

Consejo Superior de Investigaciones Científicas

Estación Experimental del Zaidín



UNIVERSIDAD
DE GRANADA

**Regulación de la expresión de la ruta de degradación
de compuestos dihidroxilados en *Azoarcus anaerobius*
y *Thauera aromatica* AR-1**

Tesis Doctoral

Daniel Pacheco Sánchez

2018

Editor: Editorial de la Universidad de Granada
Autor: Daniel Pacheco Sánchez
Dibujo de la portada: María Pacheco García
Impreso en mayo de 2018

**Regulación de la expresión de la ruta de degradación de compuestos
dihidroxiados en *Azoarcus anaerobius* y *Thauera aromatica* AR-1**

Memoria que presenta el Licenciado en Biología

Daniel Pacheco Sánchez

para aspirar al Título de Doctor

Fdo. Daniel Pacheco Sánchez

VºBº de la Directora

Fdo.: Silvia Marqués Martín

Doctora en Biología

Investigadora Científica CSIC

EEZ-CSIC/Universidad de Granada

2018

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales
Autor: Daniel Pacheco Sánchez
ISBN: 978-84-9163-909-1
URI: <http://hdl.handle.net/10481/52300>

Esta tesis doctoral ha sido realizada en el Grupo de Microbiología Ambiental y Biodegradación perteneciente al Departamento de Protección Ambiental de la Estación Experimental del Zaidín (CSIC), por Daniel Pacheco Sánchez, cuya Investigación ha sido financiada por los proyectos BIO-2011-23615 del MICINN y P08-CVI03591 de la Junta de Andalucía.

Parte de los resultados obtenidos durante esta tesis doctoral sido presentados en los siguientes congresos y publicaciones:

Publicaciones

RedR1 and RedR2, Transcripcional regulators of the anaerobic degradation pathways in *Azoarcus anaerobius*. Molina-Fuentes, A, Pacheco, D., Marqués, S. FEBS Journal 279: 492-493 (2012).

The *Azoarcus anaerobius* 1,3-Dihydroxybenzene (Resorcinol) Anaerobic Degradation Pathway Is Controlled by the Coordinated Activity of Two Enhancer-Binding Proteins. Pacheco-Sánchez D, Molina-Fuentes Á, Marín P, Medina-Bellver JI, González-López Ó, Marqués S. Appl Environ Microbiol. Apr 17;83(9). Abril 2017.

Trabajo enviado:

DbdR, a new member of the LysR family of transcripcional regulators, coordinately controls four promoters in the *Thauera aromatica* AR1 3,5-dihydroxybenzoate anaerobic degradation pathway. Submitted to Applied and Environmental Microbiology.

Congresos

FEMS 2017, 7th Congress of European Microbiologists Congres, Valencia, Spain, July 2017. The two AAA+ enhancer-binding proteins (bEBPs) RedR1 and RedR2 from heterohexamers to activate transcription of *Azoarcus anaerobius* 1,3-dihydroxybenzene anaerobic degradation pathway. Daniel Pacheco, Patricia Marín, Montserrat Grife-Ruiz and Silvia Marqués

FEMS 2015, 6th Congress of European Microbiologists. Maastricht, The Netherlands. June 2015. *Azoarcus anaerobius* resorcinol anaerobic degradation pathway is controlled by the coordinated activity of two sigma 54-dependent regulators. Pacheco, D., Molina-Fuentes, A., Marín P. and Marqués, S.

XXXVIII Congress SEBBM. Granada, Spain. Septiembre 2014. DbdR, nuevo miembro de la familia LysR, regulador transcripcional de la ruta de degradación anaeróbica de 3,5 DHB en *Thauera aroamtica* AR-1. Pacheco, D., Molina-Fuentes, A., Marín P., Díaz Romero, A. and Marqués, S.

FEMS 2013, 5th Congress of European Microbiologists. Leipzig, Germany, July, 2013. Occurrence and diversity of the novel oxidative pathway involved in the anaerobic degradation of dihydroxylated aromatic compounds. Ramón Ramagarda, Daniel Pacheco, Sophie-Marie Martirani von Abercron, Patricia Marín, Alejandro Acosta-González & Silvia Marqués.

22nd IUBMB & 37th FEBS 2012 (SEBBM). Sevilla, Spain. September 2012. RedR1 and RedR2, Two NtrC-family regulators, control the resorcinol (1,3-dihydroxybenzene) anaerobic degradation pathway in *Azoarcus anaerobius*. Pacheco, D., Molina-Fuentes, A. and Marqués, S. Section: Regulation of Gene Expression and Genome Dynamics P21-47

El doctorando **DANIEL PACHECO SÁNCHEZ** y la directora de la tesis **SILVIA MARQUÉS MARTÍN** garantizamos, al firmar esta tesis doctoral, que el trabajo ha sido realizado por el doctorando bajo la dirección de la directora de la tesis y hasta donde nuestro conocimiento alcanza, en la realización del trabajo, se han respetado los derechos de otros autores a ser citados, cuando se han utilizado sus resultados o publicaciones.

5 abril del 2018

Directora de Tesis

Doctorando

Fdo.: Silvia Marqués Martín

Fdo.: Daniel Pacheco Sánchez

A Mónica

A María y Manuela

A Mercedes y Manuel

Supongo que en esta parte es donde se ponen las frases que alguna vez te han inspirado a seguir o mejorar en tu vida. Estas son las frases que me han inspirado en mi trabajo y en mi vida.

“Anyway”

Silvia Marqués

(Lo que entiende el becario al oír esto es, “¡Verás tu lo que viene ahora!”)

“¿Tu me entiendes a mi?... (Silencio), vente que te voy a peinar”

Mercedes (Ejemplo del saber estar)

“¡Papi, ven, ven, ven! ¡Mira esto nuevo!”

María y Manuela (El interés por el conocimiento)

Agradecimiento

Llegado este punto he intentado recordar todas las personas que han ayudado en esta “historia”, y son muchas las que me vienen a la cabeza. Ha sido un camino muy difícil y lleno de miedos, pero me ha cambiado y sobre todo ha ido formándome como persona, ya que fue el inicio de un periodo profesional y sobre todo personal. Por tanto, en este camino cada uno de vosotros habeis tenido un papel importante.

En primer lugar, agradecer a Silvia por confiar en mí y sobre todo por enseñarme a pensar. Es uno de los primeros consejos que me diste y aunque no fue rápido de asimilar creo que ahora me ha servido para muchas cosas no solo profesional. Reconozco que yo lo tome como una oportunidad sólo laboral porque eso del mundo científico para mí era muy desconocido, pero me has dado la oportunidad de generar en mi ilusión y ganas por saber y buscar respuestas. Son muchas discusiones en tu despacho o en el laboratorio en las que he salido con más preguntas que respuestas, pero te he de reconocer que es admirable tu dedicación a todo lo que haces y sobre todo a ayudar a quien te lo pide.

También agradecer a todo el equipo del grupo de Microbiología Ambiental y Biodegradación, empezando por los Drs. Pieter Dillewijn, (también he de reconocer que cuando vienes con tu lista de seminarios no eres igual de simpático), Regina Wittich (aunque creas que no admiro tu valentía), Ana Segura (gracias por tu amabilidad y disposición), Estrella Duque (gracias por tu humanidad y por recordarme a la idiosincrasia de mi gente), Juan Luís Ramos (gracias por darme una gran alegría con tu equipo: Betis 3-5 Cádiz, lo siento no he podido resistirlo), Maribel Ramos (aunque difícil de entenderte algunas veces he de decirte que ha sido un honor conocerte), Manuel Espinosa (admiro tu paciencia y calma o como dice mi padre “que sangre más gorda”), Tino Krell (gracias por presentarme el maravilloso mundo de las proteínas y sobre todo por ese aparato maléfico llamado ITC), Angus (un verdadero placer conocerte y agradecerte todo lo que haces, supongo que cuando te jubiles, ¡que poquito te queda ya “chochete”!, la gente entenderán tu papel tan importante). Marian Llamas (gracias por preocuparte por mí también por escucharme y ofrecerme una charla agradable cuando he acudido a tu puerta tanto para debatir sobre resultados o experimentos como para charla de la vida sobre todo de carnaval).

Ahora a los pequeños sabios, empezare con los que no están, Saray a pesar de tu poco sentido del ritmo y arte, te agradezco todas las charlas y risas que hemos tenidos solo deseo que te dejes flequillo, besos. Marta y Bertal gracias franchutes soy buenas personas y grandes trabajadores. Alejandro gracias por tus consejos y

por abrir las puertas de tu casa y que sepas que te he quitado el sitio espero haber sido digno heredero, Águeda me abriste el camino para empezar esta historia y quiero que sepas que he pasado más miedo preparando geles que tú. Otra persona muy importante es Miriam una de las personas más nobles que he conocido y luchadora, me has ayudado en muchos momentos sobre todo con las conversaciones de tarde y toda tu alegría a pesar de todo lo que has pasado. Allí sólo puedo tener admiración por ti, creo que no sabes cuánto he aprendido de ti estos años que hemos trabajado juntos en radioactividad, eres una verdadera máquina de trabajar, sólo puedo darte las gracias por dejar que sea tu amigo y tener siempre una sonrisa y unas palabras de ánimos para mí. Has sido muy valiente con tus decisiones y, sobre todo he aprendido de ti la capacidad que tienes para ver las cosas que valen la pena en la vida, de verdad GRACIAS. A Víctor gracias por ayudarme sobre todo quitando y poniendo geles en radioactividad, y desearte la mayor suerte en tu nuevo hospital de las islas. También a Zulema, Carlos (que sepas que eres una leyenda en el mundo becario, por conseguir lo que hiciste), Lázaro, José A. Reyes, Diana, Álvaro, Verónica, gracias a todos.

Ahora llegan los que aún están y espero que por mucho tiempo siempre que ellos quieran claro. Oscar quiero darte las gracias por toda la ayuda que me has ofrecido, por ser buena gente, deseo de corazón que todos tus proyectos profesionales emprendidos con tu empresa sean todo lo productivo que desees tanto en lo económico como en lo personal, porque sé que en lo personal tu proyecto de vida irá muy bien porque según mi madre todas las personas buenas terminan siendo felices con los suyos. Ahora Matilla, a pesar de que llegaste más tarde parece que siempre has estado ya que he escuchado hablar de ti lo buen tipo que eres, pero tengo que decir que era una gran mentira porque no eres buen tipo, sino que eres una de las mejores personas que he conocido tienes un corazón enorme y quiero darte las gracias por dejar que sea amigo además de compañero. Es admirable tu dedicación y deseo que toda tu lucha alcance la recompensa que buscas porque te lo mereces y quiero que sepas que tenemos pendiente algunas cervezas y tapitas. Otro es el Becario Joaquín, he de reconocer que al principio ese pijo de los madriles no era una gran presentación, pero yo sabía que escondía una gran persona y lo has demostrado, eres un gran currante y creo que has hecho un gran sacrificio estando sólo tanto tiempo, aunque con un punto de soberbia que es muy importante para triunfar. Gracias por todas las charlas y ayuda, quiero que sepas que siento mucho no haber salido más contigo, pero las obligaciones familiares han podido, pero te apunto con Miguel para cervecita y tapita ¿vale? David, el hombre silencioso, ha sido difícil escuchar tu voz, pero quiero agradecerte toda la ayuda que me has dado y que sepas que te tengo preparado los “tupper de cristal”, gracias. También

agradecer a Cristina y Ana, “las pequeñas obreras de la colmena”, que siempre ha estado para cualquier cosa y deseamos toda la suerte que os merezcáis.

Bajamos una planta para agradecer a Laura su ayuda, aunque también recomendarle que se relaje un poquito que la vida es muy bonita como para no vivirla, animo en el último tramo, a Nene y Silvia gracias. Ahora Jesús agradecerte toda tu ayuda y las conversaciones de muchas cosas siempre se puede aprender de ti, aunque siempre no se tiene razón jajajaja, de verdad gracias. María eres lo que se dice en Cai un “bastinazo de persona”, me alegro mucho de conocerte y te agradezco todo la ayuda y conversaciones que he tenido contigo, y desearte toda la felicidad que buscas, un beso enorme. Gracias a Josemi, el currante eterno, sólo darte las gracias por ayudarme en todo lo que te he preguntado, y estar para cualquier cosa, en lo personal decirte que gente como tu hace que uno piense que hay gente buena, te deseo todo lo bueno que das. También no quiero olvidarme de mis padovines, Oscar, Montse, Evaristo, Paula gracias a todos sois grandes y sólo deseamos que tengáis la oportunidad que os merezcáis en este mundillo. Y ahora mi Alberto, es mi ojito derecho, gracias por ser como eres tienes mi admiración y te deseo que seas feliz con lo que quieras. También Marta, Patri Chica, Ruth que fueron de los primeros un beso enorme, ha sido un placer enseñaros lo poquito que se por qué de vosotros he aprendido mucho y me alegro de vuestras victorias como mías. Si Salvita, el puigdemont del Albaicín, me alegro haberte conocido eres un tío listo y desearte todo lo mejor porque eres buena gente, aunque quiero que sepas que a la Patri no la tienes contenta con tu desorden.

Por su puesto mis compañeras de lucha, Sophy, esa italiana que llevo con cara sonriente y que traía un corazón tan grande y alto como ella, hemos tenido un poco de todo, peleas, abrazos, enfados, etc, en definitiva, una amiga. Quiero que sepas que eres una de las personas más buena que he conocido, y es un placer formar parte de tu vida. También pedirte perdón por no estar más tiempo contigo fuera del laboratorio, pero como ya sabes ahora que tienes familia tus horas no son tuya. Tienes mi admiración completa ya que he visto cómo has llevado tantas cosas para adelante y cuantas horas has dedicado a esto, aunque ahora seas la reina de las apuestas, seguro que ese interés que pones por volver te dará la oportunidad que mereces. Gracias a Gaetano y a esos dos tesoros de niños que tienes que no saben la suerte que tienen de tener a esa madre. Besitos y muchos abrazos y por su puesto quedamos para una gran comilona Italo-gaditana, Gracias. Y ahora Patricia, o mejor dicho la dueña de las llaves de biología molecular, es broma, aunque te reconozco que como buena granaina cuesta que abras las puertas, pero me considero privilegiado por formar parte de esa corte que como reina que eres gobiernas. Eres

una de las personas que nunca se rinde y a pesar de que la PCR se resiste sigues y sigues hasta conseguirlo, he aprendido de ti todo lo que es moverse por un laboratorio, como afrontar los retos de los ensayos, además de tener las cosas en orden para que no me riñas, jajaja. Como persona no sé cómo expresarlo eres una amiga, que siempre ayuda sin pedir nada, que se preocupa y te anima en todo momento que sientes los logros y penas como suyo, una amiga. No sabes cuánto te hoy a echar de menos, con quien tener una charla un ratito por la mañana para hacer el día mejor. Contigo he tenido oportunidad de conocer a Antonio Schuster, al que le agradezco los ratos buenos que hemos pasado tanto en la peña de fútbol como fuera, y gracias por su amistad. También decirle a Antonio y Irene que es un placer jugar con ellos y darle gracias por el cariño mostrado a mis niñas, que sepáis que María os quiere muchos. Otro de las personas que han participado y de una forma muy activa es Lola, y toda su familia. Como dice Mónica ere nuestros pies y nuestras manos, empezamos siendo la seño de la guarda de las niñas y te has convertido en una verdadera amiga, abriendo las puertas de tu casa, Gracias y mil gracias.

Por último, vienen los foráneos como dice mi padre, en primer lugar, me acuerdo de “Los fenómenos” (Krilin, López, Peluca y Manu), creo que ellos no son cociente de la importancia que han tenido, pero se lo orgulloso que están con mis logros, porque una amistad de años se basa en respeto y admiración. Es una alegría llegar a Sanlúcar y escuchar: ¿Qué pasa chupa almeja?, seguido de nos tomamos una cosita acompañado de ¿Quillo qué?, aunque nunca se han enterado de lo que yo hago en el laboratorio, pero sé que están. Agradecer a Kiko y Verónica por todos los ánimos que me han dado y los ratos buenos que hemos pasados. Ahora Miguel y Marí, muchas gracias por todo el cariño que les dais a mis hijas y por estar para todo lo que necesitamos, si no fuera por vosotros dos no sabríamos como cuadrar horas de trabajo y vacaciones. A Miguel gracias por jugar con mis hijas y decirte que siguas siendo un niño con jamás de seguir jugando con ellas, a Marí gracias, a veces pienso que eres una de las personas que mi madre me dejo para saber ella que había alguien que me cuidara. Y a Conchita la bisabuela, persona admirable y luchadora, siendo un ejemplo de vida.

También a mi familia, Tete, Titi y a Manuel agradeceros todo vuestro apoyo, principalmente a Manuel mi padre, contigo he aprendido muchas cosas sobre todo el respecto a los demás, aprovecho para pedirte perdón por no están siempre que necesitas, y aunque siempre no estamos de acuerdo tu opinión es muy importante para mí y siempre me acuerdo de ti. A veces me pregunto ¿qué diría Manue?, porque otra de las cosas que de ti he heredado es el sentido del humor y el gusto por compartir las cosas, gracias. Ahora a la mujer que siempre esta Mercedes, no te

imaginas las veces que vienes a mi mente, te hecho mucho de menos a pesar de que ya son muchos años, y en toda esta aventura has estado presente ya que siempre has sido ejemplo de lucha y me has servido de apoyo para no tirar la toalla, gracias a mi madre. Cuando empecé a escribir los agradecimientos no sabía cómo escribir esta parte y como darte la gracias a ti Mónica, eres la mejor persona que he conocido nunca y la que ha realizado esta tesis, porque has estado en todo momento escuchando, animándome, riñéndome cuando quería tirar la toalla. Son muchas las horas, días y meses que tú te has quitado para dármelo a mí para poder hacer este trabajo, y la que cada mañana me dice: venga que tu puede acompañando de un beso y un abrazo, de ti aprendo cada día, Te quiero. Gracias por traerme a esas dos personitas María y Manuela, que son las verdaderas sufridoras de toda esta tesis, ellas son las que ha sufrido ausencia y los días malos, pero no sabrán nunca que ellas han sido el motor que ha permitido que todo esto llegue a este fin, porque son muchas veces las que por ellas he seguido luchado. Agradecerles todo el cariño que me dan cuando llego a casa y me reciben con besos y abrazos.

Contenido

Contenido

	Pag.
Figure index	I
Table index	IV
List of abbreviations	V
Resumen	IX
Summary	XII
1. INTRODUCCIÓN GENERAL	39
1.1. Aromáticos en la naturaleza	39
1.2. Degradación aerobia de compuestos aromáticos	42
1.3. Degradación anaerobia de compuestos aromáticos	43
1.4. Degradación anaerobia de compuestos aromáticos hidroxilados	49
1.5. Degradación anaerobia de aromáticos dihidroxilados en bacterias desnitrificantes. 51	
1.5.1. Degradación anaerobia de resorcinol en <i>A. anaerobius</i>	51
1.5.2. Degradación anaerobia de α -resorcilato (3,5-dihidroxibenzoato, 3,5-DHB) por <i>T. aromatica</i> AR-1.	54
1.5.3. Homologías y diferencias entre las rutas de degradación de resorcinol y α -resorcilato en bacterias desnitrificantes	57
1.6. Regulación de la expresión génica en las rutas de degradación anaerobia de compuestos aromáticos.	59
1.6.1. Elementos reguladores de la expresión génica.....	59
1.6.2. Regulación específica dependiente de efector.....	61
1.6.3. Regulación global	64
1.6.3.1. Regulación mediada por presencia de oxígeno	64
1.6.3.2. Regulación por sustratos alternativos (represión catabólica).....	66
1.7. Reguladores transcripcionales de la familia de LysR.....	68
1.7.1 Estudios estructurales de LTTRs.....	69
1.7.2 Mecanismos de acción de LTTR.....	70
1.8. Reguladores transcripcionales de la familia de NtrC (bEBPs).....	73
1.8.1. La ARN polimerasa dependiente de σ^{54}	74
1.8.2. bEBPs, activadoras de promotores dependientes de σ^{54}	74
1.8.3. Mecanismo de activación de los promotores dependientes de σ^{54}	80
2. OBJETIVOS	83
3. MATERIALS AND METHODS	93
3.1. Materials and methods for chapter 4.1	93
3.2. Materials and methods for chapter 4.2	104
3.3. Materials and methods for chapter 4.3	113
4 RESULTS AND DISCUSSION	121
Chapter 4.1. <i>Azoarcus anaerobius</i> 1,3-dihydroxybenzene (resorcinol) anaerobic degradation pathway is controlled by the coordinated activity of two bacterial enhancer-binding proteins	123
4.1.1 Abstract	125
4.1.2 Background	127
4.1.3 Results.....	129
4.1.3.1. Transcriptional organization of the resorcinol degradation gene cluster. .	129

4.1.3.2 Two σ^{54} -dependent regulators are required for maximal pathway expression.....	133
4.1.3.3 Resorcinol must be metabolized to activate the pathway.....	138
4.1.3.4. RedR1 and RedR2 interact to activate transcription.....	139
4.1.4. Discussion	141
4.1.5. Supplementary material. Supplementary figure S1	146
Chapter 4.2. Two 97% identical bacterial enhancer-binding proteins (bEBP) that interact to induce <i>Azoarcus anaerobius</i> 1,3-dihydroxybenzene (resorcinol) anaerobic degradation pathway are controlled by different activation mechanisms.....	147
4.2.1. Abstract	149
4.2.2. Background.....	151
4.2.3. Results	153
4.2.3.1. Only RedR1-RedR2 hetero-oligomers are stable <i>in vitro</i>	153
4.2.3.2. RedR1 and RedR2 are controlled through different mechanisms.	154
4.2.3.3. Promoter activity is effector-independent (constitutive) in a <i>btsS</i> background.....	157
4.2.3.4. BtdS controls RedR2 activity through sequestration of the regulator to the membrane.....	158
4.2.4. Discussion	162
Chapter 4.3. DbdR, a new member of the lysr family of transcriptional regulators, coordinately controls four promoters in the <i>Thauera aromatica</i> AR-1 3,5-dihydroxybenzoate anaerobic degradation pathway.....	169
4.3.1. Abstract	171
4.3.2. Background.....	173
4.3.3. Results	175
4.3.3.1. Three promoters drive expression of the 3,5-DHB anaerobic degradation pathway in <i>T. aromatica</i> AR-1.....	175
4.3.3.2. DbdR controls expression of the pathway promoters.....	176
4.3.3.3. The substrate must be transformed to activate DbdR.....	178
4.3.3.4. DbdR is a tetramer in solution.....	180
4.3.3.5. DbdR binding to its target promoters.	182
4.3.3.6. DbdR positively controls its own expression.	184
4.3.4. Discussion	186
5. DISCUSIÓN GENERAL	193
5.1 <i>Azoarcus anaerobius</i> : RedR1 y RedR2 controlan la expresión de los promotores de la ruta de degradación de resorcinol.	194
5.2 <i>Thauera aromatica</i> AR-1: identificación de DbdR como regulador transcripcional específico.....	202
5.2.1 Identificación del efector de la ruta.....	203
5.2.2 Unión específica de DbdR a todos sus promotores diana, regulación positiva.....	205
6. CONCLUSIONES	209
7. REFERENCIAS	213

Figure index

INTRODUCCIÓN GENERAL

Figura 1.1. Esquema de uso de los compuestos aromáticos por microorganismos	41
Figura 1.2. Reacciones iniciales en las cinco vías de diferentes bacterianas para la degradación aeróbica de tolueno, en las cepas. <i>P. putida</i> F1 (PpF1)	42
Figura 1.3. Rutas anaerobias de degradación de benzoato en <i>Thauera aromatica</i> y <i>Rhodospseudomonas palustris</i>	46
Figura 1.4. Organización génica de la ruta de degradación anaerobia del benzoato en α , β y δ -proteobacterias	48
Figura 1.5. Ruta de degradación de resorcinol por <i>Azoarcus anaerobius</i>	53
Figura 1.6. La ruta de degradación de 3,5DHB por la cepa <i>T. aromatica</i> AR-1 y la vía de degradación de resorcinol por <i>A. anaerobius</i>	55
Figura 1.7. Función propuesta de los productos de la agrupación génica de degradación de 3,5DHB en la cepa <i>T. aromatica</i> AR-1	56
Figura 1.8. Organización de la secuencia de <i>T. aromatica</i> AR-1 y <i>A. anaerobius</i> para la degradación de aromáticos dihidroxilados	58
Figura 1.9. Flujo de señales a través de redes reguladoras típicas	60
Figura 1.10. Arquitectura modular de la proteína BzdR	63
Figura 1.11. Esquema del mecanismo de acción del sistema FixLJ-FixK en respuesta a la concentración de oxígeno en <i>R. palustris</i>	66
Figura 1.12. Modelo de estructura de los dominios en los reguladores LTTR	70
Figura 1.13. Arquitectura de dominios de los cinco grupos de bEBPs	75
Figura 1.14. Esquema del dominio central (AAA+) de las bEBPs	77
Figura 1.15. Diagrama de la estructura del cristal de un dímero del dominio de unión a ADN de NtrC4 de <i>Aquifex aeolicus</i>	77
Figura 1.16. Esquema del inicio de la transcripción por ARN-polimerasa con σ^{54} mediado por bEBPs	81

RESULTS AND DISCUSSION

4.1. *Azoarcus anaerobius* 1,3-dihydroxybenzene (resorcinol) anaerobic degradation pathway is controlled by the coordinated activity of two enhancer-binding proteins.

Figure 4.1.1. *Azoarcus anaerobius*, resorcinol anaerobic degradation pathway and gene cluster 127

Figure 4.1.2. Transcriptional organization of *A. anaerobius* resorcinol degradation gene cluster 129

Figure 4.1.3. Mapping of the transcription initiation site of the three pathway operons 131

Figure 4.1.4. Alignment of P_{rehL} , P_{orf14} and P_{bqdhL} promoters 132

Figure 4.1.5. Mapping of the transcription initiation site of *redR2* and *orf10* 132

Figure 4.1.6. Homologies and differences between RedR1 and RedR2 134

Figure 4.1.7. Growth of *A. anaerobius* and *Azoarcus* sp. CIB with wild-type pR^+ plasmid and *redR* mutant derivatives 135

Figure 4.1.8. Activity of P_{bqdhL} , P_{orf14} , and P_{rehL} promoters in the presence and absence of *redR1* and *redR2* 136

Figure 4.1.9. Activity of P_{bqdhL} , P_{orf14} , and P_{rehL} promoters in mutants of the three first pathway reactions 139

Figure 4.1.10. Binding-interaction between RedR1 and RedR2 proteins and truncated derivatives 140

Figure 4.1.11. Model structure of the HTH motif of the DNA binding domain of RedR1 and RedR2 141

Figure S4.1. Alignment of RedR1 and RedR2 sequences showing the conserved domains and functionally relevant regions 146

4.2. Two 97% identical bacterial enhancer-binding proteins (bEBP) that interact to induce *Azoarcus anaerobius* 1,3-dihydroxybenzene (resorcinol) anaerobic degradation pathway are controlled by different activation mechanisms

Figure 4.2.1. Homologies and differences between RedR1 and RedR2 152

Figure 4.2.2. Interaction of RedR1 and RedR2 detected by column-binding analysis 155

Figure 4.2.3. Primer extension analysis of Porf14 in a btdS background	157
Figure 4.2.4. BtdS membrane topology prediction	159
Figure 4.2.5. Interaction of BtdS with RedR proteins detected by column-binding analysis	160
Figure 4.2.6. Binding of BtdS to RedR proteins and truncated derivatives	161
Figure 4.2.7. Homology models of AAA+ and GAF domains fitted into an electron microscopy density model of NorR bound to its UAS	164

4.3 DbdR, a new member of the LysR family of transcriptional regulators, coordinately controls four promoters in the *Thauera aromatica* AR-1 3,5-dihydroxybenzoate anaerobic degradation pathway

Figure 4.3.1. <i>T. aromatica</i> AR-1 3,5-DHB anaerobic degradation pathway and gene cluster	173
Figure 4.3.2. Mapping of the transcription initiation site of the three pathway operons	176
Figure 4.3.3. Complementation of <i>T. aromatica</i> AR-1 <i>dbdR</i> mutant with <i>dbdR</i> wild-type gene	177
Figure 4.3.4. Expression of the three pathway promoters in wild-type and <i>dbdR</i> mutant backgrounds	178
Figure 4.3.5. Identification of DbdR effector molecule. Activity of P_{dbhL} (A), P_{orf18} (B) and P_{orf20} (C) in mutants of the three first pathway reactions	179
Figure 4.3.6. Alignment of <i>T. aromatica</i> AR-1 DbdR protein with its closest crystalized relatives TsaR (<i>Comamonas testosteroni</i>) and CnbR (<i>Cupriavidus necator</i>)	181
Figure 4.3.7. Gel filtration of DbdR protein (red spot) in an FPLC Superdex 200 HR 10/300GL column	182
Figure 4.3.8. Typical elution profile in a heparine affinity column of <i>E. coli</i> MC4100 extracts bearing or not the <i>dbdR</i> gene in plasmid pBBRMCS-5	183
Figure 4.3.9. Binding of DbdR to P_{dbhL} (A), P_{orf18} (B) and P_{orf20} (C) promote	184
Figure 4.3.10. Characterization of P_{dbdR} promoter	185

5. Discussion General

Figura 5.1. Modelo de regulación de la ruta de degradación de resorcinol en <i>A. anaerobius</i>	199
--	-----

Table index

INTRODUCCIÓN GENERAL

Tabla 1.1. Algunos cultivos puros y de enriquecimiento utilizados para estudiar la degradación anaerobia de aromáticos en NRB, SRB, bacterias fermentadoras o sintróficas	45
---	----

MATERIALS AND METHODS

Table 3.1.1 Bacterial strains and plasmids used in Chapter 4.1	100
Table 3.1.2 Oligonucleotide primers used in Chapter 4.1	102
Table 3.1.3 Primers used in the RT-PCR assays described in Figure 4.1.1	103
Table 3.2.1 Bacterial strains and plasmids used in Chapter 4.2	110
Table 3.2.2 Oligonucleotide primers used in Chapter 4.2	112
Table 3.3.1 Bacterial strains and plasmids used in Chapter 4.3	119
Table 3.3.2 Oligonucleotide primers used in Chapter 4.3	120

RESULTS AND DISCUSSION

4.1. *Azoarcus anaerobius* 1,3-dihydroxybenzene (resorcinol) anaerobic degradation pathway is controlled by the coordinated activity of two enhancer-binding proteins.

Table 4.1.1 Activity of P_{rehL} , P_{bqdL} and P_{orf14} promoters in different <i>Azoarcus</i> CIB backgrounds	137
--	-----

4.2. Two 97% identical bacterial enhancer-binding proteins (bEBP) that interact to induce *Azoarcus anaerobius* 1,3-dihydroxybenzene (resorcinol) anaerobic degradation pathway are controlled by different activation mechanisms.

Table 4.2.1. β -galactosidase activity from P_{orf14} with different versions of RedR proteins in different <i>E. coli</i> strains	156
Table 4.2.2. β -galactosidase activity from P_{orf14} in different genetic backgrounds in <i>Azoarcus</i> sp. CIB (pR ⁺)	158

List of Abbreviations

2,3,5-THB	Trihidroxibenzoato
3,5-DHB	3,5-dihidroxibenzoato, α -resorcilato
BATCH	Bacterial adenylate cyclase two-hybrid
BCR	Benzoil-CoA reductasa
bEBP	bacterial <i>Enhancer binding protein</i>
CoA	Coenzima A
c-di-GMP	3',5'-Cyclic diguanylic acid
CTD	C-terminal Ddomain
DMSO	Dimetil sulfóxido
GAF	Domain: cGMP- phosphodiesterases, adenylyl cyclases and FhlA
HBQ	Hidroxibenzoquinona
HHQ	Hidroxihidroquinona
HTH	<i>Helix-turn-helix</i>
wHTH	<i>winged Helix-turn-helix</i>
IBC	<i>Inducer binding cavity</i>
IHF	<i>Integration Host Factor</i>
IPTG	1-isopropil- β -D-1 galactopiranósido
ITC	Isothermal titration calorimetry
kDa	Kilo Dalton
NADH	Nicotin adenin dinucleótido
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NRB	Bacteria nitrato reductora
NTD	N-terminal domain
ORF	<i>open reading frame</i>
PAHs	Polycyclic aromatic hydrocarbons
PAS	Domain: Per-Arnt-Sim

PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction
RBS	Ribosome binding site
RT-PCR	Reverse transcription polymeras chain reaction
SRB	Bacteria sulfato reductora
TF	Factor de transcripción
TRAP	Tripartite ATP-independent periplasmic transporter
TRP	Tiamine pirofosfato
UAS	<i>Upstream activating sequence</i>
WMM	Widdel mineral medium

Resumen/Summary

RESUMEN

Los compuestos aromáticos son unos de los compuestos mayoritarios en la naturaleza, donde la lignina, triptófano, quinonas, flavonoides y otros compuestos con origen natural están presentes en el medio formando parte de las estructuras biológicas o como cofactores en las diferentes reacciones enzimáticas. Por otro lado, las características de los compuestos aromáticos han propiciado su uso industrial en distintos campos, generándose incluso nuevos compuestos de carácter xenóbiotico. Estos han entrado en el ambiente por su uso muy frecuente o a consecuencia de vertidos accidentales, presentando una persistencia muy alta en el medio. En muchos casos este compuesto presenta una alta toxicidad con alto riesgos para la salud humana, generando gran preocupación en los distintos gobiernos. Sin embargo, su disponibilidad como sustrato para servir de fuente de crecimiento para los microorganismos ha permitido que estos hayan desarrollado sistemas o mecanismos para su uso eficiente gracias a la plasticidad génica y a la promiscuidad funcional de muchas de las enzimas que participan en las rutas de degradación. Desde hace varias décadas el estudio de la mineralización de compuestos aromáticos se ha centrado en a bacterias aerobias. Sin embargo, la gran mayoría de los ambientes contaminados por aromáticos presentan condiciones de anoxia total o parcial. Por tanto, es importante estudiar la degradación de estos compuestos en condiciones anaerobias. Nuestro trabajo se ha centrado en el estudio de la degradación anaerobia de dos compuestos monoaromáticos dihidroxilados, resorcinol y 3,5-dihidroxibenzoato (3,5-DHB), en bacterias desnitrificantes.

En esta tesis se ha estudiado la única vía descrita actualmente que emplea una oxidación independiente de oxígeno para el ataque del anillo aromático hidroxilado en condiciones de anaerobias. Las dos rutas analizadas se encuentran en *Azoarcus anaerobius* y *Thauera aromatica* AR-1, dos bacterias desnitrificantes (NRB) que degradan resorcinol y 3,5-DHB, respectivamente. Estas cepas presentan la capacidad de utilizar estos compuestos como única fuente de carbono. *A. anaerobius* es una bacteria anaerobia estricta, mientras que *T. aromatica* AR-1 es anaerobia facultativa. Al inicio de esta tesis se conocían las bases bioquímicas y se había definido la agrupación de genes que codifican los distintos pasos de la ruta en cada organismo. Así mismo se habían señalado posibles reguladores de las rutas. Aunque existe una gran similitud entre los principales genes de la ruta de ambas agrupaciones génicas, se han identificado varias diferencias relevantes entre ellas: i) presencia de un sistema de transporte de tipo TRAP en *T. aromática* y ausencia de sistema de transporte específico en *A. anaerobius*. ii) distintos reguladores transcripcionales en cada ruta: RedR1 y RedR2, pertenecientes a la familia NtrC, también conocidos como proteínas

de unión a potenciadores bacterianos (bEBP), en *A. anaerobius*, y DbdR, perteneciente a la familia de reguladores de tipo LysR (LTTR), en *T. aromatica*. Con este punto de partida, el objetivo de esta tesis se centró en analizar los mecanismos de regulación de ambas rutas.

En los capítulos 1 y 2 estudiamos la regulación de la degradación anaerobia de resorcinol en *Azoarcus anaerobius*. En primer lugar, definimos la organización transcripcional de los genes de la ruta mediante análisis de RT-PCR. Establecimos la existencia de cinco operones, tres de los cuales son inducibles por sustrato y codifican las principales enzimas de la ruta. Mediante extensión a partir de cebador establecimos que los 3 promotores presentaban una estructura típica de promotores dependiente de σ^{54} , y que su máxima actividad estaba mediada por la acción coordinada de los reguladores RedR1 y RedR2, aunque RedR2 parece tener un papel más relevante en la expresión; de hecho, la expresión de RedR1 depende de RedR2. Ambas proteínas tienen una identidad del 97% entre sí y las diferencias están localizadas en los extremos N-terminal (NTD) y C-terminal (CTD). Por homología con DhaR, otro regulador de la misma familia, en el extremo N-terminal se identifican dos dominios en tandem GAF-PAS. En el extremo C-terminal se definió el dominio HTH de reconocimiento del ADN, identificándose las distintas hélices que forman este dominio, con algunas diferencias entre RedR1 y RedR2 que podrían explicar por qué presentan mecanismos de activación diferentes. Efectivamente, sugerimos que RedR1 responde a un mecanismo clásico de activación negativo mediada por el dominio N-terminal, frente al mecanismo de RedR2, que definimos como un activador constitutivo reprimido por interacción directa con BtdS, una proteína de membrana perteneciente al complejo enzimático de BtdLS, que lleva a cabo la transformación de hidroxihidroquinona (HHQ) hasta hidroxihidrobenzoquinona (HBQ) y que en ausencia de sustrato secuestra a RedR2 en la membrana. Esta interacción ocurre a través de la cola N-terminal de RedR2 y no ocurre con RedR1. Pudimos establecer mediante ensayos de doble híbridos la interacción física entre ambos reguladores a través del dominio central, necesario para el ensamblaje a heterohexámero, que sería su forma activa más eficiente para alcanzar la máxima activación de los promotores. En solución no se detecta interacción de los reguladores consigo mismo. Sin embargo, sugerimos que RedR2 sí puede formar homodímeros si su dominio de unión a ADN está contactando con sus secuencias diana (UASs), lo que estabilizaría la formación de homohexámeros activos. Igualmente proponemos que la formación del homo-dímero de RedR1 está reprimida por NTD, y que en ausencia de este también requiere de la unión a sus UASs.

Para identificar el efector de la ruta realizamos unas primeras aproximaciones mediante calorimetría de titulación isotérmica (ITC) de ambas proteínas con posibles efectores, sin éxito. Utilizando una aproximación genética con los mutantes de los principales pasos de la ruta se estableció la necesidad de la transformación de resorcinol hasta HBQ para la activación de los promotores. El conjunto de nuestros resultados nos ha permitido proponer un modelo de regulación de la ruta de degradación en *A. anaerobius*, que implica mecanismos de control de las proteínas reguladoras muy novedosos.

En el capítulo 3 estudiamos los mecanismos de regulación de la ruta de degradación de 3,5-DHB en *T. aromatica* AR-1. Hemos establecido que DbdR es el regulador específico de la ruta, y en su secuencia identificamos los dominios característicos de esta familia LTTR. Hemos establecido que su estado nativo en solución es un tetrámero. Los promotores principales de la ruta identificados mediante extensión a partir de cebador presentan elementos altamente conservados, identificándose los posibles sitios RBS (sitio de unión regulatorio) y ABS (sitio de unión de activación) típicos de reguladores de la familia. Mediante ensayos de retardo en gel (EMSA) con extractos donde se había sobreexpresado DbdR se determinó la unión de la proteína a las regiones promotoras de los operones para los principales pasos de la ruta. No se pudo identificar el efector de la ruta mediante ITC, pero mediante una aproximación genética hemos identificado dos posibles candidatos a ser el efector que activa DbdR: la HHQ y 2,3,5-trihidroxibenzoato (2,3,5-THB), ambos intermediarios de la ruta. Por tanto es necesaria la transformación del 3,5-DHB a 2,3,5-THB para la activación. Hemos establecido que DbdR activa a varios promotores de la ruta a la vez y controla positivamente su propio promotor. Esto es algo poco descrito en los miembros de esta familia de reguladores, que suelen presentar regulación negativa de su propio promotor, y suelen activar al promotor del gen divergente al suyo. Estos son los primeros datos obtenidos sobre el mecanismo de acción de este regulador.

SUMMARY

In this thesis we have studied the only way described actuality that uses an oxygen-independent oxidation for the attack of the hydroxylated aromatic ring in anoxic conditions. The two routes analyzed are found in *Azoarcus anaerobius* and *Thauera aromatica* AR-1, two denitrifying bacteria that degrade resorcinol and 3,5-DHB, respectively. These strains present the ability to use these compounds as the sole carbon source. *A. anaerobius* is a strict anaerobic bacterium, whereas *T. aromatica* AR-1 is facultative anaerobic. At the beginning of this thesis the biochemical bases for the anaerobic degradation of these compounds were known and the clustering of the genes coding the different steps of the pathway in each organism had been defined, possible regulators of the routes pathway. Although there is a great similarity between the main genes of both gene clusters, two main differences were pointed: i) While in *T. aromatic* there was a transport system for the aromatic no specific transport system was present in *A. anaerobius*. ii) Two NtrC family regulators (bacterial enhancer binding proteins (bEBPs)) RedR1 and RedR2 were present in *A. anaerobius* cluster, while a LysR family regulator (LTTR) was present in *T. aromatica*.

In chapters 1 and 2 we have analyzed the regulatory mechanisms of the degradation of resorcinol pathway in *A. anaerobius* and we have shown that the route is organized into five transcriptional units, four of which are inducible by the presence of the substrate. Three σ^{54} -dependent promoters located upstream from the three operons coding for the main pathway enzymes were identified, which shared a similar structure with conserved upstream activating sequences (UASs) located at 103 to 111 bp from the transcription start site. Expression of the pathway is controlled by the bEBPs RedR1 and RedR2, two highly homologous regulators which, despite their high sequence identity (97%), have non-redundant functions: RedR2, the master regulator which also controls RedR1 expression, is itself able to promote transcription from two of the promoters, whilst RedR1 activity is strictly dependent on the presence of RedR2. The two regulators were shown to interact with each other, suggesting that the natural mode of activation is by forming heterodimers, which become active in the presence of the substrate after its metabolization to hydroxybenzoquinone through the pathway enzymes. The model structure of the N-terminal domain of the proteins, composed of tandem GAF and PAS motifs, suggests a control mechanism which also involves direct interaction with additional proteins.

Another feature of the RedR1 and RedR2 regulators is that they present different control mechanisms, despite the high sequence identity between them: while RedR1 responds to classical negative regulation mediated by its NTD, the activity of RedR2 is constitutive and controlled through the interaction with BtdS, an integral membrane subunit of the hydroxyhydroquinone dehydrogenase that sequesters the regulator to the membrane. No self-interaction of either bEBP could be detected in column-binding assays, as was suggested with the two-hybrid assays. This contradicts the fact that an NTD-truncated version of RedR1 and also full-length RedR2 were capable of promoter activation on their own, which implies that they were able to assemble into homo-hexamers. We suggest the promoter DNA sequence is necessary to stabilize *in vivo* the homodimers of the active forms of the two regulators. We have also shown the N-terminal end of RedR2, which has a different sequence to RedR1 in the N-terminal tail, probably interacts with one of the cytoplasmic loops predicted in BtdS model.

In the case of the regulation of *T. aromatica* AR-1 the dbdR gene that encodes a LysR-type transcriptional regulator (LTTR) that is present at the most advanced end of the group is required for anaerobic growth in 3,5-DHB and for the expression of the operons of the main route. A model structure of DbdR showed conserved key residues for effector binding with its closest relative TsaR for p-toluensulfonate degradation. We found that DbdR controlled expression of three promoters located upstream from the operons coding for the three main steps of the pathway. Whilst one of them (P_{orf20}) was only active in the presence of 3,5-DHB, the other two (P_{dbhL} and P_{orf18}) showed moderate basal levels that were further induced in the presence of the pathway substrate, which needed be converted to hydroxyhydroquinone (HHQ) to activate transcription. Both basal and induced activities were strictly dependent on DbdR, which was also required for transcription from its own promoter. DbdR basal expression was moderately high and increased two-fold in response to the presence of the effector. DbdR was found to be a tetramer in solution, producing a single retardation complex in binding assays with the three enzymatic promoters, consistent with its tetrameric structure. The three promoters had a conserved organization with clear putative regulatory and activating binding sites positioned at the canonical distance from the transcription start site. In contrast, two protein-DNA complexes were observed for the PdbdR promoter, which also showed significant sequence differences with the three other promoters. Altogether our results show that a single LTTR coordinately controls expression of the entire 3,5-DHB anaerobic degradation pathway in *T. aromatica* AR-1, allowing a fast and optimized response to the presence of the aromatic.

1 Introducción General

1. Introducción general

1.1. Aromáticos en la naturaleza

Los compuestos aromáticos constituyen el segundo tipo de sustancias orgánicas más abundante en la naturaleza. La principal fuente natural de aromáticos es la lignina, un polímero complejo de la pared celular vegetal constituido por compuestos aromáticos altamente estable en el medio ambiente (Lebo *et al.*, 2000; Fuchs *et al.*, 2011). Otras fuentes naturales de compuestos aromáticos son los aminoácidos como el triptófano, fenilalanina y tiroxina, que presentan anillos aromáticos; también las quinonas y los flavonoides presentes en las membranas que actúan en la transferencia de electrones. De origen natural son también otros compuestos fenólicos y taninos, coenzimas aromáticas que participan en muchas reacciones enzimáticas, además de todos los constituyentes aromáticos presentes en los combustibles fósiles. La elevada estabilidad termodinámica del anillo bencénico ha permitido su uso en muchos campos de la industria química (disolventes, polímeros artificiales), farmacéutica (antibióticos, etc.), industria del papel (compuestos orgánicos clorados), hasta el sector agrario con la liberación de gran cantidad de fertilizantes, pesticidas y herbicidas así como la explotación de muchos compuestos naturales cuya estructura incluye un anillo aromático (resinas, pigmentos, etc.) (Dua *et al.*, 2002; Rieger *et al.*, 2002; Díaz, 2004; Abu Laban *et al.*, 2009). Esto ha tenido consecuencias negativas ya que en los últimos dos siglos se ha producido una liberación continua de compuestos aromáticos a la biosfera como consecuencia de la actividad industrial de distinta naturaleza. Muchos de estos compuestos son xenobióticos con una alta persistencia en el medio ambiente, siendo una de las grandes preocupaciones de las distintas Agencias Medioambientales. Muchos de estos compuestos presentan además una alta toxicidad para la salud humana y muchos de ellos son potencialmente cancerígenos, por lo que han sido clasificados como peligrosos para la salud y el medio ambiente por el Comunidad Europea (Pedersen & Falck, 1997). Además, hay que tener en cuenta la liberación natural y accidental de compuestos fósiles (carbón y petróleo) en la naturaleza.

Esta abundancia y amplia distribución de los compuestos aromáticos los convierte en un importante sustrato de crecimiento para muchos organismos (Boll *et al.*, 2002). Tanto animales como plantas son capaces de modificar la estructura del anillo bencénico e incluso de degradar algunos compuestos aromáticos, pero son los microorganismos los que con su enorme diversidad han evolucionado una amplia y versátil capacidad para degradar compuestos aromáticos (naturales y xenobióticos) debido a su plasticidad génica y a la promiscuidad funcional de muchas de las

enzimas que participan en las rutas de degradación, permitiendo su adaptación al catabolismo de una gran variedad de compuestos con estructura aromática (McLeod & Eltis, 2008). En consecuencia, son los microorganismos los que prácticamente llevan a cabo la mineralización de estos compuestos en la naturaleza, especialmente hongos y bacterias que son capaces de degradar incluso grandes polímeros como la lignina en presencia de oxígeno molecular. Los compuestos aromáticos de bajo peso molecular pueden ser usados como sustrato para el crecimiento tanto en condiciones aerobias como anaerobias (Heider & Fuchs, 1997).

Desde hace varias décadas se están estudiando las rutas catabólicas de compuestos aromáticos presentes en los microorganismos con dos claros objetivos: por un lado, responder a la necesidad de aportar nuevos conocimientos y por otro ser utilizados como una herramienta fundamental para aumentar la capacidad de respuesta de las bacterias a contaminación en el medio ambiente y ser utilizadas para la recuperación de zonas contaminadas con este tipo de compuestos. Actualmente las estrategias para la recuperación de sitios contaminados están basadas en el uso de microorganismos autóctonos de las zonas contaminadas, buscando mecanismos para favorecer su crecimiento y su actividad (bioestimulación), o inoculando microorganismos autóctonos previamente seleccionados y enriquecidos (bioaumentación) (El Fantroussi & Agathos, 2005). Hasta hace poco, la gran mayoría de las estrategias de remediación se basaban en el uso de procesos aerobios llevados a cabo por bacterias aerobias, donde el oxígeno molecular no sólo es el aceptor terminal de electrones para la respiración, sino también el sustrato para la activación del anillo aromático (Harayama *et al.*, 1992). Sin embargo, con frecuencia los sitios contaminados se acaban volviendo anaerobios una vez que el metabolismo aerobio de los contaminantes ha consumido el oxígeno disponible. Igualmente, muchas zonas contaminadas, como los sedimentos, suelos anegados, etc., se encuentran en condiciones permanentes de anoxia. En estos ambientes los procesos más activos son esencialmente anaerobios y la degradación de los compuestos aromáticos ocurre tanto en condiciones de anaerobiosis estricta como en microaerofilia. Por tanto, para degradar compuestos aromáticos, los microorganismos emplean dos estrategias en función de la presencia o ausencia de oxígeno en el medio. El catabolismo aerobio, que ha sido profusamente estudiado en los últimos 60 años, lo llevan a cabo una gran diversidad filogenética de microorganismos (McLeod & Eltis, 2008). Sin embargo, sobre el catabolismo anaerobio existen muchos menos estudios. En condiciones de anaerobiosis los microorganismos utilizan aceptores de electrones alternativos al oxígeno, como nitrato (bacterias nitratorreductoras, incluyendo las desnitrificantes, NRB), sulfato (bacterias sulfatorreductoras, SRB), Fe(III) (bacterias

reductoras de ión férrico), CO₂ (metanógenas) u otros aceptores (clorato, Mn, Cr, U, etc.) (Díaz, 2004).

El uso de aceptores de electrones diferentes al oxígeno en un determinado ambiente va a depender de su disponibilidad y de la competencia entre los mismos microorganismos con los diferentes tipos de respiración. En términos de rentabilidad energética, la degradación utilizando nitrato y Fe (III) como aceptor final de electrones es prácticamente tan rentable como el uso de oxígeno. Sin embargo, las otras formas de respiración, como la que llevan a cabo las bacterias sulfatorreductoras y metanógenas, son menos eficientes. Para los organismos fermentadores, la degradación es rentable siempre que estén presentes bacterias metanógenas o SRB que utilicen los productos finales generados por ellos. Por último, las bacterias fotosintéticas obtienen la energía de la luz y degradan compuestos aromáticos anaeróbicamente hasta formar metabolitos intermediarios como acetyl-CoA, que es utilizado posteriormente en reacciones biosintéticas (Gibson & Harwood, 2002; Díaz, 2004). Por tanto existen muchas estrategias de degradación, que van a depender de la disponibilidad de oxígeno y de la utilización de aceptores de electrones alternativos en la respiración (Fig. 1.1).

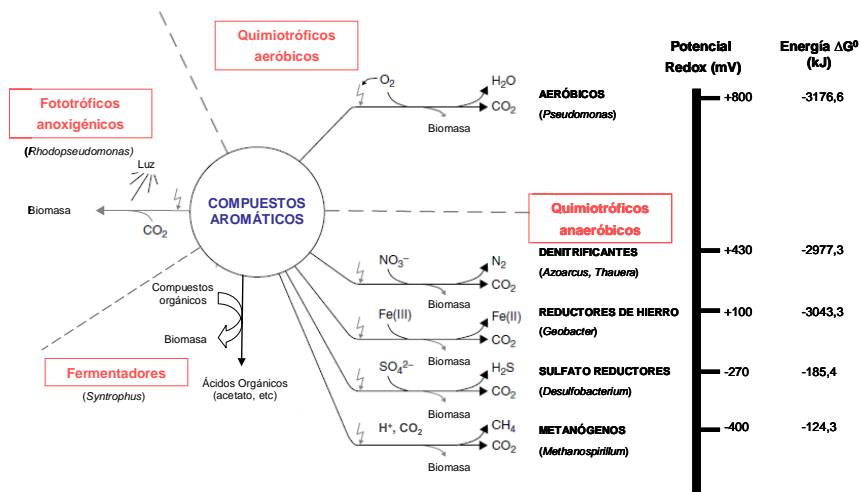


Figura 1.1. Esquema de uso de los compuestos aromáticos por microorganismos. A la derecha, el valor energético de la degradación con los distintos tipos de respiración (aerobia y anaerobia) utilizando como compuesto modelo el benzoato. La metanogénesis necesita una reacción de fermentación acoplada. Los géneros bacterianos representativos de cada tipo de metabolismo están entre paréntesis. Los distintos tipos de microorganismos en base a su respiración se presentan en recuadros en color rojo (Widdel & Rabus, 2001; Díaz, 2004).

1.2. Degradación aerobia de compuestos aromáticos

Como hemos dicho, en el catabolismo aerobio de compuestos aromáticos el oxígeno no sólo es el aceptor final de electrones en la respiración, sino que también actúa como cosustrato en algunas etapas importantes. El oxígeno es imprescindible para procesos como la hidroxilación y posterior ruptura del anillo aromático por parte de las enzimas de las rutas (Parales & Resnick, 2006; Vaillancourt *et al.*, 2006). La estrategia más utilizada es la desestabilización de la molécula mediante rutas periféricas que incorporan grupos hidroxilos en el anillo. Una vez hidroxilado, el compuesto aromático es sustrato de oxigenasas que catalizan la ruptura del anillo mediante adición de oxígeno molecular, generando un compuesto alifático que sufrirá oxidaciones progresivas hasta terminar incorporándose al ciclo de Krebs (Hayaishi, 1994). Un gran número de sustratos aromáticos son canalizados a través de rutas periféricas para dar lugar a un número limitado de intermediarios centrales dihidroxilados. Otra de las características frecuentes de la degradación de compuestos aromáticos es que un mismo compuesto puede degradarse a través de distintas rutas catabólicas, como es el caso para el tolueno (Fig. 1.2).

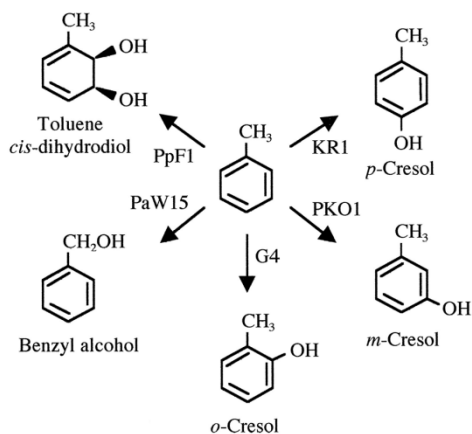


Figura 1.2. Reacciones iniciales en las cinco vías de diferentes bacterianas para la degradación aerobia de tolueno. *Pseudomonas. putida* F1(PpF1) utiliza una ruta que se inicia por una dioxigenasa del anillo, *P. putida* PaW15, porta el plásmido TOL y oxida el grupo metilo de tolueno. *Burkholderia cepacia* G4, *Rastonia pickettii* PKO1 y *P. mendocina* KR1, inician la degradación del tolueno con tolueno 2-, 3- y 4-monooxigenasas, respectivamente (Tomado de Parales *et al.* 2000).

Las oxigenasas que incorporan los grupos hidroxilo al anillo bencénico pueden ser monooxigenasas o dioxigenasas en función de que incorporen uno o dos grupos hidroxilo, respectivamente (Gibson & Parales, 2000). Estas enzimas

generalmente toman el poder reductor de NADH o NADPH y pueden ser dependientes de metales, grupo hemo o flavinas. Los principales intermediarios que se producen tienen dos grupos hidroxilo, bien adyacentes como en el catecol (1,2-dihidroxibenceno), o bien situados en posición *para* como en el gentisato (2,5-dihidroxibenzoato). Sobre el anillo hidroxilado actúan dioxigenasas de rotura del anillo. El tipo de dioxigenasas que actúa varía en función de la posición del enlace de ruptura del anillo. Las intradiol dioxigenasas rompen el anillo en posición *orto* (entre dos grupos hidroxilo), y las extradiol dioxigenasas catalizan la ruptura en posición *meta* (adyacentes a uno de los grupos hidroxilo). Estas rupturas producen un compuesto no aromático que a través de una serie de reacciones enzimáticas dará lugar a intermediarios del ciclo de Krebs (Dagley *et al.*, 1971; Harayama *et al.*, 1992; Harwood & Parales, 1996; Fuchs, 2008).

En el catabolismo aerobio de compuestos aromáticos, más recientemente se han descrito algunas rutas que combinan características tanto del catabolismo aerobio como del anaerobio, que se denominan rutas híbridas (*ruta box*). La principal propiedad de este tipo de rutas es que los sustratos son transformados en derivados del coenzima A (CoA) a través de una tioesterificación mediada por enzimas CoA ligasas. El proceso de tioesterificación es una característica común en las rutas anaerobias de degradación de compuestos aromáticos, ya que facilita la desestabilización del anillo al aumentar su densidad electrónica (Heider & Fuchs, 1997). La apertura del anillo aromático y la pérdida de la propiedad aromática del derivado CoA se realiza mediante reacciones de oxigenación u oxigenación/reducción y una posterior acción de enzimas que atacan el compuesto alicíclico generado (Gescher *et al.*, 2005). La participación de enzimas CoA ligasas en este tipo de catabolismo ha sido descrita en la degradación del ácido fenilacético en distintas especies bacterianas (Luengo *et al.*, 2001; Bartolomé-Martín *et al.*, 2004), para la degradación del 2-aminobenzoato en *Azoarcus evansii* (Schühle *et al.*, 2001), y para la degradación de benzoato en *Thauera aromatica* (Schühle *et al.*, 2003), *Burkholderia xenovorans* LB400 (Denef *et al.*, 2004), *Bacillus stearothermophilus* (Zaar *et al.*, 2001) y *A. evansii* (Gescher *et al.*, 2005). También se han descrito rutas híbridas en el metabolismo aerobio de compuestos aromáticos heterocíclicos, que incluye la degradación del ácido isonicotínico por *Mycobacterium sp.* INA1 (Kretzer *et al.*, 1993) y la de los ácidos 2-furano y 2-tiofeno carboxilato en algunas bacterias (Cripps, 1973; Koenig & Andreesen, 1990).

1.3. Degradación anaerobia de compuestos aromáticos

Muchos ecosistemas en los que no está presente el oxígeno están afectados por contaminación por aromáticos. Por ejemplo, hábitats como acuíferos

subterráneos, sedimentos acuáticos, lechos sumergidos o hábitats acuáticos estáticos son zonas representativas de la presencia de compuestos aromáticos en condiciones anóxicas, donde el catabolismo anaerobio de estos compuestos es esencial (Carmona *et al.*, 2009). De hecho, varios estudios de campo indican que en muchos casos la degradación de contaminantes en condiciones naturales está dominada por procesos anaerobios (Meckenstock *et al.*, 2004; Abu Laban *et al.*, 2009). Por tanto, los microorganismos degradadores de estos entornos juegan un papel importante en los ciclos biogeoquímicos (Evans & Fuchs, 1988; Widdel & Rabus, 2001; Gibson & Harwood, 2002; Heider, 2007). Hay que destacar que este proceso se lleva a cabo específicamente por consorcios bacterianos formados por bacterias fermentativas (acidogénicas y acetogénicas), SRB, NRB, reductoras de hierro y metanógenas (Harwood & Gibson, 1997; Heider, 2007; Foght, 2008). Asimismo, a partir de diferentes consorcios especializados de este tipo se han podido aislar e identificar SRB con capacidad de degradar distintos compuestos aromáticos (Tabla 1.1).

Aunque en los últimos años ha aumentado considerablemente nuestra comprensión de la biología de la degradación anaerobia de aromáticos en bacterias, el conocimiento actual sobre la bioquímica, la genética y la fisiología de estas vías se concentra esencialmente en la degradación de monoaromáticos simples (por ejemplo, BTEX) y de algunos PAHs de dos anillos (Carmona *et al.*, 2009; Rabus *et al.*, 2016). El estudio de las bases bioquímicas y genéticas de la degradación anaerobia de compuestos aromáticos plantea la dificultad intrínseca de requerir trabajar con microorganismos de difícil crecimiento en condiciones de laboratorio son difíciles de manipular genéticamente (Morre, 1966). Los avances en el campo están directamente relacionados con la disponibilidad de cultivos puros de bacterias capaces de degradar los distintos compuestos aromáticos en condiciones anóxicas. Paralelamente, el progreso rápido en la genética de estos organismos en los últimos años proviene en parte de tecnologías de alto rendimiento como genómica, metagenómica y proteómica (Kube *et al.*, 2005; Rabus *et al.*, 2005; Butler *et al.*, 2007; DiDonato *et al.*, 2010; Selesi *et al.*, 2010).

La degradación anaerobia del tolueno se describió por primera vez en microcosmos anóxicos (Grbic-Galic & Vogel, 1987) y posteriormente en cultivos puros de bacterias reductoras de hierro (Lovley & Lonergan, 1990), en las bacterias desnitrificantes *T. aromatica* K172, *T. aromatica* T1 y *Azoarcus* sp. (Dolfing *et al.*, 1990; Evans *et al.*, 1991; Schocher *et al.*, 1991; Fries *et al.*, 1994; Rabus & Widdel, 1995) y de bacterias reductoras de sulfato (Rabus *et al.*, 1993; Beller *et al.*, 1996). Probablemente los ejemplos mejor estudiados sean *Rhodopseudomonas palustris* y *Azoarcus* sp. CIB para la degradación del benzoato, mientras que el grupo

Aromatoleum aromaticum (anteriormente *Azoarcus* EbN1) se puede considerar el sistema modelo para la degradación del tolueno (Larimer *et al.*, 2004; Rabus *et al.*, 2005).

Al igual que ocurría en el metabolismo aerobio, las bacterias anaerobias canalizan la degradación de un gran número de aromáticos a través de rutas periféricas que convergen en unos pocos compuestos intermedios centrales, siendo el benzoil-CoA (y sus derivados 2-amino, 3-hidroxi y 3-metil) el más común.

Tabla 1.1. Algunos cultivos puros y de enriquecimiento utilizados para estudiar la degradación anaerobia de aromáticos en NRB, SRB, bacterias fermentadoras o sintróficas (Modificado de Rabus *et al.*, 2016).

Organismo	Sustrato metabolizado	Aceptor final de electrones	Filogenia	Referencia
<i>Aromatoleum aromaticum</i> EbN1	Tolueno, etilbenceno	Nitrato	<i>Betaproteobacteria</i>	(Rabus & Widdel, 1995) (Dolfing <i>et al.</i> , 1990)
<i>Azoarcus</i> sp. strain T	Tolueno	Nitrato	<i>Betaproteobacteria</i>	(Ahn <i>et al.</i> , 2009)
<i>Desulfobacterium anilini</i>	Fenol	Sulfato	<i>Deltaproteobacteria</i>	(Selesi <i>et al.</i> , 2010)
<i>Desulfobacterium cetonicum</i> , <i>Spirochaetes</i> sp. (Cultivo enriq. N47)	2-Metilnaftaleno, naftaleno	Sulfato	<i>Deltaproteobacteria</i> / <i>Spirochaetes</i>	(Rabus <i>et al.</i> , 1993;
<i>Desulfobacula toluolica</i> Tol2	Tolueno	Sulfato	<i>Deltaproteobacteria</i>	(Kunapuli <i>et al.</i> , 2007)
Cultivo de enriquecimiento BF	Benceno	Fe ³⁺	<i>Peptococcaceae</i>	(Lovley <i>et al.</i> , 1993)
<i>Geobacter metallireducens</i> GS-15	Benzoato	Fe ³⁺	<i>Deltaproteobacteria</i>	(Lahme <i>et al.</i> , 2012)
<i>Magnetospirillum</i> sp. Strain pbN1	<i>p</i> -Metilbenzoato	Nitrato	<i>Alphaproteobacteria</i>	(Yutin & Galperin, 2013)
<i>Peptoclostridium difficile</i>	<i>p</i> -Hidroxfenilacetico	Ferment.	<i>Peptostreptococcaceae</i>	(Musat <i>et al.</i> , 2009)
Cepa NaphS2	2-Metilnaftaleno naftaleno,	Sulfato	<i>Deltaproteobacteria</i>	(Breinig <i>et al.</i> , 2000)
<i>Thauera aromatica</i>	Fenol		<i>Betaproteobacteria</i>	(Anders <i>et al.</i> , 1995)
<i>Thauera aromatica</i> K172	Tolueno	Nitrato	<i>Betaproteobacteria</i>	(Song <i>et al.</i> , 1998)
<i>Thauera aromatica</i> T1	Tolueno	Nitrato	<i>Betaproteobacteria</i>	(Hopkins <i>et al.</i> , 1995)
<i>Syntrophus aciditrophicus</i> SB	Benzoato	Sintrófica	<i>Deltaproteobacteria</i>	

Pero otras rutas confluyen en otros intermediarios centrales como el resorcinol (1,3-dihidroxibenceno), floroglucinol (1,3,5-trihidroxibenceno) e hidroxihidroquinona (1,2,4-trihidroxibenceno, HHQ) (Heider & Fuchs, 1997; Gibson & Harwood, 2002; Carmona *et al.*, 2009; Boll *et al.*, 2014). En algunos casos las rutas periféricas consisten en un único paso de activación, como ocurre por ejemplo con algunos benzoatos, que se activan a sus correspondientes aril-CoA ésteres mediante la actividad de una benzoato-CoA ligasa, que requiere ATP y CoA como sustrato (Fig. 1.3). En otros casos las rutas periféricas consisten en múltiples reacciones encadenadas hasta transformar el compuesto aromático en el metabolito intermedio. Este sería el caso para la activación del tolueno hasta benzoil-CoA, que se inicia por la oxidación del grupo metilo por adición a fumarato mediada por una bencilsuccinato sintasa. Esta reacción rinde bencilsuccinato, que sufre una tioesterificación y posteriormente una serie de reacciones similares a una β -oxidación hasta producir benzoil-CoA (Spormann & Widdel, 2000; Boll *et al.*, 2014).

