), *Bacillus* or *Methylobacterium* (Trujillo and Lindell, 1973; Jakobsen *et al.*, 2006; Orita *et al.*, 2006), and as it is a non-pathogenic strain with high potential for biodegradation (Abril *et al.*, 1989; Jiménez *et al.*, 2004) we decided to study in detail its response to this toxic compound. We found that concentrations of formaldehyde 6.6-fold higher than those that inhibit growth lead to cell death, which indicates that once the safeguard system against this compound is circumvented, cells are killed.

In this study we identified genes involved in the response of *P. putida* KT2440 to sublethal concentrations of formaldehyde, which has helped us to understand the initial response of the strain to this toxic compound. We have also analysed a set of mutants in upregulated genes, and studied their ability to grow in the presence of sublethal concentrations of HCOH and survive at high HCOH concentrations. Correlations between gene induction, growth inhibition and increased sensitivity to HCOH allowed us to establish a network of genes that encode proteins involved in response to this toxic chemical.

Several pathways for the metabolism of formaldehyde into formate and their simultaneous functioning have been shown to exist in *Burkholderia* (Marx *et al.*, 2003; 2004). Mutations in any of these pathways led to increased formaldehyde sensitivity when *Burkholderia* cells were grown on methanol. Formaldehyde in *P. putida* KT2440 can be detoxified through two oxidation pathways that allow toxic aldehyde to be converted to the less toxic formate, which is subsequently converted into CO<sub>2</sub>. <sup>14</sup>C assays allowed us to record mass balances, which revealed the complete lack of incorporation of <sup>14</sup>C-formaldehyde into cell carbon skeletons. This contrasts with studies in other *Pseudomonas* sp. strains that have been reported to grow on formaldehyde through the use of the ribulose monophosphate

pathway (Goldberg and Matelis, 1975). One of our mutant strains with a defect in one of the formaldehyde dehydrogenases (PP3970) grew more slowly than the parental strain in the presence of 1.5 mM HCOH. This indicates that HCOH conversion to CO<sub>2</sub> is also a relevant detoxification pathway in *P. putida*.

Based on the analysis of the growth rates in the presence of sublethal concentrations of HCOH and the killing rates of the mutants, we suggest that in addition to the detoxification system, other systems were efficiently operating to protect KT2440 from formaldehyde. A potential mechanism for formaldehyde tolerance is the active extrusion of HCOH by the cells. In this connection it is worth noting that the MexEF/OprN extrusion pump was specifically induced in response to formaldehyde. To provide support for the role of the MexEF efflux pump in tolerance to formaldehyde, we tested HCOH tolerance in a *mexE*-deficient background. We found that the strain died more quickly than the wild type at high HCOH concentrations, and that growth on LB supplemented with 1.5 mM HCOH was significantly more slowly than that of the parental strain (Table 3). This suggests that HCOH extrusion is relevant at any concentration of this toxic compound. To our knowledge this is the first case in which an RND efflux pump is identified as able to remove a small molecule such as HCOH. RND efflux pumps can remove substrates from the periplasmic space, the cell membrane and the bacterial cytoplasm (Yu *et al.*, 2005; Takatsuka and Nikaido, 2006). Given the nature of HCOH, this chemical probably enters the vestibule of the pump from the cytoplasm.

It should also be noted that two other efflux pumps belonging to the MFS family (PP2647 and PP3658) were also induced. These mutants grew at least four times more slowly than the parental strain at low concentrations; however, their behaviour in killing assays was similar to that of the parental strain. This indicates that the two MFS efflux pumps play a role in tolerance to low HCOH concentrations.

In agreement with earlier studies in other microorganisms showing that HCOH damages both DNA and proteins (Englesberg, 1952) is our finding that a set of DNA-repairing genes was induced together with chaperones with protease activity. Mutants deficient in DNA repair *recA*, *recD* and *uvrB* genes were extremely sensitive to high concentrations of formaldehyde with killing rates around 1000-fold faster than the parental strain, indicating that DNA repair is of utmost importance in tolerance to damage at the genetic level. The *uvrB* and *recA* mutants are interesting as at sublethal HCOH concentrations they can grow at rates similar to the parental strain; however, they were hypersensitive at high HCOH concentrations. This contrasts with the *recD* mutant, which grew very slowly at low HCOH concentrations, suggesting that

*Microarrays revealed P. putida responses to toxins* 165

constitutive levels of RecD are *sine qua non* for survival. No chaperone-deficient mutants are available at present in *P. putida*; however, because of the large number of induced chaperones and their overlapping activities, we assumed that single mutants would not be as sensitive as mutants in the DNA repair system.

Formaldehyde can also lead to a kind of oxidative stress through alterations in the functioning of the respiratory chain (Nachin *et al.*, 2005). In agreement with this hypothesis, some oxidative stress systems, such as hydroxy acid dehydrogenases and glutathione biosynthesis, were found to be induced by formaldehyde. Mutants deficient in the synthesis of glutathione or in PP1616 and PP2426, which encode the two D-isomer-specific 2-hydroxy acid dehydrogenases, failed to grow or grew deficiently in the presence of sublethal concentrations of formaldehyde. We propose that under adverse conditions, *P. putida* KT2440 sets up a process intended to survive rather than to grow.

Although transcriptomic approaches helped us to identify genes that were induced or repressed in response to formaldehyde as an environmental cue, not all induced genes play a role in these responses, and gratuitous induction has been observed (Ramos *et al.*, 2001). For instance, in *P. putida* DOT-T1E and *P. putida* S12, exposure to toluene led to an increase in the expression of fructose-1,6-bisphosphate aldolase and phosphoenolpyruvate carboxykinase, but mutants in these genes exhibited parental behaviour (Segura *et al.*, 2005). In this connection we found that mutants in XenB (PP0920) and the translation initiation factor SUI1 (PP0566) showed parental behaviour. This could be due to the presence of multiple equivalent genes, as it is known that up to six *xenB*-like genes exist in *P. putida* (P. van Dillewijn, R. Wittich and J.L. Ramos, unpubl. data), and several translational initiation factors are encoded in the chromosome of the strain. If they have overlapping activities, the loss of one of them may not significantly affect growth.

We also hypothesized that the expression of genes that encode proteins essential for formaldehyde tolerance may not be induced in response to this chemical. To test whether this was the case in HCOH resistance, we generated a bank of 5000 mini-Tn5 independent mutants and searched for HCOH-sensitive ones. In this screening we found two more mutants, one in the *recD* gene and another in the *fhdA* gene; the level of expression of these genes did not change significantly in response to formaldehyde. As the RecD protein is involved in DNA repair, our results further support that DNA repair is critical for survival when cells are exposed to low concentrations of HCOH. As mentioned in *Introduction*, *P. putida* metabolizes a number of methoxylated aromatic compounds that yield formaldehyde as a by-product (Jiménez *et al.*, 2004). The constitutively expressed RecD protein may

166 A. Roca, J.-J. Rodríguez-Herva, E. Duque and J. L. Ramos

represent the first barrier acting as an innate defence against internally produced formaldehyde. In this regard the constitutively expressed PP3970 formaldehyde dehydrogenase participates in the detoxification of HCOH via its conversion to innocuous formate, which is subsequently converted to CO<sub>2</sub>.

In summary, our results show that *P. putida* is highly resistant to formaldehyde, and that resistance is multifactorial. According to our observations, resistance can involve detoxification via conversion of the toxic chemical to CO<sub>2</sub>, extrusion of this molecule by the MexEFOprN efflux pump, induction of a large series of enzymes that protect DNA and protein from direct HCOH damage, and from lateral effects such as oxidative damage. Mutants in any of the systems lead to increased sensitivity to the toxic compound. However, the intimate mechanisms leading to the activation of genes and the potential cascade of regulation have not yet been elucidated.

## Experimental procedures

### Bacterial strains and growth conditions

The strains and plasmids used in this study are shown in Table 1. Bacterial cells were grown on LB medium at 30 °C or on modified M9 minimal medium with glucose [0.5% (w/v)] or citrate (16 mM) as a carbon source (Abril *et al.*, 1989; Duque *et al.*, 2007b).

### Mineralization of <sup>14</sup>C-formaldehyde

In experiments with <sup>14</sup>C-formaldehyde, erlenmeyer flasks with a small tube sealed at the bottom of the flask were used. In the small tube 5 ml of a 2 N NaOH solution was placed to collect evolved <sup>14</sup>CO<sub>2</sub>.

### Mini-Tn5 mutagenesis

For mini-Tn5 mutagenesis we followed the protocol described by De Lorenzo and colleagues (1990). *Pseudomonas putida* KT2440 was mated for 4 h with *E. coli* CC118λpir (pUT-Km, pRK600). Cells were then suspended and around 20 000 transconjugants were selected on M9 minimal medium with citrate and 25 µg ml<sup>-1</sup> kanamycin. Transconjugants were screened for formaldehyde sensitivity using a Pick Up robot. Clones were spotted onto 96-well ELISA plates with and without 0.5 mM formaldehyde. Clones that did not grow with formaldehyde were considered formaldehyde-sensitive and were kept for further assays.

### Formaldehyde shock assays in liquid culture medium

Cells were grown overnight in 30 ml of LB medium. On the following day the cultures were diluted 1:100 in the same medium and grown under the same conditions. When the cultures reached the mid-exponential growth phase (turbidity of 0.85 ± 0.05 at 660 nm) they were divided in two halves.

We added 10 mM HCOH to one of the aliquots, and the other one was kept as a control. The number of viable cells was determined as cfu ml<sup>-1</sup> before the stressor agent was added and 10, 30 and 60 min later. These assays were run in duplicate and repeated at least three times. The values reported here are the average of at least four determinations.

### DNA techniques

Plasmid DNA was isolated according to the alkaline lysis method with the QIAprep Spin Plasmid Minipreps Kit. Total DNA was isolated as described by Ramos-González and colleagues (1991). DNA digestions with restriction enzymes, ligations and transformations were performed with standard procedures. For PCRs the standard mixture (25 µl) contained 10 ng of DNA, 200 µM of each deoxynucleoside triphosphate, 50 pmol of each primer, 2 µl of dimethyl sulfoxide and 0.25 U of *Taq* polymerase. The PCR conditions were as follows: 4 min at 95°C and then 35 cycles at 60°C for 45 s, 72°C for 30–180 s and 94°C for 4 s, followed by a final 5 min step at 72°C.

### *Pseudomonas putida* microarrays

*Pseudomonas putida* arrays (Progenika, Spain) consisting of 5539 gene-specific oligonucleotides (50-mer) spotted in duplicate onto γ-amino silane-treated 25 × 75 microscope slides and bonded to the slide with UV light and heat (Yuste *et al.*, 2006; Duque *et al.*, 2007b). The oligonucleotides represented 5350 of the 5421 predicted ORFs annotated in the *P. putida* KT2440 genome ([http://cmr.tigr.org/tigr-scripts/CMR/GenomePage.cgi?org\\_search=pse&org=gpp](http://cmr.tigr.org/tigr-scripts/CMR/GenomePage.cgi?org_search=pse&org=gpp)). In addition, 140 of the 148 putative ORFs predicted for the TOL plasmid pWW0 were also represented. The chips were also endowed with homogeneity controls consisting of oligonucleotides for the *rpoD* and *rpoN* genes spotted at 20 different positions, as well as duplicate negative controls at 203 predefined positions. Further details of the array characteristics were reported elsewhere by Yuste and colleagues (2006) and Duque and colleagues (2007b). Assays under each set of conditions were replicated at least three times.

### RNA isolation and preparation of labelled cDNA

*Pseudomonas putida* KT2440 cells were grown on LB to reach a turbidity of 0.5 at 660 nm. The cultures were then divided into two halves and 0.5 mM formaldehyde was added to one of them, then the cultures were further incubated at 30°C for another 20 min. The exposure time was long enough to allow the complete transcription of all *P. putida* operons, but was short enough to disclose the initial response of the cells to the toxic compound (Dominguez-Cuevas *et al.*, 2006; Duque *et al.*, 2007b). After the 20 min incubation, cells from 12 ml of culture samples were harvested by centrifugation at 4°C in tubes pre-cooled in liquid nitrogen. After centrifugation, the cell pellets were immediately immersed in liquid nitrogen and total RNA was isolated using TRI Reagent (Ambion), as described by Marqués and colleagues (1993). The RNA preparations were then subjected to DNase treatment, fol-

lowed by purification with RNeasy columns (Qiagen). Then the concentration of RNA was determined spectrophotometrically and its integrity was assessed by agarose gel electrophoresis. Preparation of fluorescently labelled cDNA, hybridization and data analysis were carried out as described by Duque and colleagues (2007b). Images were obtained at 10  $\mu\text{m}$  resolution and the background-subtracted median spot intensities were determined using GenePix Pro 5.1 image analysis software (Axon Instruments). Signal intensities were normalized by applying the lowest intensity-dependent normalization method (Yang *et al.*, 2002). Data were analysed in the 'log ratio' mode with Almazan System software (Alma Bioinformatics S.L.). The results obtained from experiments run in triplicate were normalized and filtered to identify genes with statistically significant increases or decreases and significant *P*-values. A particular ORF was considered differentially expressed if the change was at least 1.8-fold and if the *P*-value was  $\leq 0.05$ .

### Acknowledgements

This study was supported by a Frontier Research grant from CSIC, the SYSMO programme of the European Commission (GEN2006-27750-C5-5-E/SYS), a grant from the Spanish Ministry of Education and Science (BIO2006-05668) and a grant from the Junta de Andalucía (CIV-344). We thank Carmen Lorente and M. Mar Fandila for secretarial assistance, and K. Shashok for improving the use of English in the manuscript.

### References

- Abril, M.A., Michán, C., Timmis, K.N., and Ramos, J.L. (1989) Regulator and enzyme specificities of the TOL plasmid-encoded upper pathway for degradation of aromatic hydrocarbons and expansion of the substrate range of the pathway. *J Bacteriol* **171**: 6782–6790.
- De Lorenzo, V., Herrero, M., Jakubzik, U., and Timmis, K.N. (1990) Mini-Tn5 transposon derivatives for insertion mutagenesis, promoter probing, and chromosomal insertion of cloned DNA in gram-negative eubacteria. *J Bacteriol* **172**: 6568–6572.
- 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.
- Duncan, A.J., Bott, C.B., Terlesky, K.C., and Love, N.G. (2002) Detection of GroEL in activated sludge: a model for detection of stress. *Lett Appl Microbiol* **30**: 28–32.
- Duque, E., Molina-Henares, A.J., de la Torre, J., Molina-Henares, M.A., del Castillo, T., Lam, J., and Ramos, J.L. (2007a) Towards a genome-wide mutant library of *Pseudomonas putida* strain kt2440. In *Pseudomonas, Vol. V: A Model System in Biology*. Ramos, J.L., and Filloux, A. (eds). Dorchester, The Netherlands: Springer, pp. 227–251.
- Duque, E., Rodríguez-Herva, J.J., de la Torre, J., Domínguez-Cuevas, P., Muñoz-Rojas, J., and Ramos, J.L. (2007b) The RpoT regulon of *Pseudomonas putida* DOT-T1E and its role in stress endurance against solvents. *J Bacteriol* **189**: 207–219.
- Englesberg, E. (1952) The mutagenic action of formaldehyde on bacteria. *J Bacteriol* **63**: 1–11.
- 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**: 5190–5198.
- Ferguson, G.P., Jansen, A., Marlow, V.L., and Walker, G.C. (2006) BacA-mediated bleomycin sensitivity in *Sinorhizobium meliloti* is independent of the unusual lipid A modification. *J Bacteriol* **188**: 3143–3148.
- Fournier, D., Halasz, A., Spain, J., Spanggord, R.J., Bottaro, J.C., and Hawari, J. (2004) Biodegradation of the hexahydro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazine ring cleavage product 4-nitro-2,4-diazabutanal by *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl Environ Microbiol* **70**: 1123–1128.
- Goldberg, I., and Matelis, R.I. (1975) Growth of *Pseudomonas* C on C1 compounds: enzyme activities in extracts of *Pseudomonas* C cells grown on methanol, formaldehyde and formate as sole carbon sources. *J Bacteriol* **122**: 47–53.
- Gvakharia, B.O., Permina, E.A., Gelfand, M.S., Bottomley, P.J., Sayavedra-Soto, L.A., and Arp, D.J. (2007) Global transcriptional response of *Nitrosomonas europea* to chloroform and chloromethane. *Appl Environ Microbiol* **73**: 3440–3445.
- Henderson, B., Allan, E., and Coates, A.R. (2006) Stress wars: the direct role of host and bacterial molecular chaperones in bacterial infection. *Infect Immun* **74**: 3693–3706.
- Jakobsen, Ø.M., Benichou, A., Flickinger, M.C., Valla, S., Ellingsen, T.E., and Brautaset, T. (2006) Upregulated transcription of plasmid and chromosomal ribulose monophosphate pathway genes is critical for methanol assimilation rate and methanol tolerance in the methylotrophic bacterium *Bacillus methanolicus*. *J Bacteriol* **188**: 3063–3072.
- Jiménez, J.I., Miñambres, B., García, J.L., and Díaz, E. (2004) Genomic insights in the metabolism of aromatic compounds in *Pseudomonas*. In *Pseudomonas: Biosynthesis of Macromolecules and Molecular Metabolism*, Vol. 3. In Ramos, J.L. (ed.). Dorchester, The Netherlands: Kluwer Academic/Plenum Publishers, pp. 425–462.
- Kerner, M.J., Naylor, D.J., Ishihama, Y., Maier, T., Chang, H.C., Stines, A.P., *et al.* (2005) Proteome-wide analysis of chaperonin-dependent protein folding in *Escherichia coli*. *Cell* **122**: 209–220.
- Kummerle, N., Fench, H.H., and Kaulfers, P.M. (1996) Plasmid-mediated formaldehyde resistance in *Escherichia coli*: characterization of resistance genes. *Antimicrob Agents Chemother* **40**: 2276–2279.
- Liu, Y., Li, C.M., Lu, Z., Ding, S., Yang, X., and Mo, J. (2006) Studies of formation and repair of formaldehyde-damaged DNA by detection of DNA–protein crosslinks and DNA breaks. *Front Biosci* **11**: 991–997.
- Long, M.T., Bartholomew, B.A., Smith, M.J., Trudgill, P.W., and Hopper, D.J. (1997) Enzymology of oxidation of tropic acid to phenylacetic acid in metabolism of atropine by *Pseudomonas* sp. strain AT3. *J Bacteriol* **179**: 1044–1050.
- Maeda, T., Bao, B., Sanchez-Torres, Y., and Wood, T.K. (2008) Metabolic engineering to enhance bacterial

168 A. Roca, J.-J. Rodríguez-Herva, E. Duque and J. L. Ramos

- hydrogen production. *Microb Biotechnol* **1**: in press. doi:10.1111/j.1751-7915.2007.000003.x.
- Manchee, R.J., Broster, M.G., Stagg, A.J., and Hibbs, S.E. (1994) Formaldehyde solution effectively inactivates spores of *Bacillus anthracis* on the Scottish island of Gruinard. *Appl Environ Microbiol* **60**: 4167–4171.
- Marqués, S., Ramos, J.L., and Timmis, K.N. (1993) Analysis of the mRNA structure of the *Pseudomonas putida* TOL meta-fission pathway operon. *Biochim Biophys Acta* **1216**: 227–236.
- Marx, C.J., Chistoserdova, L., and Lidstrom, M.E. (2003) Formaldehyde-detoxifying role of the tetrahydromethanopterin-linked pathway in *Methylobacterium extorquens* AM1. *J Bacteriol* **185**: 7160–7168.
- Marx, C.J., Miller, J.A., Chistoserdova, L., and Lidstrom, M.E. (2004) Multiple formaldehyde oxidation/detoxification pathways in *Burkholderia fungorum* LB400. *J Bacteriol* **186**: 2173–2178.
- Mitsui, R., Sakai, Y., Yasueda, H., and Kato, N. (2000) A novel operon encoding formaldehyde fixation: the ribulose monophosphate pathway in the gram-positive facultative methylotrophic bacterium *Mycobacterium gastri* MB19. *J Bacteriol* **182**: 944–948.
- Molina, L., Ramos, C., Duque, E., Ronchel, M.C., García, J.M., Wyke, L., and Ramos, J.L. (2000) Survival of *Pseudomonas putida* KT2440 in soil and in the rhizosphere of plants under greenhouse and environmental conditions. *Soil Biol Biochem* **32**: 315–321.
- Mortersz, J., Sharf, C., Hecker, M., and Homuth, G. (2004) Transcriptome and proteome analysis of *Bacillus subtilis* gene expression in response to superoxide and peroxide stress. *Microbiology* **150**: 497–512.
- Musher, D.M., and Griffith, D.P. (1974) Generation of formaldehyde from methanamine: effect of pH and concentration, and antibacterial effect. *Antimicrob Agents Chemother* **6**: 708–711.
- Myers, W.F., and Paretsky, D. (1961) Synthesis of serine by *Coxiella burnetii*. *J Bacteriol* **82**: 761–763.
- Nachin, L., Nannmark, U., and Nyström, T. (2005) Differential roles of the universal stress proteins of *Escherichia coli* in oxidative stress resistance, adhesion and motility. *J Bacteriol* **187**: 6265–6272.
- Nakazawa, T. (2002) Travels of a *Pseudomonas*, from Japan around the world. *Environ Microbiol* **4**: 782–786.
- Neely, W.B. (1963) Action of formaldehyde on microorganisms III: bactericidal action of sublethal concentrations of formaldehyde on *Aerobacter aerogenes*. *J Bacteriol* **86**: 445–448.
- Nelson, K.E., Weinel, C., Paulsen, I.T., Dodson, R.J., Hilbert, H., Martins dos Santos, V.A., et al. (2002) Complete genome sequence and comparative analysis of the metabolically versatile *Pseudomonas putida* KT2440. *Environ Microbiol* **4**: 799–808.
- Nester, E.W., and Spizien, J. (1961) Role of one-carbon precursors in the biosynthesis of deoxyribonucleic acid in bacteriophage-injected and growing cells of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **82**: 867–874.
- Orita, I., Sato, T., Yurimoto, H., Kato, N., Atomi, H., Imanaka, T., and Sakai, Y. (2006) The ribulose monophosphate pathway substitutes for the missing pentose phosphate pathway in the archaeon *Thermococcus kodakaraensis*. *J Bacteriol* **188**: 4698–4704.
- Palma, M., Deluca, D., Worgall, S., and Quadri, L.E. (2004) Transcriptome and proteome analysis of the response of *Pseudomonas aeruginosa* to hydrogen peroxide. *J Bacteriol* **186**: 248–252.
- Poole, K. (2004) Efflux pumps. In *Pseudomonas: Genomics, Life Style and Molecular Architecture*, Vol. 1. Ramos, J.L. (ed.). Dorchester, The Netherlands: Kluwer Academic/Plenum Publishers, pp. 635–674.
- Ramos, J.L., Gallegos, M.T., Marqués, S., Ramos-González, M.I., Espinosa-Urgel, M., and Segura, A. (2001) Responses of gram-negative bacteria to certain environmental stressors. *Curr Opin Microbiol* **4**: 166–171.
- Ramos, J.L., Duque, E., Gallegos, M.T., Godoy, P., Ramos-González, M.I., Rojas, A., et al. (2002) Mechanisms of solvent tolerance in gram-negative bacteria. *Ann Rev Microbiol* **56**: 743–768.
- Ramos-González, M.I., Duque, E., and Ramos, J.L. (1991) Conjugational transfer of recombinant DNA in cultures and in soils host range of *Pseudomonas putida* TOL plasmids. *Appl Environ Microbiol* **57**: 3020–3027.
- Sagripani, J.L., and Bonifacino, A. (1996) Comparative sporidial effect of liquid chemical agents. *Appl Environ Microbiol* **62**: 545–551.
- Saito, Y., Nishio, K., Yoshida, Y., and Niki, E. (2005) Cytotoxic effect of formaldehyde with free radicals via increment of cellular reactive oxygen species. *Toxicology* **210**: 235–245.
- 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.
- Shinabarger, D.L., and Braymer, H.D. (1986) Glyphosate catabolism by *Pseudomonas* sp. strain PG2982. *J Bacteriol* **168**: 702–707.
- Sobsey, M.D., Wallis, C., and Melnick, J.L. (1974) Chemical disinfection of holding-tank sewage. *Appl Environ Microbiol* **128**: 861–866.
- Takatsuka, Y., and Nikaido, H. (2006) Threonine-978 in the transmembrane segment of the multidrug efflux pump ArcB of *Escherichia coli* is crucial for drug transport as a probable component of the proton relay network. *J Bacteriol* **188**: 7284–7289.
- Taylor, L.A., Barbeito, M.S., and Gremillon, G.C. (1969) Paraformaldehyde for surface sterilization and detoxification. *Appl Environ Microbiol* **17**: 614–618.
- Trujillo, R., and Lindell, K. (1973) New formaldehyde base disinfectants. *Appl. Environ Microbiol* **26**: 106–110.
- Vorholt, J.A., Marx, C.J., Lidstrom, M.E., and Thauer, R.K. (2002) Novel formaldehyde-activating enzyme in *Methylobacterium extorquens* AM1 required for growth on methanol. *J Bacteriol* **182**: 6645–6650.
- Yang, Y.H., Dudot, S., Lun, P., Lin, D.M., Peng, V., Ngai, J., and Speed, T.P. (2002) Normalization for cDNA microarray data: a robust composite method addressing single and multiple slide systematic variation. *Nucleic Acids Res* **30**: e15.

© 2007 The Authors

Journal compilation © 2007 Society for Applied Microbiology and Blackwell Publishing Ltd, *Microbial Biotechnology*, **1**, 158–169

- Yu, E.W., Aires, J.R., McDermott, G., and Nikaido, H. (2005) A periplasmic drug-binding site of the AcrB multidrug efflux pump: a crystallographic and site-directed mutagenesis study. *J Bacteriol* **187**: 6804–6815.
- Yuste, L., Hervás, A.B., Canosa, I., Tobes, R., Jiménez, J.I., Nogales, J., *et al.* (2006) Growth phase-dependent expression of the *Pseudomonas putida* KT2440 transcriptional machinery analysed with a genome-wide DNA microarray. *Environ Microbiol* **8**: 165–177.

### Supplementary material

The following supplementary material is available for this article online:

**Table S1.** Gene downregulated in *P. putida* KT2440 (pWW0) 20 min after the addition of HCOH.

This material is available as part of the online article from <http://www.blackwell-synergy.com>

CAPÍTULO 2: REDUNDANCIA ENZIMÁTICA PARA LA DETOXIFICACIÓN  
DE FORMALDEHÍDO EN *Pseudomonas putida*





## CAPÍTULO 2

### **Redundancia enzimática para la detoxificación de formaldehído en *Pseudomonas putida*.**

**Amalia Roca, José-Juan Rodríguez Herva, y Juan L. Ramos**

*Pseudomonas putida* KT2440 posee formaldehído deshidrogenasas y formato deshidrogenasas redundantes que contribuyen a la degradación de formaldehído, un compuesto altamente tóxico. Análisis físicos y transcripcionales mostraban que el marco abierto de lectura (ORF) PP0328, codifica una de las formaldehído deshidrogenasas, ésta es monocistrónica, mientras que el otro gen funcional formaldehído deshidrogenasa (ORF PP3970) forma un operón con otro gen de función desconocida. Se han identificado dos agrupaciones de genes formato deshidrogenasa (PP0489-PP0492 y PP2183-PP2186), y se ha observado que estos grupos génicos forman operones. Se han mapeado los cuatro promotores mediante la técnica de extensión de cebador, identificándose como promotores no canónicos que se expresan a niveles basales en la fase de crecimiento exponencial y a niveles más altos en la fase estacionaria independientemente de la presencia extracelular de formaldehído o formato. Estos promotores se caracterizaban por tener una región conservada 5'-AG-CCA-C/A-CT-3'. Para determinar la contribución de los diferentes productos génicos en la mineralización de formaldehído y formato, se construyeron mutantes con mutaciones simples o dobles en las formaldehído deshidrogenasas y se ensayó el efecto de las mutaciones en el catabolismo del formaldehído mediante la medida del desprendimiento de  $^{14}\text{CO}_2$  a partir de formaldehído marcado con  $^{14}\text{C}$ . Los resultados mostraban que ambas enzimas contribuían al catabolismo del formaldehído. El doble mutante en las dos enzimas seguía produciendo  $^{14}\text{CO}_2$  a partir de formaldehído, sugiriendo la presencia de una o más formaldehído deshidrogenasas todavía no identificada(s). Se generaron mutantes con mutaciones simples o dobles en las agrupaciones génicas para las formato deshidrogenasas, y todos eran capaces de metabolizar  $^{14}\text{C}$ -formato a  $^{14}\text{CO}_2$ , sugiriendo una redundancia de funciones que no sólo se limita a los genes anotados. Mutantes simples y dobles deficientes en formaldehído y formato deshidrogenasas exhiben fases de latencia más largas que las de la cepa parental cuando son confrontadas con concentraciones de formaldehído cercanas a las MICs. Esto sugiere un papel para los sistemas de detoxificación en la tolerancia a concentraciones subletales de formaldehído.

*Journal of Bacteriology*

Vol. **191**, Nº 10, pp.: 3367-3374, May **2009**.



## Redundancy of Enzymes for Formaldehyde Detoxification in *Pseudomonas putida*<sup>∇†</sup>

Amalia Roca, Jose J. Rodríguez-Herva,<sup>‡</sup> and Juan L. Ramos\*

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

Received 21 January 2009/Accepted 10 March 2009

*Pseudomonas putida* KT2440 exhibits redundant formaldehyde dehydrogenases and formate dehydrogenases that contribute to the detoxification of formaldehyde, a highly toxic compound. Physical and transcriptional analyses showed that the open reading frame (ORF) PP0328, encoding one of the formaldehyde dehydrogenases, is self-sufficient, whereas the other functional formaldehyde dehydrogenase gene (ORF PP3970) forms an operon with another gene of unknown function. Two formate dehydrogenase gene clusters (PP0489 to PP0492 and PP2183 to PP2186) were identified, and genes in these clusters were found to form operons. All four transcriptional promoters were mapped by primer extension and revealed the presence of noncanonical promoters expressed at basal level in the exponential growth phase and at a higher level in the stationary phase regardless of the presence of extracellular formaldehyde or formate. These promoters were characterized by a 5'-AG-CCA-C/A-CT-3' conserved region between -7 and -16. To determine the contribution of the different gene products to formaldehyde and formate mineralization, mutants with single and double mutations of formaldehyde dehydrogenases were generated, and the effect of the mutations on formaldehyde catabolism was tested by measuring <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> evolution from <sup>14</sup>C-labeled formaldehyde. The results showed that both enzymes contributed to formaldehyde catabolism. A double mutant lacking these two enzymes still evolved CO<sub>2</sub> from formaldehyde, suggesting the presence of one or more still-unidentified formaldehyde dehydrogenases. Mutants with single and double mutations in the clusters for formate dehydrogenases were also generated, and all of them were able to metabolize [<sup>14</sup>C]formate to <sup>14</sup>CO<sub>2</sub>, suggesting a redundancy of functions that was not limited to only the annotated genes. Single and double mutants deficient in formaldehyde dehydrogenases and formate dehydrogenases exhibited longer lag phases than did the parental strain when confronted with concentrations of formaldehyde close to the MICs. This suggests a role for the detoxification system in tolerance to sublethal concentrations of formaldehyde.

Gene duplication has long been recognized as a major source of new genes and functions. Until recently, it was assumed that gene duplication served as a means to develop new functions; however, several recent case studies and comparisons of genome content have suggested that most new genes have no new functions (4, 34). Instead, paralogous gene pairs are often subfunctionalized and frequently have overlapping activities that allow both complementation and maintenance of the original functions and an independent evolution of activities. This was recently shown for members of the Old Yellow Enzyme family of flavoproteins, which detoxify nitroaromatic compounds in *Pseudomonas putida* and other microorganisms (35, 36, 38).

Formaldehyde is a ubiquitous pollutant present in air and water. Its annual production is more than 6 million metric tons, and it is used in the manufacturing of resins, formic acid, polyoxymethylene plastics, 1,4-butanediol, and other compounds (25). Formaldehyde is useful as a disinfectant, and

formaldehyde toxicity is well known to derive from its ability to react with functional groups in proteins and nucleic acids, making it an efficient bacteriostatic and bactericidal chemical.

In spite of the toxicity of formaldehyde, some microorganisms can use it as their sole source of carbon (22). In addition, several pathways for the biological detoxification of formaldehyde have been described, among which is the concerted action of a formaldehyde dehydrogenase/formate dehydrogenase system that yields CO<sub>2</sub> (22). Enzymes involved in this detoxification process are often redundant and have been found in yeasts, bacteria, plants, and nematodes (11, 16, 28, 37, 39).

The original annotation of the genome of *P. putida* KT2440 revealed the presence of three potential formaldehyde dehydrogenase genes (PP0328, PP1939, and PP3970), as well as two clusters of genes potentially able to give rise to two different formate dehydrogenase complexes (PP0489 to PP0492 and PP2183 to PP2186) (Table 1) (21). These complexes are glutathione-independent enzymes (24). In a previous study we exposed *P. putida* KT2440 to sublethal concentrations of HCOH and analyzed global cell responses using microarrays (29). This analysis revealed that expression of the genes potentially able to encode formaldehyde dehydrogenases and formate dehydrogenases did not vary significantly in the presence of the aldehyde, although a number of functions related to the defense against this toxic chemical were induced, including DNA repair enzymes and chaperones that refold damaged proteins (29). It was then argued that formaldehyde dehydro-

\* Corresponding author. Mailing address: Consejo Superior de Investigaciones Científicas-EEZ, C/ Profesor Albareda 1, E-18001 Granada, Spain. Phone: 34-958-181608. Fax: 34-958-135740. E-mail: jlramos@eez.csic.es.

† Supplemental material for this article may be found at <http://jb.asm.org/>.

‡ Present address: Department of Biotechnology, UPM-UNIA, Campus de Montegancedo, 28223 Pozuelo de Alarcón, Madrid, Spain.

∇ Published ahead of print on 20 March 2009.

TABLE 1. Genes potentially able to encode formaldehyde dehydrogenase/formate dehydrogenase

ORF <sup>a</sup>	Gene name <sup>b</sup>	Function <sup>c</sup>	Highest identity <sup>d</sup>
PP0328	<i>fdhA</i>	Formaldehyde dehydrogenase, glutathione independent	Tanaka et al. (33), 93% identical to FdhA of <i>Pseudomonas fluorescens</i>
PP3970	<i>fdhB</i>	Formaldehyde dehydrogenase, glutathione independent	52% identical to <i>fdhA</i> of <i>P. putida</i> PP0328
PP0489	<i>fmdA</i>	Selenocysteine formate dehydrogenase alpha subunit	90% identical to <i>fdnG</i> of <i>Pseudomonas entomophila</i>
PP0490	<i>fmdB</i>	Fe-S subunit formate dehydrogenase	91% identical to <i>fdnH</i> of <i>P. entomophila</i>
PP0491	<i>fmdC</i>	Cytochrome 0556 formate dehydrogenase	89% identical to <i>fdnI</i> of <i>P. entomophila</i>
PP0492	<i>fmdD</i>	Putative accessory protein	83% identical to <i>fdhE</i> of <i>P. entomophila</i>
PP2183	<i>fmdE</i>	Formate dehydrogenase, gamma subunit, putative	79% identical to PSEEN1826 of <i>P. entomophila</i>
PP2184	<i>fmdF</i>	Formate dehydrogenase, beta subunit, putative	79% identical to PSEEN1827 of <i>P. entomophila</i>
PP2185	<i>fmdG</i>	Formate dehydrogenase, alpha subunit, putative	88% identical to PSEEN1828 of <i>P. entomophila</i>
PP2186	<i>fmdH</i>	Formate dehydrogenase, delta subunit, putative	81% identical to PSEEN1829 of <i>P. entomophila</i>

<sup>a</sup> ORF according to The Institute for Genomic Research annotation.

