

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I



**ESTUDIO DE LA REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN
DE LOS GENES CATABÓLICOS EN
“PSEUDONMONAS” SP Y2**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR**

María Teresa Del Peso Santos

Bajo la dirección del doctor
Julián Perera González

Madrid, 2008

- **ISBN: 978-84-692-1093-2 © María Teresa del Peso Santos, 2008**

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I



**ESTUDIO DE LA REGULACIÓN DE LA
EXPRESIÓN DE LOS GENES CATABÓLICOS
DEL ESTIRENO EN *Pseudomonas* sp. Y2**

TESIS DOCTORAL

M^a TERESA DEL PESO SANTOS

Madrid, 2008

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I



**ESTUDIO DE LA REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN
DE LOS GENES CATABÓLICOS DEL ESTIRENO EN
*Pseudomonas sp. Y2***

**MEMORIA PRESENTADA POR M^a Teresa del Peso Santos
PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR**

Bajo la dirección del Doctor

Julián Perera González

Autor

V^o B^o del Director de la Tesis

M^a Teresa del Peso Santos

Dr. Julián Perera González
Profesor Titular de Universidad
Universidad Complutense de Madrid

Madrid, 2008



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR I

**ESTUDIO DE LA REGULACIÓN DE LA
EXPRESIÓN DE LOS GENES CATABÓLICOS
DEL ESTIRENO EN *Pseudomonas* sp. Y2**

TESIS DOCTORAL

M^a TERESA DEL PESO SANTOS

DIRECTOR:

Dr. JULIÁN PERERA GONZÁLEZ

MADRID, 2008

A mi familia

I. Lista de abreviaturas.	1
II. Introducción.	3
1. Biodegradación de compuestos aromáticos.	3
1.1. Rutas de degradación de compuestos aromáticos.	4
1.1.1. Rutas catabólicas anaerobias.	4
1.1.2. Rutas catabólicas aerobias.	6
1.1.3. Rutas híbridas.	8
1.2 Regulación de las rutas de degradación de compuestos aromáticos.	9
1.2.1. Regulación específica.	10
1.2.2. Regulación global o sobreimpuesta.	12
2. El estireno.	14
2.1. Características generales del estireno.	14
2.2. Metabolismo microbiano del estireno.	16
2.2.1. Metabolismo anaeróbico del estireno.	16
2.2.2. Metabolismo aeróbico del estireno.	17
2.3. Genética de la degradación del estireno.	22
2.3.1. Organización genética de la ruta <i>sty</i> .	22
2.3.2. Organización genética de la ruta <i>paa</i> .	23
2.4. Regulación del catabolismo aerobio del estireno: regulación de las rutas <i>sty</i> y <i>paa</i> .	25
2.4.1. Regulación de la ruta <i>sty</i> .	25
2.4.1.1. Regulación del operón <i>sty</i> catabólico.	25
2.4.1.2. El sistema regulador StyS-StyR.	25
2.4.1.3. El promotor P_{styA} .	28
2.4.1.4. Regulación del operón <i>stySR</i> .	28
2.4.1.5. Represión catabólica del sistema <i>sty</i> .	29
2.4.2. Regulación de la ruta <i>paa</i> .	29
3. <i>Pseudomonas</i> sp. Y2.	31
III. Objetivos.	33
IV. Materiales y métodos.	35
1. Estirpes bacterianas.	35
2. Plásmidos.	37
3. Oligonucleótidos sintéticos.	39
4. Medios, conservación y condiciones de cultivo de los microorganismos.	41

5. Procedimientos de transferencia génica.	43
5.1. Transformación bacteriana mediante choque térmico.	43
5.2. Electrotransformación.	44
5.3. Conjugación.	44
5.4. Construcción de mutantes por doble recombinación.	44
6. Manipulación de ácidos nucleicos.	45
6.1. Aislamiento de DNA plasmídico.	45
6.2. Aislamiento de DNA total.	46
6.3. Purificación de fragmentos de DNA tras electroforesis preparativa.	46
6.4. Aislamiento de RNA.	47
6.5. Cuantificación de ácidos nucleicos.	47
6.6. Modificación de ácidos nucleicos.	48
7. Síntesis de ácidos nucleicos.	49
7.1. Síntesis de cDNA.	49
7.2. Transcripción <i>in vitro</i> .	49
7.3. Extensión del cebador.	50
7.4. Técnicas basadas en el uso de la PCR.	51
• Amplificación de fragmentos de DNA mediante PCR.	51
• Mutagénesis dirigida.	52
• RT-PCR cuantitativa.	52
• Oligonucleótidos cebadores.	52
8. Secuenciación de DNA.	53
8.1. Secuenciación automática.	53
8.2. Secuenciación manual.	53
9. Técnicas electroforéticas.	53
9.1. Electroforesis de DNA en geles de agarosa.	53
9.2. Electroforesis de RNA en geles de agarosa.	54
9.3. Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida.	54
9.4. Electroforesis de DNA en geles de poliacrilamida en condiciones nativas.	55
9.5. Electroforesis de DNA en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes.	55
9.6. Electroforesis de RNA en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes.	55
10. Transferencia en hibridación de ácidos nucleicos.	56
10.1. Marcaje de sondas con digoxigenina.	56
10.2. <i>Shoutern blot</i> .	56
11. Ensayos enzimáticos.	56
11.1. Inducción de los promotores P_{styA} y P_{paaF2} .	56
11.2. Medida de actividad β -galactosidasa.	56