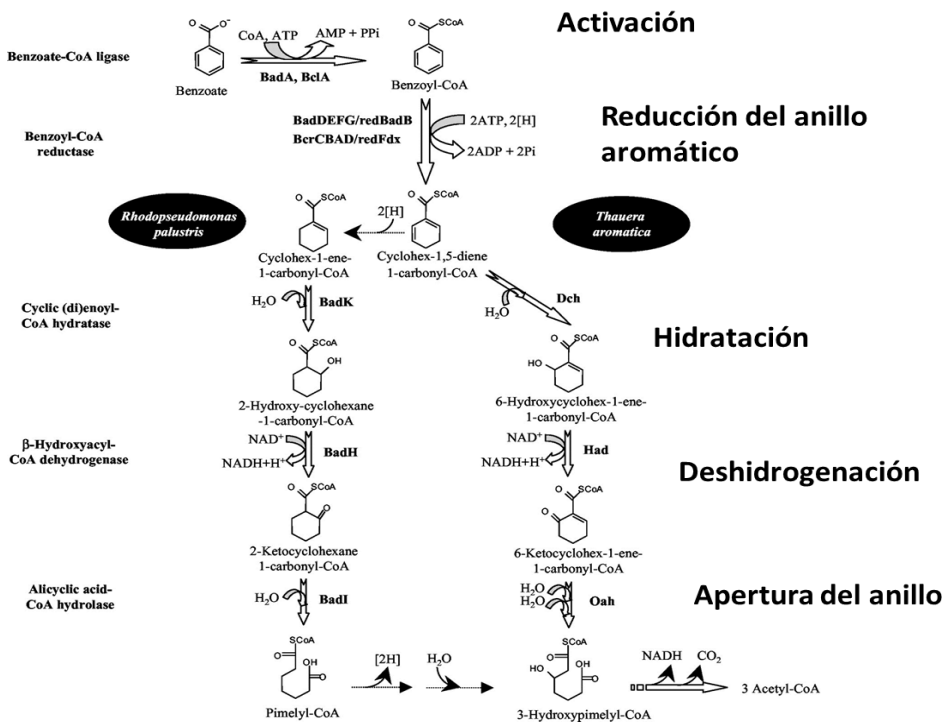


Figura 1.3. Rutas anaerobias de degradación de benzoato en *Thauera aromatica* y *Rhodopseudomonas palustris*. Junto a cada reacción enzimática de la ruta central están los productos génicos implicados en los mismos. En el margen izquierdo de la figura se especifica la actividad enzimática involucrada en cada reacción. (Tomado de López Barragán *et al.*, 2004).

El catabolismo del benzoil-CoA (ruta central) se organiza en dos tramos catabólicos: a) ruta central propiamente dicha, o ruta superior, que convierte el benzoil-CoA en un compuesto alifático tipo C₇-dicarboxil-CoA; y b) ruta inferior, que transforma el producto de la ruta superior en acetil-CoA y CO₂ mediante reacciones similares a las de la β-oxidación de ácidos dicarboxílicos (Carmona *et al.*, 2009).

El paso clave en la degradación anaerobia de aromáticos es la reducción del anillo aromático del benzoil-CoA por una benzoil-CoA reductasa (BCR), que constituye el único paso de la ruta sensible a oxígeno (Boll & Fuchs, 1995). Las BCR se pueden clasificar en dos grupos en función a su dependencia de ATP: i) dependientes de ATP (Tipo I) presentes en bacterias anaerobias facultativas tales como *T. aromatica* (Boll & Fuchs, 1995), *R. palustris* (Gibson & Gibson, 1992), *Azoarcus* spp. (Ebenau-Jehle *et al.*, 2003; López Barragán *et al.*, 2004), que tienen mayores rendimientos energéticos, y ii) independientes de ATP (Tipo II) presentes en organismos anaerobios estrictos como *Geobacter metallireducens* y *Syntrophus aciditrophicus* (Kung *et al.*, 2009; Löffler *et al.*, 2011; Boll *et al.*, 2014), con menores rendimientos energéticos. Esta enzima lleva a cabo un mecanismo complejo de bifurcación de electrones descubierto recientemente (Kung *et al.*, 2010; Buckel & Thauer, 2013; Boll *et al.*, 2014).

Finalmente, el producto de la desaromatización del anillo sufre una β-oxidación modificada con la adición de agua a un doble enlace (acil-CoA hidratasa), seguido de una dehidrogenación (hidroxiacil-CoA dehidrogenasa) y finalmente la rotura hidrolítica del anillo (oxacil-CoA hidrolasa) que genera el compuesto alifático C₇-dicarboxil-CoA. Dependiendo de la naturaleza del producto de la reducción del benzoil-CoA, se han definido dos vías alternativas: una β-oxidación tipo *Thauera*, que emplea como sustrato el dienil-CoA cíclico producto de la BCR y genera 3-hidroxipimelil-CoA (Fig. 1.3); o una β-oxidación tipo *Rhodopseudomonas*, donde el enoil-CoA cíclico producto de la BCR da lugar a pimelil-CoA (Carmona *et al.*, 2009). La ruta inferior del benzoil-CoA prosigue con la degradación de los derivados alifáticos dicarboxil-CoA hasta generar tres moléculas de acetil-CoA y una de CO₂ (Fig.1.3) (López Barragán *et al.*, 2004).

En general los determinantes génicos de las rutas de degradación anaerobia se organizan en agrupaciones génicas, como ocurre con las rutas de degradación en organismos aerobios. Estas agrupaciones presentan una organización más o menos conservadas, y la secuencia de sus genes en muchos casos permite predecir su función en la ruta. Un ejemplo de esta organización son las rutas de degradación de

benzoato de distintos organismos (Fig. 1.4). Los determinantes génicos de estas rutas se estudiaron inicialmente para la ruta central del benzoil-CoA en *T. aromatica* y *R. palustris* (Egland *et al.*, 1997; Breese *et al.*, 1998). En el caso del tolueno se ha identificado en *T. aromatica* una agrupación de unos 20 Kb donde se localizan los operones *bbs* y *bss* que codifican para los diferentes enzimas de la ruta de degradación, y un tercer operón regulador *tdiSR* que codifica un sistema de dos componentes que controla la expresión de la ruta (Leuthner & Heider, 2000).

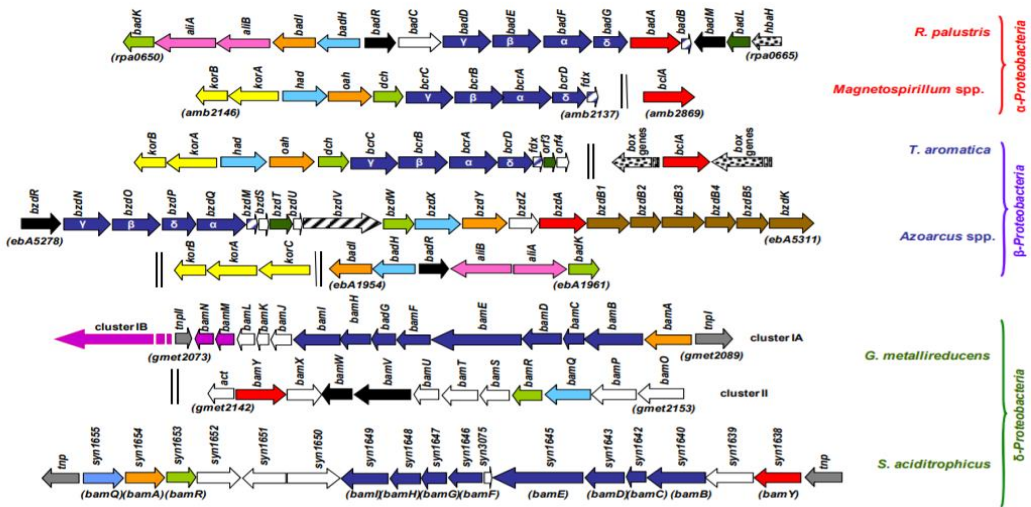


Figura 1.4. Organización génica de la ruta de degradación anaerobia del benzoato en α , β y δ -proteobacterias. *Rhodospseudomonas palustris* (NC_005296), *Magnetospirillum* spp. (*M. magneticum* AMB-1 (NC_007626), *T. aromatica* (AJ224959), *Azoarcus* (*Azoarcus* sp. CIB (AF515816), *Geobacter metallireducens* GS-15 (NC_007517) y *Syntrophus aciditrophicus* SB (NC_007759). Los genes se representan con flechas de diversos colores: rojo, genes que codifican benzoato-CoA ligasas; azul oscuro, genes que codifican las subunidades α - β - δ - γ de la benzoil-CoA reductasa; rayado azul, genes que codifican las ferredoxinas asociadas a las benzoil-CoA reductasas; amarillo, genes KGOR; rayado negro, genes que codifican posibles óxidoreductasas dependientes de NADPH y ferredoxina; verde claro, genes que codifican enoil-CoA hidratasas; azul claro, genes que codifican hidroxiacil-CoA deshidrogenasas dependientes de NAD⁺; naranja, genes que codifican oxoacil-CoA hidrolasas; negro, genes reguladores; verde oscuro, genes que codifican posibles acil-transferasas; marrón, posibles genes transportadores; rosa, genes que codifican la ciclohexanocarboxilato-CoA ligasa (AliA) y la ciclohexanocarboxil-CoA deshidrogenasa (AliB); punteado, genes pertenecientes a otras rutas catabólicas de compuestos aromáticos; blanco, genes de función desconocida. Dos rayas verticales separan los genes no adyacentes en el genoma. (Tomado de Carmona *et al.*, 2009).

1.4. Degradación anaerobia de compuestos aromáticos hidroxilados

La degradación anaerobia de los compuestos aromáticos hidroxilados se produce principalmente a través de las vías del benzoil-CoA, resorcinol y floroglucinol, siendo el principal metabolito intermediario el benzoil-CoA. Hay que destacar que la degradación anaerobia de los compuestos aromáticos dihidroxilados resorcinol (1,3-dihidroxibenceno) y α -resorcilato (3,5-dihidroxibenzoato, 3,5-DHB) en bacterias desnitrificantes siguen una ruta totalmente diferente: son hidroxilados hasta dar el compuesto intermedio común hidroxihidroquinona (HHQ), que sufre una desaromatización oxidativa hasta hidroxibenzoquinona (HBQ). Dado que esta vía es el objeto de estudio de esta tesis doctoral, se analiza de forma independiente en el capítulo 1.5.

Degradación de fenol (hidroxibenceno). Se ha estudiado principalmente en *T. aromatica*, donde la degradación ocurre a través de la vía del benzoil-CoA. La ruta periférica incluye una fosforilación a fenilfosfato, seguida de carboxilación hasta 4-hidroxibenzoato y posterior formación de 4-hidroxibenzoil-CoA, que es finalmente reducido hasta benzoil-CoA. Los genes *pps* y *ppc*, que codifican la fenilfosfato sintasa y la fenilfosfato carboxilasa, se agrupan en un operón inducible por fenol (Schleinitz *et al.*, 2009). La SRB *Desulfobacterium anilini* (recientemente reclasificada como *Desulfatiglans anilini* (Suzuki *et al.*, 2014)) también degrada fenol vía fosforilación y descarboxilación (Ahn *et al.*, 2009), y la SRB sintrófica *Syntrophorhabdus aromaticivorans* requiere la asociación con bacterias metanógenas para degradar fenol por la vía del 4-hidroxibenzoato (Qiu *et al.*, 2008).

Degradación de catecol (1,2-dihidroxibenceno). Aparentemente, la degradación anaerobia de catecol en *T. aromatica*, donde mejor se ha estudiado, se nutre de enzimas de otras rutas presentes en la cepa con una baja especificidad de sustrato, lo que permite que este compuesto y los productos de su metabolismo sean reconocidos y transformados. Se inicia mediante la carboxilación a protocatecuato mediada por las mismas enzimas requeridas para la conversión de fenol a 4-hidroxibenzoato, fenilfosfato sintasa y fenilfosfato carboxilasa. El protocatecuato producido es activado hasta protocatecoil-CoA y finalmente deshidroxilado hasta hidroxibenzoil-CoA, que es probablemente el sustrato de una BCR (Ding *et al.*, 2008). Los genes que codifican estas enzimas se localizan en un operón, junto con genes que codifican enzimas de carboxilación adicionales y que son homólogos a genes presentes en otras bacterias degradadoras de fenol (Carmona *et al.*, 2009). Este sería un ejemplo de flexibilidad catabólica, que permite a un organismo metabolizar una variedad de sustratos químicamente relacionados utilizando un conjunto limitado de genes y enzimas. Este sería el caso también para la

degradación anaerobia de ácidos *meta*-hidroxiaromáticos como el protocatecuato (*para*-dihidroxibenzoato) en *R. palustris* (Gall *et al.*, 2013).

Degradación de 3-hidroxibenzoatos. Su degradación también se ha estudiado en *T. aromatica*, y ocurre por una vía central propia ligeramente distinta de la del benzoil-CoA. Una coenzima A ligasa inducida por sustrato (HbcL) cataliza la formación de 3-hidroxibenzoil-CoA, que se reduce posteriormente a un dienoil-CoA alicíclico por la actividad de las BCR y ferredoxina de la ruta general del benzoil-CoA. Esta actividad se combina con reacciones posteriores de tipo β -oxidación específicas para la transformación del dienoil-CoA alicíclico (Laempe *et al.*, 2001). Una situación parecida parece ocurrir en varias cepas de *Azoarcus*, aunque en este caso la ruta parece incluir una BCR específica para 3-hidroxibenzoil-CoA, distinta de la BCR general (Rabus *et al.*, 2005; Wöhlbrand *et al.*, 2007; Martín-Moldes *et al.*, 2015). Se ha propuesto una vía alternativa de degradación de 3-hidroxibenzoato en bacterias fermentadoras tales como *Sporotomaculum hidroxibenzoicum*, que implica una CoA transferasa en vez de una CoA ligasa para la activación del sustrato a 3-hidroxibenzoil-CoA, y una posterior eliminación reductiva del grupo hidroxilo a través de benzoil-CoA como intermedio central (Müller & Schink, 2000). Finalmente, una tercera vía involucraría reacciones de hidroxilación para formar HHQ en la cepa desnitrificante BoNHB. Sin embargo, los genes implicados en estas dos rutas no se conocen y no se ha profundizado en su bioquímica (Schink *et al.*, 2000).

Degradación de trihidroxibencenos. La aromaticidad del anillo en este tipo de compuestos está muy debilitada por la presencia de dos o más grupos hidroxilo en posición *meta*, lo que hace que las reacciones para la rotura del anillo sean menos exigentes que las descritas hasta ahora (Schink *et al.*, 2000). De los tres isómeros de trihidroxibenceno, pirogalol (1,2,3-trihidroxibenceno) y floroglucinol (1,3,5-trihidroxibenceno) son fácilmente degradados por bacterias fermentadoras como *P. acidigallici*. El floroglucinol puede reducirse directamente a dihydrofloroglucinol, que sufre la posterior rotura del anillo y oxidación hasta rendir tres residuos de acetado (Brune & Schink, 1992). El pirogalol debe ser primero isomerizado a floroglucinol por una transhidroxilasa que utiliza un tetrahidroxibenceno como cosustrato (Messerschmidt *et al.*, 2004). El tercer isómero de trihidroxibenceno es la hidroxihidroquinona (1,2,4-trihidroxibenceno, HHQ), que en *Pelobacter masiliensi* se degrada mediante tres transhidroxilaciones sucesivas para dar floroglucinol, que se procesaría de un modo similar al descrito anteriormente (Philipp & Schink, 2012). La estrategia parece ser diferente en SRB: en *Desulfovibrio inopinatus* el primer paso es una desestabilización de la molécula,

que se reduce hasta dihidrohidroquinona, para posteriormente formar acetato y un derivado no identificado de 4 carbonos (Reichenbecher *et al.*, 2000).

Degradación de resorcinol (1,3-dihidroxybenzeno). La degradación anaerobia de resorcinol se ha estudiado en bacterias fermentadoras, SRB y bacterias desnitrificantes, y en ningún caso ocurre por la ruta del benzoil-CoA. Se han descrito dos estrategias catabólicas principales para la degradación de resorcinol: i) a través de una desaromatización reductiva clásica en SRB y fermentadoras, rindiendo 1,3-ciclohexadiona, que se hidroliza a ácido 5-oxocaproico y finalmente se fermenta a acetato y butirato (Philipp & Schink, 2012), y ii) una ruta oxidativa a través de HHQ en bacterias desnitrificantes, que también se utiliza para la degradación de α -resorcilato, y que por ser el objeto de esta tesis analizamos en detalle en los capítulos siguientes.

1.5. Degradación anaerobia de aromáticos dihidroxilados en bacterias desnitrificantes

1.5.1. Degradación anaerobia de resorcinol en *A. anaerobius*

El resorcinol (1,3-dihidroxybenzeno) es producido y utilizado en grandes cantidades en distintos sectores industriales (Krumenacker *et al.*, 2000), desde la industria maderera para la producción de resinas hasta la industria farmacéutica, por ser el sustrato inicial para la síntesis entre otros de fármacos o colorantes como la fluoresceína, utilizada como antiséptico dermatológico. Sin embargo su mayor utilización está en la producción de resinas artificiales, utilizadas en la fabricación de neumáticos como adherente entre el tejido de acero y la goma. También se produce de forma natural en algunas plantas como *Nuphar lutea*, una planta acuática que exuda de forma natural cantidades considerables de resorcinol como defensa frente a la acción de otros organismos del ambiente acuático (Sütfeld *et al.*, 1996).

La bacteria anaerobia estricta *Azoarcus anaerobius* LuFRes1, una de las cepas de estudio de esta tesis, es una betaproteobacteria nitratorreductora, aislada de aguas residuales por su capacidad para crecer con resorcinol como única fuente de carbono y nitrato como aceptor final de electrones. Tiene un tamaño de 2,7-3,3 μm x 1,5 μm , es móvil, catalasa-negativa y superóxido-dismutasa positiva. Presenta un metabolismo estrictamente oxidativo, usando el nitrato como aceptor último de electrones, el cual es reducido hasta nitrito y finalmente hasta N_2 . Tiene una temperatura óptima de crecimiento de 28°C, aunque puede vivir en un rango de 20-32°C, y su pH óptimo es 7,2 (Springer *et al.*, 1998). Esta cepa está

filogenéticamente relacionada con *T. aromatica*, con una identidad del 92,7% en su secuencia de ARN_r 16S.

Philipp y Schink (1998) determinaron que en extractos celulares de *A. anaerobius* cultivada en resorcinol, este se hidroxilaba hasta HHQ, pudiendo utilizar directamente nitrato como aceptor de electrones. La HHQ se degradaba posteriormente hasta 2-hidroxi-1,4-benzoquinona (HBQ). Las actividades enzimáticas responsables no se detectaron en extractos de células crecidas con benzoato, lo que indicaba que benzoato y resorcinol se degradan por vías diferentes y que las enzimas de degradación de resorcinol son inducibles por sustrato (Philipp & Schink, 1998). Esto establecía una nueva vía oxidativa para la degradación de resorcinol. Los genes de esta ruta se localizaron en un cósmido de 29,88 Kb (pR⁺) seleccionado de una genoteca de *A. anaerobius* por transferir a *T. aromatica* la capacidad de crecer anaeróbicamente con resorcinol como única fuente de carbono. La agrupación génica responsable de la degradación constaba de 19 genes, cuya participación en la ruta se determinó mediante la caracterización de mutantes del cósmido pR⁺ utilizando como huésped heterólogo distintas cepas de *T. aromatica*. Ocho genes resultaron ser esenciales para el crecimiento en resorcinol, y los genes de la agrupación se anotaron basándose en evidencias bioquímicas y en su homología con secuencias en las bases de datos (Darley *et al.*, 2007). La disposición de los genes en la agrupación permitía predecir una organización en 3 operones (Fig. 1.5).

La principal enzima de esta ruta es la resorcinol hidroxilasa, que cataliza la transformación de resorcinol a HHQ. Consta de dos subunidades codificadas por *rehL* y *rehS*, que presentan homología con genes de tipo molibdopterinoxidorreductasa como las DMSO reductasas. Además, *rehL* y *rehS* presentan 52% y 49% de identidad con las subunidad α y β de la pirogalol-floroglucinol transhidroxilasa de *Pelobacter acidigallici*, respectivamente, que cataliza la isomerización de pirogalol a floroglucinol (ver Capítulo 1.4.) (Messerschmidt *et al.*, 2004). Su actividad se localiza claramente en las fracciones de membrana de *A. anaerobius*, y sin embargo en su secuencia no se predice ninguna región de unión o inserción en membrana (Darley *et al.*, 2007). El siguiente paso de la ruta, la HHQ deshidrogenasa que oxida HHQ a HBQ, consta de dos subunidades codificadas por los genes *btdL* y *btdS*. El producto del gen *btdL* tiene una gran similitud con una β -hidroxiácido dehidrogenasa presente en muchas proteobacterias, que presenta en el extremo amino un dominio de unión a piridín nucleótido típico de muchas deshidrogenasas (Molina-Fuentes, 2012). El gen *btdS* presenta similitud con proteínas de membranas de función desconocida, y se le atribuye la localización

asociada a membranas de esta actividad (Philipp & Schink, 1998; Darley *et al.*, 2007).

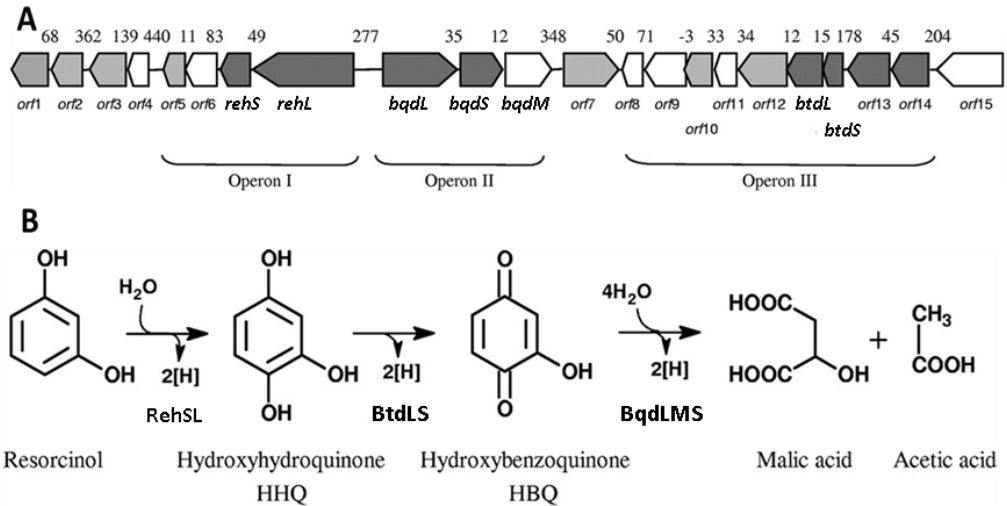


Figura 1.5. Ruta de degradación de resorcinol por *Azoarcus anaerobius*. A) Organización del cósmido pR⁺ responsable del metabolismo anaerobio de resorcinol; las diferentes ORF están anotadas y se indica la orientación de las mismas. Se indican con gris oscuro los genes esenciales y gris claro los no esenciales. B) Esquema de la ruta propuesta para la degradación anaerobia de resorcinol indicando los genes involucrados en blanco de los que se carece información. Tomado de Darley *et al.*, 2007.

La conversión de HBQ a acetato y malato requiere la rotura de dos enlaces C-C y la liberación de dos electrones, reacción que podría estar mediada por los genes *bqdLSM* que presenta similitud con los componentes E1, E2 y E3, respectivamente, del complejo enzimático piruvato deshidrogenasa. Este complejo cataliza la reacción de descarboxilación oxidativa del piruvato a acetil-CoA utilizando tiamina pirofosfato como cofactor. Por tanto se sugiere que los genes *bqdLSM*, dos de los cuales son esenciales para el crecimiento en resorcinol, codifican el complejo HBQ deshidrogenasa implicado en la rotura del anillo (Darley *et al.*, 2007). Otros dos genes de la agrupación son esenciales para el crecimiento en resorcinol, pero se desconoce su función exacta: el producto de *orf13* guarda similitud con miembros de la familia de proteasas M24 (Rawlings & Barrett, 1993), que juegan un papel importante en la maduración de muchas proteínas, por lo que se le atribuye un papel en la maduración de alguno de los complejos enzimáticos que participan en la degradación del resorcinol; el producto de *orf14* tiene similitud con NADH flavín

oxidorreductasas de α y β proteobacterias y podría tener un papel en la transferencia de electrones en la membrana (Darley *et al.*, 2007).

Del resto de los genes anotados se desconoce la función exacta. En la agrupación génica se han identificado además dos genes, *orf7* y *orf15*, con homología con reguladores transcripcionales de la familia de NtrC que activan promotores dependientes de σ^{54} , también conocidos como proteínas de unión a potenciadores bacterianos (*bacterial Enhancer Binding Proteins*, bEBP), y anotados recientemente como *redR1* y *redR2* (Pacheco-Sánchez *et al.*, 2017). Estos reguladores se analizan en más detalle en el capítulo 1.8.

1.5.2. Degradación anaerobia de α -resorcilato (3,5-dihidroxibenzoato, 3,5-DHB) por *T. aromatica* AR-1.

La cepa *T. aromatica* AR-1, una betaproteobacteria aislada a partir de cultivos de enriquecimiento de los lodos activos de la planta municipal de Tübingen-Lustnau, en Alemania (Gallus *et al.*, 1997), tiene la capacidad de crecer en 3,5-DHB como única fuente de carbono, y de degradarlo por la vía de la HHQ similar a la que utiliza *A. anaerobius* para degradar resorcinol (Gallus & Schink, 1998). Es una bacteria anaerobia facultativa, desnitrificante. Tiene forma de bacilo móvil y un tamaño de entre 1,5-3 μm ; su ADN tiene un alto contenido en G+C (66%) y puede crecer a temperaturas de entre 10 y 41°C. Tiene la capacidad de usar, además de oxígeno y nitrato, nitrito y óxido nitroso como aceptores de electrones. Puede metabolizar compuestos aromáticos de forma aerobia, como el benzoato, pero la degradación de 3,5-DHB a CO_2 acoplada a la reducción de nitrato a nitrógeno molecular sólo sucede de forma estrictamente anaerobia (Gallus *et al.*, 1997). En estudios con extractos celulares de *T. aromatica* AR-1 crecida con 3,5-DHB como única fuente de carbono, se determinó que para la formación de HHQ a partir de 3,5-DHB eran necesarias enzimas citosólicas y de membrana (Gallus and Schink, 1998). Efectivamente, durante la incubación de extractos de membrana de *T. aromatica* AR-1 con 3,5-DHB se acumulaba un compuesto no identificado, que desaparecía cuando se añadía la fracción citosólica, formándose HHQ. El compuesto intermedio formado no se ha identificado, pero se postula que pueda ser 2,3,5-trihidroxibenzoato (2,3,5-THB), que se descarboxilaría para generar HHQ.

En nuestro laboratorio hemos confirmado con patrones adecuados la formación transitoria de 2,3,5-THB a partir de extractos completos de *T. aromatica* AR-1 (Mohamed Khaled, no publicado). En la fracción de membrana también se observó actividad HHQ deshidrogenasa, responsable de la oxidación de la HHQ a HBQ, un compuesto cíclico que ha perdido el carácter aromático (Philipp & Schink,

2000). Dado que la HBQ se degrada finalmente hasta CO_2 y agua, se piensa que su degradación puede generar moléculas que se incorporen al ciclo de Krebs, probablemente acetato y malato (Fig. 1.6) (Hellstern, 2005).

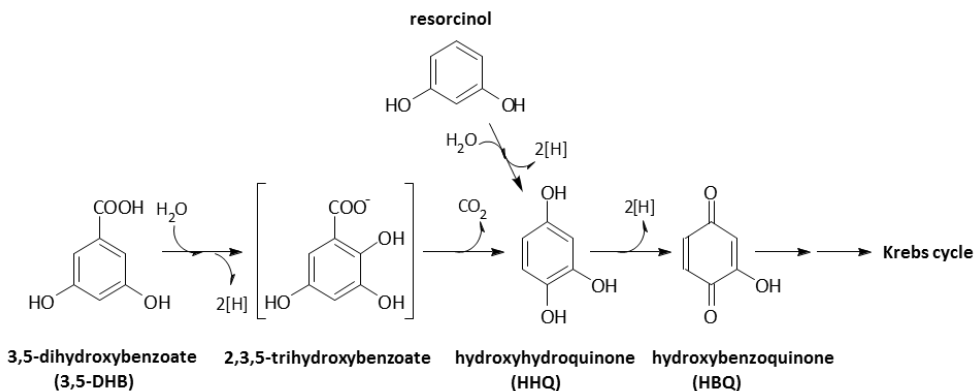


Figura 1.6. La ruta de degradación de 3,5 DHB por la cepa *T. aromatica* AR-1 y la vía de degradación de resorcinol por *A. anaerobius* convergen en el intermedio central hidroxihidroquinona (HHQ). Se indican las enzimas que participan en los diferentes pasos de la ruta. Tomado de Molina-Fuente *et al.*, 2015.

Los genes implicados en la degradación de 3,5-DHB se han identificado en nuestro laboratorio por hibridación con sondas diseñadas a partir de los genes de degradación de resorcinol en *A. anaerobius* (Molina-Fuentes *et al.*, 2015). Se identificó una región cromosómica de *T. aromatica* AR-1 que contenía 28 pautas abiertas de lectura (ORF), de las cuales 20 estaban directamente implicadas en la degradación del aromático (Fig 1.7). Un análisis de las secuencias permitió anotar la mayoría de estos genes por homología con los genes de *A. anaerobius* y con genes de las bases de datos. El análisis de mutantes en los principales genes de la agrupación y un estudio transcripcional permitieron establecer que los genes se organizaban en cinco operones que comprendían desde la *orf7* hasta la *orf26*. La primera enzima de la ruta, 3,5-DHB hidroxilasa, codificada por los genes *dbhLS*, forma un operón junto con dos genes que codifican proteínas pequeñas con estructura de cupina que suelen participar en unión de metales, con el gen *orf12* para una posible chaperona necesaria para el correcto ensamblaje de esta molibdo proteína, y con *orf11*, homólogo a *btdL* de *A. anaerobius*, que codificaría una HHQ deshidrogenasa, implicada en la oxidación de HHQ a HBQ. Una vía paralela para la transformación de HHQ a HBQ estaría codificada por *orf26*, que se anotó como *qorA* (Fig. 1.7).

El segundo operón (*orf13-15*) codifica las subunidades de un transportador tripartito de membrana periplásmica independiente de ATP (de tipo TRAP), generalmente involucrados en el transporte de ácidos carboxílicos (Kelly & Thomas, 2001), y anotados como *dbtP*, *dbtQ* y *dbtM*. Distribuidos entre el tercer y cuarto operón se encuentran los genes anotados como *bqdM*, *bqdL* y *bqdS*, que se proponen como las tres subunidades de la HBQ deshidrogenasa por su homología con las subunidades de esta enzima en *A. anaerobius* y de los cuales los dos primeros son esenciales para el crecimiento en 3,5-DHB. Los productos de los genes *orf20* y *orf21* también han mostrado ser imprescindibles para el crecimiento en 3,5-DHB, aunque su función es desconocida. Se ha propuesto que el producto de *orf20* participaría en los últimos pasos de la ruta, en la degradación de HBQ hasta acetato y malato y que el producto de *orf21*, junto con el de *orf12* mencionado anteriormente, tendría un papel en la maduración de DbhLS. No se ha encontrado ningún gen que presente homología con genes de descarboxilasas, por lo que actualmente se desconoce el gen responsable del segundo paso de la ruta, la descarboxilación de 2,3,5-THB a HHQ. No se ha podido asignar una función a los genes *orf9*, *orf10*, *orf17* y *orf18* (Fig. 1.7).

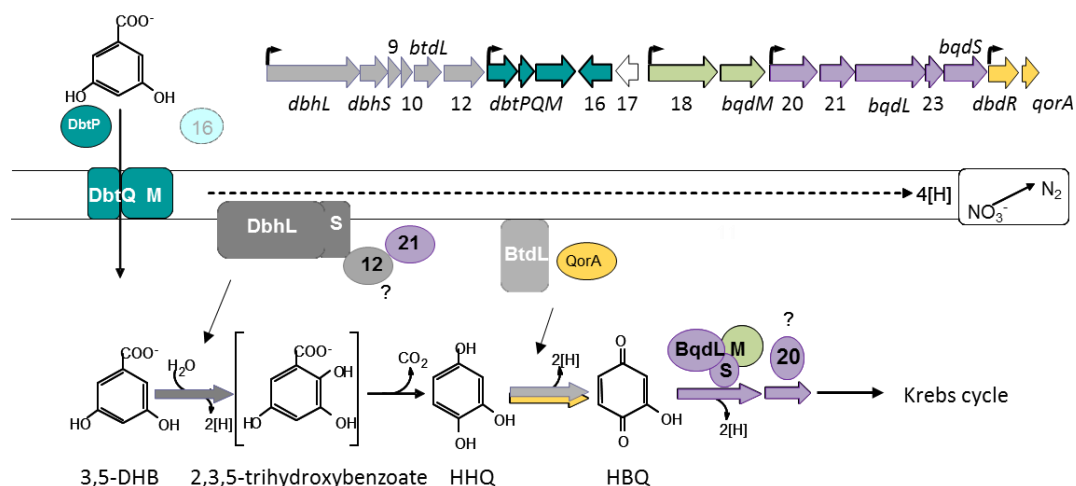


Figura 1.7. Función propuesta de los productos de la agrupación génica de degradación de 3,5DHB en la cepa *T. aromatica* AR-1. El 3,5-DHB entraría en la célula a través del sistema de transporte TRAP codificado por *orf13-15* (*dbtPQM*). La proteína codificada por *orf16* podría ser una proteína receptora alternativa para el sustrato. La 3,5-DHB hidroxilasa (*DbhLS*) está asociada a la membrana y probablemente requiera la acción coordinada del par de chaperona-peptidasa codificado por *orf21* y *orf12* para su maduración. La oxidación de la HHQ a HBQ puede llevarse a cabo mediante *BtdL* o *QorA*. La escisión del anillo de este último compuesto implicaría una enzima de tres componentes, *BqdLSM*, y el producto de *orf20* llevaría a cabo el metabolismo del compuesto lineal resultante (Tomado de Molina Fuente *et al.*, 2015).

Finalmente, en los dos extremos de la agrupación identificamos los genes *orf3* y *orf25* con una alta similitud con reguladores transcripcionales de tipo LysR (LysR type transcriptional regulator, LTTR). El análisis de mutantes en estos genes demostró que mientras *orf3* no es necesario para el crecimiento en 3,5-DHB, *orf25* es esencial para la utilización anaerobia de este sustrato, por lo que se ha propuesto como el regulador de la ruta, anotado como *dbdR*. Este gen se transcribe junto a *gorA* en el quinto operón de la agrupación (Molina-Fuentes *et al.*, 2015), y constituye uno de los objetivos de esta tesis Doctoral.

Hasta ahora sólo se han descrito estas dos cepas capaces de degradar compuestos aromáticos dihidroxilados mediante la vía oxidativa a HHQ. Dado que la oxidación de HHQ a HBQ es energéticamente muy costosa, se piensa que esta vía sólo se encuentra en NRB y no en bacterias que utilicen otros aceptores de electrones energéticamente menos favorables (Philipp & Schink, 2000). En nuestro laboratorio hemos analizado la distribución y diversidad de esta ruta en distintos entornos naturales, aislando un número de bacterias capaces de degradar estos dos compuestos en condiciones desnitrificantes. Todas resultaron pertenecer a los géneros *Azoarcus* y *Thauera*, y todas incluían en su genoma genes homólogos a *rehLS/dbhLS* (Rama-Garda *et al.*, en preparación).

1.5.3. Homologías y diferencias entre las rutas de degradación de resorcinol y α -resorcilato en bacterias desnitrificantes

Las rutas de degradación de aromáticos dihidroxilados de *A. anaerobius* y *T. aromatica* no sólo conservan los genes de los tres pasos principales de la ruta, sino que también varios genes auxiliares son homólogos en las dos cepas. RehL de *A. anaerobius* y DbhL de *T. aromatica* AR-1 presentan en el extremo amino terminal dos residuos de argininas que podrían ser la señal reconocida por un sistema similar al sistema TAT de translocación de proteínas a la membrana (Chan *et al.*, 2010). Los genes *orf13* de *A. anaerobius* y *orf12* de *T. aromatica*, que tienen homología con proteínas de la familia M24B de proteasas, muestran un 93% de identidad entre sí, y podrían participar en el proceso de maduración y translocación de estas enzimas a la membrana (Molina-Fuentes *et al.*, 2015). En las dos agrupaciones encontramos sendas chaperonas (*orf20* de *T. aromatica* AR-1 y *orf12* de *A. anaerobius*) que presentan 40% de identidad entre sí y probablemente participen en la maduración de enzimas de la ruta. Otros de los genes con similitud entre las dos cepas son los dos pequeños genes que codifican proteínas con estructura tipo cupina (*orf9* y *orf10* de *T. aromatica* AR-1), que también está presente en una copia en *A. anaerobius* entre *btdS* y *orf13*. Las cupinas son proteínas de unión a metales implicadas en una amplia diversidad de funciones celulares, y cuya presencia en

estas agrupaciones está probablemente relacionada con el hecho de que varias de las proteínas implicadas en la ruta son metaloenzimas, como por ejemplo *orf23* de *T. aromatica* AR-1 y *orf5* de *A. anaerobius*, dos proteínas con un 73% de identidad, de función desconocida. Finalmente, un gen con homología con succinico semialdehído deshidrogenasas de función desconocida está presente en las dos agrupaciones con un 69% de identidad (*orf20* de *T. aromatica* AR-1 y *orf12* de *A. anaerobius*) (Molina-Fuentes *et al.*, 2015).

A pesar de esta homología de secuencia, la organización de los genes en las dos agrupaciones se diferencia considerablemente (Fig. 1.8). En *A. anaerobius* los genes están bien organizados en unidades transcripcionales según su función. Por el contrario, los genes en *T. aromatica* AR-1 se encuentran relativamente desordenados y se transcriben en cinco operones. En esta cepa la agrupación génica está flanqueada por genes homólogos a genes del cromosoma de *Thauera* MZ1T, mientras que los genes presentes en la agrupación no tienen homólogos en los cromosomas de *Thauera* secuenciados hasta la fecha. Esto parece indicar un fenómeno de transferencia horizontal. La presencia de dos vías alternativas para el metabolismo de la HHQ refuerza esta idea. Con respecto a los mecanismos de regulación, también son diferentes en ambas cepas. En *A. anaerobius* se encuentran dos genes reguladores homólogos que codifican proteínas de la familia de NtrC, mientras que un único gen de la familia LysR está presente en la agrupación génica de degradación de 3,5-DHB en *T. aromatica* AR-1.

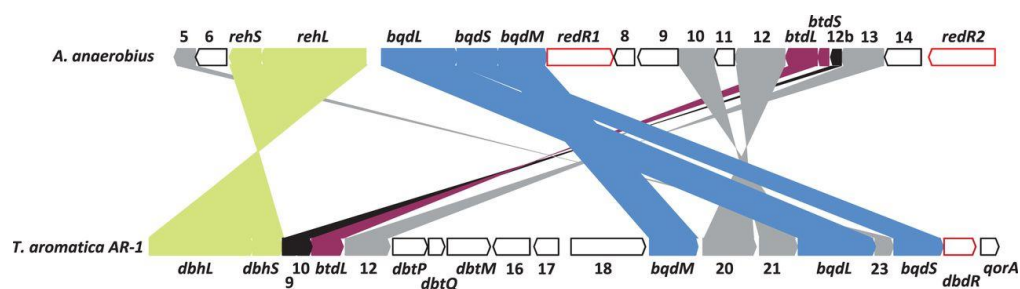


Figura 1.8. Organización de la secuencia de *T. aromatica* AR-1 y *A. anaerobius* para la degradación de aromáticos dihidroxilados. Los genes homólogos entre las dos las vías están conectados con una banda de color. Los genes reguladores están dibujados en rojo. Los genes de función desconocida presentes en ambas cepas están sombreados en gris. Los genes rellenos en negro (*A. anaerobius orf12b* y *T. aromatica* AR-1 *orf9* y *orf10*) no muestran homología de secuencia de ADN, pero se predice que sus productos comparten una estructura de tipo cupina similar (Molina-Fuentes *et al.*, 2015).

1.6. Regulación de la expresión génica en las rutas de degradación anaerobia de compuestos aromáticos.

A pesar del avance considerable en nuestro conocimiento de los genes y enzimas implicados en las rutas de degradación anaerobias de compuestos aromáticos, se conocen mucho menos los elementos reguladores de las mismas, y sólo en algunos casos se han vinculado genes reguladores con la regulación transcripcional de este tipo de rutas. La capacidad de los microorganismos para degradar compuestos aromáticos no sólo se debe a la presencia en su genoma de las enzimas de las rutas, sino también a su capacidad para controlar su expresión. Este control no depende únicamente de la presencia o ausencia del sustrato aromático en el medio, sino también de una amplia variedad de estímulos ambientales como son la tensión de oxígeno, la presencia o ausencia de luz o las variaciones en el pH, entre otros factores (Lovley, 2003; Cases & de Lorenzo, 2005). La integración de todas estas señales y la modulación de la actividad de las diferentes enzimas son fundamentales para el éxito de los microorganismos en sus diferentes medios. La regulación puede ocurrir a nivel de transcripción, de traducción o en etapas posteriores, siendo la regulación transcripcional la más común, o al menos la más estudiada (Shingler, 2003; Carmona *et al.*, 2009; Crosby *et al.*, 2010).

La transcripción del ADN mediada por la ARN polimerasa es un proceso altamente regulado que transmite al sistema de expresión génica la toma de decisiones necesarias para la adaptación al entorno. En la mayoría de los casos, la regulación transcripcional se lleva a cabo mediante la acción de una proteína reguladora que recoge las señales del medio ambiente (efectores) y las traduce en un efecto sobre la expresión génica (Shingler, 1996). Hasta la fecha se han identificado un gran número de reguladores transcripcionales en procariotas, que se agrupan en diferentes familias de proteínas.

1.6.1 Elementos reguladores de la expresión génica

En muchas ocasiones, las señales del medio ambiente son recogidas por la célula gracias a proteínas auxiliares que generan una señal intracelular que está directamente relacionada con la transcripción (por ejemplo, sistemas de dos componentes); en otros casos la señal del medio puede influir directamente en la regulación de la transcripción, o incluso la actividad de los propios elementos de la ruta puede tener un papel regulador. Por tanto, hay que hablar de redes de señales integradas, que generan una regulación superpuesta a la regulación específica, como se resume en el esquema de la figura 1.9.

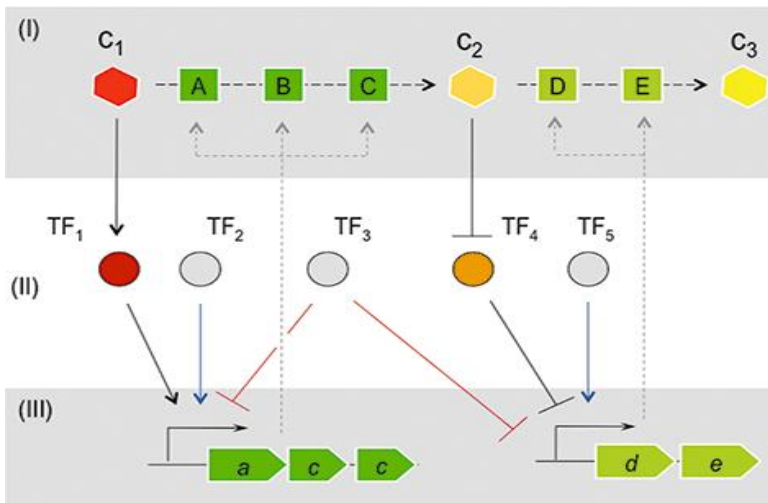


Figura 1.9. Flujo de señales a través de redes reguladoras típicas. La figura representa una red que controla una vía metabólica. (I) En la parte metabólica del sistema, el compuesto C_1 se convierte en C_3 por la acción de varias enzimas independientes (A, B, C, D y E) a través de la especie intermedia C_2 . Tanto C_1 como C_2 son moléculas de señal que desencadenan la expresión de las vías análogas. (II) En el nivel de factores transcripcionales (TF), las señales c_1 y c_2 son detectadas por TF específicos (TF_1 y TF_4 respectivamente) que pueden integrar entradas de reguladores globales (TF_2 , TF_3 y TF_5) para desencadenar la expresión de los dos operones. (III) Finalmente, a nivel de expresión génica, la unión/desunión de los diferentes TF determina la producción de enzimas que, a su vez, pueden retroalimentar el primer nivel (metabolismo). Tomado de (Silva-Rocha *et al.*, 2011).

Las proteínas reguladoras que controlan el catabolismo de compuestos aromáticos presentan una gran diversidad en sus orígenes evolutivos, lo que sugiere que los genes catabólicos y reguladores han evolucionado independientemente (Díaz & Prieto, 2000; Cases & de Lorenzo, 2005). Existen varias hipótesis para explicar la gran variedad de reguladores capaces de responder a señales similares de forma diferente. Una de ellas sería la combinación de dominios reguladores similares con motivos de unión a moléculas de estructura química parecida, pero con diferentes dominios de unión a secuencias de ADN. Otra posibilidad sería una diferencia a nivel del promotor, de forma que, aunque los reguladores muestren una arquitectura muy similar, podrían ser responsables de diferentes efectos en la célula dependiendo de la localización de los sitios de unión (regiones operadoras) en un promotor. Esto permitiría por ejemplo que un mismo regulador pueda activar ciertos genes cuando se une en una posición localizada en posición 5' con respecto de la región de unión de la ARN polimerasa, a la vez que pueda reprimir otros genes cuando se une en posición 3' respecto de dicha región. Todas estas posibilidades son las responsables del extraordinario grado de lasticidad y adaptabilidad que presentan las redes de regulación de las rutas de degradación en

bacterias (Díaz & Prieto, 2000; Tropel & van der Meer, 2004; Cases & de Lorenzo, 2005).

1.6.2. Regulación específica dependiente de efector

La expresión de los genes responsables de la degradación de compuestos aromáticos presenta generalmente una estricta regulación dependiente de sustrato. En la mayoría de los casos las rutas son inducidas por el sustrato que va ser utilizado como fuente de carbono y energía o por sus correspondientes metabolitos. Dentro de estos circuitos de regulación en bacterias anaerobias los más estudiados son probablemente los del catabolismo del benzoato en los microorganismos modelo *R. palustris* CGA009 y *Azoarcus* sp. CIB (Larimer *et al.*, 2004; Martín-Moldes *et al.*, 2015).

En *R. palustris*, se ha estudiado especialmente la agrupación génica *bad* para la degradación anaerobia de benzoato, organizada en varios operones. El papel del producto de los genes *badR*, perteneciente a la familia de MarR, y *badM* de la familia de Rrf2, en la regulación de esta ruta se ha esclarecido recientemente (Hirakawa *et al.*, 2015). La ruta del benzoato converge en esta cepa con la ruta de degradación del ciclohexano-1-carboxilato (genes *aliAB*). Contrariamente a lo establecido inicialmente (Egland & Harwood, 1999), es BadM quien regula el operón *badDEFGAB* reprimiendo su expresión en ausencia de sustrato, aunque parece que podrían existir otros elementos reguladores. Por su parte BadR reprimiría la expresión del operón *badHIaliBAbadK* uniéndose aguas arriba de su promotor. En respuesta al compuesto intermedio de la ruta 2-cetociclohexano-1-carboxil-CoA, BadR se despegaría del promotor, permitiendo su transcripción (Hirakawa *et al.*, 2015). También interviene en la regulación de esta ruta el regulador AadR, un homólogo de la proteína FNR de *E. coli*, y uno de los primeros reguladores descrito relacionado con el catabolismo anaerobio de compuestos aromáticos (Dispensa *et al.*, 1992; Egland & Harwood, 1999). AadR, que está controlada por el sistema FixLJ-K de regulación de funciones relacionadas con la respiración en condiciones de limitación de oxígeno (ver 1.6.3.1), controla la expresión de rutas del catabolismo anaerobio de compuestos aromáticos en respuesta a la transición de condiciones microaerófilas a anaerobias (Rey & Harwood, 2010). Por otra parte, CouR es un regulador homólogo a BadR que en esta cepa regula la ruta periférica del *p*-cumarato a benzoil-CoA, despegándose del promotor de *couAB* en presencia del producto *p*-coumaroil-CoA (Hirakawa *et al.*, 2012).

También en *R. palustris* se ha caracterizado el regulador HbaR, perteneciente a la familia Dnr dentro de la familia de reguladores transcripcionales FNR/Crp, que controla la transformación anaerobia de 4-hidroxibenzoato en benzoil-CoA. La ruta está codificada en cuatro unidades transcripcionales: *hbaR*, *hbaA* (4-hidroxibenzoato-CoA ligasa), *hbaBCD* (4-hidroxibenzoil-CoA reductasa) y *hbaEFGH* (probable transportador de tipo ABC). La proteína HbaR reconoce y une 4-hidroxibenzoato como molécula efectora, y actúa como activador del gen *hbaA*, pero no parece controlar la expresión de los genes responsables de la degradación aerobia de este compuesto (Egland & Harwood, 2000). HbaR por su parte parece estar controlado por AadR en respuesta a la concentración de oxígeno, lo que podría explicar las observaciones iniciales de AadR controlando la expresión de *hbaA* (Dispensa *et al.*, 1992).

Otra de la ruta más estudiada es la del tolueno en *T. aromatica* K172, donde los genes *tdiSR* codifican un sistema de dos componentes que controla la ruta periférica de degradación anaerobia de tolueno. Se transcriben en el mismo sentido que los genes catabólicos *bssDCAB* que codifican esta ruta (Coschigano & Bishop, 2004). TdiS es la histidin-quinasa sensora, que llevaría a cabo el reconocimiento del efector y TdiR es el activador que es fosforilado por TsiS (Leuthner & Heider, 1998). TdsR presenta el dominio HTH (del inglés Hélix-Turn-Helix) característico de la familia de FixJ/NarL. Este sistema presenta homología con las proteínas que regulan rutas catabólicas aerobias de tolueno (TodST) y de estireno (StySR), y se agrupan en una subfamilia de reguladores de dos componentes especializados en el control de rutas catabólicas de compuesto aromáticos (Busch *et al.*, 2007). Un sistema homólogo compuesto por TutBC regula la misma ruta en *T. aromatica* T1, codificada por *tutFDGH* (Coschigano & Young, 1997). La bacteria reductora de hierro *G. metallireducens* carece de este sistema de regulación en su ruta de degradación de tolueno. Sin embargo dos genes con homología a *xylR* (de la familia de NtrC, que regula la degradación aerobia de tolueno y xilenos en *P. putida* mt2 (Ramos *et al.*, 1997)), y *tetR*, respectivamente, se encuentran flanqueando a los genes *bss* y *bbs* para la degradación anaerobia de tolueno, por lo que podrían participar en la regulación de su expresión (Carmona *et al.*, 2009).

Otro ejemplo de regulación en bacteria desnitrificante es EtpR de *A. aromaticum* EbN1, que controla la expresión de los genes de las rutas catabólicas de *p*-etinol/*p*-hidroxiacetofenona así como un posible sistema de eflujo de disolvente presente en la agrupación génica. EtpR pertenece a la familia De NtrC de reguladores dependientes de σ^{54} y su extremo N-terminal es homólogo al de la proteína XylR que reconoce tolueno (Büsing *et al.*, 2015).

Azoarcus sp. CIB es probablemente la cepa en la que mejor se ha estudiado la regulación de la expresión de rutas anaerobias de degradación de aromáticos. De todos los sistemas caracterizados, cabe destacar la proteína BzdR, que presenta una arquitectura modular única que lo convierte en el miembro que da nombre a una nueva subfamilia de reguladores transcripcionales (Fig. 1.10) (Durante-Rodríguez *et al.*, 2013). BzdR es un represor de la expresión de los genes catabólicos del benzoato *bzd*, silenciando en ausencia de benzoato la expresión del promotor P_N que dirige la transcripción del operón *bzdNOPQMSTUVWXYZA* para la ruta completa de degradación de benzoato, y la de su propio promotor. Su inductor es el benzoil-CoA, intermediario central de la ruta (Durante-Rodríguez *et al.*, 2010).

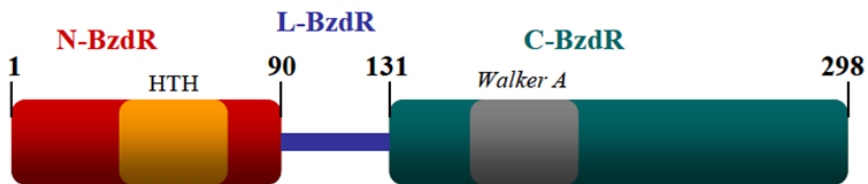


Figura 1.10. Arquitectura modular de la proteína BzdR. Representación esquemática de los dominios N-terminal (N-BzdR), C-terminal (C-BzdR) y linker (L-BzdR) del regulador transcripcional BzdR. Se representan en naranja y gris los motivos HTH y Walker A, respectivamente (tomado de (Durante-Rodríguez *et al.*, 2013).

BzdR tiene una estructura modular característica, donde el dominio N-terminal (NTD) presenta una estructura HTH de unión a ADN (C-BzdN), el dominio C-terminal (CTD) (C-BzdR) es el dominio de reconocimiento del efector benzoil-CoA que curiosamente muestra homología con una shikimato quinasa, y un linker transmite información entre ambos dominios (Fig. 1.10) (Barragán *et al.*, 2005). De esta forma cuando C-BzdR sufre un cambio conformacional por unión del efector, N-BzdR modifica su interacción con el promotor P_N permitiendo su activación (Durante-Rodríguez *et al.*, 2010). Además se ha identificado el gen *acpR*, cuyo producto muestra una elevada similitud con la proteína FNR de *E.coli* (Unden *et al.*, 2002), que participa en la regulación sobreimpuesta de la agrupación *bzd* por oxígeno (ver apartado 1.6.3.1).

Un homólogo de BzdR en *Azoarcus* sp. CIB es la proteína BoxR, que participa en la regulación de la ruta aerobia híbrida (ruta *box*) descrita anteriormente para el benzoato. El gen *boxR* está presente en todas las agrupaciones de genes *box* identificadas hasta ahora en bacterias, por lo que parece ser una sistema generalizado para controlar esta vía. Es interesante señalar que los reguladores

BoxR y BzdR actúan de forma sinérgica para controlar la expresión tanto de los genes *box* como de los *bzd* (Valderrama *et al.*, 2012).

Otro regulador caracterizado en *Azoarcus* sp. CIB es GcdR, que regula la ruta inferior de degradación del benzoato. GcdR es un regulador de la familia de LysR que se transcribe de forma divergente a su gen diana *gcdH* que codifica una glutaril-CoA deshidrogenasa, que es esencial para el catabolismo anaeróbico de muchos compuestos aromáticos y algunos ácidos alicíclicos y dicarboxílicos. GcdR presenta afinidad por glutamato y glutaconato, los sustrato de la enzimas GcdH (Blázquez *et al.*, 2008).

1.6.3. Regulación global

La mayoría de los reguladores globales implicados en la degradación de compuestos aromáticos han sido descritos en rutas aerobias (Marqués *et al.*, 2006; Carmona *et al.*, 2008; Moreno & Rojo, 2008), pero existen ejemplos conocidos y caracterizados en procesos anaerobios. Las dos señales ambientales mejor estudiadas de la regulación sobreimpuesta en rutas anaerobias son la presencia o ausencia de oxígeno y la disponibilidad de fuentes alternativas de carbono. Estas señales son integradas por reguladores globales que modifican la expresión de los genes catabólicos anaerobios actuando de forma directa sobre ellos o indirectamente al modificar la expresión de reguladores transcripcionales específicos.

1.6.3.1 Regulación mediada por presencia de oxígeno

El oxígeno representa uno de los principales factores medioambientales que controla la expresión de las rutas anaerobias de compuestos aromáticos. Por ejemplo, los niveles de expresión de los genes *badDEFG* y *badA* de *R. palustris*, que codifican las cuatro subunidades de la enzima BCR y la benzoato-CoA ligasa, respectivamente, disminuyen en condiciones aerobias (Egland *et al.*, 1997; Peres & Harwood, 2006). En el caso de *T. aromatica*, la expresión de la enzima BCR disminuye fuertemente cuando las células crecen en condiciones aerobias (Heider *et al.*, 1998). Los genes *bss* que codifican la bencilsuccinato sintasa implicada en la degradación de tolueno en *Magnetospirillum magnetotacticum* TS-6 únicamente se transcriben si las células se cultivan anaeróticamente en presencia de tolueno (Shinoda *et al.*, 2005). Recíprocamente, en *A. aromaticum* EbN1 la inducción de un número de proteínas implicadas en la degradación aerobia de benzoato se reduce considerablemente en anaerobiosis en presencia de benzoato (Wöhlbrand *et al.*, 2007)

Sin embargo, también se observa expresión de proteínas sensibles a oxígeno en condiciones aerobias, como por ejemplo la BCR de *M. magnetotacticum* TS-6 (Shinoda *et al.*, 2005) o la bencilsuccinato sintasa de *Thauera* sp. DNT-1 (Shinoda *et al.*, 2004). Por lo tanto, todo parece indicar que cada organismo ha desarrollado una estrategia reguladora distinta para la expresión dependiente de oxígeno de las agrupaciones génicas responsables del catabolismo de compuestos aromáticos. La expresión de los genes aerobios en condiciones anaerobias y la de los genes anaerobios en condiciones aerobias sería el resultado bien de un escape en la regulación específica, o bien de un mecanismo desarrollado por los microorganismos anaerobios facultativos para mantener niveles enzimáticos basales que faciliten una respuesta inmediata ante fluctuaciones en los niveles de oxígeno (Fuchs, 2008). Un ejemplo de ausencia de regulación dependiente de oxígeno es el hecho de que una única benzoato-CoA ligasa inicia tanto el metabolismo aerobio como el anaerobio del benzoato en *T. aromatica* y *Magnetospirillum* spp. (Schühle *et al.*, 2003; Kawaguchi *et al.*, 2006).

En apartados anteriores se ha mencionado la existencia de proteínas similares a FNR llamadas AadR y AcpR, que juegan un papel esencial en la activación de algunas rutas de degradación de aromáticos dependiendo de la presencia o ausencia de oxígeno. En el caso de AadR se ha observado que actúa reprimiendo la expresión de diversas dioxigenasas que emplean oxígeno como cosustrato para su catálisis (Rey & Harwood, 2010). Sin embargo a pesar de la similitud entre FNR, AadR y AcpR a nivel de secuencia y de mecanismo de acción, todo parece indicar que las tres proteínas no juegan el mismo papel en los correspondientes microorganismos hospedadores. La ausencia de FNR en *E. coli* tiene consecuencias pleiotrópicas en la expresión de un cierto número de genes, que da lugar por ejemplo a la incapacidad de la cepa mutante de crecer utilizando nitrato o fumarato como aceptores finales de electrones (Unden *et al.*, 1995).

En estudios recientes se ha identificado en *R. palustris* el sistema FixLJ-FixK que es clave para la expresión de los módulos metabólicos de la fotosíntesis, la respiración microaerobia, el metabolismo del carbono y la autotrofia en respuesta al bajo nivel de oxígeno. FixK es un regulador global que funciona en coordinación con un sistema sensor transmembrana codificado por los genes *fixJL*, y que activa diferentes promotores implicados en la fotosíntesis y en crecimiento en condiciones de microaerofilia (Fig. 1.11), además de activar el promotor de *aadR*. De esta forma se establece un doble mecanismo de regulación para proteger las enzimas sensibles al oxígeno implicadas en la degradación anaerobia de benzoato y 4-

hidroxibenzoato, con AadR ejerciendo un control más estricto que FixLJ-FixK (Rey & Harwood, 2010).

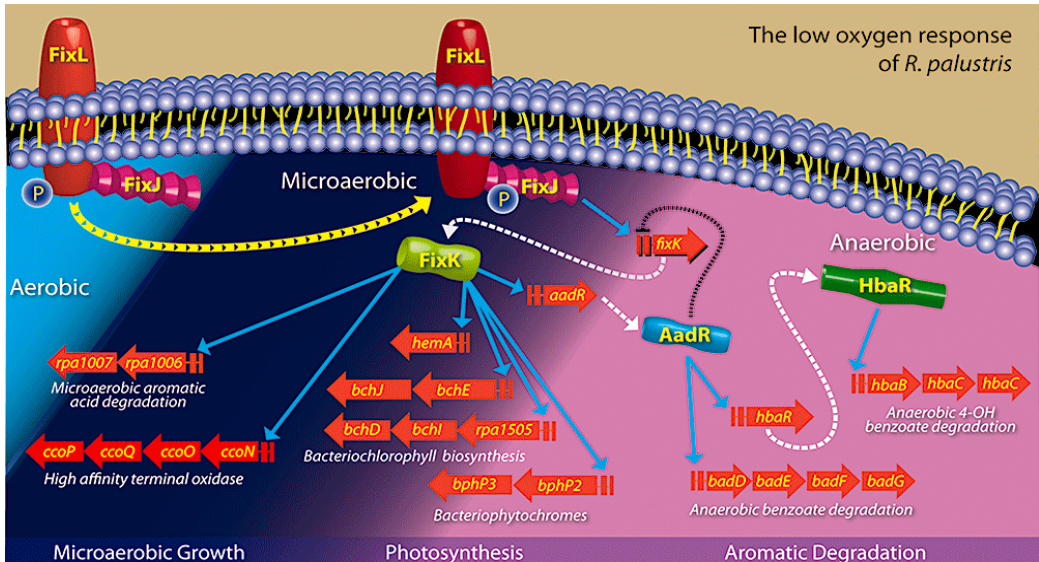


Figura 1.11 Esquema del mecanismo de acción del sistema FixLJ-FixK en respuesta a la concentración de oxígeno en *R. palustris*. La transición de las células de condiciones aerobias, microaerófilas y anaerobias se indica de izquierda a derecha. En condiciones microaerófilas, FixJ fosforilada activa la expresión de FixK, que luego activa la expresión de genes para la fotosíntesis y la respiración microaerófila. FixK también activa la expresión de *rpa4249*, un modulador negativo de la cascada de señalización FixLJ-FixK (no se muestra) y *aadR*, que codifica un regulador transcripcional que detecta anaerobiosis y activa la expresión de genes de degradación anaerobia de compuestos aromáticos. Estos incluyen el regulador HbaR, que se requiere para la expresión de genes de degradación de 4-hidroxibenzoato. Tomado de (Rey & Harwood, 2010).

1.6.3.2. Regulación por sustratos alternativos (represión catabólica)

El control del catabolismo dependiente de la disponibilidad de fuentes de carbono es uno de los mecanismos fundamentales de regulación en bacterias y confieren una ventaja adaptativa al establecer prioridades en el metabolismo del carbono. El término represión catabólica, o represión por catabolito, agrupa al conjunto de procesos reguladores que permiten que la expresión de las rutas catabólicas para la degradación de compuestos no preferidos estén silenciados cuando las bacterias está expuestas a una fuente de carbono preferida, incluso en presencia del inductor específico (Díaz & Prieto, 2000; Rojo & Alejandro Dinamarca, 2004; Carmona *et al.*, 2008)). Hablamos de fuente de carbono

preferidas cuando son de fácil asimilación e incorporación al metabolismo bacteriano, y no requieren un coste energético inicial muy elevado para su catabolismo. La represión catabólica por carbono en el catabolismo aerobio de compuestos aromáticos ha sido ampliamente estudiada y algunos de los elementos reguladores implicados han sido caracterizados en diferentes bacterias (Collier *et al.*, 1996; Shingler, 2003; Marqués *et al.*, 2006; Ohtsubo *et al.*, 2006; Moreno & Rojo, 2008; Rojo, 2010).

El control del catabolismo anaerobio de compuestos aromáticos por represión catabólica se conoce poco. Se ha descrito en *T. aromatica* y *Azoarcus sp.* CIB que algunos ácidos orgánicos como succinato, malato y acetato reprimen la expresión de genes implicados en la degradación anaerobia de compuestos aromáticos (Heider *et al.*, 1998; López Barragán *et al.*, 2004). Por el contrario en *A. aromaticum* EbN1, los compuestos aromáticos son fuentes de carbono preferidas sobre los ácidos orgánicos alifáticos (Trautwein *et al.*, 2012). Algo ligeramente diferente ocurre en *Magnetospirillum sp.* pMbN1, donde la utilización de benzoato en anaerobiosis tienen preferencia sobre la de 4-metilbenzoato, y benzoato y succinato se utilizan simultáneamente (Lahme *et al.*, 2014). En *Thauera aromatica* AR-1, la presencia (y utilización) de benzoato, que ocurre por la vía clásica del benzoil-CoA, reprime la utilización de 3,5-DHB, que se degrada por una vía oxidativa diferente (ver 1.5.2) (Philipp & Schink, 2000, 2012). Esta serie de observaciones parece indicar que en anaerobiosis estas cepas prefieren las rutas que transcurren con el benzoil-CoA como compuesto intermedio central (Lahme *et al.*, 2014).

Recientemente se ha caracterizado a AccR como el primer regulador global del catabolismo anaerobio de compuestos aromáticos en bacterias. Es un regulador de respuesta de la familia FixJ/NarL, que en anaerobiosis media el control de la represión catabólica mediada por succinato sobre las vías centrales del catabolismo de compuestos aromáticos como benzoato, 3-metilbenzoato, *m*-xileno o 3-hidroxibenzoato en *Azoarcus sp.* CIB (Valderrama *et al.*, 2014). En respuesta a una señal desconocida, AccR se autofosforila en un residuo de aspártico, lo que provoca un cambio en su estado oligomérico de monómero a dímero. En estas condiciones, se ha demostrado la unión del regulador fosforilado al promotor P_N que controla la expresión de la ruta de degradación de benzoato (ver 1.3). Se ha detectado la presencia de ortólogos AccR en los genomas de varias cepas de *Azoarcus* y *Thauera*, lo que indicaría que AccR es probablemente el mediador global del control catabólico mediado por carbono para la asimilación anaerobia de compuestos aromáticos en este grupo de betaproteobacterias (Valderrama *et al.*, 2014).

1.7. Reguladores transcripcionales de la familia de LysR

La familia LTTR representa el grupo más numeroso de reguladores transcripcionales en procariotas hasta la fecha, con más de 3800 miembros identificados, y aumentando (Pareja *et al.*, 2006; Monferrer *et al.*, 2010). La familia LTTR debe su nombre a la proteína LysR, activadora del gen *lysA* implicado en la síntesis de lisina (Stragier *et al.*, 1983). Este grupo de reguladores se identificó como tal por primera vez en 1988 (Henikoff *et al.*, 1988). Los miembros de la familia LTTR están presentes en la mayoría de géneros de procariotas y regulan la transcripción de genes implicados en multitud de funciones metabólicas, que incluyen biosíntesis de aminoácidos, resistencia a antibióticos, degradación de compuestos aromáticos, respuesta al estrés oxidativo, respuesta a la limitación de nitrógeno, a la síntesis de factores de virulencia, entre otras. Curiosamente, a pesar de la diversidad de genes diana controlados por LTTR, la mayoría de los reguladores comparten al menos un 20% de identidad de secuencias de aminoácidos en toda la longitud de la proteína (Schell, 1993). La mayor homología de secuencia se encuentra en el extremo NTD (dominio de unión de ADN, ver más adelante), y es bastante inferior en el extremo C-terminal, aunque sí presentan una notable homología estructural (Momany & Neidle, 2012). Inicialmente los LTTR se describieron como activadores transcripcionales de los genes que se localizaban divergentemente a su propio gen, y que ejercían una autorregulación negativa sobre su propio promotor al unirse al mismo sitio necesario para la activación del promotor divergente (Tropel & van der Meer, 2004). Actualmente se conocen bastantes casos en los que la organización es diferente (ver 1.7.2).