<sup>b</sup> Genes were named *fdh* because the highest homology of PP0328 was that to *fdhA* of *P. putida*.

<sup>c</sup> Function is given based on homology to protein with proved activity and in vivo mineralization carried out in this study.

<sup>d</sup> Identity with the protein with the highest hit in an organism other than *P. putida*.

genases and formate dehydrogenases could be expressed constitutively to safeguard cells against potential damage caused by the internal production of HCOH, a dead-end product in the metabolism of histidine and methoxylated aromatic compounds such as vanillate (2, 13, 17, 30).

To gain further insights into formaldehyde detoxification in *P. putida* KT2440, we studied the physical and transcriptional organization of the genes in this system and generated appropriate fusions of the promoter regions of the genes encoding formaldehyde dehydrogenase and formate dehydrogenase to '*lacZ*'. We found that expression of the detoxification system took place from noncanonical promoters, whose expression increased when cells reached the stationary phase regardless of the presence of formaldehyde and formate in the culture medium. We generated a collection of mutants deficient in formaldehyde dehydrogenases and formate dehydrogenases. Analyses of <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> evolution from <sup>14</sup>C-labeled substrates confirmed the redundant nature of the enzymes and revealed the pres-

ence of one or more other, unidentified formaldehyde dehydrogenases and formate dehydrogenases.

#### MATERIALS AND METHODS

**Bacterial strains and culture media.** The bacterial strains in this study are shown in Table 2. *Pseudomonas putida* KT2440 and its mutant derivatives were grown on M9 minimal medium with glucose (0.5% [wt/vol]) as the carbon source or LB medium (1). Cultures were incubated at 30°C and shaken on an orbital platform operating at 200 strokes per min. The effects of formaldehyde and formate on the growth of *P. putida* KT2440 and its isogenic mutants were analyzed spectrophotometrically by tracking the increase in turbidity of the cultures every 60 min. At least four time points were used to estimate doubling times in the exponential phase. When required, the following antibiotics were used at the indicated final concentrations (in micrograms per milliliter): ampicillin, 100; chloramphenicol, 30; kanamycin, 50; tetracycline, 20; and gentamicin, 20.

**RNA preparation.** *Pseudomonas putida* KT2440 was grown overnight at 30°C on LB medium. Cells were then diluted 100-fold in fresh medium and incubated with shaking until the culture reached a turbidity of about 0.2 at 660 nm, after which 0.5 mM formaldehyde was added. Mineralization assays showed that this

TABLE 2. Plasmids and strains used in this study

Strain or plasmid	Genotype/phenotype	Reference
<b>Strains</b>		
KT2440	Prototroph, Cm <sup>r</sup>	1
CIR1	RpoS-deficient derivative of KT2440	27
PRCC <i>fdhA</i> (PP0328)	<i>fdhA</i> ::mini-Tn5, Km <sup>r</sup>	7
PRCC <i>fdhE</i> (PP0492)	<i>fdhE</i> ::mini-Tn5, Km <sup>r</sup>	7
PRCC <i>fmdF</i> (PP2184)	<i>fmdF</i> ::mini-Tn5, Km <sup>r</sup>	7
AR0489	ORF0489::ΩKmGm, Km <sup>r</sup> Gm <sup>r</sup>	This study
AR3970	ORF3970::ΩKmGm, Km <sup>r</sup> Gm <sup>r</sup>	This study
AR2184/0489	ORF0489::ΩKmGm, Gm <sup>r</sup> ; <i>fmdF</i> ::mini-Tn5, Km <sup>r</sup>	This study
AR0328/3970	<i>fdhA</i> ::mini-Tn5, Km <sup>r</sup> ; ORF3970::ΩKmGm, Gm <sup>r</sup>	This study
<b>Plasmids</b>		
pCHESIΩKmGm	Ap <sup>r</sup> Km <sup>r</sup> Gm <sup>r</sup> pUNφ18 bearing a HindIII fragment from pHP45ΩKm (Ω-KmGm interposon) cloned at the HindIII site, <i>oriT</i> RP4	P. Van Dillewijn, unpublished data
pAR0489	pCHESIΩKmGm carrying, at the EcoRI/SacI sites, a 579-bp chromosomal fragment from the <i>P. putida</i> KT2440 PP0489 gene obtained by PCR	This study
pAR3970	pCHESIΩKmGm carrying, at the EcoRI/SacI sites, a 519-bp chromosomal fragment from the <i>P. putida</i> KT2440 PP3970 gene obtained by PCR	This study
pMP220	Tc <sup>r</sup> ; ' <i>lacZ</i> ' promoter probe plasmid	31
pMP0328	Tc <sup>r</sup> ; pM220 bearing the promoter region of ORF PP0328	This study
pMP0489	Tc <sup>r</sup> ; pM220 bearing the promoter region of ORF PP0489	This study
pMP2183	Tc <sup>r</sup> ; pM220 bearing the promoter region of ORF PP2183	This study
pMP3970	Tc <sup>r</sup> ; pM220 bearing the promoter region of ORF PP3970	This study

concentration guarantees formaldehyde dehydrogenase and formate dehydrogenase activities. The cultures were incubated for 1.5 to 2 h until they reached a turbidity of around 2, the value at which expression from the target promoters takes place (see Results). Cells (10 ml) were harvested by centrifugation (9,000 × g for 15 min) in disposable plastic tubes precooled in liquid nitrogen and kept at -80°C until use. RNA was extracted using the TRI reagent (catalog no. 9738; Ambion, Austin, TX) with the following modifications. The lysis step was carried out at 60°C, and a final digestion step with RNase-free DNase was added at the end of the process, followed by purification with RNeasy columns (catalog no. 74104; Qiagen, Hilden, Germany). The RNA concentration was determined spectrophotometrically at 260 nm, and RNA integrity was assessed by agarose gel electrophoresis.

**RT-PCR assays.** Reverse transcriptase PCR (RT-PCR) was done with 1 µg RNA in a final volume of 50 µl using the Titan OneTube RT-PCR system according to the manufacturer's instructions (Roche Laboratories). cDNA was synthesized at 42°C for 60 min, and the PCR cycling conditions were as follows: 94°C for 30 s and 30 cycles at an adequate annealing temperature for 45 s and at 72°C for 45 s. The annealing temperature was calculated for each reaction based on the melting temperatures of the pair of primers used. Positive and negative controls were included in all assays. The primers used to test contiguity in the mRNA are available from us on request.

**Primer extension.** Primer extension reactions were performed as described by Marqués et al. (20), and the sequences of primers used for extension are reported in the figure legends.

**Construction of knockout mutant strains by target insertional mutagenesis.** For site-directed mutagenesis, we used pCHESIQKmGm (Table 2), a derivative of pCHESIQKm that was originally constructed by Llamas et al. (19). To facilitate site-directed mutagenesis, 519 and 579 bp of the central region of PP0489 and PP3970 were amplified by PCR using primers that provide SacI and KpnI sites or EcoRI and SacI sites, respectively. The amplified fragments were ligated to pCHESIQKmGm digested with the appropriate restriction enzymes. The resulting plasmids were selected in *Escherichia coli*, and the correct clones, called pAR0489 and pAR3970, were confirmed by restriction analysis. These plasmids were then transferred to KT2440, as described by Choi et al. (5), and Gm<sup>r</sup> recombinant clones were selected. Mutant strains with the correct inactivated target genes were confirmed by Southern blotting using as a probe the originally amplified chromosomal fragment that was previously used for mutant construction. A random clone of each target gene bearing the appropriate insertion was kept for further analysis, and the clones were named *P. putida* AR0489 and *P. putida* AR3970 (Table 2).

A double mutant with knockouts in two formaldehyde dehydrogenases, called *P. putida* AR0328/3970, was constructed by site-directed mutagenesis using *P. putida* PRCC0328 as a parental strain and plasmid pAR3970 as a source to inactivate PP3970. A mutant with knockouts in PP2184 and PP0489 was generated using *P. putida* PRCC2184 as the parental strain and pAR0489 as the source of the open reading frame (ORF) PP0489 knockout. Double mutants were confirmed by Southern blotting as described above with appropriate probes based on amplified genes. Furthermore, PCR amplification with primers that annealed adjacent to the target gene were further used to confirm the mutation.

**β-Galactosidase assays.** We constructed fusions of the promoter of different genes to *'lacZ* gene in the low-copy-number pMP220 vector. The corresponding promoter regions were amplified by PCR with primers incorporating restriction sites (a PstI site in the primer designed to meet the 3' end and a BamHI site in the primer designed to meet the 5' end) to create a fusion of the promoters to *'lacZ*. Upon amplification, DNA was digested with BamHI and PstI and ligated to BglII-PstI-digested pMP220. The fusion constructs were confirmed by DNA sequencing. The plasmids were electroporated into the wild-type *P. putida*, and the corresponding transformants were grown overnight on LB medium plus tetracycline (18). The cultures were then diluted 100-fold in the same medium, and three aliquots were made; one was kept unchanged as a control, and to the other two we added 0.5 mM formaldehyde or 10 mM formate. Cultures were incubated at 30°C for about 7 h with shaking, and β-galactosidase activity was then assayed in permeabilized whole cells according to Miller's method (23). Assays were run in triplicate and were repeated at least three times.

**Mineralization assays.** Overnight cultures of *P. putida* KT2440 or its isogenic mutants in LB medium were diluted 1:100 in the same medium. Bacterial cultures (20 ml) were placed in airtight sealed 250-ml conical flasks containing 5-ml beakers fixed to the bottom of the flasks. For formaldehyde and formate mineralization, 0.5 µCi and 5 µCi of the compound were added, respectively; the final concentration of the chemical in the medium was 0.5 mM in the case of formaldehyde and 5 mM in the case of formate. <sup>14</sup>C<sub>2</sub> evolved from the <sup>14</sup>C-labeled substrate was fixed in a 5 M NaOH solution within the internal beaker.

Mineralization rates were calculated from evolved <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> and the specific activity of the initial <sup>14</sup>C-labeled substrate after incubation for 24 h.

## RESULTS AND DISCUSSION

**Physical and transcriptional organization of genes encoding formaldehyde dehydrogenases or formate dehydrogenases in KT2440.** BLAST analysis of the genome of *P. putida* KT2440 against the sequences deposited in different data banks confirmed the initial annotation of the genes and clusters involved in formaldehyde metabolism. The genes are listed in Table 1. The translated products of the ORFs PP0328 and PP3970 were found to be highly similar to known proteins with formaldehyde dehydrogenase activity, and a third ORF (PP1939) was found to yield a short truncated peptide. Subsequently, we compared the PP0328 and PP3970 products and found that they were 32% identical. Comparison of these proteins with the *Pseudomonas* sp. strain Tanaka formaldehyde dehydrogenase revealed that the PP0328 product was almost 93% identical to this protein, whose activity has been confirmed in vitro (33). The PP0328 gene was annotated as *fdhA*, whereas the PP3970 gene was called *fdhB* (Table 1).

The PP0328 gene is transcribed in the same direction as are the PP0326 and PP0327 genes, but the functions of the products of these two genes are unknown. The start codon of ORF PP0328 is 301 bp away from the stop codon of the preceding gene (Fig. 1). To test whether these two genes were part of the same transcriptional unit, we carried out RT-PCR analysis using primers based on the 3' end of a gene (PP0327) and the 5' end of PP0328 located immediately downstream. The absence of an amplification band (Fig. 2) in the RT-PCR was interpreted as evidence that ORF PP0328 was a monocistronic unit.

The PP3970 ORF is within a five-gene cluster, all genes of which are transcribed in the same direction (Fig. 1). The distance between the stop codon of the PP3969 ORF and the start codon of PP3970 is 148 bp, whereas the distance between PP3970 and the next ORF is only 14 bp. ORF PP3971 and ORF PP3972 are separated by 32 nucleotides (Fig. 1), whereas 230 bp separate the latter from ORF PP3973 (not shown). To test whether the genes were part of the same transcriptional unit, we carried out RT-PCR analysis as described above but with the appropriate primers. We found that PP3970 was transcribed independently of the 5' gene and was cotranscribed with PP3971 but not with PP3972 (Fig. 2). The function of PP3971 is unknown.

For formate dehydrogenase, two clusters of genes that could give rise to two different formate dehydrogenases were identified in the original annotation of the genome of KT2440 (24). The corresponding genes were designated *fmd* from formate dehydrogenase. In the original annotation of the KT2440 genome, an opal stop codon at a position corresponding to residue 196 in the ORF product was found. Codon 196 is possibly decoded as a selenocysteine residue in a reaction mediated by an L-seryl-t-RNA selenium transferase (PP0493/PP0494), as is the case in *E. coli* (2, 40). The cluster made up of PP0489 to PP0492 has been designated *fmdA* through *fmdD* (Table 1), whereas the other cluster, consisting of PP2183 through PP2186, has been called *fmdEFGH* (Table 1). The short distance or overlapping nature of adjacent genes in these two clusters (Fig. 1) suggested that the genes are

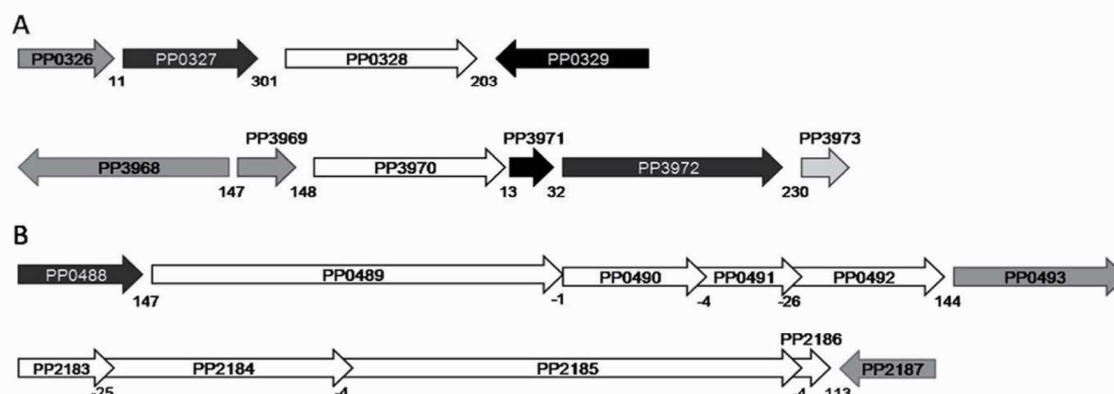


FIG. 1. Physical organization of genes encoding enzymes for formaldehyde and formate metabolism. (A) Genes that encode formaldehyde dehydrogenases. The *fdhA* gene encoding formaldehyde dehydrogenase (PP0328) is within the PP0326-to-PP0329 gene cluster, and the *fdhB* gene encoding formaldehyde dehydrogenase (PP3970) is within the PP3969-to-PP3972 cluster. (B) Genes in the operons that encode multicomponent formate dehydrogenases with the adjacent gene(s) (PP0489 through PP0492 and PP2183 through PP2186).

transcribed as operons, as confirmed by RT-PCR assays (Fig. 2). ORFs PP0489 through PP0492 were transcribed in the same direction as were the upstream and downstream genes. RT-PCR assays showed that PP0489 was not transcribed with PP0488, whereas the last gene (PP0492) was transcribed with the 3'-adjacent ORFs, PP0493 and PP0494, which encode the above-mentioned L-seryl-t-RNA transferase, showing transcriptional cou-

pling of the selenocysteine charging system with its target polypeptide (the PP0489 product) (Fig. 2). Regarding the other formate dehydrogenase cluster, ORF PP2182 was 147 nucleotides away from PP2183 and was not transcriptionally coupled to the formate dehydrogenase gene cluster (not shown). PP2187 was transcribed convergently with respect to PP2186 (Fig. 1).

Early microarray data indicated that the level of expression

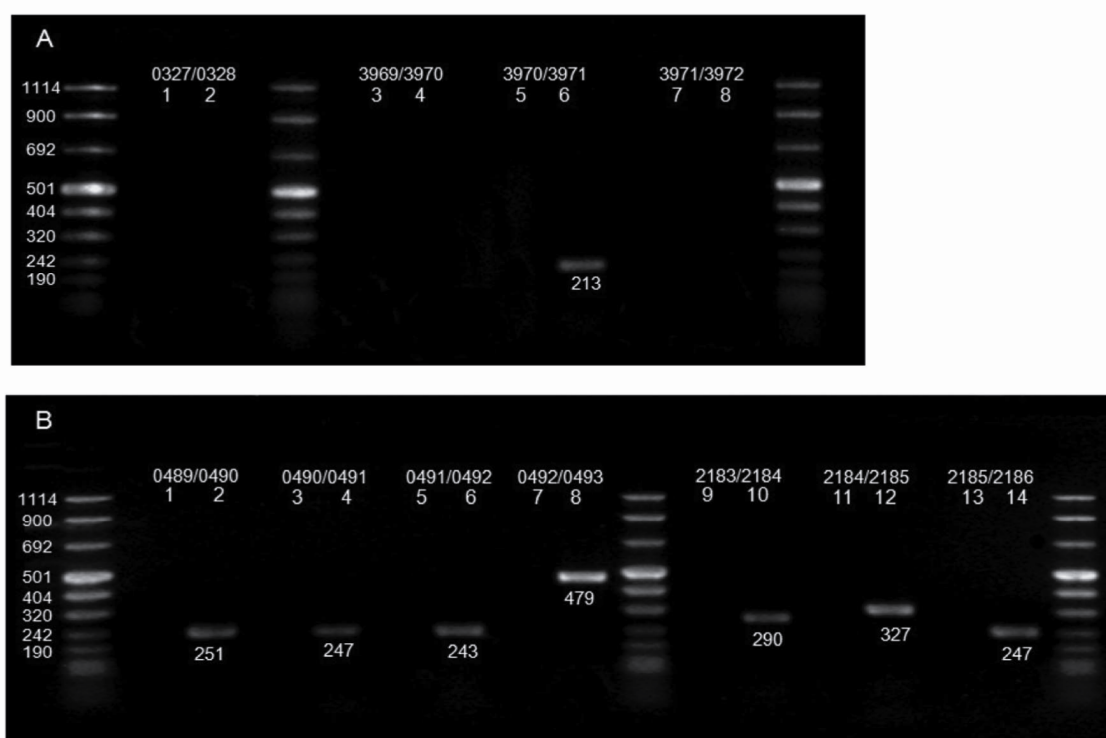


FIG. 2. Operon structure of genes encoding enzymes for formaldehyde metabolism. The products resulting from each RT-PCR were separated on agarose gels, as described in Materials and Methods. The genes to be tested as potentially cotranscribed are shown at the top. Lanes 1, 3, 5, 7, 9, 11, and 13 are negative controls without reverse transcriptase. Lanes 2, 4, 6, 8, 10, 12, and 14 are reactions with reverse transcriptase. The size of the amplified band is given below each band. The rightmost and leftmost lanes in panels A and B, as well as the lane between lanes 2 and 3 in panel A and the lane between lanes 8 and 9 in panel B, are size markers. The sizes of the markers from top to bottom are indicated.

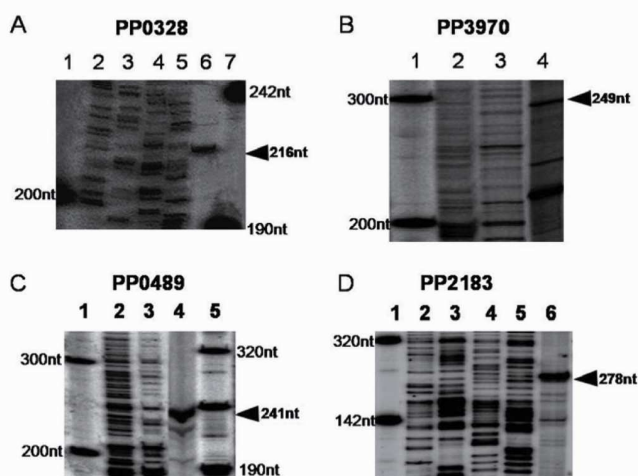


FIG. 3. Transcription initiation point of the four transcriptional units of the genes involved in formaldehyde metabolism. RNA was isolated from cells with a turbidity at 660 nm of about 3. (A) Determination of the start point of ORF PP0328. The primer used for extension was 5'-TTCAGGATGACGCCGTGTTTC-3'. Lanes 1 and 7, molecular size ladders; lanes 2 to 5, DNA sequencing ladder; lane 6, extension products. (B, C, and D) Similar to panel A, except that the transcription start points correspond to PP3970, PP0489, and PP2183, respectively. The primers used for mapping were 5'-GCCGAAGATGTCGCCTGCT-3', 5'-CCCCACGTACTTCAGCCAGGG-3', and 5'-CAGTAGGGCAGTGTTACG-3', respectively. (B) Lanes 1 to 3, size ladders; lane 4, extension products. (C) Lanes 1 and 5, size ladders; lanes 2 and 3, A and C sequences of the promoter; lane 4, extension products. (D) Lane 1, size markers; lanes 2 to 5, DNA sequence of the promoter; lane 6, extension product. nt, nucleotides.

of the four transcriptional units was independent of the presence of formaldehyde or formate in the culture medium (29). To investigate this further, we first determined the transcription start point of all three operons and PP0328, the monocistronic unit, and then constructed the appropriate fusions to *'lacZ* in the low-copy-number pMP220 plasmid.

Primer extension revealed multiple 5' ends in the extension of the different mRNAs, and from a transcriptional point of view, we considered the largest, most intense band as the true transcription start point for each promoter (Fig. 3). The lower bands were considered degradation products. We analyzed the sequences upstream from the proposed +1 position and found that the corresponding sequences were relatively less rich in A's. The alignment of the promoters revealed a potential consensus sequence, 5'-AG-CCA-C/A-CT, from -15 to -7 (in the PP0328 promoter [Fig. 4]) and a nonconserved -35 region (not shown). Expression levels for all four promoters were very

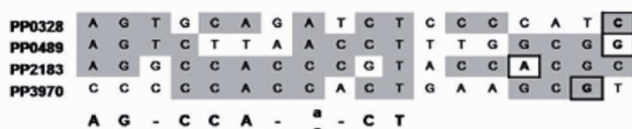


FIG. 4. Alignment of the promoters of the genes involved in formaldehyde metabolism. The alignment of the promoters covers from +1 to -17. The +1 nucleotide is boxed, and the sequences were aligned using the ALIGNMENT program. A nucleotide is included in the consensus sequence if it appears in at least three of the sequences.

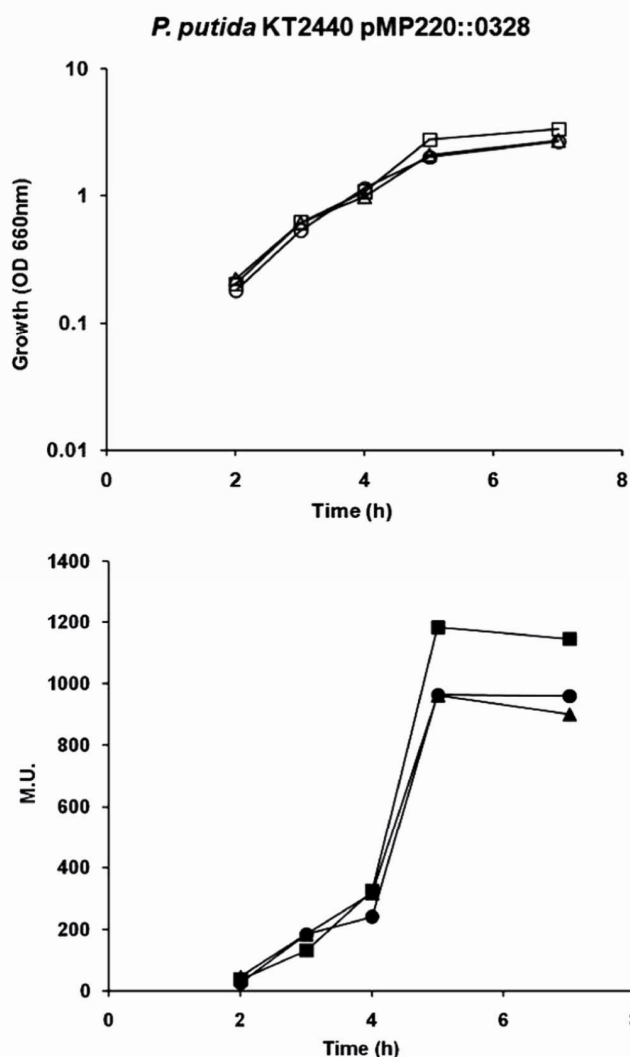


FIG. 5. Time course expression from the PP0328 promoter along the growth curve. A plasmid bearing a fusion of the promoter region of PP0328 to the *'lacZ* gene in pMP220 was transformed in the wild-type *P. putida* KT2440 strain. Cells were grown in LB medium (squares) supplemented or not with 0.5 mM formaldehyde (circles) or 10 mM formate (triangles). At the indicated times, cell growth was monitored as culture turbidity at 660 nm (top panel) and  $\beta$ -galactosidase activity was determined in permeabilized and intact cells (bottom panel). M.U., Miller units.

low or null when cells were in the exponential growth phase and increased notably when cells attained the stationary phase (Fig. 5 shows PP0328 expression). The level of expression along the growth curve was similarly high regardless of the presence of formaldehyde or formate (Fig. 5; see also Fig. S1 in the supplemental material). Fusion to the promoter of PP3970 yielded the lowest level of expression (20 to 40 Miller units) regardless of the growth phase (not shown). When we compared the maximal levels of  $\beta$ -galactosidase activity, we found that PP2184 and PP0489 expression levels were 3- to 10-fold higher than that of PP0328 (Fig. 6).

The expression pattern shown in Fig. 5 is characteristic of



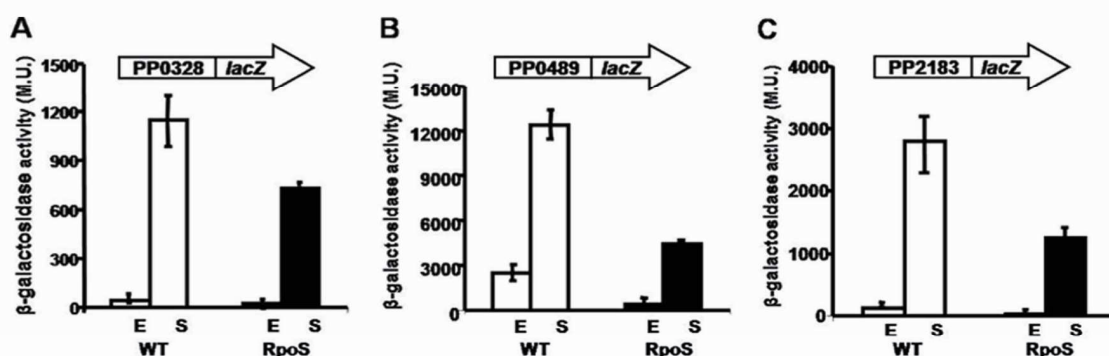


FIG. 6. Exponential- and stationary-phase levels of expression in the parental KT2440 strain and the isogenic *rpoS*-deficient background. Wild-type *P. putida* KT2440 cells and the isogenic *rpoS* mutant strain (27) were transformed with the indicated plasmid and were grown in LB medium. The turbidity of the exponential cultures (E) was around 0.8, whereas stationary cells (S) had been incubated for 7 h and exhibited turbidity in the range of 3.5 to 4.0.  $\beta$ -Galactosidase activity is expressed as the average of at least three independent determinations from three independent cultures. WT, wild type; M.U., Miller units.

sigma-38-dependent promoters (9, 15), and inspection of the derived consensus sequence and its comparison with the proposed sequence recognized by RpoS (5'-CTAYaCT-3') revealed conservation at positions -13 (C), -10 (A/C), -8 (C), and -7 (C). Subsequently, we measured expression from the promoters using transcriptional fusions to *lacZ* in an RpoS-deficient background. We found that expression levels in this sigma background (24) were 10% to 56% lower, suggesting that although RpoS might contribute to the transcription of these promoters, other sigma factors may also drive expression (Fig. 6). These results are in agreement with other studies that have shown that in vivo certain promoters can be transcribed by RNA polymerase with different sigma factors, i.e., the *P. putida* Pm promoter that is transcribed with RpoH or RpoS (5, 8, 19), and in *E. coli* a number of promoters show heterogeneity regarding transcription by RNA polymerase with RpoD and RpoS (14, 23, 31, 32). Details of the sigma factor used by RNA polymerase for transcription from the four promoters analyzed here in relation to formaldehyde/formate detoxification await further in vitro studies.

**Mutational analysis of formaldehyde dehydrogenases and formate dehydrogenases. (i) Rates of decrease in  $^{14}\text{CO}_2$  from  $\text{H}^{14}\text{COH}$  in *fdh/fmd* mutants.** To determine the potential contribution of each of the formaldehyde dehydrogenases and formate dehydrogenases to formaldehyde detoxification, we requested the PP0328, PP2184, and PP0492 mutants from the *Pseudomonas putida* Reference Culture Collection: (6) and constructed those that were not available in the collection (PP0489 and PP3970 mutants), as described in Materials and Methods. We thus compiled mutants with knockout mutations at PP0328 and PP3970, encoding formaldehyde dehydrogenases; PP0489 and PP0492 mutants in one of the formate dehydrogenase clusters; and PP2184 in the other formate dehydrogenase cluster. We also constructed mutants with double mutations in formaldehyde dehydrogenases (PP0328/PP3970) and double mutations in the formate dehydrogenase clusters (PP2184/PP0489).

To test the potential contribution of each of the above enzymes to formaldehyde and formate metabolism, we carried out in vivo assays to measure the mineralization of  $^{14}\text{C}$ -labeled

substrates. To this end, wild-type cells or isogenic mutant cells were grown on LB medium supplemented with 0.5 mM formaldehyde (0.5  $\mu\text{Ci}$ ). After 24 h we measured evolved  $^{14}\text{CO}_2$  and found that mutants deficient in either of the two formaldehyde dehydrogenases evolved 25 to 40% less  $^{14}\text{CO}_2$  than did the parental strain (Table 3). A double PP0328/PP3970 mutant was also constructed and exhibited significant  $^{14}\text{CO}_2$  evolution when exposed to [ $^{14}\text{C}$ ]formaldehyde, suggesting that these high levels of  $^{14}\text{CO}_2$  from formaldehyde were mediated by one or more nonspecific aldehyde dehydrogenases (10). Other enzymes potentially able to catabolize formaldehyde are the glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenases (11, 26, 28). In this regard it is worth noting that up to 36 ORFs of the *P. putida* KT2440 genome were annotated as potential aldehyde dehydrogenase genes. The presence of nonspecific *Pseudomonas putida* aldehyde dehydrogenases is in agreement with the relatively broad substrate specificity of this type of enzyme (10).

PP0489, PP0492, and PP2184 mutants deficient in formate dehydrogenase were also exposed to [ $^{14}\text{C}$ ]formaldehyde as described above. These mutants also exhibited reduced levels of  $^{14}\text{CO}_2$  evolution from [ $^{14}\text{C}$ ]formaldehyde in comparison to the

TABLE 3. Maximal mineralization of [ $^{14}\text{C}$ ]formaldehyde by the wild type and isogenic *P. putida* mutants<sup>a</sup>

Strain	Level of $^{14}\text{CO}_2$ (1,000 cpm) from:	
	HCOH	HCOOH
Parental strain	10.5 $\pm$ 0.3	207 $\pm$ 10
PP0328 mutant	8.1 $\pm$ 0.2	175 $\pm$ 5
PP3970 mutant	6.2 $\pm$ 0.1	218 $\pm$ 5
PP0328/PP3970 mutant	6.1 $\pm$ 0.4	162 $\pm$ 7
PP0489 mutant	5.1 $\pm$ 0.2	142 $\pm$ 3
PP0492 mutant	6.4 $\pm$ 0.3	113 $\pm$ 2
PP2184 mutant	6.8 $\pm$ 0.1	133 $\pm$ 1
PP0489/PP2184 mutant	2.7 $\pm$ 0.1	103 $\pm$ 1

<sup>a</sup> The indicated strains were grown in LB medium overnight and then diluted 100-fold in the same medium supplemented with 0.5  $\mu\text{Ci}$  formaldehyde or 5  $\mu\text{Ci}$  formate. Evolved  $^{14}\text{CO}_2$  was trapped in a solution (5 M KOH) placed in a vessel fixed to the bottom of the incubation flask. Values are those after 24 h of incubation. Other conditions are as given in Materials and Methods.

parental strain (Table 3). This suggests that coupling of the two activities contributes to formaldehyde detoxification.

We also tested mineralization of formate by mutants deficient in formaldehyde dehydrogenases or formate dehydrogenases as described above, except that [ $^{14}\text{C}$ ]formate (5  $\mu\text{Ci}$ ) was used in this series of assays. We found that the parental strain and the formaldehyde dehydrogenase mutants evolved similar amounts of  $^{14}\text{CO}_2$  from [ $^{14}\text{C}$ ]formate, as expected. However, reduced levels (30% to 60%) were found in mutants deficient in either formate dehydrogenase. Since  $^{14}\text{CO}_2$  evolution also took place from formate in the PP2184/PP0489 double mutant, at least one more, yet-unidentified formate dehydrogenase appears to operate in this strain.

As mentioned above, PP0489 has an early opal stop codon that could yield a selenocysteine formate dehydrogenase alpha subunit; consequently we expected that inactivation of the gene would have a certain effect on formate metabolism. Our results showed decreased evolution of  $^{14}\text{CO}_2$  from formate and formaldehyde in this mutant, providing indirect evidence indicating that PP0489 yields an active enzyme, although we cannot exclude the possibility that the formate dehydrogenase alpha subunit made by PP2185 could produce an active formate dehydrogenase with FmdB, FmdC, or FmdD. Functional replacement of catalytic subunits in biphenyl dioxygenases involved in the catabolism of xenobiotic compounds (3, 4, 12), as well as in the replacement of catalytic subunits and multicatalytic proteinase complexes (7), has been described.

**(ii) Effect of *fdh/fmd* mutations on growth.** The constitutive nature of the expression of formaldehyde dehydrogenases and formate dehydrogenases suggested that they may be necessary for the initial detoxification of HCOH. If this were the case, growth of mutants deficient in formaldehyde dehydrogenases or formate dehydrogenases may be affected in the presence of sublethal concentrations of formaldehyde or formate. We had previously established MICs of 1.5 mM formaldehyde and 15 mM formate for *P. putida* KT2440 (29). We tested the effect of sublethal formaldehyde concentrations, i.e., 0.3 mM and 1.2 mM, on the growth of the parental strain and the above series of isogenic mutants. At the lowest concentration, the lag phases of the parental strain and those of all tested mutant strains were similar and in the range of 1.3 h (not shown). Thereafter, the parental and mutant cells grew exponentially with doubling times in the range of 60 to 65 min. In contrast, at a higher concentration of formaldehyde, e.g., 1.2 mM, the lag phase of KT2440 was slightly shorter (about 4 h) than those of most of the mutants (5 to 6 h) (Table 4). Once the lag phase was overcome, cells grew exponentially, although at rates in the range of 56 to 100 min, indicating that once the initial shock was overcome and the cells had adapted, they were able to thrive (Table 4). When wild-type cells or formaldehyde or formate dehydrogenase mutants were exposed to 10 mM formate, no significant changes in the lag phase or growth rate in exponential phase were found.

We also tested whether deficiency in formaldehyde dehydrogenases or formate dehydrogenases had any effect on killing kinetics in the presence of a high concentration of formaldehyde (10 mM). We found that all mutants died at rates similar to those of the parental strain, i.e., survival was 1 out of  $10^3$  to  $10^4$  cells/ml after 10 min (not shown), which suggests that the formaldehyde dehydrogenase/formate dehydrogenase system,

TABLE 4. Effect of high formaldehyde concentrations on the lag phase and doubling time in the exponential phase<sup>a</sup>

Strain	Lag time (h)	Doubling time (min)
Wild-type KT2440	4 $\pm$ 0.1	56 $\pm$ 1
PP0328 mutant	5 $\pm$ 0.4	64 $\pm$ 7
PP3970 mutant	6 $\pm$ 0.2	64 $\pm$ 4
PP0492 mutant	4.5 $\pm$ 0.1	76 $\pm$ 6
PP0489 mutant	5 $\pm$ 0.2	76 $\pm$ 6
PP2184 mutant	5 $\pm$ 0.2	75 $\pm$ 5
PP0328/PP3970 mutant	5 $\pm$ 0.3	56 $\pm$ 3
PP2184/PP0489 mutant	5 $\pm$ 0.5	100 $\pm$ 12

<sup>a</sup> The indicated strains were grown on LB medium overnight and then diluted 100-fold in the same medium to reach a turbidity of 0.05 at 660 nm. Cultures were then supplemented with 1.2 mM formaldehyde, and the lag time (the period needed for the culture to reach a turbidity of 0.1 at 660 nm) was determined. When cultures were grown exponentially, the doubling time was estimated as the average time that the culture needed to double its turbidity at least threefold.

although relevant for detoxification of formaldehyde, is not the major player.

In summary, our results show that formaldehyde dehydrogenase and formate dehydrogenase activities are redundant in *P. putida* and that coupling of formaldehyde dehydrogenase and formate dehydrogenase is critical for the efficient removal of formaldehyde. Genes and operons for formaldehyde degradation are preferentially expressed during the stationary phase, although their transcription seems to be only partially dependent on the RpoS sigma factor. The formaldehyde dehydrogenase/formate dehydrogenase system does not guarantee survival in the presence of high concentrations of exogenously added formaldehyde, in agreement with our earlier proposal that survival of *P. putida* KT2440 under shock conditions is significantly mediated by chaperones and enzymes involved in DNA repair (29). Instead the formaldehyde dehydrogenase/formate dehydrogenase system may represent a safeguard against the internal production of formaldehyde in the cell catabolism of methoxylated compounds that are abundant in soil, the natural ecosystem of the strain, where cells grow at low rates.

#### ACKNOWLEDGMENTS

This study was initially supported by an intramural project of the CSIC and thereafter by "Proyecto de Excelencia" grant CVI-344 from the Junta de Andalucía and PSYSMO (GEN2006-27750-C5-5-E/SYS).

We thank Estrella Duque for providing mutants, M. M. Fandila and C. Lorente for secretarial assistance, and K. Shashok for improving the use of English in the manuscript.

#### REFERENCES

1. Abril, M. A., C. Michán, K. N. Timmis, and J. L. Ramos. 1989. Regulator and enzyme specificities of the TOL plasmid-encoded upper pathway for degradation of aromatic hydrocarbons and expansion of the substrate range of the pathway. *J. Bacteriol.* **171**:6782–6790.
2. Berg, B. L., J. Li, J. Heider, and V. Stewart. 1991. Nitrate-inducible formate dehydrogenase in *Escherichia coli* K-12. Nucleotide sequence of the *fdnGHI* operon and evidence that opal (UGA) encodes selenocysteine. *J. Biol. Chem.* **266**:22380–22385.
3. Brunel, F., and J. Davison. 1988. Cloning and sequencing of *Pseudomonas* genes encoding vanillate demethylase. *J. Bacteriol.* **170**:4924–4930.
4. Chebrou, H., Y. Hurtubise, D. Barriault, and M. Sylvestre. 1999. Heterologous expression and characterization of the purified oxygenase component of *Rhodococcus globerulus* P6 biphenyl dioxygenase and of chimeras derived from it. *J. Bacteriol.* **181**:4805–4811.
5. Choi, K. H., A. Kumar, and H. P. Schweizer. 2006. A 10-min method for preparation of highly electrocompetent *Pseudomonas aeruginosa* cells: application for DNA fragment transfer between chromosomes and plasmid transformation. *J. Microbiol. Methods* **64**:391–397.

6. Domínguez-Cuevas, P., P. Marín, J. L. Ramos, and S. Marqués. 2005. RNA polymerase holoenzymes can share a single transcription start site for the Pm promoter: critical nucleotides in the 7 to 8 region are needed to select between RNA polymerase with  $\sigma^{38}$  or  $\sigma^{32}$ . *J. Biol. Chem.* **280**:41315–41323.
7. Duque, E., A. J. Molina-Henares, J. de la Torre, M. A. Molina-Henares, T. del Castillo, J. Lam, and J. L. Ramos. 2007. Towards a genome-wide mutant library of *Pseudomonas putida* strains KT2440, p. 227–254. In J. L. Ramos (ed.), *Pseudomonas*, vol. V. Springer, London, United Kingdom.
8. Eleuteri, A. M., R. A. Kohanski, C. Cardozo, and M. Orlowski. 1996. Bovine spleen multicatalytic proteinase complex (proteasome). *Appl. Photophys.* **27**:11824–11831.
9. González-Peréz, M. M., S. Marqués, P. Domínguez-Cuevas, and J. L. Ramos. 2002. XylS activator and RNA polymerase binding sites at the Pm promoter overlap. *FEBS Lett.* **519**:117–122.
10. Hengge-Aronis, R. 2002. Signal transduction and regulatory mechanisms involved in control of the  $\sigma^S$  (RpoS) subunit of RNA polymerase. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **66**:373–395.
11. Ho, K. K., and H. Weiner. 2005. Isolation and characterization of an aldehyde dehydrogenase encoded by the *aldB* gene of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **187**:1067–1073.
12. Holmquist, B., and B. L. Vallee. 1991. Human liver class III alcohol and glutathione dependent formaldehyde dehydrogenase are the same enzyme. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **178**:1371–1377.
13. Hurtubise, Y., D. Barriault, and M. Sylvestre. 1998. Involvement of the terminal oxygenase  $\beta$  subunit in the biphenyl dioxygenase reactivity pattern toward chlorobiphenyls. *J. Bacteriol.* **180**:5828–5835.
14. Jiménez, J. I., B. Miñambres, J. L. García, and E. Díaz. 2004. Genomic insights in the metabolism of aromatic compounds in *Pseudomonas*, p. 425–490. In J. L. Ramos (ed.), *Pseudomonas*, vol. 3. Kluwer, London, United Kingdom.
15. Lacour, S., and P. Landini. 2004.  $\sigma^S$ -dependent gene expression at the onset of stationary phase in *Escherichia coli*: function of  $\sigma^S$ -dependent genes and identification of their promoter sequences. *J. Bacteriol.* **186**:7186–7195.
16. Lee, S., and J. D. Gralla. 2001.  $\sigma^{38}$  (rpoS) RNA polymerase promoter engagement via  $-10$  region nucleotides. *J. Biol. Chem.* **276**:30064–30071.
17. Lee, S., H. Bergeron, P. C. K. Lau, and J. P. N. Rosazza. 2007. Thiols in nitric oxide synthase-containing *Nocardia* sp. strain NRRL5646. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**:3095–3097.
18. Lessie, T. G., and F. C. Neidhardt. 1967. Formation and operation of the histidine-degrading pathway in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **93**:1800–1810.
19. Llamas, M., J. L. Ramos, and J. J. Rodríguez-Herva. 2000. Mutations in each of the *tol* genes of *Pseudomonas putida* reveal that they are critical for the maintenance of outer membrane stability. *J. Bacteriol.* **182**:4764–4772.
20. Marqués, S., J. L. Ramos, and K. N. Timmis. 1993. Analysis of the mRNA structure of the *Pseudomonas putida* TOL meta-fission pathway operon. *Biochim. Biophys. Acta* **1216**:227–236.
21. Marqués, S., M. T. Gallegos, and J. L. Ramos. 1995. Role of  $\sigma^S$  in transcription from the positively controlled Pm promoter of the TOL plasmid of *Pseudomonas putida*. *Mol. Microbiol.* **18**:851–857.
22. Marx, C. J., J. A. Miller, L. Chistoserdova, and M. E. Lidstrom. 2004. Multiple formaldehyde oxidation/detoxification pathways in *Burkholderia fungarum* LB400. *J. Bacteriol.* **186**:2173–2178.
23. Miller, J. H. 1972. A short course in bacterial genetics: a laboratory manual handbook for *Escherichia coli*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
24. 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. Dusterhoft, B. Tümmler, and C. M. Fraser. 2002. Complete genome sequence and comparative analysis of the metabolically versatile *Pseudomonas putida* KT2440. *Environ. Microbiol.* **4**:799–808.
25. Qian, M., M. A. Liauw, and G. Emig. 2003. Formaldehyde synthesis from methanol over silver catalysts. *Appl. Catal.* **20**:211–222.
26. Rajkumari, K., S. Kusano, A. Ashihama, T. Mizuno, and J. Gowrishankar. 1996. Effects of H-NS and potassium glutamate on  $\sigma^S$ - and  $\sigma^{70}$ -directed transcription in vitro from osmotically regulated P1 and P2 promoters of *proU* in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **178**:4176–4181.
27. Ramos-González, M. I., and S. Molin. 1998. Cloning, sequencing, and phenotypic characterization of the *rpoS* gene from *Pseudomonas putida* KT2440. *J. Bacteriol.* **180**:3421–3431.
28. Ras, J., P. W. Van Ophem, W. N. Reijnders, R. J. Van Spanning, J. A. Duine, A. H. Stouthamer, and N. Harms. 1995. Isolation, sequencing, and mutagenesis of the gene encoding NAD- and glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase (GD-FALDH) from *Paracoccus denitrificans*, in which GD-FALDH is essential for methylotrophic growth. *J. Bacteriol.* **177**:247–251.
29. Roca, A., J. J. Rodríguez-Herva, E. Duque, and J. L. Ramos. 2008. Physiological responses of *Pseudomonas putida* to formaldehyde during detoxification. *Microb. Biotechnol.* **1**:158–169.
30. Sakamoto, A., M. Veda, and H. Morikawa. 2002. *Arabidopsis* glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase is an *S*-nitrosoglutathione reductase. *FEBS Lett.* **515**:20–25.
31. Spaik, H. P., R. J. H. Okker, C. A. Wijffelman, E. Pees, and B. J. J. Lugtberg. 1987. Promoters in the nodulation region of the *Rhizobium leguminosarum* Sym plasmids pRL1J1. *Plant Mol. Biol.* **9**:27–39.
32. Tabor, H., A. H. Mehler, O. Hayaishi, and J. White. 1952. Urocanic acid as an intermediate in the enzymatic conversion of histidine to glutamic and formic acids. *J. Biol. Chem.* **196**:121–130.
33. Tanaka, K., Y. Takayanagi, N. Fujita, A. Ishihama, and H. Takahashi. 1993. Heterogeneity of the principal sigma factor in *Escherichia coli*: the rpoS gene product, sigma 38, is a second principal sigma factor of RNA polymerase in stationary-phase *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**:3511–3515.
34. Tanaka, K., S. Kusano, N. Fujita, A. Ishihama, and H. Takahashi. 1995. Promoter determinants for *Escherichia coli* RNA polymerase holoenzyme containing  $\sigma^{38}$  (the *rpoS* gene product). *Nucleic Acids Res.* **23**:827–834.
35. Tanaka, N., Y. Kusakabe, K. Ito, T. Yushimoto, and K. T. Nakamura. 2002. Crystal structure of formaldehyde dehydrogenase from *Pseudomonas putida*: the structural origin of the tightly bound cofactor in nicotinoprotein dehydrogenases. *J. Mol. Biol.* **324**:519–533.
36. van den Hemel, D., A. Brigé, A. N. Savvides, and J. van Beumen. 2006. Ligand-induced conformational changes in the capping subdomain of a bacterial old yellow enzyme homologue and conserved sequence fingerprints provide new insights into substrate binding. *J. Biol. Chem.* **281**:28152–28161.
37. van Dillewijn, P., R. M. Wittich, A. Caballero, and J. L. Ramos. 2008. Type II hydride transferases from different microorganisms yield nitrite and diarylamines from polynitroaromatic compounds. *Appl. Environ. Microbiol.* **74**:6820–6823.
38. van Dillewijn, P., R. M. Wittich, A. Caballero, and J. L. Ramos. 2008. Subfunctionality of hydride transferases of the Old Yellow Enzyme family of flavoproteins of *Pseudomonas putida*. *Appl. Environ. Microbiol.* **74**:6703–6708.
39. Yang, Z.-N., W. F. Bosron, and T. D. Hurley. 1997. Structure of human XX alcohol dehydrogenase: a glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase. *J. Mol. Biol.* **265**:330–343.
40. Zinoni, F., J. Heider, and A. Böck. 1990. Features of the formate dehydrogenase mRNA necessary for decoding of the UGA codon as selenocysteine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**:4660–4664.

CAPÍTULO 3: PAPEL “IN VIVO” DE *fdhD* Y *fmdD* EN EL  
METABOLISMO DEL FORMATO EN *Pseudomonas putida*:  
REDUNDANCIA Y EXPRESIÓN EN FASE ESTACIONARIA



## CAPÍTULO 3

### **Papel “in vivo” de *fdhD* y *fmdD* en el metabolismo del formato en *Pseudomonas putida*: Redundancia y expresión en fase estacionaria.**

**Amalia Roca y Juan L. Ramos**

En *Pseudomonas putida* KT2440 dos marcos abiertos de lectura (ORFs) PP0257 y PP0492 se anotaron originalmente como proteínas accesorias formato deshidrogenasa. La ORF PP0492 (*fmdD*) se sitúa en el extremo 3' del operón formato deshidrogenasa que se extiende desde la ORF PP0489 hasta la ORF PP0491, una de las formato deshidrogenasas de *P. putida* y se transcribe con este operón preferencialmente en fase estacionaria. La ORF PP0257 (*fdhD*) no está ligada a las agrupaciones génicas formato deshidrogenasa y, al igual que las multicomponentes formato deshidrogenasa, PP0257 se expresa preferentemente en la fase estacionaria de crecimiento, aunque la transcripción puede ser mediada por RpoD o RpoS. El nivel de expresión transcripcional de *fdhD* se ve incrementado en respuesta a formaldehído o formato o con compuestos químicos que rinden estos compuestos C<sub>1</sub> en algún paso de su metabolismo. A pesar de estas correlaciones, la inactivación de PP0257 no produce un efecto significativo en la actividad formato deshidrogenasa *in vivo*, mientras que la inactivación de PP0492 llevó a un descenso del 60% de la actividad *in vivo*. Estos resultados sugieren que la redundancia de funciones en el metabolismo del formaldehído en *P. putida* se extiende hasta las proteínas implicadas en la maduración/localización de los complejos formato deshidrogenasa.

*Environmental Microbiology Reports*

Vol. 1, Nº 10, pp.: 208-213, April 2009.



## ***In vivo* role of FdhD and FmdD in formate metabolism in *Pseudomonas putida*: Redundancy and expression in the stationary phase**

Amalia Roca<sup>†</sup> and Juan L. Ramos\*

Department of Environmental Protection, Consejo Superior de Investigaciones científicas, Estación Experimental del Zaidín, Granada, Spain.

### Summary

**In *Pseudomonas putida* two open reading frames (ORFs) PP0257 and PP0492 were originally annotated as accessory formate dehydrogenase proteins. The ORF PP0492 (*fmdD*) is at the 3' end of the ORF PP0489 through PP0491 operon that encodes one of the formate dehydrogenases of *P. putida* and it is transcribed with this operon preferentially at the stationary phase. The ORF PP0257 (*fdhD*) is unlinked to formate dehydrogenase clusters and, as to multi-component formate dehydrogenases, PP0257 is also preferentially expressed in the stationary phase, although transcription can be mediated by either RpoD or RpoS. The transcriptional level of expression of *fdhD* increased in response to formaldehyde/formate or chemicals that yield these cited C1 compounds through their metabolism. In spite of these correlations, inactivation of PP0257 does not produce a significant effect on *in vivo* formate dehydrogenase activity, while inactivation of PP0492 leads to a 60% decrease in *in vivo* activity. These results suggest that redundancy in formaldehyde/formate metabolism in *P. putida* extends to the proteins involved in maturation/location of formate dehydrogenase complexes.**

*Pseudomonas putida* KT2440 is a soil microorganism with a versatile lifestyle. The strain is extremely robust and responds to the presence of small toxic molecules through the activation of a wide range of stress defence mechanisms (Segura *et al.*, 2005; Domínguez-Cuevas *et al.*, 2006; Roca *et al.*, 2008; Ramos *et al.*, 2009) and, when available, the activation of enzymatic detoxification

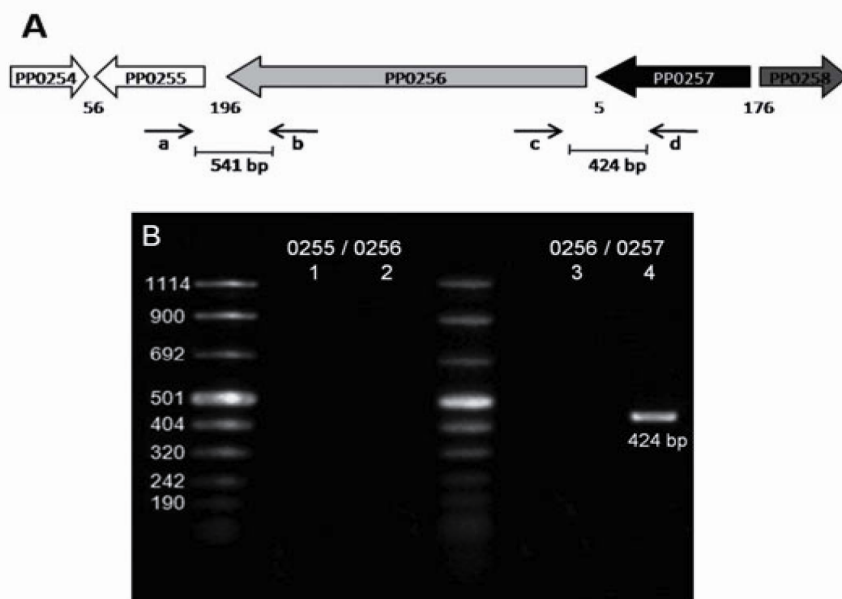
enzymes (Ramos *et al.*, 2009). A recently discovered feature of this strain is its high level of tolerance towards formaldehyde and formate. *Pseudomonas putida* KT2440 reacts to formaldehyde and formate via the activation of DNA-repair systems, chaperones and the extrusion of chemicals via the MexEF/OprN efflux pump (Roca *et al.*, 2008). In addition, this strain detoxifies formaldehyde via the coupled action of formaldehyde dehydrogenase/formate dehydrogenase systems (Roca *et al.*, 2009). The original sequencing and annotation of the KT2440 strain predicted two NAD<sup>+</sup>-linked formaldehyde dehydrogenases that oxidize formaldehyde to formate (Nelson *et al.*, 2002), although other, yet unidentified, dehydrogenase is also present as deduced from the fact that a double mutant in the two annotated formaldehyde dehydrogenases is still able to oxidize formaldehyde (Roca *et al.*, 2009).

In *P. putida*, two multi-component formate dehydrogenases (PP0489–PP0491 and PP2183–PP2186) have been shown to play an important part in the detoxification of formaldehyde. In addition to these characterized complexes, two open reading frames (ORFs) were annotated as 'accessory' formate dehydrogenase proteins (PP0257 and PP0492), and BLAST analyses of the derived products of these ORFs revealed that one of them (PP0492 – called *fmdD*–) exhibited almost 40% identity to *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* FdhE, while the same analysis showed that PP0257 exhibited 40% identity to *E. coli* and *S. enterica* FdhD protein (Fig. S1).

In *E. coli* and *S. enterica* FdhE has been shown to participate in the TAT-dependent export of mature formate dehydrogenase complexes to the periplasmic space, while FdhD has been described as an accessory protein for the maturation of multi-complex formate dehydrogenases (Mandrand-Berthelot *et al.*, 1988; Lüke *et al.*, 2008). In terms of genetic organization, in *E. coli*, both *fdhD* and *fdhE* are adjacent to the *fdoGHl* operon, which is one of the known formate dehydrogenase operons (Schlindwein *et al.*, 1990; Abaibou *et al.*, 1997). In *P. putida* KT2440, the gene encoding FmdD (FdhE) (PP0492) is physically adjacent to one of the operons of the multi-complex formate dehydrogenases (PP0489–PP0491) and RT-PCR assays revealed that *fmdD* is transcribed with the three adjacent genes in the 5' direction, whereas the

Received 3 April 2009; accepted 3 April 2009. \*For correspondence. E-mail: jlramos@eez.csic.es; Tel. (+34) 958 181608; Fax (+34) 958 135740. <sup>†</sup>Present address: Bio-Iliberis R&D, Parque Tecnológico de Ciencias de la Salud, Edificio BIC, Lab. 203, Av. de la Innovación, 1, E-18100 Armilla – Granada (Spain).





**Fig. 1.** Physical and transcriptional organization of genes surrounding *Pseudomonas putida* ORF PP0257. A. Physical organization of the gene cluster PP0254 to PP0258. The arrows indicate the direction of transcription, and the number within each arrow is the corresponding ORF number. The intragenic distance is indicated by a number under the arrows. B. RT-PCR assay. Lanes 1 and 2 correspond to the RT-PCR assay of mRNA from cells in the stationary phase using appropriate primers based on the 5' end of PP0255 (in A) (5'-AGCGACCGACCACGTTACCA-3') and the 3' end of PP0256 (in A) (5'-GCCATACGC CGACATCGAAG-3'). Lanes 3 and 4 are the same assays but with primers based on the 5' end of PP0256 (in A) (5'-GCGCCGTCT CGCAGAACTT-3') and the 3' end of PP0257 (5'-TGCAGCCTCGAGCTGATCCA-3'). The size of the cDNA amplified fragment is shown.

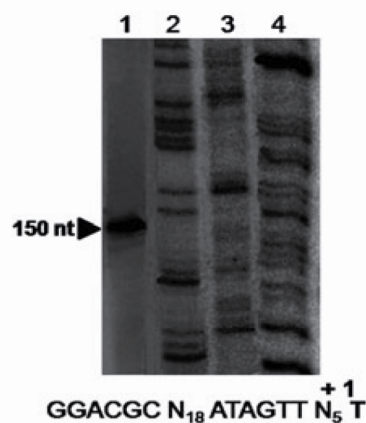
single copy of the *fdhD* gene is unlinked to the two formate dehydrogenase clusters.

Our previous transcriptomic studies showed that expression of the ORF encoding PP0257 was among those that are induced the most in *P. putida* KT2440 (Roca *et al.*, 2008) when cells were grown in the presence of sub-lethal concentrations of formaldehyde. We also found that *P. putida* formaldehyde dehydrogenase and formate dehydrogenases are preferentially expressed at the onset of the stationary phase and that their expression seems to be mediated by RNA polymerase with  $\sigma^{38}$  (Roca *et al.*, 2009).

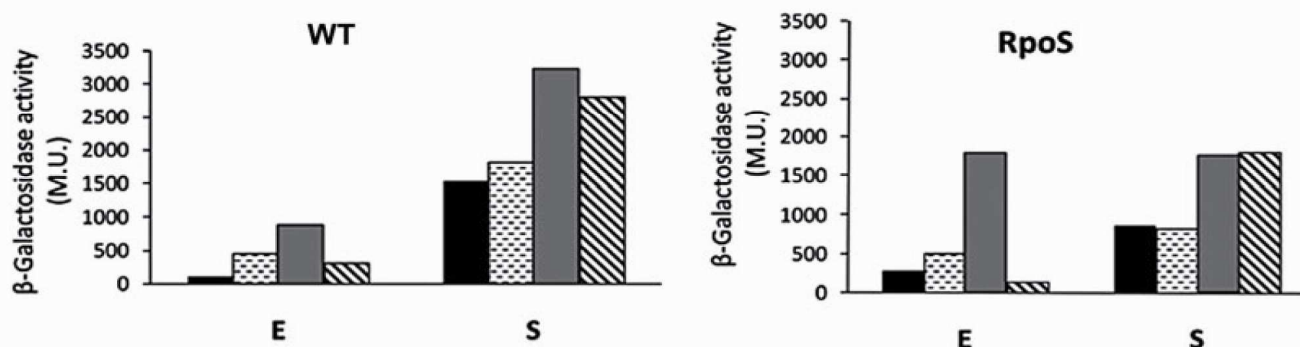
This study was undertaken to analyse the physical and transcriptional organization of ORF PP0257 in greater detail and to generate mutants of PP0257 and PP0492 to study their potential effect(s) on formate metabolism. The physical and transcriptional organization of the region around PP0257 was first analysed *in silico*, and was found to be transcribed divergently with respect to PP0258 and in the same direction as PP0256 and PP0255. The short distance between PP0257 and PP0256 (5 bp) suggested that both genes may form an operon (Fig. 1). This possibility seemed even more likely, because the distance between the stop codon of PP0256 and the next gene was 196 bp. To confirm these *in silico* predictions, total RNA was extracted from KT2440 cells grown on Luria-Bertani (LB) medium plus 0.5 mM formaldehyde and RT-PCR assays were carried out with the appropriate primers based on the 5' and 3' primers of adjacent genes to determine potential co-transcription. The results yielded a cDNA product size corresponding to PP0256/PP0257 sequences, confirming that these genes form an operon

(Fig. 1), whereas PP0256 was shown not to be co-transcribed with PP0255 (Fig. 1).

To determine the transcription start point and to define the promoter of PP0257 we used the above isolated total RNA to carry out primer extension assays using a primer located 52 bp downstream from the first ATG. The extension revealed a single transcription start point and the size of the extended product was compatible with the T marked +1 (Fig. 2). Interestingly, a hexamer was found from -6 to -11 with the sequence 5'-ATAGTT-3', which



**Fig. 2.** Determination of the transcription start point of *fdhD*. RNA was isolated from culture cells that had reached a turbidity of about 3 at 660 nm. Preparations of RNA and primer extension reactions were performed as described by Marqués *et al.* (1993). The primer used for extension was 5'-GTCGTAGGTGTTGCTGGCGG-3', and the extension product is shown in lane 1. Lanes 2-4 correspond to a DNA-sequencing ladder. The relevant sequences in the promoter.



**Fig. 3.** Expression level of PP0257 measured as  $\beta$ -galactosidase under different growth conditions and in different host backgrounds. The promoter region of ORF PP0257 was fused to the *'lacZ* in pMP220 (Tc<sup>R</sup>) (Spaink *et al.*, 1987) to yield pMP0257. The bona fide of the construction was confirmed by DNA sequencing. Plasmid pMP0257 was transformed in the KT2440 (WT) strain and its isogenic RpoS mutant (Ramos-González and Molin, 1998) and cells were grown on LB without (black) or with 0.5 mM formaldehyde (dotted), 10 mM formate (grey) or 5 mM histidine (hatched).  $\beta$ -Galactosidase activity was measured according to Miller's method (Miller, 1972) in cells in the exponential phase ( $OD_{660} = 0.7-0.8$ ) or in the stationary phase ( $OD_{660} = 3-3.2$ ).

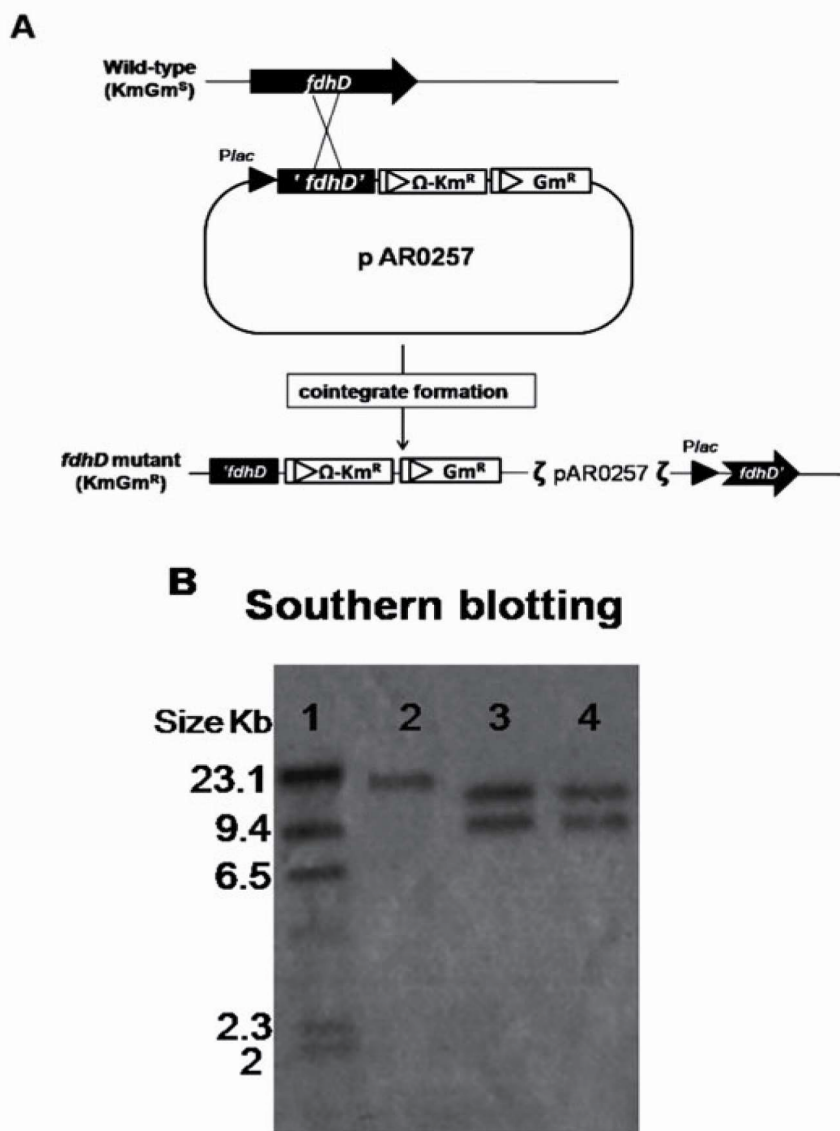
exhibits similarities with promoters recognized by  $\sigma^{70}$ . A CG-rich region with no apparent homology to  $-35$  hexamers was also found (Fig. 2).

We constructed a fusion of the promoter region of PP0257 to *'lacZ* in the low-copy-number plasmid pMP220 (Spaink *et al.*, 1987) and determined the time-course expression of the gene encoding PP0257 in the parental strain. To construct the fusion we PCR amplified, using appropriate primers with PstI and BglII sites at the 5' and 3' end respectively, a 175 bp chromosomal DNA fragment and ligated it to PstI/BglII digested pMP220. The ligation was transformed and Tc<sup>R</sup> clones were selected in *E. coli* CC118. One of the plasmids, called pMP0257, was found to carry the correct fusion, which was confirmed by DNA sequencing. The pMP0257 plasmid was transformed into *P. putida* KT2440 and cells were grown in LB medium. We found that PP0257 was expressed at a certain basal level during the exponential growth of the cells (not shown), and which increased about 10-fold when the cell density of the cultures reached a turbidity  $> 1.0$  (Fig. 3). The time-course expression of PP0257 was similar to that described before for formate dehydrogenase clusters, the expression of which has been previously shown to be partially dependent on RpoS (Roca *et al.*, 2009). To test whether expression from PP0257 was also RpoS-dependent, we determined expression from the PP0257 promoter in an RpoS-deficient background. We found a certain basal level of expression, measured as  $\beta$ -galactosidase activity in cells in the expression phase of the growth, and that in contrast with the parental strain expression from PP0257 increased about threefold in the RpoS mutant background, suggesting that expression from PP0257 promoter *in vivo* is partly dependent on RpoS (Fig. 3).

Subsequently we determined  $\beta$ -galactosidase levels in RpoS-proficient and RpoS-deficient cells growing with

formaldehyde, formate, vanillate and histidine. Histidine and the methoxylated benzoate were used because formaldehyde and formate are produced in their catabolism (Hu and Phillips, 1988; Overhage *et al.*, 1999; Priefert *et al.*, 2001; Hibia *et al.*, 2005). The results showed that the RpoS mutant grew with doubling times similar to those of the parental strain in the absence and in the presence of all these chemicals. In the parental strain and in the RpoS isogenic mutant in the presence of these chemicals we found that the basal level of expression in the exponential phase increased with respect to the basal one in the absence of chemicals and, in particular with formate (Fig. 3). In the stationary phase in the parental strain with formaldehyde or formate or compounds that lead to their production, expression reached near 3000 units. In the mutant RpoS background, expression from PP0257 also increased but maximal level were about half of those reached in the parental strain (Fig. 3). This again supports a modest but statistically significant contribution of RpoS to the expression from PP0257.