Estas proteínas suelen tener un peso molecular de entre 32 y 37 kDa y su forma activa es la de un tetrámero (Tropel & van der Meer, 2004). Esto no siempre se corresponde con el estado oligomérico de estas proteínas en solución, pudiendo existir el regulador en forma dimérica o monomérica y adquiriendo una conformación de tetrámero al interactuar con el ADN donde desarrollan su función, generalmente en presencia de una molécula inductora o efector (Monferrer *et al.*, 2010). También se ha descrito que CrgA de *Neisseria meningitidis*, implicada en el contacto bacteria hospedador, tiene conformación octamérica tanto en solución como unida a ADN (Sainsbury *et al.*, 2009). Igualmente, se ha sugerido que tetrámeros de ThnR, que controla la degradación de tetralina en *Sphingomonas macroglotabida*, pueden formar estructuras de orden superior (López-Sánchez *et al.*, 2009).

1.7.1 Estudios estructurales de LTTRs

En los últimos años se están descubriendo y caracterizado un número creciente de LTTR. No obstante, el mecanismo detallado de regulación transcripcional por LTTR sigue sin estar bien resuelto, en parte debido a la falta de estructuras cristalizadas de proteínas completas unidas a su promotor y/o al efector. Con el fin de conocer los mecanismos de regulación de esta familia, se han realizado grandes esfuerzos para caracterizar los reguladores a nivel molecular. Igualmente, ha aumentado notablemente el número de estructuras de proteínas completas disponibles, así como unidas a ADN o efector (Monferrer *et al.*, 2010; Zhou *et al.*, 2010; Devesse *et al.*, 2011; Alanazi *et al.*, 2013; Jo *et al.*, 2015; Vadlamani *et al.*, 2015; Lerche *et al.*, 2016; Puneekar *et al.*, 2016; Koentjoro *et al.*, 2018). Sin embargo la baja solubilidad de los LTTR dificulta la producción de altas concentraciones de proteína, dificultando la obtención de cristales de estas proteínas, además de la flexibilidad de su estructura, que afecta al proceso de cristalización (Stec *et al.*, 2004; Monferrer *et al.*, 2010). Por otra parte, la necesidad de utilizar altas concentraciones de sal en el tampón también dificulta la determinación estructural de LTTR en complejo con sus ligandos naturales.

CbnR, el primer miembro de la familia cuya estructura se caracterizó como proteína completa, regula la expresión de genes responsables de la degradación del clorocatecol en *Ralstonia eutropha* NH948 (Muraoka *et al.*, 2003). De este trabajo se dedujo que la estructura típica en estado de monómero de los LTTR comprende aproximadamente 300 residuos de aminoácidos que contienen dos dominios principales unidos por una hélice larga que conecta un dominio regulatorio C-terminal (regulatory domain, RD) y un dominio de unión a ADN más pequeño de tipo α -hélice-giro- α -hélice alado (winged helix-turn-helix, wHTH) (ADN-binding domain, DBD). Este dominio de unión a ADN es característico de esta familia de reguladores y presenta tres hélices alfa y dos láminas beta que forman una horquilla. La segunda y la tercera hélice son las que interaccionan de forma directa con el ADN. El dominio regulador RD comprende dos subdominios plegables (RD1 y RD2) conectados entre sí por dos hojas β en forma de bisagra, que permite captar las moléculas activadoras (efectores) en la cavidad que se genera en la interfase RD1-RD2 (cavidad de unión del inductor (IBC)) (Fig. 1.12) (Ezezika *et al.*, 2007; Lerche *et al.*, 2016).

Esta organización en subdominios les confiere a estas proteínas una enorme flexibilidad, que les permite adoptar distintas conformaciones atendiendo a las señales recibidas, con consecuencias importantes sobre su actividad (Momany & Neidle, 2012).

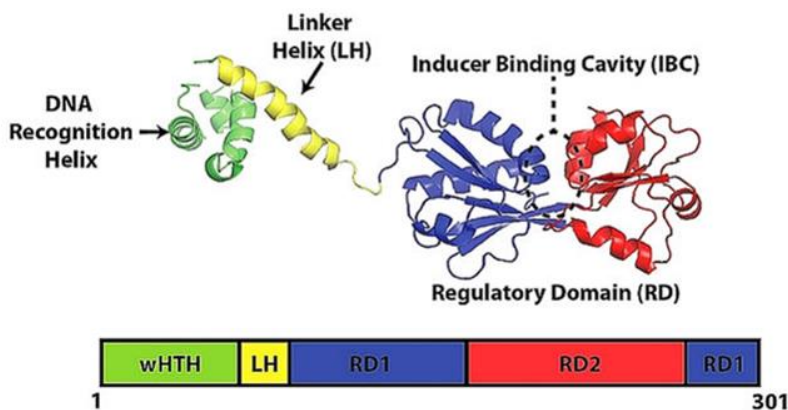


Figura 1.12. Modelo de estructura de los dominios en los reguladores LTTR. En el extremo N-terminal se encuentra el dominio wHTH (DBD) unido por una hélice que conecta al dominio regulador, a su vez dividido en dos subdominios RD1/RD2. Entre ambos se localiza una cavidad de unión al ligando (IBC). El código de colores de los segmentos de la secuencia se corresponden con los colores en la estructura; se puede observar que la estructura de RDI se constituye a partir de dos segmentos discontinuos de secuencia (Tomado de Lerche *et al.*, 2016).

1.7.2 Mecanismos de acción de LTTR

Los promotores regulados por proteínas de la familia de LysR presentan algunas características comunes: presentan dos sitios diferenciados de unión al regulador, situados en diferentes posiciones con respecto al punto de inicio de la transcripción. El primero se denomina sitio de unión regulatorio (*regulatory* o *recognition binding site*, RBS, inicialmente llamado también sitio represor), que suele estar centrado en posición -65 con respecto al inicio de la transcripción, aunque esto no siempre es así. El segundo sitio se denomina sitio de unión activador (*activation-binding site*, ABS) y puede encontrarse en cualquier lugar aguas abajo del RBS (Maddocks & Oyston, 2008). Los sitios RBS poseen una secuencia consenso T-N₁₁-A, conocido como "motivo LTTR" o "caja LTTR", del que se sugiere que interactúa con un dímero del regulador y cuyos extremos palindrómicos pueden contener secuencias conservadas más o menos largas (Schell, 1993). Los sitios ABS no presentan una secuencia palindrómica conservada y generalmente tienen menos afinidad por la proteína reguladora que los RBS (Porrúa *et al.*, 2013). Los modelos actuales proponen que en el sitio RBS ocurre la unión permanente de un dímero del regulador, y que esto no siempre se cumple en el sitio ABS, siendo considerado éste como el sitio responsable directo de la función de control de la transcripción (Maddocks & Oyston, 2008).

La mayoría de los LTTR funcionan detectando la presencia de moléculas pequeñas (efectores) y transmiten las señales de unión del ligando a la activación o represión transcripcional. Sin embargo, en general, la presencia de efectores es prescindible para la unión de los reguladores a sus promotores diana, y la afinidad de unión de las proteínas al ADN puede o no alterarse tras la unión de los efectores (Schell, 1993; Bundy *et al.*, 2002; Porrúa *et al.*, 2007). CatR de *Pseudomonas putida* es un buen ejemplo de cambios en respuesta a la interacción con un efector, donde en ausencia de su efector, el regulador sólo se une al RBS, mientras que su interacción con el ABS ocurre una vez que el inductor está unido (Chugani *et al.*, 1997a; Tover *et al.*, 2000). Hay excepciones a este modelo. Por ejemplo la proteína Nac de control de asimilación de nitrógeno de *Klebsiella pneumoniae*, que regula la expresión de un gran número de genes relacionados en su mayoría con el metabolismo del nitrógeno, se encuentra siempre en forma activa y no depende de la presencia de un efector, activando sus promotores diana en función de su concentración en la célula (controlada a su vez por un promotor dependiente de σ^{54} y NtrC y también autorregulada negativamente) (Bender, 2010).

Son pocos los ligandos de LTTR identificados hasta la fecha. En la mayoría de los casos suele ser el compuesto a metabolizar por la ruta regulada o algún intermediario de la misma. En algunos casos, los LTTR pueden reconocer más de un efector simultáneamente, como se demostró para BenM de *Acinetobacter baylyi* ADP1 (Ezezika *et al.*, 2007), y más recientemente para DntR de *Burkholderia* sp. (Lonneborg & Brzezinski, 2011). En otros casos el proceso es más complejo, como en OxyR de *E. coli*, proteína de respuesta estrés que detecta bajos niveles de peróxido de hidrógeno en la célula. En este caso, la unión del peróxido de hidrógenos a un residuo Cys en el dominio regulador de OxyR da rápidamente lugar a la formación de un puente disulfuro intramolecular, lo que implica un cambio drástico en la conformación de la proteína esencial para su activación (Jo *et al.*, 2015).

Como hemos dicho, los mecanismos de control de la transcripción mediados por LTTR no están aún bien establecidos. El modelo clásico es el de autorregulación negativa y activación de la transcripción, típico de LTTR que se transcriben de forma divergente al gen u operón que controlan. Sin embargo podemos decir que actualmente la visión de la organización de estos reguladores y sus promotores diana es mucho más diversa de la idea inicial. En general, cada vez es mayor el número de reguladores descritos que no se transcriben de forma divergente a sus promotores dianas, de los que son activos sobre varios promotores localizados en cualquier parte del genoma (Tropel & van der Meer, 2004; Zhang &

Anderson, 2012; Reen *et al.*, 2013; Breddermann & Schnetz, 2017) y también de reguladores que actúan como represores o activadores transcripcionales, y que se autorregulan positivamente. LrhA de *E. coli*, un LTTR con funciones pleiotrópicas, es un ejemplo de este tipo de LTTR (Lehnen *et al.*, 2002). Según el modelo de autorregulación negativa, la secuencia intergénica entre el gen regulador y su gen diana posee un único sitio RBS donde un dímero de la proteína LysR se une permanentemente de forma independiente de efector, solapando con el sitio de unión de la ARN polimerasa para el gen regulador divergente. La unión del segundo dímero a la región ABS es más débil, y en presencia de efector la proteína sufre un cambio conformacional, permitiendo el acceso a la ARN polimerasa y la transcripción del gen diana (Maddocks & Oyston, 2008). Se han propuesto varios mecanismos por los que se puede activar la transcripción del gen diana en presencia de inductor. La subunidad α de la ARN polimerasa podría interactuar directamente con el complejo regulador, y esta interacción dependería en gran medida de la unión del regulador al sitio ABS, que aumentaría la afinidad de la polimerasa por el promotor (Chugani *et al.*, 1997b). El ángulo de la curvatura del ADN también parece ser un factor clave en la regulación de la transcripción. De este modo, el complejo regulador, unido permanentemente a los sitios RBS y ABS del promotor, sufriría un cambio conformacional en presencia de la molécula efectora pasando de estructura extendida a estructura compacta, desplazándose el dímero situado sobre la región ABS, lo que relajaría el ángulo de la curvatura del ADN, permitiendo así una mejor transcripción del gen diana (Monferrer *et al.*, 2010). Este mecanismo está estrechamente relacionado con la hipótesis del dímero deslizante, descrito en promotores donde se encuentran varias regiones ABS desplazadas unos pocos nucleótidos unas de otras y con diferente afinidad por el complejo regulador, como por ejemplo en el caso de la regulación por AtzR del promotor responsable de la degradación de atracina en *Pseudomonas putida* sp. cepa AD (Porrúa *et al.*, 2007). Esta hipótesis propone que el cambio conformacional sufrido por el regulador en presencia de la molécula efectora altera su afinidad por los ABS y "desliza" el dímero de un sitio ABS a otro, lo que se traduciría en una relajación del ángulo de la curvatura del ADN y una activación de la transcripción (Porrúa *et al.*, 2007; Porrúa *et al.*, 2010). De los distintos estudios estructurales de proteínas de la familia se deduce que los cambios estructurales que produce la unión de efector en el dominio RD tienen como consecuencia reorientaciones importantes en el dominio DBD, esenciales para el deslizamiento del regulador en su promotor diana (Jo *et al.*, 2015; Lerche *et al.*, 2016; Koentjoro *et al.*, 2018). La proteína Nac de *K. pneumoniae* sería de nuevo una excepción a este modelo, ya que es capaz de activar o reprimir algunos de sus promotores diana como dímero y otros como tetrámero (Bender, 2010).

Además, la arquitectura de sus promotores diana es variable, encontrándose los sitios RBS y ABS en algunos casos adyacentes, en otros separados por una vuelta de hélice y en otros por varias vueltas de hélice. En los dos primeros casos es la distancia entre los sitios de unión la que determina que Nac se una con una conformación extendida o compacta, semejante al modelo clásico, para la activación/represión. Sin embargo en el tercer caso la unión de un tetrámero en cualquiera de sus conformaciones implica la formación un bucle en el ADN entre los dos sitios de unión. Un ejemplo de regulación de genes que no se transcriben divergentemente es LigR de *Sphingobium sp.* SYK-6. LigR activa la transcripción de los operones *ligK-orf1-ligI-lsdA* y *ligJABC* en presencia de proptocatecuato (PCA) o galato (GA), que son intermediarios de la ruta, y reprime la activación de su propio gen. LigR se une a los promotores de *ligK* y *ligJ*, e induce la curvatura del ADN. En presencia de PCA o GA, aumenta la curvatura del ADN en ambos promotores, y las regiones protegidas por LigR de los promotores de *ligK* y *ligJ* se extienden o acortan, respectivamente (Kamimura *et al.*, 2010). Varios reguladores de esta familia participan en el control de la expresión de rutas aerobias de degradación de compuestos aromáticos. Algunos ejemplos son CbnR que regula la ruta de degradación de 3-clorocatecol en *Cupriavidus necator* (Koentjoro *et al.*, 2018), DntR la de 2,4-dinitrotolueno en *Burkholderia sp.* (Lonneborg & Brzezinski, 2011), BenM y CatM la de degradación de aromáticos como benzoato en *A. baylyi* ADP1, controlando además varios genes de la ruta del β -keto adipato, NahR la de degradación de naftaleno de *Pseudomonas* (Schell & Faris Poser, 1989), TsaR la de *p*-toluensulfonato en *Comamonas testosteroni* T-2 (Monferrer *et al.*, 2010), AtzR la de ácido cianúrico en *Pseudomonas sp.* ADP (Porrúa *et al.*, 2007). En el caso de rutas anaerobias de compuestos aromáticos son menos los reguladores de LTTR que se conocen. Un ejemplo es GcdR de *Azoarcus sp.* CIB (ver 1.6.2). GcdR se produce en una conformación inactiva que en presencia de los posibles inductores (glutamato y glutaconato) se activa y activa el promotor de *gcdH* (Blázquez *et al.*, 2008). Algunos LTTRs de rutas catabólicas han sido cristalizados y se dispone de su estructura. De todas las proteínas con estructuras disponibles, es TsaR la que presenta una mayor identidad con la secuencia del regulador de la familia de LysR identificado en la ruta de degradación de 3,5 DHB de *T. aromatica*, con un 28% de identidad. El análisis de este regulador, que denominamos DbdR, es uno de los objetivos de esta tesis.

1.8. Reguladores transcripcionales de la familia de NtrC (bEBPs).

Los genomas bacterianos codifican distintos factores sigma de transcripción, que dirigen la unión selectiva de la holoenzima de la ARN polimerasa ($E\sigma$) a promotores específicos (Ishihama, 2000). Dos familias de factores sigma

determinan la especificidad de la ARN polimerasa por el promotor: la familia σ^{70} (RpoD) y la familia σ^{54} (RpoN). El factor σ^{70} está generalmente dedicado a la transcripción de genes esenciales para el mantenimiento de las funciones celulares; otros factores sigma de esta familia se han relacionado con procesos celulares más específicos, como σ^{32} para la respuesta a choque térmico, σ^{38} para fase estacionaria y respuesta a estrés, σ^{24} involucrado en el mantenimiento de la integridad de la envuelta celular, y numerosos factores sigma extracitoplásmicos que intervienen en la respuesta a estímulos periplásmicos y extracelulares (Gruber & Gross, 2003).

1.8.1. La ARN polimerasa dependiente de σ^{54} .

El factor σ^{54} es el único miembro conocido de su familia y dirige el núcleo de la ARN polimerasa a promotores de arquitectura y secuencia muy diferentes a las de promotores dependientes de σ^{70} . Las funciones que regula este factor sigma son muy diversas, incluyendo virulencia, fijación de nitrógeno, respuesta a estrés, disponibilidad de fuentes de carbono alternativa, etc. (Shingler, 2011). La ARN polimerasa con σ^{54} ($E\sigma^{54}$) se une a las secuencias -12 y -24 con respecto al inicio de la transcripción (+1), con el consenso TTGGCACG-N₄-TTGC característicos de estos promotores (Barrios *et al.*, 1999). Al contrario de lo que ocurre con los factores sigma de la familia σ^{70} , en una transcripción controlada por $E\sigma^{54}$, esta holoenzima es incapaz de isomerizar espontáneamente el ADN de doble cadena de complejo cerrado a complejo abierto, requisito necesario para el inicio de la transcripción. El conjunto $E\sigma^{54}$ -promotor requiere de la hidrólisis de ATP por un regulador de tipo bEBP (ver 1.8.2) para producir los cambios conformacionales necesarios para la transición (isomerización) a complejo abierto y dar paso al inicio de la transcripción (Wigneshweraraj *et al.*, 2008).

1.8.2. bEBPs, activadoras de promotores dependientes de σ^{54} .

Los reguladores transcripcionales que activan a la ARN polimerasa con el factor σ^{54} pertenecen a la familia De NtrC, denominados actualmente bEBPs (del inglés *bacterial Enhancer-Binding Proteins*) por su similitud con el sistema de la ARN polimerasa II de eucariotas, ya que sus sitios de unión se localizan a cierta distancia aguas arriba del sitio de unión de la ARN polimerasa e implica una fuerza mecánica generada por la hidrólisis de ATP para activar la transcripción (Rappas *et al.*, 2007; Wigneshweraraj *et al.*, 2008; Shingler, 2011). Las bEBPs se incluyen dentro de la superfamilia AAA+ (de ATPasas asociadas con diversas actividades celulares) por contener un dominio central característico que reconoce e hidroliza ATP (Schumacher *et al.*, 2006; Chen *et al.*, 2008).

Las bEBPs son proteínas modulares de unos 300 aminoácidos que en general constan de tres dominios (Schumacher *et al.*, 2006). El dominio regulador NTD (dominio R) tiene un papel en la percepción de la señal y modula la actividad de la bEBP. El dominio central AAA+ (dominio C) es responsable de la hidrólisis del ATP; es indispensable y a menudo suficiente para activar la transcripción dependiente de σ^{54} . Por último, el CTD de unión al ADN (dominio D) contiene un motivo HTH que permite el reconocimiento específico de su secuencia diana, denominada UAS (del inglés upstream activating sequence) (Fig 1.13).

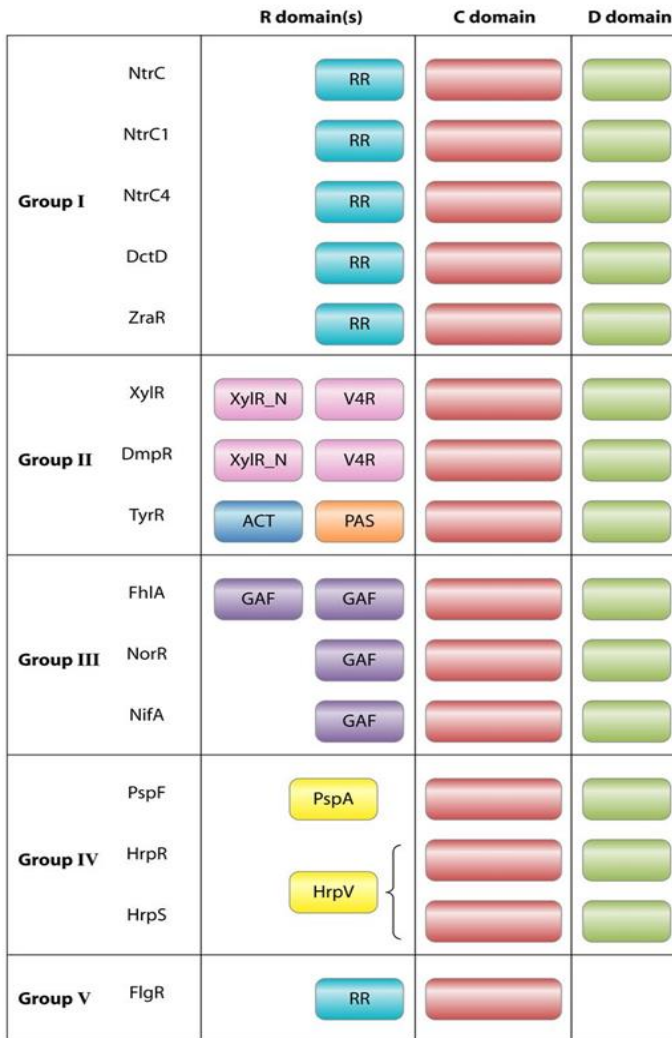


Figura 1.13. Arquitectura de dominios de los cinco grupos de bEBPs. El dominio central AAA+ (C, rojo) está muy conservado y es absolutamente esencial para la transcripción dependiente σ^{54} . El dominio C-terminal de unión a ADN (D, verde) consiste en un motivo HTH que dirige la bEBP a sitios de unión específicos (UAS) y está ausente en los bEBPs del grupo V. El dominio regulador N-terminal (R) no está conservado entre los miembros de la familia de bEBPs y puede contener diferentes dominios sensores dependiendo de la señal ambiental que se detecte. Este dominio está ausente en las bEBPs del grupo IV, siendo otra proteína la que recibe y transfiere la señal. Las bEBPs del grupo I contienen un dominio regulador de respuesta (RR) (azul). Las bEBPs del Grupo II contienen dominios Per, ARNT y PAS (naranja) o XylR-N y V4R (vinil 4 reductasa) (rosa). Las bEBPs del grupo III contienen dominios GAF (violeta). HrpR y HrpS (grupo IV) son coactivadores de la transcripción y se muestran agrupados (Tomado de Bush & Dixon, 2012).

Los dominios NTD y central están conectados por una α -hélice de unión anclando el linker B. Sin embargo, no todos los activadores dependientes de σ^{54} presentan los tres dominios. Aunque siempre se conserva el dominio central, algunas bEBPs carecen del dominio regulador o del dominio de unión a ADN. Los dominios reguladores no están conservados, y pueden contener una variedad de motivos sensores atendiendo a la señal que detectan. En consecuencia, la familia de bEBPs se ha dividido en cinco grupos en función de la organización de los tres dominios (Fig 1.14) (Bush & Dixon, 2012). De forma excepcional, se han descrito algunas bEBPs que controlan promotores dependientes de σ^{70} (Ghosh *et al.*, 2010).

El dominio central de las bEBPs (dominio AAA+) es responsable de la unión de ATP y de su hidrólisis, de la oligomerización de la proteína y de la interacción con el factor σ^{54} . Es el más conservado de los tres dominios y posee siete regiones altamente conservadas, C1 a C7 (Morett & Segovia, 1993), que incluyen los motivos Walker A y B de unión e hidrólisis de ATP y las regiones sensoras I y II características de las proteínas AAA+ (Fig. 1.14). Si bien muchas de las características estructurales de este dominio son comunes a la superfamilia AAA+, este dominio en las bEBPs contiene dos inserciones únicas que forman bucles flexibles expuestos a la superficie. El bucle 1 (L1, loop1) se forma a partir de una inserción que sobresale de una hélice α en la región C3, donde se encuentra el motivo GAFTGA altamente conservado que en la forma activa de la proteína está expuesto y permite el contacto con $E\sigma^{54}$ (Rappas *et al.*, 2007). La conformación de este bucle cambia drásticamente tras la unión de ATP a la proteína y posterior hidrólisis a ADP. El bucle 2 (L2, loop 2) se inserta entre C5 y C6 y participa asistiendo a L1 en el contacto con $E\sigma^{54}$ (Shingler, 2011; Bush & Dixon, 2012). Se propone que el cambio de conformación de los bucles promueve la remodelación del complejo cerrado de $E\sigma^{54}$ con el promotor, dando lugar al inicio de la transcripción (Chen *et al.*, 2010).

El CTD (dominio D) presenta un motivo HTH de tipo Fis de proteínas de unión a ADN que incluye la hélice de reconocimiento (hélice D) del surco mayor del ADN, respaldado por una tercera hélice (hélice B). El dominio HTH dirige la unión del activador a los sitios diana en el promotor, asegurando así una respuesta específica. Una cuarta hélice (hélice A) de longitud variable es importante en muchas bEBPs para la formación de dímeros de este dominio y ayuda a mantener la distancia adecuada entre las dos hélices de reconocimiento del dímero para unirse a dos surcos mayores consecutivos en el ADN (Vidangos *et al.*, 2014) (Fig.1.15).

La unión al ADN facilita la isomerización de la bEBP a hexámero y su estabilización, manteniendo la fidelidad regulatoria del dominio R.

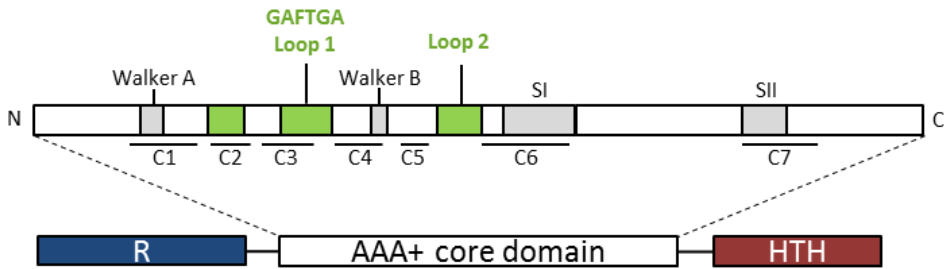


Figura 1.14. Esquema del dominio central (AAA+) de las bEBPs. Las regiones marcadas en gris son comunes a todos los miembros de la familia AAA+ (el motivo “Walker A” que participa en la unión del nucleótido; el motivo Walker B que participa en la hidrólisis del nucleótido y en la coordinación del ion magnesio; y los dominios sensores SI y SII). Las regiones específicas de bEBPs están marcadas en verde (incluyen el motivo GAFTGA, los bucles 1 y 2 (loops 1 and 2) y la región conservada C2). En rojo y azul se señalan los dominios C-terminal con el motivo HTH de unión a ADN, y el dominio regulador N-terminal, respectivamente, que constituyen la bEBP completa. Modificado de Shingler, 2011.

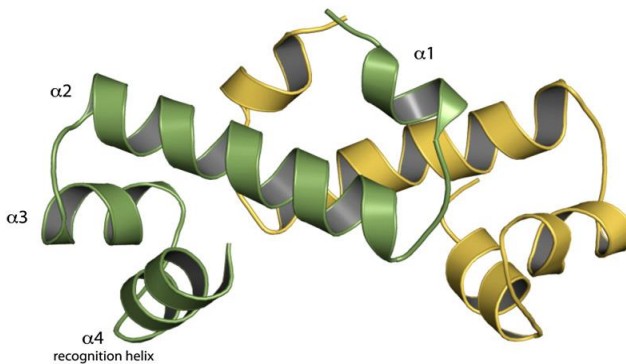


Figura 1.15. Diagrama de la estructura del cristal de un dímero del dominio de unión a ADN de NtrC4 de *Aquifex aeolicus*. α 1-4 se corresponden con las hélices A, B, C y D. La estructura de cada monómero se representa de un color. Tomado de Batchelor *et al.*, 2008.

El dominio NTD (dominio R) es el encargado de responder a las señales ambientales y regular la actividad del dominio central C (Schumacher *et al.*, 2006). Se han descrito tres formas principales en las que el dominio regulador detecta la señal ambiental y se activa: por fosforilación, por unión de un ligando, y por interacciones proteína-proteína. Dependiendo del método de activación, se encuentran diferentes tipos de dominios en la región reguladora (Fig. 1.13). Los reguladores de respuesta (RR) funcionan como un sistema de dos componentes (TCS), en el que una proteína sensor-quinasa reconoce la señal celular, se

autofosforila y transfiere el fosfato a un residuo de aspartato conservado del dominio regulador de respuesta. La fosforilación del dominio regulador estimula la bEBP para iniciar el proceso de activación de la transcripción (ver 1.8.3).

Un ejemplo de este tipo de bEBPs es el sistema de dos componentes NtrB-NtrC que se activa en respuesta a condiciones de limitación de nitrógeno, donde NtrB es la sensor-quinasa del TCS (Ninfa & Magasanik, 1986), sistema regulador del transporte de ácidos dicarboxílicos en *Rhizobium* DctB-DctD, donde DctB es la sensor-quinasa, es también un sistema de este tipo (Ronson *et al.*, 1987). Dos ejemplos de activación por unión a ligando son las proteínas DmpR y XylR, cuyo NTD reconoce compuestos aromáticos (fenol y xilenos, respetivamente) (Salto *et al.*, 1998; Shingler, 2011). El mecanismo intrínseco de activación de estos reguladores no se conoce bien, pero se sabe que la unión del aromático al extremo NTD es la señal que inicia la oligomerización de la bEBP, lo que requiere de la intervención del linker B que une este dominio con el dominio central AAA+ (O'Neill *et al.*, 2001). Recientemente se ha obtenido la estructura cristalina del primer NTD de un regulador de este grupo, MopR, que responde a compuestos fenólicos. La estructura revela un pequeño dominio en el extremo N-terminal responsable de estabilizar el dímero de la proteína, así como la unión de un átomo de zinc esencial para mantener la integridad estructural (Ray *et al.*, 2016). Otro ejemplo algo diferente de este tipo de activación es la proteína NorR que controla la detoxificación de óxido nítrico (NO) en *E. coli*, cuyo extremo N-terminal contiene un dominio GAF con un centro de hierro no hemo que reconoce NO, y cuya estructura completa se ha determinado recientemente (Bush *et al.*, 2015). A diferencia de otras bEBPs, NorR oligomeriza a hexámero al unirse al ADN sin necesidad del efector. La unión del NO al dominio sensor recoloca este dominio en la periferia del dominio central, como “abrazando” al hexámero. Ejemplos de regulación mediante la interacción proteína-proteína son las proteínas NifA de *Azotobacter vinelandii*, HrpS de *P. syringae* y FleQ de *P. aeruginosa* y *Rhodobacter sphaeroides*. La actividad de NifA se bloquea por unión con la proteína NifL. En condiciones de inducción (condiciones favorables para la fijación de nitrógeno) la interacción entre las dos proteínas se previene por unión del efector (2-oxoglutarato) a NifA y de ADP a NifL (Slavny *et al.*, 2010). En cuanto a HrpS, se ha demostrado que HrpR y HrpS, dos bEBPs homólogas que carecen de dominio NTD, interactúan entre sí formando un complejo hetero-hexamérico estable que es quien activa la transcripción dependiente de σ^{54} de *hrpL*. Se ha determinado que la proteína HrpV se une a HrpS en el heterohexamero para reprimir su interacción productiva con el complejo $E\sigma^{54}$ -promotor (Jovanovic *et al.*, 2011). En el caso de FleQ de *P. aeruginosa*, que regula la expresión de flagelo y síntesis de

exopolisacáridos, la interacción es con FleN, una ATPasa especial que actúa básicamente como antagonista de FleQ (Dasgupta & Ramphal, 2001). Sin embargo FleQ de *R. sphaeroides* carece de NTD y se ha sugerido que activa algunos de los promotores que regula formando heterooligómeros con FleT, una bEBP que carece de tanto de NTD como de HTH (Poggio *et al.*, 2005). Finalmente, una nueva forma de control de la actividad del dominio central se ha descrito recientemente en FleQ de *P. aeruginosa*: el segundo mensajero c-di-GMP regula la actividad ATPasa de esta proteína uniéndose directamente al dominio central, lo que bloquea el sitio de unión de ATP y desestabiliza el hexámero, inhibiendo en consecuencia la actividad ATPasa (Matsuyama *et al.*, 2016).

El control que ejerce el dominio NTD sobre la actividad ATPasa del dominio central se realiza a nivel de la oligomerización de la proteína a hexámero, la forma activa imprescindible tanto para la actividad ATPasa como para la interacción del regulador con la $E\sigma^{54}$ unida al promotor (Bush & Dixon, 2012). Esta transducción de la señal ambiental a la estructura de la proteína se realiza mediante dos tipos de control: positivo o negativo. En la mayoría de las bEBPs el control es de tipo negativo, y en este tipo de reguladores la delección del dominio NTD da lugar a una proteína que es constitutivamente activa, mientras que su presencia incluso en *trans* puede ejercer la función represora (Pérez-Martin & de Lorenzo, 1996). Ejemplos de este tipo de bEBPs serían XylR, DmpR y NtrC1. En el mecanismo de control positivo, descrito por ejemplo para NtrC, el extremo N-terminal no realiza funciones represoras sobre el dominio catalítico, de forma que su delección rinde una proteína inactiva.

Otra característica que define a los reguladores de esta familia es que reconocen sitios de unión localizados a cierta distancia aguas arriba del promotor regulado, denominadas UAS (*Upstream Activating Sequences*). Estas secuencias están generalmente constituidas por una pareja de repeticiones invertidas para favorecer la unión de dímeros, aunque en algún caso están presentes secuencias UASs adicionales, como sería el caso de la proteína NorR, que depende estrictamente de la unión a sus tres UASs para isomerizar a hexámero (Tucker *et al.*, 2010; Bush *et al.*, 2015). La disposición de las UASs puede variar; generalmente están localizadas a una distancia de entre aproximadamente 80 y 200 pb, aunque en algunos casos pueden desplazarse hasta más de 1 Kb aguas arriba. La interacción necesaria entre el activador unido a sus UASs y el complejo cerrado de la $E\sigma^{54}$ unida al promotor se consigue gracias a la curvatura del ADN, causada en la mayoría de los casos por la unión de la proteína IHF (*Integration Host Factor*) (Shingler, 2011).

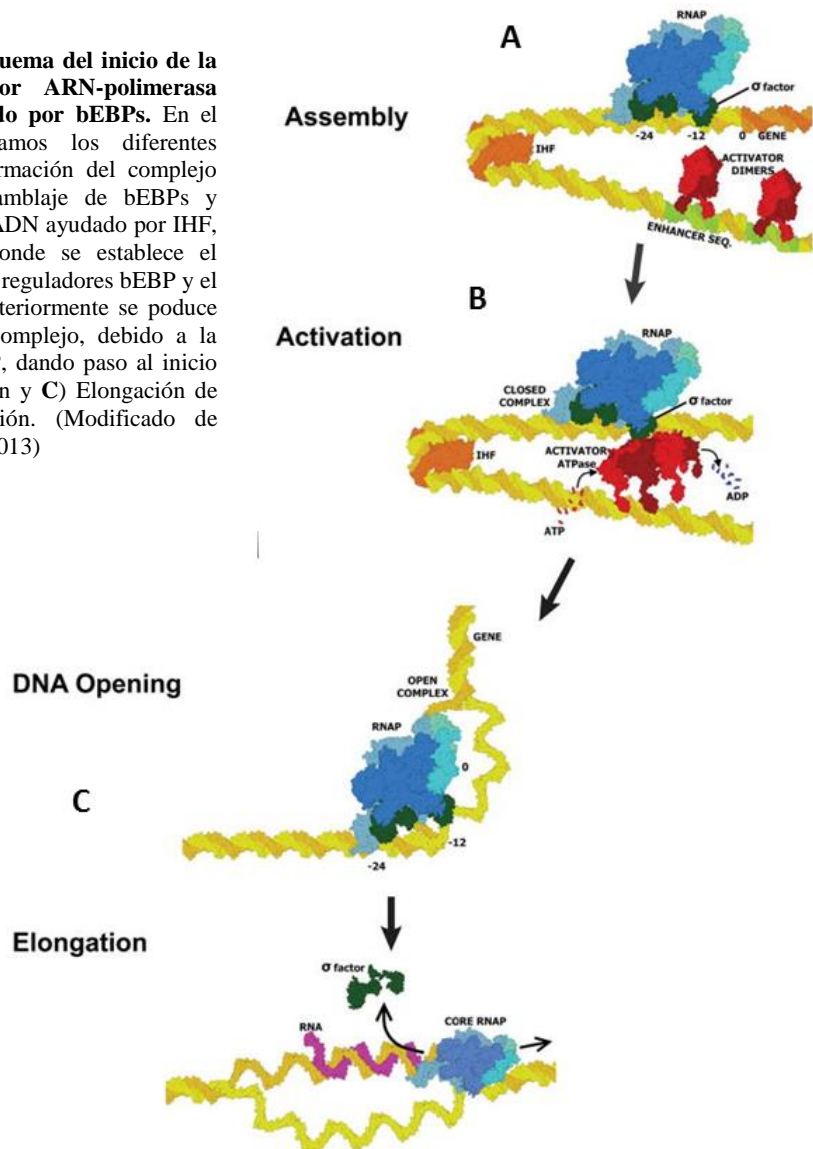
1.8.3. Mecanismo de activación de los promotores dependientes de σ^{54} .

El mecanismo de activación de promotores dependientes de σ^{54} por las EBPs es muy complejo y los diferentes pasos que lo constituyen se han estudiado profusamente en diversas proteínas de la familia, para muchas de las cuales se dispone de estructura parcial o completa (revisado en (Ghosh *et al.*, 2010; Shingler, 2011; Bush & Dixon, 2012; Vidangos *et al.*, 2013). Aunque la mayoría de los pasos se han resuelto, aún existen dudas sobre el orden de algunos eventos en el proceso de activación. Con los numerosos datos disponibles se ha propuesto un mecanismo general de activación, con respecto al cual ciertas bEBPs pueden presentar algunas diferencias. El mecanismo se puede resumir así: las bEBPs se unen a sus UASs en forma de dímeros, que son inactivos. Al recibir la señal activadora a través del dominio regulador (unión del efector, fosforilación del dominio regulador, u otra señal), se produce un cambio conformacional seguido de la oligomerización de las proteínas a hexámero, paso previamente inhibido por el NTD. Como hemos mencionado anteriormente, esta inhibición puede responder a un mecanismo de regulación negativa, debido a que el NTD bloquea al dímero en una orientación inadecuada para la oligomerización a hexámero (es el caso de DctD o NtrC1 (Park *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2003; Chen *et al.*, 2008), o bien a un mecanismo de regulación positiva, en el que el NTD tiene que estar activado para ejercer su función de favorecer y estabilizar la formación del anillo hexamérico (es el caso de NtrC (De Carlo *et al.*, 2006; Chen *et al.*, 2008)). La oligomerización deja libre el sitio de unión e hidrólisis de ATP del dominio central. El anillo hexamérico se aproxima a $E\sigma^{54}$ (generalmente con la ayuda de la proteína IHF que dobla el ADN convenientemente), contacta con σ^{54} e hidroliza ATP. La interacción entre el anillo hexamérico y σ^{54} es crítica para poder acoplar la hidrólisis de ATP a la iniciación de la transcripción. La energía liberada de esta reacción es la que produce el cambio conformacional en el complejo $E\sigma^{54}$ -promotor, permitiendo el paso de complejo cerrado a complejo abierto y la iniciación de la transcripción (Fig. 1.16).

Aunque se ha demostrado que el ATP se puede unir a un dímero de bEBP, la oligomerización a hexámero es imprescindible para estimular la actividad ATPasa completa (Vidangos *et al.*, 2013). Si bien la forma activa más común de las bEBPs es un hexámero, algunas proteínas de la familia parecen funcionar como heptámeros (Batchelor *et al.*, 2009; Dey *et al.*, 2015). También se ha descrito la formación de hetero-hexameros entre diferentes bEBPs: este es el caso mencionado anteriormente del complejo formado por la interacción entre las dos bEBPs homólogas HrpR y HrpS de *P. syringae* para la activación de factores de virulencia (Jovanovic *et al.*, 2011).

En el caso de la ruta de degradación de resorcinol en *A. anaerobius*, se han identificado en la agrupación génica dos reguladores perteneciente a la familia De NtrC, anotados como RedR1 y RedR2 (Pacheco-Sánchez *et al.*, 2017), que presentan más del 97% de identidad entre sus secuencias. Las diferencias se concentran en los dominios NTD y CTD, La caracterización en profundidad de estas bEBPs y de su papel regulador de la ruta es uno de los objetivos de esta tesis doctoral.

Figura 1.16. Esquema del inicio de la transcripción por ARN-polimerasa con $E\sigma^{54}$ mediado por bEBPs. En el esquema observamos los diferentes pasos para la formación del complejo abierto, **A)** Ensamblaje de bEBPs y plegamiento del ADN ayudado por IHF, **B)** Activación donde se establece el contacto entre los reguladores bEBP y el factor sigma; posteriormente se produce la apertura del complejo, debido a la hidrólisis de ATP, dando paso al inicio de la transcripción y **C)** Elongación de la de transcripción. (Modificado de Vidangos *et al.*, 2013)



2 Objetivos

2. Objetivos

Como hemos explicado en la introducción, las cepas nitrato reductoras *Azoarcus anaerobius* y *Thauera aromatica* AR-1 son las únicas cepas descritas capaces de la degradación anaerobia de resorcinol y 3,5-dihidroxibenzoato, respectivamente, utilizando la vía oxidativa a HHQ. Al inicio de esta Tesis Doctoral se habían caracterizado los genes que forman parte de las rutas, pero no se disponía de información sobre sus mecanismos de regulación. Como objetivo general de este trabajo, nos propusimos investigar y caracterizar los sistemas reguladores que modulan la expresión de estas dos rutas. Se definieron los siguientes objetivos específicos:

1. Estudiar la organización transcripcional de los operones que forman la agrupación génica que codifica la ruta anaerobia de degradación de resorcinol en *Azoarcus anaerobius*.
2. Caracterizar los mecanismos de regulación transcripcional, mediada por reguladores específicos, de la ruta de degradación de resorcinol en esta cepa.
3. Analizar la regulación de la expresión de los genes de la ruta de degradación de 3,5-dihidroxibenzoato en la bacteria *Thauera aromatica* AR-1.

3 Materials and Methods

3. Materials and methods

3.1. Materials and methods for chapter 4.1

3.1.1. Materials and standard procedures. All chemicals used in this study were from Fluka (Neu Ulm, Germany), Sigma-Aldrich Labor Chemie (Steinheim, Germany), Perkin Elmer Life Science (Massachusetts, United States) or Merck Serono (Darmstadt, Germany). Restriction enzymes were from New England Biolabs (Frankfurt am Main, Germany). T4 DNA ligase was purchased from Roche (Grenzach-Wyhlen, Germany). Plasmids were isolated with “Qiapreps spin plasmid kit” of Qiagen (Hilden, Germany). PCRs and cDNA were purified with “Qiaquick Gel Extraction Kit” of Qiagen. Oligonucleotides were synthesized by Sigma-Aldrich. DNA sequencing was performed by the DNA Sequencing Service at the López-Neyra Parasitology and Biomedicine Institute (IPBLN), (Granada, Spain). Transformation, PCR amplification with Expan High Fidelity (Roche) and protein analysis were performed according to standard protocols (Ausubel *et al.*, 1991).

3.1.2. Bacterial strains, media and culture conditions. The bacterial strains used in this work are summarized in Table 3.1.1. *Azoarcus anaerobius* strain LuFRes1 (Springer *et al.*, 1998b) was cultured anaerobically at 30°C without shaking in 50 or 100-ml infusion bottles containing non-reduced Widdel mineral medium (WMM) under nitrogen gas (Philipp and Schink, 1998). The medium was buffered with 30 mM 3-(N-morpholino) propane sulfonic acid (MOPS) instead of bicarbonate and supplemented with 8 mM nitrate. Resorcinol (2 mM) was added from a 0.5 M stock solutions under nitrogen gas. *Azoarcus* sp. strain CIB (Martín-Moldes *et al.*, 2015a) was used for heterologous expression of the resorcinol degradation pathway encompassed in pR⁺ cosmid (Darley *et al.*, 2007). For the pathway characterization, *Azoarcus* sp. CIB and its transconjugants were grown anaerobically as described above except that glutarate (5 mM) and succinate (5 mM) were also used as carbon sources when required. For genetic manipulations, *Azoarcus* sp. strain CIB and derivatives were grown aerobically in WMM supplemented with 5 mM glutarate as the carbon source. Solid media for *Azoarcus* sp. strain CIB derivatives were prepared with 1.6% twice washed Difco agar. When necessary, antibiotics were used at the following concentrations: tetracycline, 5 µg/ml; kanamycin, 25 µg/ml and chloramphenicol, 15 µg/ml; when required, 5-bromo-4-chloro-3-indolyl β-D-galactopyranoside (X-gal) was used at 0.8 mM. *Escherichia coli* strains were cultivated in Luria-Bertani (LB) medium (10 g l⁻¹ tryptone, 5 g l⁻¹ yeast extract, 5 g l⁻¹ NaCl) in Erlenmeyer flasks at 37°C and 200 rpm on a rotary shaker. When required, cultures were supplemented with 100 µg/ml

ampicillin, 50 µg/ml kanamycin, 50 µg/ml streptomycin, 0.5 mM isopropyl-β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG).

3.1.3. Growth experiments. To analyze the growth of *Azoarcus* sp. CIB bearing the pR⁺ plasmid and mutant derivatives, 100 ml serum bottles containing 75 ml of anoxic WMM supplemented with the required antibiotics and resorcinol (2 mM) and/or glutarate (2 mM) as the carbon source were inoculated with 1% of the exponentially growing *Azoarcus* sp. strain CIB with wild-type and mutant pR⁺ cosmids cultures and incubated at 30°C. Samples were taken anoxically at the designated time points with a sterile syringe flushed with N₂ and used immediately for OD₆₀₀ determination in a Shimadzu UV-266.

3.1.4. Plasmid construction. Plasmid carrying transcriptional P_{rehL}::*lacZ*, P_{orf14}::*lacZ* and P_{bqdL}::*lacZ* fusions were obtained as follows: DNA fragments containing the *rehL* (576 bp), *orf14* (297 bp) and *bqdL* (515 bp) promoter regions from pR⁺ cosmid were amplified by PCR using the appropriated primers (Table 3.1.2) to generate flanking *SalI* (upstream) and *BglII* (downstream) sites for *rehL* promoter and *BglII* (upstream) and *PstI* (downstream) sites for *bqdL* and *orf14* promoters, and cloned in pGEMT (Promega). The resulting plasmids carrying the P_{orf14} and P_{bqdL} promoters were digested with the corresponding enzymes and the promoter containing fragment was cloned between the same sites of the broad-host-range promoter probe vector pMP220 (Spaink *et al.*, 1987a), and then transferred as *HindIII* fragments into the *HindIII* site of pMP190 (Spaink *et al.*, 1987a) to create pMP190::P_{orf14} (p190Porf14) and pMP190::P_{bqdL} (p190PbqdL). To obtain pMP190::P_{rehL} (p190PrehL), the *rehL* promoter cloned in pGEMT was directly subcloned on pMP190 using *SalI* and *BglII*. The correct orientation of each promoter in pMP190 was confirmed by sequence analysis.

3.1.5. Site-specific homologous inactivation of genes in the pR⁺ cosmid. All the plasmids used for allelic replacement were based on the pKNG101 suicide vector (Kaniga *et al.*, 1991) and are listed in Table 3.1.1. The mutants in pR⁺ obtained in this work were generated by double homologous recombination using pKNG101 plasmid derivatives as described (Aranda-Olmedo *et al.*, 2005). To construct the *redR2* knockout mutant, a 2.3 kb *HindIII* fragment of pR⁺ containing *redR2* gene and its flanking region was cloned in pBluescriptIISK (Stratagene) and inactivated by insertion of the mini-Tn5 kanamycin resistance gene at the unique *BglII* site. The resulting mutated *redR2*::*km* gene was cloned in the *SmaI* site of pKNG101 to obtain pKNGredR2::Km. For the *redR1* deletion mutant, 1 and 1.1 Kb DNA fragments upstream and downstream of *redR1* were amplified with the appropriate primers to create overlapping sequences, and the resulting products

were used as template in a second PCR reaction with the outer set of the primers of the first reactions. The final fragment was cloned into pCR2.1-TOPO (Invitrogen) and sequenced to exclude the presence of point mutations in the sequences flanking *redR1* deletion. The final fragment was cloned between the *ApaI* and *SpeI* sites of pKNG101 to obtain pKNG Δ redR1. Both pKN101 derivatives were used to deliver the mutations to pR⁺ cosmid in *E. coli* ET8000 by RP4-mediated mobilization, as follows: the *E. coli* donor strain CC118 λ pir bearing the pKNG101 mutant derivatives, recipient strain ET8000 bearing pR⁺, and HB101 (pRK600) helper strain were grown overnight on LB medium in the presence of tetracycline, kanamycin and chloramphenicol, respectively. Samples of 0.5 ml of each culture were harvested by centrifugation (13,000 x g for 10 min) and the cells were washed once with 1 ml LB. The resulting pellets were combined in 100 μ l LB and dropped on a sterile 47 mm-diameter, 0.22 μ m pore size filter (Schleicher and Schnell, Germany) placed on an LB plate and incubated overnight at 30°C. The filters were transferred into 3 ml of M9 salt solution (Abril *et al.*, 1989) and cells were washed off by vigorous vortexing. For the *redR2* mutant, *E. coli* ET8000 (pR⁺) transconjugants were selected for their resistance to nalidixic acid, tetracycline and kanamycin in LB solid medium. Amongst them, those where double crossover had occurred were directly selected as sucrose-resistant/streptomycin sensitive clones. For the *redR1* deletion mutant, transconjugants bearing a cointegrate of the pKNG101 Δ redR1 into pR⁺ were selected on WMM with 5 mM glutarate as the sole carbon source and 50 μ g/ml streptomycin in addition to tetracycline. Streptomycin-resistant transconjugants were analysed by PCR with primers flanking the gene to be deleted. Those in which both the wild-type and the mutated gene products were amplified were selected and cultured in liquid LB medium with only tetracycline during 12-16 h to promote the second crossover and the allelic exchange to occur. To select double recombinants, colonies were plated on LB with 10 % (w/v) sucrose. Streptomycin-sensitive/sucrose-resistant colonies were analyzed by PCR to confirm the cosmid gene deletion. A double *redR1*, *redR2* mutant was obtained in the same way, except that the *E. coli* ET8000 bearing pR⁺redR2::Km instead of pR⁺ was used as the recipient strain. The correct insertion of all mutations was confirmed by PCR analysis and Southern blot.

3.1.6. Triparental conjugation of cosmids and plasmids into *Azoarcus* sp.

CIB. Wild-type and mutant pR⁺ cosmid derivatives, as well as pMP190 derivatives were transferred to *Azoarcus* sp. CIB by RP4-mediated mobilization. *Azoarcus* sp. CIB was grown aerobically to saturation in WMM supplemented with glutarate (5 mM), and *E. coli* donor strain DH5 α (bearing either pR⁺ or its mutant derivatives, or pMP190 derivatives) and HB101 (pRK600) helper strain were grown overnight on

LB medium in the presence of the required antibiotic. Samples of the *E. coli* cultures (1 ml each) and 15 ml of *Azoarcus* sp. CIB culture were harvested by centrifugation (13,000 x g for 10 min at 10°C) and the cell pellets were washed once with 1 ml of WMM and combined in 100 µl WMM. The resulting cell suspension was dropped on a sterile 47 mm-diameter, 0.22 µm pore size filter (Schleicher and Schnell, Germany) placed on an LB plate, and incubated overnight at 30°C. The filters were then transferred into 1 ml of minimal medium and cells were washed off by vigorous vortexing. *Azoarcus* sp. CIB transconjugants were selected aerobically for their resistance to tetracycline (pR⁺ derivatives) and chloramphenicol (pMP190 derivatives) on WMM supplemented with glutarate (5 mM) to counter-select against *E. coli* donor and helper strains.

3.1.7. RNA extraction. *A. anaerobius* was grown at 30°C under nitrate reducing conditions with resorcinol (2 mM) and/or succinate (2 mM) as the carbon source. Cells (45 ml) were harvested by centrifugation (8000 x g, 5 min, 4°C) in disposable plastic tubes pre-cooled in liquid nitrogen, and the pellets were kept at -80°C until use. RNA was extracted using the TRI-reagent method (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. The RNA concentration was determined with a NanoDrop (Thermo Scientific), and RNA integrity was assessed by agarose gel electrophoresis.

3.1.8. Reverse transcription-polymerase chain reactions (RT-PCR). Reverse transcriptase PCR (RT-PCR) was done with 400 ng 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 with random primers at 50°C for 45 min, and the PCR cycling conditions were as follows: 94°C for 20 s, 35 cycles at an adequate annealing temperature for 20 s followed by extension at 68°C for 20 s. The annealing temperature was calculated for each reaction based on the melting temperatures of the pair of primers used (Table 3.1.3). For each reaction, the positive control was total DNA from *Azoarcus* sp. CIB (pR⁺), and the negative control was a reaction with the same RNAs but omitting the cDNA synthesis step.

3.1.9. Primer extension analysis. Oligonucleotides complementary to the coding strand of the *rehl*, *bqdl* and *orf14* genes (Table 3.1.2) were ³²P-labelled at their 5'-end in 10 µl final volume that contained: 1 µl 10 x buffer, 10 pmol oligonucleotide, 1 µl [γ -³²P]ATP (6000 mCi/mmol) and 1 U phage T4 polynucleotide kinase (Roche). The reaction mixtures were incubated for one hour at 37°C and 10 minutes at 70°C to inactivate the kinase, and the labelled oligonucleotide was filtered through a Micro Bio-Spin column (Bio-Rad) to

eliminate unbound nucleotide. Labelled primers were annealed to total RNA isolated as described above in 10 μ l annealing mixture that contained 2 μ l 5 \times annealing buffer (2 M NaCl, 50 mM Pipes, pH 7.0), 10⁵ cpm of 5'-end-labelled primer and 10-30 μ g total RNA template. The mixtures were first heated at 95°C for 3 min, incubated at 65°C for 5 min and then slowly cooled to 44°C. cDNA was synthesized by the addition of 40 μ l of reverse transcriptase buffer to bring final concentrations to 50 mM Tris-HCl pH 8.5, 1 mM dithiothreitol, 8 mM MgCl₂, 30 mM KCl, 1 mM each of all four dNTPs, 0.4 U/ μ l of RNase inhibitor (Roche) and 8 U AMV reverse transcriptase (Roche). The mixtures were incubated 1 h at 44 °C and the reaction was halted by the addition of 5 μ l 3 M sodium acetate and 150 μ l ethanol. The products of reverse transcription were analyzed in urea-polyacrylamide sequencing gels. Gels were exposed to Molecular Imager model GS-525 (Bio-Rad).

3.1.10. Bacterial adenylate cyclase two-hybrid assays (BACTH). BACTH assays were performed as described (Karimova *et al.*, 2000). Briefly, the *redR1* and *redR2* genes were amplified from pR⁺ cosmid DNA by PCR using the primers XbaIRedR1, XbaIRedR2 and BamHIRedR1/2 for whole length genes, and XbaIRedR1/2, BamHINTRedR1/2 (amplifies the N-terminal domain, NTD) and XbaI Δ RedR1-2 (amplifies the protein genes with an NTD deletion) for the truncated protein genes. The resulting products were purified and cloned in pGEMT (Promega) and confirmed by sequence analysis. The pGEMT derivatives were digested with either *XbaI/BamHI* or *HindIII/XbaI* and the fragments containing the *redR1* and *redR2* genes and their truncated versions were fused in frame to either the pKT25 or pUT18C fragments of adenylate cyclase gene (Karimova *et al.*, 2000), respectively, to create pKT25redR2 and derivatives (T25-RedR2 fusions) and pUT18CredR1 and derivatives (T18-RedR1 fusions). The remaining constructs containing different segments of the two proteins were constructed as above using the primer sets listed in table 3.1.2. Correct translational fusions were confirmed by sequence analysis. For BACTH assays, pKT25 and pUT18C plasmids carrying *redR2* and *redR1* genes or their truncated derivatives were transformed in different combinations into *E. coli* BTH101 cells and interaction efficiency between the plasmid-encoded proteins was quantified by measuring β -galactosidase activity of the cultures following overnight induction with 0.5 mM isopropyl- β -D-thiogalactoside. Assays were minimally performed in triplicate and standard errors of the mean were calculated.

3.1.11. Betagalactosidase assays. For assays in *E. coli*, 3 ml LB supplemented with the required antibiotics were inoculated with a single colony of

E. coli BTH101 bearing the appropriate combination of plasmids and incubated overnight at 30 °C. The 3 ml LB were then inoculated with 1/100 overnight culture and incubated at 30 °C with shaking. When the cultures reached the exponential phase or after overnight growth, β -galactosidase activity was determined as described previously (Miller, 1972). For assays in *Azoarcus* sp. CIB, 3 ml WMM supplemented with 5 mM glutarate as carbon source and the required antibiotics were inoculated with a single colony of each strain bearing the appropriate combination of plasmids and incubated aerobically (100 rpm) for 3 days at 30 °C. The pre-grown culture was then inoculated in 45 ml of WMM supplemented with the indicated carbon source to an initial OD of 0.05 and incubated under anoxic conditions at 30°C without shaking. At the indicated times, β -Galactosidase activity was determined in permeabilized whole cells (0.1 ml) according to Miller (Miller, 1972). Assays were minimally performed in duplicate and standard errors of the mean were calculated.

3.1.12. Purification of RedR1 and RedR2 by affinity chromatography.

The *redR1* and *redR2* genes were amplified by PCR using the primers NdeIredR1, NdeIredR2 and HindIIIredR1/2 (Table 3.1.2). The resulting products were purified and cloned in pGEMT (Promega) and confirmed by sequence analysis. The pGEMT derivatives were digested with *NdeI/HindIII* and the fragments containing the *redR1* and *redR2* genes were ligated fused in frame to pET28b+, to create pET28b-redR1 and pET28b-redR2. *E. coli* BL21 (D3) transformed with plasmid pET28b-redR1 and pET28b-redR2 was used to overproduce RedR1 and RedR2 with a C-terminal His-tag. The cells were grown in 1 L of 2 x YT medium supplemented with 25 μ g/mL kanamycin in an Erlenmeyer flask on a rotary shaker at 37°C. When the cells had reached an A_{660} of 0.6, protein expression was induced with 0.1 mM IPTG (isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside) and incubation was continued for 20 h at 18°C. The cells were then harvested and stored at -20°C until use. Frozen cells were suspended in 20 ml of buffer A (20 mM Tris-HCL pH 8.0, 500 mM NaCl, 10% glycerol, 10 mM Triton X-100, 0.1 mM EDTA, 2.5 mM β -mercaptoethanol and 10 mM Imidazole) and lysed by two passages through a French pressured cell. The crude extract was centrifuged at 13,000 g for 1 h at 4°C. The resulting supernatant containing His-tagged RedR1 or RedR2 protein was loaded onto a HisTrap HP affinity column (GE Healthcare) prepared as indicated by the manufacturer and equilibrated with the breakage buffer A containing 10 mM imidazole in an ÄKTA fast protein liquid chromatography system (GE Healthcare). The protein was eluted with 180 mM imidazole. The purity of His-RedR1 and His-RedR2 proteins were verified by SDS-PAGE. The protein concentration was determined with the Bradford method using bovine serum albumin as the standard,

and dialyzed against buffer B (20 mM Tris-HCl pH 8.0, 500 mM NaCl, 10% glycerol, 0.1 mM EDTA and 1 mM DTT).

3.1.13. Isothermal titration calorimetry (ITC). Titrations of His-tagged RedR1 and RedR2 were carried out in a VP microcalorimeter (MicroCal, Northampton, MA, USA) at 25°C under anoxic conditions because the hydroxylated pathway intermediates are highly sensitive to oxygen. Before starting, proteins were dialyzed against oxygen-free buffer B obtained by flushing nitrogen gas through the solution for 20 min, followed by filtration through 0.45 µm cut-off filters. Then the protein was placed in the sample cell of the instrument previously gassed with nitrogen. The ligands were prepared in the degassed dialysis buffer. The ligands used were resorcinol (Merck), hydroxyhydroquinone and the hydroxylated analogues gentisate, methyl-p-benzoquinone, tetrahydroxy-1,4-quinone and benzoquinone (Sigma Aldrich). Control experiments involved the titration of dialysis buffer with ligand solutions.

Table 3.1.1 Bacterial strains and plasmids used in Chapter 4.1.

Strain or plasmid	Genotype/Relevant Characteristics	Reference
Strains		
<i>Escherichia coli</i>		
HB101	<i>supE44 hsdS20</i> (r _B ⁻ m _B ⁻) <i>recA13 ara-14proA2 lacY1 galK2 rpsL20</i> (Sm ^R) <i>xyl-5 mtl-1</i>	(Boyer and Roulland-Dussoix, 1969)
CC118λpir	Δ(<i>ara-leu</i>) <i>araD AlacX74 galE galK phoA20 thi-1 rpsE rpoB argE recA1</i> , lysogenized with λ <i>pir</i>	(de Lorenzo <i>et al.</i> , 1990)
DH5α	<i>endA1 hsdR17 supE44 thi-1 recA1 gyrA</i> (Nal ^R) <i>relA1</i> Δ(<i>argF-lac</i>) U169 <i>depR</i> (Φ80 <i>dlac</i> Δ(<i>lacZ</i>)) M15)	(Sambrook <i>et al.</i> , 1989)
BTH101	F ⁻ <i>cya-99 araD139 galE15 galK16 rpsL1</i> (Str ^t) <i>hsdR2 mcrA1 mcrB1</i>	(Karimova <i>et al.</i> , 2000)
ET8000	<i>rbs lacZ::IS1 gyrA hutC_K</i> (prototroph)	(MacNeil <i>et al.</i> , 1982)
<i>Azoarcus anaerobius</i>	Wild-type strain, strict anaerobe, degrades resorcinol under denitrifying conditions (DSM 12081)	(Springer <i>et al.</i> , 1998b)
<i>LufRes1</i>		
<i>Azoarcus</i> sp. strain CIB	Wild-type strain, degrader of aromatic compounds	(Martín-Moldes <i>et al.</i> , 2015b)
Plasmids		
pKNG101	Sm ^R , gene replacement vector, <i>oriR6K</i> , <i>oriTRK2</i> , <i>sacB</i>	(Kaniga <i>et al.</i> , 1991)
pRK600	Cm ^R , helper plasmid, <i>oriColE1</i> , <i>mobRK2</i> , <i>traRK2</i>	(Kessler <i>et al.</i> , 1992)
pMP190	Cm ^R , broad-host-range promoter probe vector (<i>lacZ</i>)	(Spaink <i>et al.</i> , 1987b)
pMP220	Tc ^R , broad-host-range promoter probe vector (<i>lacZ</i>)	(Spaink <i>et al.</i> , 1987a; Kovach <i>et al.</i> , 1995)
PCR2.1-TOPO	PCR product cloning vecto, <i>ori PUC</i> , <i>ori f1</i> ; Ap ^R , Km ^R	Invitrogen
pGEMT@-T Easy	PCR product cloning vector, <i>ori PUC</i> , <i>ori f1</i> ; Ap ^R	Promega
pET28b+	Expression vector for recombinant proteins with His ₆ tag at the N-terminus; Km ^R	Novagen
pKT25	Km ^R , pSU40 derivative that carries the T25 fragment of <i>B. pertussis</i> adenylate cyclase (residues 1 to 224) with a polylinker sequence at the 3' end.	(Karimova <i>et al.</i> , 2000)
pUT18C	Ap ^R , pUC19 derivative that carries the T18 fragment of <i>B. pertussis</i> adenylate cyclase with a polylinker sequence at the 3' end.	(Karimova <i>et al.</i> , 2000)
pUT18CredR1	In frame gene fusion of <i>B. pertussis</i> adenylate cyclase T18 fragment and <i>redR1</i> in pUT18C.	This study
pUT18CredR2	In frame gene fusion of <i>B. pertussis</i> adenylate cyclase T18 fragment and <i>redR2</i> in pUT18C.	This study
pKT25redR1	In frame gene fusion of <i>B. pertussis</i> adenylate cyclase T25 fragment and <i>redR1</i> in pKT25.	This study
pKT25redR2	In frame gene fusion of <i>B. pertussis</i> adenylate cyclase T25 fragment and <i>redR2</i> in pKT25.	This study
pUT18CredR1-NTD	In frame gene fusion of <i>B. pertussis</i> adenylate cyclase T18 fragment and the NTD of <i>redR1</i> in pUT18C	This study
pKT25redR2-NTD	In frame gene fusion of <i>B. pertussis</i> adenylate cyclase T18 fragment and the NTD of <i>redR2</i> in pKT25	This study
pKT25ΔredR1	In frame gene fusion of <i>B. pertussis</i> adenylate cyclase T25 fragment and a truncated <i>redR1</i> starting at residue 319	This study

	in pKT25.	
pKT25ΔredR2	In frame gene fusion of <i>B. pertussis</i> adenylate cyclase T25 fragment and a truncated <i>redR2</i> gene starting at residue 321 in pKT25.	This study
pUT18CΔredR1	In frame gene fusion of <i>B. pertussis</i> adenylate cyclase T18 fragment and a truncated <i>redR1</i> gene starting at residue 319 in pKT25.	This study
pUT18CΔredR2	In frame gene fusion of <i>B. pertussis</i> adenylate cyclase T18 fragment and a truncated <i>redR2</i> starting at residue 321 in pKT25.	This study
pBBRedR1	1.9 Kb PCR product containing <i>redR1</i> inserted between the <i>HindIII/XbaI</i> sites of pBBRMCS-5.	This study
PBBRedR2	1.9 Kb PCR product containing <i>redR2</i> inserted between the <i>HindIII/XbaI</i> sites of pBBRMCS-5.	This study
pKNGredR2::Km	pKNG101 carrying, at the <i>SmaI</i> site, the 2.35-kb <i>redR2</i> fragment from pR ⁺ , with the mini-Tn5 Km gene inserted at the unique <i>BglIII</i> site.	This study
pKNGΔredR1	pKNG101 carrying, between the <i>ApaI</i> and <i>SpeI</i> sites, <i>redR1</i> with a 1920 bp internal deletion in a 2 kb fragment from pR ⁺ .	This study
p190Prehl	P _{rehl} ::lacZ transcriptional fusion in pMP190; Cm ^R	This study
p190Porf14	P _{orf14} ::lacZ transcriptional fusion in pMP190; Cm ^R	This study
p190Pbqdl	P _{bqdl} ::lacZ transcriptional fusion in pMP190; Cm ^R	This study
pET28b-redR1	pET28b+ derivative containing an in frame fusion of the His ₆ tag to <i>redR1</i> gene; Km ^R	This study
pET28b-redR2	pET28b+ derivative containing an in frame fusion of the His ₆ tag to <i>redR2</i> gene; Km ^R	This study
Cosmids		
pLAFR3	Tc ^R , cos, RK2oriV, RK2oriT	(Staskawicz <i>et al.</i> , 1987)
pR ⁺	Tc ^R , pLAFR3 containing a 29.9-kb resorcinol gene cluster of <i>A. anaerobius</i>	(Darley <i>et al.</i> , 2007)
pR ⁺ <i>redR1</i> ::Km	Tc ^R , Km ^R , pR ⁺ knockout mutant Mu_42, <i>redR1</i> ::TN<KAN-2>	(Darley <i>et al.</i> , 2007)
pR ⁺ <i>redR2</i> ::Km	Tc ^R , Km ^R , pR ⁺ knockout mutant, mini-Tn5 Km resistance gene inserted at the <i>BglIII</i> site of <i>redR2</i>	This study
pR ⁺ Δ <i>redR1</i>	Tc ^R , Km ^R , pR ⁺ mutant carrying a 1920 bp internal deletion in <i>redR1</i>	This study
pR ⁺ Δ <i>redR1,redR2</i> ::Km	Tc ^R , Km ^R , pR ⁺ double mutant, <i>redR2</i> ::Km, Δ <i>redR1</i>	This study
pR ⁺ <i>rehL</i> ::Km	Tc ^R , Km ^R , pR ⁺ knockout mutant Mu_21, <i>rehL</i> ::TN<KAN-2>	(Darley <i>et al.</i> , 2007)
pR ⁺ <i>btdL</i> ::Km	Tc ^R , Km ^R , pR ⁺ knockout mutant Mu_76, <i>btdL</i> ::TN<KAN-2>	(Darley <i>et al.</i> , 2007)
pR ⁺ <i>bqds</i> ::Km	Tc ^R , Km ^R , pR ⁺ knockout mutant Mu_53, <i>bqdl</i> ::TN<KAN-2>	(Darley <i>et al.</i> , 2007)

Table 3.1.2. Oligonucleotide primers used in Chapter 4.1.