In *E. coli* and *S. enterica*, mutants deficient in *fdhE* or *fdhD* exhibited low levels of formate dehydrogenase activity (Mandrang-Berthelot *et al.*, 1988; Paveglio *et al.*, 1988; Schlindwein *et al.*, 1990; Crouch *et al.*, 2005). Complementation of *E. coli fdhD* mutants by cloned *fdhD* gene, but not *fdhE*, restored formate dehydrogenase activity (Mandrang-Berthelot *et al.*, 1988). This suggests that FdhD and FdhE play a role at distinct steps in the maturation of formate dehydrogenases in *E. coli*. To determine the potential role of FdhE and FdhD in *P. putida* in regard to formate metabolism we acquired a mutant PP0492 from the *Pseudomonas* mutant collection (Duque *et al.*, 2007) and we created a mutant in PP0257 using site-directed mutagenesis (Fig. 4). In order to carry out site-directed mutagenesis, a 489 bp fragment of the central



**Fig. 4.** Construction of a PP0257 mutant knock-out by site-directed mutagenesis.

**A.** Strategy used to construct an *fdhD* mutant of *P. putida*. The figure shows the physical map of pCHESI  $\Omega$ -KmGm, which is a derivative of pCHESI  $\Omega$ -Km originally constructed by Llamas and colleagues (2003). To generate the *fdhD* mutation, a 489 bp fragment of the *P. putida fdhD* gene was amplified by PCR by using primers that provide EcoRI and SacI sites and was subsequently ligated to pCHESI  $\Omega$ -KmGm digested with the same restriction enzymes. The resulting plasmid, pAR0257, was transformed into CC118 *P. putida* KT2440 as described by Choi and colleagues (2005), and Gm<sup>R</sup> recombinant clones were selected after co-integration into the host chromosome. **B.** Identification of mutant strains. Lane 1 is a molecular weight size marker, lane 2 is wild-type DNA and lanes 3 and 4 are two random clones. DNA was cut with SmaI and hybridized against the *fdhD* gene as a probe. Other details are in the text.

region of PP0257 was PCR-amplified using primers containing EcoRI and SacI sites, then subsequently ligated to the EcoRI/SacI-digested pCHESI $\Omega$ KmGm vector (Llamas *et al.*, 2000; P. van Dillewijn and J.L. Ramos, unpublished) in the same transcriptional direction as the *lac* promoter. This plasmid was called pAR0257. The plasmid was then transferred to KT2440, as described by Choi and colleagues (2005), and double recombinant clones were selected as Km-resistant and Gm-resistant derivatives. The mutant clones were checked by southern blot to confirm that pAR0257 had integrated into and disrupted the target gene. One clone, designated as *P. putida* AR0257, was chosen for further study.

To measure the effect of deficiency in FmdD and FdhD we decided to measure evolution of <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> from <sup>14</sup>C-

formate and <sup>14</sup>C-formaldehyde in the parental strain and each knock-out mutant. The parental and mutant strains were then incubated with 0.5  $\mu$ Ci <sup>14</sup>C-formaldehyde or 5  $\mu$ Ci C-formate and after a 24 h incubation, the evolution of <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> was measured. We found that the PP0257 mutant strain evolved almost identical levels to the parental strain with either of the labelled substrates, suggesting that PP0257 is not relevant per se for formaldehyde/formate detoxification. To support this possibility we determined the killing kinetics of the mutant deficient in PP0257 in response to 10 mM formaldehyde and compared the killing rates with those reported before by Roca and colleagues (2008). We observed a decrease in the rate of survival of 10<sup>-3</sup> per ml for mutants devoid of PP0257, which was similar to that of the parental strain. Therefore,

212 A. Roca and J. L. Ramos

our *in vivo* results suggest that although expression of PP0257 is partially RpoS-dependent and parallels that of formate dehydrogenase, a PP0257 knock-out mutant is still able to metabolize formate to the same extent as the parental strain. The protein or proteins that may replace FdhD in *P. putida* are yet unknown and further research is necessary. In contrast a mutant deficient in FmdD exhibited around 50% lower levels of  $^{14}\text{CO}_2$  evolution from  $^{14}\text{C}$ -formate suggesting a direct role in maturation/location of formate dehydrogenases in *P. putida*. This indicates that in *P. putida* redundancy of proteins for formaldehyde/formate metabolism can extend to accessory proteins, as it is the case for the corresponding formaldehyde dehydrogenases/formate dehydrogenases.

### Acknowledgements

Amalia Roca is the recipient of a Torres Quevedo contract from the Spanish Ministry of Innovation, Science and Technology. This work has been supported by grants from Junta de Andalucía (CVI 344), European Commission (GEN2006-27750) and Frontier Programme of the CSIC.

### References

- Abaibou, H., Giordano, G., and Mandrand-Berthelot, M.A. (1997) Suppression of *Escherichia coli* formate hydrogenlyase activity by trimethylamine *n*-oxide is due to drainage of the inducer formate. *Microbiology* **143**: 2657–2664.
- Choi, K.H., Kumar, A., and Schweizer, H.P. (2005) A 10-min method for preparation of highly electrocompetent *Pseudomonas aeruginosa* cells: application for DNA fragment transfer between chromosomes and plasmid transformation. *J Microbiol Methods* **64**: 391–397.
- Crouch, M.L., Becker, L.A., Bang, I.S., Tanabe, H., Ouellete, A.J., and Fang, F.C. (2005) The alternative sigma factor sigma E is required for resistance of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium to anti-microbial peptides. *Mol Microbiol* **56**: 789–799.
- 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.
- Duque, E., Molina-Henares, A.J., de la Torre, J., Mohna-Henares, M.A., del Castillo, T., Lam, J., and Ramos, J.L. (2007) Towards a genome-wide mutant library of *Pseudomonas putida* strain KT2440. In *Pseudomonas Vol 5*. Ramos, J.L., and Filloux, A. (eds). Dordrecht, the Netherlands: Springer, pp. 227–251.
- Hibia, M., Sonokia, T., and Moria, H. (2005) Functional coupling between vanillate-*O*-demethylase and formaldehyde detoxification pathway. *FEMS Microbiol Lett* **253**: 237–242.
- Hu, L., and Phillips, A.T. (1988) Organization and multiple regulation of histidine utilization genes in *Pseudomonas putida*. *J Bacteriol* **170**: 4272–4279.
- Llamas, M., Ramos, J.L., and Rodríguez-Herva, J.J. (2000) Mutations in each of the *tol* genes of *Pseudomonas putida* reveal that they are critical for the maintenance of outer membrane stability. *J Bacteriol* **182**: 4764–4772.
- Llamas, M.A., Ramos, J.L., and Rodríguez-Herva, J.J. (2003) Transcriptional organization of the *Pseudomonas putida tol-oprL* genes. *J Bacteriol* **185**: 184–195.
- Lüke, I., Butland, G., Moore, K., Buchanan, G., Lyall, V., Fairhurst, S.A., et al. (2008) Biosynthesis of the respiratory formate dehydrogenases from *Escherichia coli*: characterization of the FdhE protein. *Arch Microbiol* **190**: 685–696.
- Mandrand-Berthelot, M.A., Couchoux-Luthaud, G., Santini, C.L., and Giordano, G. (1988) Mutants of *Escherichia coli* specifically deficient in respiratory formate dehydrogenase activity. *Gen Microbiol* **134**: 3129–3139.
- Marqués, S., Ramos, J.L., and Timmis, K.N. (1993) Analysis of the mRNA structure of the *Pseudomonas putida* TOL meta fission pathway operon around the transcription initiation point, the *xylTE* and *teh xylFJ* regions. *Biochim Biophys Acta* **1216**: 227–236.
- Miller, J. (1972) *Experiments in Molecular Genetics*. Cold Spring Harbor Lab., Cold Spring Harbor, USA.
- Nelson, K.E., Weinel, C., Paulsen, I.T., Dodson, R.J., Hilbert, H., Martins dos Santos, V.A., et al. (2002) Complete genome sequence and comparative analysis of the metabolically versatile *Pseudomonas putida* KT2440. *Environ Microbiol* **4**: 799–808.
- Overhage, J., Priefert, H., and Steinbüchel, A. (1999) Biochemical and genetic analyses of ferulic acid catabolism in *Pseudomonas* sp. strain HR199. *Appl Environ Microbiol* **65**: 4837–4847.
- Paveglio, M.T., Tang, J.S., Unger, R.E., and Barrett, E.L. (1988) Formate-nitrate respiration in *Salmonella typhimurium*: studies of two *rha*-linked *fdn* genes. *J Bacteriol* **170**: 213–217.
- Priefert, H., Rabenhorst, J., and Steinbüchel, A. (2001) Biotechnological production of vanillin. *Appl Microbiol Biotechnol* **56**: 296–314.
- Ramos-González, M.I., and Molin, S. (1998) Cloning, sequencing and phenotypic characterization of the *rpoS* gene from *Pseudomonas putida* KT2440. *J Bacteriol* **180**: 3421–3431.
- Ramos, J.L., Krell, T., Daniels, C., Segura, A., and Duque, E. (2009) Responses of *Pseudomonas* to small toxic molecules by a mosaic of domains. *Curr Opin Microbiol* **12**: 215–220.
- Roca, A., Rodríguez-Herva, J.J., Duque, E., and Ramos, J.L. (2008) Physiological responses of *Pseudomonas putida* to formaldehyde during detoxification. *Microbial Biotechnol* **1**: 158–169.
- Roca, A., Rodríguez-Herva, J.J., and Ramos, J.L. (2009) Redundancy of enzymes for formaldehyde detoxification in *Pseudomonas putida*. *J Bacteriol* **191** (in press).
- Schindwein, C., Giordano, G., Santini, C.L., and Mandrand, M.A. (1990) Identification and expression of the *Escherichia coli fdhD* and *fdhE* genes, which are involved in the formation of respiratory formate dehydrogenase. *J Bacteriol* **172**: 6112–6121.
- 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.

Spaink, H.P., Okker, R.J.H., Wijffelman, C.A., Pees, E., and Lugtenberg, B.J.J. (1987) Promoters in the nodulation region of the *Rhizobium leguminosarum* Sym plasmid pRL1J1. *Plant Mol Biol* **9**: 27–39.

#### Supporting information

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article:

**Fig. S1.** Alignment of FdhE and FdhD of *P. putida* KT2440 to the corresponding proteins from *E. coli* K-12.

Please note: Wiley-Blackwell are not responsible for the content or functionality of any supporting materials supplied by the authors. Any queries (other than missing material) should be directed to the corresponding author for the article.

## **V. DISCUSIÓN GENERAL**



El formaldehído es un compuesto tóxico para todos los seres vivos debido a su alta reactividad con componentes celulares como los ácidos nucleicos y las proteínas (Englesberg, 1952). Aunque se considera un contaminante industrial, se ha de tener en cuenta que el formaldehído es un subproducto en el metabolismo de la histidina y compuestos naturales metoxilados, y dado su origen biogénico no es sorprendente que los seres vivos hayan desarrollado mecanismos de detoxificación de formaldehído. En esta Tesis Doctoral se ha puesto de manifiesto que en *P. putida* KT2440 el formaldehído se detoxifica a través de su oxidación a formato, un compuesto menos tóxico, que a su vez es subsecuentemente transformado en CO<sub>2</sub>. Los ensayos de mineralización con <sup>14</sup>C-formaldehído revelaron la total carencia de incorporación de <sup>14</sup>C en los esqueletos carbonados celulares, sugiriendo que en este microorganismo todo el formaldehído es mineralizado a CO<sub>2</sub>. Estos resultados contrastan con otros estudios publicados en otras cepas de *Pseudomonas sp.* en los que se describían cepas que eran capaces de crecer en formaldehído empleando la ruta de la ribulosa monofosfato (Goldberg y Matelis, 1975).

En este trabajo también hemos establecido que *P. putida* KT2440 exhibe un nivel de tolerancia innata a formaldehído que le permite crecer en presencia de concentraciones de 1,5 mM de este compuesto. Este nivel de resistencia es similar al tolerado por *E. coli* (Kummerle *et al.*, 1996), *Burkholderia* (Marx *et al.*, 2004), *Mycobacterium* (Mitsui *et al.*, 2000), *Bacillus* o *Methylobacterium* (Trujillo y Lindell, 1973; Jakobsen *et al.*, 2006; Orita *et al.*, 2006). Aunque concentraciones de 1,5 mM de formaldehído inhibían el crecimiento de esta cepa, las concentraciones de formaldehído que conducían a la muerte celular de KT2440 eran del orden de 10 mM, indicando que algunos de los sistemas de defensa contra este compuesto no funcionaba a suficiente nivel a esas concentraciones provocando la muerte celular. En el primer capítulo de esta Tesis Doctoral hemos identificado, utilizando ensayos de transcriptómica, un conjunto de genes implicados en la respuesta de *P. putida* KT2440 a concentraciones subletales de formaldehído, hecho que ha ayudado a que se comprenda mejor la respuesta inicial de la cepa a este compuesto químico.



Se ha analizado la supervivencia y la tasa de muerte en un conjunto de mutantes en genes inducidos en presencia de concentraciones subletales de formaldehído (0,5 mM), y las correlaciones que se han encontrado entre la inducción génica, la inhibición del crecimiento y el incremento de la sensibilidad a HCOH han permitido que se puedan identificar una red de genes que codifican proteínas implicadas en la respuesta a este compuesto tóxico, aspectos que se discuten en el texto que sigue.

Varios autores han puesto de manifiesto que en *Burkholderia* operan de forma simultánea varias rutas implicadas en el metabolismo del formaldehído (Marx *et al.*, 2003 y 2004), y que la inactivación de una o varias de estas rutas conduce a un incremento de la sensibilidad a formaldehído cuando se cultivan estas bacterias en metanol. En *P. putida* KT2440 los enzimas para la transformación de formaldehído en formato y de éste en CO<sub>2</sub> son redundantes, sin embargo, la inactivación de cualquiera de los segmentos de manera individual no influyó en la tolerancia de la cepa a formaldehído, sugiriendo que el metabolismo del formaldehído a CO<sub>2</sub> no es la vía principal de tolerancia al aldehído, lo cual contrasta con las observaciones hechas en *Burkholderia* por el grupo de Lindstrom.

En el primer capítulo de este trabajo se ha descrito que un mecanismo potencial para la tolerancia a formaldehído es la extrusión activa de este compuesto. En relación con este hecho hay que apuntar que la bomba de extrusión MexEF/OprN se induce específicamente en respuesta a formaldehído. Los resultados obtenidos en los ensayos de tolerancia en la cepa mutante MexEF sugieren que la extrusión de HCOH es relevante a cualquier concentración de este tóxico. Según la información de la que disponemos hasta el momento, éste es el primer caso en el que se ha identificado una bomba de eflujo de tipo RND capaz de expulsar moléculas orgánicas de bajo peso molecular como el formaldehído. Las bombas de eflujo RND pueden retirar sustratos del espacio periplásmico, de la membrana celular y del citoplasma bacteriano (Yu *et al.*, 2005; Takatsuka y Nikaido, 2006), y ello gracias a la presencia de una serie de lóbulos en la bomba de extrusión que actúan a nivel de canales intramoleculares que permiten la entrada de los sustratos de la bomba hasta el centro activo de extrusión. La expulsión de las moléculas tóxicas por estas bombas de eflujo se produce hacia el

exterior celular, ya que la bomba, situada en la membrana interna, se acopla a un canal de membrana externa que permite salvar el periplasma. Estudios de nuestro laboratorio apoyan que la bomba MexEF/OprN presenta un amplio espectro de extrusión de compuestos xenobióticos como el TNT (Fernández *et al.*, 2009) y participa, probablemente, en la homeostasis de fenilalanina (Herrera *et al.*, 2009b, enviado a publicación). Aunque la bomba MexEF extruye tetraciclina y ampicilina, su papel en la tolerancia a antibióticos es menos relevante que el que juega la bomba TtgABC (Godoy *et al.*, en preparación). El trabajo de Herrera *et al.* ha demostrado que el nivel basal de expresión de la bomba MexEF está controlado por el regulador global PhhR (Herrera *et al.*, 2009a, en prensa).

Por otro lado cabe destacar que en los estudios de transcriptómica aparecen inducidas otras dos bombas de la familia MFS (PP2647 y PP3658). Los mutantes en los genes que codifican dichas proteínas crecían al menos 4 veces más lentamente que la cepa parental a bajas concentraciones de HCOH, no obstante sus comportamientos en los ensayos de cinética de muerte eran similares al de la parental. Este dato se ha interpretado como que estas dos bombas de eflujo MFS juegan un papel en la tolerancia a bajas concentraciones de formaldehído.

Conforme a los estudios iniciales publicados en otros microorganismos el formaldehído provoca daños tanto en ADN como en proteínas (Englesberg, 1952), este dato concuerda con el hecho de que en respuesta a concentraciones subletales de formaldehído se encontraran inducidos genes que codifican proteínas implicadas en procesos de reparación de ADN y un conjunto de genes que codifican chaperonas. En la colección de mutantes de *Pseudomonas* (en la actualidad cuenta con más de 3000 mutantes identificados por secuenciación [Duque *et al.*, 2007, y datos no publicados]) no se dispone de mutantes en genes de chaperonas, por lo que su papel específico en la respuesta a formaldehído no se ha podido estudiar. No obstante se han identificado y descrito mutantes en los sistemas de reparación de ADN. Los mutantes deficientes en procesos de reparación de ADN *recA*, *recD* y *uvrB* eran extremadamente sensibles a elevadas concentraciones de formaldehído, indicando que los procesos de reparación de ADN son de gran importancia a nivel genético en la tolerancia a dicho compuesto.

Los mutantes *uvrB* y *recA* son interesantes ya que crecían con velocidades similares a la que presentaba la cepa parental en concentraciones subletales de HCOH, no obstante dichas cepas eran hipersensibles a elevadas concentraciones de HCOH. Este hecho contrasta con el de que el mutante en *recD* crecía con tiempos de generación muy elevados a bajas concentraciones de formaldehído, sugiriendo que es necesario un nivel mínimo de RecD para la supervivencia a cualquier concentración de formaldehído.

El formaldehído además puede llegar a producir estrés oxidativo al alterar el funcionamiento de la cadena respiratoria (Nachin *et al.*, 2005). De acuerdo con esta hipótesis se observó inducción en algunos sistemas que están implicados en la respuesta a estrés oxidativo, como la biosíntesis de GSH y deshidrogenasas de hidroxiaácidos. Los mutantes deficientes en la síntesis de glutatión y los que estaban afectados en los locus PP1616 y PP2426, los cuales codifican dos 2-hidroxiaácido deshidrogenasas específicas de isómeros D, no crecían o crecían deficientemente en presencia de formaldehído 1,5 mM. Analizando en conjunto los genes inducidos en respuesta formaldehído; bombas de extrusión, sistemas de reparación de ADN y de replegamiento de proteínas y sistemas contra estrés oxidativo, hemos propuesto que *P. putida* pone marcha un conjunto de mecanismos para poder sobrevivir en presencia de formaldehído mas que para crecer en presencia de este tóxico. Este tipo de comportamiento se ha observado también cuando KT2440 se enfrenta a choques de compuestos orgánicos tales como el tolueno, *orto*-xileno o 3-metilbenzoato (Domínguez-Cuevas *et al.*, 2006). Así mismo se ha descrito que en *Bacillus subtilis* en respuesta a distintos estreses (choque térmico, sales, choque de etanol, variaciones de pH...) se inducían genes que codifican chaperonas y genes relacionados con procesos de reparación de ADN (Hellmann *et al.*, 2001; Goranov *et al.*, 2006). Por lo que las observaciones realizadas en respuesta a formaldehído podrían tener un carácter de tipo general.

Aunque los estudios transcriptómicos nos ayudaron a identificar qué genes se inducían o reprimían en respuesta a formaldehído, no todos los genes inducidos juegan un papel esencial en dicha respuesta, considerándose este incremento de expresión como inducción gratuita (Ramos *et al.*, 2001). Casos como este se han descrito en *P. putida* DOT-T1E y *P. putida* S12 expuestas a tolueno, las cuales presentaban un incremento de la expresión en la fructosa 1-6 bifosfato aldolasa y en la fosfenolpiruvato carboxiquinasa, pero los mutantes en los genes que codifican dichas proteínas presentaban un comportamiento similar al del parental (Segura *et al.*, 2005). Por otro lado y en relación con el estrés oxidativo se ha descrito que el mutante en *XenB* (PP0920) mostraba un comportamiento similar al de la cepa silvestre. Esto podría ser debido a que *P. putida* posee 7 genes homólogos a *xenB* (van Dillewijn, sin publicar), y es posible que su redundancia sea la fuente por la que el comportamiento del mutante es idéntico al de la cepa parental.

Una de las hipótesis que se propuso en esta Tesis Doctoral es que la expresión de genes que codifican proteínas esenciales para la tolerancia a formaldehído podría no inducirse en respuesta a dicho compuesto. Para comprobar esta hipótesis se generó un banco de 5000 mutantes independientes. Entre estos, se identificó un mutante, *recD*, sensible a formaldehído, cuyo nivel de expresión no cambiaba significativamente en respuesta a HCOH. Este resultado, sugiere que la proteína RecD, no sólo estaría implicada en procesos de reparación de ADN, si no que sería crítica para la supervivencia de KT2440 cuando ésta se expone a bajas concentraciones de HCOH. Como se mencionó en la introducción de esta Tesis, *P. putida* es capaz de metabolizar un buen número de compuestos aromáticos metoxilados que producen formaldehído como subproducto de su asimilación (Jiménez *et al.*, 2004). La expresión constitutiva de RecD podría representar la primera barrera de actuación como defensa innata contra el formaldehído que se produce internamente, el cual podría generar daños a nivel de ADN.

A modo de resumen se puede decir que nuestros resultados apoyan que *P. putida* es resistente a formaldehído y dicha resistencia es multifactorial. De acuerdo con las observaciones descritas anteriormente, esta resistencia parece implicar la detoxificación mediante la conversión del tóxico a CO<sub>2</sub>, extrusión de la molécula por medio de la bomba de eflujo MexEFOprN, inducción de enzimas que reparan el ADN dañado y chaperonas que corrigen a nivel de proteínas el daño directo provocado por el formaldehído o el de sus efectos laterales como los daños oxidativos. Mutaciones en algunos de estos sistemas provocan un incremento en la sensibilidad frente a este compuesto tóxico. No obstante, los mecanismos que conducen a la activación de estos genes y las cascadas regulatorias implicadas en dicha activación no han podido ser esclarecidos hasta el momento.

El tamaño de los genomas bacterianos parece estar correlacionado con su diversidad funcional y con la redundancia de funciones (Bansal, 1999; Snel *et al.*, 1999), la cual se ha visto formar parte importante de la robustez genética de los organismos. Se conocen dos grupos de redundancia funcional: La presencia de múltiples genes parálogos con funciones solapadas y la presencia de rutas bioquímicas no homólogas que realizan funciones similares (Gu *et al.*, 2006; Kitami y Nadeau, 2002; Wagner, 2000). Una de las necesidades bioquímicas más importantes para cualquier microorganismo es tener la capacidad de detoxificar aldehídos altamente tóxicos, ya que son intermediarios de muchas rutas bioquímicas (Chang y Gershwin, 1992; Feron *et al.*, 1991), en el caso del formaldehído se han descrito hasta 4 rutas para su detoxificación que pueden operar de manera simultánea.

En relación con la redundancia funcional, en el segundo capítulo de esta Tesis Doctoral se ha analizado detalladamente la organización física y transcripcional de los genes que codifican las formaldehído deshidrogenasas y formato deshidrogenasas en KT2440. Los análisis de BLAST del genoma de *P. putida* KT2440 contra secuencias depositadas en diferentes bases de datos confirmaron la existencia de genes y grupos de genes redundantes implicados en el metabolismo del formaldehído. Los productos de la traducción de los ORFs codificados por PP0328 y PP3970 presentan una elevada similitud a proteínas conocidas con actividad formaldehído deshidrogenasa, mientras

que PP1939 se había anotado como una formaldehído deshidrogenasa truncada, que en caso de que se tradujera rendiría un péptido muy corto (47 aminoácidos) (Nelson *et al.*, 2002). Los análisis de RT-PCR realizados en este trabajo indican que el gen ORF PP0328 (*fdhA*) codifica una formaldehído deshidrogenasa que se transcribe como una unidad monocistrónica, mientras que el otro gen funcional (ORF PP3970, *fdhB*) forma parte de un operón con el gen PP3971 que codifica una proteína de función desconocida.

Por otro lado, se han identificado dos grupos de genes formato deshidrogenasa (PP0489-PP0492 y PP2183-PP2186) que codifican dos complejos multicomponentes. Análisis de RT-PCR demostraron que los genes de estos grupos forman operones. En la anotación original del genoma de KT2440 se describió un codón stop ópalo en el residuo 196 del ORF PP0489, que podría ser traducido como un residuo de selenocisteína (Sec). El codón UGA, normalmente codón stop, puede también dirigir la incorporación del aminoácido selenocisteína en una proteína. En *E. coli* dicho proceso requiere la expresión constitutiva de los genes *selA*, *selB*, *selC* y *selD*. El gen *selC* codifica un ARNt<sup>sec</sup> específico de Sec que primero es cargado con serina por la seril-ARNt sintetasa. Éste a su vez se convierte en selenocisteinil-ARNt<sup>sec</sup>, por medio de la selenocisteína sintetasa (SelA). Para dicha reacción se requiere un donador de selenio de bajo peso molecular, el selenofosfato, el cual se sintetiza a partir de ATP y selenio por medio del producto del gen *selD*, la selenofosfato sintetasa (Stadman y Noren, 1996). Este proceso se detalla en la Figura 1 del material suplementario de la discusión. En el genoma de *P. putida* KT2440 se han identificado dos de los genes descritos en *E. coli*, a saber, PP0493 (SelA) y PP0494 (SelB) que codifican la L-seryl-ARNt selenio transferasa y el factor de elongación específico de selenocisteína, respectivamente.

La síntesis de Sec y su inserción en la cadena polipeptídica requiere una compleja maquinaria molecular. Un rasgo clave que insta a los ribosomas a reconocer el codón UGA como codón Sec es el elemento secuencia de inserción de selenocisteína (SECIS), una estructura de tipo tallo-lazo que se encuentran en el ARNm de las selenoproteínas (Low y Berry, 1996). En eucariotas y arqueas, los elementos SECIS se localizan en la región no codificante de los genes de las selenoproteínas (Böck, 2000). La presencia de

selenoproteínas se da en todos los reinos, en arqueas se han descrito 7, mientras que en eucariotas se han descrito más de 20, de las cuales la mayoría se desconoce la función que desempeñan, en bacterias se han identificado unas 15 diferentes y la mayoría tienen asignada una función (Punginelli *et al.*, 2004; Zhang y Gladyshev, 2005).

Los elementos SECIS en bacterias (bSECIS) difieren de los elementos de eucariotas y arqueas tanto en secuencia como en estructura, y se localizan inmediatamente aguas abajo del codón UGA (Berg *et al.*, 1991; Hüttenhofer y Böck, 1998). Los elementos bSECIS mejor caracterizados son los presentes en los genes que codifican las formato deshidrogenasas H (FdhF), N (FdnG) y O (FdoG) de *E. coli* (Punginelli *et al.*, 2004). Los bSECIS de *E. coli* están constituidos por dos dominios (Figura 2, material suplementario de la discusión); uno que contiene el codón UGA (TGA) y el otro una estructura tallo-lazo de 17 nucleótidos separada del codón UGA por 11 nucleótidos. Los nucleótidos GU expuestos en el lazo apical y los nucleótidos UU colgantes en la parte superior del tallo se consideran un rasgo común entre los elementos SECIS de *E. coli* (Heider *et al.*, 1992; Hüttenhofer *et al.*, 1996). La distancia entre el codón UGA y el lazo apical también parece jugar un papel importante en la incorporación de Sec (Chen *et al.*, 1993; Liu *et al.*, 1998). Se han identificado elementos putativos SECIS en el ARNm de selenoproteínas de otras bacterias, como *Clostridium sticklandii*, *Clostridium purinolyticum* y *Eubacterium acidaminophilum* y parecen no tener semejanza entre ellos o con los de *E. coli* con respecto a las secuencias que forman el lazo o la longitud del tallo (Heider *et al.*, 1991; Gursinsky *et al.*, 2000). El elemento SECIS es reconocido por SelB, el cual funciona de manera homóloga al factor de elongación EF-Tu (Forchhammer *et al.*, 1989; Kromayer *et al.*, 1996). SelB une GTP y selenocisteil-ARNt<sup>sec</sup> y reconoce el elemento SECIS. En *E. coli* la interacción entre SelB y el elemento SECIS es altamente específica (Baron *et al.*, 1993; Heider y Böck, 1992; Liu *et al.*, 1998), por ejemplo el cambio en un sólo nucleótido del lazo apical del elemento SECIS de *fdhF* o el alargamiento o acortamiento del mismo abole por completo la inserción de Sec *in vivo* (Gursinsky *et al.*, 2008).

Al hacer un análisis de la secuencia adyacente al codón UGA en el ORF PP0489 de KT2440, hemos localizado la secuencia que probablemente daría lugar a una estructura tipo tallo-lazo (Figura 3, material suplementario de la discusión), esta secuencia de 44 nucleótidos podría corresponder al elemento SECIS clave para la incorporación de Sec en la subunidad alfa de formato deshidrogenasa (PP0489). Además la estructura secundaria del elemento SECIS de KT2440 cumple el consenso anotado por Zhang y Gladyshev (2005), modelo obtenido a partir del alineamiento de 100 estructuras tipo SECIS pertenecientes a secuencias de selenoproteínas bacterianas representativas (Figura 4, material suplementario de la discusión). Nuestras comparaciones entre el elemento SECIS de KT2440 y los correspondientes a las SECIS de *E. coli* sugieren que existe una gran homología entre ellos, por lo que cabría esperar que la incorporación de Sec en KT2440 se realice a través de un mecanismo similar al de *E. coli*.

Se han mapeado los cuatro promotores correspondientes a las dos formaldehído deshidrogenasas y formato deshidrogenasas mediante la técnica de extensión de cebador. Los resultados muestran la presencia de promotores no canónicos que se expresan con cierto nivel basal en la fase de crecimiento exponencial y a elevado nivel en la fase estacionaria, independientemente de la presencia de formaldehído o formato en el medio extracelular. Estos promotores se caracterizan por tener una región conservada 5'-AG-CCA-C/A-CT-3' entre las posiciones -7 y -16. Además, hay que destacar que al comparar los niveles máximos de actividad  $\beta$ -galactosidasa de cada promotor, los niveles de expresión de PP2183 y PP0489 eran de 3 a 10 veces superiores al de PP0328, mientras que el promotor PP3970 presentaba niveles de expresión muy bajos a lo largo de la curva de crecimiento. El patrón de expresión de todos los promotores era el característico para los promotores dependientes de sigma-38 ( $\sigma^{38}$ ). Al comparar la secuencia consenso de los promotores en estudio con la propuesta para los promotores reconocidos por RpoS se observó que se conservaban las bases de las posiciones -13(C), -10 (A/C), -8 (C) y -7 (C). Al analizar la expresión de los promotores en un fondo deficiente en RpoS, se encontró que la actividad de los mismos era entre un 10% y 56% más baja que en la cepa silvestre, sugiriendo que RpoS podría contribuir a la transcripción de estos genes, aunque la ARN polimerasa podría



utilizar otros factores sigmas alternativos para la lectura de estos promotores, hecho que se ha descrito para la expresión *in vivo* de ciertos promotores relacionados con el metabolismo de xenobióticos en *Pseudomonas* (Marqués *et al.*, 2006; Potvin *et al.*, 2008; Wood y Ohman, 2009).

Para determinar la contribución de los diferentes productos génicos en la mineralización de formaldehído y formato, se han generado mutantes simples y dobles en las formaldehído deshidrogenasas y formato deshidrogenasas funcionales identificadas por análisis de BLAST. Se estudió el efecto de las mutaciones en el catabolismo del formaldehído mediante la medida del desprendimiento de  $^{14}\text{CO}_2$  a partir de  $^{14}\text{C}$ -formaldehído o  $^{14}\text{C}$ -formato. Los resultados mostraron que tanto los mutantes simples en las formaldehído deshidrogenasas como el doble mutante continuaban produciendo  $^{14}\text{CO}_2$ , lo que sugiere la presencia de una o más formaldehído deshidrogenasa(s) no identificada(s) hasta ahora, o bien, la participación de otras aldehído deshidrogenasas en el proceso de detoxificación del formaldehído. Este hecho quedaría justificado por la existencia 36 genes que codifican aldehídos deshidrogenasas en el genoma de KT2440, además se debe tener en cuenta que las aldehído deshidrogenasas son enzimas que presentan una baja especificidad de sustrato por lo que sería bastante probable que este tipo de enzimas participara en la mineralización de formaldehído. Los resultados obtenidos en los ensayos de mineralización en mutantes simples y dobles de la formato deshidrogenasa son similares a los mencionados para las formaldehído deshidrogenasas. Estos mutantes eran capaces de metabolizar  $^{14}\text{C}$ -formato a  $^{14}\text{CO}_2$ , lo que sugiere una redundancia de funciones que no solo se limita a los genes anotados. Este tipo de redundancia es frecuente en muchos microorganismos que son capaces de metabolizar formaldehído (Mitsui *et al.* 2000; Marx *et al.*, 2003, 2004).

A lo largo de este trabajo de Tesis Doctoral hemos identificado dos formato deshidrogenasa multicomponentes que parecen jugar un papel importante en la detoxificación de HCOH. En adición a estos complejos caracterizados, se han anotado 2 ORFs como proteínas accesorias formato deshidrogenasa (PP0257 y PP0492). Análisis de BLAST de los productos derivados de estas ORFs mostraron que uno de ellos

(PP0492-llamado FmdD) posee aproximadamente un 40% de identidad con la proteína FdhE de *Escherichia coli* y *Salmonella enterica* (Figura 1, material suplementario del capítulo 3), los porcentajes de identidad son superiores ( $\approx 90\%$ ) en los análisis de BLAST de las proteínas FdhE de otras *Pseudomonas* como *P. putida* F1, *P. putida* GB1, *P. putida* W619 y *P. entomophila* L48 (Tabla 1, material suplementario del capítulo 3). El mismo análisis realizado para la secuencia de PP0257 confirmó que dicha proteína posee aproximadamente un 40% de identidad con la proteína FdhD de *E. coli* y *S. enterica* (Figura 2, material suplementario del capítulo 3), y al igual que en el caso anterior los porcentajes de identidad son superiores ( $\approx 90\%$ ) en los análisis de BLAST de otras *Pseudomonas* como *P. putida* F1, *P. putida* GB1, *P. putida* W619 y *P. entomophila* L48 (Tabla 2, material suplementario del capítulo 3).

En *E. coli* la translocación de Fdh-N y Fdo-G se produce gracias a un péptido señal TAT (del inglés *Twin Arginine Transport*) (S/T-R-R-x-F-L-K) (motivo doble arginina) localizado en la región N-terminal de las subunidades FdnG y FdoG (Berks, 1996; Berks *et al.*, 2000), y ya que las proteínas FdnH y FdoH no la portan, varios autores han propuesto que las dianas de las subunidades FdnG y FdoG son suficientes para exportar los complejos heterodiméricos preformados FdnGH y FdoGH a través del canal TAT. Este motivo doble arginina sitúa al complejo proteína en la cara periplasmática de la membrana y se conserva también en la región N-terminal de la subunidad FmdA de *P. putida* KT2440 (Figura 5, material suplementario de la discusión). Punginelli y colaboradores (2004) al realizar distintos análisis bioinformáticos sugirieron que el ARNm específico de los primeros 17 codones de los genes *fdnG* y *fdoG* forman una estructura estable tallo-lazo que media el control traduccional de la síntesis de Fdh-N y Fdh-O (Figura 6, material suplementario de la discusión). Además estos autores observaron que las sustituciones de la primera arginina (R5) de la secuencia señal de FdnG por otro amino ácido provocaba un incremento dramático en la síntesis de proteína.

Nosotros hemos observado tras realizar distintos análisis bioinformáticos que esta estructura tallo-lazo aparece también en KT2440 (Figura 7, material suplementario de la discusión), además, la similitud entre la estructura secundaria de KT2440 y las distintas de *E. coli* nos inducen a sugerir que, probablemente, las proteínas multicomponentes formato deshidrogenasa de estos dos microorganismos se comportan de la misma manera durante el proceso de exportación. Esta estructura tallo-lazo se conserva en regiones codificantes de otras bacterias como *Salmonella entérica* serovar Tiphymurium, *Hemophilus influenzae* y *Pseudomonas aeruginosa* (Punginelli *et al.*, 2004).