Primer	Sequence (5' to 3')	Product (target plasmid)
XbaIRedR1 BamHIRedR1	TCTAGAGGTGGACGGTTTCCTCTCCAGCGTCA GGATCCTTACTTGACGGTGACCTGCTTGACGATG	<i>redR1</i> (pKT25)
XbaIRedR2 BamHIRedR2	TCTAGAGATGAGTAGGGAAACTTCATTGGCCAGC GGATCCTTACCTGACGGTGAACGACT	<i>redR2</i> (pKT25)
XbaIRedR1 BamHINTDRedR1	TCTAGAGGTGGACGGTTTCCTCTCCAGCGTCA GGATCCTTACAGCGCGAGGATC	NTD- <i>redR1</i> (pKT25)
XbaIRedR2 BamHINTDRedR2	TCTAGAGATGAGTAGGGAAACTTCATTGGCCAGC GGATCCTTACTCGCGCAGCGCGAG	NTD- <i>redR2</i> (pKT25)
XbaIΔRedR1-2 BamHIRedR1	TCTAGAGACTTTCGACGACATCC GGATCCTTACTTGACGGTGACCTGCTTGACGATG	Δ <i>redR1</i> (pKT25)
XbaIΔRedR1-2 BamHIRedR2	TCTAGAGACTTTCGACGACATCC GGATCCTTACCTGACGGTGAACGACT	Δ <i>redR2</i> (pKT25)
HindIIIRedR1F XbaIRedR1Re	AAGCTTGTGGACGGTTTCCTCTCCAGCGTCAG TCTAGAGTTACCTGACGGTGAACGAC	<i>redR1</i> (pUT18C)
HindIIIRedR2F XbaIRedR2Re	AAGCTTATGAGTAGGGAAACTTCATTGGCCAGC TCTAGAGTTACTTGACGGTGACCTGC	<i>redR2</i> (pUT18C)
HindIIIΔRedR1F XbaIRedR1Re	AAGCTTACTTTCGACGACATCC TCTAGAGTTACCTGACGGTGAACGAC	Δ <i>redR1</i> (pUT18C)
HindIIIΔRedR2F XbaIRedR2Re	AAGCTTACTTTCGACGACATCC TCTAGAGTTACTTGACGGTGACCTGC	Δ <i>redR2</i> (pUT18C)
SallIreh1F BglIIreh1R	GTCGACCATCCTCGTTCCTCAGGG AGATCTCATTCCCTGTTTCCTCC	Prehl (p190PrehL)
NdeIredR1 HindIIIpETredR1	CATATGGTGGACGGTTTCCTCTC AAGCTTTTACTCGCGCAGCGCGAGG	<i>redR1</i> (pET28b-redR1)
NdeIredR2 HindIIIpETredR2	CATATGTTCACTTTCGACGAC AAGCTTTTACTCGCGCAGCGCGAGG	<i>redR2</i> (pET28b-redR2)
HindIIIpBRedR1F XbaIpBRedR1R	AAGCTTGTGGACGGTTTCCTCTCCAGCGTCAG TCTAGACGTTACCTGACGGTGAACGAC	<i>redR1</i> (pBBR1)
HindIIIpBRedR2F XbaIpBRedR2R	AAGCTTATGAGTAGGGAAACTTCATTGGCCAGCG TCTAGACGTTACTTGACGGTGACCTGC	<i>redR2</i> (pBBR2)
BglIIporf14 PstIporf14	AGATCTGGTCGGGCGCAAGCTC CTGCAGGTATCTCCTGTTAATC	P _{orf14} (p190Porf14)
BglIIpbqdhl PstIpbqdhl	AGATCTCTGCGACACGGCGTGC CTGAGGAACGAGGATGCTGCAG	P _{bqdL} (p190PbqdL)
priAlfa90	CATATTTCTGATTTGGTC	<i>rehL</i> primer extension
pripyr90	AATCCTTGGCATCTCG	<i>bqdL</i> primer extension
pri20(90)	CCACGAAGTTCGATGG	<i>orf14</i> primer extension

Table 3.1.3 Primers used in the RT-PCR assays described in Figure 4.1.1.

Primer	5' to 3' sequence	Amplified region (reaction in figure 4.1.1)	Expected size
Reg4 ups Cuatroend	ATTGATCGCCGCTTCCTTTGC CTGGTGGCAAAGGGTACGAAC	<i>orf4/orf5</i> intergenic region (A)	589 bp
Cuatroaups GSTend	CCGACTATCCGAACCTCTC GCCGACTATCCGAACCTCTC	<i>orf5/orf6</i> intergenic region (B)	333 bp
GSTups bethaend	TGCCATACACCCCGATTCCAGG GGATACCTTCGGCGACTTC	<i>orf6/rhS</i> intergenic region (C)	316 bp
Bethaups Alphaend	CACATCGTCGGGCGGTAGGC GCAACAGCAAGGCACCGAGG	<i>rhS/rhL</i> intergenic region (D)	420 bp
Pyrend Acups	TGCTAACCGACGAGATCCAG CCGTCTTCTTGAGCCAGCG	<i>bqdhL/bqdhS</i> intergenic region (E)	317 bp
Acend PDHups	ATCCTGGCGGTCCGGCACGG GATGCAGCCCCAGTTGAGG	<i>bqdhS/bqdhM</i> intergenic region (F)	338 bp
PDHend AcoR1ups	CCGTGTTCCCGCATCCGAC CCAGGATGAAGCCCGTGCC	<i>bqdhM/redR1</i> intergenic region (G)	368 bp
TH1ups 13end	CACATTGGGTGCGCCGAAGTAG CCATTTGCGCCGTGCTTTTCG	<i>orf8/orf9</i> intergenic region (H)	257 bp
orf9F-rt orf10R-rt	GCTGCGGATGACGCAACT GCCGAGGAAATCGGGGA	<i>orf9/orf10</i> intergenic region (I)	149bp
orf10F-rt orf11R-rt	CTCGATGAGTTCGTGATCCAG GTCATCTACCTGATCATGCCG	<i>orf10/orf11</i> intergenic region (J)	244 bp
orf11F-rt orf12R-rt	GTCATCTACCTGATCATGCCG GTCGAAGTCGGCATCGACGAG	<i>orf11/orf12</i> intergenic region (K)	175bp
Gabups 17end	GTTGCGACTCACCGTTGTC CGCTCGCCGAGTGTCGC	<i>orf12/btdhL</i> intergenic region (L)	230 bp
BtdhL end BtdhS end	AGATTAGCGGCCATCGGGGTACCC ATGGCGCAGTGCTGCTCCGCATC	<i>btdhL/btdhS</i> intergenic region (M)	450 bp
17ups 18end	TGCCGTTGAGGTTCCACAGC GCGGCGAGTCCCTAAAGATG	<i>btdhS/cup</i> intergenic region (N)	410 bp
18ups Pepend	GCCGCCGGGATGGATTTTC AGGAGGAGGTGGTGGTGAC	<i>cup/orf13</i> intergenic region (O)	254 bp
Pepups 20end	CCGCGCTCCCAGTCCTTG GCCGAAGCCCAGTATCCC	<i>orf13/orf14</i> intergenic region (P)	199 bp
20x AcoR2end	GAGATGTACTGGCACATCGG GGAGTTCAATGGCAATGTCCG	<i>orf14/redR2</i> intergenic region (Q)	404 bp
2q-rhIF 2q-rhIR	ATACCAGCGCATCGAGAC AAGTTCCGCCGACATCATC	<i>rhl</i> intergenic region (*)	375bp

3.2 Materials and methods for Chapter 4.2

3.2.1. Materials and standard procedures. All chemicals used in this study were from Fluka (Neu Ulm, Germany), Sigma-Aldrich Labor Chemie (Steinheim, Germany), PerkinElmer Life Science (Waltham, MA) or Merck Serono (Darmstadt, Germany). Restriction enzymes were obtained from New England BioLabs (Frankfurtam Main, Germany). T4 DNA ligase was purchased from Roche (Grenzach-Wyhlen, Germany). Plasmids were isolated with a Qiapreps spin plasmid kit from Qiagen (Hilden, Germany). PCRs and cDNA were purified with a Qiaquick gel extraction kit from Qiagen. Oligonucleotides were synthesized by Sigma-Aldrich. DNA sequencing was performed by the DNA Sequencing Service at the López-Neyra Parasitology and Biomedicine Institute (IPBLN; Granada, Spain). Transformation, PCR amplification with the Expand high-fidelity system (Roche), and protein analysis were performed according to standard protocols (Ausubel *et al.*, 1991).

3.2.2. Bacterial strains, media, and culture conditions. The bacterial strains used in this work are summarized in Table 3.2.1. *Azoarcus* sp. strain CIB (López Barragán *et al.*, 2004) was used for heterologous expression of the resorcinol degradation pathway encompassed in the pR⁺ cosmid (Darley *et al.*, 2007). *Azoarcus* sp. strain CIB bearing the pR⁺ plasmid and plasmid mutant derivatives was cultured anaerobically at 30°C without shaking in 50- or 100-ml infusion bottles containing non-reduced Widdel mineral medium (WMM) under nitrogen gas. The medium was buffered with 30 mM 3-(N-morpholino) propane sulfonic acid (MOPS) instead of bicarbonate and supplemented with 8 mM nitrate. Resorcinol (2 mM), glutarate (5 mM) or both (1 mM and 3 mM, respectively) was added from 0.5 M stock solutions under nitrogen gas. For genetic manipulations, *Azoarcus* sp. strain CIB (pR⁺) and derivatives were grown aerobically in WMM supplemented with 5 mM glutarate as the carbon source. Solid media for *Azoarcus* sp. strain CIB derivatives were prepared with 1.6% twice-washed Difco agar. When necessary, antibiotics were used at the following concentrations: tetracycline, 5 µg/ml; kanamycin, 25 µg/ml; and chloramphenicol, 15 µg/ml. When required, 5-bromo-4-chloro-3-indolyl D-galactopyranoside (X-Gal) was used at 0.8 mM. *Escherichia coli* strains were cultivated in Luria-Bertani (LB) medium (10 g l⁻¹ tryptone, 5 g l⁻¹ yeast extract, 5 g l⁻¹ NaCl) in Erlenmeyer flasks at 37°C and 200 rpm on a rotary shaker. When required, cultures were supplemented with 100 µg/ml ampicillin, 50 µg/ml kanamycin, 50 µg/ml streptomycin, and 0.5 mM isopropyl-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG).

3.2.3. Plasmid construction. Truncated versions of *redR1* and *redR2* genes lacking the NTD were amplified from pR⁺ cosmid DNA by PCR using the primers indicated in Table 3.2.2. The resulting products were purified and cloned in pGEM-T (Promega) and confirmed by sequence analysis. The pGEM-T derivatives were digested with NdeI/HindIII, and the fragments containing the Δ redR1 and Δ redR2 genes were ligated and fused in frame to pET28b+ to create pET28b- Δ redR1 and pET28b- Δ redR2. These were cut with XbaI /HindIII and the fragments were cloned into pMMB67EH, obtaining the plasmids pMMB Δ RedR1 and pMMB Δ RedR2 used for the β -gal assays. For the full-length version of RedR1 the same approach was used but cutting plasmid pET28bRedR1 (Pacheco-Sánchez *et al.*, 2017) with XbaI/HindII and subcloning the resulting fragment into pMMB67EH to obtain pMMBRedR1. To construct pJBRedR2, a HindIII fragment from pR⁺ encompassing the *redR2* gene and short flanking regions was first cloned in pBlueScript and then subcloned as EcoRI-KpnI fragment into pJB3Km (Blatny *et al.*, 1997).

3.2.4. Site-specific homologous inactivation of genes in the pR⁺ cosmid. All the plasmids used for allelic replacement were based on the pKNG101 suicide vector (Kaniga *et al.*, 1991) and are listed in Table 3.2.1. The mutants in pR⁺ obtained in this work were generated by double homologous recombination using pKNG101 plasmid derivatives as described previously (Aranda-Olmedo *et al.*, 2005). To maximize recombination efficiency and counter selection, mutagenesis were performed with the recipient pR⁺ plasmid or its derivatives in *E. coli* strains ET8000 or DH5a. The *btdS* mutant was constructed by two rounds of overlapping PCR. In a first round the upstream *btdS* flanking region (647 bp) and a gentamicin resistance cassette from pBBR1-MCS5 were amplified with the appropriated primers to create overlapping ends and used as template for a second round of PCR with the outer set of primers of the first reactions. The procedure was repeated combining the downstream *btdS* flanking region (678 bp), and then the two PRC products containing the same gentamicin resistance gene were used as template for a final PCR with the outer set of *btdS* primers of the first reactions. The final fragment was cloned into pGEM-T (Promega) and sequenced to exclude the presence of point mutations in the sequences flanking *btdS*. The fragment was cut and cloned between the ApaI and SpeI sites of pKNG101 to obtain pKNGBtdS::Gm. This plasmid was used to deliver the mutation to pR⁺ cosmid in *E. coli* ET8000 by RP4-mediated mobilization, as follows: the *E. coli* donor strain CC118 λ pir (pKNGBtdS::Gm), recipient strain ET8000 (pR⁺) and mutant derivatives, and HB101(pRK600) helper strain were grown overnight on LB medium in the presence of the appropriated antibiotics. Samples of 0.5 ml of each culture were harvested by centrifugation, the cells were washed with 1 ml LB, the resulting

pellets were combined in 100 μ l LB and dropped on a sterile 47 mm diameter, 0.22 μ m-pore-size filter (Schleicher and Schuell, Germany) placed on an LB plate, and incubated overnight at 30°C. The filters were transferred into 3 ml of M9 salt solution (Abril *et al.*, 1989), and cells were washed off by vigorous vortexing. *E. coli* ET8000 (pR⁺) transconjugants were selected for their resistance to nalidixic acid, tetracycline, gentamicin in LB solid medium. Among them, those where double crossovers had occurred were checked for sucrose-resistance/streptomycin-sensitivity. The *btdS*::Gm mutation was delivered in the *redR1* and *redR2* mutants and in the *redR1 redR2* double mutant directly in *Azoarcus* sp. CIB bearing the corresponding mutants of (pR⁺). To that end, we first selected a transconjugants bearing a cointegrate of pKNG101BtdS into the pR⁺ derivative on WMM with 5 mM glutarate as the sole carbon source and 50 μ g/ml streptomycin in addition to tetracycline. Streptomycin-resistant transconjugants were analyzed by PCR with primers flanking the *btdS* gene to confirm the presence of a wild-type and a mutated gene copy, and a selected correct clone was cultured in liquid LB medium with only tetracycline during 12 to 16 h to promote the second crossover event and the allelic exchange to occur. To select double recombinants, colonies were plated on LB with 10% (w/v) sucrose. Streptomycin-sensitive/sucrose-resistant colonies were analyzed by PCR to confirm the double cross-over. The correct insertion of all mutations was confirmed by PCR analysis and Southern blotting.

3.2.5. Triparental conjugation of cosmids and plasmids into *Azoarcus* sp. strain CIB. Wild-type and mutant pR⁺ cosmid derivatives, as well as pMP190 derivatives were transferred to *Azoarcus* sp. strain CIB by RP4-mediated mobilization. *Azoarcus* sp. strain CIB was grown aerobically to saturation in WMM supplemented with glutarate (5 mM), and *E. coli* donor strains bearing either pR⁺ or its mutant derivatives, or pMP190 derivatives, and the HB101 (pRK600) helper strain were grown overnight on LB medium in the presence of the required antibiotics. Samples of the *E. coli* cultures (1 ml each) and 15 ml of *Azoarcus* sp. strain CIB culture were harvested by centrifugation and the cell pellets were washed once with 1 ml of WMM and combined in 100 μ l WMM. The resulting cell suspension was dropped onto a sterile 47-mm-diameter, 0.22- μ m-pore-size filter (Schleicher and Schuell, Germany) placed on an LB plate, and incubated overnight at 30°C. The filters were then transferred into 1 ml of WMM, and cells were washed off by vigorous vortexing. *Azoarcus* sp. strain CIB transconjugants were selected aerobically for their resistance to tetracycline (pR⁺ derivatives) and chloramphenicol (pMP190 derivatives) on WMM supplemented with glutarate (5 mM) to counter-select against *E. coli* donor and helper strains.

3.2.6. Bacterial adenylate cyclase two-hybrid assays (BACTH). BtdS was amplified by PCR using the primers indicated in Table 3.2.2. The resulting amplicon was purified and cloned in pGEM-T (Promega) and verified by sequencing. The pGEM-T derivative was digested with Sall/HindIII and subcloned into pUT18 to create pUT18btdS. The constructions of the complete and truncated versions of the RedR1 and RedR2 proteins fused to pKT25 were already available (Pacheco-Sánchez *et al.*, 2017). The BACTH assays were performed as previously described (Karimova *et al.*, 2000). The pKT25 and pUT18 plasmids carrying *redR1*, *redR2* and *btdS* genes or their truncated derivatives were transformed in different combinations into *E. coli* BTH101 cells, and interaction efficiency between the plasmid-encoded proteins was quantified by measuring β -galactosidase activity of the cultures following overnight induction with 0.5 mM IPTG. Assays were minimally performed in triplicate and standard errors of the mean were calculated.

3.2.7 Betagalactosidase assays. For assays in *E. coli* strains BTH101 and MC4100, 3 ml LB supplemented with the required antibiotics were inoculated with a single colony of the *E. coli* strain bearing the appropriate combination of plasmids and incubated overnight at 30°C. Fresh 3 ml LB was then inoculated with 1/100 of this overnight culture and incubated at 30°C with shaking. When the cultures reached the exponential phase, or after overnight growth, β -galactosidase activity was determined as described previously (Miller, 1972). For assays in *Azoarcus* sp. strain CIB, 3 ml WMM supplemented with 5 mM glutarate as the carbon source and the required antibiotics were inoculated with a single colony of each strain bearing the appropriate combination of plasmids and incubated aerobically (100 rpm) for 3 days at 30°C. The pre-grown culture was then inoculated into 45 ml of WMM supplemented with the indicated carbon source to an initial OD of 0.05 and incubated under anoxic conditions at 30°C without shaking. At the indicated times, β -galactosidase activity was determined in permeabilized whole cells (0.1 ml) as above.

3.2.8. Construction of human influenza haemagglutinin (HA) epitope-tagged RedR1 and RedR2. To construct the plasmids for the production of C-terminal HA-tagged RedR1 and RedR2 proteins, the genes were amplified using the primers indicated in Table 2.2 that included the sequence for the HA tag. The resulting fragment were purified and cloned in pGEM-T (Promega) and confirmed by sequence analysis. The pGEM-T derivatives were digested with NdeI/HindIII and the fragments containing the tagged *redR1* and *redR2* genes were ligated and fused to pET24b+ to create pET24bRedR1HA and pET24bRedR2HA. *E. coli*

BL21(D3) transformed with plasmids pET24bRedR1HA or pET24bRedR2HA were used to overproduce RedR1HA and RedR2HA with a C-terminal HA-tag.

3.2.9. Overproduction and purification of 6His-RedR1, 6His-RedR2 and MBP-6His-BtdS by affinity chromatography. BL21 (pETRedR1), BL21 (pETRedR2) and BL21 (pMALBtdS) cells were grown in 1 liter of 2xYT medium supplemented with 25 µg/ml kanamycin in an Erlenmeyer flask on a rotary shaker at 37°C. When the cells had reached an A_{660} of 0.6, protein expression was induced with 0.1 mM IPTG and incubation was continued for 20 h at 18°C. The cells were then harvested and stored at 20°C until use. Frozen cells were suspended in 20 ml of lysis buffer A (20 mM Tris-HCl [pH 8.0], 500 mM NaCl, 10% glycerol, 10 mM Triton X-100, 0.1 mM EDTA, 2.5 mM -mercaptoethanol, and 10 mM imidazole) and lysed by two passages through a French pressure cell. The crude extract was centrifuged at 13,000 g for 1 h at 4°C. The resulting supernatant containing 6His-RedR1, 6His-RedR2 or MBP-6His-BtdS protein was loaded onto a HisTrap HP affinity column (GE Healthcare) prepared as indicated by the manufacturer and equilibrated with the lysis buffer A containing 10 mM imidazole in an Äkta fast protein liquid chromatography system (GE Healthcare). The protein was eluted with 250 mM imidazole. The purity of the 6His-RedR1, 6His-RedR2 and MBP-6His-BtdS proteins was verified by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). The protein concentration was determined with the Bradford method using bovine serum albumin as the standard after dialyzed against buffer B (20 mM Tris-HCl [pH 8.0], 300 mM NaCl, 10% glycerol, 0.1 mM EDTA, and 1 mM DTT).

3.2.10. Column binding assay. Before starting these assays, the 6His-RedR1, 6His-RedR2, or MBP-6His-BtdS proteins were purified as described in the previous section. After being dialysed against buffer B to eliminate imidazole, the assay started by attaching the purified protein to a HisTrap HP affinity column (GE Healthcare). Then a crude extract containing the overproduced protein of interest (RedR1-HA or RedR2-HA) was obtained by 3 passages of 1 l culture concentrated in 30 ml of buffer A through a French pressure cell. The crude extract was centrifuged at 13,000 g for 1 hour at 4°C. The resulting supernatant containing the HA-tagged protein was loaded onto the column where the 6His-RedR1, 6His-RedR2, or MBP-6His-BtdS protein had previously been loaded, then the column was washed with up to 10 column volumes of buffer A supplemented with 10 mM imidazole. The bound proteins were then eluted in buffer B (lysis buffer supplemented with 250 mM imidazole). Fractions (2 ml) were collected throughout

the process and analyzed by Western Blot with either anti-His or anti-HA antibodies to identify each protein.

3.2.11. SDS-PAGE and Western-Blot. Proteins in chromatography samples (25 μ l) were fractionated by SDS-PAGE in 10% polyacrylamide gels and electrotransferred to nitrocellulose membranes. Membranes were then blocked with 5% dry milk in phosphate-buffered saline (PBS). Immunodetection was performed using anti-His antibody (Penta-His Antibody (1:5000), BSA-free from QiagenR) or a monoclonal antibody directed against the influenza hemagglutinin epitope (1:2000) (HA.11, Covance) by incubating the membranes during 1 h at room temperature. Then the membranes were washed three times with PBS. The second antibody, Polyclonal Rabbit Anti-Mouse Immunoglobulins/HRH (Dako) or the horseradish peroxidase-conjugated rabbit anti-mouse (DAKO) (1:1000) was added and incubated for 1 hour, membranes were washed three times with PBS, and the signal was detected using the SuperSignal® West Femto Chemiluminescent Substrate (Thermo Scientific). Blots were scanned and analyzed using the Quantity One version 4.6.7 (Bio-Rad).

3.2.12. Bioinformatics tools for sequence analysis. Nucleotide and amino acid sequences were analyzed using the tools provided by the NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) and the ExpASy molecular biology server (<http://www.expasy.org>). Computational models of the protein three-dimensional structure were built with the Phyre2 Server (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/>) (Kelley *et al.*, 2015). DAS transmembrane prediction server (<https://tmdas.bioinfo.se/>) (Cserzö *et al.*, 1997) was used to confirm the BtdS secondary structure determined by Phobius (<http://phobius.sbc.su.se>) (Zou *et al.*, 2010) and visualized with Protter (<http://wlab.ethz.ch/protter>) (Omasits *et al.*, 2014). The protein structure models were visualized with UCSF Chimera (Pettersen *et al.*, 2004).

Table 3.2.1 Bacterial strains and plasmids used in Chapter 4.2.

Strain or plasmid	Genotype/Relevant Characteristics	Reference
Strains		
<i>Escherichia coli</i>		
MC4100	<i>AraD139 Δ(argF-lac) U169 relA1 rpsL150(Sm^R) deoCL ptsF25 flbB5301 rbsR</i>	(Casadaban, 1976)
HB101	<i>supE44 hsdS20 (r_B⁻ m_B⁻) recA13 ara-14 proA2 lacY1 galK2 rpsL20 (Sm^R) xyl-5 mtl-1</i>	(Boyer and Roulland-Dussoix, 1990)
CC118λpir	<i>Δ(ara-leu)araD ΔlacX74 galE galK phoA20 thi-1 rpsE rpoB argE recA1</i> , lysogenized with λpir	(de Lorenzo <i>et al.</i> , 1990)
DH5α	<i>endA1 hsdR17 supE44 thi-1 recA1 gyrA(Nal^R) relA1 Δ(argF-lac) U169 depR(Φ80dlacΔ(lacZ) M15)</i>	(Sambrook <i>et al.</i> , 1989)
BTH101	F ⁻ <i>cya-99 araD139 galE15 galK16 rpsL1 (Str^r) hsdR2 mcrA1 mcrB1</i>	Karimova <i>et al.</i> , 2000)
BW25113	F ⁻ , Δ (<i>araD-araB</i>)567, <i>lacZ4787(del)::rrnB-3</i> , LAM-, <i>rph-1</i> , Δ(<i>rhaD-rhaB</i>)568, <i>hsdR514</i> (Keio collection)	(Datsenko & Wanner, 2000; Baba <i>et al.</i> , 2006)
JW1702-1	BW25113 strain with inactivated mutants in the <i>ihfA</i> gene	(Baba <i>et al.</i> , 2006)
JW3169-1	BW25113 strain with inactivated mutants the <i>rpoN</i> gene which encodes the σ ⁵⁴ subunit of RNA polymerase	(Baba <i>et al.</i> , 2006)
<i>Azoarcus</i>		
<i>Azoarcus anaerobius</i>	Wild-type strain, strict anaerobe, degrades resorcinol under denitrifying conditions(DSM12081)	(Springer <i>et al.</i> , 1998b)
<i>Azoarcus</i> sp. strain CIB	Wild-type strain, degrader of aromatic compounds	(Martín-Moldes <i>et al.</i> , 2015b)
Plasmids		
PCR2.1-TOPO	PCR product cloning vecto, <i>ori</i> PUC, <i>ori</i> f1; Ap ^R , Km ^R	Invitrogen
pGEMT®-T Easy	PCR product cloning vector, <i>ori</i> PUC, <i>ori</i> f1; Ap ^R	Promega
pMP190	Cm ^R Broad-host-range promoter probe vector	(Spaink <i>et al.</i> , 1987b)
pMP220	Tc ^R broad-host-range promoter probe vector (<i>lacZ</i>)	(Spaink <i>et al.</i> , 1987a; Kovach <i>et al.</i> , 1991)
p190Porf14	<i>P_{orf14}::lacZ</i> in pMP190; Cm ^R	(Pacheco-Sánchez <i>et al.</i> , 2017)
p220Porf14	<i>P_{orf14}::lacZ</i> in pMP 220; Tc ^R	(Pacheco-Sánchez <i>et al.</i> , 2017)
pKNG101	Sm ^R ; gene replacement vector; <i>ori</i> R6K <i>oriT</i> RK2 <i>sacB</i>	(Kaniga <i>et al.</i> , 1991)
pKNGbtdS::Km	pKNG101 carrying, between <i>Apal</i> - <i>SpeI</i> sites, <i>btds</i> in a 1.6-kb fragment from pR ⁺ disrupted with a Gm ^R cassette	This study
pET28b+	Expression vector for recombinant proteins with His6 tag at C-terminus; Km ^R	Novagen
pET28b-ΔRedR1	pET28b+ derivate containing redR1 starting at residue 319 (without NTD domain)	This study
pET28b-ΔRedR2	pET28b+ derivate containing redR2 starting at residue 322 (without NTD domain)	This study
pET28bRedR1	pET28b+ derivative containing redR1 gene; Km ^R	(Pacheco-Sánchez <i>et al.</i> , 2017)
pET28bRedR2	pET28b+ derivative containing redR2 gene; Km ^R	(Pacheco-Sánchez <i>et al.</i> , 2017)
pMMB67EH	Ap ^R , p _{tac} , <i>oriV</i> , Expression vector for recombinant proteins, broad-host-range, Ap ^R	(Furste <i>et al.</i> , 1986)
pMMBRedR1	pMMB67EH carrying <i>redR1</i> subcloned from pET28RedR1 cut with XbaI / HindIII	This study

pMMBΔRedR1	pMMB67EH carrying Δ <i>redR1</i> subcloned from pET28-ΔRedR1 cut with XbaI / HindIII	This study
pMMBΔRedR2	pMMB67EH carrying Δ <i>redR2</i> subcloned from pET28-ΔRedR2 cut with XbaI / HindIII	This study
pJB3Ap	pJB3Km1 derivative lacking the Km ^R gene; broad-host range IncP1 cloning vector, Ap ^R	(Blatny <i>et al.</i> , 1997); this study
pJBRedR2	<i>redR2</i> gene in pJB3Ap as KpnI-HindIII fragment .	This study
pMAL-pV	Expression vector for recombinant proteins with a MBP tag at the N-terminus, Ap ^R	(Pérez-Martín <i>et al.</i> , 1997)
pMALBtds	pMAL-pV derivat containing <i>btdS</i> gene; Ap ^R	This study
pET24b+	Expression vector for recombinant proteins with a His6 tag at the N-terminus; Km ^R	Novagen
pET24bRedR1HA	pET24b+ derivat containing RedR1 gene with HA tag at the C-terminal; Km ^R	(Pacheco-Sánchez <i>et al.</i> , 2017)
pET24bRedR2HA	pET24b+ derivat containing RedR2 gene with HA tag at the C-terminal; Km ^R	(Pacheco-Sánchez <i>et al.</i> , 2017)
pKT25	Km ^R , pSU40 derivative that carries the T25 fragment of <i>Bordetella pertussis</i> adenylate cyclase (residues 1 to 224)	(Karimova <i>et al.</i> , 2000)
pUT18	Ap ^R , pUC19 derivative that carries the T18 fragment of <i>B. pertussis</i> adenylate cyclase with a multicloning	(Karimova <i>et al.</i> , 2000)
pUT18btdS	In frame gene fusion of the T18 fragment of <i>B. pertussis</i> adenylate cyclase and the <i>btdS</i> gene in pUT18.8 in pKT25.	This study
pKT25redR1	In frame gene fusion of the T25 fragment of <i>B. pertussis</i> adenylate cyclase and the <i>redR1</i> gene in pKT25.	(Pacheco-Sánchez <i>et al.</i> , 2017)
pKT25redR2	In frame gene fusion of the T25 fragment of <i>B. pertussis</i> adenylate cyclase and the <i>redR2</i> gene in pKT25.	(Pacheco-Sánchez <i>et al.</i> , 2017)
pKT25redR1-NTD	In frame gene fusion of the T25 fragment of <i>B. pertussis</i> adenylate cyclase and the NTD of <i>redR1</i> gene in pKT25.	(Pacheco-Sánchez <i>et al.</i> , 2017)
pKT25reR2-NTD	In frame gene fusion of the T25 fragment of <i>B. pertussis</i> adenylate cyclase and the NTD of <i>redR2</i> gene in pKT25.	(Pacheco-Sánchez <i>et al.</i> , 2017)
pKT25redR1Δ6NTD	In-frame gene fusion of <i>B. pertussis</i> adenylate cyclase T25 fragment and a truncated <i>redR1</i> gene starting at residue 8 in pKT25.	This study
pKT25redR2Δ8NTD	In-frame gene fusion of <i>B. pertussis</i> adenylate cyclase T25 fragment and a truncated <i>redR1</i> gene starting at residue 10 in pKT25.	This study
Cosmids		
pLAFR3	Tc ^R , cos, RK2oriV, RK2oriT	(Staskawicz <i>et al.</i> , 1987)
pR+	Tc ^R , pLAFR3 containing a 29.9-kb resorcinol gene cluster of <i>A. anaerobius</i>	(Darley <i>et al.</i> , 2007)
pR+ <i>redR1</i> ::Km	Tc ^R , Km ^R , pR+ knockout mutant Mu_42, <i>redR1</i> ::TN<KAN-2>	(Darley <i>et al.</i> , 2007)
pR+ <i>redR2</i> ::Km	Tc ^R , Km ^R , pR+ knockout mutant, mini-Tn5 Km resistance gene inserted at the BglII site of <i>redR2</i>	(Pacheco-Sánchez <i>et al.</i> , 2017)
pR+ <i>btdS</i> ::Gm	Tc ^R , Gm ^R , pR+ knockout mutant, the <i>btdS</i> gene in a 1.6-kb fragment from pR+, containing a Gm ^R cassette.	This study
pR+ <i>btdS</i> ::Gm <i>redR1</i> ::Km	Tc ^R , Km ^R , Gm ^R , pR+ double mutans, <i>btdS</i> ::Gm <i>redR1</i> ::Km	This study
pR+ <i>btdS</i> ::Gm <i>redR2</i> ::Km	Tc ^R , Km ^R , Gm ^R , pR+ double mutans, <i>btdS</i> ::Gm <i>redR2</i> ::Km	This study

Table 3.2.2. Oligonucleotide primers used in for Chapter 4.2

Primer	Sequence (5' to 3')	Product (target plasmid)
GmF	ACGCACACCGTGGAAC	<i>Gm</i>
GmR	TCCTCGATCTCGGCTTGAACG	
FupS	GGTGTTCGCGGTCGAG	Upstream <i>btdS</i>
RupsGm	GTTTCCACGGTGTGCGTTCGGGGAAAGAAGAA AAGGC	
Rds	ATGACCTCGATCATCTGC	Downstream <i>btdS</i>
FdsGm	CGTTCAAGCCGAGATCGATCGAGGAGGGCAG CCATGAGCG	
SalIbtdsMBPForv	GTGACATGCGGGGAAATATGGCTCTTACC	<i>btdS</i> (pMALBtdS)
HindIIIbtdsMBPRev	AAGCTTTAACATGGCTGCCCCAGTAC	
NdeIRedR1	CATATGGTGGACGGTTTCCTCTC	<i>redR1</i> (pET24b+HARedR1)
HindIIIHARedR1	AAGCTTTACGCGTAGTCCGGCACGTCGTACGG GTACCTGACGGTGAACG	
NdeIRedR2	CATATGTTCACTTTCGACGAC	<i>redR2</i> (pET24b+HARedR2)
HindIIIHARedR2	AAGCTTTACGCGTAGTCCGGCACGTCGTACGG GTACTTGACGGTGACCTGCTTGAC	
HindIIIbtdS	AAGCTTATGCGGGGAAATATGGCTCTTACC	<i>btdS</i> (pUT18btdS)
SalIbtdS	GTCGACTCATGGCTGCCCCAGTACAGC	
NdeIΔRedR1	CATATGACTTTTCGACGACATCC	ΔRedR1 (pET28bΔRedR1)
HindIIIpETRedR1	AAGCTTTTACTCGCGCAGCGCGAGG	
NdeIΔRedR2	CATATGACTTTTCGACGACATCC	ΔRedR2 (pET28bΔRedR2)
HindIIIpETRedR2	AAGCTTTTACTCGCGCAGCGCGAGG	
XbaIΔ6RedR1	TCTAGAGAGCGTCAGAGCCGCTTGG	Δ6RedR1 (pKT25redR1Δ6NTD)
BamHINTDRedR1	GGATCCTTACAGCGCGAGGATC	
XbaIΔ8RedR1	TCTAGAGAGCGTCAGAGCCGCTTGG	Δ8RedR1 (pKT25redR2Δ8NTD)
BamHINTDRedR2	GGATCCTTACTCGCGCAGCGCGAG	
SalIbtdsMBPForv	GTGACATGCGGGGAAATATGGCTCTTACC	<i>btdS</i> (pMALBtdS)
HindIIIbtdsMBPRev	AAGCTTTAACATGGCTGCCCCAGTAC	

3.3. Materials and methods for Chapter 4.3

3.3.1. Materials and standard procedures. All chemicals used in this study were from Fluka (Neu Ulm, Germany), Sigma-Aldrich (Darmstadt, Germany) and Merck (Darmstadt, Germany). Restriction and other molecular biology enzymes were obtained from New England BioLabs (Ipswich, Massachusetts) and Roche (Basel, Switzerland). Plasmids were isolated with a Qiaprep spin plasmid kit from Qiagen (Hilden, Germany). PCR products and cDNA were purified with a Qiaquick gel extraction kit from Qiagen. Oligonucleotides were synthesized by Sigma-Aldrich. RNA was extracted using the TRI-reagent method (Ambion, Austin, TX). DNA sequencing was performed by the DNA Sequencing Service at the López-Neyra Parasitology and Biomedicine Institute (IPBLN, CSIC; Granada, Spain). Transformation, PCR amplification with the Expand high-fidelity system (Roche), and protein analysis were performed according to standard protocols (Ausubel *et al.*, 1991).

3.3.2. Bacterial strains, plasmids, and culture conditions. The bacterial strains and plasmids used in this study are summarized in Table 3.3.1. *Thauera aromatica* strain AR-1 (Gallus *et al.*, 1997) and its mutant derivatives and transconjugants were grown anaerobically at 30°C without shaking in 50 or 100 ml infusion bottles containing non-reduced Widdel mineral medium under nitrogen gas prepared as described (Molina-Fuentes *et al.*, 2015). The final medium (WMM) included 30 mM 3-(N-morpholino) propanesulfonic acid (MOPS) as buffer instead of bicarbonate and 8 mM potassium nitrate. The carbon sources used were stored in sterile infusion bottles under nitrogen gas and were added to the cultures with syringes to the specified final concentrations. For all genetic manipulations, *T. aromatic* strain AR-1 and derivatives were grown aerobically in WMM supplemented with glutarate 5 mM as the carbon source. Solid media were prepared by adding 1.6 % twice-washed Difco agar to the WMM medium. *Escherichia coli* strains HB101, DH5 α , MC4100 and CC118 λ pir were grown aerobically at 37°C in Luria-Bertani (LB) medium. When appropriate, antibiotics were used at the following concentration: tetracycline, 10 $\mu\text{g ml}^{-1}$; ampicillin, 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$; kanamycin, 50 $\mu\text{g ml}^{-1}$, streptomycin, 50 $\mu\text{g ml}^{-1}$, and gentamicin, 10 $\mu\text{g ml}^{-1}$ (except for *T. aromatica* AR-1, for which tetracycline and kanamycin were used at 5 $\mu\text{g ml}^{-1}$ and 25 $\mu\text{g ml}^{-1}$, respectively).

3.3.3. Growth experiments. Infusion bottles (100 ml) containing 75 ml of anaerobic WMM supplemented with the required antibiotics and 3,5-DHB (1 mM) and/or succinate (2 mM) or glutarate (3.5 mM) as carbon source were inoculated with 1% of an exponentially growing culture of *T. aromatica* AR-1 or mutant derivatives, and incubated anaerobically at 30°C. Samples were taken anoxically

with a sterile syringe flushed with N₂ at the designated time points and used immediately for determination of the optical density at 600 nm (OD₆₀₀) or β-galactosidase activity.

3.3.4. Plasmid Construction. Plasmids carrying transcriptional *P_{dbhL}::lacZ*, *P_{orf18}::lacZ*, *P_{orf20}::lacZ* and *P_{dbdR}::lacZ* fusions were obtained as follows. DNA fragments containing the *dbhL* (328-bp), *orf18* (385-bp), *orf20* (345-bp) and *dbdR* (301-bp) promoter regions from *Thauera aromatica* AR-1 were amplified by PCR using the appropriated primers (Table 3.3.2) to generate flanking BglII (upstream) and XbaI (downstream) sites for *P_{dbhL}* promoter, BglII (upstream and downstream) sites for *P_{dbdR}* promoter and BglII (upstream) and PstI (downstream) sites for *P_{orf18}* and *P_{orf20}* promoters, and cloned in pGEM-T (Promega) or pCR2.1-TOPO (Invitrogen). The resulting plasmids carrying the promoters were digested with the enzymes for the newly created flanking sites and the promoter-containing fragment was cloned between the same sites of the broad-host-range promoter probe vector pMP220 (Spaink *et al.*, 1987) to create p220PdbhL, p220Porf18, p220Porf20 and p220PdbdR. The correct orientation of each promoter in pMP220 was confirmed by sequence analysis. For the construction of the plasmid pBBdbdR, the *dbdR* gene was amplified by PCR using the primers HindIIIDbdR-F and XbaIDbdR-R (Table 3.3.2) using genomic DNA from *T. aromatica* AR-1 as template. The resulting product was purified and cloned in pGEM-T (Promega) and confirmed by sequence analysis. The pGEM-T derivatives were digested with HindIII/XbaI, and the fragment containing the *dbdR* gene was ligated in the same sites of pBBR1MCS-5 to create pBBdbdR. This plasmid was used for the complementation of the *dbdR* mutant.

3.3.5. Triparental conjugation. The promoter::*lacZ* fusion pMP220 derivatives were transferred to *T. aromatica* strain AR-1 (wild type) and its mutant derivatives AR-1-*dbdR*, AR-1-*bqdL*, AR-1Δ*btdL-qorA* and AR-1-*dbhL* obtained previously (Molina-Fuentes *et al.*, 2015) by RP4-mediated mobilization. *T. aromatica* AR-1 was grown to saturation in WMM supplemented with glutarate (5 mM). The *E. coli* donor strain CC118λpir bearing the plasmids to be transferred and the *E. coli* HB101 (pRK600) helper strain were grown overnight on LB medium in the presence of tetracycline and chloramphenicol, respectively. All steps were performed aerobically as follows: 1 ml of each *E. coli* culture and 15 ml of *T. aromatica* AR-1 culture were harvested by centrifugation (13,000 g for 10 min at 10°C). Cell pellets were washed once with 1 ml of WMM. The three resulting cell pellets were combined in 100 μl WMM, distributed on a sterile 47 mm-diameter, 0.22 μm pore-size filter (Schleicher and Schuell, Germany) placed on an LB plate, and incubated overnight at 30°C. The filters were then transferred into 3 ml of

WMM, and cells were washed off by vigorous vortexing. *T. aromatica* AR-1 transconjugants were selected by their resistance to tetracycline (pMP220::promoter) or kanamycin and tetracycline (*dbdR* mutant bearing plasmid pMP220::promoter) either anaerobically or aerobically in WMM supplemented with 5 mM glutarate to counter-select against *E. coli* donor and helper strains. The transconjugants were confirmed by PCR analysis. Complementation plasmids were transferred to *T. aromatica* AR-1 mutant strains as described above, except that *T. aromatica* AR-1 mutant transconjugants were selected aerobically for their resistance to gentamicin in WMM supplemented with 5 mM glutarate.

3.3.6. β -Galactosidase assays. For assays in *T. aromatica* AR-1 and its mutants, 3 ml WMM supplemented with 5 mM glutarate as the carbon source and the required antibiotics was inoculated with a single colony of each strain bearing the appropriate combination of plasmids and incubated anaerobically for 3 days at 30°C as described (see above). The pregrown culture was then inoculated into 45 ml of WMM supplemented with the indicated carbon source to an initial OD of 0.05 and incubated under anoxic conditions at 30°C without shaking. At the indicated times, 1 ml culture was collected by centrifugation and β -galactosidase activity was determined in permeabilized whole cells according to Miller (Miller, 1972). Assays were minimally performed in triplicate and standard errors of the mean were calculated.

3.3.7. RNA preparation. *T. aromatica* AR-1 was grown at 30°C under nitrate-reducing conditions with 1 mM 3,5-DHB and/or 3.5 mM glutarate as the carbon source. Cells (45 ml) were harvested by centrifugation (8,000 x g, 5 min, 4°C) in disposable plastic tubes precooled in liquid nitrogen, and the pellets were kept at -80°C until use. RNA was extracted using the TRI-reagent method (Ambion, Austin, TX) with the following modifications (Aranda-Olmedo *et al.*, 2005): 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. The RNA concentration was determined with a NanoDrop (Thermo Scientific), and RNA integrity was assessed by agarose gel electrophoresis.

3.3.8. Primer extension analysis. Oligonucleotides complementary to the coding strand of the *dbhL*, *orf18*, *orf20*, and *dbdR* genes (Table 3.3.2) were ³²P labeled at their 5' end in 10 μ l final volume that contained 1 μ l 10 x T4 polynucleotide kinase buffer (Roche), 10 pmol oligonucleotide, 1 μ l [γ -³²P]ATP (6,000 mCi/mmol) and 1 U phage T4 polynucleotide kinase (Roche). The reaction mixtures were incubated for 1 h at 37°C and 10 min at 70°C to inactivate the kinase, and the labeled oligonucleotide was filtered through a Micro Bio-Spin column (Bio-Rad) to eliminate unbound nucleotide. Labeled primers were annealed

to total RNA isolated as described above in 10 μ l annealing mixture that contained 2 μ l 5x annealing buffer (2 M NaCl, 50 mM PIPES [piperazine-N,N-bis(2-ethanesulfonic acid)] [pH 7.0]), 10^5 cpm of 5'-end-labeled primer, and 10 to 30 μ g total RNA template. The mixtures were first heated at 95°C for 3 min, incubated at 65°C for 5 min, and then slowly cooled down to 44°C. cDNA was synthesized by the addition of 40 μ l of reverse transcriptase buffer to bring final concentrations to 50 mM Tris-HCl (pH 8.5), 1 mM dithiothreitol (DTT), 8 mM MgCl₂, 30 mM KCl, 1 mM (each) all four deoxynucleoside triphosphates (dNTPs), 0.4 U/ μ l of RNase inhibitor (Roche) and 8 U avian myeloblastosis virus (AMV) reverse transcriptase (Roche). The mixtures were incubated for 1 h at 44°C, and the reaction was halted by the addition of 5 μ l 3 M sodium acetate and 150 μ l ethanol. The products of reverse transcription were analyzed in urea-polyacrylamide sequencing gels. Gels were exposed to Molecular Imager model GS-525 (Bio-Rad). The DNA sequence was patterned using the DNA Cycle Sequencing kit based on the Sanger method (dideoxy chain termination method) following the manufacturer's instructions except that ³²P-labelled primers (1 μ l, 6.5×10^5 cpm) were used instead of fluorescence-labeled primers.

3.3.9. Overproduction and purification of His-tagged DbdR by affinity chromatography. The *dbdR* gene was amplified by PCR using the primers NdeIDbdR-F and HindIIIDbdR-R (Table 3.3.2). The resulting products was purified and cloned in pGEM-T (Promega) and sequenced to rule out the presence of mutations. The pGEM-T derivative was digested with NdeI/HindIII, and the fragment containing the *dbdR* gene was ligated and fused in frame to pET28b+ to create pETDbdR. *E. coli* BL21 (D3) transformed with plasmid pETDbdR was used to overproduce the protein with the His tag. The cells were grown in 1 liter of 2xYT medium supplemented with 25 μ g/ml kanamycin in an Erlenmeyer flask on a rotary shaker at 37°C. When the cells had reached an A₆₆₀ of 0.6, protein expression was induced with 0.1 mM IPTG (isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside) and incubation was continued for 20 h at 18°C. The cells were then harvested and stored at -20°C until use. Frozen cells were suspended in 25 ml of buffer A (20 mM Tris-HCl [pH 7.9], 500 mM NaCl, 10% glycerol, 1 mM DTT, and 10 mM imidazole) and lysed by 3 passages through a French pressure cell. The crude extract was centrifuged at 13,000 x g for 1 h at 4°C. The supernatant was passed through a 0.45 μ m pore-size filter and loaded onto a 5-ml Ni-agarose column (Amersham Biosciences) pre-equilibrated with buffer A in an ÄKTA (GE Healthcare) FPLC system. Nonspecifically bound material was washed with six volumes of the same buffer plus 10 mM imidazole, and then a linear gradient from 20 mM to 500 mM imidazole in buffer B (20 mM Tris-HCl [pH 7.9], 500 mM NaCl, 10% glycerol, 1

mM DTT) was applied at a flow rate of 1 ml min⁻¹ for 30 min. Fractions of 2 ml were harvested; the 6His-DbdR protein eluted between 150 mM and 250 mM imidazole. The purity of the 6His-DbdR protein was analyzed in 12.5% SDS-PAGE. The protein was dialyzed overnight against buffer B, quantified with Bradford (Biorad) and aliquot fractions were stored at 4°C.

3.3.10. Analytical size-exclusion chromatography. The native molecular mass of purified 6His-DbdR protein was determined by gel filtration chromatography using a FPLC Superdex 200 HR 10/30 (GE Healthcare) column. The buffer used for the gel filtration chromatography was the working buffer used for the purification of 6His-DbdR (see 6.3.9.) without imidazole and DTT. About 0.45 mg of purified 6His-DbdR protein was applied at a flow rate of 0.5 ml min⁻¹. The molecular mass of DbdR was estimated from a plot of the elution volume against the logarithm of the molecular masses of the following protein standards (Sigma): β -Amylase 4 mg/ml (200 kDa), alcohol dehydrogenase 5 mg/ml (150 kDa), albumin 10 mg/ml (66 kDa), carbonic anhydrase 3 mg/ml (29 kDa) and Cytochrome C7150 2 mg/ml (12.4 kDa). Blue dextran (2 mg/ml, 2000 kDa) was used to calculate the void volume.

3.3.11. Preparation of cleared-out extracts enriched in DbdR. *E.coli* MC4100 bearing pBBdbdR were grown overnight in LB with streptomycin and gentamicin at 30° C and 200 rpm. Flasks containing 500 ml of fresh medium were inoculated with an aliquot of these pre-cultures and incubated at 30°C until an OD₆₆₀ of 0.6 was reached, when they were induced with 1 mM IPTG and incubation was continued for 20 h at 30°C. The cells were then harvested by centrifugation and cell pellets were stored at -80°C until use. Crude extracts were prepared by suspending the pellet in 5 ml lysis buffer (20 mM Tris-HCl [pH 7.9], 500 mM NaCl and 1 mM DTT, 1x CompleteTM protease inhibitor mixture (Roche Applied Science)) followed by cell disruption by sonication. The clear supernatant was filtered through a 0.45- μ m pore size nylon membrane and loaded onto a 1-ml Heparin column (HiTrap Heparin HP, Amersham Biosciences) pre-equilibrated with buffer C (Tris-HCl 20 mM pH 7.6, DTT 1 mM). Unbound proteins, which included DbdR, were collected and labelled as “purified extract”. The column was then washed with buffer C until non-specifically bound material had been removed. Specifically bound proteins were eluted from the column with buffer C supplemented with 1 M NaCl, collected and labelled as “bound extract”. The protein concentration in the fractions was determined according to QubitTM assays. DbdR-free control extracts were obtained with a similar procedure but starting from *E.coli* MC4100 (pBBR1MCS-5) cultures.

3.3.12. Electrophoretic mobility shift assays (EMSA). The promoter regions of P_{dbhL} , P_{orf18} , P_{orf20} and P_{dbdR} were amplified by PCR using *T. aromatica* AR-1 chromosomal DNA as template and the primer pairs indicated in Table 3.3.2, and cloned in pCR2.1-TOPO (Invitrogen) or pGEM-T (Promega), rendering plasmids pGEMT::dbhL, pGEMT::orf18, pGEMT::orf20 and pTOPO::dbdR, respectively. The plasmids were sequenced to ensure the absence of mutations and the promoter fragments for ^{32}P end-labelling were obtained either by PCR with the primers shown in Table 3.3.2 for P_{orf18} , and P_{orf20} , or they were obtained after plasmid restriction with the appropriate enzymes for P_{dbhL} and P_{dbdR} . After electrophoresis, the fragments (ranging from 205 to 350 bp, approximately) were isolated from agarose gels and end-labeled with $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ using T4 polynucleotide kinase. A concentration of 2 nM end-labeled DNA fragment (1.5×10^4 cpm) and the indicated amounts of DbdR-enriched cell extracts were mixed and incubated at 30°C for 15 min in 10 μl of binding buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.8, 50 mM KCl, 100 mM NaCl, 8 mM magnesium acetate, 5% [wt/vol] glycerol) containing 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of poly-d (IC) as competitor DNA and 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ bovine serum albumin. The DNA-protein complexes were resolved by electrophoresis in 4% (wt/vol) non-denaturing polyacrylamide gels and electrophoresed at 50V in Tris-glycine Buffer for 2 h at room temperature. The gels were dried and visualized by exposure to Phosphorimager screens. The results were analyzed with Molecular Imager FX equipment and QuantityOne software (Bio-Rad).

3.3.13. Isothermal titration Calorimetry (ITC). Titrations of His-tagged DbdR were carried out in a VP microcalorimeter (MicroCal, Northampton, MA) at 25°C under anoxic conditions because the hydroxylated pathway intermediates are highly sensitive to oxygen. Before starting, proteins were dialyzed against oxygen-free buffer B obtained by flushing nitrogen gas through the solution for 20 min. The 6His-DbdR protein was placed in the sample cell of the instrument previously flushed with dinitrogen. The ligands were prepared in the degassed dialysis buffer. The ligands used were 3,5-DHB, hydroxyhydroquinone, and the hydroxylated analogues gentisate and benzoquinone (Sigma-Aldrich). Control experiments entailed the titration of dialysis buffer with ligand solutions.

3.3.14. Protein modelling. The tridimensional models of DbdR protein structure were generated with the Phyre2 tool available at <http://www.sbg.bio.ic.ac.uk> (Kelley and Sternberg, 2009). The proteins used as model were obtained from the Protein Data Bank in the www.rcsb.org server: TsaR (c3fzjC) and CbnR (c1iz1B). Using TsaR as a template, Phyre2 modelled the structure of DbdR with 100.0% confidence and 96% sequence coverage.

Table 3.3.1 Strains and plasmids used in Chapter 4.3

Strain or plasmid	Genotype/Relevant Characteristics	Reference
Strains		
<i>Escherichia coli</i>		
HB101	<i>supE44 hsdS20 (rB-mB-) recA13 ara-14proA2 lacY1 galK2 rpsL20 (SmR) xyl-5 mtl-1</i>	(Boyer and Roulland-Dussoix, 1969)
CC118λpir	<i>Δ(ara-leu)araD ΔlacX74 galE galK phoA20 thi-1 rpsE rpoB argE recA1, lysogenized with λpir</i>	(De Lorenzo <i>et al.</i> , 1990)
DH5α	<i>endA1 hsdR17 supE44 thi-1 recA1 gyrA(NalR) relA1 Δ(argF-lac) U169 depR(Φ80dlacΔ(lacZ) M15)</i>	(Sambrook and Russell, 2001)
MC4100	<i>araD139 Δ(argF-lac) U169 relA1 rpsL150(SmR)deoCL ptsF25 flbB5301 rbsR</i>	(Casadaban, 1976)
BL21(DE3)	F- <i>ompT hsdSB(rb-mB-) gal dcm λDE3</i>	(Sambrook and Russell, 2001)
<i>Thauera aromatica</i>		
AR-1	Wild-type strain, degrades 3,5-DHB under denitrifying conditions (DSM-11528)	(Gallus <i>et al.</i> , 1997)
AR-1- <i>dbdR</i>	Km ^R , <i>T. aromatica</i> AR-1 mutant strain with a disruption of <i>dbdR</i> gene	(Molina-Fuentes <i>et al.</i> , 2015)
AR-1- <i>bqdl</i>	Km ^R , <i>T. aromatica</i> AR-1 mutant strain with a disruption of <i>bqdl</i> gene	(Molina-Fuentes <i>et al.</i> , 2015)
AR-1- <i>ΔbtdL-qorA</i>	Km ^R , Gm ^R <i>T. aromatica</i> AR-1 mutant strain with a disruption of <i>qorA</i> gene and deletion in <i>btdL</i> gene	(Molina-Fuentes <i>et al.</i> , 2015)
AR-1- <i>dbhL</i>	Km ^R , <i>T. aromatica</i> AR-1 mutant strain with a disruption of <i>dbhL</i> gene	(Molina-Fuentes <i>et al.</i> , 2015)
Plasmids		
pRK600	Cm ^R ; helper plasmid, <i>oriColE1, mobRK2, traRK2</i>	(Kessler <i>et al.</i> , 1992)
pMP220	Tc ^R ; broad-host-range promoter probe vector (<i>lacZ</i>)	(Spaink <i>et al.</i> , 1987)
pBBR1MCS-5	Broad-host-range, (<i>oriV RK2</i>), Gm ^R	(Kovach <i>et al.</i> , 1995)
pBBdbdR	965 kb PCR product containing <i>dbdR</i> gene inserted between HindIII and XbaI sites of pBBRMCS-5.	This study
PCR2.1-TOPO	PCR product cloning vector, <i>ori pUC, ori fl1</i> ; Ap ^R , Km ^R	Invitrogen
pGEMT@-T Easy	PCR product cloning vector, <i>ori pUC, ori fl1</i> ; Ap ^R	Promega
p220Pdbhl	Pdbhl:: <i>lacZ</i> in pMP220; Tc ^R	This study
p220Porf18	Porf18:: <i>lacZ</i> in pMP220; Tc ^R	This study
p220Porf20	Porf20:: <i>lacZ</i> in pMP220; Tc ^R	This study
p220PdbdR	PdbdR:: <i>lacZ</i> in pMP220; Tc ^R	This study
pET28b+	Expression vector for recombinant proteins with His6 tag at the N-terminus; Km ^R	Novagen
pETDdbdR	pET28b+ derivative containing <i>dbdR</i> gene; Km ^R	This study

Table 3.3.2 Oligonucleotide primers used in Chapter 4.3

Primer	Sequence (5' to 3')	Product (target plasmid) / Purpose / size
BglIIpdbdr-F	AGATCTGTTCGCCGCGATCATCAACC	<i>PdbdR</i> (p220PdbdR) / transcriptional fusion and EMSA / -263 to +34
BglIIpdbdr-R	AGATCTCTGGCAAATCCCCGATTTC	
BglIIpORF20-F	AGATCTGCGCAAGGCCCGCGAGC	<i>Porf20</i> (p220Porf20) / transcriptional fusion / -122 to +72
PstIpORF20-R	CTGCAGCATGAATCGTCCTCGAAGAT	
BglIIpORF18-F	AGATCTGCCATGCCGGCAAGG	<i>Porf18</i> (p220Porf18) / transcriptional fusion / -254 to +83
PstIpORF18-R	CTGCAGTCATCGCAACCCATCTCC	
BglIIpdbhL-F	AGATCTGCGCAGCTCCGCAAC	<i>PdbhL</i> (p220PdbhL) / transcriptional fusion and EMSA / -255 to +60
XbaIpdhL-R	TCTAGACATAGTCCCCTCTGTATTGA	
NdeIDbdR-F	CATATGGTGGACGCGCATCGTGGATGATGCCG	<i>dbdR</i> (pETdbdR) / His-tagged protein purification / 918 bp
HindIIIDbdR-R	AAGCTTTATCAGCCGACTGACTGACG	
HindIIIDbdR-F	AAGCTTGTGGACGCGCATCGTGGATGATGCCG	<i>dbdR</i> (pBDbdR) / cleared extract preparation / 918 bp
XbaIDbdR-R	TCTAGAACCCGAGATCGAATTGCC	
EMSAORF18F	AGATCTTTGCTGCTGTGCGCCGGCAA	<i>Porf18</i> / EMSA / -254 to +83
PstIpORF18-R	CTGCAGTCATCGCAACCCATCTCC	
EMSAORF20F	AGATCTTTGCTGCGCCGGCAAG	<i>Porf20</i> / EMSA / -122 to +72
PstIpORF20-R	CTGCAGCATGAATCGTCCTCGAAGAT	
Priext-dhL	TGTCGTGGAACCTCGATCGGC	<i>dhbL</i> / primer extension
Priext-orf18	GCCCTCCAAAACAGCTTGATTC	<i>orf18</i> / primer extension
Priext-orf20	GGTCAATTCAAGGCCGGAGA	<i>orf20</i> / primer extension
Priext-dbdR	GCAGCTGGCTCAGCTTC	<i>dbdR</i> / primer extension

4 Results and Discussion

Results and Discussion

Chapter 4.1

***Azoarcus anaerobius* 1,3-dihydroxybenzene (resorcinol) anaerobic degradation pathway is controlled by the coordinated activity of two bacterial enhancer-binding proteins**

This chapter was published as:

Pacheco-Sánchez D, Molina-Fuentes A, Marín P, Medina-Bellver J-I, González-López O, Marqués S. 2017.

The *Azoarcus anaerobius* 1,3-dihydroxybenzene (resorcinol) anaerobic degradation pathway is controlled by the coordinated activity of two enhancer-binding proteins. *Appl Environ Microbiol* 83:e03042-16. <https://doi.org/10.1128/AEM.03042-16>.

4.1.1 Abstract

The anaerobic resorcinol degradation pathway in *A. anaerobius* is unique in that it uses an oxidative rather than a reductive strategy for the degradation of the aromatic compound, in a process that is dependent on nitrate respiration. We have shown that the pathway is organized in five transcriptional units, four of which are inducible by the presence of the substrate. Three σ^{54} -dependent promoters located upstream from the three operons coding for the main pathway enzymes were identified, which shared a similar structure with conserved upstream activating sequences (UASs) located at 103 to 111 bp from the transcription start site. Expression of the pathway is controlled by the bEBPs RedR1 and RedR2, two highly homologous regulators which, despite their high sequence identity (97%), have non-redundant functions: RedR2, the master regulator which also controls RedR1 expression, is itself able to promote transcription from two of the promoters, whilst RedR1 activity is strictly dependent on the presence of RedR2. The two regulators were shown to interact with each other, suggesting that the natural mode of activation is by forming heterodimers, which become active in the presence of the substrate after its metabolization to hydroxybenzoquinone through the pathway enzymes. The model structure of the N-terminal domain of the proteins, composed of tandem GAF and PAS motifs, suggests a control mechanism which also involves direct interaction with additional proteins.

4.1.2 Background

For the degradation of hydroxylated compounds the strict anaerobic *A. anaerobius* utilize alternative way, to the classical benzoyl-CoA pathways, 1,3-dihydroxybenzene (resorcinol) and 1,3,5-trihydroxybenzene (phloroglucino). In this new strategy, 1,3-dihydroxybenzene is hydroxylated to give the intermediate hydroxyhydroquinone (HHQ), follows by an oxidative desaromatization to hydroxybenzoquinone(HBQ). HBQ is further metabolized to malate and acetate through an unknown mechanism (Philipp and Schink, 2012) (Fig. 4.1.1B).

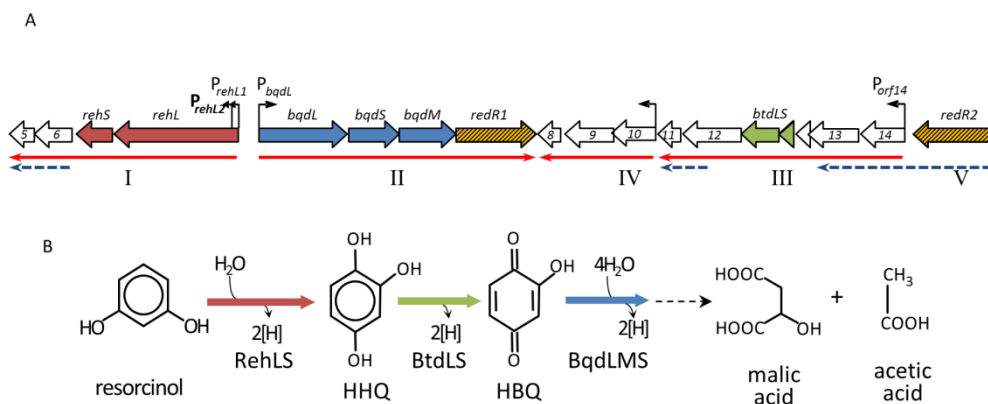


Figure 4.1.1 *Azoarcus anaerobius*, resorcinol anaerobic degradation pathway and gene cluster **A**) **Transcriptional organization of the anaerobic resorcinol degradation pathway in *Azoarcus anaerobius*.** The genes (block arrows) for the pathway are located in a 29-kb chromosomal region, which includes 19 genes organized in five operons, which are induced (solid red arrows) by the presence of substrate or show basal expression levels (blue arrows (dashed when the gene is also inducible)). Bent arrows above the genes show the presence of putative promoters, as deduced from our results and identified by primer extension analysis. Dashed block arrows (orange) depict the genes for the two transcriptional regulators *redR1* and *redR2* (after the results obtained in this study). **(B)** The first reactions in the degradation of resorcinol. The gene products involved are indicated in each step.

The genes of this pathway were located in a cosmid of 29.88 Kb (pR^+) selected from a library of *A. anaerobius* and includes 19 genes. This cosmid can confer the ability to grow anaerobically with resorcinol as the sole carbon source to other NRB. The genes encoding the enzymes for the first three steps in resorcinol, degradation were identified and annotated as *rehLS* for resorcinol hydroxylase, *btdLS* for hydroxyhydroquinone dehydrogenase and *bqdLMS* for a putative benzoquinone dehydrogenase (Fig. 4.1.1A) (Darley *et al.*, 2007).

Two genes, *orf7* and *orf15*, with homology with transcriptional regulators of the NtrC family that activate σ^{54} dependent promoters, also known as bacterial

enhancer binding proteins (bEBP), have also been identified in the gene cluster. The regulatory mechanisms controlling expression of anaerobic aromatic degradation pathways have been experimentally elucidated in an increasing number of organisms; the regulators described so far belong to the major prokaryote regulatory protein families, such as NtrC, LysR, MarR, FNR and two-component systems. In most cases, their activating or repressing activity is modulated by the presence of an effector, generally a substrate or an intermediate in the degradation pathway (Carmona *et al.*, 2009; Juárez *et al.*, 2013; Hirakawa *et al.*, 2015).

Regulators belonging to the NtrC family, typically have a modular domain architecture consisting of three functional domains: a highly conserved central domain that belongs to the AAA+ family (ATPases associated to several cellular activities), a C-terminal DNA binding domain (CTD) with a helix-turn-helix (HTH) motif, and an N-terminal receiver domain (NTD) involved in signal recognition which is not conserved in the family (Bush and Dixon, 2012). The sigma-54-dependent RNA polymerase recognizes a localized consensus sequence -12 and -24 bp upstream from the transcription initiation site and forms a stable closed complex for the oligomerization to open complex and initiation of transcription requires hydrolysis of ATP by the bEBP regulator. This requires the bEBP to contact the promoter bound σ^{54} -RNAPolymerase, which is facilitated by DNA looping favored by the IHF protein. The binding site of the regulator, so-called upstream activity sequences (UAS) is located between 60 and 120 bp upstream from the RNA polymerase binding site. (Shingler, 2011).

The presence of two homologous σ^{54} -dependent regulators in the *A. anaerobius* gene cluster opens up the question of how the overall pathway is regulated, whether both are required for expression of the pathway, and which signals control its expression. Here we have defined the transcriptional units governing the pathway expression and identified the promoters for the three main steps in the pathway, and we have analyzed the regulatory network controlling transcription of the pathway genes. Our results suggest that despite the high sequence identity between them, neither of the two regulators is redundant, but rather both are essential and operate coordinately, probably using different activation mechanisms.

4.1.3 Results

4.1.3.1. Transcriptional organization of the resorcinol degradation gene cluster.

To determine the transcriptional organization of the pathway, we analyzed the co-transcription of all adjacent genes in the cluster using RT-PCR with RNA isolated from *A. anaerobius* cells growing with either resorcinol or succinate as the carbon source (Figure 4.1.2). The results showed that the cluster was arranged in five transcriptional units that did not match the initially predicted operons (Darley *et al.*, 2007) (Figure 4.1.1A).

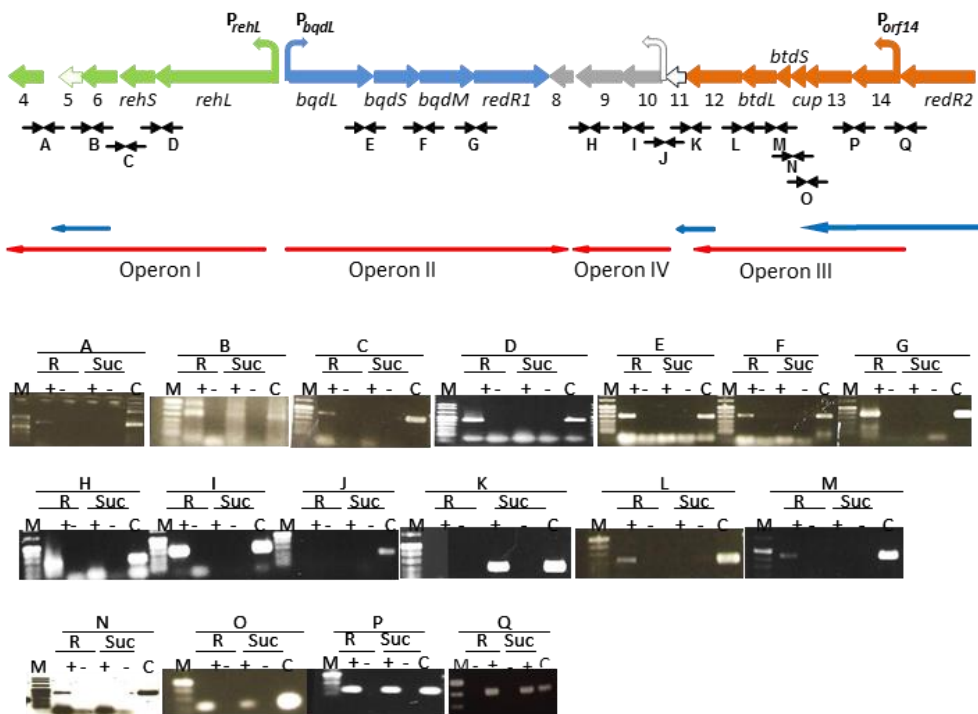


Figure 4.1.2. Transcriptional organization of *A. anaerobius* resorcinol degradation gene cluster.

The genes for the pathway are presented as block arrows. Red arrows below the cluster indicate inducible operons. Blue arrows indicate basal expression levels. Curved arrows above the genes show the presence of putative promoters, as deduced from our results. The converging black arrows and underlined numbers indicate the amplified region and refer to the PCR reactions shown below, where: M, molecular marker; R, resorcinol; Suc, succinate; C, positive c, positive control with *A. anaerobius* DNA. PCR reactions were carried out in the presence (+) and absence (-) of reverse transcriptase. The reaction labelled with an asterisk was done with *rehL* internal primers. The primers used in this analysis are listed in Table 3.1.3.

Operon I encompassed the genes for the two subunits of the resorcinol hydroxylase *rehLS* and the two genes located downstream. Operon II, transcribed divergently from operon I, included the genes coding for the third step enzyme subunits *bqdLMS* together with *redR1*, coding for one of the NtrC family transcriptional regulators present in the operon. Operon III comprised seven genes, including those coding for the second pathway enzyme *btdLS*. Operon IV included three genes of unknown function (*orf8*, *orf9* and *orf10*). Finally *redR2*, the second NtrC family regulator gene located at one end of the cluster, was transcribed independently from the remaining genes. Operons I to IV were only expressed in the presence of the pathway substrate, indicating they were inducible by resorcinol. In addition, the first two genes and the last gene of operon III were also expressed at basal levels in the absence of the inducer, whilst the gene coding for *redR2* was constitutively expressed (Figure 4.1.2., Figure 4.1.1A). This organization suggests the presence of upregulated promoters in the presence of the pathway substrate at least upstream of *rehL*, *bqdL*, *orf14* and *orf10* genes. To map the promoters driving transcription of the first three pathway enzymes, total RNA of *A. anaerobius* cells growing on either succinate or resorcinol was isolated and analyzed using primer extension with labelled oligonucleotides complementary to *rehL*, *bqdL* and *orf14* (Table 3.1.2). A single extension band was observed for *bqdL* and *orf14*, which only appeared when cells were grown on resorcinol, confirming the induction of the pathway by its substrate (Fig. 4.1.3.). The band size positioned the transcription start sites 82 bp (P_{bqdL}) and 64 bp (P_{orf14}) upstream from the translational start site of *bqdL* and *orf14*, respectively. In contrast, two bands were observed for *rehL*: a 72 nt band appeared in both the succinate- and resorcinol-grown cells, whilst a 93 nt band was only present in the resorcinol-grown cells. This indicates the presence of two promoters: one expressed in all conditions (P_{rehL2}) and a second one inducible by resorcinol (P_{rehL1}), located 95 bp and 116 bp upstream from the *rehL* translational start site, respectively. Alignment of the sequences upstream from the transcription start sites evidence a similar architectural organization of the three inducible promoters, characteristic of σ^{54} -dependent promoters (Fig. 4.1.3D). All comprised a well-conserved binding site for σ^{54} -dependent RNA polymerase ($E\sigma^{54}$) with the consensus TGGCA-N₆-TTGC and a sequence with good homology to the IHF-binding consensus was found 17-18 bp upstream from the -12/-24 $E\sigma^{54}$ binding site (Figure 4.1.3D). More than 100 bp upstream from the start site, a highly conserved region spanning more than 25 bp including conserved motifs organized as one direct and two inverted 5 bp repeats (TGCGA) was identified as possible UASs for activator binding.

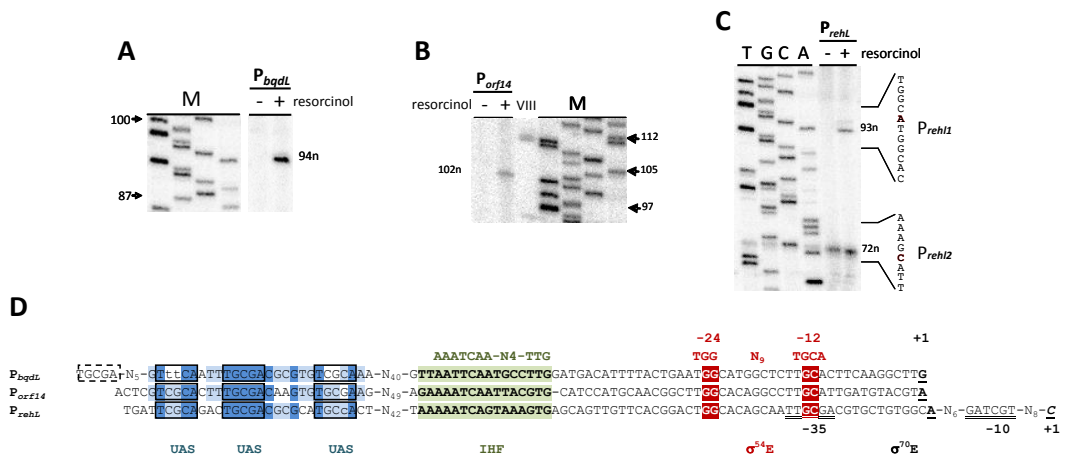


Figure 4.1.3. Mapping of the transcription initiation site of the three pathway operons. Primer extension of total RNA of *A. anaerobius* cells grown on succinate (-) or resorcinol (+) with primers for *P_{bqdL}* (A), *P_{orf14}* (B), and *P_{rehL}* (C). In panels A and B, the sequencing reaction mixtures of unrelated sequences were used as a molecular size marker (M). VIII, Roche molecular marker VIII. In panel C, a sequencing reaction of the promoter region with the same primer was run in parallel (TGCA) to map the start site, as indicated on the right side. (D) Alignment of the promoter region of the three promoters showing the conserved σ^{54} binding -24/-12 elements (red), the transcription start site (+1), the IHF-binding site (green), and the proposed UASs (dark blue, conserved in the three promoters, light blue, conserved in at least 2 promoters). The -35/-10 elements of *P_{rehL2}* σ^{70} -dependent promoter are double underlined. The sequences between the IHF-binding site and the UASs are in a contracted format as “N_x,” where “x” represents the number of bases present between the two sequence segments.

Additional possible repeats with less conserved sequences in direct and inverse orientation were found flanking the conserved region (Fig. 4.1.4). In addition a sequence for σ^{70} binding overlapping the σ^{54} -binding site was found upstream from *rehL*, which defined the constitutive *P_{rehL2}* promoter. These results suggest that although the RedR2 regulator is synthesized constitutively and is always present in the cell, RedR1 expression requires the prior induction of *P_{bqdL}* and is dependent on the presence of resorcinol. In addition to the upregulated promoters, the promoters upstream from *orf10* and *redR2* were mapped using primer extension analysis, and the transcription start sites were located 32 and 25 bp upstream of the translation start site, respectively. The results confirmed the constitutive expression of both promoters (Fig. 4.1.5).

.....102030405060708090100110120130140150160
PbgdL AT **TCGCG**TTTGGAGCCAGAGGCCGCT **TCGCG**CAGCGCATGCAATGCTTT **TCGCG**AAGGCG **TCGCG**ATTTCATTTCTGAAATCGATGCTCTT**CG**
Poz-f14 GCCACCGTGTACCGCCGATGCAAGCAGCAGCGATCGTCAAGCAGGTCCAGGTACCTCG **TCGCG**TTTTCGCGCAAGTGTCTCAGCCTCCG-N₁₄-**GAATTC**CAAT**TCGCG**CAITCCCATTAAGGCT**TCGCG**ACAGCGCTT**CG**
PzebL **TCGCG**AGGAT**TCGCG**CGAGTGTACCGCGGTAGCGGT **TCGCG**CGTGAN **TCGCG**GAC **TCGCG**CGCGCA **TCGCG**CACTCGACTCCGCAATTCGCCTC-N₁₄-**TAAAT**CGAT**TCGCG**AGTGTGACGACTTTCACGGACT**TCGCG**ACAGCAAT**TCGCG**

Figure 4.14. Alignment of P_{redR2} , P_{orf10} , P_{orf14} and P_{zebL} promoters. The conserved $E\sigma^{54}$ binding -24/-12 elements (bold, highlighted in black), the IHF-binding site (bold, highlighted in grey), the proposed UASs (dark blue) and flanking conserved putative regulator binding sequences (light blue) are shown. The -35 element (partial) of P_{zebL} , $E\sigma^{70}$ -dependent promoter is underlined. The sequence between the IHF binding site and the UASs are contracted as Nx, where x is the number of bases present between the two sequence segments.

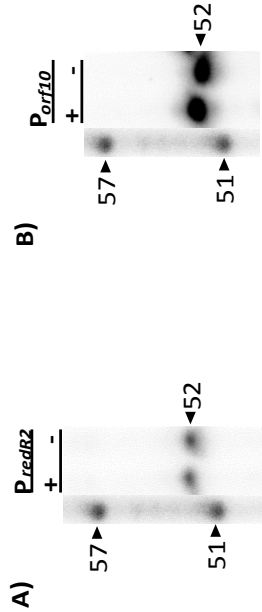
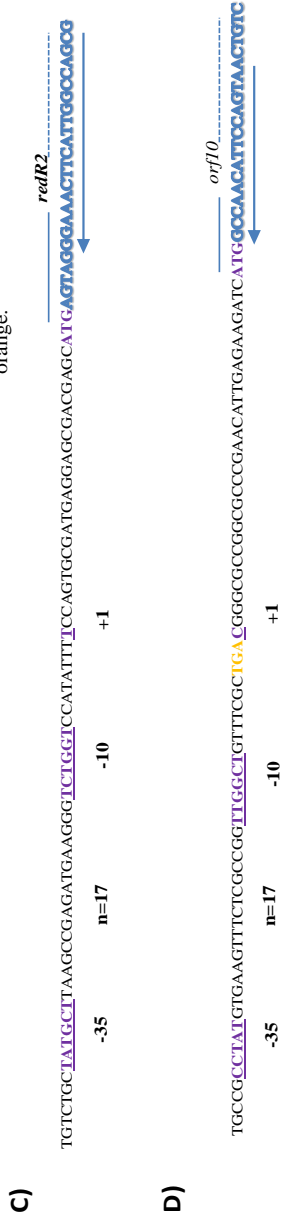


Figure 4.1.5. Mapping of the transcription initiation site of *redR2* and *orf10*. Primer extension of total RNA of *A. anaerobius* cells grown on succinate (-) or resorcinol (+) with primers for P_{redR2} (A) and P_{orf10} (B). M, molecular marker. The sequence of the promoter region showing the predicted $E\sigma^{70}$ binding -10/-35 elements (violet and underlined), the 17 bp spacing between them, the transcription start site (+1), and the ORF of each gene are indicated; *redR2* (C) and *orf10* (D). The primers used in the extension are underlined with an arrow. The STOP codon of *orf10*, which precedes *orf10*, is shaded in orange.



4.1.3.2 Two σ^{54} -dependent regulators are required for maximal pathway expression.

Sigma-54 dependent promoters are controlled by the so-called bEBPs belonging to the NtrC family of transcriptional regulators. RedR1 and RedR2, the two bEBPs encoded in *A. anaerobius* resorcinol degradation gene cluster, share more than 97% amino-acid sequence identity (Fig. 4.1.6.A, Fig. 4.1.5). The sequence of their central (AAA+) domain is identical, and the 17 different residues between the two proteins are distributed between the NTD (the 7 initial residues are different in the two proteins and there is a single Thr to Ile change within the PAS domain), the HTH of the DNA binding domain (5 different residues), and 4 residues in the tail downstream the HTH motif (Fig. 4.1.6.A). The N-terminal receiver domain of both proteins is composed of a GAF and a PAS domain connected by a long α -helix (Fig. 4.1.6B).

Because *A. anaerobius* is a strict anaerobe that cannot grow on solid agar plates, the genetic analysis were carried out in the facultative anaerobe *Azoarcus* sp. strain CIB (Martín-Moldes *et al.*, 2015a) bearing the pR⁺ cosmid, which encompasses the entire resorcinol degradation cluster of *A. anaerobius* and confers *Azoarcus* sp. CIB the capacity to grow anaerobically on resorcinol (Darley *et al.*, 2007). Primer extension analysis of total RNA isolated from *Azoarcus* sp. CIB (pR⁺) growing on either succinate or resorcinol as the carbon source confirmed that pR⁺ plasmid reproduced the promoter expression pattern observed in the parental *A. anaerobius* strain (not shown). *Azoarcus* sp. CIB (pR⁺) was used henceforth in the genetic analysis of the degradation pathway.

We generated knockout mutants in either *redR1* or *redR2* genes by insertion of a kanamycin resistance cassette in the corresponding coding region in pR⁺ cosmid to create pR⁺*redR1*::Km and pR⁺*redR2*::Km (see 3.1 Materials and Methods 4.1). A *redR1*, *redR2* double mutant was generated by creating an internal deletion in *redR1* on pR⁺*redR2*::Km cosmid. The wild-type and mutant cosmids were introduced into *Azoarcus* sp. CIB and the capacity of the resulting strains to grow with resorcinol as carbon source was determined. Figure 4.1.7. shows that *Azoarcus* sp. CIB bearing wild type pR⁺ was able to grow on resorcinol as *A. anaerobius* strain, whilst the *Azoarcus* sp. CIB strains bearing either *redR1* or *redR2* mutant cosmids were impaired in their capacity to grow with resorcinol as the carbon source. However, whilst *redR1* mutant growth was delayed for 24 hours, the *redR2* mutant only started to grow after a 72 hour-lag period, when the medium turned into a characteristic reddish color due to the transient accumulation of hydroxylated intermediates.

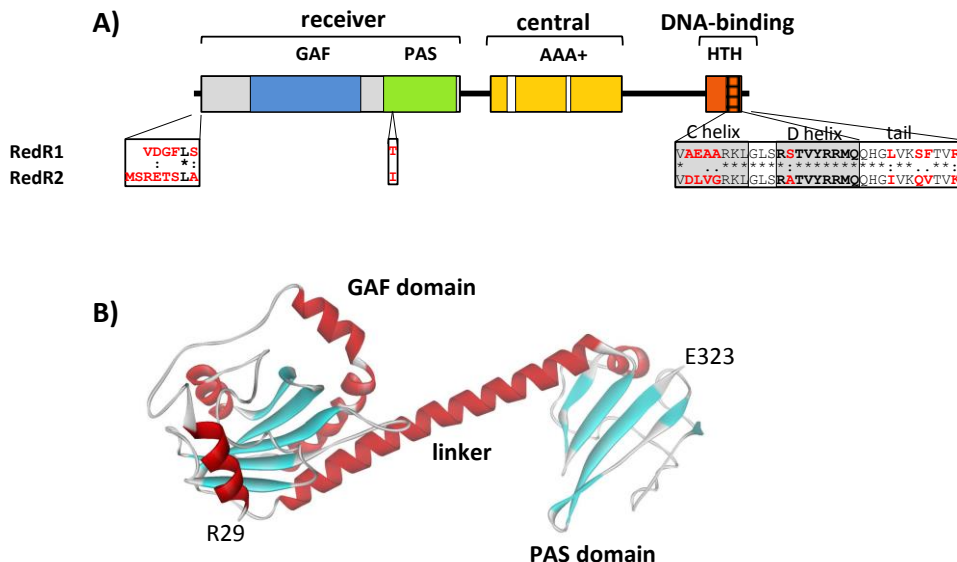


Figure 4.1.6. Homologies and differences between RedR1 and RedR2. Schematic representation of the different domains of the regulatory proteins RedR1 and RedR2. (A) The N-terminal receiver domain including a GAF (blue) and a PAS (green) domain, the central domain (AAA+, yellow) and the DNA binding domain (orange) including an HTH motif (squares) are shown. The Walker A and B motifs in the central domain are depicted as white boxes, the two helices shaping the HTH are shaded in grey in the sequence and the final tail is indicated. The amino acid sequences where the 17 differences between the two proteins are found are enlarged, highlighting in red the amino acid residues that are different between the two regulators. The remaining sequence which is not shown is identical in the two proteins. **(B)** Model structure of the N-terminal domain of RedR2 using DhaR as template. The amino acid residues at the N- and C-terminal ends are indicated.

A *redR1 redR2* double mutant was unable to grow with resorcinol as the sole carbon source. It is worth noting that all *Azoarcus* sp. strain CIB derivatives showed similar growth rates on glutarate (data not shown). These results suggest that both regulators are involved in the control of the pathway: the role of RedR2 is critical for the activation of the pathway, although RedR1 is also required for optimal expression. Normal growth was recovered when the mutants were complemented with the corresponding regulatory gene cloned in a broad-host-range plasmid under the control of a P_{lac} promoter in plasmids pBBRedR1 and pBBRedR2 (Materials and Methods 4.1, Table 3.1.1).

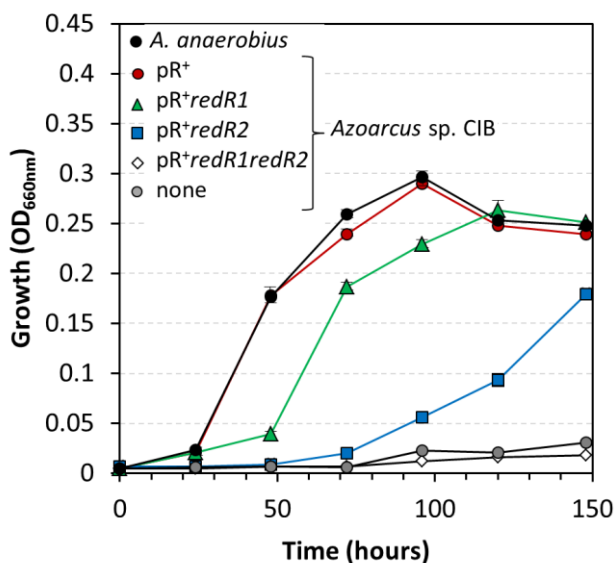


Figure 4.1.7. Growth of *A. anaerobius* and *Azoarcus sp. CIB* with wild-type pR⁺ plasmid and *redR* mutant derivatives. Cells were grown under anaerobic conditions with nitrate as electron acceptor and resorcinol as carbon source. Black circle, *A. anaerobius*; red circles, *Azoarcus sp. CIB* (pR⁺); green triangles, *Azoarcus sp. CIB* (pR⁺redR1::Km); blue squares, *Azoarcus sp. CIB* (pR⁺redR2::Km); grey circles, *Azoarcus sp. CIB*; white diamonds, *Azoarcus sp. CIB* (pR⁺ΔredR1,redR2::Km) double mutant. Data are the average of two or three independent experiments and standard errors of the mean are shown.

To confirm that both regulators were involved in controlling transcription of the pathway, we constructed transcriptional fusions of the P_{rehL1}, P_{orf14}, and P_{bqdl} promoters for the first, second and third steps of the pathway, respectively, to *lacZ* in the pMP190 broad-host-range vector (Spaink *et al.*, 1987a) and we transferred them to *Azoarcus sp. CIB* (pR⁺) and its corresponding *redR1* and *redR2* mutants. To allow normal growth of the mutant strains, the cells were grown on glutarate in the presence or absence of resorcinol and β-galactosidase activity was determined after 72 hours. Figure 4.1.8 shows that in *Azoarcus sp. CIB* (pR⁺), the promoters were only active in the presence of the substrate, as expected. The exception was P_{rehL}, which included both P_{rehL1} and P_{rehL2} promoters. The activity values of the control strain carrying the promoter fusion in the absence of pR⁺ was extremely low

(1.3 \pm 0.14 Miller units [MU]), while activity in the presence of pR⁺ but in the absence of effector was 20.4 \pm 2.3, in accordance with the presence of the constitutive promoter P_{rehL2} (Fig. 4.1.3 C). Similar values were obtained in the redR1 and redR2 mutants.

The effect of the mutations was slightly different on the three promoters: while P_{orf14} activity in the presence of resorcinol was negligible in both the *redR1* and *redR2* mutants, P_{rehL1} and P_{bqdl} activities were reduced to 52% and 35% in the *redR1* mutant, respectively, and were negligible in the *redR2* mutant. Activity assayed in a *redR1*, *redR2* double mutant gave negligible values for all three promoters (not shown). The activity of the promoters was also assayed after 120 hours in cells growing on resorcinol as the only carbon source (Fig. 4.1.8 B and D), once the *redR2* mutant had initiated growth (see a typical growth curve in Fig. 4.1.7). It is worth noting that in the wild type background the activity of both promoters in the absence of glutarate was twice as high as the maximum activity in the presence of this carbon source, suggesting that they were probably controlled by catabolite repression in this strain.

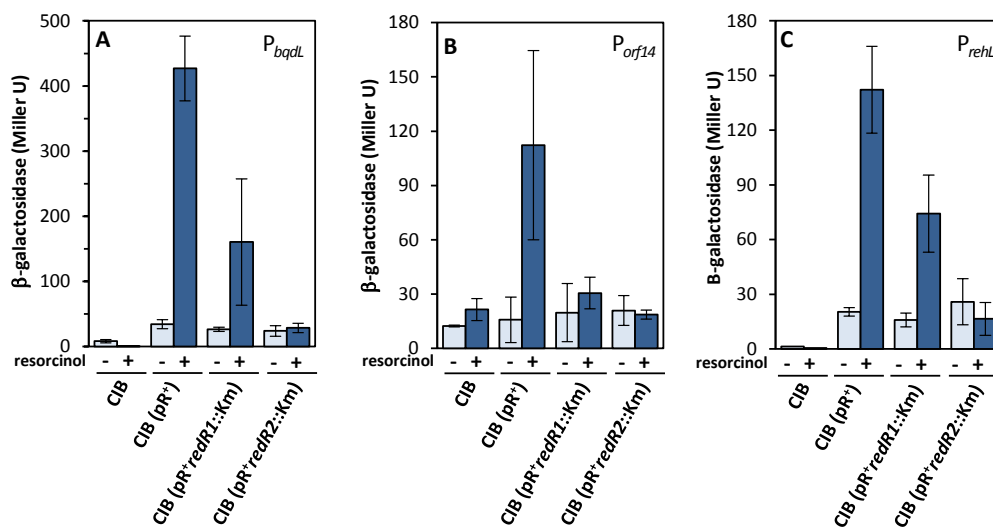


Figure 4.1.8. Activity of P_{bqdl}, P_{orf14}, and P_{rehL} promoters in the presence and absence of *redR1* and *redR2*. β -Galactosidase activity was measured after 72 h in cultures of *Azoarcus* sp. strain CIB bearing the wild-type pR plasmid or its *redR1* and *redR2* knockout mutants, together with the corresponding promoter-*lacZ* fusion in pMP190, growing on glutarate plus resorcinol. (A) P_{bqdl}; (B) P_{orf14}; (C) P_{rehL}. Assays were minimally performed in duplicate, and standard errors of the mean are shown.

In these conditions, activity of P_{orf14} was reduced to between 20 and 25% of the wild type values in both mutants, whilst P_{bqdl} and P_{rehL1} activity in the *redR1* mutant reached 35-40% of the wild type, and below 10% in the *redR2* mutant. These results confirm that both regulators were required for promoter activity, although the role of RedR2 was more relevant. Nevertheless both regulators seemed to be equally important for P_{orf14} activity.

Because *redR1* is the last gene of operon II, its expression will be dependent on the P_{bqdl} promoter, which also depends on *redR2* (Fig. 4.1.8A and B). Therefore, a mutant in *redR2* may in fact be impaired in *redR1* expression and therefore behave like a *redR1-redR2* double mutant, thus masking the actual role of *redR2*. To rule out this possibility, we made *redR1* expression independent of *redR2* by cloning the *redR1* gene under the control of the constitutive P_{lac} promoter (*Azoarcus* sp. CIB lacks a *lac* operon) in pBBR-redR1, and we transferred it to *Azoarcus* sp. CIB ($pR^+redR2::Km$) bearing either the P_{rehL1} or the P_{bqdl} promoter::*lacZ* fusion in the corresponding plasmid (Materials and Methods-Chpater 4.1 Table 3.1.1). It is worth noting that pBBRedR1 could restore wild type activity in a *redR1::Km* mutant (Table 4.1.1). The presence of RedR1 expressed from a constitutive promoter neither improved growth of the *redR2* mutant nor restored totally or partially the activity of the promoters (Table 4.1.1). This confirmed the requirement of both regulators for promoter expression, and the central role of RedR2.

Table 4.1.1 Activity of P_{rehL} , P_{bqdl} and P_{orf14} promoters in different *Azoarcus* CIB backgrounds.

Background	β -galactosidase (MU) ¹	
	P_{bqdl}	P_{rehL}
pR^+	226.1 \pm 51.7	95.4 \pm 4.8
$pR^+redR2::Km$	2.2 \pm 0.7	0.0
$pR^+redR2::Km$, pBR-redR1	0.0	0.0
$pR^+redR1::Km$	172.7 \pm 37	66.2
$pR^+redR1::Km$, pBR-redR1	255.2 \pm 9.4	86.4 \pm 4.3

¹ Cells were grown on glutarate plus resorcinol and assayed after 72 h.

4.1.3.3 Resorcinol must be metabolized to activate the pathway.

As in most bEBPs, the N-terminal domain of RedR1 and RedR2 constitutes the receiver domain probably involved in sensing the environmental signal required to trigger transcription from their target promoter. In a subgroup of bEBPs involved in the regulation of degradation pathways, this signal is the presence of a small molecule, generally the substrate or an intermediate of the regulated pathway, which serves as effector for activation of the regulator (Shingler, 2003). To test the interaction of the RedR1 and RedR2 regulators with resorcinol or with pathway intermediates, His-tagged versions of RedR1 and RedR2 were overproduced and purified using affinity chromatography, and binding of possible effectors was tested using isothermal titration calorimetry (ITC). Assays were carried out under anoxic conditions because the hydroxylated pathway intermediates are highly sensitive to oxygen (see the materials and methods chapter 4.1). No binding signal was detected with either resorcinol or the first pathway intermediate hydroxyhydroquinone (data not shown). Hydroxybenzoquinone, the second intermediate in the degradation pathway, is not commercially available and could not be tested. In addition we tested hydroxylated and oxo analogues as possible effectors of the protein, such as gentisate, methyl-*p*-benzoquinone, tetrahydroxy-1,4-quinone and benzoquinone, with negative results. We therefore decided to apply a genetic approach to determine if any compound of the pathway would act as effector by measuring promoter activity in genetic backgrounds unable to transform the substrate resorcinol (an *rehL* mutant), the first intermediate HHQ (a *btdL* mutant) or the second intermediate hydroxybenzoquinone (a *bqdS* mutant). The P_{orf14} and P_{bqdL} promoter fusions to *lacZ* were assayed in *Azoarcus* sp. CIB bearing the wild-type pR^+ cosmid or pR^+ mutants in either *rehL*, *bqdS* or *btdL* (Darley *et al.*, 2007), and β -galactosidase activity was determined after 72 and 96 hours of growth on glutarate in the presence and absence of resorcinol. Figure 4.9 shows that in the *rehL* mutant, which was not able to transform resorcinol, the activity of the two promoters was completely absent.

The same was true for the *btdL* mutant, where HHQ resulting from resorcinol hydroxylation could not be further metabolized and accumulated. However, in a *bqdS* mutant, which lacks the small subunit of benzoquinone dehydrogenase and accumulates hydroxybenzoquinone, the activity of P_{orf14} promoter reached 85% of the wild-type, and that of P_{bqdL} was significantly higher than in the two other mutants, reaching 40% of the wild type values. These results point to hydroxybenzoquinone as the effector molecule required for activation of the regulators. The different intensity of the mutation effect on the two promoters suggests that additional factors may be involved in promoter activation in each case.

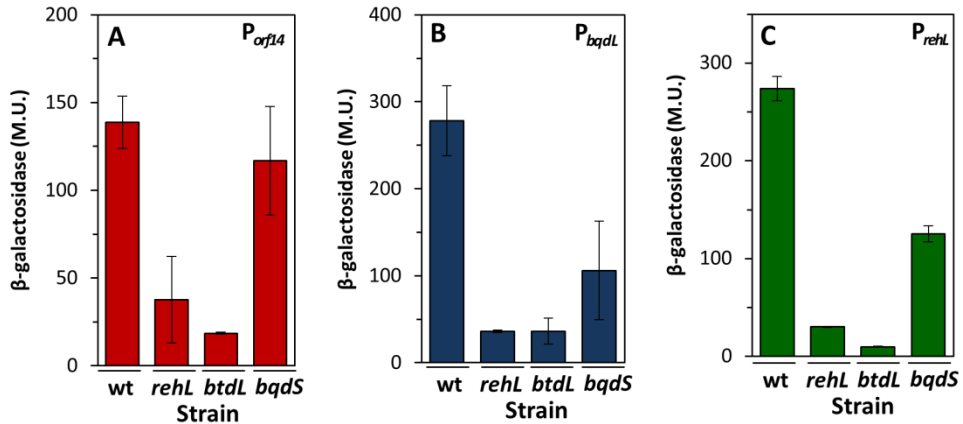


Figure 4.1.9. Activity of P_{bqdL} , P_{orf14} , and P_{rehL} promoters in mutants of the three first pathway reactions. β -Galactosidase activity was measured after 72 h in cultures of *A. anaerobius* bearing the wild-type pR⁺ plasmid or the indicated knockout mutants, together with the corresponding promoter-lacZ fusion in pMP190, growing on glutarate in the presence of resorcinol. (A) P_{orf14} ; (B) P_{bqdL} ; (C) P_{rehL} . Basal values in the absence of resorcinol (30 to 50 MU) were similar in the wild-type and mutant strains. Assays were minimally performed in duplicate; error bars show the standard deviations of the mean.

4.1.3.4. RedR1 and RedR2 interact to activate transcription.

From the results in figures 4.1.7 and 4.1.8 it follows that the two regulators are required to initiate transcription from the three operons at maximum levels. Primer extension analysis showed that in each case a single activable promoter (i.e., a single transcription start site) controlled expression of the operon (Fig. 4.1.3), which points to both regulators simultaneously acting to activate transcription. This would mean that the two proteins need to interact to generate a proficient hexamer for effective activation of the promoters, which is conceivable considering their high degree of sequence homology. We used bacterial adenylate cyclase two-hybrid assays (BACTH, (Karimova *et al.*, 1998)) to determine whether RedR1 and RedR2 could physically interact. We constructed different fusions of *redR1* and *redR2* genes and several truncated derivatives in the plasmids pKT25 and pUT18C and transformed them into the BTH101 reporter strain. Binding interactions were detected when the full RedR1 and RedR2 proteins were genetically fused to the complementary fragments of adenylate cyclase active site (Fig. 4.1.10), whilst no self-interaction above control values was observed between two RedR1 or two RedR2 proteins. Binding between the two regulators was detected when the NTD of either or both of them was deleted (Δ RedR1 and Δ RedR2), suggesting that the

interaction occurred through the central domain. In this sense, no interaction between the NTD of either protein with the counterpart full-length protein was observed.

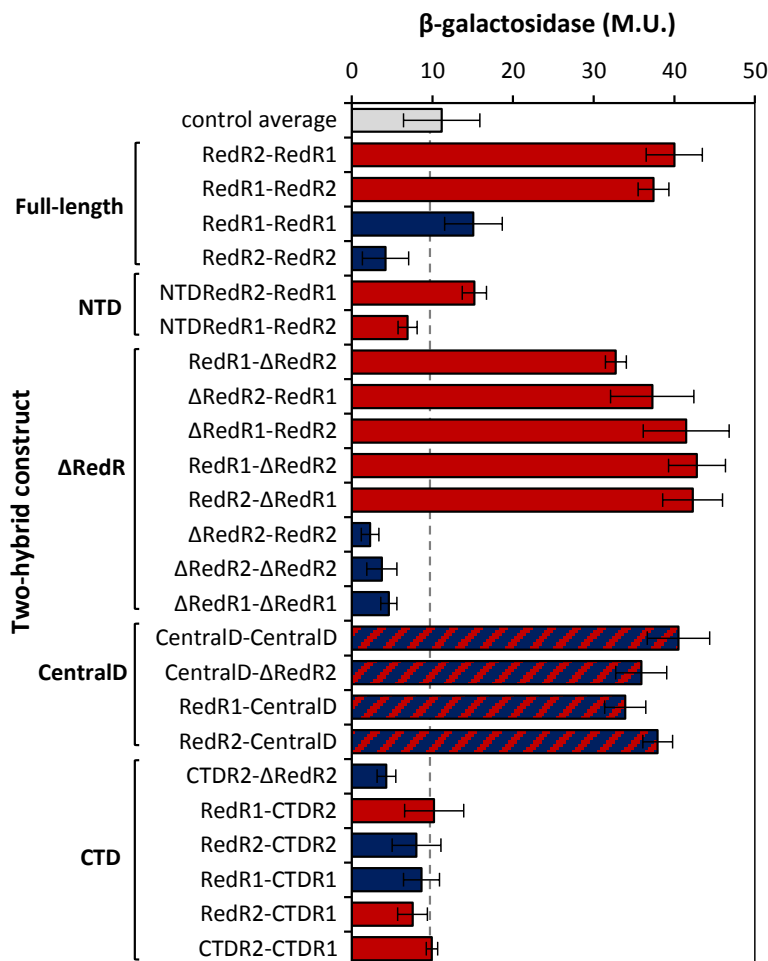


Figure 4.1.10. Binding-interaction between RedR1 and RedR2 proteins and truncated derivatives. The RedR1 and RedR2 proteins and truncated derivatives were fused to the N-terminus of T25 or T18C Cya fragments in the plasmids pKT25 and pUT18C BATCH vectors (Karimova *et al.*, 2000). In each assay pair in the X-axis, the first construct was based on pKT25 and the second one on pUT18C. Controls are the plasmids devoid of insert. Red bars, hetero-interactions; blue bars, self-interactions; grey bars, controls with one of the plasmids devoid of insert. NTD, N-terminal domain; ΔRedR, truncated version lacking the N-terminal domain.

These data suggest that RedR1 and RedR2 form a heterodimer bound through their central domains, which have an identical sequence, and this interaction is required for promoter activation. Interestingly, no self-interaction was observed between either the two Δ RedR1 or the two Δ RedR2 truncated proteins. Since the central domain sequence of the two proteins is identical, the only difference between the self-interaction assays and the assays combining Δ RedR1 and Δ RedR2 was the presence of some different residues at the HTH motif. Thus self-interaction of two identical proteins seems to be hindered by the presence of identical HTH domains.

4.1.4. Discussion

The anaerobic resorcinol degradation pathway in *A. anaerobius* is unique in that it uses an oxidative rather than reductive strategy for the degradation of the aromatic compound, in a process that is dependent on nitrate respiration. Expression of the pathway, which includes more than fifteen genes, is energetically demanding for the cell, therefore only takes place when the substrate of the pathway is present in the medium. We have shown that expression is controlled by two highly homologous bEBPs present in the cluster, which regulate the activity of three σ^{54} -dependent promoters located upstream from the three operons coding for the main pathway enzymes. The structure of the three promoters is well conserved and presents the typical features, including an IHF binding site located 44-46 bp upstream from the transcription start site (Fig 4.3). Although this is not always required in σ^{54} -dependent promoters, binding of IHF dimers to this sequence induces a strong bending in the DNA that brings into close proximity the DNA-bound RNA polymerase and the regulator hexamer bound at its UASs located further upstream in the promoter sequence (Shingler, 2011). The bEBP binding sites have been identified in a number of σ^{54} -dependent promoters to be constituted by palindromic sequences of different lengths and significance, located far upstream from the RNA polymerase binding site (Martinez *et al.*, 2008; Abdou *et al.*, 2011). Transcription activation by bEBPs requires previous oligomerization of the protein into hexamers rings bound at their UASs, which is required both for ATP hydrolysis and for interaction with the promoter-bound RNA polymerase (Bush and Dixon, 2012). Recently it has been shown for the *E. coli* NorR activator that a 100 bp DNA region wraps around the oligomeric complex, which directly contacts three UASs spanning 53-56 bp that are essential for promoter activation (Tucker *et al.*, 2004; Bush *et al.*, 2015). However, although this finding probably anticipates DNA-protein arrangement for most bEBPs, the strict requirement of all UASs for activation is an unusual situation, and in most σ^{54} -dependent promoters UASs of high and low affinity binding are defined, which usually correspond to sequences of

high and low relevance for promoter activation, respectively. In the three RedR1/RedR2 regulated promoters, putative conserved UASs arranged as three 5 bp repeats and spanning 24 bp were located at 103-111 bp upstream from the start site (Fig. 4.1.3.). Several less conserved repeats flanking the proposed conserved region were identified, probably comprising the entire binding site (Fig. 4.1.4).

The DNA binding domain in most bEBPs is composed of 4 helices (A to D) (Vidangos *et al.*, 2014): a three-helical bundle constitutes the typical HTH core domain that binds DNA through the last helix (D helix) (Aravind *et al.*, 2005), flanked by a fourth helix (A helix) which contributes to dimerization and correct positioning of the dimers of HTHs on the DNA. In the model structures of the CTD of RedR1 and RedR2, helices B, C and D were clearly defined, while the presence of an A helix was unclear (Fig. S.1. in the supplemental material). The postulated DNA binding helices of RedR1 and RedR2 contain three arginines (Fig. 4.1.6), two of are predicted to face toward DNA (Fig. 4.11) The proposed uses (TCGCA-N3-TGCGA-N6-TGCGA) identified here are rich in guanines (Fig. 4.1.3 D) which are good candidates for establishing direct interactions with D helix arginines (Vidangos *et al.*, 2014).

In accordance with their 97% amino-acid identity, the two regulators were able to interact with each other independently of their NTD, suggesting that the interaction occurs through their central domains, which are identical (Fig. 4.1.10.). A reduced number of bEBPs have been reported to be able to form heterodimer complexes: HrpR and HrpS regulators of *Pseudomonas syringae hrpL* promoter encoding an extracitoplasmic sigma factor (ECF) that controls expression of the type III secretion system in this strain (Hutcheson *et al.*, 2001), and FleQ and FleT regulators controlling flagellar synthesis in *Rhodobacter sphaeroides* (Poggio *et al.*, 2005). All these proteins naturally lack the N-terminal receiver domain. HrpR and HrpS share 57% amino-acid sequence identity (Jovanovic *et al.*, 2011). HrpR is unable to form homodimers whilst HrpS does associate with itself to a certain extent. However, the most active assembly occurs when the two proteins interact with each other to form a transcriptionally active heterohexamer (Lawton *et al.*, 2014). Critical positions in HrpR and HrpS exposed in the interface are responsible for the discrimination between self- and hetero-interaction. However, this does not seem to be the case in the RedR1-RedR2 heterodimer interactions, since the sequence of their central domain is identical. Rather, the presence of different residues in their DNA binding domains appears to be hindering self-association. Interestingly, the main differences between the HTH sequence of RedR1 and

RedR2 are not located in the predicted DNA recognition helix D but in the C helix and in the tail downstream from the D helix (Fig. 4.6A, Fig. 4.1.11).

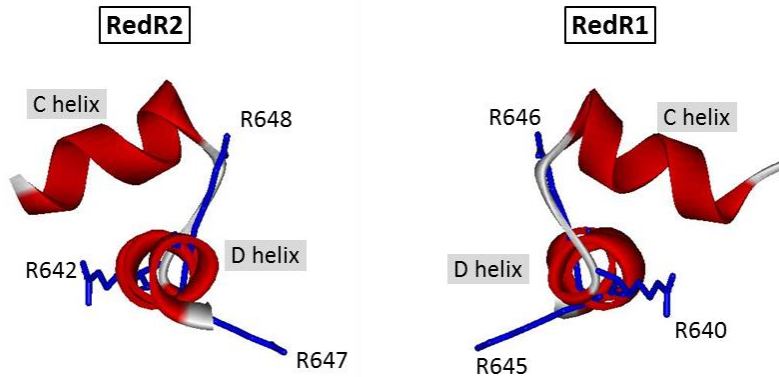


Figure 4.1.11. Model structure of the HTH motif of the DNA binding domain of RedR1 and RedR2, showing in blue the arginine residues in the DNA recognition helix (D helix). The two motifs are presented in inverted orientation, the same as they would be found in a protein heterodimer.

The loop between helices C and D has been suggested to contribute to NtrC4 DNA binding domain dimerization by stabilizing the inter-monomer interactions established through helix B (and helix A in some proteins) (Vidangos *et al.*, 2013). Thus it would be plausible that interaction between the HTH domains in RedR1/RedR2 heterodimer would be favoured over self-interaction. The contribution of the DNA binding domain to overall protein homodimerization is variable amongst bEBPs and depends on other protein domains. In some bEBPs, the interaction between central domains or NTDs is weak in their inactive state, and dimerization through their DNA binding domain becomes essential to allow DNA binding in the inactive state (Vidangos *et al.*, 2013). Oligomerization determinants of HrpS were shown to reside in its CTD, since the protein devoid of this domain was incapable of self-interaction or interaction with HrpR (Jovanovic *et al.*, 2011). RedR1 and RedR2 would thus belong to the protein type stabilizing dimerization through DNA binding domain interactions, although only interactions between two different proteins would be favoured. The case of FleT and FleQ interaction is different and less understood. FleT lacks the DNA binding domain, and it has been suggested to improve FleQ binding to DNA through direct interaction (Poggio *et al.*, 2005). Thus, RedR1 and RedR2 would be the only bEBPs composed of the

three archetypical domains described so far that require heterodimer formation to be fully active. However, whilst RedR1 seems to absolutely require RedR2 to be active, RedR2 alone was capable of a certain degree of promoter activation (Fig. 4.1.8.), suggesting that this protein could form homohexamers *in vivo*, although, as for HrpS this self-interaction was not detected in two-hybrid assays (Hutcheson *et al.*, 2001). Consequently, the function of the two regulators was not redundant in the cell and both were required for maximal pathway expression. Whilst RedR1 seem to be almost dispensable for growth (Fig. 4.1.7.), it is clearly required for transcription activation, especially in the case of P_{orf14} , for which the absence of either regulator reduced the activity to basal levels (Fig. 4.1.8.). On the other hand, growth of *redR2* mutants on resorcinol was severely impaired, confirming the pivotal role of RedR2 in transcription activation of P_{orf14} , P_{bqdL} and P_{rehL} . The transcriptional organization of the pathway, where *redR2* is constitutively expressed and *redR1* is the fourth gene of an operon controlled by RedR1 and RedR2, suggests that an activation cascade may control the pathway expression with RedR2 as the master regulator. In fact in a *redR2* mutant, expression from P_{bqdL} , which governs *redR1* expression, was negligible (Fig. 4.1.8.A and B). Thus although maximum expression from this promoter also requires an active RedR1 protein (Fig. 4.1.8.), the absence of RedR2 regulator reduces RedR1 production and therefore also contributes to reducing expression from the remaining promoters. Despite the conserved architecture of the three promoters, subtle differences in promoter activity were observed: whilst the presence of RedR2 was sufficient to promote P_{bqdL} and P_{rehL} activity to levels below maximum, P_{orf14} required both RedR1 and RedR2 (Fig. 4.1.8.), suggesting that they respond differently to RedR2 homodimers and RedR1/RedR2 heterodimers.

We have shown that the signal triggering promoter activation was the intermediate compound HBQ. Whilst HBQ accumulation in a *bqdS* mutant fully induced P_{orf14} , P_{bqdL} was only partially active, suggesting that additional elements were required under those conditions. In a group of bEBPs, activation occurs through binding of an effector, generally a substrate of the pathway, to the NTD, which de-represses the ATPase activity at the central domain (Shingler, 2011). It was impossible to test direct binding of HBQ to either RedR1 or RedR2 by ITC, and it is unclear from our results which protein is the target of HBQ or if both of them respond to the effector. The PAS and GAF domains in the NTD of the two proteins are good candidates to accommodate an effector, but interestingly, they resemble the tandem GAF-PAS domains of the DhaR protein, which has been shown to be regulated by direct interaction with two antagonist proteins (Shi *et al.*, 2014). The distinct behaviour of the *redR1* and *redR2* knockout mutants suggests

different regulation modes for each of them. Preliminary results in our lab with truncated versions of the regulators point in this direction. It is thus tempting to suggest that RedR1 and RedR2 are able to sense different signals or the same signal through different mechanisms, with different consequences on activation. A number of genes in the resorcinol degradation cluster whose function is unknown will be candidates for a future screening of RedR interacting factors.

4.1.5. Supplementary material. Supplementary figure S1

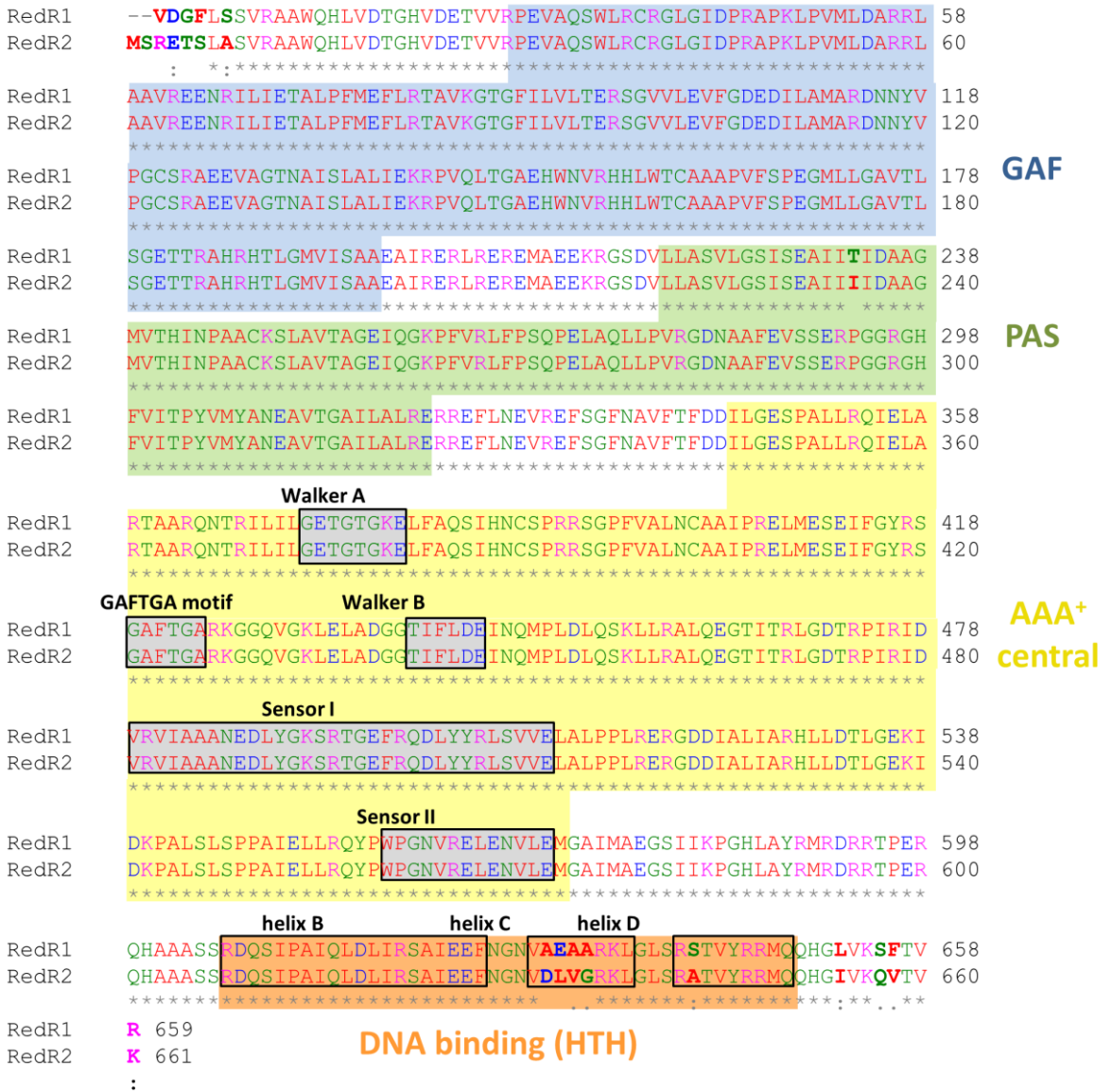


Figure S1. Alignment of RedR1 and RedR2 sequences showing the conserved domains and functionally relevant regions. The 17 residues that are different between the two proteins are depicted in bold. An asterisk below the sequences denotes identical residues in the two proteins.

Results and Discussion

Chapter 4.2

Two 97% identical bacterial enhancer-binding proteins (bEBP) that interact to induce *Azoarcus anaerobius* 1,3-dihydroxybenzene (resorcinol) anaerobic degradation pathway are controlled by different activation mechanisms.

4.2.1. Abstract

Three σ^{54} -dependent promoters drive transcription of the operons coding for resorcinol degradation pathway in the strict anaerobe *A. anaerobius*. Expression of the pathway is controlled by two bEBPs, RedR1 and RedR2, which show 97% sequence identity. The NTD of the two proteins show tandem GAF-PAS domains connected by a linker helix. In this chapter we have demonstrated using column-binding assays the previous suggestion of hetero-oligomer formation between RedR1 and RedR2, and we have identified a different mechanisms of control of each regulator activity, despite the high sequence identity between them: whilst RedR1 responds to the classical NTD-mediated negative regulation, RedR2 activity is constitutive and controlled through interaction with BtdS, an integral membrane subunit of hydroxyhydroquinone dehydrogenase that sequesters the regulator to the membrane. We have used P_{orf14} as model target promoter since it is the promoter that was shown to be more dependent on the activity of the two regulators. No self-interaction of either bEBP could be detected in column-binding assays, as was suggested in chapter 1 with the two-hybrid assays. This contradicts the fact that an NTD-truncated version of RedR1 and full-length RedR2 were capable of promoter activation on their own, which implies that they were able to assemble into homo-hexamers. We suggest the promoter DNA sequence is necessary to stabilize *in vivo* the homodimers of the active forms of the two regulators. We have also shown the N-terminal end of RedR2, which presents a different sequence to RedR1 in the N-terminal tail, probably interacts with one of the cytoplasmic loops predicted in BtdS model.

4.2.2. Background

As mentioned earlier (see section 1.8 of this thesis), promoter specificity factors guiding RNA polymerases to specific promoters in bacteria (sigma factors) fall into two classes: the σ^{70} class can function in transcription initiation without additional control proteins, although many σ^{70} -dependent promoters can also be modulated by transcriptional regulators belonging to diverse families. In contrast, the σ^{54} class is incapable of initiating transcription by itself and requires specialized AAA+ transcription activator proteins, the bacterial enhancer-binding proteins (bEBPs) (Bush & Dixon, 2012).

The resorcinol anaerobic degradation pathway in *A. anaerobius* is organized in five transcriptional units, three of which are inducible by the presence of the substrate (Pacheco-Sánchez *et al.*, 2017). Three σ^{54} -dependent promoters drive transcription of the operons coding for the main pathway enzymes (Fig 4.1.1). Expression of the pathway is controlled by two bEBPs, RedR1 and RedR2, which show 97% sequence identity. The two RedR proteins show the typical domain organization of bEBPs: the N-terminal domain (NTD) has a characteristic signature, in this case composed of GAF and PAS tandem domains connected by a long α -helix (Fig 4.1.3.B, Fig 4.2.1A); the central domain of both regulators is identical and bears the typical GAFTGA, Walker A and Walker B motifs that characterize the AAA+ family; the C-terminal domain (CTD) encompasses the DNA binding motif, consisting of a Fis-like HTH. The three domains are connected by linker helices. The 17 residues that are different between the two proteins are located in the NTD and CTD. Especially, the N-terminal edge of both proteins is different in sequence and length (6 and 8 residues in RedR1 and RedR2, respectively), and an additional Ile to Thr change is present in the PAS domain. In addition the α -helix preceding the recognition helix in the DNA-binding HTH motif at the C-terminal end, and the C-terminal tail, include nine different residues (Figure 5.1A). Induction of the pathway requires the transformation of the substrate to the intermediate hydroxybenzoquinone (HBQ). We have previously shown that despite the high sequence identity between the two regulators, they are not redundant, and both of them are required to activate transcription, although RedR2 can to a certain extent activate transcription by itself from two of its target promoters. RedR2 is thus the master regulator of the pathway that also controls RedR1 expression. RedR1 is inactive in the absence of RedR2. Bacterial adenylate cyclase two-hybrid (BACTH) assays pointed to the two proteins interacting with each other, and only heteromeric oligomers being capable of full transcription activation (Pacheco-Sánchez *et al.*, 2017). Furthermore, analysis of the pathway expression in different mutant backgrounds suggested that the two regulators are subjected to different

activation mechanisms. Structure modeling identified the NTD of DhaR regulator, which controls the dihydroxyacetone kinase operon in *E. coli*, as the closest related structure to the NTD of both proteins (Figure 4.2.1C). Interestingly, the activity of DhaR is controlled through protein-protein interaction of its NTD with the two subunits of the kinase under its control (Shi *et al.*, 2014). This opened up the possibility of RedR proteins being controlled by similar mechanisms.

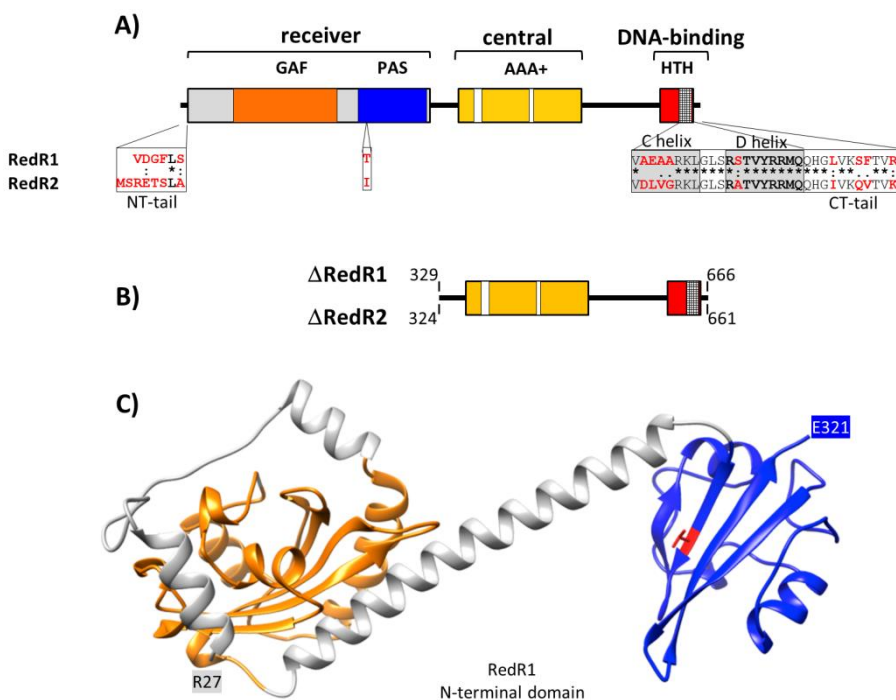


Figure 4.2.1. Homologies and differences between RedR1 and RedR2. (A) Schematic representation of the domains of the regulatory proteins RedR1 and RedR2: the N-terminal receiver domain that includes a GAF (orange) and a PAS (blue) domain; the central domain (AAA+, yellow); and the DNA binding domain (red) including an HTH motif (squares), are shown. The Walker A and B motifs in the central domain are depicted as white boxes, the two helices shaping the HTH are shaded in gray in the sequence, and the final tail is indicated. The amino acid sequences where the 17 differences between the two proteins are found are enlarged, with the amino acid residues that are different between the two regulators highlighted in red. The remaining sequences, which are not shown, are identical for the two proteins. (B) Schematic presentation of the truncated versions of RedR1 and RedR2 used in this study, indicating the RedR sequences residues at the N-C-Terminal of each protein. (C) Model structure of the N-terminal domain of RedR1 using DhaR as the template. The amino acid residues at the N- and C-terminal ends are indicated. The GAF and PAS domains are colored as in A. The Thr residue that is substitute by an Ile in RedR2 is presented as sticks and highlighted in red. The NTD models of RedR1 and RedR2 would be otherwise identical.

Our preliminary results on *A. anaerobius* resorcinol degradation pathway regulation thus indicated that two almost identical bEBPs controlled through different mechanisms were working as heterohexamers to activate transcription of three pathway promoters (Pacheco-Sánchez *et al.*, 2017). The aim of this study was to further analyze the proposed interaction between the two bEBPs and to elucidate the control mechanism operating for each regulator. We used P_{orf14} as target promoter, which has been shown to be strictly dependent on the two bEBPs once the effector HBQ has been synthesized through the pathway. Our results demonstrate the previous suggestion of hetero-oligomer formation and identify two different modes of control of the regulators activity, despite the high sequence identity: whilst RedR1 responds to the classical NTD-mediated negative regulation, RedR2 activity is constitutive and controlled through interaction with an integral membrane protein that sequesters the regulator to the membrane.

Because *A. anaerobius* is a strict anaerobe that cannot grow on solid agar plates, the experiments were carried out in the facultative anaerobe *Azoarcus* sp. strain CIB (Martín-Moldes *et al.*, 2015) bearing the pR⁺ cosmid, which encompasses the entire resorcinol degradation cluster of *A. anaerobius* (Darley *et al.*, 2007) and confers upon *Azoarcus* sp. strain CIB the capacity to grow anaerobically on resorcinol, reproducing the promoter expression pattern of the original *A. anaerobius* host (Pacheco-Sánchez *et al.*, 2017).

4.2.3. Results

4.2.3.1 Only RedR1-RedR2 hetero-oligomers are stable *in vitro*.

We had previously suggested based on BACTH assays that neither RedR1 nor RedR2 were capable of self-interaction, and only contacts between RedR1 and RedR2 were detected. Additional results with different truncated versions of the two regulators suggested that interaction occurred through the central domain, and that the NTDs were not involved in this interaction (Pacheco-Sánchez *et al.*, 2017). Because the central domain of the two proteins is identical, the absence of self-interaction was unexpected. In order to confirm that only hetero-interactions could be physically established between these proteins, we performed column-binding experiments with differently tagged RedR1 and RedR2 proteins. An N-terminal 6His fusion to RedR2 (6His-RedR2) was purified and then bound onto a Ni²⁺-sepharose column. Then a C-terminal fusion of hemagglutinin epitope (HA) to RedR1 (RedR1-HA) was overexpressed in *E. coli* and the crude extract was loaded

onto the column where 6His-RedR2 was previously bound. After thorough washing to eliminate unbound material, the 6His-RedR2 protein was finally eluted with 250 mM imidazole. Since the two proteins have a similar molecular weight (72.5 and 72.8 kD) they must migrate at the same position in the gel. Figure 5.2A shows that RedR1 (detected with anti-HA antibody) was retained in the column where RedR2 was bound, and co-eluted with it (detected with anti-His antibody) when imidazole removed the nickel-bound His-tagged protein. This result is a strong indication of direct interaction between the two regulators, consistent with the preliminary two-hybrid analysis results. It is worth noting that RedR1-HA did not bind the column in the absence of pre-bound 6His-RedR2 (not shown).

To explore the occurrence of self-interactions between the two proteins, we repeated the experiment described above except that we changed either the HA-tagged protein in the crude extract or the His-tagged protein bound to the column. Fig. 4.2.2B and C show that neither RedR1-HA nor RedR2-HA were retained in the column when the same regulator (except for a 6His-tag substituting the HA tag) was pre-loaded in the column, and they were directly eluted with the unbound material and further washing. These data confirm that RedR1 and RedR2 can only form hetero-oligomers, which probably constitute the competent conformation in the promoter activation mechanism

4.2.3.2 RedR1 and RedR2 are controlled through different mechanisms.

The great majority of bEBPs are negatively controlled by their NTD, which blocks the protein dimers in a face-to-face orientation that impedes the oligomerization to hexamers unless the triggering signal produces an appropriate conformational change (Chen *et al.*, 2008). In these proteins, the deletion of the NTD renders proteins no longer repressed in hexamer assembly and capable of transcription activation in the absence of the triggering signal (Weiss *et al.*, 1991; Pérez-Martin & de Lorenzo, 1996). In contrast, in some bEBPs the NTD does not exert a negative effect, but is rather required, once activated by the environmental signal, for the assembly of the hexameric ring (De Carlo *et al.*, 2006). In these proteins, deletion of the NTD renders a regulator incapable of hexamer assembly and thus inactive. To identify the mechanism controlling RedR1 and RedR2 activity, we generated NTD-truncated versions of the proteins (Δ RedR1 and Δ RedR2) by deleting the 319 and 321 N-terminal residues, respectively, leaving almost intact the full-length of the linker helix (Fig 4.2.1).

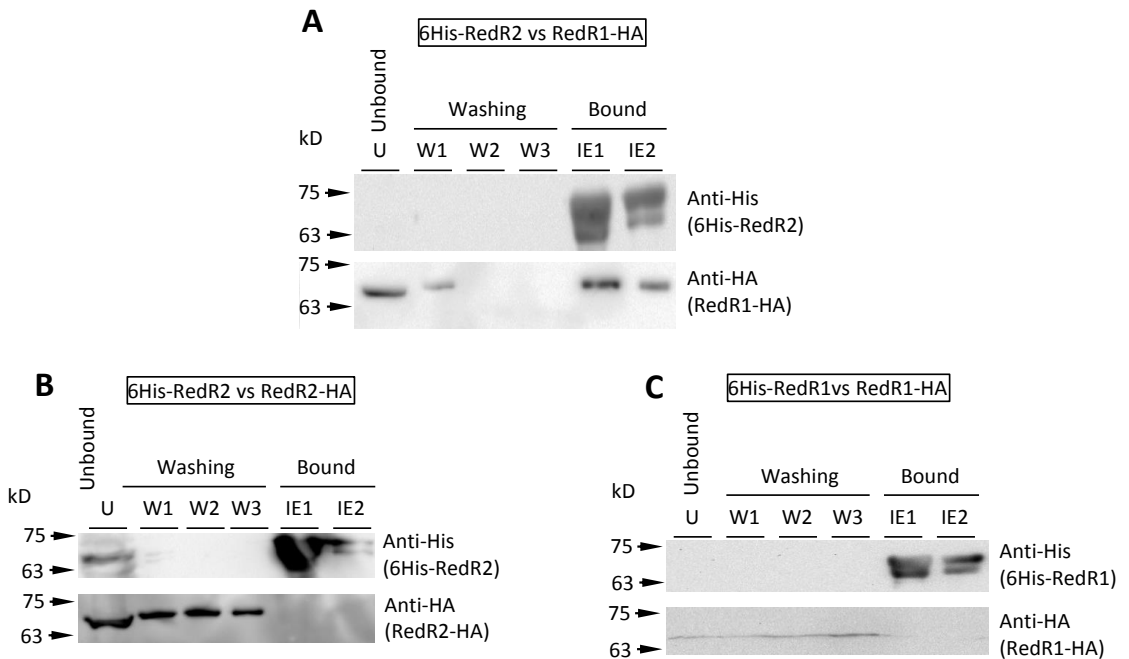


Figure 4.2.2. Interaction of RedR1 and RedR2 detected by column-binding analysis. A) A solution of purified 6His-RedR2 protein was loaded onto a HisTrap HP (GE Healthcare) column and thoroughly washed with buffer B as described in Experimental procedures. Then a crude extract containing overproduced RedR1-HA protein was loaded and the column was washed with 10 bed volumes of loading buffer. Unbound material (U) and washing fractions (W) were collected, then bound proteins were eluted using buffer B supplemented with 250 mM imidazole. The collected fractions (bound proteins) were labelled as IE1 and IE2. The proteins in the indicated samples were fractionated in SDS-PAGE, transferred to polyvinylidene difluoride (PVDF) membranes, and probed using either anti-His or anti-HA antibodies as indicated. B) A similar experiment as in A except that the crude extract contained overproduced RedR2-HA. C) A similar experiment as in A except that the initially loaded purified protein was 6His-RedR1.