En *E. coli* y *S. entérica* se ha descrito que FdhE participa en el mecanismo de exportación dependiente de TAT para los complejos formato deshidrogenasa maduros hacia el espacio periplasmático, mientras que FdhD se ha propuesto como una proteína accesoria para la maduración de dichos complejos (Mandrand-Berthelot *et al.*, 1988; Lüke *et al.*, 2008). En términos de organización genética *fdhD* y *fdhE* son adyacentes al operón *fdoGHI* (Abaibou *et al.*, 1995; 1997; Schlindwein *et al.*, 1990; Schlindwein y Mandrand 1991). En *P. putida* KT2440 el gen codificante de FmdD (FdhE, PP0492) se sitúa físicamente adyacente a uno de los operones de las muticomponentes formato deshidrogenasa (PP0489-PP0491), mientras que *fdhD* no está ligado a ninguno de los dos grupos formato deshidrogenasa. Los análisis por RT-PCR han confirmado que *fmdD* se transcribe con los tres genes adyacentes en 5' (PP0489, PP0490, PP0491).

El estudio del entorno genético de PP0257 indicó que este gen se transcribe divergentemente con respecto a PP0258 y en la misma dirección que PP0256 y PP0255. Análisis de RT-PCR confirmaron que PP0257 y PP0256 forman un operón y no se co-transcriben con PP0255. El examen de la región promotora de PP0257 mediante la técnica de extensión de cebador reveló la existencia de una secuencia 5'-ATGTT-3' entre las posiciones -6 y -11 similar a la que presentan los promotores reconocidos por  $\sigma^{70}$ . El análisis de la expresión de la región promotora de PP0257 a lo largo de la curva de crecimiento mostraba un comportamiento similar al descrito para los promotores de las formaldehído deshidrogenasas y formato deshidrogenasas. Así,

PP0257 se expresaba a niveles basales en la fase exponencial y a altos niveles en la fase estacionaria (Figura 3A, material suplementario del capítulo 3). También determinamos la actividad del promotor *fdhD* en células cultivadas en formaldehído, formato, histidina y vanilato, en el metabolismo de los dos últimos compuestos se producen formaldehído y/o formato (Hu y Phillips, 1988; Overhage *et al.*, 1999; Priefert *et al.*, 2001; Hibia *et al.*, 2005), y observamos que el nivel de expresión basal obtenido en la fase exponencial era superior en las células cultivadas en los distintos compuesto químicos que el obtenido cuando las células se cultivaban sólo en LB, cabe remarcar que la mayor actividad basal se producía en el caso del formato (Figura 3 y Figura 3A, material suplementario del capítulo 3). En la fase estacionaria los niveles de expresión de las células cultivadas en formaldehído, formato o los compuestos que rinden la producción de éstos llegaban a alcanzar hasta 3000 U.M. cuando se usaban fusiones del promotor al gen '*lacZ*' (Figura 3 y Figura 3A, material suplementario del capítulo 3). Por otro lado nos propusimos determinar si la expresión del promotor PP0257 era parcialmente dependiente de RpoS, al igual que se observó en los promotores de los genes que participan en el metabolismo del formaldehído estudiados anteriormente. En el fondo mutante deficiente en sigma-38, la curva de actividad  $\beta$ -galactosidasa era similar a la observada en la cepa parental, no obstante los máximos niveles de expresión fueron aproximadamente la mitad de los medidos en la cepa silvestre (Figura 3 y Figura 3B, material suplementario del capítulo 3), lo que sugiere que existe una contribución de RpoS en la expresión de FdhD y que dicha contribución es sólo parcial.

Por otro lado, haciendo referencia a los resultados de los estudios transcriptómicos descritos en el primer capítulo de esta Tesis Doctoral, advertimos que el gen PP0257 se inducía entre otros cuando KT2440 estaba expuesta a concentraciones subletales de formaldehído. Se han publicado resultados similares recientemente en *Bacillus subtilis*, ya que este gen se encontró inducido cuando dicha cepa era expuesta a bajos pHs. En *E. coli* y otras bacterias el pH regula el catabolismo y respiración obligando al microorganismo a consumir ácidos a bajos pHs y producir ácidos a pHs elevados.

En *Bacillus subtilis* los ácidos inducen un gran número de deshidrogenasas dependientes de NAD(P)<sup>+</sup> como la alcohol deshidrogenasa (*adhA*), la alanina deshidrogenasa (*ald*), la succinato semialdehído deshidrogenasa (*gabD*) y varias formato deshidrogenasa putativas (*fdhD*, *yjgC*, *yrhE*, *yrhG*). Se ha propuesto que estas enzimas podrían compensar la acidez a través de NAD(P)H que transfiere iones hidruro al sistema de transporte de electrones. Posteriormente las bombas de protones los expulsan fuera de la célula (Wilks *et al.*, 2009).

En el tercer capítulo de esta Tesis Doctoral además de analizar la organización física y transcripcional de la ORF PP0257, quisimos estudiar el papel de las dos proteínas accesorias (FdmD y FdhD) en el metabolismo del formato. En *E. coli* y *S. enterica* se ha descrito que los mutantes en *fdhD* y *fdhE* poseen baja actividad formato deshidrogenasa (Mandrand-Berthelot *et al.*, 1988; Pavaglio *et al.*, 1988; Schindwein *et al.*, 1990; Crouch *et al.*, 2005), y que la complementación con el gen *fdhD* restauraba la actividad formato deshidrogenasa, mientras que la complementación con *fdhE* no lo hacía (Mandrand-Berthelot *et al.*, 1988). Todo esto sugiere que FdhD y FdhE participan en distintos pasos de la maduración de las formato deshidrogenasas.

Para determinar el efecto de la deficiencia en FdmD y FdhD medimos el desprendimiento de <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> procedente de formaldehído (0,5 μCi) y formato (5 μCi) marcados con <sup>14</sup>C tras 24h de incubación. El mutante en FdhD presentaba niveles de evolución de <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> similares a la cepa parental (Tabla 3, material suplementario), lo que sugiere que PP0257 no es relevante para la detoxificación de formaldehído o formato “per se”. Para corroborar esta hipótesis, testamos la sensibilidad a formaldehído del mutante FdhD mediante ensayos de cinética de muerte en respuesta a choques de 10 mM formaldehído y comprobamos que los niveles de supervivencia eran similares a los de la cepa parental (Tabla 4, material suplementario del capítulo 3). También se ensayó la sensibilidad a formaldehído mediante estudios de crecimiento en presencia de 1,2 mM HCOH, observando que tanto el mutante como la cepa parental presentaban tiempos de generación y fases de latencia similares (Tabla 5, material suplementario del capítulo 3).

Por otro lado el mutante en el gen *fdmD* (PP0492), en presencia de  $^{14}\text{C}$ -formato o  $^{14}\text{C}$ -formaldehído, desprendía niveles de  $^{14}\text{CO}_2$  un 50% más bajos que los de la cepa parental (Tabla 3, material suplementario), lo que sugiere que esta proteína juega un papel directo en el proceso de maduración/localización de las formato deshidrogenasas de *P. putida*. En base a los resultados obtenidos podemos afirmar que en *P. putida* la redundancia de proteínas que participan en el metabolismo del formaldehído/formato puede extenderse hasta las proteínas accesorias.

Nuestros resultados muestran que las actividades formaldehído deshidrogenasa y formato deshidrogenasa son redundantes en *P. putida* y que el acoplamiento de las formaldehído deshidrogenasas y formato deshidrogenasas es crítico para que se produzca eliminación eficiente del formaldehído. El sistema formaldehído deshidrogenasa/formato deshidrogenasa no garantiza la supervivencia celular en presencia de elevadas concentraciones de formaldehído, en estas situaciones se ponen en marcha un conjunto de mecanismos que implican la participación de chaperonas y enzimas implicadas en procesos de reparación de ADN, como se ha descrito al inicio de la Discusión. De esta manera el sistema formaldehído deshidrogenasa/formato deshidrogenasa podría representar un mecanismo de defensa de la célula frente a la producción interna de formaldehído que se origina como resultado del catabolismo de compuestos aromáticos metoxilados, histidina y colina. Dichos compuestos son abundantes en el suelo, el nicho natural de la cepa KT2440, donde las células crecen a expensas de estos compuestos resultantes de su excreción por plantas o como resultado de la degradación de lignina. De esta manera se explica el porqué de la redundancia de las enzimas de detoxificación de formaldehído y los mecanismos que ayudan a salvar su generación en el metabolismo celular.



## **VI. CONCLUSIONES**





## CONCLUSIONES:

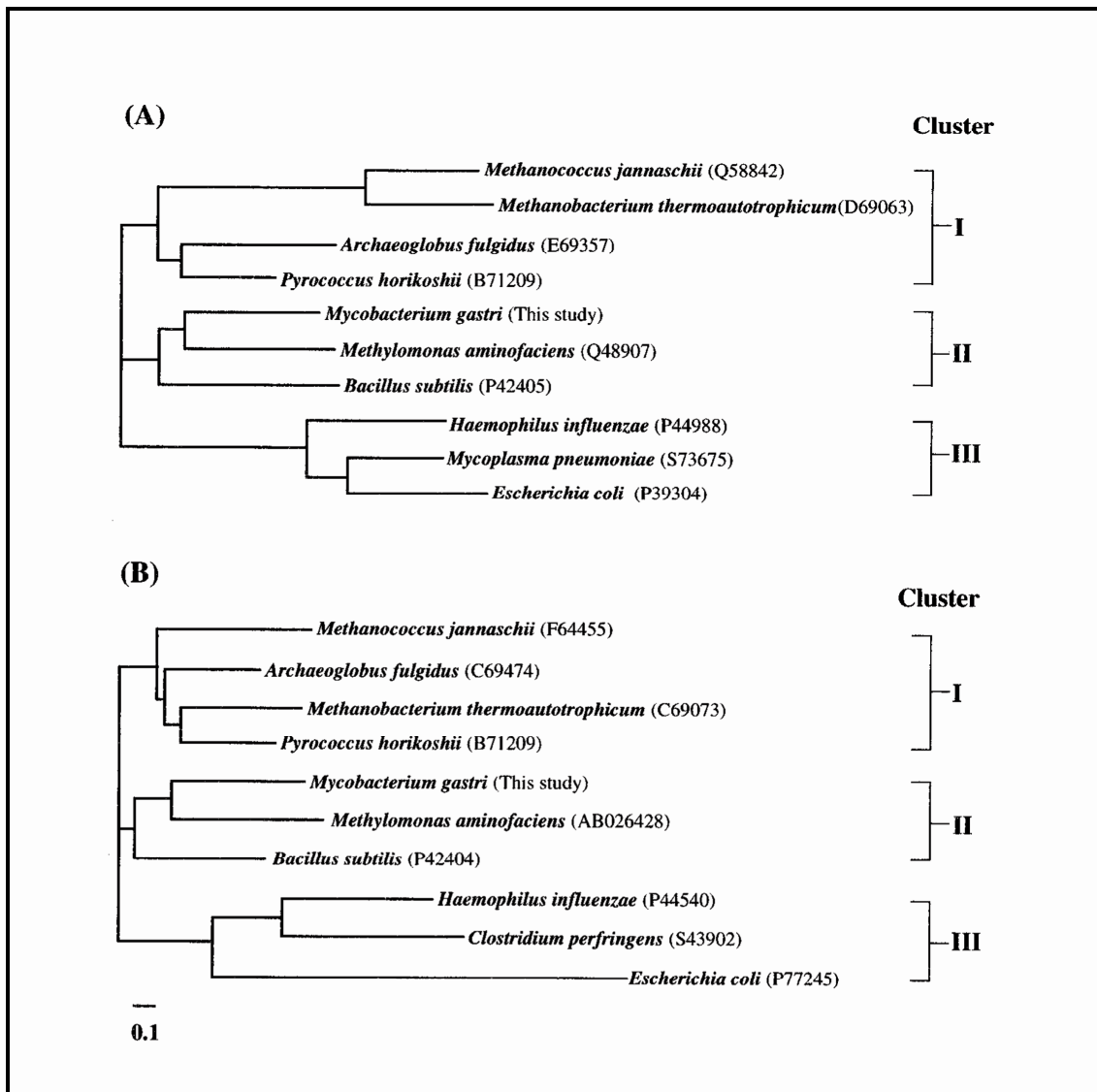
1. *Pseudomonas putida* KT2440 crece en presencia de concentraciones inferiores a 1,5 mM de HCOH y hasta 10 mM de HCOOH. Concentraciones de 10 mM de HCOH provocan la muerte celular. La respuesta de *Pseudomonas putida* a concentraciones subletales de formaldehído (por ej. 0,5 mM) implica: detoxificación del tóxico mediante su conversión a CO<sub>2</sub>, expulsión del mismo al medio extracelular por medio de bombas de extrusión, respuesta de protección contra estrés oxidativo y reparación del ADN y proteínas dañadas.
2. *Pseudomonas putida* es capaz de detoxificar formaldehído hasta CO<sub>2</sub>, sin utilizarlo como fuente de esqueletos carbonados. En la detoxificación de formaldehído/formato participan al menos dos formaldehído deshidrogenasas y dos complejos formato deshidrogenasa. La fase de lectura denominada PP0328, codifica una formaldehído deshidrogenasa monocistrónica, mientras que PP3970 codifica una formaldehído deshidrogenasa que forma un operón con otro gen de función desconocida (PP3971). Se han identificado dos agrupaciones de genes formato deshidrogenasa (PP0489-PP0491 y PP2183-PP2186), en cada agrupación los genes se transcriben como operones independientes.
3. El sistema de detoxificación de formaldehído es efectivo a bajas concentraciones de formaldehído ya que los mutantes simples y dobles en formaldehído y formato deshidrogenasas exhiben fases de latencia más largas que las de la cepa parental cuando son confrontadas con concentraciones de formaldehído cercanas a 1,5 mM.
4. La expresión de los genes formaldehído deshidrogenasa y formato deshidrogenasa, y la del gen accesorio PP0492 tiene lugar desde promotores no canónicos. Éstos se expresan a niveles basales en la fase de crecimiento exponencial y a niveles más altos en la fase estacionaria independientemente de la presencia extracelular de formaldehído o formato. Estos promotores se caracterizan por tener una región conservada 5'-AG-CCA-C/A-CT-3'. La expresión de estos promotores está, en parte, influenciada por el factor sigma RpoS.
5. La fase de lectura PP0257 (*fdhD*) forma un operón con PP0256. Este operón se expresa preferentemente en fase estacionaria y su nivel de expresión se ve incrementado en respuesta a formaldehído, formato o compuestos químicos que rinden estos compuestos C<sub>1</sub>. La región promotora de PP0257 posee una secuencia 5'-ATGTT-3' similar a la que presentan los promotores reconocidos por  $\sigma^{70}$ , aunque su transcripción también podría estar mediada por RpoS.

6. La bomba de extrusión MexEF/OprN y las codificadas por los genes PP2647 y PP3658 se inducen en respuesta a formaldehído. El mutante en la bomba MexEF es más sensible a formaldehído que la cepa silvestre. Éste trabajo es el primero en identificar una bomba de eflujo de tipo RND capaz de expulsar moléculas orgánicas de bajo peso molecular.
7. La expresión de los genes *recA* y *uvrB*, genes que codifican proteínas implicadas en procesos de reparación de ADN, se induce a concentraciones subletales de HCOH y los mutantes en dichos genes son hipersensibles a elevadas concentraciones de HCOH.
8. En una búsqueda de mutantes sensibles a HCOH se identificó RecD, también implicado en procesos de reparación de ADN, como proteína relevante en la tolerancia a formaldehído pero no inducible en respuesta a bajas concentraciones de HCOH. Se propone que RecD podría representar la primera barrera de actuación como defensa innata contra el formaldehído que se produce durante el metabolismo de compuestos que rinden formaldehído y formato.
9. En respuesta al estrés oxidativo generado por el formaldehído se induce la síntesis de GSH y deshidrogenasas de hidroxiaácidos. Los mutantes deficientes en la síntesis de glutatión y los que estaban afectados en los loci PP1616 y PP2426, los cuales codifican dos 2- hidroxiaácido deshidrogenasas específicas de isómeros D, no crecían o crecían deficientemente en presencia de formaldehído 1,5 mM

## **VII. MATERIAL SUPLEMENTARIO**



## MATERIAL SUPLEMENTARIO DE LA INTRODUCCIÓN:



**Figura 1. Análisis filogenético de la secuencia de aminoácidos de la proteína HPS (A) y la proteína PHI (B) empleando el programa CLUSTAL W del servidor DDBJ (Thompson *et al.*, 1994). La similitud entre la secuencia de aminoácidos del gen putativo en cada organismo indicado y las secuencias de aminoácidos de HPS y PHI de *M. gastris* MB19 era la siguiente: *M. jannaschii* (HPS, 57.3%; PHI, 67.0%), *M. thermoautotrophicum* (HPS, 53.9%; PHI, 56.3%), *A. fulgidus* (HPS, 81.2%; PHI, 68.6%), *P. horikoshii* (HPS, 74.5%; PHI, 67.5%), *B. subtilis* (HPS, 76.2%; PHI, 72.1%), *H. influenzae* (HPS, 58.0%; PHI, 43.0%), *E. coli* (HPS, 62.8%; PHI, 36.0%), *M. pneumoniae* (HPS, 64.8%), and *C. perfringens* (PHI, 48.9%). Obtenido de Mitsui *et al.*, 2000.**

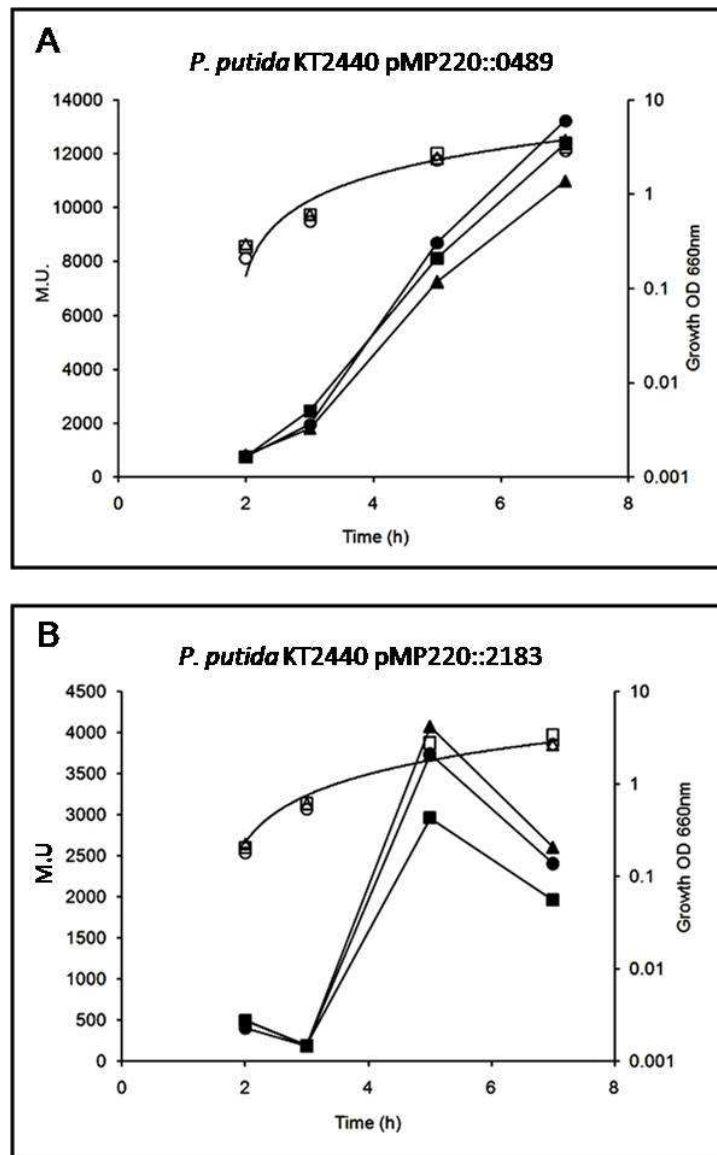
## MATERIAL SUPLEMENTARIO DEL CAPÍTULO 1:

Tabla 1. Genes reprimidos en *P. putida* KT2440 pWWO.

TIGR identifíer	Gene product	Gene name	Change (fold)
PP_0876	Transcriptional regulator, AraC family		-1.91
PP_0913	Conserved hypothetical protein		-1.84
PP_1788	Hypothetical protein		-2.32
PP_1789	Hydrolase, haloacid dehalogenase-like family		-2.11
PP_1790	Acylneuraminate cytidyltransferase, putative hypothetical protein		-1.97
PP_1812	Hypothetical protein		-2.46
PP_1959	Hypothetical protein		-1.98
PP_3558	Amino acid transporter, periplasmic amino acid-binding protein, putative		-2.21
PP_3642	Hypothetical protein		-2.16
PP_3872	Hypothetical protein		-1.89
PP_3963	Conserved domain protein		-2.11
PP_4265	Transcriptional regulator Anr	<i>anr</i>	-1.94
PP_5044	GTP-binding protein TypA/BipA		-1.82
PP_5107	Monofunctional biosynthetic peptidoglycan transglycosylase	<i>mtgA</i>	-2.88
PP_5184	Glutamine synthetase, putative	<i>glnA</i>	-2.50
PP_5329	Phosphate ABC transporter, periplasmic phosphate-binding protein	<i>pstS</i>	-2.09
PP_5338	Aspartate ammonia-lyase	<i>aspA</i>	-2.06

Los datos corresponden a medidas realizadas 20 minutos tras la adición de 0,5 mM HCOH

## MATERIAL SUPLEMENTARIO DEL CAPÍTULO 2:



**Figura 1. Evolución de la expresión de PP0489 (A) y PP2183 (B) a lo largo de la curva de crecimiento.** Un plásmido que portaba una fusión de las regiones promotoras de cada gen al gen *lacZ* en el pMP220 se transformó en la cepa silvestre *P. putida* KT2440. Las células se cultivaron en medio LB (cuadrados) suplementado o no con 0,5 mM HCOH (círculos) o con 10 mM HCOOH (triángulos). A los tiempos indicados se realizó un seguimiento del crecimiento celular como turbidez del cultivo a 660 nm (cuadrados, círculos y triángulos vacíos) y se determinó la actividad  $\beta$ -galactosidasa en Unidades Miller (cuadrados, círculos y triángulos rellenos).



Tabla 1. Cebadores empleados en este estudio.

Nombre del primer	Uso	Secuencia
PP0327/0328 5'	Fusión a Pmp220	<b>AAGGATCCT</b> GAAACGCCAACCGGACTG
PP0327/0328 3'	Fusión a Pmp220	<b>TACTGCAG</b> CTCTTACCTCGTTGAT
PP3969/3970 5'	Fusión a Pmp220	<b>TAGGATCCAT</b> GCAAGAGCTGCTAC
PP3969/3970 3'	Fusión a Pmp220	<b>AACTGCAG</b> CTCTCATAGTCTTGCT
PP0488/0489 5'	Fusión a Pmp220	<b>AAGGATCC</b> TGTGGCGCAGAGCAG
PP0488/0489 3'	Fusión a Pmp220	<b>CAGGTACC</b> GTCGTAGCCGCTGAACA
PP2182/2183 5'	Fusión a Pmp220	<b>AAGGATCC</b> GGGGCGTAATCACG
PP2182/2183 3'	Fusión a Pmp220	<b>TACTGCAG</b> CGGACCTCGGCATC
PP0489 5' pCHESIQKmGm	Constr. mutante	<b>CAGAGCTC</b> ACCGCGATGCCAACTTC
PP0489 3' pCHESIQKmGm	Constr. mutante	<b>CAGGTACC</b> GTCGTAGCCGCTGAACA
PP3970 5' pCHESIQKmGm	Constr. mutante	<b>CAGAATTC</b> CCTACCACGGTGCTAAC
PP3970 3' pCHESIQKmGm	Constr. mutante	<b>CAGAGCTC</b> GGATGTCCGATAGGAACAG
P.ext 0328	Primer extension	TTCAGGATGACGCCGTGTTCT
P.ext 0489	Primer extension	CCCCACGTGCTTCAGCCAGGGC
P.ext 2183	Primer extension	CAGTAGGGGCAGTGTTACG
P.ext 3970	Primer extension	GCCGAAGATGTCGCCTGCT
RT 0327/0328 5'	RT	CAACCGGACTGTCGTTCTGT
RT 0327/0328 3'	RT	GAACACGGCGTCATCCTGAA
RT 3969/3970 5'	RT	TGCACCTTGGACTCGCTCAG
RT 3969/3970 3'	RT	GCCGAAGATGTCGCCTTGCT
RT 3970/3971 5'	RT	TCGTTACTCACCGCTTAGCC
RT 3970/3971 3'	RT	CCACAGGTCGATGAGCAGAA
RT 3971/3972 5'	RT	TTGCGTTACCTGGCCTGTTCT
RT 3971/3972 3'	RT	CTGGCAAGGCTGTTGGACAT
RT 0488/0489 5'	RT	TGCTCAGGCACGGACTTCTC
RT 0488/0489 3'	RT	GAAGTCCGACGGTTCAGGT
RT 0489/0490 5'	RT	TGGCTACCTGACCAATACCT
RT 0489/0490 3'	RT	TCACGCAGTTCATTCCACTC
RT 0491/0492 5'	RT	CGAAGTGACCGGCGACAAGA
RT 0491/0492 3'	RT	CCACAAGCTGCTGCTGGATG
RT 0492/0493 5'	RT	TTGCGTTACCTGGCCTGTTCT
RT 0492/0493 3'	RT	CTGGCAAGGCTGTTGGACAT
RT 2183/2184 5'	RT	CATCAGCCTGCGCCCTGTTT
RT 2183/2184 3'	RT	ATCAGCGGCTCCAGCCAGTA
RT 2184/2185 5'	RT	GGCGGTATGACTGCCTATCC
RT 2184/2185 3'	RT	AGCCGCGCATGCCTTCGATT
RT 2185/2186 5'	RT	GTGACGGCAGTGGAAGTGGT
RT 2185/2186 3'	RT	GGCGTCCAGAAGCTCTGCA

**En negrita** – bases “añadidas” (**no** hibridan con la secuencia original)

Subrayado – sitio de restricción

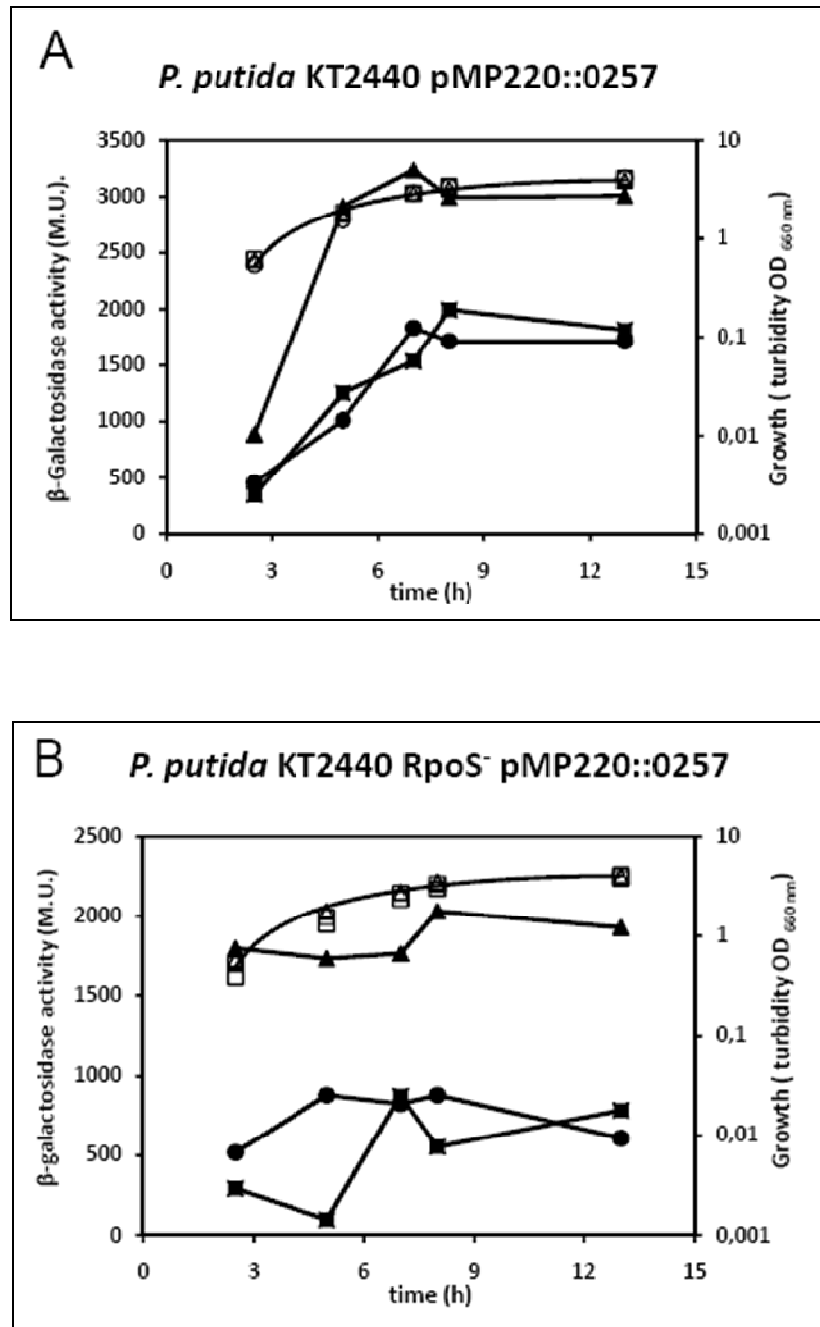
## MATERIAL SUPLEMENTARIO DEL CAPÍTULO 3:

<b>GENE ID: 948384 fdhE   formate dehydrogenase formation protein</b> <b>[Escherichia coli str. K12 substr. MG1655] (Over 10 PubMed links)</b>			
Score = 190 bits (482), Expect = 2e-46 Identities = 116/293 (39%), Positives = 153/293 (52%), Gaps = 8/293 (2%)			
<i>P. put.</i> KT2440	27	PPFLHLPAANL FELRAARLEQLAEGNALGDYLRLIARLCRIQQQLVDNPPGGMPVAEARQ	86
		PP L NL+ RA RL +LAE N LGDYLR A + Q+ ++ + P M + AR	
<i>E. coli</i> K-12	23	PPLLFPRKLNLYNRRRAERLRELAENNPLGDYLRFAALIAHAQEVVLYDHPLEMDLT-ARI	81
<i>P. put.</i> KT2440	87	RLCMDHGLPPLAADSLVREGPWLWVWLQALLEHLSGETRGPMEALQVLRGSDDNQRKGGW	146
		+ G PPL L R+ W L AL+ L E GP ++ L + ++	
<i>E. coli</i> K-12	82	KEASAQKGPLDIHVLPRDKHWQKLLMALIAELKPEMSGPALAVIENLEKASTQLEDMA	141
<i>P. put.</i> KT2440	147	IALLAGQYDGVPAALVPFLGAALQAAWSSWLLALPAHQLKPAGSLAQ-CPACGSPAMAGV	205
		AL A + V + PF+ AAL W+ +P G Q CP CGS ++ +	
<i>E. coli</i> K-12	142	SALFASDFSSVSSDKAPFIWAALSLYWAQMANLIPGKARAEYGEQRQYCPVCGSMPVSSM	201
<i>P. put.</i> KT2440	206	VRNRGKHNGRLRYLACSLCACEWHVVRVKCVYCESSKDLRYTSLEDDRHAPGKAPLRAECC	265
		V+ G GLRYL C+LC EWHVVRVKC CE S L Y SL+D++ A ++AE C	
<i>E. coli</i> K-12	202	VQI-GTTQGLRYLHCNLCETEWHVVRVKCSNCFQSGKLHYWSLDDEQ-----AAIKAESC	255
		* * * *	
<i>P. put.</i> KT2440	266	PGCDSYLKQNYLENDAAAEP LADDLASLALDIRLDGEGFHRLAPNMLPAGGG	318
		CD+YLK Y E D E +ADDLASL LD R++ EG+ R + N L PG G	
<i>E. coli</i> K-12	256	DDCDTYLKILYQEKDPKIEAVADDLASLVLDARMEQEGYARSSINPFLFPGEG	308

**Figura 1. Alineamientos entre las secuencias de las proteínas FmdD de *P. putida* KT2440 y FdhE de *E. coli* K-12.** La Figura muestra un recuadro donde se remarcan con un asterisco los 4 motivos CXXC conservados que son indicativos de la presencia de cofactores metálicos, como grupos Fe-S, iones de Zn (II) o iones de Cu (II) (Sargent, 2007b; Turner *et al.*, 2004) Las proteínas FdhE presentan al menos dos iones Fe (III) unidos por motivos cisteína CXXC. Éstos residuos se conservan en los 400 miembros de la familia FdhE (Turner *et al.*, 2004) y son esenciales para la estabilidad y función biológica de la proteína (Lüke *et al.*, 2008). El alineamiento se ha obtenido del análisis de BLAST de la secuencia *fmdD* (PP0492) por medio del servidor web <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>.

GENE ID: 948393 fdhD   formate dehydrogenase formation protein	
[Escherichia coli str. K12 substr. MG1655] (10 or fewer PubMed links)	
Score = 178 bits (452), Expect = 4e-43	
Identities = 98/234 (41%), Positives = 140/234 (59%), Gaps = 0/234 (0%)	
<i>P. put.</i> KT2440	38 LAEEVALAIVYNGLNQAVMLVSPDLEDFAVGFSVSGSIVEGTAEIYDLKLSGSGSALYA 97
	+AEEV +A+VYNG++ VM+ SP DLE FA+GFS+ GI+E +I+ + + S + L
<i>E. coli</i> K-12	37 VAAEVPVALVYNGISHVVMASPKDLEYFALGFSLSEGIIESPRDIFGMDVVPSCNGLEV 96
<i>P. put.</i> KT2440	98 DLEISSRAFWNLKNQRRQLAGTSGCGLCGVEALEQALPDLAVLPGAPLPPAQWLVLGLRER 157
	+E+SSR F LK +RR LAG +GCG+CGVE L + LP L
<i>E. coli</i> K-12	97 QIELSSRRFMGLKERRRALAGRTGCGVCGVEQLNDIGKPVQPLPFTQTDFLNKLLDDALRH 156
<i>P. put.</i> KT2440	158 IDAFQPLGQHCGAVHAALFMDRQGE LLGREDIGRHNALDKLIGALLRQRIDTQGGLAIV 217
	++ FQP+GQ G HAA +M GEL+ G ED+GRH ALDKL+G ++ Q G +V
<i>E. coli</i> K-12	157 LNDFQPVGQLTGCTHAAAWMLPSGELVGGHEDVGRHVALDKLLGRRSQEGESWQQGAVLV 216
<i>P. put.</i> KT2440	218 TSRCSELIQKVLRAIGIQTLVSLSAPTGLALQWARKHNLNLIHLPKHSAPRVYS 271
	+SR S E++QK G++ L ++SA T LA++ A + NL L+ K VY+
<i>E. coli</i> K-12	217 SSRASYEMVQKSAMCGVEILFAVSAATTLAVEVAERCNLTLVGFCKPGRATVYT 270

Figura 2. Alineamientos de las secuencias de las proteínas FdhD de *P. putida* KT2440 y FdhD de *E. coli* K-12. El alineamiento se ha obtenido del análisis de BLAST de la secuencia *fdhD* (PP0257) por medio del servidor web <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>.