We measured the activity of both the wild-type and truncated versions of the bEBPs on P_{orf14} promoter fused to *lacZ* in p220Porf14 in the heterologous host *E. coli* MC4100 in the absence of inducer (which in *E. coli* cannot be transformed into the effector HHQ). Interestingly, whilst RedR1 was inactive in *E. coli*, its NTD-truncated version Δ RedR1 produced high transcription levels from P_{orf14} (Table 4.2.1). On the contrary, whilst the truncated Δ RedR2 was totally inactive, the wild-type RedR2 regulator was constitutively active in *E. coli*, although the transcription levels obtained were lower. To confirm that the activity of both proteins corresponded to the σ^{54} -dependent promoter, assays of Δ RedR1 and RedR2 were performed in *E. coli* BW25113 (wild-type) and its *rpoN* and *ihfA* mutants. Table 5.1 shows that activation of transcription from P_{orf14} by the two active versions of the

regulators was strictly dependent on the RNA polymerase with σ^{54} and required IHF, a particular feature of most bEBP-regulated promoters that require this factor to bend DNA and bring into proximity the regulator and the RNA polymerase (Shingler, 2011).

These results clearly show that the two bEBPs, despite their striking sequence identity, are subjected to different control mechanisms. RedR1 behaves as a typical negatively regulated bEBP such as NtrC1, DctD or XylR (Fernández *et al.*, 1995; Park *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2003), and is probably controlled through binding of the previously identified effector hydroxybenzoquinone (HBQ) (Pacheco-Sánchez *et al.*, 2017). In contrast, RedR2 is capable by itself of significant levels of constitutive transcription activation. This is rather unique, since positively regulated bEBPs require stimulation of the NTD (e.g. through phosphorylation or ligand binding) to become active (Weiss *et al.*, 1991; Bush & Dixon, 2012), and in the experimental conditions of Table 4.2.1 with *E. coli*, no effector was present. It is worth noting that different combinations of the two proteins in either version (full-length and truncated) were incapable to activate transcription (not shown).

Table 4.2.1. β -galactosidase activity from P_{orf14} with different versions of RedR proteins in different *E. coli* strains.

Strain	bEBP	β -galactosidase ¹ (MU)
MC4100	none	6.4 (\pm 0.2)
	RedR1	9.9 (\pm 3.5)
	RedR2	53.7 (\pm 5.5)
	Δ RedR1	166.6 (\pm 36.5)
	Δ RedR2	9.1 (\pm 2.3)
BW25113 (wt)		156.2 (\pm 16.2)
<i>rpoN</i>	Δ RedR1	10.1 (\pm 1.2)
<i>ihfA</i>		6.4 (\pm 1.0)
BW25113 (wt)		49.9 (\pm 4.0)
<i>rpoN</i>	RedR2	6.4 (\pm 8.9)
<i>ihfA</i>		8.9 (\pm 4.6)

¹Measured from P_{orf14} -*lacZ* fusion in pMP220.

4.2.3.3. Promoter activity is effector-independent (constitutive) in a *btsS* background.

Because RedR2 was constitutively active in the heterologous host *E. coli*, where no other specific regulatory element of *A. anaerobius* was present, we hypothesized that in its natural host an unknown mechanism was keeping this regulator inactive in the absence of inducer. Among the possible mechanisms involved in the process, we considered protein-protein interaction with a protein factor encoded in the resorcinol degradation cluster, which would repress activity of RedR2. We screened several available mutants of different genes of the cluster (Darley *et al.*, 2007) for constitutive promoter activation. Some of them (*rehL*, *btdL* and *bqdS*, coding for a subunit of the enzymes involved in the three first steps of the pathway) had been analyzed in a previous work and were shown to be responsible for the transformation of the substrate into the effector, but activity was in all cases effector dependent (Pacheco-Sánchez *et al.*, 2017). However, primer extension analysis of P_{orf14} promoter in a knock-out mutant of the *btdS* gene, coding for the small subunit of HHQ dehydrogenase (second step of the pathway), showed that expression was similar in the presence and absence of the pathway substrate, in contrast to the wild-type strain where expression was only observed in the presence of resorcinol (Fig 4.2.3).

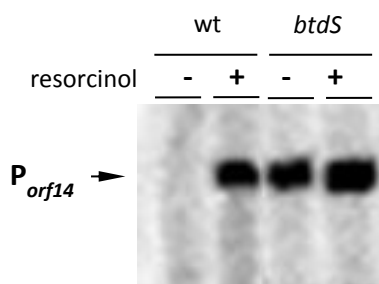


Figure 4.2.3 Primer extension analysis of P_{orf14} in a *btdS* background. Primer extension of total RNA of wild-type *Azoarcus* sp. CIB (pR⁺) and its *btdS* mutant growing on glutarate (-) or glutarate plus resorcinol (+) with a ³²P-labelled primer complementary to *orf14*. The cDNA extension band corresponding to P_{orf14} is indicated with an arrow.

To confirm constitutive expression of the promoter in a *btdS* background, we introduced the $P_{orf14}::lacZ$ fusion (p190Porf14) in the *btdS* mutant strain and determined β -galactosidase activity in the presence and absence of substrate. Table 2 shows that whilst in the wild-type strain P_{orf14} activity was negligible in the absence of resorcinol and was induced more than ten-fold in the presence of the substrate, activity in the *btdS* background was similar in the presence and absence

of resorcinol and reached approximately 55% the activity of the wild-type in the presence of effector.

To determine whether the observed constitutive activity depended on the regulatory proteins, we constructed double mutants of *btdS* and either regulatory gene (*redR1* and *redR2*). As shown in Table 4.2.2, constitutive activity of P_{orf14} in a *btdS* mutant was confirmed with β -galactosidase activity. Moreover, this activity was unaffected in a *redR1 btdS* double mutant. In contrast, the activity was negligible in a *redR2 btdS* double mutant both in the presence and absence of substrate, indicating that RedR2 was the only regulator responsible for the constitutive P_{orf14} expression. Thus, we can conclude that *btdS* is the regulatory element repressing RedR2 activity in *Azoarcus* when no substrate is present. Furthermore, the presence of the inducer resorcinol in the *btdS redR1* double mutant did not further increase activity with respect to the values in the absence of inducer, which suggests that once de-repressed by the absence of BtdS, no additional signal is sensed by RedR2, which when working as only regulator could not reach maximum activation levels.

Table 4.2.2. β -galactosidase activity from P_{orf14} in different genetic backgrounds in *Azoarcus* sp. CIB (pR⁺)

Strain	β -galactosidase ¹ (MU)	
	Glutarate	Glutarate/Resorcinol
<i>Azoarcus</i> sp. CIB (pR ⁺)		
wt	16.65 (\pm 6.70)	197.47 (\pm 1.18)
<i>btdS</i> ::Gm	105.59 (\pm 15.18)	107.98 (\pm 13.62)
<i>btdS</i> ::Gm, <i>redR1</i> ::Km	99.75 (\pm 15.18)	106.56 (\pm 16.32)
<i>btdS</i> ::Gm, <i>redR2</i> ::Km	6.13 (\pm 2.32)	7.34 (\pm 8.97)
<i>redR1</i> ::Km ²	19.76 (\pm 16.06)	30.60 (\pm 8.70)
<i>redR2</i> ::Km ²	20.93 (\pm 8.30)	18.71 (\pm 2.51)

¹Measured from P_{orf14} promoter::*lacZ* fusion in pMP220.

²Values already presented in Pacheco-Sánchez *et al.*, 2017.

4.2.3.4 BtdS controls RedR2 activity through sequestration of the regulator to the membrane.

Homology search in the databases revealed that BtdS closest relative (85% identity) was a DoxX/D-like family protein of the Betaproteobacterium *Candidimonas bauzanensis* (Zhang *et al.*, 2012). DoxX/D is a poorly characterized

family of small integral membrane proteins of unknown function (PFAM04173). The members of this family are similar in size (<200 residues, BtdS has 135 residues) and are characterized by four predicted transmembrane helices (Figure 4.2.4). Thus, if *btdS* is located in the membrane, the observed lack of activity of RedR2 in the absence of effector would result from the BtdS-mediated sequestration of this bEBP to the cytoplasmic membrane.

The best characterized member of the family is DoxD from the archaeon *Acidianus ambivalens*, the small subunit of thiosulphate: acceptor oxidoreductase (TAOR) involved in sulfur oxidation (Purschke *et al.*, 1997). In a group of DoxX/D family protein genes, *doxD* is co-transcribed with the gene for the large subunit of TAOR, *doxA*. However, in a divergent cluster of homologues, a partner *doxA* gene is missing, and a different function is suggested for this group, to which BtdS would belong. Interestingly, the acceptor of DoxD in *A. ambivalens* is a quinone (Müller *et al.*, 2004), as a quinone is also the product of the reaction carried out by BtdLS.

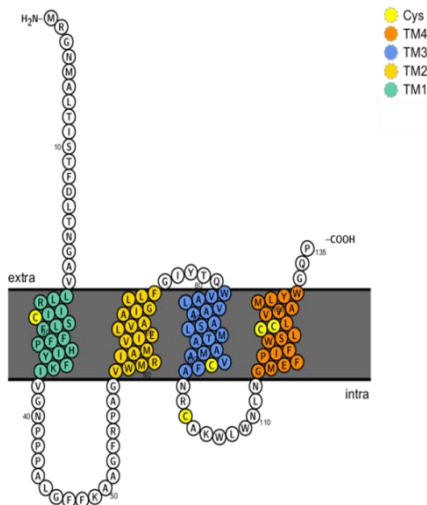


Figure 4.2.4. BtdS membrane topology prediction. The amino acid residues are shown as circles with the corresponding one-letter symbol, transmembrane segments (green, yellow, blue, orange) are shown as schemes of the helix, the membrane is shown in grey with the extracellular and cytoplasmic sides indicated. The C- and N-terminal ends are indicated. The cysteine residues are highlighted in yellow.

To confirm direct protein-protein interaction between RedR2 and BtdS, we carried out column binding experiments. Because BtdS is an integral membrane protein insoluble when overexpressed (not shown), we generated a protein fusion of BtdS to the maltose-binding protein (MBP) in pMAL-pV, which includes an internal 6-His tag (Pérez-Martín *et al.*, 1997). The resulting chimera (MBP-6His-BtdS) was purified and loaded onto a Ni²⁺-sepharose column, and an *E. coli* crude extract containing overproduced RedR2-HA was then applied to the column and subsequently washed to eliminate unbound material.

Figure 4.2.5 shows that RedR2 was retained by the BtdS protein bound to the column and co-eluted with it when imidazole was applied. MBP-6His-BtdS eluted as a 52 kD protein. On the contrary, RedR1 was not retained by BtdS and eluted with the unbound material. These results confirm the above genetic indications that RedR2 but not RedR1 was repressed by BtdS. It is worth noting that in a control assay with the MBP lacking the BtdS moiety bound to the column, neither RedR1 nor RedR2 were retained in the column (not shown). To further identify the RedR2 domain involved in interaction of this bEBP with BtdS, we designed a series of BACTH constructs in pUTC18 and pKT25 to probe the different RedR2 domains against BtdS. BACTH assays are especially suitable for BtdS analysis since they were designed to be applicable to integral membrane proteins (Karimova *et al.*, 2000). The different pUT18 and pKT25 derivatives were transformed into BTH101 reporter strain (Material and Methods 4.2, Table 3.2.1). Figure 4.2.6 clearly shows that RedR2 but not RedR1 as whole-length proteins showed binding interaction with BtdS, thus confirming the above results with column binding assays. Furthermore, the binding determinant could be located to the NTD of RedR2, which gave strong positive binding values with BtdS. As expected, RedR1 NTD was negative in interaction with BtdS.

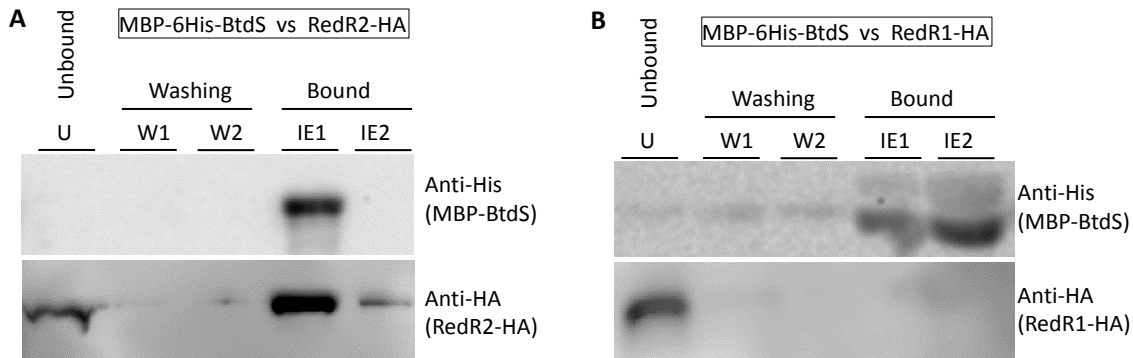


Figure 4.2.5. Interaction of BtdS with RedR proteins detected by column-binding analysis. A) A solution of purified MBP-6His-BtdS was loaded onto a HisTrap HP (GE Healthcare) column and thoroughly washed with buffer B as described in Materials and Methods 3.2. Then a crude extract containing overproduced RedR2-HA was loaded and the column was washed with 10 bed volumes of loading buffer. Unbound material (U) and washing fractions (W) were collected. Finally bound proteins were eluted using buffer B supplemented with 250 mM imidazole. The collected fractions (bound proteins) were labeled as IE1 and IE2. The proteins in the indicated samples were fractionated in SDS-PAGE, transferred to PVDF membranes, and probed using either anti-His or anti-HA antibodies as indicated. B) A similar experiment as in A except that the crude extract contained overproduced RedR1-HA.

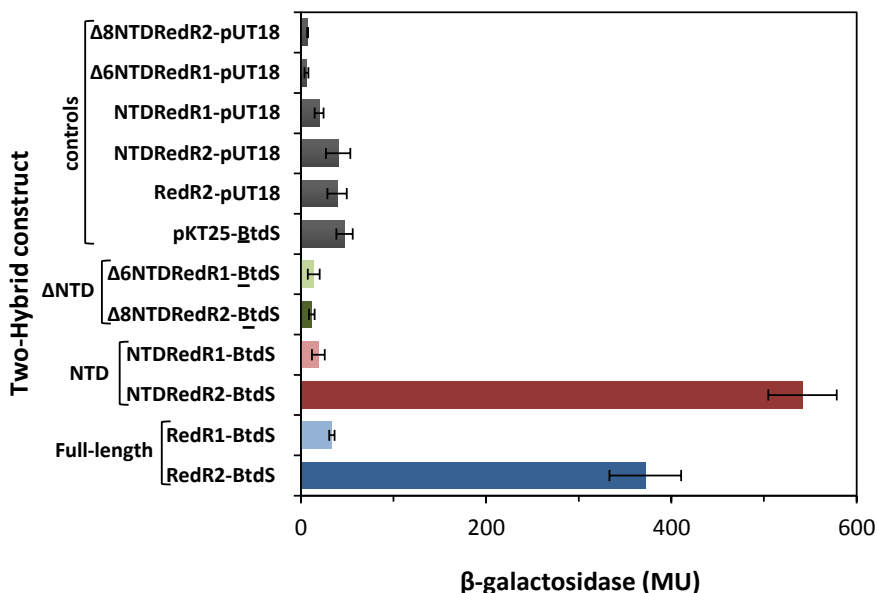


Figure 4.2.6. Binding of BtdS to RedR proteins and truncated derivatives. RedR1 and RedR2 proteins and truncated derivatives were fused to the N-terminus of T25 and BtdS was fused to the C-terminus of T18 in pKT25 and pUT18 BACTH vectors (Karimova *et al.*, 2000). In each assay pair in the x axis (separated by a hyphen), the first construct was based on pKT25 and the second on pUT18. NTDRedR1 and NTDRedR2 are the N-terminal domain of either protein (red), Δ6NTDRedR1 and Δ8NTDRedR2 are truncated versions of the NTD indicating the number of N-terminal residues removed (green), RedR1 and RedR2 are the full-length proteins (blue). Controls are assays with one of the plasmids devoid of insert (grey). Assays were minimally performed in triplicate; error bars show the standard deviation of the mean

The NTD domains of the two proteins are identical except for their N-terminal tail, where a stretch of 6 and 8 non-conserved residues (in RedR1 and RedR2, respectively) precede the conserved sequence, and for position 233 of RedR1 within the PAS domain, where a Thr is substituted by an Ile in RedR2 (Fig. 4.2.1). Therefore, the different behavior of the two proteins in the binding assays must lie in either or both sequence differences. We constructed a T25 fusion to the NTDs devoid of their N-terminal tail (6 or 8 residues according to the specific protein) and probed them against the T18 fusion to BtdS. As shown in Fig. 4.2.6, the RedR2 NTD devoid of his N-terminal tail had lost its capacity of binding interaction with BtdS. This result suggests that the N-terminal tail of the protein is the sequence determinant that establishes the differences between RedR1 and RedR2 in their capacity to interact with BtdS, and has an essential role in the control of the NTD through binding BtdS.

4.2.4. Discussion

The anaerobic resorcinol degradation pathway of *A. anaerobius* is unique not only because it represents a different aromatic degradation strategy in anaerobes (Philipp & Schink, 1998), but as evidenced in this study, because it also constitutes a novel and complex model of bEBP-mediated transcriptional regulation. The presence of two genes coding for almost identical bEBPs in the cluster initially raised the possibility of their function being redundant for pathway activation. Our previous genetic analysis established that despite their striking sequence similarity, both regulators were required for full pathway induction in a manner that probably required them to form hetero-oligomers (Pacheco-Sánchez *et al.*, 2017). In this study we were able to clearly confirm *in vitro* the binding interactions between RedR1 and RedR2 that were faintly predicted in previous two-hybrid assays. In fact, an overall practical outcome of the set of results presented here is that column-binding assays are reliably reflected in the two-hybrid assays, an approach that allows the easy evaluation of a broader range of protein derivatives and combinations. In addition, column-binding assays discarded self-interactions of the two proteins, as already suggested by the two-hybrid assays. This is especially intriguing since hetero-interactions were shown to occur through the central domains of RedR1 and RedR2 (Pacheco-Sánchez *et al.*, 2017), and both proteins have identical central domains. The differences between them are located in the NTD and CTD. We must then assume that some unknown determinant in either or both NTD and CTD was impeding self-interaction of each protein through their central domain. In the case of RedR1, this is most likely the NTD, which also negatively controls protein assembly in negatively regulated bEBPs (Batchelor *et al.*, 2008). Deletion of this domain in Δ RedR1 rendered a protein that was fully active in *E. coli* (Table 4.2.1), which implies that it was capable to assemble into a homo-hexamer. However, we had previously shown that this truncated version of the protein was also not capable of detectable binding-interaction with itself in two-hybrid assays (Pacheco-Sánchez *et al.*, 2017). We contemplate two possible explanations for this discrepancy: one possibility is that the interactions that occur *in vivo* during activation are too weak to be detected in two-hybrid assays; the second hypothesis is more plausible and involves the DNA sequences at the UASs as a stabilizing factor during hexamer assembly. In fact, bEBPs are normally bound to their UASs as two dimers in the absence of stimulatory signal (Vidangos *et al.*, 2013) (Figure 1.16), and assemble into a hexamer when activation of the NTD reorients this domain, eliciting the conformational change in each subunit required for oligomer assembly on the DNA (Volkman *et al.*, 2001). A case of extreme dependence on DNA binding for oligomerization is the NorR protein of *E. coli*. This regulator is unique in that it is capable of DNA binding and hexamer formation

in the absence of stimulatory signal provided that its three target UASs are present (Tucker *et al.*, 2010), and is only prepared to receive the stimulatory signal (NO) once the hexameric nucleoprotein complex is assembled (D'Autreaux *et al.*, 2005). In fact, the presence of the target DNA was shown to increase *in vitro* ATPase activity of this and other regulators (Austin & Dixon, 1992), which ultimately depends on hexamer assembly. Thus, it is conceivable that the DNA binding domain in Δ RedR1 is also involved in oligomer formation through binding its target UASs at the P_{orf14} promoter. This binding would not only increase the local concentration of the protein, as suggested (Porter *et al.*, 1993), but most importantly it would stabilize the otherwise weak interactions between Δ RedR1 monomers, explaining why this truncated protein was active on P_{orf14} . In other words, the DNA of the UASs would behave as an allosteric effector that determined Δ RedR1 conformation by controlling multimerization, and hence activity, of the regulator.

A similar DNA-mediated stabilization of the oligomer might also explain RedR2 full-length protein activation of P_{orf14} in *E. coli* and in a *btdS redR1* double mutant of *Azoarcus sp.* CIB, despite the absence of self-interaction in two-hybrid and column binding assays (Table 4.2.1 and 4.2.2, and Fig. 4.2.2). However, in this case the model has additional paradoxes. The NTD of RedR2 is clearly not exerting a repressing effect on protein oligomerization (Table 4.2.1), as for other positively regulated bEBPs (De Carlo *et al.*, 2006). This is however striking since the difference between Δ RedR1 (active) and Δ RedR2 (inactive) is at their CTD, mainly at the positioning helix C and the N-terminal tail (Fig. 4.2.1). This would imply that RedR2 CTD obstructs Δ RedR2 hexamer assembly on the DNA in the absence of the NTD. The differences between the two CTDs are not especially significant, but changes in the polarity/charge of a few residues in the positioning helix C might influence the orientation of the two DNA-binding helices of a dimer, leading to an incompatible angle and/or distance to allow their binding to the major grooves in the DNA (Vidangos *et al.*, 2013), besides the possible role of the N-terminal tail.

Also, positively regulated bEBPs generally compensate the absence of dimerization at their NTD by dimerizing through the two helices linking the central domain to the HTH in the CTD (helices A and B) (Sallai & Tucker, 2005; Vidangos *et al.*, 2014). We have previously shown that a truncated version of RedR2 only consisting of the CTD was not capable of self-interaction in two-hybrid assays (Pacheco-Sánchez *et al.*, 2017). Thus activity of RedR2 in the absence of RedR1 again points to the presence of the target promoter DNA stabilizing *in vivo* hexamer assembly to stimulate transcription from P_{orf14} . However in this case, unlike in RedR1, this interaction requires the presence of an intact RedR2 NTD, which

probably favors and/or stabilizes the oligomer assembly. Since, as mentioned, the differences between the two bEBPs mainly lie in the C- and T-terminal tails, it is tempting to suggest that these two ends physically interact in the active RedR2 hexamer. This type of interaction has been recently suggested from the structural studies of NorR in complex with its target DNA. The GAF domain in NorR NTD formed an arm-like structure curved down over the hexamer, sitting at the periphery of the central domain. The DNA binding domain was located below the central domain and contacted the DNA that encircled the bottom of the hexamer ring. Interestingly, the structure revealed that the GAF at the NTD domain interacted with the DNA binding domain, and potentially with the enhancer DNA itself (Fig. 4.2.7) (Bush *et al.*, 2015).

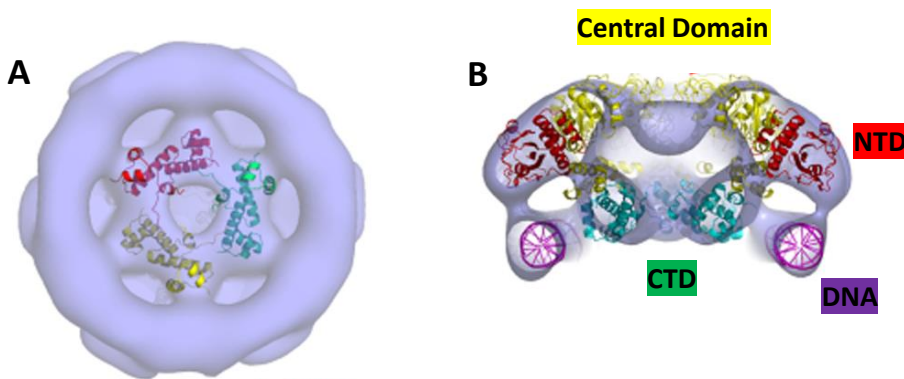


Figure 4.2.7. Homology models of AAA and GAF domains fitted into an electron microscopy density model of NorR bound to its UAS. A) Three pairs of DNA binding domains (yellow, red and cyan) fitted into the inner density viewed from the bottom. B) Cut-open view of (A) showing the three domains in different colors and a 100 bp circular dsDNA fitted into the density below the NorR hexamer. Taken from Bush *et al.*, 2015.

It has been suggested that the positive and negative regulation of bEBPs can be predicted based on the presence/absence of dimerization motifs in the linkers connecting the NTD with the central AAA+ domain (L1) and connecting this domain with the CTD (L2) (Doucleff *et al.*, 2005; Shingler, 2011). Obviously, this is not corroborated by RedR1 and RedR2, which have identical linker sequences but opposite activation mechanisms.

RedR2 activity on P_{orf14} in *E. coli* occurred in the absence of any external activating signals, which contrasts with the strict necessity of NTD activation to promote transcription in the positively controlled bEBPs (Bush & Dixon, 2012). We

have shown that the control of RedR2 in its natural host is mediated by its NTD binding the integral membrane protein BtdS, which sequesters the bEBP to the membrane, constraining its availability to activate the target promoter (Fig. 4.2.5). This implies that rather than a positively activated bEBP, RedR2 would be a constitutive bEBP, directly capable to bind its operator and undergo the series of event leading to transcription activation if made available in the cell. However, we have shown that under natural conditions, maximum promoter activity is only obtained when the two regulators are present and the activating signal (presence of the resorcinol substrate metabolized to HBQ) is provided (Pacheco-Sánchez *et al.*, 2017), as shown in Table 4.2.2 for P_{orf14} promoter in *Azoarcus* sp. CIB bearing the pR^+ plasmid. The RedR2-dependent constitutive transcription level in the absence of RedR1 was 50% lower than the induced levels in the wild-type, where RedR1 and RedR2 associate to promote transcription. Because RedR1 by itself is incapable of promoter activation (see negligible activity values in the *redR2* mutant, Table 4.2.2), the activity in the wild-type is not the sum of the activities corresponding to each regulators, but rather the activity stemming from the novel active conformation of the regulators, composed of RedR1 and RedR2 hetero-oligomers. We suggest that in their native conformation, the affinity of the RedR proteins for their counterpart is higher than their affinity for themselves, favoring the formation of heterodimers/oligomers. This is supported by the strong interactions between the two full-length proteins observed in BACTH and column binding assays. It must be emphasized that the predicted recognition helix (D) of the HTH of both proteins is almost identical (a single Ser to Ala change, Fig. 4.2.1) and most differences are found in the positioning helix (C) and C-terminal tail. It is thus plausible that both regulators target the same UASs, and that some determinants in the NTDs and CTDs are weakening the affinity to form homodimers/oligomers. Thus, when the two regulators are present, heterodimers are preferentially formed in solution over either homodimer, since RedR1 full-length protein is incapable of self-interaction and RedR2 would require stabilization through DNA binding to form homodimers.

A further question arises from this model: why is RedR1 not repressed by BtdS? The NTD sequence, which is responsible for RedR2 binding to BtdS (Fig. 4.2.6), is slightly different in the two regulators. As depicted in Figure 4.2.1, the N-terminal tail preceding the conserved sequence between the two proteins is different in sequence and length, and Thr233 in RedR1 is an Ile in RedR2. A BACTH construct of RedR2 NTD lacking its N-terminal 8-residue tail completely lost its capacity of binding interaction with BtdS (Fig. 5.6), suggesting this tail plays an important role in RedR2 control, being responsible for the interaction with BtdS. Our suggestion is that RedR2 N-terminal tail makes specific contacts with one of

the predicted cytoplasmic loops of BtdS. Besides the specific differences in the tail sequence, RedR2 N-terminal tail (MSRETSLA) has a more polar character than RedR1 tail (VDGFLS), which might be relevant for protein-protein interaction. In fact, one of the cytoplasmic loops in BtdS is rich in Trp, an indication of the likelihood of being part of a binding site (Fig. 4.2.4) (Ma *et al.*, 2003). This loop also has a marked polar character, which may favor contacts between the two proteins at the membrane surface (Hu *et al.*, 2000). Our attempts to identify the actual BtdS region involved in the interaction with RedR2 by probing oligopeptides bearing the loop sequence for interaction with RedR2 NTD in ITC assays were unsuccessful, because the dilution heat of the probed peptides was too high to allow the detection of interaction signals (not shown).

Several bEBPs are regulated by protein-protein interactions. The best-characterized examples are FleQ, NifA, PspF and DhaR, the regulation of which shows interesting similarities with RedR2 regulation. DhaR is a special case of bEBP, since it does not control a σ^{54} -dependent but a σ^{70} -dependent promoter, and its central domain lacks the σ^{54} -binding motif (Bächler *et al.*, 2005). However the structure of its NTD with a GAF and PAS-like tandem domain resembles the RedR proteins NTD and was used to model their structure (Fig. 4.2.1). DhaR regulates the expression of the two subunits of the dihydroxyacetone kinase in *E. coli*, DhaK and DhaL. Interestingly, DhaR is activated by interaction with DhaL whilst it is repressed by DhaK in a manner that is dependent on the ATP *versus* ADP load of DhaL (only DhaL-ADP can bind DhaR). Whilst DhaL binds DhaR through both the PAS and GAF domains, as well as through the linker helix between them, DhaK can only interact with the GAF domain (Shi *et al.*, 2014). Thus, DhaR and RedR2 can be included amongst the regulators controlled by the so called trigger enzymes, i. e. enzymes with dual functions: besides their specific enzymatic activity, they play an active role in the control of gene expression (Commichau & Stulke, 2008). An example with similar features to what we observe in RedR2 is the LTTR ThnR controlling tetralin degradation in *Sphingopyxis granuli* strain TFA (Ledesma-García *et al.*, 2013). The activity of this regulator is controlled, probably through protein-protein interaction, by the iron-sulfur flavoprotein ThnY that in turn is regulated by the electron transport chain of the tetralin dioxygenase system in response to the catabolic flux in the cell (Ledesma-García *et al.*, 2016). The NifA protein, which includes a GAF domain in its NTD, is controlled through protein-protein interaction with its antiactivator NifL, to prevent the hexamer assembly (Martinez-Argudo *et al.*, 2004). Interestingly, NifL of *K. pneumoniae* that contains tandem PAS domains in its NTD is membrane-associated (sequestered) when the FAD of one of its PAS domains is reduced by the reduced quinone pool generated

during anaerobic respiration. Only in its oxidized state (in the presence of oxygen) it dissociates into the cytoplasm to repress NifA through direct protein-protein interaction (Grabbe & Schmitz, 2003). Furthermore, the N-terminal tail of NifL seems to be essential for the protein oligomerization and redox signal transduction (Little *et al.*, 2012). PspF, the phage shock protein regulator, also seems to be ultimately controlled through the redox state of the quinone pool in the membrane (Engl *et al.*, 2011). This bEBP that lacks an NTD is constitutively active, and is repressed through protein-protein interaction with PspA, a peripheral membrane protein that inhibits its ATPase activity (Weiner *et al.*, 1991). Although the final factors influencing PspA association to the membrane through two integral membrane proteins have not been elucidated yet (Joly *et al.*, 2010), this is another example of a bEBP controlled through membrane related proteins capable of sensing the redox state of the quinone pool. Finally, the regulation of FleQ varies depending on the host. In *P. aeruginosa*, FleQ activity is repressed through direct protein-protein interaction with FleN, a P loop ATPase that inhibits FleQ ATPase activity (Dasgupta & Ramphal, 2001; Chanchal & Jain, 2017).

The question remains of which is the mechanism that releases RedR2 from BtdS to activate transcription. Although this issue was not addressed in this study, it is tempting to speculate that, as for some of the membrane related systems described above, the redox state of some membrane factors might influence the redox state of BtdS, allowing the release of the bEBP. Furthermore, the product of the reaction carried out by BtdLS is hydroxybenzoquinone, and this compound is the experimentally determined pathway effector triggering induction of the two proteins (Pacheco-Sánchez *et al.*, 2017). Furthermore, the only characterized BtdS homologue is the electron transfer subunit of a thiosulphate:quinone oxidoreductase (Müller *et al.*, 2004). As mentioned, RedR2 NTD contains a PAS domain; these domains frequently accommodate a cofactor, frequently FAD, which would be a good candidate to sense a redox signal. On the other hand *orf14*, the first gene in the operon controlled by P_{orf14} in the resorcinol degradation cluster, codes for a NADH-dependent flavin oxydorredutase of unknown function (Darley *et al.*, 2007), which might be involved in returning BtdS/RedR2 to the repressed state once the substrate were consumed. However, the crystal structure of the NTD of DhaR, based on which RedR2 structure was modeled, was shown not to contain any cofactor. Thus, although this remains to be clarified for RedR2, *a priori* we do not expect a flavin cofactor be present in RedR2 NTD.

Two examples of bEBP heterodimer formation have been described: *Pseudomonas syringae* HrpS-HrpR and *R. sphaeroides* FleQ-FleT systems.

However, both of them significantly differ from the RedR1-RedR2 system analyzed here. Although FleQ is believed to form heterooligomers with FleT, this last bEBP lacks both the NTD and HTH motifs. Interestingly, FleQ is capable of transcription activation on its own at P_{fleT} promoter, but both FleQ and FleT are required to activate the remaining target promoters (Poggio *et al.*, 2005). This resembles the situation with RedR2, which can on its own activate to a certain extent some of its target promoters, but strictly requires RedR1 for some others (Pacheco-Sánchez *et al.*, 2017 and not shown).

HrpS and HrpR are paralogues that lack the NTD. HrpRS forms a transcriptionally active heterohexamers that are active in transcription, and are negatively controlled through protein interaction of HrpS with HrpV, which fulfills a similar role to that of PspA with PspF. These two regulators are believed to have evolved from a single ancestral gene duplication event, after which sequence degeneration has lead to two paralogues with specialized role in bEBP activity control (Jovanovic *et al.*, 2011). It is most probable that *redR1* and *redR2* also originated from a gene duplication event, and they further evolved to sense the same ultimate signal (presence of a usable substrate) through different mechanisms. The final benefits of this dual mode o regulation are not obvious, but it probably allows a finer coordination of the expression levels of the five pathway operons coding for 20 genes, which certainly implies an important energy cost to the cell that must be tightly controlled.

Results and Discussion

Chapter 4.3

DbdR, a new member of the LysR family of transcriptional regulators, coordinately controls four promoters in the *Thauera aromatica* AR-1 3,5-dihydroxybenzoate anaerobic degradation pathway

This chapter was submitted to *Applied and Environmental Microbiology* as:

Daniel Pacheco-Sánchez, Águeda Molina-Fuentes, Patricia Marín, Alberto Díaz-Romero and Silvia Marqués. DbdR, a new member of the LysR family of transcriptional regulators, coordinately controls four promoters in the *Thauera aromatica* AR-1 3,5-dihydroxybenzoate anaerobic degradation pathway.

4.3.1. Abstract

The facultative anaerobe *Thauera aromatica* strain AR-1 uses 3,5-dihydroxybenzoate (3,5-DHB) as sole carbon and energy source under anoxic conditions using an unusual oxidative strategy to overcome aromatic ring stability. A 25 kb gene cluster organized in four main operons encodes the anaerobic degradation pathway for this aromatic. The *dbdR* gene coding for a LysR-type transcriptional regulator (LTTR) which is present at the foremost end of the cluster is required for anaerobic growth on 3,5-DHB and for expression of the main pathway operons. A model structure of DbdR showed conserved key residues for effector binding with its closest relative TsaR for *p*-toluenesulfonate degradation. We found that DbdR controlled expression of three promoters located upstream from the operons coding for the three main steps of the pathway. Whilst one of them (P_{orf20}) was only active in the presence of 3,5-DHB, the other two (P_{dbhL} and P_{orf18}) showed moderate basal levels that were further induced in the presence of the pathway substrate, which needed be converted to hydroxyhydroquinone to activate transcription. Both basal and induced activities were strictly dependent on DbdR, which was also required for transcription from its own promoter. DbdR basal expression was moderately high and increased two-fold in response to the presence of the effector. DbdR was found to be a tetramer in solution, producing a single retardation complex in binding assays with the three enzymatic promoters, consistent with its tetrameric structure. The three promoters had a conserved organization with clear putative regulatory and activating binding sites positioned at the canonical distance from the transcription start site. In contrast, two protein-DNA complexes were observed for the P_{dbdR} promoter, which also showed significant sequence differences with the three other promoters. Altogether our results show that a single LTTR coordinately controls expression of the entire 3,5-DHB anaerobic degradation pathway in *Thauera aromatica* AR-1, allowing a fast and optimized response to the presence of the aromatic.

4.3.2. Background

The facultative denitrifier *Thauera aromatica* strain AR-1 attacks 3,5-dihydroxybenzoate (3,5-DHB, α -resorcate) through an oxidative rather than a reductive reaction, where the aromatic ring is hydroxylated at position 2 by a resorcinol hydroxylase (*dbhLS*) to render, after subsequent decarboxylation, the central intermediate hydroxyhydroquinone (HHQ) (Gallus & Schink, 1998) (Fig. 4.3.1.A). Similarly, in the strict anaerobe *Azoarcus anaerobius*, dihydroxybenzene (resorcinol) is converted to HHQ through hydroxylation of the aromatic ring at position 4 (Philipp & Schink, 1998). In *T. aromatica* AR-1 the 3,5-DHB-hydroxylating enzyme activity is membrane-associated and does not produce HHQ as a primary oxidation product but an unknown intermediate, probably 2,3,5-trihydroxybenzoate, where the decarboxylation to HHQ is stimulated in the presence of an unidentified factor present in the cytoplasmic fraction (Gallus & Schink, 1998). The group of genes that encodes the enzymes of the route shows a significant homology between the two organisms, although with some differences (Darley *et al.*, 2007; Molina-Fuentes *et al.*, 2015). Cluster analysis identified a total of 28 ORFs, organized into a total of 5 operons, four transcriptional units that encode the three main steps of the pathways and a TRAP transport system. The fifth operon that encodes a transcriptional regulator type LysR (LTTR), called *DbdR*, together with the *qorA* gene that encodes a redundant enzyme for the second step of the pathway (Fig. 4.3.1B).

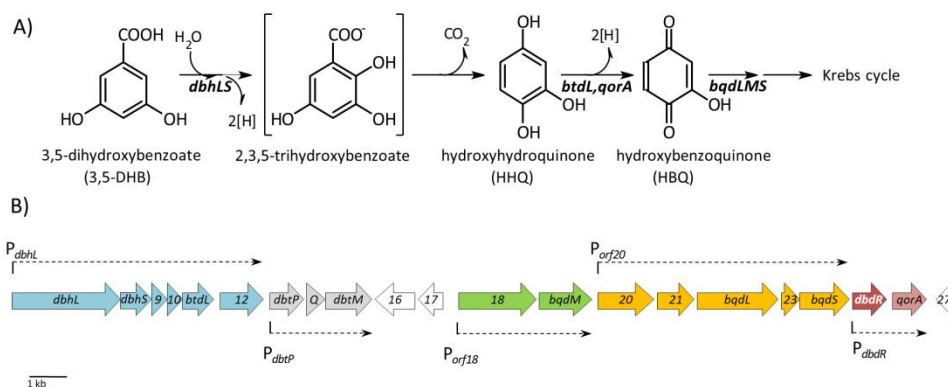


Figure 4.3.1. *T. aromatica* AR-1 3,5-DHB anaerobic degradation pathway and gene cluster. **A)** *T. aromatica* strain AR-1 3,5-DHB degradation pathway. The genes involved in each enzymatic step are indicated. **B)** Organization of the *T. aromatica* strain AR-1 genomic region coding for anaerobic 3,5-DHB degradation. The genes belonging to the same operon are shown in the same colour, except the regulatory gene *dbdR*, which is shown in red. The promoters identified in this work are indicated, and the resulting messengers are outlined as dashed arrows.

The main enzymes of both dihydroxylated aromatic degradation pathways are induced by the presence of the substrate (Philipp and Schink, 2000), which has been confirmed at the transcriptional level, both in *A. anaerobius* (Pacheco-Sánchez *et al.*, 2017) and in *T. aromatica* AR-1 (Molina-Fuentes *et al.*, 2015). One of the differences is found in the regulatory mechanisms. In *A. anaerobius*, the transcription of the first three reactions of the pathway is controlled by the coordinated activity of two homologous regulators belonging to the NtrC family (Pacheco-Sánchez *et al.*, 2017), whilst in *T. aromatica* AR-1 the *dbdR* gene is necessary for growth in 3,5-DHB (Molina-Fuentes *et al.*, 2015), which suggests that this LTTR is responsible for the expression of the different operons of the pathway

The LTTR family is a highly conserved group of transcriptional regulators that are composed of a highly conserved N-terminal winged helix-turn-helix (wHTH) DNA-binding domain (DBD) approximately 60 amino acids in length, and an effector-binding domain (EBD) with lower sequence conservation but a conserved structural fold located in the C-terminal end of the protein (Momany & Neidle, 2012). Both domains are connected by a long linker helix which confers the high flexibility required for the conformational changes that take place upon effector binding for promoter activation (Momany & Neidle, 2012; Koentjoro *et al.*, 2018). The current model for LTTR-dependent promoter activation predicts binding of the regulator to two distinct binding sites: i) the recognition binding site (RBS) normally centered at position -65 from the transcription start site and including the LTTR consensus palindromic sequence (T-N₁₁-A) and ii) the activation binding site (ABS) generally overlapping the -35 box for RNA polymerase (RNAP) binding (Maddocks & Oyston, 2008; Momany & Neidle, 2012). Whilst the RBS seems to be essential for LTTR binding, the ABS is essential for activation. The main goal of this study was to characterize the transcriptional regulation controlling the growth of *T. aromatica* AR-1 on 3,5-DHB and the factors influencing pathway expression, amongst which the LTTR DbdR plays a pivotal role. Unlike most LTTRs, DbdR is not transcribed divergently from the genes it controls. Rather, it is able to simultaneously activate several promoters in the gene cluster. We were able to define four promoters of the pathway that were strictly dependent on this regulator, which responded to a pathway intermediate. Analysis of DbdR binding to its target promoters revealed differences in the binding mode to the promoters coding for pathway enzymes and to its own promoter.

4.3.3 Results

4.3.3.1. Three promoters drive expression of the 3,5-DHB anaerobic degradation pathway in *T. aromatica* AR-1.

To map the promoters driving transcription of the three main operons of the pathway, total RNA of *T. aromatica* AR-1 cells growing on either glutarate or 3,5-DHB was isolated and analyzed using primer extension with labelled oligonucleotides complementary to *dbhL*, *orf18* and *orf20*. A single extension band was observed for *dbhL*, which only appeared when cells were grown on 3,5-DHB (Fig. 4.3.2A). The band size positioned the transcription start site 57 bp upstream from the translational start site of *dbhL*. Two extension bands were observed for *orf18* and *orf20*, which mapped 76 and 79 bp (P_{orf18}), and 70 and 71 bp (P_{orf20}) upstream from the translation start site of *orf18* and *orf20*, respectively (Fig. 4.3.2B and C). Whilst the two P_{orf20} bands only appeared with 3,5-DHB, the two P_{orf18} bands were present at low level in glutarate-grown cells and were strongly induced in the presence of 3,5-DHB. These data confirm the inducibility of the pathway by its substrate. Alignment of the sequences upstream from the transcription start sites showed a similar organization of the three promoters and several regions of high sequence conservation (Fig. 4.3.2.D).

The highest similarity was found between P_{dbhL} and P_{orf20} , with almost identical -10/-35 boxes for RNA polymerase (RNAP) binding, an identical sequence between positions -30 and -55 (coordinates relative to P_{dbhL} start site) that overlapped the -35 box, and a highly conserved (58% identity) region with partial symmetry between positions -57 and -75, which included the consensus LTTR binding motif T-N₁₁-A. Although less conserved, this motif was also present in P_{orf18} , as was the -30/-55 conserved region which overlapped a significantly different -35 box. In all three promoters the LTTR binding motif was centered at or near position -65 relative to their transcription start site, and would correspond to the so-called regulatory binding site (RBS) present in most LTTR-dependent promoters (Maddocks & Oyston, 2008). The conserved -30/-55 region fulfilled the criteria of the activation binding site (ABS) defined in most LTTR-dependent promoters, i.e. placed between the RBS and the transcription start site, overlapping the -35 box (Lerche *et al.*, 2016).

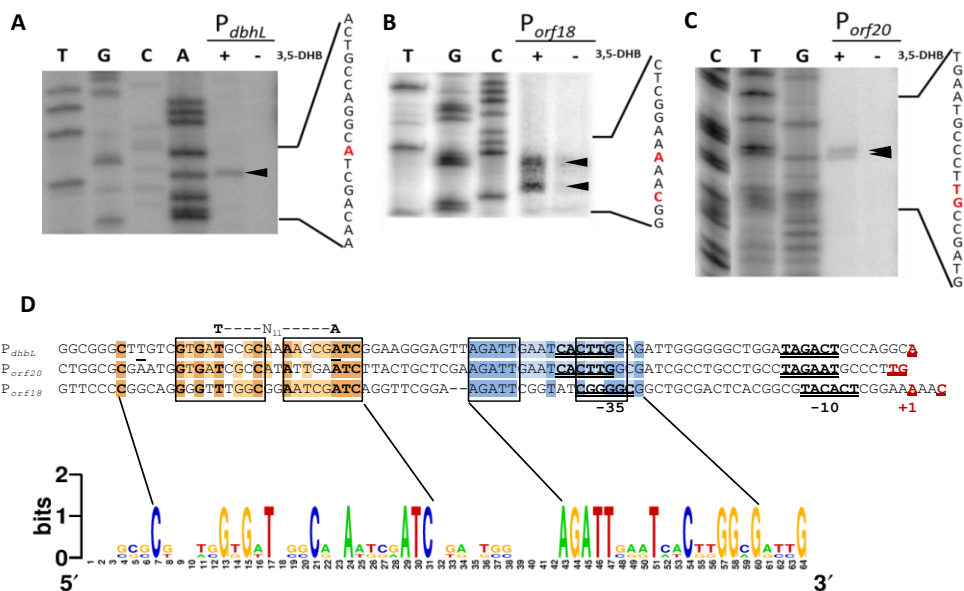


Figure 4.3.2. Mapping of the transcription initiation site of the three pathway operons. Primer extension of total RNA of *T. aromatica* AR-1 cells growing on glutarate (-) or 3,5-DHB (+) with primers for *P_{dhbL}* (A), *P_{orf18}* (B), and *P_{orf20}* (C) were run parallel to sequencing reactions of the corresponding region with the same primers. The cDNA extension bands corresponding to each promoter are indicated with an arrow. (D) Alignment of the promoter region of the three promoters showing the conserved RNA polymerase -10/-35 binding elements (double-underlined), the transcription start site (+1, red), and the conserved putative regulator binding sites located upstream (RBS, orange; ABS, blue; dark colored bases are conserved in the three promoters; light colored bases are conserved in two promoters). (E) LOGO presentation of the conserved regions between the three promoters.

4.3.3.2. DbdR controls expression of the pathway promoters.

We have previously shown that *dbdR* gene was essential for anaerobic growth on 3,5-DHB, and was also required for expression of the three main pathway operons (Molina-Fuentes *et al.*, 2015). In fact, growth of a *dbdR* mutant on 3,5-DHB was restored when *dbdR* gene was provided in a plasmid, as was the activity of the promoters (Fig.4.3.3). To confirm that control of the three promoters was dependent on DbdR, we generated transcriptional fusions of the *P_{dhbL}*, *P_{orf18}*, and *P_{orf20}* promoters to *lacZ* in the pMP220 broad-host-range vector (Spaink *et al.*, 1987) and we transferred them to *T. aromatica* AR-1 and its *dbdR* null mutant (Molina-Fuentes *et al.*, 2015).

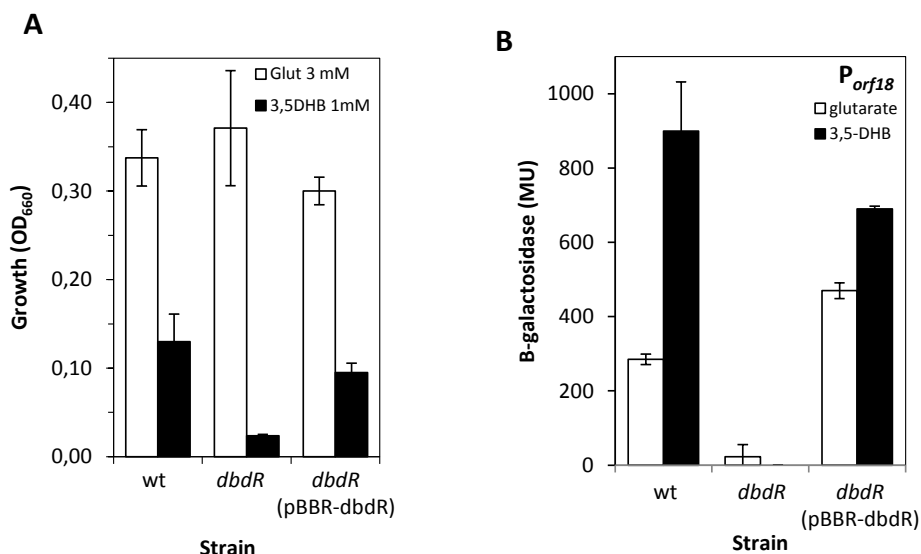


Figure 4.3.3. Complementation of *T. aromatica* AR-1 *dbdR* mutant with *dbdR* wild-type gene. **A)** *T. aromatica* strain AR-1, its *dbdR* mutant derivative, and the complemented strain with pBBRMCS5 bearing *dbdR* wild-type gene were inoculated at an initial OD₆₆₀ of 0.05 and were cultivated either on 3,5 mM glutarate (white) or 1 mM 3,5-DHB (black) at 30°C. Growth was determined as OD₆₆₀ after 72 h. **B)** The same strains as in (A) but bearing a P_{orf18}::*lacZ* transcriptional fusion in plasmid p220Porf18 were grown for 96 h either on glutarate (white) or 3,5-DHB (black) and β-galactosidase activity was determined. Average values from at least 3 repetitions (±SD) are shown.

To allow normal growth of the mutant strain, the cells were cultivated on succinate in the presence and absence of 3,5-DHB and β-galactosidase activity was determined after 72 hours of growth. In the wild type strain, P_{dbhL} and P_{orf18}, promoters of the first and second steps in the pathways, and of one subunit of the third step, respectively, showed a significant basal activity in the absence of substrate, which was induced 3.5 and 5 times, respectively, in the presence of 3,5-DHB (Fig. 4.3.4.). In contrast, the basal levels were negligible in P_{orf20}, and a strong induction was observed in the presence of 3,5-DHB. Both the basal and the induced activities of all three promoters were dependent on the presence of the *dbdR* gene. The unexpected differences between the two promoters with highest sequence similarity, P_{dbhL} and P_{orf20}, especially in the absence of the effector, suggest that additional elements in the promoter sequence are relevant to determine the final promoter response and strength. In fact, it has been shown that minute changes in the DNA recognition elements or even in the flanking sequence can have drastic consequences on the affinity of the regulator for its binding site (Kovacikova & Skorupski, 2002; MacLean *et al.*, 2008).

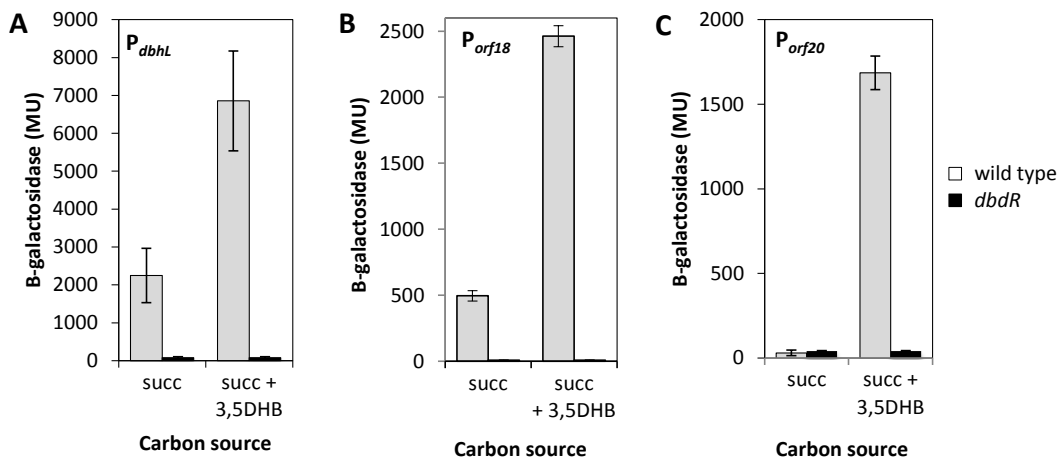


Figure 4.3.4. Expression of the three pathway promoters in wild-type and *dbdR* mutant backgrounds. β -galactosidase activity was measured after 72 h in cultures of wild-type *T. aromatica* AR-1 (white bars) and its *dbdR* mutant (black bars) bearing the corresponding promoter-*lacZ* fusion in pMP220, growing on succinate or succinate plus 3,5-DHB. A) P_{dbhL} ; B) P_{orf18} ; C) P_{orf20} .

4.3.3.3. The substrate must be transformed to activate DbdR.

Although some LTTR are capable of promoter activation in the absence of an effector, most of them require binding to a signal molecule to become active (Maddocks & Oyston, 2008). This is especially true for those LTTR regulating aromatic biodegradation pathways, which are generally recognized and activated by the substrate or by intermediate compounds in the degradation pathway (Tropel & van der Meer, 2004). To test the interaction of DbdR with its substrate or with pathway intermediates, a His-tagged version of the protein was overproduced and purified using nickel-affinity chromatography and the binding of possible effectors was tested using isothermal titration calorimetry (ITC). The assays were carried out under anoxic conditions because the hydroxylated pathway intermediates become readily oxidized in the presence of oxygen. No binding signal was detected with 3,5-DHB and the first pathway intermediate hydroxyhydroquinone (data not shown). The first and third intermediates in the pathway, 2,3,5-trihydroxybenzoate and hydroxybenzoquinone, respectively, are not commercially available and could not be tested. We also tested two hydroxylated analogues as possible effectors of the protein; neither 2,5-dihydroxybenzoate (gentisate) nor 3,4-dihydroxybenzoate

(protocatechuate) showed any interaction with the protein. As an alternative we used a genetic approach to determine which intermediate of the pathway was essential for promoter activation *in vivo*. To that end, we measured promoter activity in genetic backgrounds unable to transform the substrate 3,5-DHB (a *dbhL* mutant), the third intermediate HHQ (a *btdL*, *qorA* double mutant) and the fourth intermediate hydroxybenzoquinone (a *bqdl* mutant). Each of these mutants was expected to accumulate the corresponding substrate of the mutated enzyme gene. Fusions to *lacZ* of the three promoters were assayed in wild type *T. aromatica* AR-1 and in its corresponding pathway mutants after 72 hours of growth on glutarate in the presence and absence of 3,5-DHB. Figure 4.3.5. shows that in the *dbhL* mutant, unable to transform 3,5-DHB, P_{dbhL} activity was similar in the absence and presence of the effector (i.e., basal levels).

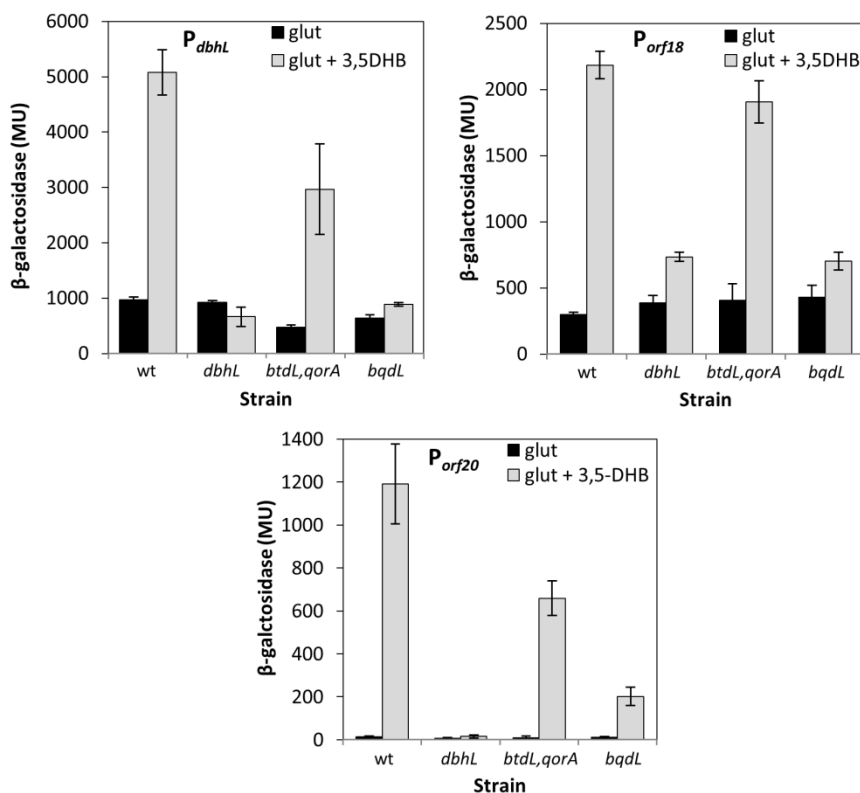


Figure 4.3.5. Identification of DbdR effector molecule. Activity of P_{dbhL} (A), P_{orf18} (B) and P_{orf20} (C) in mutants of the three first pathway reactions. β -galactosidase activity was measured after 72 h in cultures of wild-type *T. aromatica* AR-1 and the indicated knockout mutants bearing the corresponding promoter-*lacZ* fusions in pMP220, growing on glutarate in the presence and absence of 3,5-DHB. Data are the average of 4-8 assays.

The same was true for the *bqdL* mutant, where HBQ accumulated. However, in a *btdL*, *qorA* double mutant, which lacks both pathways for HHQ transformation into HBQ and accumulates HHQ and probably its proposed precursor 2,3,5-trihydroxybenzoate, the activity of P_{dbhL} was significantly higher than in the two other mutants, reaching 60% of the wild type values. A similar picture was obtained for P_{orf18} and P_{orf20} , where promoters were only induced by 3,5-DHB in the *btdL*,*qorA* double mutant, reaching values of 92% and 57% of the wild-type, respectively. These results point to HHQ or possibly 2,3,5-trihydroxybenzoate as the ligand required for activation of DbdR to induce the three promoters.

4.3.3.4. DbdR is a tetramer in solution.

In LTTRs, the effector binding domain (regulatory domain, RD), is located at the C-terminal end of the protein. Its structure is composed of two Rossmann fold-like subdomains leaving a cavity in the interface between them that constitutes the ligand binding site (also known as the inducer binding cavity) (Lerche *et al.*, 2016). Interestingly, the two closest DbdR homologues for which a crystal structure is available are the two LTTRs involved in the regulation of aromatic degradation pathways: *Comamonas testosteroni* strain T-S TsaR (Monferrer *et al.*, 2010) and *Cupriavidus necator* CbnR (Muraoka *et al.*, 2003), which control degradation of the aromatics *p*-toluensulfonate and chlorocatechol, respectively. Fig. 4.3.6.A shows the alignment of DbdR with TsaR and CbnR. As expected, the highest degree of sequence identity is located in the CTD, although homology is maintained throughout the whole protein sequence, especially in certain key residues involved in effector recognition (Monferrer *et al.*, 2010). Figure 4.3.6.B shows the structure prediction of DbdR based on the crystal structure of TsaR, which locates DbdR DBD between residues 3 and 63 in the NTD, whilst the conserved EBD encompasses residues 87 to 297. A clear inducer binding cavity is identifiable between the two sub-domains of the RD, which are well delimited in the structure. A long α -helix connects the DBD to the RD. In the TsaR protein, the residues putatively involved in *p*-toluensulfonate binding have been identified (Monferrer *et al.*, 2010). Similarly positioned residues are present in the DbdR binding cavity (Fig. 4.3.6A): conserved Ser98 and Pro99 would face the side chain of the aromatic effector, whilst Pro199, 243 and 267 would create the hydrophobic environment accommodating the aromatic ring. These residues were also conserved in CatM and BenM proteins (Clark *et al.*, 2004).

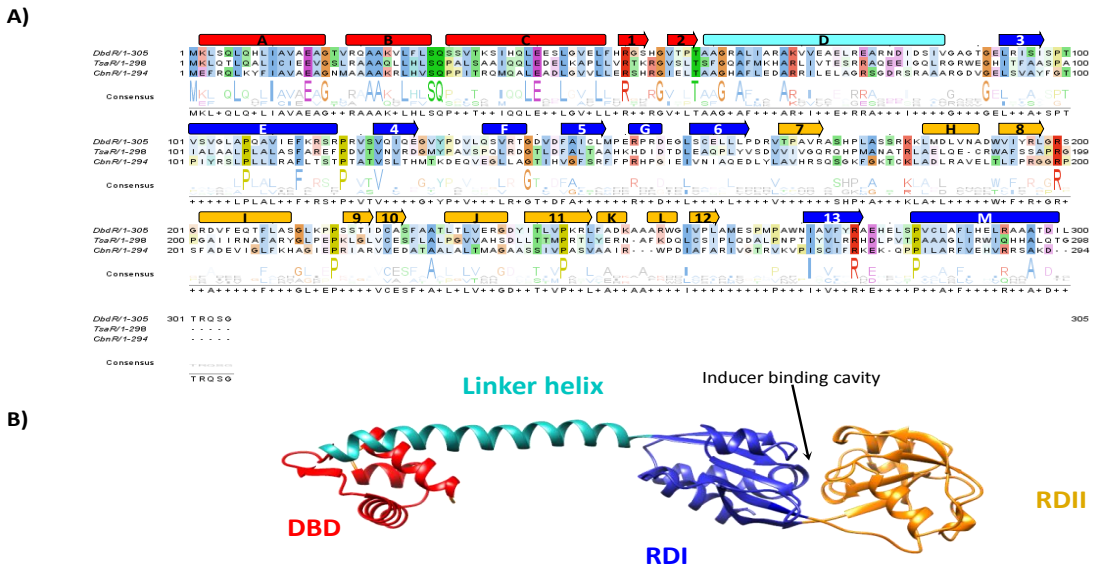


Figure 4.3.6. A) Alignment of *T. aromatica* AR-1 DbdR protein with its closest crystalized relatives Tsar (*Comamonas testosteroni*) and CbnR (*Cupriavidus necator*). The consensus sequence is presented as a LOGO. The sequence secondary structure predicted from Tsar crystal are shown above the alignment as bars (α -helices) and arrows (β -strands), colored as in B. **B)** Structure prediction of DbdR using the crystal structure of Tsar (c3fzjC) as a model (23). Helices and strands are colored as in A to distinguish the domains and subdomains. DBD, DNA-binding domain, red; RD, regulatory domain composed of two subdomains, RDI (blue) and RDII (yellow); the linker helix is shown in turquoise.

LTTRs are generally either dimers (Bender, 2010; Zhou *et al.*, 2010) or tetramers (Jo *et al.*, 2015; Lerche *et al.*, 2016) in solution, although the majority of them are only active as DNA-bound tetramers (Nguyen Le Minh *et al.*, 2018). However, higher level complexes (octamers) have also been suggested (López-Sánchez *et al.*, 2009; Sainsbury *et al.*, 2009).

To determine the natural conformation of DbdR in solution, a His-tagged protein was overproduced in *E. coli* and purified with nickel affinity chromatography. In SDS-PAGE the 6His-DbdR monomers eluted with a molecular size of approximately 39.1 kD, consistent with the sequence-deduced protein size (36.8 kD). In analytical exclusion chromatography, purified DbdR eluted as a single peak corresponding to 161.8 kD, suggesting that DbdR is a tetramer in solution (Fig. 4.3.7.).

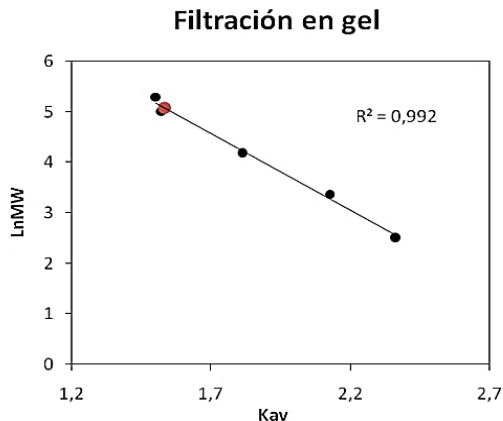


Figure 4.3.7. Gel filtration of DbdR protein (red spot) in an FPLC Superdex 200 HR 10/300GL column. Molecular weight markers were β -amylase (200 kDa), alcohol dehydrogenase (150 kDa), albumin (66 kDa), carbonic anhydrase (29 kDa) and cytochrome c (12.4 kDa). Blue dextran was used to calculate the void volume

4.3.3.5 DbdR binding to its target promoters.

Initial electrophoresis mobility shift assays (EMSA) of DNA fragments of the three promoters with His-tagged DbdR protein evidenced protein aggregation in the electrophoresis wells, impeding penetration of the DNA fragment in the gel (not shown). The LTTRs are known to be poorly soluble, which hinders their purification and long-term storage (Monferrer *et al.*, 2010). To avoid the purification step that concentrated the proteins beyond manageable values, we performed EMSA using purified extracts of an *E. coli* strain overproducing DbdR protein as previously described for poorly soluble regulators (Domínguez-Cuevas *et al.*, 2008). To that end, wild-type DbdR protein was expressed from a P_{lac} promoter in pBBdbdR in *E. coli* MC4100 and extracts of the cultures were obtained and passed through a heparin column to remove most unrelated DNA-binding proteins, which were eluted after applying 1 M NaCl (Fig. 4.3.8).

Bound and unbound fractions were tested with EMSA for their ability to bind DNA fragments containing either of the three promoter regions spanning from more than 120 bp upstream from the transcription start site to more than 34 bp downstream (Table 3.3.2). Only the heparin-unbound fraction (labeled as “purified fraction”) was able to form a specific and stable DNA-protein complex, which appeared as a clearly shifted band in all cases (Fig. 6.9. A, B and C). The presence of an excess of unlabelled competitor DNA could titrate DbdR from its target DNA fragment (Fig. 4.3.9.A, lane 8; B, lane 7; C, lane 9). To rule out the possibility of the extracts containing unrelated DNA-binding proteins capable of binding to these promoters, labelled promoter DNA fragments were incubated with increasing concentrations of similarly processed extracts from MC4100 cells carrying and empty pBBRMCS5 plasmid (control extracts). These extracts lacking DbdR were

incapable of producing DNA retardation with either promoter in EMSA (Fig. 4.3.9.A, lane10; B, lane 8 and D). In all cases, the DbdR containing extracts only generated a single DNA-protein complex, consistent with DbdR being a tetramer in solution and binding its target promoter as such. Because DbdR is activated by the pathway intermediate HHQ, we repeated the assays in the presence and absence of this effector, although the anoxic conditions during incubation and electrophoresis could not be fully maintained. The presence of 1 mM HHQ in the binding assays resulted in loss of retardation. However, this effect was not specific and the addition of HHQ to unrelated binding assays with different regulators also resulted in loss of interaction (data not shown), which we attributed to a toxic effect of HHQ on protein structure.