**Figura 3. Evolución de la expresión de *fdhD* (PP0257) a lo largo de la curva de crecimiento.** Un plásmido que portaba una fusión de la región promotora del gen *fdhD* al gen *lacZ* en el pMP220 se transformó en la cepa silvestre *P. putida* KT2440 (**A**) y en el mutante RpoS (Ramos-González, M.I, y Molin, S. 1998) (**B**). Las células se cultivaron en medio LB (cuadrados) suplementado o no con 0,5 mM HCOH (círculos) o con 10 mM HCOOH (triángulos). A los tiempos indicados se realizó un seguimiento del crecimiento celular como medida de la turbidez del cultivo a 660 nm (cuadrados, círculos y triángulos vacíos) y se determinó la actividad  $\beta$ -galactosidasa en Unidades Miller (cuadrados, círculos y triángulos rellenos).

**Tabla 1. Porcentaje de identidad y similitud del ORF PP0492 (FmdD) respecto a otros microorganismos.**

Cepa	Tamaño (AA)	identidad (%)	Positivos (%/AA post)	Gen
<i>Pseudomonas putida</i> F1	308	98	99/306	Pput_0526
<i>Pseudomonas putida</i> GB-1	306	92	95/292	Pput GB1_0535
<i>Pseudomonas putida</i> W619	316	88	92/291	Pput W619_0547
<i>Pseudomonas entomophila</i> L48	308	87	92/283	<i>fdhE</i>
<i>Pseudomonas fluorescens</i> Pf0-1	308	64	77/234	Pf101_2701
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1	309	59	70/214	<i>fdhE</i>
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	305	53	67/205	PST_0163
<i>Salmonella enterica</i> subsp <i>enterica</i> serovar Tiphya	308	39	53/156	<i>fdhE</i>
<i>Escherichia coli</i> . K-12	309	39	52/153	<i>fdhE</i>

Los parámetros de la tabla se han obtenido del análisis de BLAST de la secuencia *fdhD* (PP0257) por medio del servidor web <http://blast.jcvi.org/cmr-blast/>.

**Tabla 2. Porcentaje de identidad y similitud del ORF PP0257 (FdhD) respecto a otros microorganismos.**

Cepa	Tamaño (AA)	identidad (%)	Positivos (%/AA post)	Gen
<i>Pseudomonas putida</i> F1	276	98	99/275	Pput_0272
<i>Pseudomonas putida</i> GB-1	276	97	98/272	Pput GB1_0282
<i>Pseudomonas putida</i> W619	276	94	97/269	Pput W619_4953
<i>Pseudomonas entomophila</i> L48	275	92	95/263	PSEEN 0241
<i>Pseudomonas fluorescens</i> Pf0-1	280	77	86/239	Pf101_0280
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i> str. DC3000	278	76	84/227	<i>fdhD</i>
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1	279	62	73/198	PAO5180
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	265	72	83/181	PST_0315
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>phaseolicola</i> 1448A	278	75	83/225	<i>fdhD</i>
<i>Escherichia coli</i> . K-12	277	41	59/140	<i>fdhD</i>

Los parámetros de la tabla se han obtenido del análisis de BLAST de la secuencia *fdhD* (PP0257) por medio del servidor web <http://blast.jcvi.org/cmr-blast/>.

**Tabla 3. Mineralización máxima de [<sup>14</sup>C] formaldehído y [<sup>14</sup>C] formato de la cepa silvestre KT2440 y los mutantes isogénicos PP0492 y PP0257.**

Nivel de <sup>14</sup> CO <sub>2</sub> producido (x 1000 cpm) a partir de		
Cepa	HCOH	COOH
KT2440 R	10,5 ± 0,3	207 ± 10
PP0492	6,4 ± 0,3	113 ± 2
PP0257	11 ± 0,9	195 ± 12

Las cepas indicadas se cultivaron en medio LB durante 12 h, después se diluyeron 100 veces en el mismo medio suplementado con 0,5 µCi de formaldehído ó 5 µCi de formato. El <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> desprendido se capturó en una solución (KOH 5 mM) situada en un vasito fijado al fondo del matraz de incubación. Los valores representados en la tabla se obtuvieron tras 24 horas de incubación.

**Tabla 4. Nivel de supervivencia a choques de HCOH 10 mM en la cepa parental y los mutantes en los distintos genes implicados en el metabolismo del HCOH.**

<b>Cepa</b>	<b>UFC/ml (T=0 min)</b>	<b>UFC/ml (T=30 min)</b>	<b>SR</b>
KT2440 R	$10^9$	$10^6$	$10^{-3}$
PP0328	$10^8$	$10^5$	$10^{-3}$
PP3970	$10^8$	$10^5$	$10^{-3}$
PP0489	$10^9$	$10^7$	$10^{-2}$
PP0492	$10^8$	$10^5$	$10^{-4}$
PP2184	$10^9$	$10^7$	$10^{-2}$
PP0257	$10^9$	$10^6$	$10^{-3}$

Las cepas indicadas se cultivaron en medio LB durante 12 h, después se diluyeron 100 veces en el mismo medio hasta alcanzar una turbidez de 0,05 a 660 nm. Cuando los cultivos alcanzaron una turbidez de  $0,8 \pm 0,05$  a 660 nm (fase de crecimiento exponencial) se realizó un choque con 10 mM HCOH, tras el cual se realizó el recuento de UFC/ml a distintos tiempos (0, 10, 30 y 60 min). Para estimar el nivel de sensibilidad se determinó el ratio de supervivencia (S.R.) como el ratio entre el número de CFU/ml presentes a  $t=30$ min tras el choque 10 mM y el número de CFU/ml presentes antes de la adición del tóxico.

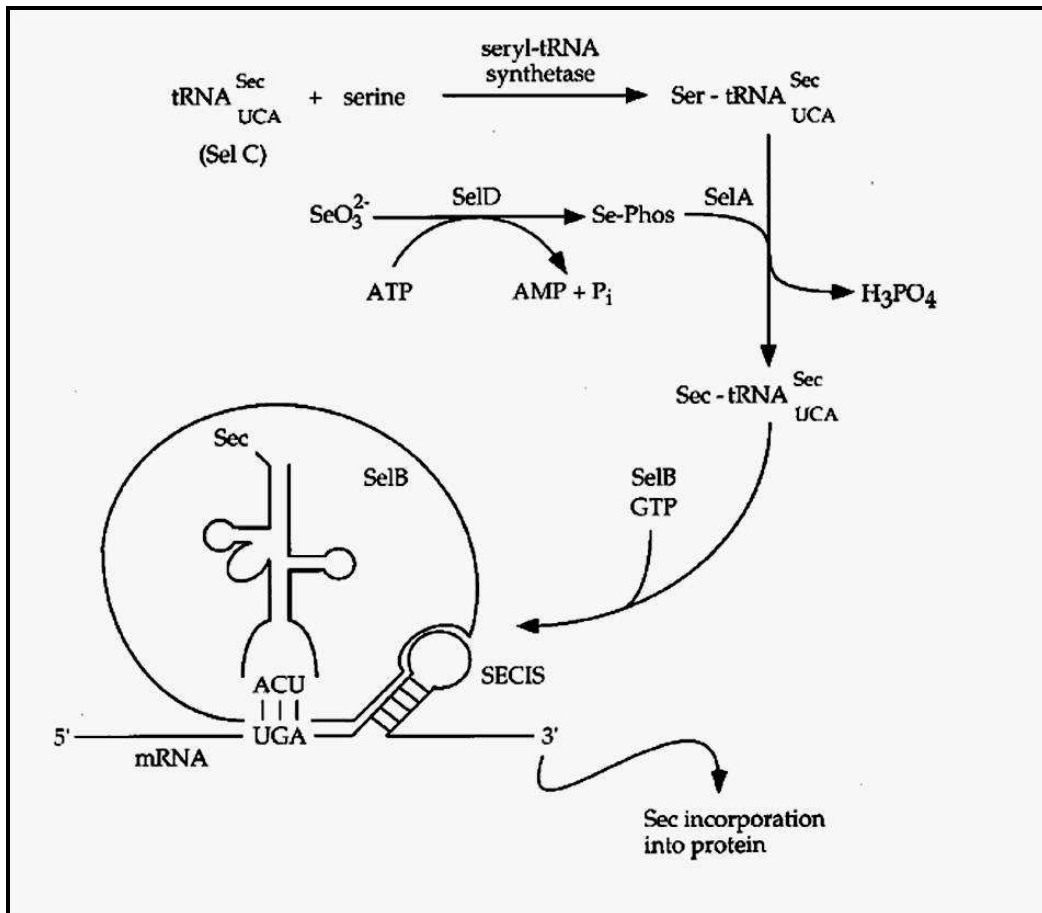


**Tabla 5. Efecto de concentraciones elevadas de formaldehído en la fase de latencia y en el tiempo de duplicación de la fase exponencial.**

<b>Cepa</b>	<b>Tiempo de latencia (h)</b>	<b>Tiempo de duplicación (min)</b>
KT2440 R	4 ± 0,1	56 ± 1
PP0492	4,5 ± 0,1	76 ± 6
PP0257	5 ± 0,5	60 ± 1

Las cepas indicadas se cultivaron en medio LB durante 12 h, después se diluyeron 100 veces en el mismo medio hasta alcanzar una turbidez de 0,05 a 660 nm. Los cultivos se suplementaron con 1,2 mM HCOH, y se determinó el tiempo de latencia (periodo de tiempo necesario para que el cultivo alcance una turbidez de 0,1 a 660 nm). Cuando los cultivos crecían exponencialmente, se estimó el tiempo de duplicación como el tiempo medio que el cultivo necesita para duplicar su turbidez.

## MATERIAL SUPLEMENTARIO DE LA DISCUSIÓN:



**Figura 1. Ruta biosintética para la incorporación de selenocisteína.** SelC, el ARNt específico del codón Sec es primero cargado con serina. SelD, dependiente de ATP cataliza la transformación del selenito ambiental a especies activadas de seleno-fosfato. Estas especies son empleadas por SelA para reemplazar el hidroxilo serina por selenol, formando un ARNt cargado con Sec que reconoce al codón ópalo UGA. En presencia de GTP, el factor de elongación SelB efectúa la traducción Sec mediante la unión del ARNt-Sec y el ARNm SECIS. Obtenido de Sandman y Noren, 2000.

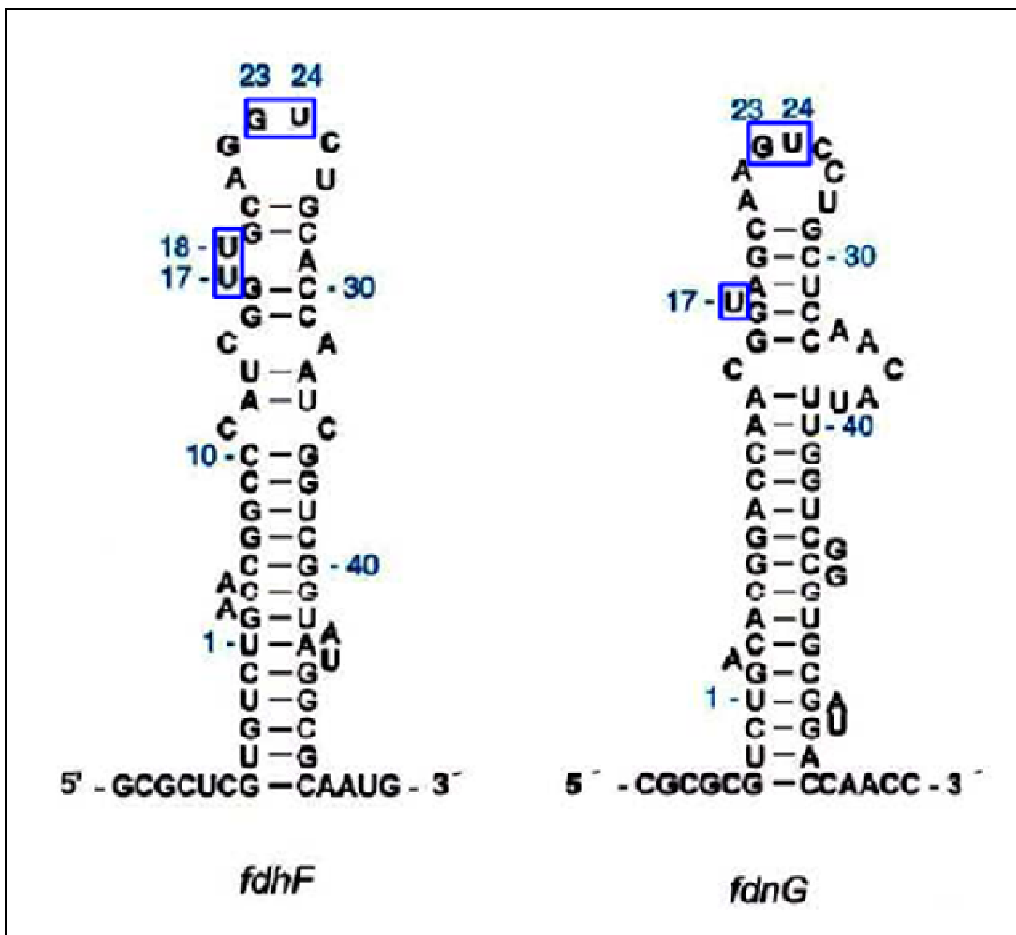


Figura 2. Modelos de las estructuras secundarias de las bSECIS de las formato deshidrogenasas de *E. coli* *fdhF* y *fdnG*. El nucleótido colgante y los nucleótidos del lazo apical que interactúan con el factor de elongación SelB están recuadrados en azul. La numeración de las dos estructuras comienza en el codón UGA selenocisteína. Las estructuras se han obtenido de Hüttenhofer *et al.*, 1996. Adaptado de Krol, 2002.

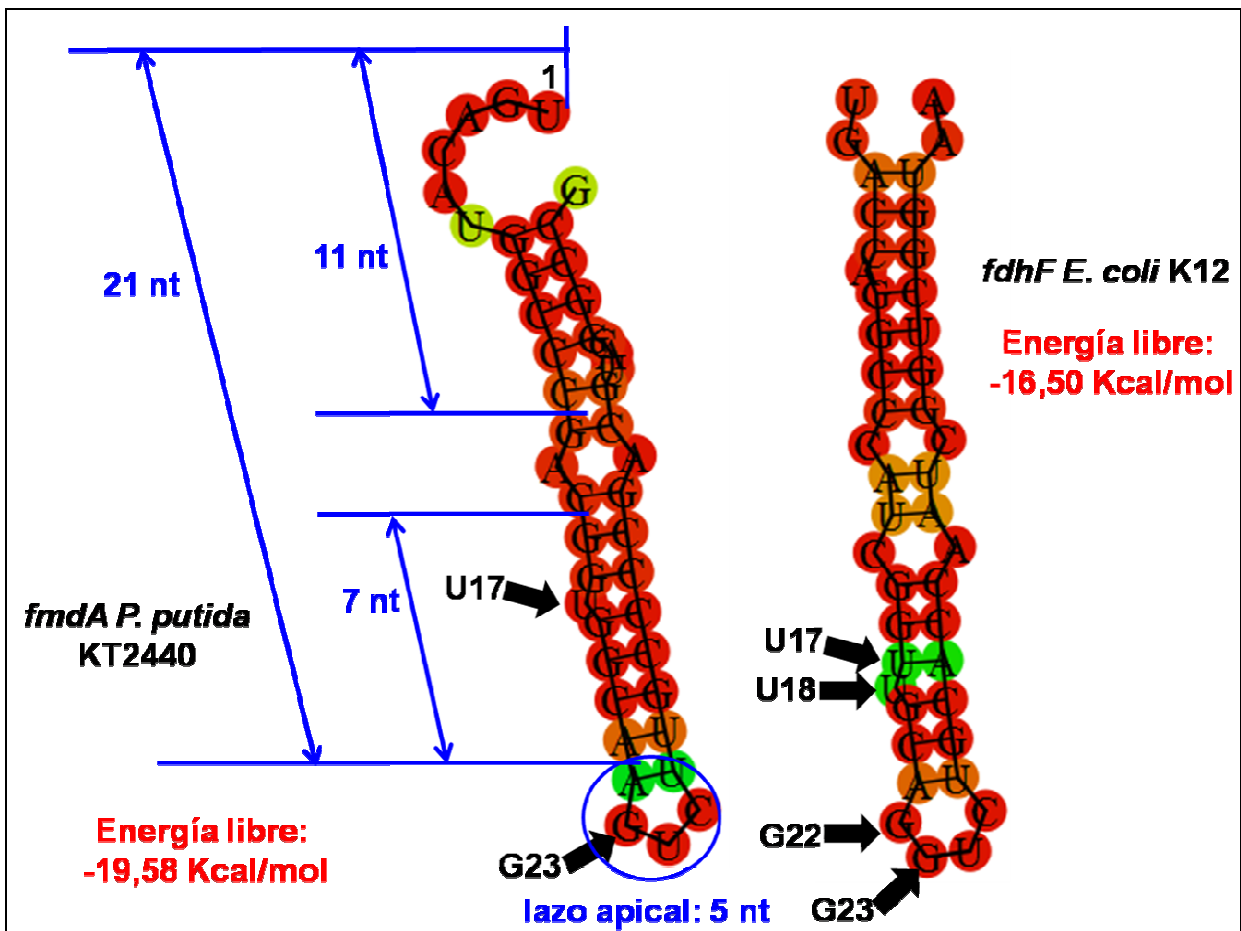
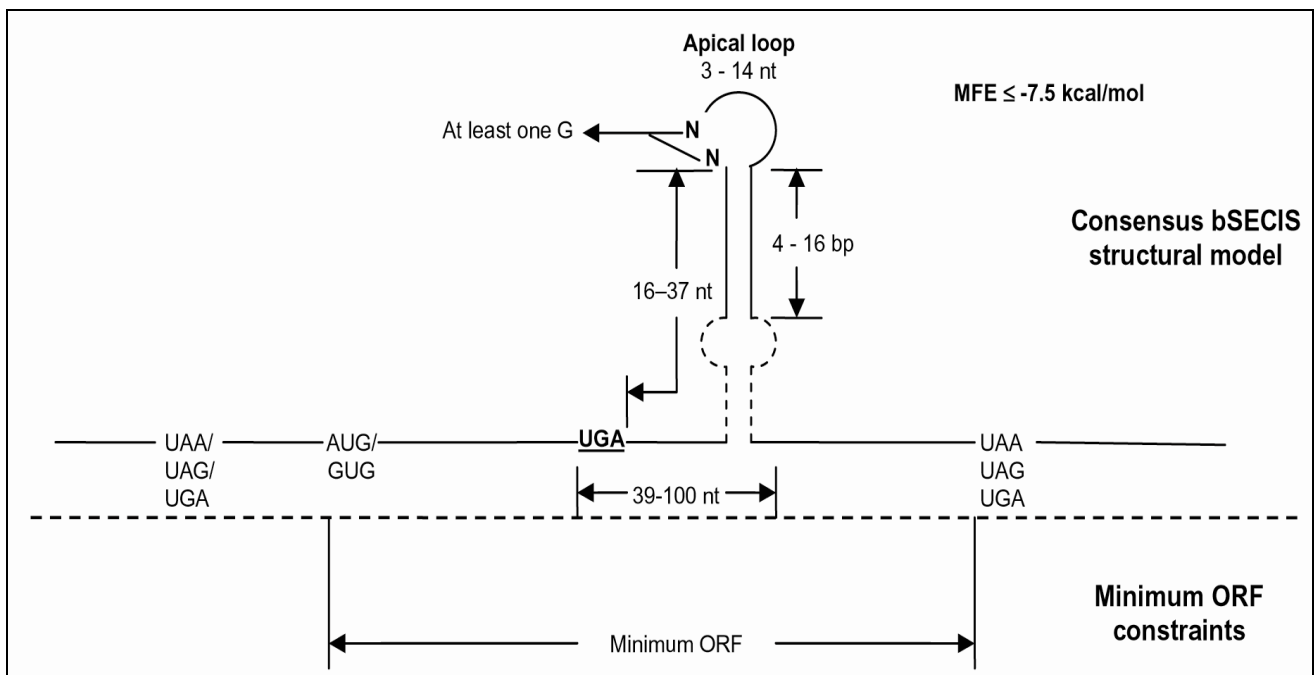



Figura 3. Modelos de las estructuras secundarias de las bSECIS de las formato deshidrogenasas *fdhF* de *E. coli* y *fmdA* de *P. putida* KT2440. Los modelos se han construido con los 44 nucleótidos adyacentes al codón UGA. Las secuencia de *fdhF* se ha extraído de Krol, 2002 y la de *fmdA* (PP0489) de Nelson *et al*, 2002. Las estructuras secundarias se han obtenido con el servidor web RNAfold (<http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAfold.cgi>). La numeración de las dos estructuras comienza en el codón UGA selenocisteína.



**Figura 4. Modelo estructural del consenso bSECIS y restricciones mínimas de la ORF.** El codón UGA se muestra en negrita y subrayado. El modelo del consenso incluye: (i) 3-14 nt en el lazo apical y 4-16 nt en el tallo superior, (ii) al menos una G entre los dos primeros nucleótidos del lazo apical, (iii) un espacio de 13-37 nt entre el codón UGA y el lazo apical y (iv) MFE (mínima energía libre)  $\leq -7,5$  Kcal/mol. Las restricciones mínimas de la ORF incluyen al menos un codón AUG/GUG entre el codón UGA y el primer codón stop situado aguas arriba del codón UGA. Obtenido de Zhang y Gladishev ,2005.

```

>  sp|P32176.5|FDOG ECOLI RecName: Full=Formate dehydrogenase-O, major subunit; AltName: Full=Formate dehydrogenase-O subunit alpha; AltName: Full=FDH-Z subunit alpha; AltName: Full=Aerobic formate dehydrogenase major subunit; Flags: Precursor Length=1016

Score = 1425 bits (3688), Expect = 0.0, Method: Compositional matrix adjust.
Identities = 674/1024 (65%), Positives = 806/1024 (78%), Gaps = 11/1024 (1%)

P.put. KT2440 10 MDLNRRQFFKVAAVGLGGSSLAALGMAPTPAFAEQVRHFKLAHTKETRNTCPYCSVGCGL 69
M ++RRQFFK+ A G+ G++ AALG AP+ A AE R +KL T+ETRNTC YCSVGCGL
E. coli K-12 1 MQVSRQFFKICAGGMAGTAAALGFAPSVALAE-TRQYKLLRTRRNTCTCYCSVGCGL 59

P.put. KT2440 70 ILYSQGDAGKNVKQNIHIEGDADHPVNRGTLCPKGAGLLDFIHSPSRLQYPEVRKPGSK 129
++YS GD KN K +I HIEGD DHPVNRG LCPKGAGL+DFIHS SRL++PE R PGS
E. coli K-12 60 LMYSLGDGAKNAKASIFHIEGDPDHPVNRGALCPKGAGLVDFIHSESRLKFPEYRAPGSD 119

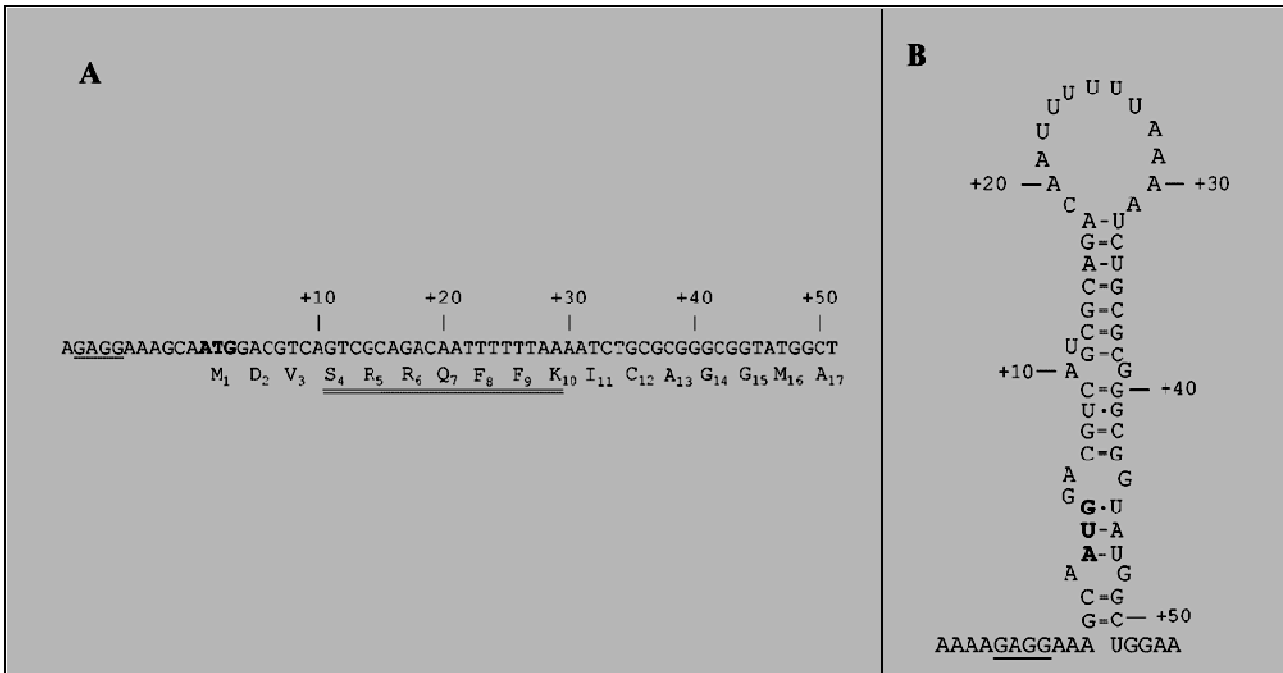
P.put. KT2440 130 EWVRVSWDEALDRVADLMKQDRDANFIEKNAQGQTVNRWLTGFLAASAASSEAGYLTHK 189
+W ++SW+EA DR+A LMK+DRDAN+I +NA+G TVNRWL+TG L ASA+S+E GYLT K
E. coli K-12 120 KWQQISWEEAFDRIAKLMKEDRDANYIAQNAEGVTVNRWLSTGMLCASASSNETGYLTQK 179

P.put. KT2440 190 VIRATGMLGFDNQARV-HGPTVASLAPTYGRGAMTNHWSDIANANLVLMGGNAEEAHP 248
RA GML DNQARV HGPTVASLAPT+GRGAMTNHW DI NANLV+VMGGNAEEAHP
E. coli K-12 180 FSRALGMLAVDNQARVUHGPTVASLAPTFRGAMTNHWVDIKNANLVVMGGNAEEAHP 239

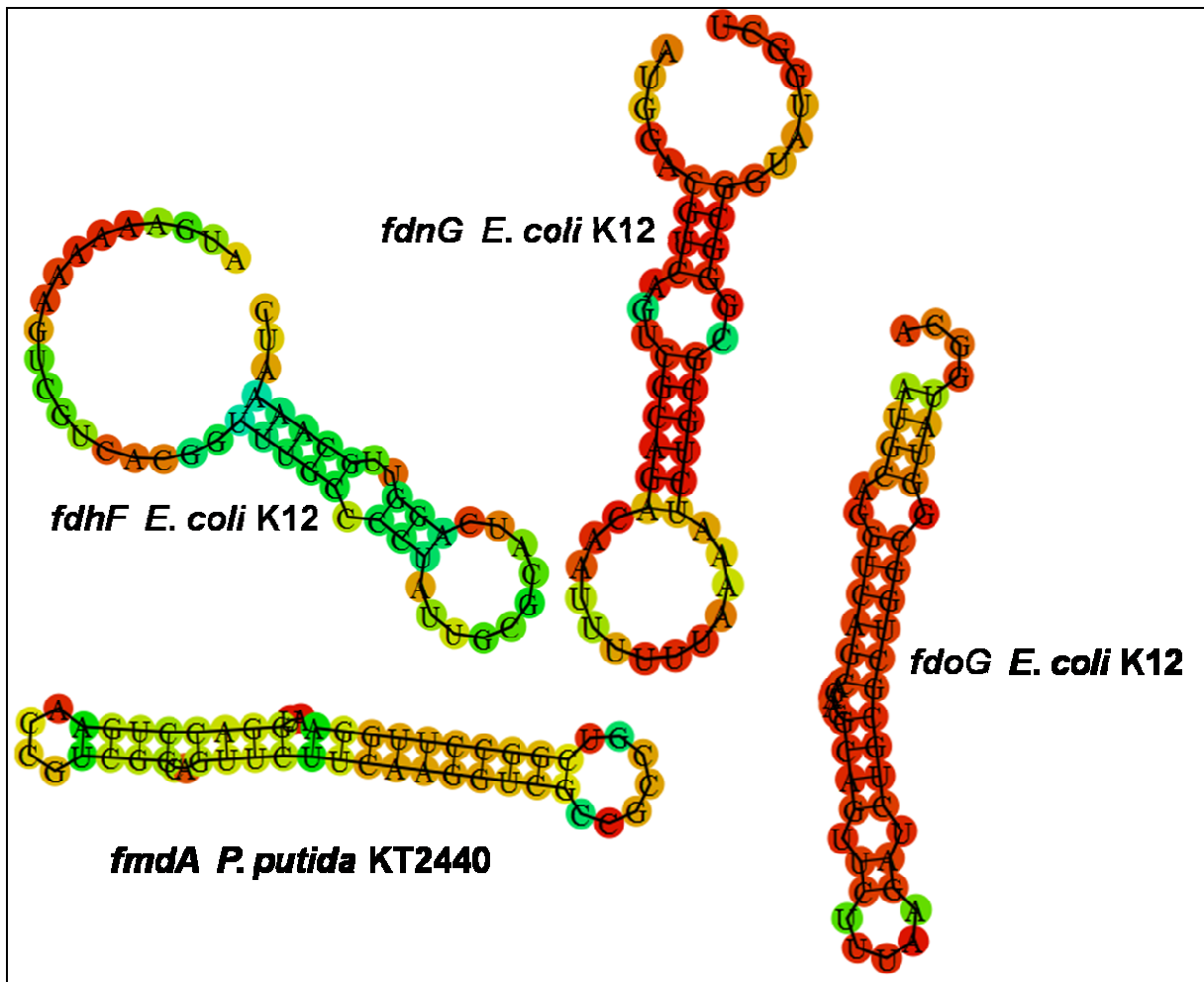
P.put. KT2440 249 GFKWVTEAKAHNKARLIVDPRFRTRTASVADYYAPIRTGTDIAFMGGLINYLSSNDKIQH 308
GF+W EAK HN A+LIV+DPRFRTRTA+VADYYAPIR+GTDIAF+ G++ YLL+N+K
E. coli K-12 240 GFRWAMEAKIHNGAKLIVDPRFRTRTAAVADYYAPIRSGTDIAFLSGVLLYLLNNEKFNR 299

```

**Figura 5. Alineamientos entre las secuencias de las proteínas FmdA (PP0489) de *P. putida* KT2440 y FDOG de *E. coli* K-12.** La Figura muestra en un recuadro el motivo doble arginina N/S-R-R-Q-F-F-K, siendo el anotado en la Bibliografía S/T-R-R-x-F-L-K. Éste péptido señal se localiza en la región N-terminal de las dos proteínas (Berks, 1996; Berks *et al.*, 2000). El alineamiento se ha obtenido del análisis de BLAST de la secuencia *fdhE* PP0492 por medio del servidor web <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>.



**Figura 6. El ARNm específico del péptido señal fdnG puede ser empaquetado en una estructura tallo-lazo.** La posición del codón de inicio se indica en negrita, la secuencia *Shine-Dalgarno* de unión al ribosoma se muestra subrayada. La numeración mostrada es relativa a la primera base del codón de inicio y se designa +1. **(A)** Porción del ADN del plásmido pVJS2248 (Stanley *et al.*, 2002) mostrando la primera parte de la región codificante del péptido señal de *fdnG*. Los aminoácidos del motivo doble arginina aparecen con doble subrayado. **(B)** El ARNm que cubre la región mostrada en la sección A de la figura se empaquetó empleando el programa mfold 3 (Zuker, 2003) procedente del servidor web <http://www.bioinfo.rpi.edu/applications/mfold>. Adaptado de Punginelli *et al.*, 2004.



**Figura 7. Modelos de las estructuras secundarias de 17 primeros codones de las formato deshidrogenasas *fdhF*, *fdnG*, *fdoG* de *E. coli* y *fmdA* de *P. putida* KT2440.** Los modelos se han construido con los 48 primeros nucleótidos de las secuencias de los genes *fdhF*, *fdnG* y *fdoG* de *E. coli* K-12 y la de *fmdA* (PP0489) de *P. putida* KT2440 disponibles en la base de datos TIGR (<http://cmr.jcvi.org/tigr-scripts/CMR/CmrHomePage.cgi>). Los análisis bioinformáticos realizados por distintos autores sugieren que el ARNm específico de los primeros 17 codones de los genes *fdnG* y *fdoG* forma una estructura estable tallo-lazo que media el control traduccional de la síntesis de Fdh-N y Fdh-O (Punginelli *et al.*, 2004). Las estructuras secundarias se han obtenido con el servidor web RNAfold RNAfold (<http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAfold.cgi>). La semejanza entre las estructuras secundarias obtenidas nos hacen pensar que probablemente las proteínas multicomponentes formato deshidrogenasa de *E. coli* y *P. putida* KT2440 se comporten de la misma manera durante el proceso de exportación.





## **VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**



- Abaibou, H., Pommier, J., Benoit, S., Giordano G. and Mandrand-Berthelot, M.A. 1995.** Expression and characterization of the *Escherichia coli fdo* locus and a possible physiological role for aerobic formate dehydrogenase. *J. Bacteriol.* **177**: 7141–7149.
- Adroer, N., Casas, C., De Mas, C. and Solà, C. 1990.** Mechanism of formaldehyde biodegradation by *Pseudomonas putida*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **33**: 217-220.
- Allais, J.J., Louktibi, A. and Baratti, J. 1983.** Oxidation of Methanol by the Yeast *Pichia pastoris*. Purification and Properties of the Formate Dehydrogenase. *Agric. Biol. Chem.* **47**: 2547-2554.
- Alexandersson, R., Hedenstierna, G. and Kolmodin-Hedman, B. 1982.** Exposure to formaldehyde: effects on pulmonary function. *Arch. Environ. Health* **37**: 279-284.
- Andersen, J.R. and Ljungdahl, L.G. 1974.** Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-dependent formate dehydrogenase from *Clostridium thermoaceticum*: purification and properties. *J. Bacteriol.* **120**: 6-14.
- Ando, M., Yoshimoto, T., Ogushi, S., Rikitake, K., Shibata, S. and Tsuru, D. 1979.** Formaldehyde dehydrogenase from *Pseudomonas putida*. *J. Biochem.* **85**: 1165-1172.
- Anthony, C. 1975.** The microbial metabolism of C1 compounds: the cytochromes of *Pseudomonas* AM1. *Biochem. J.* **146**: 289–298.
- Anthony, C. 1982.** The biochemistry of methylotrophs. Academic Press, London, England.
- Anthony, C. 1996.** Quinoprotein-catalyzed reactions. *Biochem. J.* **320**: 697–711.
- Aranda-Olmedo, I., Tobes, R., Manzanera, M., Ramos, J.L. and Marques, S. 2002.** Species-specific repetitive extragenic palindromic (REP) sequences in *Pseudomonas putida*. *Nucl. Acids Res.* **30**: 1826-1833.
- Asano, Y., Sekigawa, T., Inukai, H. and Nakazawa, A. 1988.** Purification and properties of formate dehydrogenase from *Moraxella* sp. strain C-1. *J. Bacteriol.* **170**: 3189-3193.
- Attwood, M. 1990.** Formaldehyde dehydrogenases from methylotrophs. *Methods. Enzymol.* **188**: 314–324.
- Attwood, M.M., and Quayle, J.R. 1984.** Formaldehyde as a central intermediary metabolite of methylotrophic metabolism, p. 315–323. *In* R. L. Crawford and R. S. Hanson (ed.), *Microbial growth on C1 compounds*. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- Avilova, T.V., Egorova, O.A., Ioanesyan, L.S. and Egorov, A.M. 1985.** Biosynthesis, isolation and properties of NAD-dependent formate dehydrogenase from the yeast *Candida methylica*. *Eur. J. Biochem.* **152**: 657-662.
- Bagdasarian, M., Lurz, R., Ruckert, B., Franklin, F.C., Bagdasarian, M.M., Frey, J., Timmis, K.N. 1981.** Specific-purpose plasmid cloning vectors. II. Broad host range, high copy number, RSF1010- derived vectors, and a host-vector system for gene cloning in *Pseudomonas*. *Gene* **16**: 237-247.
- Bagdasarian, M. and Timmis, K.N. 1982.** Host vector systems for gene cloning in *Pseudomonas*. *Curr. Top Microbiol. Immunol.* **96**: 47-67.

- Baldomà, L. and Aguilar, J. 1987.** Involvement of lactaldehyde dehydrogenase in several metabolic pathways of *Escherichia coli* K12. *J. Biol. Chem.* **262**: 13991-13996.
- Bansal, A.K. 1999.** An automated comparative analysis of 17 complete microbial genomes. *Bioinformatics* **15**: 900–908.
- Barber, R.D., Rott, M.A. and Donohue, T.J. 1996.** Characterization of a glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase from *Rhodobacter sphaeroides*. *J. Bacteriol.* **178**: 1386–1393.
- Barber, R.D. and Donohue, T.J. 1998.** Function of a glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase in *Rhodobacter sphaeroides* formaldehyde oxidation and assimilation. *Biochemistry* **37**: 530–537.
- Baron, C., Heider, J. and Böck, A. 1993.** Interaction of translation factor SelB with the formate dehydrogenase H selenopolypeptide mRNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**: 4181–4185.
- Berg, B.L., Li, J., Heider, J. and Stewart, V. 1991.** Nitrate-inducible formate dehydrogenase in *Escherichia coli* K-12. I. Nucleotide sequence of the *fdnGHI* operon and evidence that opal (UGA) encodes selenocysteine. *J. Biol. Chem.* **266**: 22380–22385.
- Berks, B.C., Page, M.D., Richardson, D.J., Reilly, A., Cavill, A., Outen, F. and Ferguson, S.J. 1995.** Sequence analysis of subunits of the membrane bound nitrate reductase from a denitrifying bacterium: the integral membrane subunit provides a prototype for the dihaem electron-carrying arm of a redox loop. *Mol. Microbiol.* **15**: 319-331.
- Berks, B.C. 1996.** A common export pathway for proteins binding complex redox cofactors? *Mol. Microbiol.* **22**: 393–404.
- Berks, B.C., Sargent, F., and Palmer, T. 2000.** The Tat protein export pathway. *Mol. Microbiol.* **35**: 260–274.
- Berks, B.C., Palmer, T., Sargent, F. 2003.** The Tat protein translocation pathway and its role in microbial physiology. *Adv. Microb. Physiol.* **47**: 187–254.
- Bertero, M.G., Rothery, R.A., Palak, M., Hou, C., Lim, D., Blasco, F., Weiner, J.H. and Strynadka, N.C. 2003.** Insights into the respiratory electron transfer pathway from the structure of nitrate reductase-A. *Nat. Struct. Biol.* **10**: 681–687.
- Böck, A. 2000.** Biosynthesis of selenoproteins—an overview. *Biofactors* **11**: 77–78.
- Bognar, A.L., Meighen, E.A. 1978.** An induced aliphatic aldehyde dehydrogenase from the bioluminescent bacterium *Benecka harveyi*. Purification and properties. *J. Biol. Chem.* **2**: 446-450.
- Boyington, J.C., Gladyshev, V.N., Khangulov, S.V., Stadtman, T.C. and Sun, P.D. 1997.** Crystal structure of formate dehydrogenase H: catalysis involving Mo, molybdopterin, selenocysteine, and an Fe<sub>4</sub>S<sub>4</sub> cluster. *Science* **275**: 1305-1308.

- Buell, C.R., Joardar, V., Lindeberg, M., Selengut, J., Paulsen, I.T., Gwinn, M.L., Dodson, R.J., Deboy, R.T., Durkin, A.S., Kolonay, J.F., Madupu, R., Daugherty, S., Brinkac, L., Beanan, M.J., Haft, D.H., Nelson, W.C., Davidsen, T., Zafar, N., Zhou, L., Liu, J., Yuan, Q., Khouri, H., Fedorova, N., Tran, B., Russell, D., Berry, K., Utterback, T., Van Aken, S.E., Feldblyum, T.V., D'Ascenzo, M., Deng, W.L., Ramos, A.R., Alfano, J.R., Cartinhour, S., Chatterjee, A.K., Delaney, T.P., Lazarowitz, S.G., Martin, G.B., Schneider, D.J., Tang, X., Bender, C.L., White, O., Fraser, C.M. and Collmer, A. 2003. The complete genome sequence of the Arabidopsis and tomato pathogen *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **100**: 10181-10186.
- Chang, C.C., and M. E. Gershwin. 1992. Perspectives on formaldehyde toxicity: separating fact from fantasy. Regul. Toxicol. Pharmacol. **16**: 150–160.
- Chen, G.F.T., Fang, L., and Inouye, M. 1993. Effect of the relative position of the UGA codon to the unique secondary structure in the *fdhF* mRNA on its decoding by selenocysteyl tRNA in *E. coli*, J. Biol. Chem. **268**: 23128–23131.
- Chistoserdova, L., Vorholt, J.A., Thauer, R.K. and Lidstrom, M.E. 1998. C1 transfer enzymes and coenzymes linking methylotrophic bacteria and methanogenic archaea. Science **281**: 99–102.
- Coldiron, V.R., Ward, J.B. Jr., Trieff, N.M., Janssen, H.E. Jr. and Smith J.H. 1983. Occupational exposure to formaldehyde in a medical center autopsy service. J. Occup. Med. **25**(7):544-548.
- Colas des Francs-Small, C., Ambard-Bretteville, F., Small, I.D. and Remy, R. 1993. Identification of a major soluble protein in mitochondria from nonphotosynthetic tissues as NAD-dependent formate dehydrogenase. Plant Physiol. **102**: 1171-1177.
- Cox, J.C., Edwards, E.S. and DeMoss J.A. 1981. Resolution of distinct selenium-containing formate dehydrogenases from *Escherichia coli*. J. Bacteriol. **145**: 1317-1324.
- Correia, M.A. 1995. Rat and human liver cytochromes P450: substrate and inhibitor specificities and functional markers, p. 607–630. In P. R. Ortiz de Montellano (ed.), Cytochrome P450 structure, mechanism, and biochemistry, 2nd ed. Plenum Press, New York, N.Y.
- Craft, T.R., Bermúdez, E. and Skopek, T.R. 1987. Formaldehyde mutagenesis and formation of DNA-protein crosslinks in human lymphoblasts *in vitro*. Mutat. Research. **176**: 147-155.
- Crouch, M.L., Becker, L.A., Bang, I.S., Tanabe, H., Ouellete, A.J., and Fang, F.C. 2005. The alternative sigma factor sigma E is required for resistance of *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* to anti-microbial peptides. Mol. Microbiol. **56**: 789–799.
- Czjzek, M., dos Santos, J.P., Pommier, J., Giordano, G., Mejean, V. and Haser, R. 1998. Crystal structure of oxidized trimethylamine N-oxide reductase from *Shewanella massilia* at 2.5 Å resolution. J. Mol. Biol. **284**: 435-447.
- Dahl, A.R., and Hadley, W.M. 1983. Formaldehyde production promoted by rat nasal cytochrome P-450-dependent monooxygenases with nasal decongestants, essences, solvents, air pollutants, nicotine, and cocaine as substrates. Toxicol. Appl. Pharmacol. **67**: 200–205.
- Dejonghe, W., Boon, N., Seghers, D., Top, E.M. and Verstraete, W. 2001. Bioaugmentation of soils by increasing microbial richness: missing links. Environ. Microbiol. **3**: 649-657.

- Delgado, A., Duque, E. and Ramos, J.L. 1992.** Behavior in agricultural soils of a recombinant *Pseudomonas bacterium* that simultaneously degrades alkyl- and haloaromatics. *Microb Releases* **1**: 23-28.
- del Castillo, T., Ramos, J.L., Rodríguez-Herva, J.J., Fuhrer, T., Sauer, U. and Duque, E. 2007.** Convergent Peripheral Pathways Catalyze Initial Glucose Catabolism in *Pseudomonas putida*: Genomic and Flux Analysis. *J. Bact.* **189**: 5142–5152.
- den Dooren Jong, L.E. 1926.** Bigdrage tot de kennis van het mineralisatieproces. Nijgh & van Ditmar, Rotterdam.
- Dias, J.M., Than, M.E., Humm, A., Huber, R., Bourenkov, G.P., Bartunik, H.D., Bursakov, S., Calvete, J., Caldeira, J., Carneiro, C. et al. 1999.** Crystal structure of the first dissimilatory nitrate reductase at 1.9 Å solved by MAD methods. *Structure* **7**: 65-79.
- 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.
- dos Santos, V.A.P., Heim, S., Moore, E.R., Strätz, M. and Timmis, K.N. 2004.** Insights into the genomic basis of niche specificity of *Pseudomonas putida* KT2440. *Environ. Microbiol.* **6** (12): 1264–1286
- dos Santos, V.A.P., Timmis K.T., Burkhard, T. and Christian, W. 2005.** Genomic features of *Pseudomonas putida* strain KT2440. *The pseudomonads. Vol I: Virulence and gene regulation.* Kluwer Publishing: 273-292
- Duque, E., Molina-Henares, A.J., de la Torre, J., Molina-Henares, M.A., del Castillo, T., Lam, J. and Ramos, J.L. 2007.** Towards a genome-wide mutant library of *Pseudomonas putida* strain KT2440. In: *Pseudomonas vol. V: A Model System in Biology*, Eds. Juan L. Ramos and A. Filloux. Springer, The Netherlands, Chapter 8, in press.
- Dunn, N.W. and Gunsalus, I.C. 1973.** Transmissible plasmid coding early enzymes of naphthalene oxidation in *Pseudomonas putida*. *J. Bacteriol.* **114**: 974-979.
- Egorov, A.M., Avilova, T.V., Dikov, M.M., Popov, V.O., Rodionov, Yu.V. and Berezin, I.V. 1979.** NAD-dependent formate dehydrogenase from methylotrophic bacterium, strain 1. Purification and characterization. *Eur. J. Biochem.* **99**: 569-576.
- Ellis, P.J., Conrads, T., Hille, R. and Kuhn, P. 2001.** Crystal structure of the 100 kDa arsenite oxidase from *Alcaligenes faecalis* in two crystal forms at 1.64 Å and 2.03 Å. *Structure* **9**: 125-132.
- Englesberg, E. 1952.** The mutagenic action of formaldehyde on bacteria. *J. Bacteriol.* **63**:1-11.
- Enoch, H.G. and Lester, R.L. 1975.** The purification and properties of formate dehydrogenase and nitrate reductase from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **250**: 6693–6705.
- Espinosa-Urgel M, Kolter R and Ramos JL 2002.** Root colonization by *Pseudomonas putida*: love at first sight. *Microbiology* **148**: 341-343.

- 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**: 5190-5198.
- Everall, P.H., Morris, C.A., Oliver, P.R. and Becker, J.F. 1982.** Problems in the disinfection of class 1 microbiology safety cabinets. *J. Clin. Pathol.* **35** (7): 698-705.
- Farinelli, M.P., Fry, D.W. and Richardson, K.E. 1983.** Isolation, Purification, and Partial Characterization of Formate Dehydrogenase from Soybean Seed. *Plant Physiol.* **73**: 858-859.
- Feil, H., Feil, W.S., Chain, P., Larimer, F., DiBartolo, G., Copeland, A., Lykidis, A., Trong, S., Nolan, M., Goltsman, E., Thiel, J., Malfatti, S., Loper, J.E., Lapidus, A., Detter, J.C., Land, M., Richardson, P.M., Kyrpides, N.C., Ivanova, N. and Lindow, S.E. 2005.** Comparison of the complete genome sequences of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* B728a and pv. *tomato* DC3000. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **102** (31): 11064-11069.
- Fernández, M.R., Biosca, J.A., Norin, A., Jörnvall, H. and Parés, X. 1995.** Class III alcohol dehydrogenase from *Saccharomyces cerevisiae*: Structural and enzymatic features differ toward the human/mammalian forms in manner consistent with functional needs in formaldehyde detoxification. *FEBS Lett.* **370**: 23-26.
- Fernández, M., Duque, E., Pizarro-Tobías, P., van Dillewijn, P., Wittich, R.M. and Ramos, J.L. 2009.** Microbial responses to xenobiotic compounds. Identification of genes that allow *Pseudomonas putida* KT2440 to cope with 2,4,6-trinitrotoluene. *Microbial Biotechnology* **2**: 287-294.
- Feron, V.J., Til, H.P., de Vrijer, F., Woutersen, R.A., Cassee, F.R. and van Bladeren, P.J. 1991.** Aldehydes: occurrence, carcinogenic potential, mechanism of action and risk assessment. *Mutat. Res.* **259**: 363-385.
- Forchhammer, K., Leinfelder, W. and Böck, A. 1989.** Identification of a novel translation factor necessary for the incorporation of selenocysteine into protein. *Nature* **342**: 453-456.
- Fournier, D., A. Halasz, J. Spain, R.J. Spanggord, J.C. Bottaro and J. Hawari. 2004.** Biodegradation of the hexahydro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazine ring cleavage product 4-nitro-2,4-diazabutanal by *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**: 1123-1128.
- Fujii, Y., Yamakasi, Y., Matsumoto, M., Nishida, H., Hada, M. and Ohkubo, K. 2004.** The Artificial Evolution of an Enzyme by Random Mutagenesis: The Development of Formaldehyde Dehydrogenase. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **68** (8): 1722-1727.
- Galan, B., Diaz, E., and Garcia, J.L. 2000** Enhancing desulphurization by engineering a flavin reductase-encoding gene cassette in recombinant biocatalysts. *Environ. Microbiol.* **2**: 687-694.
- Gibson, D.T. and Subramanian, V. 1984.** Microbial degradation of aromatic hydrocarbons. pp. 361-369 In D. T. Gibson [ed.], *Microbial degradation of organic compounds*. Marcel Dekker, New York.
- Glancer-Šoljan, M., Šoljan, V., Dragičević, T.L. and Čačić, L. 2001.** Aerobic Degradation of Formaldehyde in Wastewater from the Production of Melamine Resins. *Food technol. biotechnol.* **39** (3): 197-202.



**Godoy, P., Molina-Henares, A.J., de la Torre, J., Duque, E. and Ramos, J.L.** Functional characterization of the RND family of multidrug efflux pumps: *in silico* to *in vivo* confirmation of four functionally distinct subgroups. (2010) in preparation.

**Goenrich, M., Bartoschek, S., Hagemeyer, C.H., Griesinger, C., Vorholt, J.A. 2002.** A glutathione-dependent formaldehyde activating enzyme (Gfa) from *Paracoccus denitrificans* detected and purified via 2D proton exchange NMR spectroscopy. *J. Biol. Chem.* **277**: 3069–3072.

**Goldberg, I. and Matelis, R.I. 1975.** Growth of *Pseudomonas* C on C1 compounds: enzyme activities in extracts of *Pseudomonas* C cells grown on methanol, formaldehyde and formate as sole carbon sources. *J. Bacteriol.* **122**: 47-53.

**Goranov, A.I., Kuester-Schoeck, E., Wang, J.D. and Grossman, A.D. 2006.** Characterization of the Global Transcriptional Responses to Different Types of DNA Damage and Disruption of Replication in *Bacillus subtilis*. *J. Bact.* **188** (15): 5595–5605.

**Grafstrom, R.C., Curren, R.D., Yang, L. and Harris, C.C. 1985.** Genotoxicity of formaldehyde in cultured human bronchial fibroblasts. *Science* **228**: 89-90.

**Greated, A., Lambertsen, L., Williams, P.A. and Thomas, C.M. 2002.** Complete sequence of the IncP-9 TOL plasmid pWW0 from *Pseudomonas putida*. *Environ. Microbiol.* **4**:856-871.

**Gross, R., Simon, J., Lancaster, C.R. and Kroger, A. 1998.** Identification of histidine residues in *Wolinella succinogenes* hydrogenase that are essential for menaquinone reduction by H<sub>2</sub>. *Mol Microbiol.* **30**: 639-646.

**Gu, Z., Steinmetz, L.M., Gu, X., Scharfe, C., Davis, R.W. and Li, W.H. 2003.** Role of duplicate genes in genetic robustness against null mutations. *Nature* **421**: 63–66.

**Gursinsky, T., Jäger, J., Andreesen, J.R. and Söhling, B. 2000.** A *selDABC* cluster for selenocysteine incorporation in *Eubacterium acidaminophilum*. *Arch. Microbiol.* **174**: 200–212.

**Gursinsky, T., Gröbe, D., Schierhorn, A., Jäger, J., Andreesen, J.R. and Söhling, B. 2008.** Factors and Selenocysteine Insertion Sequence Requirements for the Synthesis of Selenoproteins from a Gram-Positive Anaerobe in *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* **74** (5): 1385–1393.

**Gutheil, W.G., Kasimoglu, E. and Nicholson, P.C. 1997.** Induction of glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase activity in *Escherichia coli* and *Hemophilus influenzae*. *Biochem Biophys. Res. Commun.* **238**: 693–696

**Hagemeyer, C.H., Chistoserdova, L., Lidstrom, M.E., Thauer, R.K. and Vorholt, J. A. 2000.** Characterization of a second methylene tetrahydromethanopterin dehydrogenase from *Methylobacterium extorquens* AM1. *Eur. J. Biochem.* **267**: 3762–3769.

**Handler, P., Bernheim, M.L.C. and Klein, J.R. 1941.** The oxidative demethylation of sarcosine to glycine. *J. Biol. Chem.* **138**: 211–218.

**Hanson, R.S. and T.E. Hanson. 1996.** Methanotrophic bacteria. *Microbiol. Rev.* **60**: 439–471.

- Harms, N., Ras, J., Reijnders, W.N.M., van Spanning, R.J.M. and Stouthamer, A.H. 1996. S-formylglutathione hydrolase of *Paracoccus denitrificans* is homologous to human esterase D: a universal pathway for formaldehyde detoxification? J Bacteriol. **178**: 6296–6299.
- Hassett, D., Cuppoletti, J., Trapnell, B., Lyman, Rowe, J., Yoon, S., Hilliard, G., Parvatiyar, K., Kamani, M., Wozniak, D., Hwang, S., McDermott, T. and Ochsner, U. 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**: 1425-1443.
- Hatzixanthis, K., Clarke, T.A., Oubrie, A., Richardson, D.J., Turner, R.J. and Sargent, F. 2005. Signal peptide-chaperone interactions on the twinarginine protein transport pathway. Proc. Natl. Acad. Sci. USA
- Hayat, M.A. 1981. Fixation of electron microscopy. New York, Acad Press.
- Heck, H. d'A., and Casanova-Schmitz, M. 1984. Biochemical Toxicology of formaldehyde. In review of Biochemical Toxicology Vol. 6 (Hodgson, E., Bend, J. R., Philpot. R.M.,eds): 155-189. Elsevier: Amsterdam.
- Helmann, J.D., Winston Wu, M.F., Kobel, P.A., Gamo, F.-J., Wilson, M., Morshedi, M.M., Navre, M. and Paddon, C. 2001. Global Transcriptional Response of *Bacillus subtilis* to Heat Shock. J. Bacteriol. **183** (24): 7318–7328.
- Heider, J., Forchhammer, K., Sawers, G. and Böck, A. 1991. Interspecies compatibility of selenoprotein biosynthesis in Enterobacteriaceae. Arch. Microbiol. **155**: 221–228.
- Heider, J., and Böck, A. 1992. Targeted insertion of selenocysteine into the a subunit of formate dehydrogenase from *Methanobacterium formicicum*. J. Bacteriol. **174**: 659–663.
- Heider, J., Baron, C., and Böck, A. 1992. Coding from a distance: dissection of the mRNA determinants required for the incorporation of selenocysteine into protein. EMBO J. **11**: 3759–3766.
- Herrera, M.C., Krell, T., Zhang, X and Ramos, J.L. 2009 (a). PhhR binds to target sequences at different distances with respect to RNA polymerase in order to activate transcription. J. Mol. Biol. Accepted. Minor modifications required.
- Herrera, M.C., Duque, E., Rodríguez-Herva, J.J., Fernández-Escamilla, A. and Ramos, J.L. 2009 (b). Identification and characterization of the PhhR regulon in *Pseudomonas putida*. Environ. Microbiol. Submitted.
- Hibia, M., Sonokya, T., and Moria, H. 2005. Functional coupling between vanillate-O-demethylase and formaldehyde detoxification pathway. FEMS Microbiol. Lett. **253**: 237–242.
- Hou, C.T., Patel, R.N., Laskin, A.I. and Barnabe, N. 1982. NAD-linked formate dehydrogenase from methanol-grown *Pichia pastoris* NRRL-Y-7556. Arch. Biochem. Biophys. **216**: 296-305
- Hu, L., and Phillips, A.T. 1988. Organization and multiple regulation of histidine utilization genes in *Pseudomonas putida*. J Bacteriol **170**: 4272–4279.

- Hüsken, L.E., Beeftink, R., de Bont, J.A.M. and Wery, J. 2001.** High-rate 3-methylcatechol production in *Pseudomonas putida* strains by means of a novel expression system. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **55**: 571-577.
- Hüsken, L. E., M. Oomes, K. Schoren, J. Tramper, J. A. M. de Bont, and R. Beeftink. 2002.** Membranefacilitated bioproduction of 3-methylcatechol in an octanol/water two-phase system. *J. Biotechnol.* **96**: 281-289.
- Hüttenhofer, A., Westhof, E. and Böck, A. 1996.** Solution structure of mRNA hairpins promoting selenocysteine incorporation in *E. coli* and their base-specific interaction with special elongation factor SelB. *RNA* **2**: 345–366.
- Hüttenhofer, A. and Böck, A. 1998.** RNA structures involved in selenoprotein synthesis, in: R. Simons, M. Grunberg-Manago (Eds.), *RNA Structure and Function*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, pp. 603–639.
- IARC. 1986.** Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. *Tabacco Smoking*. International Agency for Reserch on Cancer.
- IARC. 1995.** Formaldehyde. In *Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Wood Dust and Formaldehyde.* **62**, 217-362. IARC, Lyon.
- Ishige, T., Tani, A., Sakai, Y. and Kato, N. 2000.** Long-chain aldehyde dehydrogenase that participates in *n*-alkane utilization and wax ester synthesis in *Acinetobacter* sp. strain M-1. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**: 3481-3486.
- Ito, K., Takahashi, M., Yoshimoto, T. and Tsuru, D. 1994.** Cloning and high-level expression of the glutathione-independent formaldehyde dehydrogenase gene from ***Pseudomonas putida***. *J. Bacteriol.* **176**: 2483–2491.
- Izumi, Y., Kanzaki, H., Morita, S., Futazuka, H. and Yamada, H. 1987.** Crystalline formate dehydrogenase from *Candida methanolica*. *FEMS Microbiol. Lett.* **48** (1-2): 139-142.
- Izumi, Y., Kanzaki, H., Morita, S., Kato, N. and Yamada, H. 1988.** Dichlorophenolindophenol-linked formate dehydrogenase of the methanol-utilizing *Mycobacterium gastri* MB19. *FEMS Microbiol. Lett.* **56**: 277-280.
- Izumi, Y., Kanzaki, H., Morita, S., Futazuka, H. and Yamada, H. 1989.** Characterization of crystalline formate dehydrogenase from *Candida methanolica*. *Eur. J. Biochem.* **182**(2): 333-341.
- Jack, R.L., Buchanan, G., Dubini, A., Hatzixanthis, K., Palmer, T. and Sargent, F. 2004.** Coordinating assembly and export of complex bacterial proteins. *EMBO J.* **23**: 3962–3972
- Jakobsen, Ø.M., A. Benichou, M.C. Flickinger, S. Valla, T.E. Ellingsen, and T. Brautaset. 2006.** Upregulated transcription of plasmid and chromosomal ribulose monophosphate pathway genes is critical for methanol assimilation rate and methanol tolerance in the methylotrophic bacterium *Bacillus methanolicus*. *J. Bacteriol.* **188**: 3063-3072.
- Jiménez, J. I., Miñambres, B., García, J. L. and Díaz, E. 2002.** Genomic analysis of the aromatic catabolic pathways from *pesudomonas putida* KT2440. *Environ. Microbiol.* **4**: 824-841.

- Jiménez, J.I., Miñambres, B., García, J.L. and Díaz, E. 2004.** Genomic insights in the metabolism of aromatic compounds in *Pseudomonas*. In: *Pseudomonas: Biosynthesis of Macromolecules and Molecular Metabolism*, Ed. Juan L. Ramos, vol. 3, chapter 15, pp. 425-462. Kluwer Academic/Plenum Publishers.
- Johnson, P.A., and Quayle, J.R. 1964.** Microbial growth on C1 compounds: Oxidation of methanol, formaldehyde and formate by methanol-grown *Pseudomonas* AM1. *Biochem. J.* **93**: 281–290.
- Jones, J.B. and Stadtman, T.C. 1981.** Selenium-dependent and selenium-independent formate dehydrogenases of *Methanococcus vannielii*. Separation of the two forms and characterization of the purified selenium-independent form. *J. Biol. Chem.* **256**: 656-663.
- Jones, D. P., H. Thor, B. Andersson, and S. Orrenius. 1978.** Detoxification reactions in isolated hepatocytes. Role of glutathione peroxidase, catalase, and formaldehyde dehydrogenase in reactions relating to *N*-demethylation by the cytochrome P-450 system. *J. Biol. Chem.* **253**: 6031–6037.
- Jormakka, M., Törnroth, S., Byrne, B., Iwata, S. 2002.** Molecular basis of proton motive force generation: structure of formate dehydrogenase-N. *Science* **295**: 1863-1868.
- Jormakka, M., Byrne, B. and Iwata, S. 2003.** Formate dehydrogenase – a versatile enzyme in changing environments. *Current Opinion in Structural Biology* **13**: 418–423.
- Jormakka, M., Richardson, D.J., Byrne, B. and Iwata, S. 2004.** Architecture of NarGH reveals a structural classification of Mo-bisMGD enzymes. *Structure* **12**: 95–104.
- Kato, N., Kano, M., Tani, Y. and Ogata, K. 1974.** Purification and characterization of formate dehydrogenase in a methanol utilizing yeast, *Kloeckera* sp. no. 2201. *Agric. Biol. Chem.* **38**: 111-116.
- Kato, N., Kobayashi, H., Shimao, M., Sakazawa, C. 1984.** Properties of formaldehyde dismutation catalyzing enzyme of *Pseudomonas putida* F61. *Agric. Biol. Chem.* **47**(8): 2017-2023.
- Kato, N., Yamagami, T., Shimao, M. and Sakazawa, C. 1987.** Dihydroxyacetone production from methanol by a dihydroxyacetone kinase deficient mutant of *Hansenula polymorpha*. *Appl. Microb. Biotechnol.* **25**: 415-418.
- Kato, N., Yurimoto, H. and Thauer, R.K. 2006.** The physiological role of the ribulose monophosphate pathway in bacteria and archaea. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **70** (1): 10-21. Review.
- Kellerhals, M.B., Kessler, B. and Witholt, B. 1999.** Closed-loop control of bacterial high-cell-density fed-batch cultures: production of mcl-PHAs by *Pseudomonas putida* KT2442 under single-substrate and cofeeding conditions. *Biotechnol. Bioeng.* **65**: 306-15.
- Kiely, P.D., Haynes, J.M., Higgins, C.H., Franks, A., Mark, G.L., Morrissey, J.P. and O'gara, F. 2006.** Exploiting New Systems-Based Strategies to Elucidate Plant-Bacterial Interactions in the Rhizosphere. *Microb. Ecol.* **51**: 257-266.

- Kirk, R.E. and Othmer, D.F. 1980.** Encyclopedia of chemical technology, vol 11, 3<sup>rd</sup> edn. Wiley, New York, pp 236-250.
- Kitami, T., and Nadeau, J.H. 2002.** Biochemical networking contributes more to genetic buffering in human and mouse metabolic pathways than does gene duplication. *Nat. Genet.* **32**: 191–194.
- Klein, C.R., Kessler, F.P., Perrei, C., Frank, J., Duine, J.A. and Schwartz, A.C. 1994.** A novel dye-linked formaldehyde **dehydrogenase** with some properties indicating the presence of a protein-bound redox-active quinone cofactor. *Biochem. J.* **301**: 289–295.
- Kraak, M., Smits, T., Kessler, B. and Witholt, B. 1997.** Polymerase C1 levels and poly(R-3-hydroxyalkanoate) synthesis in wild-type and recombinant *Pseudomonas* strains. *J. Bacteriol.* **179**: 4985-4991.
- Kroger, A., Winkler, E., Innerhofer, A., Hackenberg, H. and Schagger, H. 1979.** The formate dehydrogenase involved in electron transport from formate to fumarate in *Vibrio succinogenes*. *Eur. J. Biochem.* **94**: 465-475.
- Krol, A. 2002.** Evolutionarily different RNA motifs and RNA–protein complexes to achieve selenoprotein synthesis. *Biochimie* **84**: 765–774.
- Kromayer, M., Wilting, R., Tormay, P. and Böck, A. 1996.** Domain structure of the prokaryotic selenocysteine-specific elongation factor SelB. *J. Mol. Biol.* **262**: 413–420.
- Kromayer, M., B. Neuhierl, B., Friebe, A. and Böck, A. 1999.** Genetic probing of the interaction between the translation factor SelB and its mRNA binding element in *Escherichia coli*. *Mol. Gen. Genet.* **262**: 800–806.
- Kummerle, N., H.H. Fench, and P.M. Kaulfers. 1996.** Plasmid-mediated formaldehyde resistance in *Escherichia coli*: characterization of resistance genes. *Antimicrob. Agents Chemother.* **40**: 2276-2279.
- Kung, H.-F. and Wagner, C. 1970.** Oxidation of C1 Compounds by *Pseudomonas* Sp. *MS Biochem. J.* **116**: 357-365.
- Kunow, J., Shima, S., Vorholt, J.A. and Thauer, R.K. 1996.** Primary structure and properties of the formyltransferase from the mesophilic *Methanosarcina barkeri*: comparison with the enzymes from thermophilic and hyperthermophilic methanogens. *Arch. Microbiol.* **165** (2): 97-105.
- Lanciano, P., Vergnes, A., Grimaldi, S., Guigliarelli, B. and Magalon, A. 2007.** Biogenesis of a respiratory complex is orchestrated by a single accessory protein. *J. Biol. Chem.* **282**: 17468–17474.
- Laukel, M., L. Chistoserdova, M.E. Lidstrom, and Vorholt, J.A. 2003.** The tungsten-containing formate dehydrogenase from *Methylobacterium extorquens* AM1: purification and properties. *Eur. J. Biochem.* **270**: 325–333.
- Le, L., Ayer, S., Olace, A.R. and Benyajati, C. 1990.** Analysis of formaldehyde-induced *Adh* mutations in *Drosophila* by RNA structure mapping and direct sequencing of PCR amplified genomic DNA. *Biochem. Genet.* **28**: 367-387.

- Lescure, A, Fagegaltier, D., Carbon, P. and Krol, A. 2002. Protein factors mediating selenoprotein synthesis, *Curr. Prot. Pept. Sci.* **3**: 143–151.
- Levchuk, A.A., Bulyga, I.M., Izmalkova, T. Iu., Sevastianovich, Ia R., Kosheleva, I.A., Thomas, C.M. and Titok, M.A. 2006. Nah-plasmids of IncP-9 group from natural strains of *Pseudomonas*. *Mol. Biol.* **40**: 835-843.
- Liber, H.L., Benforado, K., Crosby, R.M., Simpson, D. and Skopek, T.R. 1989. Formaldehyde-induced and spontaneous alterations in human hprt DNA sequence and RNAm expression. *Mutant. Res.* **226**: 31-37
- Lidstrom, M.E. 2001. Aerobic methylotrophic prokaryotes. *In* M. Dworkin (ed.), *Prokaryotes*. <http://link.springer.de/link/service/books/10125/>.
- Lidstrom, M.E., and Somers, L. 1984. Seasonal study of methane consumption in Lake Washington. *Appl. Environ. Microbiol.* **47**: 1255–1260.
- Lida, M., Kitamura-Kimura, K., Maeda, H. and Mineki, S. 1992. Purification and characterization of a NAD-dependent formate dehydrogenase produced by *Paracoccus* sp.+. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **56** (19): 1966-1970.
- Ling, K., and T. Tung. 1948. The oxidative demethylation of monomethyl-L-amino acids. *J. Biol. Chem.* **174**: 643–645
- Liu, C.-L. and Mortenson, L. E. 1984. Formate dehydrogenase of *Clostridium pasteurianum*. *J. Bacteriol.* **159**: 375-380.
- Liu, Z., Reches, M., Groisman, I. and Engelberg-Kulka, H. 1998. The nature of the minimal 'selenocysteine insertion sequence' (SECIS) in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res.* **26**: 896–902.
- Liu, Y., Li, C.M. Lu, Z., Ding, S., Yang, X. and Mo, J. 2006. Studies of formation and repair of formaldehyde-damaged DNA by detection of DNA-protein crosslinks and DNA breaks. *Front. Biosci.* **11**: 991-997.
- Long, M.T., Bartholomew, B.A., Smith, M.J., Trudgill, P.W. and Hopper, D.J. 1997. Enzymology of oxidation of tropic acid to phenylacetic acid in metabolism of atropine by *Pseudomonas* sp. strain AT3. *J. Bacteriol.* **179**: 1044-1050.
- Low, S. and Berry, M. 1996. Knowing when not to stop: selenocysteine incorporation in eukaryotes. *Trends Biochem. Sci.* **21**: 203–208.
- Lüke, I., Butland, G., Moore, K., Buchanan, G., Lyall, V., Fairhurst, S.A., Greenblatt, J.F., Emili, A., Palmer, T. and Sargent, F. 2008. Biosynthesis of the respiratory formate dehydrogenases from *Escherichia coli*: characterization of the FdhE protein. *Arch. Microbiol.* **190**: 685–696
- Lugtenberg, B.J.J. and Dekkers, L.C. 1999. What makes *Pseudomonas* bacteria rhizosphere competent? *Environ. Microbiol.* **1**: 9-13.
- Ma, T.H. and Harris, M.M. 1988. Review of the genotoxicity of formaldehyde. *Mutat Res.* **196** (1): 37-59. Review.