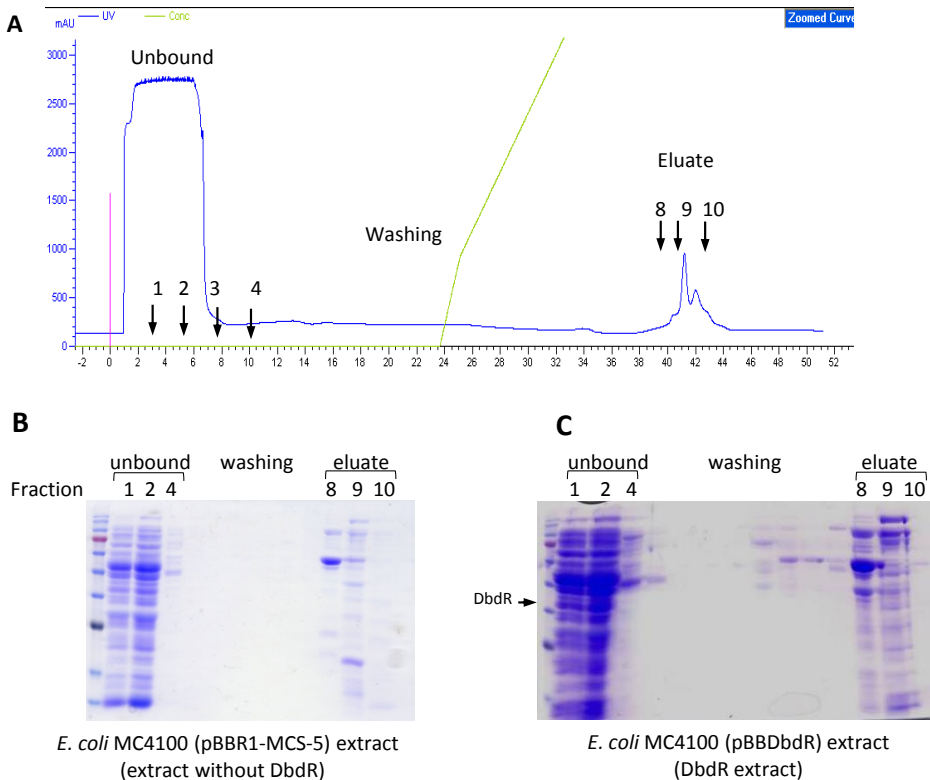


Figure 4.3.8. A) Typical elution profile in a heparine affinity column of *E. coli* MC4100 extracts bearing or not the *dbdR* gene cloned in plasmid pBBRMCS-5. Elution conditions are described in the methods section. The collected fractions from the extract without DbdR (B, *E. coli* MC4100 (pBBRMCS-5)) or with DbdR (C, *E. coli* MC4100 (pBBDbdR)) were analyzed in SDS-PAGE. Blue star pre-stained protein marker (Nipponogenetics) was used as molecular weight marker. The band corresponding to DbdR is indicated with an arrow

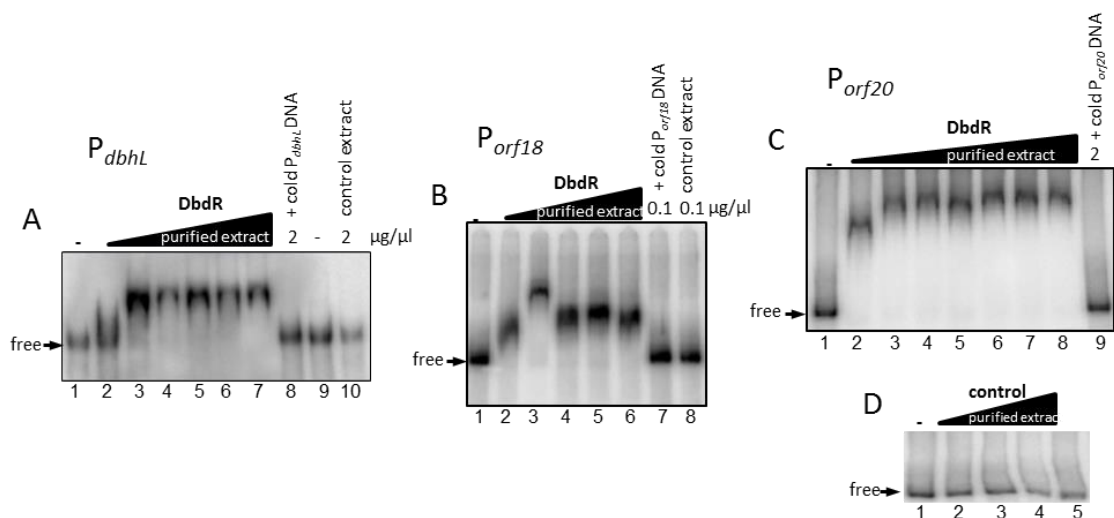


Figure 4.3.9. Binding of DbdR to P_{dbhL} (A), P_{orf18} (B) and P_{orf20} (C) promoter DNA. EMSA of ^{32}P -labeled promoter DNA fragments with purified extracts containing DbdR protein were performed as described in Materials and Methods with either no protein added (lane 1) or increasing amounts of DbdR-enriched extract (purified extract): A) 0.8, 1, 1.2, 1.6, 1.8 and 2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$; B) 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 and 0.8 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ (lanes 2 to 6); C) 0.5, 0.8, 1, 1.2, 1.6, 1.8 and 2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ (lanes 2-8) of DbdR-enriched extract. An excess of specific unlabeled promoter DNA fragment, lane 8 (A); lane 7 (B); lane 9 (C) was added to a reaction mixture that also contained the maximum amount of crude extract. A purified control extract lacking DbdR was used as control at the indicated protein concentration (A, lane 2; B, lane 8; D, lanes 2-5, protein range 0.8, 1.2 and 2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$).

4.3.3.6. DbdR positively controls its own expression.

In general, LTTRs also control their own expression through interaction with the promoter of their genes, in most cases located divergently from the pathway promoter they activate (Maddocks & Oyston, 2008). In contrast, in *T. aromatica* AR-1 DbdR is transcribed downstream and in the same direction as the operon controlled by P_{orf20} (Fig. 4.3.1.). We previously showed that *dbdR* was transcribed as a separate mRNA molecule that included the downstream-located *gorA* gene, and independently of the operon controlled by P_{orf20} (Molina-Fuentes *et al.*, 2015), which suggested the presence of a promoter directly upstream of the gene. We used primer extension assays to identify the promoter driving expression of DbdR. Total RNA of *T. aromatica* AR-1 cells growing on either glutarate or 3,5-DHB was isolated and analyzed with labelled oligonucleotides complementary to *dbdR*. A single extension band was observed that was more intense when cells were grown on 3,5-DHB (Fig. 4.3.10.A). The band size positioned the transcription start site 36 bp upstream from the translational start site of *dbdR*, and defined the RNAP binding site, which differed significantly from the consensus (Fig. 6.10D). Furthermore, the

only putative DbdR binding site showing the conserved T-N₁₁-A sequence was detected centered at -88 bp from the transcription start site, which is unusually distant. It is worth noting that the intergenic region between *dbdR* coding sequence and the preceding gene (*bqdS*) is 90 bp long, and only 53 bp separate *dbdR* transcription start site and *bqdS* stop codon (Fig. 4.3.10D).

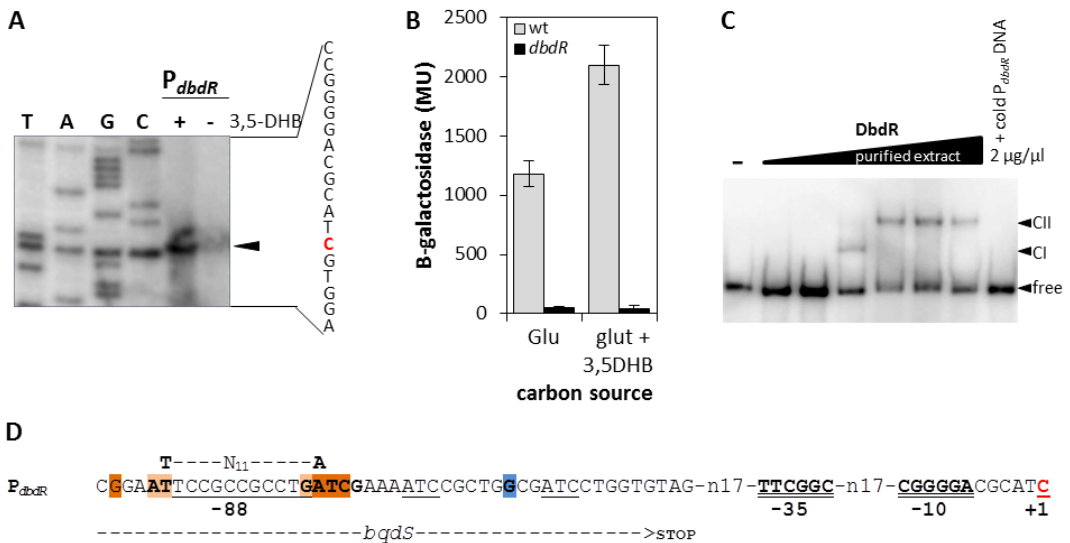


Figure 4.3.10. Characterization of P_{dbdR} promoter. **A)** Mapping of the transcription initiation site of P_{dbdR} as determined in primer extension of total RNA of *T. aromatica* AR-1 cells growing on glutarate (-) or 3,5-DHB (+) with a primer complementary to *dbdR* gene. A sequencing reaction of the region with the same primer was run in parallel. **B)** Expression of P_{dbdR} in wild-type and *dbdR* mutant backgrounds determined as β -galactosidase activity in 72 h cultures of wild-type *T. aromatica* AR-1 (grey bars) and its *dbdR* mutant (black bars) bearing the corresponding promoter-*lacZ* fusion in pMP220, growing on glutarate or glutarate plus 3,5-DHB. **C)** Binding of DbdR to P_{dbdR} promoter DNA: EMSA of 32 P-labeled promoter DNA fragment with increasing concentrations of purified extracts containing DbdR (0.025, 0.045, 0.075, 0.1, 0.8 and 1.2 μ g/ μ l, lanes 2-7); -, no extract added (lane 1); lane 8, addition of specific unlabeled promoter DNA fragment to a reaction mixture that also contained the maximum amount of crude extract. A similar assay with control extracts lacking DbdR gave no retardation band (not shown). **D)** P_{dbdR} promoter sequence showing the putative RNA polymerase binding (-10/-35) and DbdR binding sequences. Bases conserved in the DbdR binding motifs of the remaining promoters are shown with the same colour code as in Fig. 2. The position of the bases relative to the transcription start site (+1, red) is indicated below the sequence. The region spanning the end of *bqdS* gene is indicated.

Thus, the DbdR binding site overlaps the *bqdS* sequence, which may explain the atypical location and sequence of the binding sites (Fig. 4.3.10D). Furthermore, a stem-loop structure could be predicted 9 bp downstream the *bqdS* stop codon that may constitute a transcription terminator (not shown). A transcriptional fusion of

P_{dbdR} to *lacZ* in pMP220 was assayed in *T. aromatica* AR-1 wild type strain and in a *dbdR* mutant both in the presence and absence of substrate. Figure 7B shows that the promoter had high basal activity in the absence of substrate (approximately 1200 MU), which increased almost twofold in the presence of 3,5-DHB.

Both the basal and induced activities were strictly dependent on DbdR. Thus, unlike most LTTRs, DbdR is required to activate its own synthesis, which is further stimulated in the presence of an effector. Binding of DbdR to its own promoter was confirmed in EMSA of a DNA fragment covering 312 bp upstream from the *dbdR* translation start site, with purified DbdR extracts prepared as above (Fig. 6.10.C). Interestingly, two retardation complexes were observed in this promoter, which we had never observed for the enzymatic operon promoters analyzed above at any protein concentration (Fig. 4.3.9).

4.3.4. Discussion

The anaerobic degradation pathway for 3,5-DHB in *T. aromatica* AR-1 involves oxidative rather than reductive steps as initial reactions for aromatic activation and metabolism, which depend on at least 20 genes organized in a 25 kb gene cluster. Efficient expression of the pathway requires the presence of the substrate in the medium and an intact copy of the regulatory gene *dbdR*, previously described as essential for anaerobic growth on the aromatic and for expression of some genes in the pathway (Molina-Fuentes *et al.*, 2015). DbdR belongs to the LTTR family of regulators, which are generally transcribed divergently from the promoter they control. Actually all LTTRs were initially believed to repress their own expression through binding at the same site required for activation of the divergent promoter (thus originally called the repressor binding site, RBS), which was especially true for many LTTRs regulating the aerobic degradation of aromatics (BenM, CatM, NahR, TfdR, among others) (Tropel & van der Meer, 2004). This is not the case for DbdR, which is transcribed downstream and independently of one of the operons under its control (Molina-Fuentes *et al.*, 2015). In fact, the current view of LTTRs describes a more diverse organization of the genes than initially thought. In an increasing number of LTTR-controlled regulatory networks the regulator is not divergently transcribed from its target promoter, occasionally it can simultaneously control several target promoters, and in some cases it also activates its own synthesis (Bender, 2010; Reen *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2015; Breddermann & Schnetz, 2017; Nguyen Le Minh *et al.*, 2018). We have shown that DbdR is capable of directly activating at least three promoters in the pathway which drive transcription of the enzymes essential for the initial reaction steps. The structure of the three promoters is conserved, with a clear LTTR box (RBS) centered approximately at position -65 and bearing the consensus

GNGNTN₃CN₂AN₄ATC (underlined bases make up the palindromic TN₁₁A LTTR consensus). A putative ABS is found 11 bp downstream the RBS (9 bp downstream in the case of P_{orf18}) and overlapping the -35 RNA polymerase binding site, bearing the consensus AGATTN₃TN₂CN₂GGNG that shows no obvious palindromic structure, as is the case for many ABS sites in LTTR controlled promoters (Porrúa *et al.*, 2007; Maddocks & Oyston, 2008). The functional organization of these sites is unknown, but its conservation in the three promoters is a clear indication of a pivotal role in promoter activation. The sequence homology is especially remarkable between P_{dbhL} and P_{orf20}, which control transcription of the enzymes for initial 3,5-DHB activation and the ensuing HHQ dearomatization, and for the cleavage of the non-aromatic product HBQ, respectively (Fig. 4.3.1.). Despite the strong conservation between them (60% and 94% identity in the RBS and ABS sites, respectively, Fig. 4.3.2.D), their transcription pattern is different. P_{dbhL} shows high basal DbdR-dependent expression levels, which are further increased in the presence of the substrate (Fig. 4.3.4.A), whilst P_{orf20} is completely inactive in the absence of substrate and becomes fully active when 3,5-DHB is present in the medium (Fig. 4.3.4.C). Minute changes in the promoter sequence at positions within the regulatory elements have been shown to drastically influence promoter responsiveness to its LTTR by altering affinity of the regulator for its promoter (Kovacikova & Skorupski, 2002; MacLean *et al.*, 2008). Although highly similar, the RBS and ABS sites of P_{dbhL} and P_{orf20} are not identical and the few base pair differences between them may explain the lack of activation of P_{orf20} by DbdR in the absence of an effector. For instance, P_{dbhL} shows an A track within the RBS which is absent in P_{orf20} (Fig. 4.3.2.D). A survey of LTTR-dependent promoters for the presence of A tracks in the binding sites shows that a not insignificant portion of them presents A tracks within the ABS, and some of them show additional A or T tracks in the RBS, which were suggested to help interaction of the regulator with their binding site(s) (Porrúa *et al.*, 2013).

Using a genetic approach we have shown that the pathway substrate 3,5-DHB must be metabolized to activate transcription from the three promoters. Our current knowledge of the pathway does not allow us to discern whether the accumulated intermediates in the *btgL*,*gorA* double mutant responsible for DbdR activation is 2,3,5-trihydroxybenzoate or HHQ. However, the conservation of the residues in the binding cavities with those of TsaR, CatM and BenM, which respond to effectors bearing an acidic side chain, suggests that the unstable intermediate 2,3,5-trihydroxybenzoate could be the effector of DbdR. This would explain the absence of interaction of DbdR with HHQ in ITC assays. Regardless of the specific effector activating DbdR, this implies that in order for the pathway to become fully induced, the enzymatic machinery for the initial transformation of 3,5-DHB must already be

available in the cell before uptake of the substrate. Our results suggest that the regulatory circuit is in fact designed to allow basal levels of 3,5-DHB hydroxylase (*dbhLS* gene) to be permanently present in the cell to transform the incoming substrate into an effector molecule. If the effector were actually HHQ, its fast production after exposure to 3,5-DHB would also be guaranteed. The transformation of the 2,3,5-trihydroxybenzoate produced by DbhLS into HHQ was shown to depend *in vitro* on an unknown protein factor present in the cytoplasmic fraction of *Thauera aromatica* AR-1 cell extracts (Gallus & Schink, 1998; Schink *et al.*, 2000). The gene putatively responsible for this activity has not yet been identified, although *orf18*, which shows homology to a molibdopterine oxidoreductase, would be a good candidate (Molina-Fuentes *et al.*, 2015). Thus, both *dbhLS* and *orf18*, shown to be significantly expressed even in the absence of substrate (Fig. 4.3.4), would guarantee the transformation of 3,5-DHB into HHQ to activate the expression of the third pathway enzyme HBQ dehydrogenase (*bqdLMS*) from P_{orf20} , essential for complete substrate degradation and anaerobic growth on this carbon source. We have previously shown that *Thauera aromatica* AR-1 growth on 3,5-DHB was significantly impaired in a mutant in the TRAP transport system encoded by *dbtPQM*, suggesting that this substrate needed to be transported into the cell by a dedicated machinery (Molina-Fuentes *et al.*, 2015). We have located a promoter upstream from *dbtP* that showed high constitutive expression levels (Pacheco-Sánchez, unpublished), which would, if present, guarantee permanent substrate uptake into the cell (Fig. 4.3.1.B).

LTTR proteins are known to be highly insoluble and difficult to obtain as concentrated protein solutions (Stec *et al.*, 2004), essentially due the poor solubility of their DNA binding domain (Ezezika *et al.*, 2007). Our attempts to perform EMSA analysis with purified DbdR proved unsuccessful because aggregates that did not enter the gel were observed with the different promoter DNAs. The use of DbdR enriched fractions obtained from DbdR over-producing *E. coli* extracts in our EMSA analysis circumvented the solubility problem. Using this approach, specific DbdR binding to the three promoter sequences was observed. Unfortunately, this method did not allow estimation of promoter affinity since the actual DbdR concentration in the different extracts was not known. Based on our gel filtration data and on TsaR structure, the DbdR closest relative crystalized so far, we predict that DbdR native configuration is a tetramer, probably resulting from the association of two homodimers, which would be bound in an antiparallel configuration through their linker helix (Monferrer *et al.*, 2010; Momany & Neidle, 2012). In the EMSA of the three promoters, a single retardation band was always

observed, suggesting that DbdR is actually binding these promoters directly as a tetramer (Fig. 4.3.9.).

Unlike most LTTR, and especially unlike those transcribed divergently from their activated gene, DbdR was shown to activate transcription from its own promoter, and to increase transcription twofold in the presence of the substrate (Fig. 4.3.10.A and B). It is worth noting that *dbdR* is co-transcribed with *gorA* gene, coding for a quinone oxidoreductase required for efficient HHQ processing during 3,5-DHB degradation (Molina-Fuentes *et al.*, 2015). Interestingly, EMSA of P_{dbdR} promoter with DbdR extracts showed the consecutive formation of two protein-DNA complexes, consistent with sequential binding of DbdR as dimers and further oligomerization to tetramers. Although gel filtration assays of purified DbdR protein indicated a tetrameric structure in solution, it is plausible that at the working protein concentrations in the purified extracts used in the EMSA, DbdR dimers and tetramers would coexist. The nitrogen assimilation control protein Nac of *Klebsiella pneumoniae* can activate transcription either as dimer or as tetramer, depending on the target promoter (Bender, 2010). In solution, the protein is a tetramer that dissociates into dimers when the protein concentration decreases to a certain threshold (Rosario & Bender, 2005). Interestingly, the activity of this LTTR is not controlled by an effector, but is rather dependent on its concentration in the cell, which is regulated by NtrC. The P_{dbdR} sequence shows no homology with the three promoters controlling the enzymatic genes, which probably results from the unusual location of the promoter overlapping the 3' end of the upstream transcribed *bqds* gene, and thus must adapt the sequence of the binding sites to the enzyme coding sequence (Fig. 4.3.10.D). A putative RBS could be identified around position -88, more than 20 bp further apart from the transcription start site than in the typical LTTR-dependent promoters. Furthermore, no clear ABS could be predicted in the sequence. It is conceivable that at P_{dbdR} , the different positioning of the binding sites would imply a different DbdR promoter activation mechanism with a different protein rearrangement for activation, as described for other LTTR targeting several promoters with different operator organization (Bender, 2010; Momany & Neidle, 2012; Nguyen Le Minh *et al.*, 2018). This can be seen as the regulator conformation and activation mechanism not only controlled by the presence/absence of its effector but also modulated by the specific operator sequence present at each promoter.

Overall, the results presented in this study show that a single LTTR coordinately controls expression of the entire 3,5-DHB anaerobic degradation pathway in *Thauera aromatica* AR-1. The regulator was essential for transcription of all the operons coding for the different enzymatic steps down to ring cleavage, as

well as for transcription of its own gene. The regulatory network allowed basal expression of the enzymatic machinery required for the metabolism of the substrate to produce the effector molecule, which once synthesized induced synthesis of the remaining pathway steps and initiated a positive feedback, increasing expression from all the target promoters to allow maximum growth. This included a twofold induction of its own promoter, which is not only important to maintain the regulator levels, but also to synthesize the co-transcribed *qorA* gene, required to efficiently remove HHQ, which above a certain threshold becomes toxic to the cell.

5 Discusión General

5. Discusión general

Las rutas de degradación anaerobia de resorcinol y 3,5-DHB analizadas en esta tesis son hasta el momento las dos únicas rutas que implican una vía diferente de degradación anaerobia de compuesto hidroxilados por bacterias reductoras de nitrato. El paso principal en ambas rutas es el ataque a los sustratos dihidroxilados utilizando una estrategia oxidativa en ausencia de oxígeno, totalmente diferente de la ruta clásica en organismos anaerobios que utilizan una estrategia reductiva para el ataque del anillo aromático (Philipp & Schink, 1998, 2000). Dado el alto coste energético que supone para la célula este tipo de rutas complejas, cabe esperar que sólo se expresen cuando el sustrato está presente en el medio. Por lo tanto mantener su expresión bajo control adquiere una gran importancia. La regulación de un proceso metabólico puede ejercerse a diferentes niveles de control: transcripcional, traduccional y post-traduccional. En este trabajo nos hemos centrado en el estudio de la regulación a nivel transcripcional, que es el mecanismo más común, o al menos el más estudiado por ser el primer nivel de regulación de la expresión de las rutas catabólicas de compuestos aromáticos (Díaz and Prieto, 2000; Tropel and van der Meer, 2004; Cases and de Lorenzo, 2005; Carmona *et al.*, 2009).

Al inicio de este trabajo se conocían las bases bioquímicas de la degradación de resorcinol y 3,5-DHB en *A. anaerobius* y *T. aromatica* AR-1, respectivamente, habiéndose identificado las agrupaciones de genes responsables de las mismas (Darley *et al.*, 2007; Molina-Fuentes *et al.*, 2015). Comparando la expresión de la rutas en ausencia y presencia de sustrato mediante RT-PCR pudimos definir la organización de los genes en operones, estableciendo en ambos casos la existencia de un total de 5 operones, a diferencia de la predicción inicial en *A. anaerobius* de la existencia de sólo 3 operones (Darley *et al.*, 2007). Pese a contener un gran número de genes homólogos, la organización de cada agrupación génica en los dos organismos es diferente. Curiosamente, todos los genes menos uno en *T. aromatica* AR-1 se transcriben en la misma dirección (Fig. 4.3.1), mientras que en el caso de *A. anaerobius* la distribución es tal que varios operones se transcriben de forma divergente (Fig. 4.1.1). Por otra parte, los genes de la ruta están mejor organizados en operones de acuerdo a su función en *A. anaerobius*, mientras que en *T. aromatica* AR-1 los genes están distribuidos de forma más desordenada, lo que parece indicar que los distintos genes se han reclutado más recientemente. Además en la agrupación génica de *T. aromatica* AR-1 existe un operón que codifica un sistema de transporte de tipo TRAP (Tripartite ATP-indepent periplasmic transporter) compuesto por los genes *dbtPQM* (Fig 4.3.1). Mediante extensión a partir de cebador hemos detectado la presencia de un promotor corriente arriba de *dbtP* que presenta una actividad constitutiva. Esto se confirma en ensayos de β -

galactosidasa de dicho promotor fusionado al gen reportero *lacZ*, donde observamos una actividad basal alta y dependiente de DbdR (Pacheco-Sánchez, sin publicar). Esto garantizaría la presencia del sustrato en la célula siempre que las células se expongan a él. En el caso de *A. anaerobius* sólo se ha identificado el gen para una subunidad de un transportador de tipo ABC junto al gen de una transposasa en un extremo de la agrupación, que no es necesario para el crecimiento de la cepa en resorcinol (Darley *et al.*, 2007). Por tanto, la presencia de este sistema TRAP en *T. aromatica* AR-1 podría ser una mejora adquirida por la cepa dada la presencia de un grupo carboxilo en su sustrato, que probablemente requiera de un mecanismo de transporte específico. Finalmente, en ambas rutas se observan operones que son inducibles por sustrato además de presentar ciertos niveles basales de expresión. En ambas agrupaciones génicas se habían identificado posibles genes reguladores: en el caso de *A. anaerobius* se encontraron los genes *redR1* y *redR2*, con homología con reguladores transcripcionales de la familia de NtrC, también conocidos como proteínas de unión a potenciadores bacterianos (bEBP); en *T. aromatica* AR-1 se encontraron dos reguladores de la familia de reguladores LTTR, de los cuales sólo uno, DbdR, era necesario para la expresión de la ruta (Molina-Fuentes, 2012). En este trabajo hemos estudiado los mecanismos de regulación de ambas rutas.

5.1 *Azoarcus anaerobius*: RedR1 y RedR2 controlan la expresión de los promotores de la ruta de degradación de resorcinol.

La organización transcripcional de los genes de degradación de resorcinol sugería la presencia de promotores regulados positivamente en presencia del sustrato de la ruta corriente arriba de al menos los genes *rehL*, *bqdB*, *orf14* y *orf10*. Es frecuente que los genes de las rutas de degradación estén organizados en diferentes unidades transcripcionales; por ejemplo en *Rhodospseudomonas palustris* todos los genes de degradación anaerobia de benzoato se encuentran organizados en cinco operones (Egland *et al.*, 1997; Breese *et al.*, 1998), aunque en otros casos forman una única unidad transcripcional, como en *Azoarcus* sp. CIB, donde los genes de degradación del benzoato se organizan en un solo operón inducible por sustrato (López Barragán *et al.*, 2004; Rabus *et al.*, 2005).

La estructura de los promotores de los principales pasos de la ruta identificados en este trabajo está bien conservada y presenta los elementos típicos de promotores dependiente de σ^{54} . Hemos podido identificar los elementos de unión de IHF y proponer posibles UASs (Fig. 4.1.3). Hemos demostrado que la actividad de P_{orf14} y de los otros promotores es dependiente de IHF y RpoN (σ^{54}) (Table 4.2.2 y datos no mostrados). La activación de estos promotores está mediada por RedR1 y RedR2, que tienen en su dominio C-terminal el dominio de unión a ADN (HTH)

donde se predicen las diferentes hélices de las estructuras típicas del dominio de unión a ADN de los reguladores bEBP (Vidangos *et al.*, 2014). En RedR1 y RedR2 se definen claramente las hélices B, C y D de los motivos HTH, e identificamos tres posibles residuos de arginina (Fig. 4.1.11) que podrían participar en la unión al ADN en las UASs propuestas, que presentan un alto porcentaje de guaninas (TCGCA-N₃-TGCGA-N₆-TGCGA) (Vidangos *et al.*, 2014). Datos preliminares obtenidos en nuestro laboratorio de la actividad de la versión activa del regulador RedR1 (Δ RedR1) con los promotores de la ruta en *E. coli* sugieren que alguna de las UASs tiene mayor importancia que otras (datos no mostrados). Esto es habitual en los promotores regulados por bEBPs, aunque en algún caso, como el de NorR, la unión del hexámero ensamblado en el ADN requiere de sus tres UASs (Tucker *et al.*, 2010; Bush *et al.*, 2015). Además, Δ RedR1 sólo fue activo sobre los promotores P_{orf14} y P_{bqdl}.

En los últimos años, y especialmente gracias al análisis de un gran número de estructuras de cristales de proteínas de la familia, se ha aclarado considerablemente el mecanismo de activación de las bEBPs hasta la activación de la polimerasa dependiente σ^{54} unida al promotor (Bush & Dixon, 2012; Vidangos *et al.*, 2013; Bush *et al.*, 2015). Para la mayoría de reguladores de la familia el proceso se puede resumir así: en ausencia de señal, las proteínas se unen a dos de sus UASs como dos dímeros. Una vez percibida la señal, esta origina un cambio conformacional en las proteínas que conduce al ensamblaje de tres dímeros en un hexámero. Este es un requisito imprescindible para que la proteína sea capaz de actividad ATPasa. En la mayoría de las EBPs, la oligomerización es además suficiente para la actividad ATPasa y para la interacción del regulador con σ^{54} unido a la RNA polimerasa, dando lugar a la remodelación del complejo cerrado a complejo abierto e inicio de la transcripción (Bush & Dixon, 2012). La actividad de la mayoría de bEBPs está reprimida por el dominio NTD, que impide que los dímeros de la proteína formen hexámeros espontáneamente, lo que se ha venido en llamar regulación negativa, como ocurre con NtrC1, DctD o XylR (Fernández *et al.*, 1995; Park *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2003). La oligomerización sólo ocurre cuando las bEBPs son activadas, bien por la unión de un efector, por la fosforilación del extremo NTD, o por cualquier otro mecanismo a nivel del NTD, que produce el cambio conformacional necesario para permitir el ensamblaje a hexámero (Batchelor *et al.*, 2008). Estos reguladores se vuelven constitutivamente activos, es decir capaces de ensamblarse en hexámeros y tener actividad ATPasa, cuando se deleciona su dominio NTD (Pérez-Martin & de Lorenzo, 1996). El análisis de las formas truncadas carentes de NTD de RedR1 y RedR2 puso de manifiesto que sólo RedR1 estaba regulada negativamente por su NTD (Tabla 4.2.1), ya que Δ RedR1 podía activar la

transcripción desde P_{orf14} (y también desde P_{bqdL} , datos no mostrados) en *E. coli* sin necesidad de efector. Por otra parte, los resultados tanto de ensayos de doble-híbrido como de unión en columna demostraron que RedR2, pero no RedR1, era capaz de interactuar con la proteína BtdS, y que esta unión ocurría a través de su extremo NTD (Fig. 4.2.5 y 4.2.6). BtdS es una proteína integral de membrana (Fig. 4.2.4) que guarda homología con la proteína DoxD, que es la subunidad transportadora de electrones de una tiosulfato:quinona oxidoreductasa implicada en la oxidación de azufre en arqueas (Purschke *et al.*, 1997). Por tanto, proponemos que esta proteína secuestra a RedR2 en ausencia de efector, lo que explicaría la ausencia de actividad en células creciendo con glutarato como única fuente de carbono (Fig. 4.1.8). En presencia de resorcinol, que se oxida a HHQ mediante la actividad de RehLS, y posteriormente a HBQ por la actividad de BtdLS, la reducción de BtdS en este proceso liberaría a RedR2. Hemos determinado que esta proteína, una vez liberada, es capaz de activar hasta ciertos niveles a P_{orf14} en ausencia de otra señal salvo la presencia de sus UASs (Tabla 4.2.2), además de a los otros dos promotores (datos no mostrados). Por tanto RedR2 se puede considerar una bEBP con actividad constitutiva, que sería siempre activa si está disponible. Los datos de actividad sobre los distintos promotores en un mutante en *redR1*, donde la actividad sólo dependería de RedR2 ensamblada en homohexámeros, sugieren que las UASs de los distintos promotores son diferentes en su eficiencia para estabilizar el homo-hexámero de RedR2 y promover la transcripción (Fig. 4.1.3 y Fig. 4.1.8)

En el capítulo 4.1 establecimos que ambos reguladores son necesarios para conseguir la máxima actividad de los tres promotores estudiados. Esto podría explicarse bien por la suma de la activación de los promotores alternativamente por cada una de los reguladores, o bien por una activación mediada por un complejo proteico activo formado por ambos reguladores. Hay que especificar que la expresión de los tres promotores en ausencia de uno de los reguladores presentaba en todos los casos el mismo punto de inicio de la transcripción (Molina-Fuentes, 2012). Sin embargo, ensayos de actividad de los promotores en su fondo carente de RedR2 muestran que RedR1 por sí sola (como proteína entera) no es capaz de activar la transcripción (Fig 4.1.8) La existencia de bEBPs que pueden formar heterodímeros ha sido descrita anteriormente. Por ejemplo forman complejos heterooligoméricos HrpR y HrpS de *Pseudomonas syringe* para la activación de factores de virulencia (Jovanovic *et al.*, 2011), y los reguladores FleQ y FleT que controlan la síntesis flagelar en *Rhodobacter sphaeroides* (Poggio *et al.*, 2005). Mediante ensayos de doble híbrido demostramos la existencia de interacciones entre las proteínas RedR1 y RedR2, que se confirmaron mediante ensayos de unión

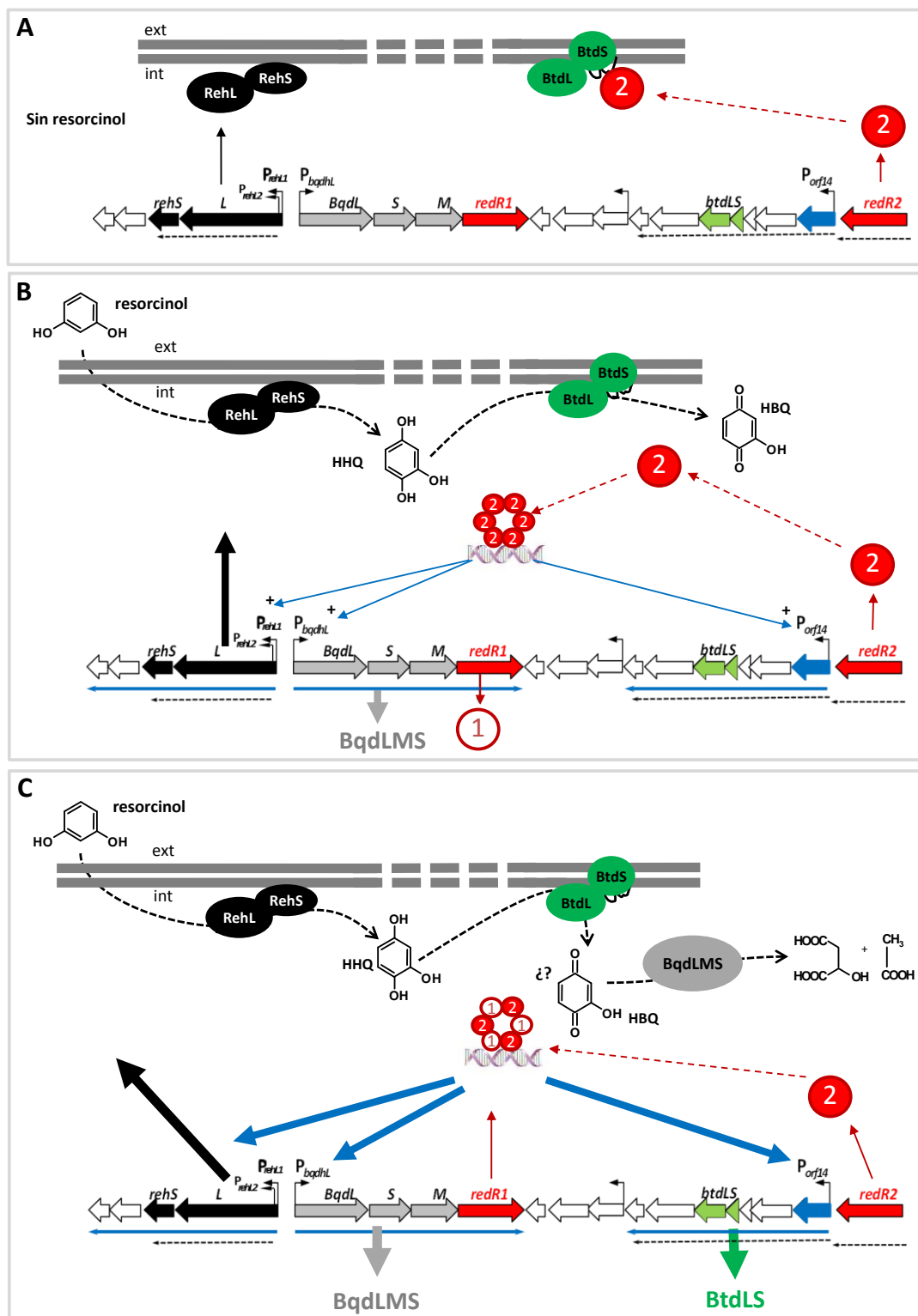
en columna (Fig. 4.2.2), y que se establecen a través del domino central (Fig.4.1.10). Esto confirmaría la formación de heterohexámeros, que son probablemente la forma de mayor actividad de estos reguladores (ver más adelante). Estos mismos ensayos demostraron que las dos proteínas en solución no pueden formar homodímeros (Fig. 4.1.10).

Esto contrasta con la capacidad de las dos formas activas, Δ RedR1 y RedR2 completa, de activar la transcripción de P_{orf14} por sí mismas (Tabla 4.2.1), lo que implica que estas formas sí son capaces de ensamblarse en homohexámeros pese a no auto-interaccionar en ensayos de doble híbrido (Fig 4.1.10). Esto podría ser debido a que la interacción sea muy débil, no pudiendo ser detectada en ensayos de doble híbrido, siendo más fuerte (y por tanto detectable en estos ensayos) la formación del heteroxámero. Sin embargo, nuestros datos y la información disponible sobre el modo de acción de las bEBPs apuntan más a que probablemente sea la unión al ADN en sus UASs, que ocurre en los ensayos de transcripción pero no ocurre en los ensayos de doble híbrido, sea un factor esencial para la estabilización de los homodímeros y su posterior ensamblaje en hexámeros sobre el ADN. Esto sugiere que es el extremo CTD quien impide la homodimerización en solución de las formas homo-activas de los dos reguladores y su ensamblaje a hexámero. La unión del CTD a sus UASs provocaría el cambio conformacional necesario para estabilizar la unión y facilitar la oligomerización.

En el huésped natural en condiciones silvestres ambos reguladores son necesarios para conseguir niveles máximos de activación de los promotores. Los reguladores RedR1 y RedR2 están codificado en diferentes operones: el gen *redR1* se encuentra en el operón II, y su síntesis es dependiente de RedR2 a través del promotor P_{bqdl} ; el gen *redR2* constituye el operon V y tiene expresión constitutiva, lo que permite que RedR2 esté siempre presente en la célula (Fig. 4.1.2). Los datos obtenidos en esta tesis nos permiten proponer un modelo de activación de la ruta, en el que existiría un efecto cascada mediado por RedR2, que regularía la expresión de RedR1 en función de la necesidad de activación de los promotores de la ruta en presencia de sustrato (Fig 4.2.1). En ausencia de sustrato (en células creciendo en glutarato), habría una producción basal de RedR2 y de RehLS (primer paso de la ruta) desde sus promotores constitutivos P_{redR2} y P_{rehL2} , y de BtdLS (segundo paso de la ruta y regulador negativo de RedR2). Aunque no tenemos evidencias experimentales de expresión basal de estos genes, el hecho de que no haya actividad de los promotores en ausencia de efector apunta a que debe de haber niveles suficientes de BtdS para inactivar la proteína RedR2 producida constitutivamente. En estas condiciones, la proteína RedR2 producida estaría secuestrada en la

membrana por BtdS, manteniéndose por tanto inactiva (Fig 5.1A). En esta situación no se sintetizaría la proteína RedR1, ya que en un mutante en *redR2* no hay actividad de P_{bqdl} que controla la expresión de RedR1 (Fig. 4.1.8). Al llegar el sustrato, sería transformado a HHQ por la actividad de RehLS, y posteriormente a HBQ por actividad de BtdLS. Proponemos que la transferencia de electrones que ocurre en BtdS como consecuencia de su actividad enzimática liberaría a RedR2, quedando disponible para activar la transcripción desde sus promotores diana. Esta proteína por sí sola es activa y capaz de formar homohexámeros sobre sus secuencias diana. En esta nueva situación, se inducirían niveles intermedios de todas las enzimas de la ruta (Fig.5.1B). Hemos visto que el efecto de una mutación en *redR1*, donde sólo estaría RedR2 activo, afecta en distinta medida a los tres promotores, siendo mucho más drástico en P_{orf14} . Esto indicaría que podría haber pequeñas diferencias en el modo de reconocimiento de cada promotor específico. Sería necesario un análisis más profundo de las UAS propuestas en cada promotor dentro del sistema de *Azoarcus* sp. CIB con pR^+ y las versiones mutantes de los reguladores, para determinar si las secuencias necesarias son diferentes cuando el regulador está formando un homohexámero que cuando los dos forman un heterohéxamero. La inducción de los tres promotores de la ruta por RedR2 daría lugar a la síntesis de RedR1 en el citoplasma. Nuestros resultados de doble híbrido y unión a columna dejan claro que las dos proteínas completas en solución presentan mayor afinidad la una por la otra que consigo mismas, por lo que la formación de heterodímeros se vería favorecida (Fig. 5.1C). La presencia del efector, probablemente por interacción con RedR1, favorecería el ensamblaje a heterohexámero, que sería la forma activa más eficiente de los reguladores. Este sería un mecanismo de control de los elementos importantes de la ruta, de forma que sólo serían activados cuando son necesarios en abundancia a través de un mecanismo en cascada.

Figura 5.1 (página siguiente): **Modelo de regulación en la degradación de resorcinol en *A. anaerobius*.** Los principales genes de los operones implicados se representan en distintos colores: operón I (negro) codifica al complejo resorcinol hidroxilasa; operón II (gris) con los genes del complejo HBQ deshidrogenasa y RedR1 (rojo); operón III con los genes del complejo HHQ deshidrogenasa (verde) y el regulador RedR2 (rojo). Las flechas negras discontinuas representan los niveles basales de expresión y las flechas azules continuas los niveles inducibles representadas en dos tipos de grosor según el nivel de actividad. **A)** En ausencia de resorcinol los niveles basales de los dos primeros pasos de la ruta están presentes junto con RedR2, unido a BtdS por su extremo N-terminal. **B)** En presencia de resorcinol se produce su transformación hasta HBQ, la liberación de RedR2 para formar homodímeros y posteriormente homohexámeros sobre el ADN, que activan la expresión de los promotores de la ruta en un nivel intermedio. **C)** Posteriormente la síntesis de RedR1 da lugar a la formación del heterohexámeros que activan los promotores con su nivel máximo.



Este modelo explicaría la mayoría de los resultados obtenidos en esta tesis. Sin embargo, aún quedan varias controversias por esclarecer. La primera de ellas es cómo dos proteínas con una identidad de secuencia tan alta presentan mecanismos tan diferentes de regulación. Dado que las diferencias entre las dos proteínas se localizan en los extremos NTD y CTD, pensamos que ahí radican los determinantes de los diferentes comportamientos de los dos reguladores. Uno de los elementos que diferencia a ambos reguladores está en su extremo N-terminal: los 8 primeros residuos de RedR2 y 6 primeros de RedR1 preceden la secuencia idéntica entre ambos (Fig.4.1.6). Sólo uno de esos residuos coincide entre las dos proteínas. En el dominio C-terminal donde está el dominio HTH, las diferencias se concentran en la hélice C. Los resultados obtenidos con los ensayos de doble híbrido parecen indicar que la unión de RedR2 con BtdS se realiza por la cola N-terminal (Fig. 4.2.6), siendo esta diferencia la que marca cuál de los reguladores está secuestrado. Se podría especular que RedR1 sea una nueva versión evolucionada de RedR2, sin la señal de unión a BtdS e inactivo por sí solo, siendo esta una manera de asegurar el efecto cascada mencionado anteriormente. Por otra parte, las diferencias en el dominio HTH podrían explicar la diferencia en los mecanismos de activación, ya que en las proteínas con control positivo es el dominio HTH el que favorece el estado de dímero a la espera de la señal para formar el homohexámero y ser activa (De Carlo *et al.*, 2006; Vidangos *et al.*, 2013). En la hélice de unión al ADN (hélice D) los dos reguladores son muy parecidos, y las diferencias se concentran en la hélice C (de posicionamiento), y en la cola C-terminal. No está muy clara la existencia de una hélice A en estas proteínas, que generalmente estabiliza la formación de dímeros, pero en cualquier caso sería idéntica en los dos reguladores. Por otra parte, podemos especular sobre los motivos que impiden la formación de homodímeros basándonos en los mecanismos conocidos de funcionamiento de las bEBPs. La formación de dímeros ocurre de distinta manera y con distintas consecuencias en los reguladores de control positivo y de control negativo. En estos últimos, la dimerización se produce a través del dominio NTD, que adquiere así una orientación “cara a cara” que impide la formación de hexámeros. Es necesaria la señal activadora en el NTD para que este se reoriente y permita la oligomerización (Volkman *et al.*, 2001). En el caso de los reguladores de control positivo, los NTD no interactúan y las estructuras que estabilizan los dímeros están en el CTD, especialmente en la región que conecta el dominio central con el HTH (Sallai & Tucker, 2005; Vidangos *et al.*, 2014). En RedR1, parece claro que el impedimento para la formación de homodímeros está en el NTD, ya que su delección produce una proteína activa (Tabla 4.2.1). Sin embargo la dimerización en este caso requiere de la unión del regulador truncado a sus UASs. En el caso de RedR2, sugerimos que la dimerización sí es posible, pero también requiere que la

proteína esté unida a sus UASs. Esto implica por tanto una transmisión de señal entre los dominios NTD y CTD al unirse al ADN. Las diferencias en estos dominios entre las dos proteínas explicarían la diferencia de comportamiento entre ellas.

La tercera cuestión controvertida en el proceso es cuál es la señal que activa a las dos proteínas y cómo se produce. Desde un punto de vista global, hemos demostrado que el sustrato tiene que ser metabolizado hasta HBQ para activar la transcripción. Sin embargo en nuestros ensayos de ITC no obtuvimos ninguna señal con los compuestos que pudimos ensayar (hay que recordar que algunos de los intermediarios de la ruta no están disponibles comercialmente), por lo que esto no se pudo confirmar *in vitro*. Dado que el efector es un intermediario de la ruta, la presencia inicial de las enzimas para los primeros pasos de la ruta es necesaria para la transformación del sustrato en efector. En las bEBPs, la señal se percibe por el dominio NTD. En nuestro caso hemos identificado dominios GAF y PAS en tándem en el NTD, que son los candidatos para recibir la señal del efector. Las dos proteínas se pudieron modelar a partir del dominio NTD de DhaR (Shi *et al.*, 2014), que no parece tener capacidad para el reconocimiento de efector debido a las cadenas laterales hidrofóbicas muy voluminosas de su dominio PAS que impiden disponer de espacio para el ligando. En esta proteína la regulación está mediada por interacción con otras proteínas a través del dominio GAF. Este sería igualmente el caso de RedR2, que no reconoce efector pero interacciona con BtdS. Cómo percibe la señal BtdS para liberar a RedR2 es ahora mismo una incógnita, pero debe de estar relacionada con la transferencia de electrones en la proteína al oxidar la HHQ a HBQ, o podría ser la propia benzoquinona la señal. Otros reguladores de la familia, como NifA, parecen regularse por un mecanismo redox mediado por la proteína NifL, que unida a membrana reconocen la señal ambiental a través de su dominio PAS (Grabbe & Schmitz, 2003; Little *et al.*, 2012). Otro ejemplo de regulación mediada por una proteína de membrana es PspF, que carece de dominio NTD y se controla por interacción con la proteína asociada a membrana PspA (Joly *et al.*, 2010). En cuanto a RedR1, sabemos que como proteína entera sólo es funcional cuando forma heterodímeros con RedR2, y que estos se pueden formar en ausencia de efector si nos atenemos a los resultados de doble híbrido y de unión en columna (Fig. 4.10 y 5.2). Sin embargo en un mutante *btdS* la actividad de P_{orf14} en ausencia de sustrato, que sólo depende de RedR2, es igual a la actividad en presencia de sustrato (indicando que RedR2 una vez liberada de BtdS no se activa por efector). Más aún, esta actividad es la mitad de la actividad en la cepa silvestre (con RedR1 y RedR2) en presencia de efector. Esto sugiere que el efector es probablemente necesario para la oligomerización del heterodímero a heterohexámero, o para su unión al DNA, y su acción se ejercería sobre RedR1. De nuevo no podemos

determinar si el efector directo que actúa sobre RedR1 es la HBQ o es un cambio en el estado redox de la proteína la señal. En este sentido hay que señalar que los dominios PAS se caracterizan a menudo por acomodar cofactores, generalmente de tipo redox, y especialmente flavín-adenín-dinucleótido (FAD) (Upadhyay *et al.*, 2016). En nuestro modelado de las proteínas RedR, el programa utilizado (Phyre 2) predecía por homología con otras proteínas con dominio PAS la posible presencia de bien un grupo hemo, y con menor probabilidad de un grupo FAD. Sin embargo, como hemos discutido anteriormente, no parece que la cavidad del dominio PAS en este caso permita el acomodo de un grupo prostético (Shi *et al.*, 2014). Por otra parte, el primer gen en el operón controlado por P_{orf14} es ORF14, una proteína esencial para el crecimiento en resorcinol que presenta homología con NADH-flavín oxidorreductasas. El hecho de que presente niveles de expresión basal y que se transcriba en el mismo operón que el complejo enzimático BtdLS que interviene en la transformación de HHQ a HBQ podrían indicar un papel en la transmisión de señal. Finalmente, un aspecto que no hemos afrontado en esta tesis es el mecanismo por el cual RedR2 y BtdS vuelven a su estado inicial de RedR2 secuestrado en la membrana una vez consumido el sustrato. Este mecanismo queda por esclarecer.

5.2 *Thauera aromatica* AR-1: identificación de DbdR como regulador transcripcional específico.

En la agrupación génica para la degradación de 3,5-DHB en *T. aromatica* AR-1 se identificó un operón que codifica un regulador transcripcional, que llamamos DbdR. El operón incluía el gen *gorA* que codifica una enzima que participa en el segundo paso de la ruta. Mediante análisis de mutantes se identificó a DbdR como el regulador de la ruta, y mediante análisis de RT-PCR se demostró que controlaba la expresión de los principales promotores de la ruta (Molina-Fuentes *et al.*, 2015), lo que se confirmó posteriormente con fusiones transcripcionales (Fig. 6.4).

DbdR pertenece a la familia de reguladores LTTR (Maddocks & Oyston, 2008). Estos generalmente se transcriben de forma divergente al promotor que controlan, siendo esto lo que sucede en muchos LTTRs que regulan la degradación aerobia de compuestos aromáticos (BenM, CatM, NahR, TfdR, etc.) (Tropel and van der Meer, 2004). Aunque inicialmente se consideraba que sólo actuaban sobre un promotor diana, actualmente se sabe que presentan tipos muy diversos de organización. DbdR se transcribe aguas abajo y de forma independiente de uno de los operones a los que controla. Además tiene la capacidad de activar varios promotores de la ruta de forma simultánea, como se ha descrito para otros

reguladores de la familia (Bender, 2010; Reen *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2015; Breddermann and Schnetz, 2017; Nguyen Le Minh *et al.*, 2018). Se trata pues de un regulador de la familia con ciertas diferencias respecto a las características comunes.

Mediante experimentos de extensión a partir de cebador se determinó el punto de inicio de la transcripción de los principales promotores de la ruta (P_{dbhL} , P_{orf18} y P_{orf20}). La estructura de estos tres promotores se conserva, con una localización clara del sitio RBS (sitio de unión regulatorio) centrada en una posición -65 pb con respecto al inicio de la transcripción. Entre el RBS y el sitio de inicio de la transcripción, solapando parcialmente con el sitio de unión de la ARN polimerasa, se encuentra el sitio de unión de activación (ABS) (Fig. 4.3.2.) definido en la mayoría de los promotores dependientes de LTTR (Lerche *et al.*, 2016), aunque en este caso sin una secuencia palindrómica como se ha definido en muchos de los sitios ABS en promotores dependiente de LTTR (Porrua 2007; Maddocks & Oyston, 2008). Utilizando fusiones transcripcionales de P_{dbhL} , P_{orf18} y P_{orf20} al gen *lacZ* se determinó que su actividad era inducible por sustrato, como es común en las rutas de degradación de compuestos aromáticos, aunque en este caso existían niveles considerables de actividad basal en los promotores P_{dbhL} , y P_{orf18} , que era también dependiente de DbdR (Fig. 4.3.4.). A pesar de la similitud en la estructura de los promotores, parecen existir mecanismos de activación diferenciados para cada uno de ellos: por ejemplo, P_{orf20} sólo presenta actividad en presencia de sustrato y carece de actividad basal (Fig 4.3.4.C), mientras P_{dbhL} , con una altísima identidad con P_{orf20} en las secuencias reguladoras, especialmente en las cajas -10/-35 y sitio ABS, presenta actividad basal alta. Por tanto, como se ha observado en otros promotores de la familia donde pequeños cambios afectan a la actividad promotora, las pequeñas diferencias en los elementos reguladores descritos podrían ser relevantes para la activación mediada por DdbR (Kovacikova and Skorupski, 2002; MacLean *et al.*, 2008).

5.2.1 Identificación del efector de la ruta.

Los datos obtenidos mediante filtración en gel de DbdR muestran que es un tetrámero en solución, como sucede con gran parte de los reguladores de tipo LysR. Se ha descrito que pueden existir en forma dimérica o incluso octamérica (Bender, 2010; Lerche *et al.*, 2016; Sainsbury *et al.*, 2009), aunque la mayoría de ellos sólo son activos como tetrámeros unidos al ADN. Mediante ensayos de ITC para identificar el efector de la ruta, no pudimos establecer unión con ninguno de los candidatos disponibles, ya que en alguno de los candidatos probables, como el 2,3,5-THB y la HBQ, dos de los intermediarios de la ruta, no están disponibles

comercialmente. Por lo tanto utilizamos una aproximación genética, partiendo de mutantes en los distintos pasos de la ruta para identificar el compuesto efector. Esto nos permitiría establecer condiciones de acumulación de los compuestos intermedios en cada paso de la ruta. De esta forma, ensayando la actividad de los diferentes promotores en los distintos fondos genéticos, pudimos determinar que es necesario metabolizar el 3,5-DHB para la activación de los promotores (Fig.4.3.5) y que el efector era un intermediario de la ruta, probablemente el 2,3,5-THB o la HHQ. Actualmente nos es imposible distinguir mediante una aproximación genética entre estos dos compuestos, ya que el gen responsable de la descarboxilación del 2,3,5-THB a HHQ no ha sido identificado. Sin embargo, otras proteínas con homología con DbdR, como los reguladores TsaR, CatM y BenM presentan los residuos Ser98 y Pro99 (según la numeración en TsaR) en su cavidad de reconocimiento del efector (IBC), para los que se ha propuesto que son los responsables de interaccionar con compuestos con cadena lateral ácida (como un grupo carboxilo). Estos residuos están conservados en DbdR, lo que apunta a que el efector sea el 2,3,5-THB, ya que obviamente la HHQ carece de grupo carboxilo. Con estos datos podemos concluir que los elementos que transforman el 3,5-DHB hasta el compuesto intermedio efector deben estar presentes en la célula. Esto justificaría la necesidad de niveles basales de expresión desde P_{dbhl} , en caso de que el efector fuera la HHQ. En el caso de que el 2,3,5-THB fuera el efector, sería necesaria la acción de una proteína no identificada. El producto del gen *orf18* sería un buen candidato ya que presenta similitud con la proteína molibdopterinoxidorreductasas de la familia MopB (Molina-Fuentes *et al.*, 2015). Al igual que DbhLS, el producto de *orf18* estaría presente en ausencia de sustrato, ya que P_{orf18} también presenta niveles significativos de expresión basal (Fig. 6.4). Por el contrario, el promotor P_{orf20} sólo es activo en presencia del inductor, para llevar a cabo la transformación HBQ, y su presencia para la generación del efector no es necesaria. Esta necesidad de disponer de los primeros elementos de la ruta en todo momento justificaría también la necesidad de disponer de forma constitutiva del sistema de transporte TRAP, que introduce el sustrato en la célula. La inducción de la ruta en respuesta a la presencia de sustrato da lugar a la síntesis de los pasos finales de la degradación, aumentando además la presencia de los complejos enzimáticos ya presentes. Esto, junto a una mayor expresión desde P_{dbdR} que aumentaría la concentración del regulador, generaría un efecto de amplificación. Una vez degradado el 3,5-DHB, el sistema volviera a los niveles basales, preparados para una nueva entrada de sustrato.

5.2.2 Unión específica de DbdR a todos sus promotores diana, regulación positiva.

A pesar de que cada vez son más los reguladores de esta familia que se van descubriendo y caracterizando, aún sigue sin estar bien resuelto su mecanismo de activación de la transcripción, principalmente debido a la falta de estructuras cristalizadas de proteínas completas unidas a su promotor o al efector. Esto es debido a la alta insolubilidad de estos reguladores, que dificulta disponer de suficientes concentraciones de las proteínas para su cristalización (Stec *et al.*, 2004; Monferrer *et al.*, 2010). Para analizar la interacción de DbdR con los promotores de la ruta, realizamos ensayos de retardo en gel con un derivado de esta proteína con una cola de 6-His. En estos ensayos se observó la formación de agregados que no pudieron entrar en el gel, lo que concuerda con la conocida baja solubilidad de estas proteínas (Monferrer *et al.*, 2010). Para evitar este problema, utilizamos extractos crudos de células de *E. coli* donde se había sobreproducido DbdR, tras pasarlos por una columna de heparina para eliminar las proteínas con alta afinidad por el ADN. Con esta aproximación pudimos determinar la interacción de DbdR con los tres promotores principales de la ruta (Fig 4.3.9), aunque sin poder cuantificar la afinidad por cada promotor por no disponer de la concentración real de DbdR en los extractos. En los ensayos con los tres promotores sólo se aprecia una única banda de retardo. De los datos de su estructura nativa en solución, además de la similitud con el regulador TsaR (utilizado para modelar la proteína), deducimos que DbdR se une a los promotores directamente como un tetrámero (Fig. 4.3.9).

El análisis de P_{abdR} nos permitió definir una estructura totalmente diferente a la de los promotores principales de la ruta, que además presentaba altos niveles de expresión basal mediados por DbdR que se duplicaban en presencia de efector (Fig. 4.3.10 A y B). Por tanto DbdR regula positivamente su propia expresión, a diferencia de los descrito para gran parte de los miembros de la familia (Maddocks & Oyston, 2008). También a través de ensayos de retardo en gel con los extractos con DbdR sobreproducido se determinó la interacción de este regulador con su propio promotor. En este caso, a diferencia de los otros tres promotores, aparecían dos complejos proteína-ADN. Esto podría ser debido a una unión inicial en forma de dímero y posteriormente, por el aumento de la concentración de DbdR, a la formación de un tetrámero. Los ensayos de filtración en gel en los que se determinó que el estado nativo de DbdR en solución era un tetrámero se llevaron a cabo con altas concentraciones de una proteína purificada. Sin embargo en los ensayos de retardo en gel partimos de extractos celulares donde la concentración del regulador es probablemente muy inferior, y donde podrían coexistir dímeros y tetrámeros. Por ejemplo, se ha descrito que el regulador Nac de *Klebsiella pneumoniae* puede

activar en estado de dímero o tetrámero, dependiendo del promotor al que active. Nac también es un tetrámero en solución, que se disocia a dímero cuando la concentración de la proteína disminuye, y su mecanismo de activación depende de su concentración en la célula y no de un efector (Bender, 2010). En cualquier caso, el mecanismo de unión de DbdR a su propio promotor y a los tres promotores restantes es diferente, lo que probablemente refleja la gran diferencia en la estructura de este promotor con respecto a los otros tres (Fig.4.3.2), y sugiere que presentan un mecanismo de activación diferente. Esto se ha descrito para reguladores de LTTRs que activan varios promotores (Bender, 2010; Momany & Neidle, 2012; Nguyen Le Minh *et al.*, 2018), donde adquieren diferentes conformaciones no sólo en presencia y ausencia del efector sino moldeados por la secuencia de ADN del promotor específico que activan (Bender, 2010; Momany & Neidle, 2012; Nguyen Le Minh *et al.*, 2018).

6 Conclusiones

6. Conclusiones

El trabajo descrito en esta memoria ha dado lugar a las siguientes conclusiones:

1. Los genes para la degradación de resorcinol de *A. anaerobius*, inducible por sustrato, están organizados en 5 operones, tres de los cuales corresponden a los tres primeros pasos de la ruta. Su expresión está controlada por los reguladores RedR1 y RedR2, pertenecientes a la familia de NtrC de proteínas de unión a potenciadores bacterianos (bEBPs). Ambos reguladores son necesarios para la máxima expresión de los promotores principales de la ruta.
2. Los tres promotores principales de la ruta presentan una estructura conservada típica de promotores dependiente de σ^{54} , donde se predicen las secuencias de unión de σ^{54} , del factor IHF y de las proteínas reguladoras. Los tres promotores tienen comportamientos algo diferentes entre sí, lo que sugiere que cada uno tiene su propio mecanismo específico de regulación.
3. Los reguladores RedR1 y RedR2 interactúan a través del dominio central AAA+ para formar un heterohexámero, que es la configuración óptima para obtener la máxima expresión de los tres promotores principales de la ruta.
4. En ausencia de resorcinol RedR2, que tiene actividad constitutiva, se mantiene secuestrado en la membrana mediante su unión a la proteína integral de membrana BtdS, lo que impide la expresión de los promotores principales de la ruta. La interacción se realiza a través del extremo N-terminal de RedR2. RedR1 no es capaz de unirse a BtdS.
5. Para la activación del regulador RedR2 y su liberación de BtdS, el resorcinol debe de ser metabolizado hasta HBQ. Para garantizar la producción inicial de HBQ necesaria para activar a las proteínas reguladoras, los genes implicados en los dos primeros pasos de la ruta tienen niveles de expresión basal en ausencia de sustrato.
6. La expresión del RedR1 está controlada por RedR2. Nuestro modelo propone que una vez sintetizado desde el promotor P_{bqdl} , RedR1 se activa en presencia del efector HBQ por un cambio en la conformación de su extremo NTD y forma heterohexámeros con RedR2 en solución. Esta sería la configuración activa para la máxima expresión de los promotores de la ruta. En solución esta

unión se ve probablemente favorecida sobre la formación de homo-hexámeros de cualquiera de las dos proteínas.

7. DbdR pertenece a los reguladores transcripcionales de la familia de tipo LysR y es el único regulador específico de la ruta de degradación de 3,5-dihidroxibenzoato en *T. aromatica* AR-1. Se han identificado los principales promotores de la ruta y en ellos se localizan los posibles sitios de unión del regulador, que presentan homología con los de reguladores de la familia.
8. Además de activar a todos los promotores de la ruta, DbdR activa a su propio promotor. Para la activación de DbdR es necesaria la transformación de 3,5-dihixobenzoato hasta HHQ, aunque no podemos descartar que el efector no sea el 2,3,5-trihidroxibenzoato.

7 References

7. References

- Abdou, L., Chou, H.T., Haas, D., and Lu, C.D. (2011) Promoter recognition and activation by the global response regulator CbrB in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **193**:2784-2792.
- 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.
- Abu Laban, N., Selesi, D., Jobelius, C., and Meckenstock, R.U. (2009) Anaerobic benzene degradation by Gram-positive sulfate-reducing bacteria. *FEMS Microbiol Ecol* **68**:300-311.
- Ahn, Y.B., Chae, J.C., Zylstra, G.J., and Haggblom, M.M. (2009) Degradation of phenol via phenylphosphate and carboxylation to 4-hydroxybenzoate by a newly isolated strain of the sulfate-reducing bacterium *Desulfobacterium anilini*. *Appl Environ Microbiol* **75**:4248-4253.
- Alanazi, A.M., Neidle, E.L., and Momany, C. (2013) The DNA-binding domain of BenM reveals the structural basis for the recognition of a T-N11-A sequence motif by LysR-type transcriptional regulators. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **69**:1995-2007.
- Anders, H.-J., Kaetzke, A., Kämpfer, P., Ludwig, W., and Fuchs, G. (1995) Taxonomic Position of Aromatic-Degrading Denitrifying *Pseudomonad* Strains K 172 and KB 740 and Their Description as New Members of the Genera *Thauera*, as *Thauera aromatica* sp. nov., and *Azoarcus*, as *Azoarcus evansii* sp. nov., Respectively, Members of the Beta Subclass of the Proteobacteria. *Int J Syst Evol Microbiol* **45**:327-333.
- Aranda-Olmedo, I., Ramos, J.L., and Marqués, S. (2005) Integration of signals through Crc and PtsN in catabolite repression of *Pseudomonas putida* TOL plasmid pWW0. *Appl Environ Microbiol* **71**:4191-4198.
- Aravind, L., Anantharaman, V., Balaji, S., Babu, M.M., and Iyer, L.M. (2005) The many faces of the helix-turn-helix domain: transcription regulation and beyond. *FEMS Microbiol Rev* **29**:231-262.
- Austin, S., and Dixon, R. (1992) The prokaryotic enhancer binding protein NTRC has an ATPase activity which is phosphorylation and DNA dependent. *EMBO J* **11**:2219-2228.
- Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A., and Struhl, K. (1991) *Current Protocols in Molecular Biology*. New York.: Wiley, .
- Baba, T., Ara, T., Hasegawa, M., Takai, Y., Okumura, Y., Baba, M., Datsenko, K.A., Tomita, M., Wanner, B.L., and Mori, H. (2006) Construction of *Escherichia coli* K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection. *Mol Syst Biol* **2**:2006.0008.
- Bächler, C., Schneider, P., Bähler, P., Lustig, A., and Erni, B. (2005) *Escherichia coli* dihydroxyacetone kinase controls gene expression by binding to transcription factor DhaR. *EMBO J* **24**:283-293.