- Maillard, J., Spronk, C.A.E.M., Buchanan, G., Lyall, V., Richardson, D.J., Palmer, T., Vuister, G.W. and Sargent, F. 2007. Structural diversity in twin-arginine signal peptide-binding proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **104**: 15641–15646.
- Magaña-Schwencke, N., Elkert, B. and Moustachi. 1978. Biochemical analysis of damage induced in yeast by formaldehyde. Induction of single-strand in DNA and their repair. *Mutation Res.* **50**: 181-193.
- Manchee, R.J., Broster, M.G., Stagg, A.J. and Hibbs, S.E. 1994. Formaldehyde solution effectively inactivates spores of *Bacillus anthracis* on the Scottish island of Gruinard. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**: 4167-4171.
- Mandrand-Berthelot, M.A., Couchoux-Luthaud, G., Santini, C.L. and Giordano, G. 1988. Mutants of *Escherichia coli* specifically deficient in respiratory formate dehydrogenase activity. *J. Gen. Microbiol.* **134**: 3129–3139.
- Marison, I.W., and Attwood, M.M. 1980. Partial purification and characterization of a dye-linked formaldehyde dehydrogenase from *Hyphomicrobium* X. *J. Gen. Microbiol.* **177**: 305–313.
- Marison, I.W., and Attwood, M.M. 1982. A possible alternative mechanism for the oxidation of formaldehyde to formate. *J. Gen. Microbiol.* **128**: 1441–1446.
- Marqués, S., Gallegos, M.T., and Ramos. J.L. 1995. Role  $\sigma^S$  13 in transcription from the positively controlled Pm promoter of the TOL plasmid of *Pseudomonas putida*. *Mol. Microbiol.* **18**: 851-857.
- Marsh, G.M. 1982. Proportional mortality patterns among chemical plant workers exposed to formaldehyde. *Br. J. Ind. Med.* **39**: 313-322.
- Martinez-Bueno, M.A., Tobes, R., Rey, M. and Ramos, J.L. 2002. Detection of multiple extracytoplasmic function (ECF) sigma factors in the genome of *Pseudomonas putida* KT2440 and their counterparts in *Pseudomonas aeruginosa* PA01. *Environ. Microbiol.* **4**: 842-855.
- Marx, C.J., Chistoserdova, L. and Lidstrom, M.E. 2003 (a). Formaldehyde-detoxifying role of the tetrahydromethanopterin-linked pathway in *Methylobacterium extorquens* AM1. *J. Bacteriol.* **185**: 7160-7168.
- Marx, C.J., Laukel, M., Vorholt, J.A. and Lidstrom, M.E. 2003 (b). Purification of the Formate-Tetrahydrofolate Ligase from *Methylobacterium extorquens* AM1 and Demonstration of its Requirement for Methylothetic Growth. *J. Bacteriol.* **185** (24): 7169–7175.
- Marx, C.J., Miller, J.A., Chistoserdova, L. and Lidstrom, M.E. 2004. Multiple formaldehyde oxidation/detoxification pathways in *Burkholderia fungorum* LB400. *J. Bacteriol.* **186**: 2173-2178.
- Marx, C.J., Van Dien, S.J. and Lidstrom, M.E. 2005. Flux analysis uncovers key role of functional redundancy in formaldehyde metabolism. *PLoS Biol* 3(1): e<sup>16</sup>.
- Meek, L. and Arp, D.J. 2000. The hydrogenase cytochrome b heme ligands of *Azotobacter vinelandii* are required for full H(2) oxidation capability. *J. Bacteriol.* **182**: 3429-3436.

- Mehta, R.J. 1975.** A novel inducible formaldehyde dehydrogenase of *Pseudomonas* sp. (RJ1). *Antonie van Leeuwenhoek J. Microbiol. Serol.* **41**: 89–95.
- Meister, A. 1988.** Glutathione Metabolism and Its Selective Modification. *J. Biol. Chem.* **263**: 17205-17208.
- Migliore, L., Ventura, L., Barale, R., Lopriendo, N., Castellino, S. and Pulci, R. 1989.** Micronuclei and nuclear anomalies induced in the gastrointestinal epithelium of rats treated with formaldehyde. *Mutagénesis* **4**: 327-334.
- Migula, W. 1894.** Ueberein neues system der bakterien. *Arb Bakteriol Ins Karlsruhe* **1**: 235-238.
- Mitsui, R., Sakai, Y., Yasueda, H. and Kato, N. 2000.** A novel operon encoding formaldehyde fixation: The ribulose monophosphate pathway in the gram-positive facultative methylotrophic bacterium *Mycobacterium gastri* MB19. *J. Bacteriol.* **182**: 944-948.
- Muller, U., Willnow, P., Ruschig, V. and Hopner, Th. 1978.** Formate dehydrogenase from *Pseudomonas oxalaticus*. *Eur. J. Biochem.* **83**: 485-498.
- Musher, D.M. and Griffith, D.P. 1974.** Generation of formaldehyde from methenamine: Effect of pH and concentration, and antibacterial effect. *Antimicrob. Agents Chemother.* **6**: 708-711.
- Nachin, L., Nannmark, U. and Nyström, T. 2005.** Differential roles of the universal stress proteins of *Escherichia coli* in oxidative stress resistance, adhesion and motility. *J. Bacteriol.* **187**: 6265-6272.
- Nagy, I., Schoofs, G., Compennolle, F., Proost, P., Vanderleyden J. and de Mot, R. 1995.** Degradation of the thiocarbamate herbicide EPTC (S-Ethyl Dipropylcarbamothioate) and biosafening by *Rhodococcus* sp. Strain NI86/21 involve an inducible cytochrome P-450 system and aldehyde dehydrogenase. *J. Bacteriol.* **177**: 676-687.
- Neely, W.B. 1963.** Action of formaldehyde on microorganisms III: Bactericidal action of sublethal concentrations of formaldehyde on *Aerobacter aerogenes*. *J. Bacteriol.* **86**: 445-448.
- 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. Dusterhoft, B. Tummeler, and C.M. Fraser. 2002.** Complete genome sequence and comparative analysis of the metabolically versatile *Pseudomonas putida* KT2440. *Environ. Microbiol.* **4**: 799–808.
- Neumann, G., Kabelitz, N., Zehnsdorf, A., Miltner, A., Lippold, H., Meyer, D., Schmid, A. and Heipieper, H.J. 2005.** Prediction of the adaptability of *Pseudomonas putida* DOT-T1E to a second phase of a solvent for economically sound two-phase biotransformations. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**: 6606-6612.
- Nozaki, M., Kagamiyama, H. and Hayaishi, O. 1963.** Crystallization and some properties of metapyrocatechase. *Biochem Biophys Res Commun* **11**: 65-69.



- Ogushi, S., Ando, M., and Tsuru, D. 1984.** Formaldehyde dehydrogenase from *Pseudomonas putida*: a zinc metalloenzyme. *J. Biochem.* **96**: 1587–1591.
- Ogushi, S., Ando, M., and Tsuru, D. 1986.** Formaldehyde dehydrogenase from *Pseudomonas putida*: the role of a cysteinyl residue in the enzyme activity. *Agric. Biol. Chem.* **50**: 2503–2507.
- Olivera, E.R., Carnicero, D., Garcia, B., Minambres, B., Moreno, M.A., Canedo, L., Dirusso, C.C., Navarro, G., and Luengo, J.M. 2001.** Two different pathways are involved in the beta-oxidation of n-alkanoic and n-phenylalkanoic acids in *Pseudomonas putida* U: genetic studies and biotechnological applications. *Mol. Microbiol.* **39**: 863-874.
- Olsen, J.H. and Dossing, M. 1982.** Formaldehyde induced symptoms in day care centers. *Am. Ind. Hyg. Assoc. J.* **43**: 366-370.
- Oresnik, I.J., Ladner, C.L. and Turner, R.J. 2001.** Identification of a twin-arginine leader-binding protein. *Mol. Microbiol.* **40**: 323–331.
- Orita, I., Sato, T., Yurimoto, H., Kato, N., Atomi, H., Imanaka, T. and Sakai, Y. 2006.** The ribulose monophosphate pathway substitutes for the missing pentose phosphate pathway in the archaeon *Thermococcus kodakaraensis*. *J. Bacteriol.* **188**: 4698-4704.
- Overhage, J., Priefert, H., and Steinbüchel, A. 1999.** Biochemical and genetic analyses of ferulic acid catabolism in *Pseudomonas* sp. strain HR199. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 4837–4847.
- Palleroni, N.J. 1984.** Genus I. *Pseudomonas* Migula 1894. In R. G. Krieg and J. G. Holt (eds), *The Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 141-199. The Willians & Wilkins Co., Baltimore.
- Palleroni, N.J. 1986.** Taxonomy of *Pseudomonas*. In "The Bacteria". Academic Press. London Vol. X.: 3-25.
- Palmer, T., Sargent, F., Berks, B.C. 2005.** Export of complex cofactor containing proteins by the bacterial Tat pathway. *Trends Microbiol.* **13**: 175–180.
- Parales, R.E. and Haddock, J.D. 2004.** Biocatalytic degradation of pollutants. *Curr. Opin. Biotechnol.* **15** (4): 374-379.
- Patel, R.N., Hou, C.T., Derelanko, P. and Felix, A. 1980.** Purification and properties of a heme-containing aldehyde dehydrogenase from *Methylosinus trichosporium*. *Arch. Biochem. Biophys.* **203**: 654–662.
- Paulsen, I.T., Press, C.M., Ravel, J., Kobayashi, D.Y., Myers, G.S., Mavrodi, D.V., Deboy, R.T., Seshadri, R., Ren, Q., Madupu, R., Dodson, R.J., Durkin, A.S., Brinkac, L.M., Daugherty, S.C., Sullivan, S.A., Rosovitz, M.J., Gwinn, M.L., Zhou, L., Schneider, D.J., Cartinhour, S.W., Nelson, W.C., Weidman, J., Watkins, K., Tran, K., Khouri, H., Pierson, E.A., Pierson, L.S., Thomashow, L.S., Loper, J.E. 2006.** Corrigendum: Complete genome sequence of the plant comensal *Pseudomonas fluorescens* Pf-5. *Nat. Biotechnol.* **23**: 873-878.
- Paveglio, M.T., Tang, J.S., Unger, R.E., and Barrett, E.L. 1988.** Formate-nitrate respiration in *Salmonella typhimurium*: studies of two *rha*-linked *fdn* genes. *J. Bacteriol.* **170**: 213–217.

- Peacock, D. and Boulter. 1970.** Kinetic Studies of Formate Dehydrogenase. *Biochem. J.* **120**: 763-769.
- Phibbs, P.V.Jr., and Eagon, R. G. 1970.** Transport and phosphorylation of glucose, fructose, and mannitol by *Pseudomonas aeruginosa*. *Arch. Biochem. Biophys.* **138**: 470-82.
- Phibbs, P.V.J., McCowen, S.M., Feary, T.W. and Blevins W.T. 1978.** Mannitol and fructose catabolic pathways of *Pseudomonas aeruginosa* carbohydrate-negative mutants and pleiotropic effects of certain enzyme deficiencies. *J Bacteriol* **133**: 717-728.
- Popov, V.O. and Lazmin, V.S. 1994.** NAD<sup>+</sup>-dependent formate dehydrogenase. *Biochem. J.* **301**: 625-643.
- Potvin, E., Sanschagrín, F., and Levesque, R.C. 2008.** Sigma factors in *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol. Rev.* **32**: 38–55.
- Priefert, H., Rabenhorst, J., and Steinbüchel, A. 2001.** Biotechnological production of vanillin. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **56**: 296–314.
- Punginelli, C., Ize, B., Stanley, N.R., Stewart, V., Sawers, G., Berks, B.C. and Palmer, T. 2004.** mRNA secondary structure modulates translation of Tat-dependent formate dehydrogenase-N. *J. Bacteriol.* **186**: 6311–6315.
- Raaijmakers, H., Macieira, S., Dias, J.M., Teixeira, S., Bursakov, S., Huber, R., Moura, J.J., Moura, I. and Romão, M.J. 2002.** Gene sequence and the 1.8 Å crystal structure of the tungsten-containing formate dehydrogenase from *Desulfovibrio gigas*. *Structure* **10**: 1261-1272.
- Raaijmakers HC and Romão M.J. 2006.** Formate-reduced *E. coli* formate dehydrogenase H: the reinterpretation of the crystal structure suggests a new reaction mechanism. *J. Biol. Inorg. Chem.* **11**: 849–854.
- Ramos, J.L., Diaz, E., Dowling, D., de Lorenzo, V., Molin, S., O'Gara, F., Ramos, C. and Timmis, K.N. 1994.** The behavior of bacteria designed for biodegradation. *Biotechnology (N Y)* **12**: 1349-1356.
- Ramos, J.L., Gallegos, M.T., Marqués, S., Ramos-González, M.I., Espinosa-Urgel, M. and Segura, A. 2001.** Responses of gram-negative bacteria to certain environmental stressors. *Curr. Opin. Microbiol.* **4**: 166-171.
- Ramos, J.L., Duque, E., Gallegos, M.T., Godoy, P., Ramos-González, M.I., Rojas, A., Terán, W. and Segura, A. 2002.** Mechanisms of solvent tolerance in gram-negative bacteria. *Ann. Rev. Microbiol.* **56**: 743-768.
- Ramos-González, M.I., and Molin, S. 1998.** Cloning, sequencing and phenotypic characterization of the rpoS gene from *Pseudomonas putida* KT2440. *J Bacteriol* **180**: 3421–3431.

- Ras, J., van Ophem, P.W., Reijnders, W.N.M., van Spanning, R.J.M., Duine, J.A., Stouthamer, A.H. and Harms, N. 1995.** Isolation, sequencing, and mutagenesis of the gene encoding NAD- and glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase (GD-FALDH) from *Paracoccus denitrificans*, in which GD-FALDH is essential for methylotrophic growth. *J. Bacteriol.* **177**: 247–251.
- Rheinwald, J.G., Chakrabarty, A.M. and Gunsalus, I.C. 1973.** A transmissible plasmid controlling camphor oxidation in *Pseudomonas putida*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **70**: 885-889.
- Riederer-Henderson, M.A. and Peck, Jr.H.D. 1986.** Properties of formate dehydrogenase from *Desulfovibrio gigas*. *Can. J. Microbiol.* **32**(5): 430-435.
- Richardson, D.J. and Sawers, G. 2002.** PMF through the redox loop. *Science* **295**: 1842–1843
- Richardson, DJ. 2000.** Bacterial respiration: a flexible process for a changing environment. *Microbiology* **146**: 551-571.
- Rodríguez-Herva, J.J., Duque, E., Molina-Henares, M.A, Navarro-Avilés, G., van Dillewijn, P., de la Torre, J., Molina-Henares, A.J., Sánchez de la Campa, A., Ran, F.A., Segura, A., Shingler, V. and Ramos, J.L. 2009.** Physiological and transcriptomic characterization of a *fliA* mutant of *Pseudomonas putida* KT2440. *Environ. Microb. Rep.* En prensa.
- Rojas, A., Duque, E., Schmid, A., Hurtado, A., Ramos, J.L., and Segura, A. 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.
- Ryan, K. J., and C. G. Ray. (editors). 2004.** Sherris Medical Microbiology, 4th ed., McGraw Hill.
- Sagripanti, J.L. and Bonifacino, A. 1996.** Comparative sporicidal effect of liquid chemical agents. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 545-551.
- Sargent, F., Bogsch, E.G., Stanley, N.R., Wexler, M., Robinson, C., Berks, B.C. and Palmer, T. 1998.** Overlapping functions of components of a bacterial Sec-independent protein export pathway. *EMBO J.* **17**: 3640-3650.
- Sargent, F., Stanley, N.R., Berks, B.C. and Palmer, T. 1999.** Sec-independent protein translocation in *Escherichia coli*: a distinct and pivotal role for the TatB protein. *J. Biol. Chem.* **274**: 36073-36083.
- Sargent, F. 2007 (a).** The twin-arginine transport system: moving folded proteins across membranes. *Biochem. Soc. Trans.* **35**: 835–847.
- Sargent F 2007 (b).** Constructing the wonders of the bacterial world: biosynthesis of complex enzymes. *Microbiology* **153**: 633–651.
- Sawers, G., Heider, J., Zehelein, E. and Böck, A. 1991.** Expression and operon structure of the *sel* genes of *Escherichia coli* and identification of a third selenium-containing formate dehydrogenase isoenzyme. *J. Bacteriol.***173**: 4983-4993.
- Sawers, G. 1994.** The hydrogenases and formate dehydrogenases of *Escherichia coli*. *Antonie Van Leeuwenhoek* **66**: 57–88.

- Serov, A.E., Popova, A.S., Fedorchuk, V.V. and Tishkov, V.I. 2002.** Engineering of coenzyme specificity of formate dehydrogenase from *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. J.* **367**: 841–847.
- 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** (17): 5937-5945.
- Segura, A., Rodríguez-Conde, S., Ramos, C. and Ramos, J.L. 2009.** Bacterial responses and interactions with plants during rhizoremediation. *Microbial Biotechnology* **2** (4): 452–464.
- Selvaraju, S.B., Khan, I.U. and Yadav, J.S. 2005.** Biocidal activity of formaldehyde and nonformaldehyde biocides toward *Mycobacterium immunogenum* and *Pseudomonas fluorescens* in pure and mixed suspensions in synthetic metalworking fluid and saline. *Appl. Environ. Microbiol.* **71** (1): 542-546.
- Schauer, N.L. and Ferry, J.G. 1982.** Properties of formate dehydrogenase in *Methanobacterium formicicum*. *J. Bacteriol.* **150** (1): 1-7.
- Schindwein, C., Giordano, G., Santini, C.L. and Mandrand, M.A. 1990.** Identification and expression of the *Escherichia coli fdhD* and *fdhE* genes, which are involved in the formation of respiratory formate dehydrogenase. *J. Bacteriol.* **172**: 6112–6121.
- Schindwein, C. and Mandrand, M.A. 1991.** Nucleotide sequence of the *fdhE* gene involved in respiratory formate dehydrogenase formation in *Escherichia coli* K-12. *Gene* **97**: 147–148
- Schindelin, H., Kisker, C., Hilton, J., Rajagopalan, K.V. and Rees, D.C. 1996.** Crystal structure of DMSO reductase: redox-linked changes in molybdopterin coordination. *Science* **272**: 1615-1621.
- Schutte, H., Flossdorf, J., Sahm, H. and Kula, M.-R. 1976.** Purification and properties of formaldehyde dehydrogenase and formate dehydrogenase from *Candida boidinii*. *Eur. J. Biochem.* **62**: 151-160.
- Schwörer, B., Breitung, J., Klein, A.R., Stetter, K.O., Thauer, R.K. 1993.** Formylmethanofuran: tetrahydromethanopterin formyltransferase and N5,N10-methylenetetrahydromethanopterin dehydrogenase from the sulfate-reducing *Archaeoglobus fulgidus*: similarities with the enzymes from methanogenic Archaea. *Arch. Microbiol.* **159** (3): 225-232.
- Shaham, J., Bomstein, Y., Meltzer, A., Kaufman, Z., Palma, E. and Ribak, J. 1996.** DNA-protein crosslinks, a biomarker of exposure to formaldehyde-in *vitro* and *in vivo* studies. *Carcinogenesis*. **17**: 121-125.
- Shinabarger, D.L., and Braymer, H.D. 1986.** Glyphosate catabolism by *Pseudomonas* sp. strain PG2982. *J. Bacteriol.* **168**: 702-707.
- Shinagawa, E., Toyama, H., Matsushita, K., Tuitemwong, P., Theeragool, G. and Adachi, O. 2008.** Formaldehyde elimination with formaldehyde and formate oxidase in membrane of acetic acid bacteria. *J. Biosci. Bioeng.* **105** (3): 292-295.

- Shinoda, T., Satoh, T., Mineki, S., Lida, M., Taguchi, H., 2002.** Cloning, nucleotide sequencing, and expression in *Escherichia coli* of the gene for formate dehydrogenase of *Paracoccus* sp.12-A, a formate-assimilating bacterium. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **66**: 271–276.
- Shoda, M. 2000.** Bacterial control of plant diseases. *J. Biosci. Bioeng.* **89**: 515-521
- Snel, B., Bork, P. and Huynen, M.A. 1999.** Genome phylogeny based on gene content. *Nat. Genet.* **21**: 108–110.
- Sobsey, M.D., Wallis, C. and Melnick, J.L. 1974.** Chemical disinfection of holding-tank sewage. *Appl. Envir. Microbiol.* **128**: 861-866.
- Speer, B.L.C., and Lidstrom, M.E. 1994.** Sequence of the gene for a NAD(P)-dependent formaldehyde dehydrogenase (class III alcohol dehydrogenase) from a marine methanotroph *Methylobacter marinus* A45. *FEMS Lett.* **121**: 349–356.
- Stanier, R.Y., Palleron. N.J., Doudoroff, M. 1966.** The aerobic *pseudomonads*: a taxonomic study. *J. Gen. Microbiol.* **43**: 159-271.
- Stanley, N.R., Sargent, F., Buchanan, G., Shi, J., Stewart, V., Palmer, T. and Berks, B.C. 2002.** Behaviour of topological marker proteins targeted to the Tat protein transport pathway. *Mol Microbiol* **43**: 1005–1021.
- Stayner, L., Steenland, K., Greife, A., Hornung, R., Hayes, R.B., Nowlin, S., Morawetz, J., Ringenburg, V., Elliot, L., and Halperin, W. 1993.** Exposure-response analysis of cancer mortality in cohort of workers exposed to ethylene oxide. *American Journal of Epidemiology.* **138** (10): 787-798.
- Stewart, V. 1988.** Nitrate respiration in relation to facultative metabolism in Enterobacteria. *Microbial. Rev.* **52**: 190-232.
- Stewart, V., Lin, J.T. and Berg, B.L. 1991.** Genetic evidence that genes *fdhD* and *fdhE* do not control synthesis of formate dehydrogenase-N in *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* **173**: 4417–4423.
- Stirling, D.I., and Dalton, H. 1978.** Purification and properties of an NAD(P)-linked formaldehyde dehydrogenase from *Methylococcus capsulatus* (Bath). *J. Gen. Microbiol.* **107**: 19–29.
- Stover CK, Pham XQ, Erwin AL, Mizoguchi SD, Warrenner P, Hickey MJ, Brinkman FS, Hufnagle WO, Kowalik DJ, Lagrou M, Garber RL, Goltry L, Tolentino E, Westbrook-Wadman S, Yuan Y, Brody LL, Coulter SN, Folger KR, Kas A, Larbig K, Lim R, Smith K, Spencer D, Wong GK, Wu Z, Paulsen IT, Reizer J, Saier MH, Hancock RE, Lory S, Olson MV 2000.** Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature* **406**: 959-964.
- Strydom, D.J., and Vallee, B.L. 1982.** Characterization of human alcohol dehydrogenase isoenzymes by high-performance liquid chromatographic peptide mapping. *Anal. Biochem.* **123**: 422-429.
- Suruda, A., Schutle, P., Boeniger, M., Hayes, R.B., Livingston, G.K., Steenland, K., Stewart, P., Herrick, R., Douthit, D. and Fingerhut. 1993.** Cytogenetic effects of formaldehyde exposure in students of mortuary science. *Cancer Epidemiol. Biomarker Preven.* **2**: 453-460.

- Tanaka, N., Kusabe, Y., Ito, K., Yoshimoto, K., Nakamura, K.T. 2002.** Cristal structure of formaldehyde dehydrogenase from *Pseudomonas putida*: the structural origin of the tightly bound cofactor in nicotinoprotein dehydrogenases. *J. Mol. Biol.* **324**: 519-533.
- Tanaka, N., Kusakabe, Y., Ito, K., Yoshimoto, T., and Nakamura, K.T. 2003.** Crystal structure of glutathione independent formaldehyde dehydrogenase. *Chem. Biol. Interact.* 143–144: 211–218.
- Takatsuka, Y. and Nikaido, H. 2006.** Threonine-978 in the transmembrane segment of the multidrug efflux pump AcrB of *Escherichia coli* is crucial for drug transport as a probable component of the proton relay network. *J. Bacteriol.* **188** (20): 7284-7289.
- Tate, S. and Dalton, H. 1999.** A low-molecular-mass protein from *Methylococcus capsulatus* (Bath) is responsible for the regulation of formaldehyde dehydrogenase activity *in vitro*. *Microbiology* **145**: 159–167.
- Taylor, L.A., Barbeito, M.S. and Gremillon, G.C. 1969.** Paraformaldehyde for surface sterilization and detoxification. *Appl. Environ. Microbiol.* **17**: 614-618.
- Thanbichler, M. and Böck, A. 2001.** Functional analysis of prokaryotic SelB proteins. *BioFactors* **14**: 53–59.
- Thauer, R.K. 1996.** Biodiversity and unity in biochemistry. *Antonie Leeuwenhoek* **71**, 21-32.
- Thauer, R.K. 1998.** Biochemistry of methanogenesis: a tribute to Marjory Stephenson. *Microbiology* **144**: 2377–2406.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G. and Gibson, T.J. 1994.** CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* **22**: 4673–4680.
- Timmis, K.N., Rojo, F. and Ramos, J.L. 1988.** Prospects for laboratory engineering of bacteria to degrade pollutants. *Basic Life Sci.* **45**: 61-79.
- Tishkov, V.I. 1993.** Structure, Mechanism of Action and Protein Engineering of NAD-dependent Formate Dehydrogenase, D.Sc. Thesis, Moscow State University, Moscow.
- Tishkov, V.I. and Popov, V.O. 2006.** Protein engineering of formate dehydrogenase. *Biomolecular Engineering* **23**: 89–110
- Trujillo, R., and Lindell, K. 1973.** New formaldehyde base disinfectants. *Appl. Environ. Microbiol.* **26**: 106-110.
- Tsuru, D., Oda, N., Matuo, Y., Ishikawa, S., Ito, K., and Yoshimoto, T. 1997.** Glutathione-independent formaldehyde dehydrogenase from *Pseudomonas putida*: Survey of functional groups with special regard for cysteine residue. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **61**: 1354–1357.
- Turner, R.J., Papish, A.L. and Sargent, F. 2004.** Sequence analysis of bacterial redox enzyme maturation proteins (REMPs). *Can. J. Microbiol.* **50**: 225–238.

- Uden, G. and Bongaerts, J. 1997.** Alternative respiratory pathways of *Escherichia coli*: energetics and transcriptional regulation in response to electron acceptors. *Biochim. Biophys. Acta* **1320**: 217-234.
- Uotila, L. and Koivusalo, M. 1974.** Formaldehyde dehydrogenase from human liver. Purification, properties and evidence for the formation of glutathione thiol esters by the enzyme. *J. Biol. Chem.* **249**: 7653-7663.
- Uotila, L., and Koivusalo, M. 1979.** Purification of formaldehyde and formate dehydrogenases from pea seeds by affinity chromatography and S-formylglutathione as the intermediate of formaldehyde metabolism. *Arch. Biochem. Biophys.* **196**: 33-45.
- Uotila, L. and Koivusalo, M. 1989.** Glutathione-dependent oxidoreductases: Coenzymes and Cofactors. Vol. III In. *Glutathione. Chemical, Biochemical and Medical Aspects. Part .A.* (Dolphin, D., Poulson, R. and Avramovic, O., eds.), 517-551, John Wiley and Sons, Inc., New York.
- van Dijken, J.P., Oostra-Demkes, G.J., Otto, R. and Harder, W. 1976.** S-formylglutathione: The substrate for formate dehydrogenase in methanol-utilizing yeasts. *Arch. Microbiol.* **11**: 77-83.
- van Dillewijn, P., Couselo, J.L., Corredoira, E., Delgado, A., Wittich, R.M., Ballester, A. and Ramos, J.L. 2008.** Bioremediation of 2,4,6-trinitrotoluene by bacterial nitroreductase expressing transgenic aspen. *Environ. Sci. Technol.* **42** (19): 7405-7410.
- van Ophem, P.W., Van Beeumen, J. and Duine, J.A. 1992.** NAD-linked, factor-dependent formaldehyde dehydrogenase or trimeric, zinc-containing, long-chain alcohol dehydrogenase from *Amycolatopsis methanolica*. *Eur. J. Biochem.* **206**: 511-518.
- van Ophem, P.W. and Duine, J.A. 1994.** NAD- and co-substrate (GSH or factor)-dependent formaldehyde dehydrogenases from methylotrophic microorganisms act as a class III alcohol dehydrogenase. *FEMS Microbiol. Lett.* **116**: 87-94.
- Vergnes, A., Pommier, J., Toci, R., Blasco, F., Giordano, G. and Magalon, A. 2006.** NarJ chaperone binds on two distinct sites of the aponitrate reductase of *Escherichia coli* to coordinate molybdenum cofactor insertion and assembly. *J. Biol. Chem.* **281**: 2170-2176.
- Vinals, C., Depiereux, E. and Feytmans, E. 1993.** Prediction of structurally conserved regions of D-specific hydroxy acid dehydrogenases by multiple alignment with formate dehydrogenase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **192**: 182-188.
- Vodovar, N., Vallenet, D, Cruveiller, S, Rouy, Z., Barbe, V., Acosta, C., Cattolico, L., Jubin, C., Lajus, A., Segurens, B., Vacherie, B., Wincker, P., Weissenbach, J., Lemaitre, B., Médigue, C. and Bocard, F. 2006.** Complete genome sequence of the entomopathogenic and metabolically versatile soil bacterium *Pseudomonas entomophila*. *Nature Biotechnology* **24**: 673-679.
- Vorholt, J.A., Kunow, J., Stetter, K.O. and Thauer, R.K. 1995.** Enzymes and coenzymes of the carbon monoxide dehydrogenase pathway for autotrophic CO<sub>2</sub> fixation in *Archaeoglobus lithotrophicus* and the lack of carbon monoxide dehydrogenase in the heterotrophic *A. profundus*. *Arch. Microbiol.* **163**: 112-118.

- Vorholt, J.A., Chistoserdova, L., Lidstrom, M.E. and Thauer, R.K. 1998.** The NADP-dependent methylene tetrahydromethanopterin dehydrogenase in *Methylobacterium extorquens* AM1. *J. Bacteriol.* **180**: 5351–5356.
- Vorholt, J.A., Chistoserdova, L., Stolyar, S.M., Thauer, R.K. and Lidstrom, M.E. 1999.** Distribution of tetrahydromethanopterin-dependent enzymes in methylotrophic bacteria and phylogeny of methenyl tetrahydromethanopterin cyclohydrolases. *J. Bacteriol.* **181**: 5750–5757.
- Vorholt, J.A., Marx, .C.J., Lidstrom, M.E. and Thauer, R.K. 2000.** Novel formaldehyde-activating enzyme in *Methylobacterium extorquens* AM1 required for growth on methanol. *J. Bacteriol.* **182**: 6645–6650.
- Vorholt, J.A. 2002.** Cofactor-dependent pathways of formaldehyde oxidation in methylotrophic bacteria. *Arch. Microbiol.* **178** (4): 239-249. Review.
- Vorholt, J.A., Marx, C.J., Lidstrom, M.E. and Thauer, R.K. 2002.** Novel formaldehyde-activating enzyme in *Methylobacterium extorquens* AM1 required for growth on methanol. *J. Bacteriol.* **182**: 6645-6650.
- Wagner, A. 2000.** Robustness against mutations in genetic networks of yeast. *Nat. Genet.* **24**: 355–361.
- Walsh, U.F., Morrissey, J.P. and O’Gara, F. 2001.** *Pseudomonas* for biocontrol of phytopathogens: from functional genomics to commercial exploitation. *Curr. Opin. Biotechnol.* **12**: 289–295.
- Weinel, C., Nelson, K.E. and Tummler, B. 2002.** Global features of the *Pseudomonas putida* KT2440 genome sequence. *Environ. Microbiol.* **4**: 809-818.
- Wilks, J.C., Kitko, R.D., Cleeton, S.H., Lee, G.E., Ugwu, Ch.S., Jones, B.D., BonDurant, S.S. and Slonczewski, J.L. 2009.** Acid and Base Stress and Transcriptomic Responses in *Bacillus subtilis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **75** (4): 981–990.
- Williams, P.A. and Murray, K. 1974.** Metabolism of benzoate and the methylbenzoates by *Pseudomonas putida* (arvilla) mt-2: evidence for the existence of a TOL plasmid. *J. Bacteriol.* **120**: 416-423.
- Wolfe, R.S. 1991.** My kind of biology. *Annu. Rev. Microbiol.* **45**: 1-35.
- Wood, L.F. and Dennis E. Ohman D.E. 2009.** Use of cell wall stress to characterize  $\sigma^{22}$  (AlgT/U) activation by regulated proteolysis and its regulon in *Pseudomonas aeruginosa*. *Molecular Microbiology* **72** (1): 183–201.
- Worsey, M.J. and Williams, P.A. 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.
- Yamamoto, I., Saiki, T., Liu, S.M. and Ljungdahl, L.G. 1983.** Purification and properties of NADP-dependent formate dehydrogenase from *Clostridium thermoaceticum*, a tungsten-selenium-iron protein. *J. Biol. Chem.* **25**: 1826-1832.



**Yasueda, H., Kawahara, Y. and Sugimoto, S. 1999.** *Bacillus subtilis yckG and yckF* encode two key enzymes of the ribulose monophosphate pathway used by methylootrophs, and *yckH* is required for their expression. *J. Bacteriol.* **181** (23): 7154-7160.

**Yu, E.W., Aires, J.R., McDermott, G. and Nikaido, H. 2005.** A periplasmic drug-binding site of the AcrB multidrug efflux pump: a crystallographic and site-directed mutagenesis study. *J. Bacteriol.* **187**: 6804-6815.

**Zahn, J.A., Bergmann, D.J., Boyd, J.M., Kunz, R.C., Dispirito, A.A. 2001.** Membrane-associated quinoprotein formaldehyde dehydrogenase from *Methylococcus capsulatus* Bath. *J. Bacteriol.* **183**: 6832–6840.

**Zhang, Y., and Gladyshev, V.N. 2005.** An algorithm for identification of bacterial selenocysteine insertion sequence elements and selenoprotein genes. *Bioinformatics* **21**: 2580–2589.

**Zinoni, F., Birkmann, A., Stadtman, T.C. and Böck, A. 1986.** Nucleotide sequence and expression of the selenocysteine-containing polypeptide of formate-dehydrogenase from *E. coli*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**: 4560–4564.