- Barragán, M.J.L., Blázquez, B., Zamarro, M.T., Mancheno, J.M., García, J.L., Díaz, E., and Carmona, M. (2005) BzdR, a repressor that controls the anaerobic catabolism of benzoate in *Azoarcus* sp. CIB, is the first member of a new subfamily of transcriptional regulators. *J Biol Chem* **280**:10683-10694.
- Barrios, H., Valderrama, B., and Morett, E. (1999) Compilation and analysis of σ^{54} -dependent promoter sequences. *Nucleic Acids Res* **27**:4305-4313.
- Bartolomé-Martín, D., Martínez-García, E., Mascaraque, V., Rubio, J., Perera, J., and Alonso, S. (2004) Characterization of a second functional gene cluster for the catabolism of phenylacetic acid in *Pseudomonas* sp. strain Y2. *Gene* **341**:167-179.
- Batchelor, J.D., Sterling, H.J., Hong, E., Williams, E.R., and Wemmer, D.E. (2009) Receiver domains control the active-state stoichiometry of *Aquifex aeolicus* sigma54 activator NtrC4, as revealed by electrospray ionization mass spectrometry. *J Mol Biol* **393**:634-643.
- Batchelor, J.D., Doucleff, M., Lee, C.J., Matsubara, K., De Carlo, S., Heideker, J., Lamers, M.H., Pelton, J.G., and Wemmer, D.E. (2008) Structure and regulatory mechanism of *Aquifex aeolicus* NtrC4: variability and evolution in bacterial transcriptional regulation. *J Mol Biol* **384**:1058-1075.
- Beller, H.R., Spormann, A.M., Sharma, P.K., Cole, J.R., and Reinhard, M. (1996) Isolation and Characterization of a Novel Toluene-Degrading, Sulfate-Reducing Bacterium. *Appl Environ Microbiol* **62**:1188-1196.
- Bender, R.A. (2010) A NAC for regulating metabolism: the nitrogen assimilation control protein (NAC) from *Klebsiella pneumoniae*. *J Bacteriol* **192**:4801-4811.
- Blatny, J.M., Brautaset, T., Winther-Larsen, H.C., Karunakaran, P., and Valla, S. (1997) Improved broad-host-range RK2 vectors useful for high and low regulated gene expression levels in gram-negative bacteria. *Plasmid* **38**:35-51.
- Blázquez, B., Carmona, M., García, J.L., and Díaz, E. (2008) Identification and analysis of a glutaryl-CoA dehydrogenase-encoding gene and its cognate transcriptional regulator from *Azoarcus* sp. CIB. *Environ Microbiol* **10**:474-482.
- Boll, M., and Fuchs, G. (1995) Benzoyl-coenzyme A reductase (dearomatizing), a key enzyme of anaerobic aromatic metabolism. ATP dependence of the reaction, purification and some properties of the enzyme from *Thauera aromatica* strain K172. *Eur J Biochem* **234**:921-933.
- Boll, M., Fuchs, G., and Heider, J. (2002) Anaerobic oxidation of aromatic compounds and hydrocarbons. *Curr Opin Chem Biol* **6**:604-611.
- Boll, M., Löffler, C., Morris, B.E., and Kung, J.W. (2014) Anaerobic degradation of homocyclic aromatic compounds via arylcarboxyl-coenzyme A esters: organisms, strategies and key enzymes. *Environ Microbiol* **16**:612-627.
- Boyer, H.W., and Roulland-Dussoix, D. (1969) A complementation analysis of the restriction and modification of DNA in *Escherichia coli*. *J Mol Biol* **41**:459-472.
- Breddermann, H., and Schnetz, K. (2017) Activation of leuO by LrhA in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **104**:664-676.

- Breese, K., Boll, M., Alt-Morbe, J., Schagger, H., and Fuchs, G. (1998) Genes coding for the benzoyl-CoA pathway of anaerobic aromatic metabolism in the bacterium *Thauera aromatica*. *Eur J Biochem* **256**:148-154.
- Breinig, S., Schiltz, E., and Fuchs, G. (2000) Genes involved in anaerobic metabolism of phenol in the bacterium *Thauera aromatica*. *J Bacteriol* **182**:5849-5863.
- Brune, A., and Schink, B. (1992) Phloroglucinol pathway in the strictly anaerobic *Pelobacter acidigallici*: fermentation of trihydroxybenzenes to acetate via triacetic acid. *Arch Microbiol* **157**: 417-424.
- Buckel, W., and Thauer, R.K. (2013) Energy conservation via electron bifurcating ferredoxin reduction and proton/Na(+) translocating ferredoxin oxidation. *Biochim Biophys Acta* **1827**:94-113.
- Bundy, B.M., Collier, L.S., Hoover, T.R., and Neidle, E.L. (2002) Synergistic transcriptional activation by one regulatory protein in response to two metabolites. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**:7693-7698.
- Busch, A., Lacal, J., Martos, A., Ramos, J.L., and Krell, T. (2007) Bacterial sensor kinase TodS interacts with agonistic and antagonistic signals. *Proc Natl Acad Sci USA* **104**:13774.
- Bush, M., and Dixon, R. (2012) The role of bacterial enhancer binding proteins as specialized activators of σ^{54} -dependent transcription. *Microbiol Mol Biol Rev* **76**:497-529.
- Bush, M., Ghosh, T., Sawicka, M., Moal, I.H., Bates, P.A., Dixon, R., and Zhang, X. (2015). The structural basis for enhancer-dependent assembly and activation of the AAA⁺ transcriptional activator NorR. *Mol Microbiol* **95**:17-30.
- Büsing, I., Kant, M., Dorries, M., Wöhlbrand, L., and Rabus, R. (2015) The predicted sigma(54)-dependent regulator EtpR is essential for expression of genes for anaerobic p-ethylphenol and p-hydroxyacetophenone degradation in "*Aromatoleum aromaticum*" EbN1. *BMC Microbiol* **15**:251.
- Butler, J., He, Q., Nevin, K., He, Z., Zhou, J., and Lovley, D. (2007) Genomic and microarray analysis of aromatics degradation in *Geobacter metallireducens* and comparison to a *Geobacter* isolate from a contaminated field site. *BMC Genomics* **8**:180.
- Carmona, M., Prieto, M.A., Galán, B., J.I., G., and Díaz, E. (2008) Signalling networks and design of pollutant biosensors. In *Microbial Biodegradation: Genomics and Molecular Biology*. Díaz, E. (ed). Norfolk, UK: Caister Academic Press, pp. 97-143.
- Carmona, M., Zamarro, M.T., Blázquez, B., Durante-Rodríguez, G., Juárez, J.F., Valderrama, J.A., Barragán, M.J., García, J.L., and Díaz, E. (2009) Anaerobic catabolism of aromatic compounds: a genetic and genomic view. *Microbiol Mol Biol Rev* **73**:71-133.
- Casadaban, M.J. (1976) Transposition and fusion of the *lac* genes to selected promoters in *Escherichia coli* using bacteriophage *lambda* and *Mu*. *J Mol Biol* **104**:541-555.

- Cases, I., and de Lorenzo, V. (2005) Genetically modified organisms for the environment: stories of success and failure and what we have learned from them. *Int Microbiol* **8**:213-222.
- Chan, C.S., Chang, L., Winstone, T.M.L., and Turner, R.J. (2010) Comparing system-specific chaperone interactions with their Tat dependent redox enzyme substrates. *FEBS Lett* **584**:4553-4558.
- Chanchal, B.P., and Jain, D. (2017) ATP-Induced Structural Remodeling in the Antiaactivator FleN Enables Formation of the Functional Dimeric Form. *Structure* **25**:243-252.
- Chen, B., Sysoeva, T.A., Chowdhury, S., and Nixon, B.T. (2008) Regulation and action of the bacterial enhancer-binding protein AAA+ domains. *Biochem Soc Trans* **36**:89-93.
- Chen, B., Sysoeva, T.A., Chowdhury, S., Guo, L., De Carlo, S., Hanson, J.A., Yang, H., and Nixon, B.T. (2010) Engagement of Arginine Finger to ATP Triggers Large Conformational Changes in NtrC1 AAA+ ATPase For Remodeling Bacterial RNA Polymerase. *Structure* **18**:1420-1430.
- Chugani, S.A., Parsek, M.R., Hershberger, C.D., Murakami, K., Ishihama, A., and Chakrabarty, A.M. (1997) Activation of the *catBCA* promoter: Probing the interaction of CatR and RNA polymerase through in vitro transcription. *J Bacteriol* **179**:2221-2227.
- Clark, T., Haddad, S., Neidle, E., and Momany, C. (2004) Crystallization of the effector-binding domains of BenM and CatM, LysR-type transcriptional regulators from *Acinetobacter* sp. ADP1. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **60**:105-108.
- Collier, D.N., Hager, P.W., and Phibbs, P.V., Jr. (1996) Catabolite repression control in the *Pseudomonads*. *Res Microbiol* **147**:551-561.
- Commichau, F.M., and Stulke, J. (2008) Trigger enzymes: bifunctional proteins active in metabolism and in controlling gene expression. *Mol Microbiol* **67**:692-702.
- Coschigano, P.W., and Young, L.Y. (1997) Identification and sequence analysis of two regulatory genes involved in anaerobic toluene metabolism by strain T1. *Appl Environ Microbiol* **63**:652-660.
- Coschigano, P.W., and Bishop, B.J. (2004) Role of benzylsuccinate in the induction of the *tutE tutFDGH* gene complex of *T. aromatica* strain T1. *FEMS Microbiol Lett* **231**:261-266.
- Cripps, R.E. (1973) The microbial metabolism of thiophen-2-carboxylate. *Biochem J* **134**:353-366.
- Crosby, H.A., Heiniger, E.K., Harwood, C.S., and Escalante-Semerena, J.C. (2010) Reversible N epsilon-lysine acetylation regulates the activity of acyl-CoA synthetases involved in anaerobic benzoate catabolism in *Rhodospseudomonas palustris*. *Mol Microbiol* **76**:874-888.
- Cserző, M., Wallin, E., Simon, I., von Heijne, G., and Elofsson, A. (1997) Prediction of transmembrane alpha-helices in prokaryotic membrane proteins: the dense alignment surface method. *Protein Eng* **10**:673-676.

- Dagley, S., Rose, A.H., and Wilkinson, J.F. (1971) Catabolism of Aromatic Compounds by Micro-Organisms. In *Adv Microb Physiol*: Academic Press, pp. 1-46.
- Darley, P.I., Hellstern, J.A., Medina-Bellver, J.I., Marqués, S., Schink, B., and Philipp, B. (2007) Heterologous expression and identification of the genes involved in anaerobic degradation of 1,3-dihydroxybenzene (resorcinol) in *Azoarcus anaerobius*. *J Bacteriol* **189**:3824-3833.
- Dasgupta, N., and Ramphal, R. (2001) Interaction of the Antiactivator FleN with the Transcriptional Activator FleQ Regulates Flagellar Number in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **183**:6636-6644.
- Datsenko, K.A., and Wanner, B.L. (2000) One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**:6640-6645.
- D'Autreaux, B., Tucker, N.P., Dixon, R., and Spiro, S. (2005) A non-haem iron centre in the transcription factor NorR senses nitric oxide. *Nature* **437**:769-772.
- De Carlo, S., Chen, B., Hoover, T.R., Kondrashkina, E., Nogales, E., and Nixon, B.T. (2006). The structural basis for regulated assembly and function of the transcriptional activator NtrC. *Genes Dev* **20**:1485-1495.
- 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.
- Denef, V.J., Park, J., Tsoi, T.V., Rouillard, J.M., Zhang, H., Wibbenmeyer, J.A., Verstraete, W., Gulari, E., Hashsham, S.A., and Tiedje, J.M. (2004) Biphenyl and benzoate metabolism in a genomic context: outlining genome-wide metabolic networks in *Burkholderia xenovorans* LB400. *Appl Environ Microbiol* **70**:4961-4970.
- Devesse, L., Smirnova, I., Lonneborg, R., Kapp, U., Brzezinski, P., Leonard, G.A., and Dian, C. (2011) Crystal structures of DntR inducer binding domains in complex with salicylate offer insights into the activation of LysR-type transcriptional regulators. *Mol Microbiol* **81**:354-367.
- Dey, S., Biswas, M., Sen, U., and Dasgupta, J. (2015) Unique ATPase site architecture triggers *cis*-mediated synchronized ATP binding in heptameric AAA+-ATPase domain of flagellar regulatory protein FlrC. *J Biol Chem* **290**:8734-8747.
- Díaz, E. (2004) Bacterial degradation of aromatic pollutants: a paradigm of metabolic versatility. *Int Microbiol*:173-180.
- Díaz, E., and Prieto, M.A. (2000) Bacterial promoters triggering biodegradation of aromatic pollutants. *Curr Opin Biotechnol* **11**:467-475.
- DiDonato, R.J., Jr., Young, N.D., Butler, J.E., Chin, K.J., Hixson, K.K., Mouser, P., Lipton, M.S., DeBoy, R., and Methe, B.A. (2010) Genome sequence of the deltaproteobacterial strain *NaphS2* and analysis of differential gene expression during anaerobic growth on naphthalene. *PLoS One* **5**:e14072.

- Ding, B., Schmeling, S., and Fuchs, G. (2008) Anaerobic metabolism of catechol by the denitrifying bacterium *Thauera aromatica* -a result of promiscuous enzymes and regulators? *J Bacteriol* **190**:1620-1630.
- Dispensa, M., Thomas, C.T., Kim, M.K., Perrotta, J.A., Gibson, J., and Harwood, C.S. (1992) Anaerobic growth of *Rhodopseudomonas palustris* on 4-hydroxybenzoate is dependent on AadR, a member of the cyclic AMP receptor protein family of transcriptional regulators. *J Bacteriol* **174**:5803-5813.
- Dolfing, J., Zeyer, J., Binder-Eicher, P., and Schwarzenbach, R.P. (1990) Isolation and characterization of a bacterium that mineralizes toluene in the absence of molecular oxygen. *Arch Microbiol* **154**:336-341.
- Domínguez-Cuevas, P., Marín, P., Busby, S., Ramos, J.L., and Marqués, S. (2008) Roles of effectors in XylS-dependent transcription activation: intramolecular domain derepression and DNA binding. *J Bacteriol* **190**:3118-3128.
- Doucleff, M., Chen, B., Maris, A.E., Wemmer, D.E., Kondrashkina, E., and Nixon, B.T. (2005) Negative regulation of AAA+ ATPase assembly by two component receiver domains: a transcription activation mechanism that is conserved in mesophilic and extremely hyperthermophilic bacteria. *J Mol Biol* **353**:242-255.
- Dua, M., Singh, A., Sethunathan, N., and Johri, A.K. (2002) Biotechnology and bioremediation: successes and limitations. *Appl Microbiol Biotechnol* **59**:143-152.
- Durante-Rodríguez, G., Mancheno, J.M., Rivas, G., Alfonso, C., García, J.L., Díaz, E., and Carmona, M. (2013) Identification of a missing link in the evolution of an enzyme into a transcriptional regulator. *PLoS One* **8**:e57518.
- Durante-Rodríguez, G., Valderrama, J.A., Mancheno, J.M., Rivas, G., Alfonso, C., Arias-Palomo, E., Llorca, O., García, J.L., Dí-az, E., and Carmona, M. (2010) Biochemical Characterization of the Transcriptional Regulator BzdR from *Azoarcus* sp. CIB. *J Biol Chem* **285**:35694-35705.
- Ebenau-Jehle, C., Boll, M., and Fuchs, G. (2003) 2-oxoglutarate : NADP(+) oxidoreductase in *Azoarcus evansii*: Properties and function in electron transfer reactions in aromatic ring reduction. *J Bacteriol* **185**:6119-6129.
- Egland, P.G., and Harwood, C.S. (1999) BadR, a New MarR Family Member, Regulates Anaerobic Benzoate Degradation by *Rhodopseudomonas palustris* in Concert with AadR, an Fnr Family Member. *J Bacteriol* **181**:2102-2109.
- Egland, P.G., and Harwood, C.S. (2000) HbaR, a 4-Hydroxybenzoate Sensor and FNR-CRP Superfamily Member, Regulates Anaerobic 4-Hydroxybenzoate Degradation by *Rhodopseudomonas palustris*. *J Bacteriol* **182**:100-106.
- Egland, P.G., Pelletier, D.A., Dispensa, M., Gibson, J., and Harwood, C.S. (1997) A cluster of bacterial genes for anaerobic benzene ring biodegradation. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**:6484-6489.
- El Fantroussi, S., and Agathos, S.N. (2005). Is bioaugmentation a feasible strategy for pollutant removal and site remediation? *Curr Opin Microbiol* **8**:268-275.
- Engl, C., Beek, A.T., Bekker, M., de Mattos, J.T., Jovanovic, G., and Buck, M. (2011) Dissipation of proton motive force is not sufficient to induce the phage shock protein response in *Escherichia coli*. *Curr Microbiol* **62**:1374-1385.

- Evans, W.C., and Fuchs, G. (1988) Anaerobic degradation of aromatic compounds. *Annu Rev Microbiol* **42**:289-317.
- Evans, P.J., Mang, D.T., Kim, K.S., and Young, L.Y. (1991) Anaerobic degradation of toluene by a denitrifying bacterium. *Appl Environ Microbiol* **57**:1139-1145.
- Ezezika, O.C., Haddad, S., Neidle, E.L., and Momany, C. (2007) Oligomerization of BenM, a LysR-type transcriptional regulator: structural basis for the aggregation of proteins in this family. *Acta Crystallogr F* **63**:361-368.
- Ezezika, O.C., Haddad, S., Clark, T.J., Neidle, E.L., and Momany, C. (2007) Distinct effector-binding sites enable synergistic transcriptional activation by BenM, a LysR-type regulator. *J Mol Biol* **367**:616-629.
- Fernández, S., de Lorenzo, V., and Pérez-Martín, J. (1995) Activation of the transcriptional regulator XylR of *Pseudomonas putida* by release of repression between functional domains. *Mol Microbiol* **16**:205-213.
- Foght, J. (2008) Anaerobic biodegradation of aromatic hydrocarbons: pathways and prospects. *J Mol Microbiol Biotechnol* **15**:93-120.
- Fries, M.R., Zhou, J., Chee-Sanford, J., and Tiedje, J.M. (1994) Isolation, characterization, and distribution of denitrifying toluene degraders from a variety of habitats. *Appl Environ Microbiol* **60**:2802-2810.
- Fuchs, G. (2008) Anaerobic metabolism of aromatic compounds. *Ann N Y Acad Sci* **1125**:82-99.
- Fuchs, G., Boll, M., and Heider, J. (2011) Microbial degradation of aromatic compounds - from one strategy to four. *Nat Rev Microbiol* **9**:803-816.
- Furste, J.P., Pansegrau, W., Frank, R., Blocker, H., Scholz, P., Bagdasarian, M., and Lanka, E. (1986) Molecular cloning of the plasmid RP4 primase region in a multi-host-range tacP expression vector. *Gene* **48**:119-131.
- Gall, D.L., Ralph, J., Donohue, T.J., and Noguera, D.R. (2013) Benzoyl Coenzyme A Pathway-Mediated Metabolism of meta-Hydroxy-Aromatic Acids in *Rhodopseudomonas palustris*. *J Bacteriol* **195**:4112-4120.
- Gallus, C., and Schink, B. (1998) Anaerobic degradation of α -resorcyate by *Thauera aromatica* strain AR-1 proceeds via oxidation and decarboxylation to hydroxyhydroquinone. *Arch Microbiol* **169**:333-338.
- Gallus, C., Gorny, N., Ludwig, W., and Schink, B. (1997) Anaerobic degradation of α -resorcyate by a nitrate-reducing bacterium, *Thauera aromatica* strain AR-1. *Syst Appl Microbiol* **20**:540-544.
- Gescher, J., Eisenreich, W., Worth, J., Bacher, A., and Fuchs, G. (2005) Aerobic benzoyl-CoA catabolic pathway in *Azoarcus evansii*: studies on the non-oxygenolytic ring cleavage enzyme. *Mol Microbiol* **56**:1586-1600.
- Ghosh, T., Bose, D., and Zhang, X. (2010) Mechanisms for activating bacterial RNA polymerase. *FEMS Microbiol Rev* **34**:611-627.
- Gibson, K.J., and Gibson, J. (1992) Potential early intermediates in anaerobic benzoate degradation by *Rhodopseudomonas palustris*. *Appl Environ Microbiol* **58**:696-698.
- Gibson, D.T., and Parales, R.E. (2000) Aromatic hydrocarbon dioxygenases in environmental biotechnology. *Curr Opin Biotechnol* **11**:236-243.

- Gibson, J.S., and Harwood, C. (2002) Metabolic diversity in aromatic compound utilization by anaerobic microbes. *Annu Rev Microbiol* **56**:345-369.
- Grabbe, R., and Schmitz, R.A. (2003) Oxygen control of *nif* gene expression in *Klebsiella pneumoniae* depends on NifL reduction at the cytoplasmic membrane by electrons derived from the reduced quinone pool. *Eur J Biochem* **270**:1555-1566.
- Grbic-Galic, D., and Vogel, T.M. (1987) Transformation of toluene and benzene by mixed methanogenic cultures. *Appl Environ Microbiol* **53**:254-260.
- Gruber, T.M., and Gross, C.A. (2003) Multiple sigma subunits and the partitioning of bacterial transcription space. *Annu Rev Microbiol* **57**:441-466.
- Harayama, S., Kok, M., and Neidle, E.L. (1992) Functional and Evolutionary Relationships Among Diverse Oxygenases. *Annu Rev Microbiol* **46**:565-601.
- Harwood, C.S., and Parales, R.E. (1996) The α -keto adipate pathway and the biology of self-identity. *Annu Rev Microbiol* **50**:553-590.
- Harwood, C.S., and Gibson, J. (1997) Shedding light on anaerobic benzene ring degradation: a process unique to prokaryotes? *J Bacteriol* **179**:301-309.
- Hayaishi, O. (1994) Tryptophan, Oxygen, and Sleep. *Annu Rev Biochem* **63**:1-25.
- Heider, J. (2007) Adding handles to unhandy substrates: anaerobic hydrocarbon activation mechanisms. *Curr Opin Chem Biol* **11**:188-194.
- Heider, J., and Fuchs, G. (1997) Anaerobic metabolism of aromatic compounds. *Eur J Biochem* **243**:577-596.
- Heider, J., Boll, M., Breese, K., Breinig, S., Ebenau-Jehle, C., Feil, U., Gad'on, N., Laempe, D., Leuthner, B., Mohamed, M.E.-S., Schneider, S., Burchhardt, G., and Fuchs, G. (1998) Differential induction of enzymes involved in anaerobic metabolism of aromatic compounds in the denitrifying bacterium *Thauera aromatica*. *Arch Microbiol* **170**:120-131.
- Hellstern, J. (2005) Anaerobic degradation of resorcinol (1,3-dihydroxybenzene) by *Azoarcus anaerobius*: Biochemical aspects of the degradation pathway and identification of the involved genes In. Konstanz: University of Konstanz, Germany.
- Henikoff, S., Haughn, G.W., Calvo, J.M., and Wallace, J.C. (1988) A large family of bacterial activator proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* **85**:6602-6606.
- Hirakawa, H., Schaefer, A.L., Greenberg, E.P., and Harwood, C.S. (2012) Anaerobic *p*-Coumarate Degradation by *Rhodopseudomonas palustris* and Identification of CouR, a MarR Repressor Protein That Binds *p*-Coumaroyl Coenzyme A. *J Bacteriol* **194**:1960-1967.
- Hirakawa, H., Hirakawa, Y., Greenberg, E.P., and Harwood, C.S. (2015) BadR and BadM Proteins Transcriptionally Regulate Two Operons Needed for Anaerobic Benzoate Degradation by *Rhodopseudomonas palustris*. *Appl Environ Microbiol* **81**:4253-4262.
- Hopkins, B.T., McInerney, M.J., and Warikoo, V. (1995) Evidence for anaerobic syntrophic benzoate degradation threshold and isolation of the syntrophic benzoate degrader. *Appl Environ Microbiol* **61**:526-530.

- Hu, Z., Ma, B., Wolfson, H., and Nussinov, R. (2000) Conservation of polar residues as hot spots at protein interfaces. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* **39**:331-342.
- Hutcheson, S.W., Bretz, J., Sussan, T., Jin, S., and Pak, K. (2001) Enhancer-binding proteins HrpR and HrpS interact to regulate hrp-encoded Type III protein secretion in *Pseudomonas syringae* strains. *J Bacteriol* **183**:5589-5598.
- Ishihama, A. (2000) Functional modulation of *Escherichia coli* RNA polymerase. *Annu Rev Microbiol* **54**:499-518.
- Jo, I., Chung, I.Y., Bae, H.W., Kim, J.S., Song, S., Cho, Y.H., and Ha, N.C. (2015) Structural details of the OxyR peroxide-sensing mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A* **112**:6443-6448.
- Joly, N., Engl, C., Jovanovic, G., Huvet, M., Toni, T., Sheng, X., Stumpf, M.P., and Buck, M. (2010) Managing membrane stress: the phage shock protein (Psp) response, from molecular mechanisms to physiology. *FEMS Microbiol Rev* **34**:797-827.
- Jovanovic, M., James, E.H., Burrows, P.C., Rego, F.G., Buck, M., and Schumacher, J. (2011) Regulation of the co-evolved HrpR and HrpS AAA+ proteins required for *Pseudomonas syringae* pathogenicity. *Nat Commun* **2**:177.
- Juárez, J.F., Zamarro, M.T., Eberlein, C., Boll, M., Carmona, M., and Díaz, E. (2013) Characterization of the *mbd* cluster encoding the anaerobic 3-methylbenzoyl-CoA central pathway. *Environ Microbiol* **15**:148-166.
- Kamimura, N., Takamura, K., Hara, H., Kasai, D., Natsume, R., Senda, T., Katayama, Y., Fukuda, M., and Masai, E. (2010) Regulatory system of the protocatechuate 4,5-cleavage pathway genes essential for lignin downstream catabolism. *J Bacteriol* **192**:3394-3405.
- Kaniga, K., Delor, I., and Cornelis, G.R. (1991) A wide-host-range suicide vector for improving reverse genetics in gram-negative bacteria: inactivation of the *blaA* gene of *Yersinia enterocolitica*. *Gene* **109**:137-141.
- Karimova, G., Ullmann, A., and Ladant, D. (2000) A bacterial two-hybrid system that exploits a cAMP signaling cascade in *Escherichia coli*. *Methods Enzymol* **328**:59-73.
- Karimova, G., Pidoux, J., Ullmann, A., and Ladant, D. (1998) A bacterial two-hybrid system based on a reconstituted signal transduction pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**:5752-5756.
- Kawaguchi, K., Shinoda, Y., Yurimoto, H., Sakai, Y., and Kato, N. (2006) Purification and characterization of benzoate-CoA ligase from *Magnetospirillum* sp. strain TS-6 capable of aerobic and anaerobic degradation of aromatic compounds. *FEMS Microbiol Lett* **257**:208-213.
- Kelley, L.A., and Sternberg, M.J. (2009) Protein structure prediction on the Web: a case study using the Phyre server. *Nat Protoc* **4**:363-371.
- Kelley, L.A., Mezulis, S., Yates, C.M., Wass, M.N., and Sternberg, M.J.E. (2015) The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. *Nature Protocols* **10**:845.

- Kelly, D.J., and Thomas, G.H. (2001) The tripartite ATP-independent periplasmic (TRAP) transporters of bacteria and archaea. *FEMS Microbiol Rev* **25**:405-424.
- Kessler, B., de Lorenzo, V., and Timmis, K.N. (1992) A general system to integrate *lacZ* fusions into the chromosomes of gram-negative eubacteria: regulation of the Pm promoter of the TOL plasmid studied with all controlling elements in monocopy. *Mol Gen Genet* **233**:293-301.
- Koenig, K., and Andreesen, J.R. (1990) Xanthine dehydrogenase and 2-furoyl-coenzyme A dehydrogenase from *Pseudomonas putida* Fu1: two molybdenum-containing dehydrogenases of novel structural composition. *J Bacteriol* **172**:5999-6009.
- Koentjoro, M.P., Adachi, N., Senda, M., Ogawa, N., and Senda, T. (2018) Crystal structure of the DNA-binding domain of the LysR-type transcriptional regulator CbnR in complex with a DNA fragment of the recognition-binding site in the promoter region. *FEBS J*.
- Kovach, M.E., Elzer, P.H., Hill, D.S., Robertson, G.T., Farris, M.A., Roop, R.M., 2nd, and Peterson, K.M. (1995) Four new derivatives of the broad-host-range cloning vector pBBR1MCS, carrying different antibiotic-resistance cassettes. *Gene* **166**:175-176.
- Kovacikova, G., and Skorupski, K. (2002) Binding site requirements of the virulence gene regulator AphB: differential affinities for the *Vibrio cholerae* classical and El Tor *tcpPH* promoters. *Mol Microbiol* **44**:533-547.
- Kretzer, A., Frunzke, K., and Andreesen, J.R. (1993) Catabolism of isonicotinate by *Mycobacterium* sp. INA1: extended description of the pathway and purification of the molybdoenzyme isonicotinate dehydrogenase. *J Gen Microbiol* **139**:2763-2772.
- Krumenacker, L., Costantini, M., Pontal, P., and Sentenac, J. (2000) Hydroquinone, Resorcinol, and Catechol. In *Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology*: John Wiley & Sons, Inc.
- Kube, M., Beck, A., Zinder, S.H., Kuhl, H., Reinhardt, R., and Adrian, L. (2005) Genome sequence of the chlorinated compound-respiring bacterium *Dehalococcoides* species strain CBDB1. *Nat Biotechnol* **23**:1269-1273.
- Kunapuli, U., Lueders, T., and Meckenstock, R.U. (2007). The use of stable isotope probing to identify key iron-reducing microorganisms involved in anaerobic benzene degradation. *ISME J* **1**:643-653.
- Kung, J.W., Baumann, S., von Bergen, M., Muller, M., Hagedoorn, P.L., Hagen, W.R., and Boll, M. (2010) Reversible biological Birch reduction at an extremely low redox potential. *J Am Chem Soc* **132**:9850-9856.
- Kung, J.W., Löffler, C., Dorner, K., Heintz, D., Gallien, S., Van Dorsselaer, A., Friedrich, T., and Boll, M. (2009) Identification and characterization of the tungsten-containing class of benzoyl-coenzyme A reductases. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**:17687-17692.
- Laempe, D., Jahn, M., Breese, K., Schagger, H., and Fuchs, G. (2001) Anaerobic metabolism of 3-hydroxybenzoate by the denitrifying bacterium *Thauera aromatica*. *J Bacteriol* **183**:968-979.

- Lahme, S., Harder, J., and Rabus, R. (2012) Anaerobic degradation of 4-methylbenzoate by a newly isolated denitrifying bacterium, strain pMbN1. *Appl Environ Microbiol* **78**:1606-1610.
- Lahme, S., Trautwein, K., Strijkstra, A., Dorries, M., Wohlbrand, L., and Rabus, R. (2014) Benzoate mediates the simultaneous repression of anaerobic 4-methylbenzoate and succinate utilization in *Magnetospirillum* sp. strain pMbN1. *BMC Microbiol* **14**:269.
- Larimer, F.W., Chain, P., Hauser, L., Lamerdin, J., Malfatti, S., Do, L., Land, M.L., Pelletier, D.A., Beatty, J.T., Lang, A.S., Tabita, F.R., Gibson, J.L. *et al.* (2004) Complete genome sequence of the metabolically versatile photosynthetic bacterium *Rhodospseudomonas palustris*. *Nat Biotechnol* **22**:55-61.
- Lawton, E., Jovanovic, M., Joly, N., Waite, C., Zhang, N., Wang, B., Burrows, P., and Buck, M. (2014) Determination of the self-association residues within a homomeric and a heteromeric AAA+ enhancer binding protein. *J Mol Biol* **426**:1692-1710.
- Lebo, S.E., Gargulak, J.D., and McNally, T.J. (2000) Lignin. In *Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology*: John Wiley & Sons, Inc.
- Ledesma-García, L., Reyes-Ramirez, F., and Santero, E. (2013). The ferredoxin ThnA3 negatively regulates tetralin biodegradation gene expression via ThnY, a ferredoxin reductase that functions as a regulator of the catabolic pathway. *PLoS One* **8**:e73910.
- Ledesma-García, L., Sánchez-Azqueta, A., Medina, M., Reyes-Ramirez, F., and Santero, E. (2016) Redox proteins of hydroxylating bacterial dioxygenases establish a regulatory cascade that prevents gratuitous induction of tetralin biodegradation genes. *Sci Rep* **6**:23848.
- Lee, S.Y., De La Torre, A., Yan, D., Kustu, S., Nixon, B.T., and Wemmer, D.E. (2003) Regulation of the transcriptional activator NtrC1: structural studies of the regulatory and AAA+ ATPase domains. *Genes Dev* **17**:2552-2563.
- Lehnen, D., Blumer, C., Polen, T., Wackwitz, B., Wendisch, V.F., and Unden, G. (2002) LrhA as a new transcriptional key regulator of flagella, motility and chemotaxis genes in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **45**:521-532.
- Lerche, M., Dian, C., Round, A., Lönneborg, R., Brzezinski, P., and Leonard, G.A. (2016). The solution configurations of inactive and activated DntR have implications for the sliding dimer mechanism of LysR transcription factors. *Sci Rep* **6**:19988.
- Leuthner, B., and Heider, J. (1998) A two-component system involved in regulation of anaerobic toluene metabolism in *Thauera aromatica*. *FEMS Microbiol Lett* **166**:35-41.
- Leuthner, B., and Heider, J. (2000) Anaerobic toluene catabolism of *Thauera aromatica*: the bbs operon codes for enzymes of beta oxidation of the intermediate benzylsuccinate. *J Bacteriol* **182**:272-277.
- Little, R., Slavny, P., and Dixon, R. (2012) Influence of PAS domain flanking regions on oligomerisation and redox signalling by NifL. *PLoS One* **7**:e46651.

- Löffler, C., Kuntze, K., Vazquez, J.R., Rugor, A., Kung, J.W., Bottcher, A., and Boll, M. (2011) Occurrence, genes and expression of the W/Se-containing class II benzoyl-coenzyme A reductases in anaerobic bacteria. *Environ Microbiol* **13**:696-709.
- Lonneborg, R., and Brzezinski, P. (2011) Factors that influence the response of the LysR type transcriptional regulators to aromatic compounds. *BMC Biochem* **12**:49.
- López Barragán, M.J., Carmona, M., Zamarro, M.T., Thiele, B., Boll, M., Fuchs, G., García, J.L., and Díaz, E. (2004) The bzd gene cluster, coding for anaerobic benzoate catabolism, in *Azoarcus* sp. strain CIB. *J Bacteriol* **186**:5762-5774.
- López-Sánchez, A., Rivas-Marín, E., Martínez-Pérez, O., Floriano, B., and Santero, E. (2009) Co-ordinated regulation of two divergent promoters through higher-order complex formation by the LysR-type regulator ThnR. *Mol Microbiol* **73**:1086-1100.
- Lovley, D.R. (2003) Cleaning up with genomics: applying molecular biology to bioremediation. *Nat Rev Micro* **1**:35-44.
- Lovley, D.R., and Lonergan, D.J. (1990) Anaerobic Oxidation of Toluene, Phenol, and p-Cresol by the Dissimilatory Iron-Reducing Organism, GS-15. *Appl Environ Microbiol* **56**:1858-1864.
- Lovley, D.R., Giovannoni, S.J., White, D.C., Champine, J.E., Phillips, E.J., Gorby, Y.A., and Goodwin, S. (1993) *Geobacter metallireducens* gen. nov. sp. nov., a microorganism capable of coupling the complete oxidation of organic compounds to the reduction of iron and other metals. *Arch Microbiol* **159**:336-344.
- Luengo, J.M., Garcia, J.I., and Olivera, E.R. (2001) The phenylacetyl-CoA catabolon: a complex catabolic unit with broad biotechnological applications. *Mol Microbiol* **39**:1434-1442.
- Ma, B., Elkayam, T., Wolfson, H., and Nussinov, R. (2003) Protein-protein interactions: structurally conserved residues distinguish between binding sites and exposed protein surfaces. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**:5772-5777.
- MacLean, A.M., Anstey, M.I., and Finan, T.M. (2008) Binding site determinants for the LysR-type transcriptional regulator PcaQ in the legume endosymbiont *Sinorhizobium meliloti*. *J Bacteriol* **190**:1237-1246.
- MacNeil, T., MacNeil, D., and Tyler, B. (1982) Fine-structure deletion map and complementation analysis of the *glnA-glnL-glnG* region in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **150**:1302-1313.
- Maddocks, S.E., and Oyston, P.C. (2008) Structure and function of the LysR-type transcriptional regulator (LTTR) family proteins. *Microbiology* **154**:3609-3623.
- Marqués, S., Aranda-Olmedo, I., and Ramos, J.L. (2006) Controlling bacterial physiology for optimal expression of gene reporter constructs. *Curr Opin Biotechnol* **17**:50-56.
- Martínez, M., Colombo, M.V., Palacios, J.M., Imperial, J., and Ruíz-Argüeso, T. (2008) Novel arrangement of enhancer sequences for NifA-dependent activation

- of the hydrogenase gene promoter in *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*. *J Bacteriol* **190**:3185-3191.
- Martínez-Argudo, I., Little, R., Shearer, N., Johnson, P., and Dixon, R. (2004) The NifL-NifA System: a Multidomain Transcriptional Regulatory Complex That Integrates Environmental Signals. *J Bacteriol* **186**:601-610.
- Martín-Moldes, Z., Zamarro, M.T., del Cerro, C., Valencia, A., Gómez, M.J., Arcas, A., Udaondo, Z., García, J.L., Nogales, J., Carmona, M., and Díaz, E. (2015) Whole-genome analysis of *Azoarcus* sp. strain CIB provides genetic insights to its different lifestyles and predicts novel metabolic features. *Syst Appl Microbiol* **38**:462-471.
- Matsuyama, B.Y., Krasteva, P.V., Baraquet, C., Harwood, C.S., Sondermann, H., and Navarro, M.V. (2016) Mechanistic insights into c-di-GMP-dependent control of the biofilm regulator FleQ from *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **113**:E209-218.
- McLeod, M., and Eltis, L. (2008) Genomic insights into the aerobic pathways for degradation of organic pollutants. In *Microbial biodegradation: genomics and molecular biology*. Díaz, E. (ed). Norfolk, UK: Caister Academic Press, pp. 1-23.
- Meckenstock, R.U., Morasch, B., Griebler, C., and Richnow, H.H. (2004) Stable isotope fractionation analysis as a tool to monitor biodegradation in contaminated aquifers. *J Contam Hydrol* **75**:215-255.
- Messerschmidt, A., Niessen, H., Abt, D., Einsle, O., Schink, B., and Kroneck, P.M.H. (2004) Crystal structure of pyrogallol–phloroglucinol transhydroxylase, an Mo enzyme capable of intermolecular hydroxyl transfer between phenols. *Proc Natl Acad Sci USA* **101**:11571-11576.
- Miller, J. (1972) Experiments in molecular genetics. In. N.Y., USA: Cold Spring Harbor, , pp. 352-355.
- Molina-Fuentes, A. (2012) Degradación anaerobia de compuestos aromáticos hidroxilados en *Azoarcus anaerobius* y *Thauera aromatica* AR-1. In *Environ Prot*. Granada: University of Granada.
- Molina-Fuentes, A., Pacheco, D., Marín, P., Philipp, B., Schink, B., and Marqués, S. (2015) Identification of the gene cluster for the anaerobic degradation of 3,5-dihydroxybenzoate (alpha-resorcyate) in *Thauera aromatica* strain AR-1. *Appl Environ Microbiol* **81**:7201-7214.
- Momany, C., and Neidle, E.L. (2012) Defying stereotypes: the elusive search for a universal model of LysR-type regulation. *Mol Microbiol* **83**:453-456.
- Monferrer, D., Tralau, T., Kertesz, M.A., Dix, I., Sola, M., and Uson, I. (2010) Structural studies on the full-length LysR-type regulator TsaR from *Comamonas testosteroni* T-2 reveal a novel open conformation of the tetrameric LTTR fold. *Mol Microbiol* **75**:1199-1214.
- Moreno, R., and Rojo, F. (2008) The target for the *Pseudomonas putida* Crc global regulator in the benzoate degradation pathway is the BenR transcriptional regulator. *J Bacteriol* **190**:1539-1545.

- Morett, E., and Segovia, L. (1993) The sigma-54 bacterial enhancer-binding protein family: mechanism of action and phylogenetic relationship of their functional domains. *J Bacteriol* **175**:6067-6074.
- Morre, W.E.C. (1966) Techniques for routine culture of fastidious anaerobes *Ins J Syst Bacteriol* **16**:173-190.
- Müller, J.A., and Schink, B. (2000) Initial steps in the fermentation of 3-hydroxybenzoate by *Sporotomaculum hydroxybenzoicum*. *Arch Microbiol* **173**:288-295.
- Müller, F.H., Bandejas, T.M., Urich, T., Teixeira, M., Gomes, C.M., and Kletzin, A. (2004) Coupling of the pathway of sulphur oxidation to dioxygen reduction: characterization of a novel membrane-bound thiosulphate:quinone oxidoreductase. *Mol Microbiol* **53**:1147-1160.
- Muraoka, S., Okumura, R., Ogawa, N., Nonaka, T., Miyashita, K., and Senda, T. (2003) Crystal Structure of a Full-length LysR-type Transcriptional Regulator, CbnR: Unusual Combination of Two Subunit Forms and Molecular Bases for Causing and Changing DNA Bend. *J Mol Biol* **328**:555-566.
- Musat, F., Galushko, A., Jacob, J., Widdel, F., Kube, M., Reinhardt, R., Wilkes, H., Schink, B., and Rabus, R. (2009) Anaerobic degradation of naphthalene and 2-methylnaphthalene by strains of marine sulfate-reducing bacteria. *Environ Microbiol* **11**:209-219.
- Nguyen Le Minh, P., Velázquez Ruíz, C., Vandermeeren, S., Abwoyo, P., Bervoets, I., and Charlier, D. (2018) -Differential protein-DNA contacts for activation and repression by ArgP, a LysR-type (LTTR) transcriptional regulator in *Escherichia coli*. *Microbiol Res* **206**:141-158.
- Ninfa, A.J., and Magasanik, B. (1986) Covalent modification of the *glnG* product, NRI, by the *glnL* product, NRII, regulates the transcription of the *glnALG* operon in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA* **83**:5909-5913.
- Ohtsubo, Y., Goto, H., Nagata, Y., Kudo, T., and Tsuda, M. (2006) Identification of a response regulator gene for catabolite control from a PCB-degrading beta-proteobacteria, *Acidovorax* sp. KKS102. *Mol Microbiol* **60**:1563-1575.
- Omasits, U., Ahrens, C.H., Muller, S., and Wollscheid, B. (2014) Protter: interactive protein feature visualization and integration with experimental proteomic data. *Bioinformatics* **30**:884-886.
- O'Neill, E., Wikstrom, P., and Shingler, V. (2001) An active role for a structured B-linker in effector control of the sigma54-dependent regulator DmpR. *EMBO J* **20**:819-827.
- Pacheco-Sánchez, D., Molina-Fuentes, A., Marín, P., Medina-Bellver, J.I., González-López, O., and Marqués, S. (2017) The *Azoarcus anaerobius* 1,3-dihydroxybenzene (resorcinol) anaerobic degradation pathway Is controlled by the coordinated activity of two enhancer-binding proteins. *Appl Environ Microbiol* **83**:e03042-03016.

- Parales, R.E., Ditty, J.L., and Harwood, C.S. (2000) Toluene-Degrading Bacteria Are Chemotactic towards the Environmental Pollutants Benzene, Toluene, and Trichloroethylene. *Appl Environ Microbiol* **66**: 4098-4104.
- Parales R.E., Resnick S.M. (2006) Aromatic Ring Hydroxylating Dioxygenases. In: Ramos JL., Levesque R.C. (eds) *Pseudomonas*. Springer, Boston, MA
- Pareja, E., Pareja-Tobes, P., Manrique, M., Pareja-Tobes, E., Bonal, J., and Tobes, R. (2006) ExtraTrain: a database of Extragenic regions and Transcriptional information in prokaryotic organisms. *BMC Microbiol* **6**:29.
- Park, S., Meyer, M., Jones, A.D., Yennawar, H.P., Yennawar, N.H., and Nixon, B.T. (2002) Two-component signaling in the AAA+ ATPase DctD: binding Mg^{2+} and BeF^{3-} selects between alternate dimeric states of the receiver domain. *FASEB J* **16**:1964-1966.
- Pedersen, F., and Falck, J. (1997) Environmental Hazard Classification - Classification of selected substances as dangerous for the environment; NORDBAS2 software program. TemaNord. In. Copenhagen, Denmark: Nordic Council of Ministers. , p. pp. 101.
- Peres, C.M., and Harwood, C.S. (2006) BadM is a transcriptional repressor and one of three regulators that control benzoyl coenzyme A reductase gene expression in *Rhodopseudomonas palustris*. *J Bacteriol* **188**:8662-8665.
- Pérez-Martin, J., and de Lorenzo, V. (1996) In vitro activities of an N-terminal truncated form of XylR, a sigma 54-dependent transcriptional activator of *Pseudomonas putida*. *J Mol Biol* **258**:575-587.
- Pérez-Martín, J., Cases, I., and de Lorenzo, V. (1997) Design of a solubilization pathway for recombinant polypeptides in vivo through processing of a bi-protein with a viral protease. *Protein Eng* **10**:725-730.
- Pettersen, E.F., Goddard, T.D., Huang, C.C., Couch, G.S., Greenblatt, D.M., Meng, E.C., and Ferrin, T.E. (2004) UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis. *J Comput Chem* **25**:1605-1612.
- Philipp, B., and Schink, B. (1998) Evidence of two oxidative reaction steps initiating anaerobic degradation of resorcinol (1,3-dihydroxybenzene) by the denitrifying bacterium *Azoarcus anaerobius*. *J Bacteriol* **180**:3644-3649.
- Philipp, B., and Schink, B. (2000) Two distinct pathways for anaerobic degradation of aromatic compounds in the denitrifying bacterium *Thauera aromatica* strain AR-1. *Arch Microbiol* **173**:91-96.
- Philipp, B., and Schink, B. (2012) Different strategies in anaerobic biodegradation of aromatic compounds: nitrate reducers versus strict anaerobes. *Environ Microbiol Rep* **4**:469-478.
- Poggio, S., Osorio, A., Dreyfus, G., and Camarena, L. (2005) The flagellar hierarchy of *Rhodobacter sphaeroides* is controlled by the concerted action of two enhancer-binding proteins. *Mol Microbiol* **58**:969-983.
- Porrúa, O., García-Jaramillo, M., Santero, E., and Govantes, F. (2007) The LysR-type regulator AtzR binding site: DNA sequences involved in activation, repression and cyanuric acid-dependent repositioning. *Mol Microbiol* **66**:410-427.

- Porrúa, O., Platero, A.I., Santero, E., Del Solar, G., and Govantes, F. (2010) Complex interplay between the LysR-type regulator AtzR and its binding site mediates atzDEF activation in response to two distinct signals. *Mol Microbiol* **76**:331-347.
- Porrúa, O., López-Sánchez, A., Platero, A.I., Santero, E., Shingler, V., and Govantes, F. (2013) An A-tract at the AtzR binding site assists DNA binding, inducer-dependent repositioning and transcriptional activation of the *PatzDEF* promoter. *Mol Microbiol* **90**:72-87.
- Porter, S.C., North, A.K., Wedel, A.B., and Kustu, S. (1993) Oligomerization of NTRC at the *glnA* enhancer is required for transcriptional activation. *Genes Dev* **7**:2258-2273.
- Punekar, A.S., Porter, J., Carr, S.B., and Phillips, S.E. (2016) Structural basis for DNA recognition by the transcription regulator MetR. *Acta Crystallogr F Struct Biol Commun* **72**:417-426.
- Purschke, W.G., Schmidt, C.L., Petersen, A., and Schafer, G. (1997) The terminal quinol oxidase of the hyperthermophilic archaeon *Acidianus ambivalens* exhibits a novel subunit structure and gene organization. *J Bacteriol* **179**:1344-1353.
- Qiu, Y.L., Hanada, S., Ohashi, A., Harada, H., Kamagata, Y., and Sekiguchi, Y. (2008) *Syntrophorhabdus aromaticivorans* gen. nov., sp. nov., the first cultured anaerobe capable of degrading phenol to acetate in obligate syntrophic associations with a hydrogenotrophic methanogen. *Appl Environ Microbiol* **74**:2051-2058.
- Rabus, R., and Widdel, F. (1995) Conversion studies with substrate analogues of toluene in a sulfate-reducing bacterium, strain Tol2. *Arch Microbiol* **164**:448-451.
- Rabus, R., Nordhaus, R., Ludwig, W., and Widdel, F. (1993) Complete oxidation of toluene under strictly anoxic conditions by a new sulfate-reducing bacterium. *Appl Environ Microbiol* **59**:1444-1451.
- Rabus, R., Kube, M., Heider, J., Beck, A., Heitmann, K., Widdel, F., and Reinhardt, R. (2005) The genome sequence of an anaerobic aromatic-degrading denitrifying bacterium, strain EbN1. *Arch Microbiol* **183**:27-36.
- Rabus, R., Boll, M., Heider, J., Meckenstock, R.U., Buckel, W., Einsle, O., Ermler, U., Golding, B.T., Gunsalus, R.P., Kroneck, P.M., Kruger, M., Lueders, T. *et al.* (2016) Anaerobic Microbial Degradation of Hydrocarbons: From Enzymatic Reactions to the Environment. *J Mol Microbiol Biotechnol* **26**:5-28.
- Ramos, J.L., Marqués, S., and Timmis, K.N. (1997) Transcriptional control of the *Pseudomonas* TOL plasmid catabolic operons is achieved through an interplay of host factors and plasmid-encoded regulators. *Annu Rev Microbiol* **51**:341-373.
- Rappas, M., Bose, D., and Zhang, X. (2007) Bacterial enhancer-binding proteins: unlocking sigma54-dependent gene transcription. *Curr Opin Struct Biol* **17**:110-116.

- Rawlings, N.D., and Barrett, A.J. (1993) Evolutionary families of peptidases. *Biochem J* **290**:205.
- Ray, S., Gunzburg, M.J., Wilce, M., Panjekar, S., and Anand, R. (2016) Structural Basis of Selective Aromatic Pollutant Sensing by the Effector Binding Domain of MopR, an NtrC Family Transcriptional Regulator. *ACS Chem Biol* **11**:2357-2365.
- Reen, F.J., Haynes, J.M., Mooij, M.J., and O'Gara, F. (2013) A non-Classical LysR-type transcriptional regulator PA2206 is required for an effective oxidative stress response in *Pseudomonas aeruginosa*. *Plos One* **8**:e54479.
- Reichenbecher, W., Philipp, B., Suter, M.J.F., and Schink, B. (2000) Hydroxyhydroquinone reductase, the initial enzyme involved in the degradation of hydroxyhydroquinone (1,2,4-trihydroxybenzene) by *Desulfovibrio inopinatus*. *Arch Microbiol* **173**:206-212.
- Rey, F.E., and Harwood, C.S. (2010) FixK, a global regulator of microaerobic growth, controls photosynthesis in *Rhodospseudomonas palustris*. *Mol Microbiol* **75**:1007-1020.
- Rieger, P.-G., Meier, H.-M., Gerle, M., Vogt, U., Groth, T., and Knackmuss, H.-J. (2002) Xenobiotics in the environment: present and future strategies to obviate the problem of biological persistence. *J Biotechnol* **94**:101-123.
- Rojo, F. (2010) Carbon catabolite repression in *Pseudomonas*: optimizing metabolic versatility and interactions with the environment. *FEMS Microbiol Rev* **34**:658-684.
- Rojo, F., and Alejandro Dinamarca, M. (2004) Catabolite Repression and Physiological Control. In *Virulence and Gene Regulation*. Ramos, J.-L. (ed). Boston, MA: Springer US, pp. 365-387.
- Ronson, C.W., Astwood, P.M., Nixon, B.T., and Ausubel, F.M. (1987) Deduced products of C4-dicarboxylate transport regulatory genes of *Rhizobium leguminosarum* are homologous to nitrogen regulatory gene products. *Nucleic Acids Res* **15**:7921-7934.
- Rosario, C.J., and Bender, R.A. (2005) Importance of Tetramer Formation by the Nitrogen Assimilation Control Protein for Strong Repression of Glutamate Dehydrogenase Formation in *Klebsiella pneumoniae*. *J Bacteriol* **187**:8291-8299.
- Sainsbury, S., Lane, L.A., Ren, J.S., Gilbert, R.J., Saunders, N.J., Robinson, C.V., Stuart, D.I., and Owens, R.J. (2009) The structure of CrgA from *Neisseria meningitidis* reveals a new octameric assembly state for LysR transcriptional regulators. *Nucleic Acids Res* **37**:4545-4558.
- Sallai, L., and Tucker, P.A. (2005) Crystal structure of the central and C-terminal domain of the sigma(54)-activator ZraR. *J Struct Biol* **151**:160-170.
- Salto, R., Delgado, A., Michán, C., Marqués, S., and Ramos, J.L. (1998) Modulation of the function of the signal receptor domain of XylR, a member of a family of prokaryotic enhancer-like positive regulators. *J Bacteriol* **180**:600-604.
- Sambrook, J., and Russell, D. (2001) *Molecular cloning: a laboratory manual*. N.Y.: Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold spring Harbor Laboratory Press.

- Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. (1989) *Molecular cloning: a laboratory manual*. N.Y.: Cold spring Harbor, N.Y., Cold spring Harbor Laboratory.
- Schell, M. (1993) Molecular biology of the LysR family of transcriptional regulators. *Annu Rev Microbiol* **47**:597-626.
- Schell, M.A., and Faris Poser, E. (1989) Demonstration, characterization, and mutational analysis of NahR protein binding to *nah* and *sal* promoters. *J Bacteriol* **171**:837-846.
- Schink, B., Philipp, B., and Müller, J. (2000) Anaerobic Degradation of Phenolic Compounds. *Naturwissenschaften* **87**:12-23.
- Schleinitz, K.M., Schmeling, S., Jehmlich, N., von Bergen, M., Harms, H., Kleinsteuber, S., Vogt, C., and Fuchs, G. (2009) Phenol degradation in the strictly anaerobic iron-reducing bacterium *Geobacter metallireducens* GS-15. *Appl Environ Microbiol* **75**:3912-3919.
- Schocher, R.J., Seyfried, B., Vazquez, F., and Zeyer, J. (1991) Anaerobic degradation of toluene by pure cultures of denitrifying bacteria. *Arch Microbiol* **157**:7-12.
- Schühle, K., Jahn, M., Ghisla, S., and Fuchs, G. (2001) Two Similar Gene Clusters Coding for Enzymes of a New Type of Aerobic 2-Aminobenzoate (Anthranilate) Metabolism in the Bacterium *Azoarcus evansii*. *J Bacteriol* **183**:5268-5278.
- Schühle, K., Gescher, J., Feil, U., Paul, M., Jahn, M., Schagger, H., and Fuchs, G. (2003) Benzoate-Coenzyme A Ligase from *Thauera aromatica*: an Enzyme Acting in Anaerobic and Aerobic Pathways. *J Bacteriol* **185**:4920-4929.
- Schumacher, J., Joly, N., Rappas, M., Zhang, X., and Buck, M. (2006) Structures and organisation of AAA+ enhancer binding proteins in transcriptional activation. *J Struct Biol* **156**:190-199.
- Selesi, D., Jehmlich, N., von Bergen, M., Schmidt, F., Rattei, T., Tischler, P., Lueders, T., and Meckenstock, R.U. (2010) Combined genomic and proteomic approaches identify gene clusters involved in anaerobic 2-methylnaphthalene degradation in the sulfate-reducing enrichment culture N47. *J Bacteriol* **192**:295-306.
- Shi, R., McDonald, L., Cygler, M., and Ekiel, I. (2014) Coiled-coil helix rotation selects repressing or activating state of transcriptional regulator DhaR. *Structure* **22**:478-487.
- Shingler, V. (1996) Signal sensing by sigma 54-dependent regulators: derepression as a control mechanism. *Mol Microbiol* **19**:409-416.
- Shingler, V. (2003) Integrated regulation in response to aromatic compounds: from signal sensing to attractive behaviour. *Environ Microbiol* **5**:1226-1241.
- Shingler, V. (2011) Signal sensory systems that impact σ^{54} -dependent transcription. *FEMS Microbiol Rev* **35**:425-440.
- Shinoda, Y., Sakai, Y., Uenishi, H., Uchihashi, Y., Hiraiishi, A., Yukawa, H., Yurimoto, H., and Kato, N. (2004) Aerobic and anaerobic toluene degradation by a newly isolated denitrifying bacterium, *Thauera* sp. strain DNT-1. *Appl Environ Microbiol* **70**:1385-1392.

- Shinoda, Y., Akagi, J., Uchihashi, Y., Hiraishi, A., Yukawa, H., Yurimoto, H., Sakai, Y., and Kato, N. (2005) Anaerobic degradation of aromatic compounds by *Magnetospirillum* strains: isolation and degradation genes. *Biosci Biotechnol Biochem* **69**:1483-1491.
- Silva-Rocha, R., Tamames, J., dos Santos, V.M., and de Lorenzo, V. (2011) The logicome of environmental bacteria: merging catabolic and regulatory events with Boolean formalisms. *Environ Microbiol* **13**:2389-2402.
- Slavny, P., Little, R., Salinas, P., Clarke, T.A., and Dixon, R. (2010) Quaternary structure changes in a second Per-Arnt-Sim domain mediate intramolecular redox signal relay in the NifL regulatory protein. *Mol Microbiol* **75**:61-75.
- Song, B., Young, L.Y., and Palleroni, N.J. (1998) Identification of denitrifier strain T1 as *Thauera aromatica* and proposal for emendation of the genus *Thauera* definition. *Int J Syst Bacteriol* **48 Pt 3**:889-894.
- Spaank, 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.
- Spormann, A., and Widdel, F. (2000) Metabolism of alkylbenzenes, alkanes, and other hydrocarbons in anaerobic bacteria. *Biodegradation* **11**:85-105.
- Springer, N., Ludwig, W., Philipp, B., and Schink, B. (1998) *Azoarcus anaerobius* sp. nov., a resorcinol-degrading, strictly anaerobic, denitrifying bacterium. *Int J Syst Bacteriol* **48**:953-956.
- Staskawicz, B., Dahlbeck, D., Keen, N., and Napoli, C. (1987) Molecular characterization of cloned avirulence genes from race 0 and race 1 of *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea*. *J Bacteriol* **169**:5789-5794.
- Stec, E., Witkowska, M., Hryniewicz, M.M., Brzozowski, A.M., Wilkinson, A.J., and Bujacz, G.D. (2004) Crystallization and preliminary crystallographic studies of the cofactor-binding domain of the LysR-type transcriptional regulator Cbl from *Escherichia coli*. *Acta Crystallogr D* **60**:1654-1657.
- Stragier, P., Richaud, F., Borne, F., and Patte, J.C. (1983) Regulation of diaminopimelate decarboxylase synthesis in *Escherichia coli*. I. Identification of a *lysR* gene encoding an activator of the *lysA* gene. *J Mol Biol* **168**:307-320.
- Sütfeld, R., F, P., and Nahrstedt, A. (1996) Resorcinol in exudates of *Nuphar lutea*. *J Chem Ecol* **22**:2221-2231.
- Suzuki, D., Li, Z., Cui, X., Zhang, C., and Katayama, A. (2014) Reclassification of *Desulfobacterium anilini* as *Desulfatiglans anilini* comb. nov. within *Desulfatiglans* gen. nov., and description of a 4-chlorophenol-degrading sulfate-reducing bacterium, *Desulfatiglans parachlorophenolica* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* **64**:3081-3086.
- Tover, A., Zernant, J., Chugani, S.A., Chakrabarty, A.M., and Kivisaar, M. (2000) Critical nucleotides in the interaction of CatR with the *pheBA* promoter: conservation of the CatR-mediated regulation mechanisms between the *pheBA* and *catBCA* operons. *Microbiology* **146**:173-183.

- Trautwein, K., Wilkes, H., and Rabus, R. (2012) Proteogenomic evidence for beta-oxidation of plant-derived 3-phenylpropanoids in "*Aromatoleum aromaticum*" EbN1. *Proteomics* **12**:1402-1413.
- Tropel, D., and van der Meer, J.R. (2004) Bacterial Transcriptional Regulators for Degradation Pathways of Aromatic Compounds. *Microbiol Mol Biol Rev* **68**:474-500.
- Tucker, N.P., D'Autreaux, B., Studholme, D.J., Spiro, S., and Dixon, R. (2004) DNA binding activity of the *Escherichia coli* nitric oxide sensor NorR suggests a conserved target sequence in diverse proteobacteria. *J Bacteriol* **186**:6656-6660.
- Tucker, N.P., Ghosh, T., Bush, M., Zhang, X., and Dixon, R. (2010) Essential roles of three enhancer sites in $\sigma(54)$ -dependent transcription by the nitric oxide sensing regulatory protein NorR. *Nucleic Acids Res* **38**:1182-1194.
- Uden, G., Becker, S., Bongaerts, J., Holighaus, G., Schirawski, J., and Six, S. (1995) O₂-sensing and O₂-dependent gene regulation in facultatively anaerobic bacteria. *Arch Microbiol* **164**:81-90.
- Uden, G., Achebach, S., Holighaus, G., Tran, H.G., Wackwitz, B., and Zeuner, Y. (2002) Control of FNR function of *Escherichia coli* by O₂ and reducing conditions. *J Mol Microbiol Biotechnol* **4**:263-268.
- Vadlamani, G., Thomas, M.D., Patel, T.R., Donald, L.J., Reeve, T.M., Stetefeld, J., Standing, K.G., Vocadlo, D.J., and Mark, B.L. (2015) The beta-lactamase gene regulator AmpR is a tetramer that recognizes and binds the D-Ala-D-Ala motif of its repressor UDP-N-acetylmuramic acid (MurNAc)-pentapeptide. *J Biol Chem* **290**:2630-2643.
- Vaillancourt, F.H., Bolin, J.T., and Eltis, L.D. (2006) The ins and outs of ring-cleaving dioxygenases. *Crit Rev Biochem Mol Biol* **41**:241-267.
- Valderrama, J.A., Shingler, V., Carmona, M., and Díaz, E. (2014) AccR is a master regulator involved in carbon catabolite repression of the anaerobic catabolism of aromatic compounds in *Azoarcus* sp. CIB. *J Biol Chem* **289**:1892-1904.
- Valderrama, J.A., Durante-Rodriguez, G., Blazquez, B., Garcia, J.L., Carmona, M., and Diaz, E. (2012) Bacterial degradation of benzoate: cross-regulation between aerobic and anaerobic pathways. *J Biol Chem* **287**:10494-10508.
- Vidangos, N., Maris, A.E., Young, A., Hong, E., Pelton, J.G., Batchelor, J.D., and Wemmer, D.E. (2013) Structure, function, and tethering of DNA-binding domains in sigma(5)(4) transcriptional activators. *Biopolymers* **99**:1082-1096.
- Vidangos, N.K., Heideker, J., Lyubimov, A., Lamers, M., Huo, Y., Pelton, J.G., Ton, J., Gralla, J., Berger, J., and Wemmer, D.E. (2014) DNA recognition by a sigma(54) transcriptional activator from *Aquifex aeolicus*. *J Mol Biol* **426**:3553-3568.
- Volkman, B.F., Lipson, D., Wemmer, D.E., and Kern, D. (2001) Two-state allosteric behavior in a single-domain signaling protein. *Science* **291**:2429-2433.
- Weiner, L., Brissette, J.L., and Model, P. (1991) Stress-induced expression of the *Escherichia coli* phage shock protein operon is dependent on sigma 54 and modulated by positive and negative feedback mechanisms. *Genes Dev* **5**:1912-1923.

- Weiss, D.S., Batut, J., Klose, K.E., Keener, J., and Kustu, S. (1991) The phosphorylated form of the enhancer-binding protein NTRC has an ATPase activity that is essential for activation of transcription. *Cell* **67**:155-167.
- Widdel, F., and Rabus, R. (2001) Anaerobic biodegradation of saturated and aromatic hydrocarbons. *Curr Opin Biotechnol* **12**:259-276.
- Wigneshweraraj, S., Bose, D., Burrows, P.C., Joly, N., Schumacher, J., Rappas, M., Pape, T., Zhang, X., Stockley, P., Severinov, K., and Buck, M. (2008) Modus operandi of the bacterial RNA polymerase containing the σ ₅₄ promoter-specificity factor. *Mol Microbiol* **68**:538-546.
- Wöhlbrand, L., Kallerhoff, B., Lange, D., Hufnagel, P., Thiermann, J., Reinhardt, R., and Rabus, R. (2007) Functional proteomic view of metabolic regulation in “*Aromatoleum aromaticum*” strain EbN1. *Proteomics* **7**:2222-2239.
- Yutin, N., and Galperin, M.Y. (2013) A genomic update on clostridial phylogeny: Gram-negative spore formers and other misplaced clostridia. *Environ Microbiol* **15**:2631-2641.
- Zaar, A., Eisenreich, W., Bacher, A., and Fuchs, G. (2001) A Novel Pathway of Aerobic Benzoate Catabolism in the Bacteria *Azoarcus evansii* and *Bacillus stearothermophilus*. *J Biol Chem* **276**:24997-25004.
- Zhang, C., and Anderson, A.J. (2012) Multiplicity of genes for aromatic ring-hydroxylating dioxygenases in *Mycobacterium* isolate KMS and their regulation. *Biodegradation* **23**:585-596.
- Zhang, W.M., Zhang, J.J., Jiang, X., Chao, H.J., and Zhou, N.Y. (2015) Transcriptional Activation of Multiple Operons Involved in para-Nitrophenol Degradation by *Pseudomonas* sp Strain WBC-3. *Appl Environ Microbiol* **81**:220-230.
- Zhang, D.-C., Busse, H.-J., Wieser, C., Liu, H.-C., Zhou, Y.-G., Schinner, F., and Margesin, R. (2012) *Candidimonas bauzanensis* sp. nov., isolated from soil, and emended description of the genus *Candidimonas* *Int J Syst Evol Microbiol* **62**:2084-2089.
- Zhou, X., Lou, Z., Fu, S., Yang, A., Shen, H., Li, Z., Feng, Y., Bartlam, M., Wang, H., and Rao, Z. (2010) Crystal structure of ArgP from *Mycobacterium tuberculosis* confirms two distinct conformations of full-length LysR transcriptional regulators and reveals its function in DNA binding and transcriptional regulation. *J Mol Biol* **396**:1012-1024.
- Zou, L., Wang, Z., Wang, Y., and Hu, F. (2010) Combined prediction of transmembrane topology and signal peptide of beta-barrel proteins: using a hidden Markov model and genetic algorithms. *Comput Biol Med* **40**:621-628.