11.3. Valoración de la actividad FA-CoA ligasa.	57
12. Hiperexpresión y purificación de proteínas de fusión.	58
12.1. Proteínas de fusión con colas de histidinas.	58
12.2. Proteínas de fusión con la proteína de unión a maltosa (MBP).	59
12.3. Obtención de extractos proteicos.	59
12.4. Determinación de la concentración de proteínas.	60
12.5. Fosforilación de His ₆ -StyR.	60
12.6. σ^{70} -RNA polimerasa de <i>P. putida</i> KT2440.	60
13. Ensayos de unión proteína-DNA.	61
13.1. Marcaje de sondas.	61
• Marcaje de sondas con [γ^{32} P] ATP y T4 polinucleótido kinasa.	61
• Marcaje de sondas con [α^{32} P]dATP y el fragmento <i>klenow</i> de la DNA polimerasa.	61
13.2. Ensayos de retardo de banda electroforética.	62
13.3. Ensayos de protección frente a la digestión con DNasa I.	62
14. Ultracentrifugación analítica.	63
14.1. Equilibrio de sedimentación.	63
14.2. Velocidad de sedimentación.	64
15. Análisis informático de secuencias.	64
15.1. Visualización y corrección de los cromatogramas.	64
15.2. Mapas de restricción.	64
15.3. Comparación de secuencias con las bases de datos (SwissProt y trEMBL) y alineamiento de proteínas.	64
15.4. Plegamiento de secuencias de DNA.	65
15.5. Plegamiento de secuencias de RNA.	65
15.6. Comparación y búsqueda de secuencias en el DNA.	65
V. Resultados.	67
A. Estudio de la región promotora P_{styA}.	67
1. La región promotora P_{styA} .	67
2. Papel de la proteína StyR en la regulación del promotor P_{styA} .	68
2.1. Sitios STY en P_{styA} .	68
2.2. Expresión y purificación de His ₆ -StyR.	68
2.3. Ensayos de la unión de StyR a la región P_{styA} .	69
2.4. El papel de StyR en la actividad de la transcripción a partir de P_{styA} .	71
3. Papel de la proteína PaaX en la regulación del promotor P_{styA} .	72
3.1. Estudio <i>in silico</i> de P_{styA} : localización de un motivo de unión para PaaX.	72
3.2. Estudios de la unión de PaaX a la región P_{styA} .	73

3.2.1. Preparación de la sonda STY.	73
3.2.2. Ensayos de retardo en gel con extractos celulares.	73
3.2.3. Preparación de MBP-PaaX1.	75
3.2.4. Ensayos de retardo en gel con MBP-PaaX1.	76
3.3. Localización y definición de la región operadora de PaaX en P_{styA} - $styA$.	77
3.3.1. Ensayo de protección frente a la digestión con DNasaI.	77
3.3.2. Mutación de la región operadora de PaaX y ensayos de retardo en gel con MBP-PaaX1.	79
3.4. Estudio <i>in vitro</i> del efecto de la unión de PaaX al operador P_{styA} . Transcripción <i>in vitro</i> .	81
3.5. Estudio <i>in vivo</i> del efecto de la unión de PaaX al operador en P_{styA} mediante un sistema heterólogo de dos plásmidos.	82
3.6. Estudio <i>in vivo</i> del efecto de la unión de PaaX al operador en P_{styA} en <i>Pseudomonas</i> sp. Y2.	84
3.6.1. Construcción del mutante <i>Pseudomonas</i> sp. Y2T2X1.	84
3.6.2. Crecimiento de Y2T2X1 en estireno y en AFA.	86
3.6.3. Estudio de la transcripción a partir de P_{styA} en el mutante Y2T2X1.	87
3.7. Estudios físicos de la interacción de PaaX y el operador en $styA$.	88
4. Papel de IHF en la regulación del promotor P_{styA} .	90
4.1. Ensayos de la unión de IHF a la región P_{styA} .	91
4.2. Estudio de la secuencia de unión de IHF a la región P_{styA} .	92
4.3. Estudio del papel de IHF en la transcripción a partir de la región P_{styA} <i>in vitro</i> .	93
4.4. Estudio del papel de IHF en la transcripción a partir de la región P_{styA} <i>in vivo</i> .	95
B. Estudio de la región promotora P_{paaF2}.	97
1. Construcción y estudios de crecimiento de distintos mutantes $paaF$ derivados de <i>Pseudomonas</i> sp. Y2.	97
1.1. Construcción de la estirpe <i>Pseudomonas</i> sp. strain Y2T2 $paaF::Km$.	97
1.2. Construcción de la estirpe <i>Pseudomonas</i> sp. strain Y2T2 $paaF2::Km$.	98
1.3. Crecimiento de Y2T2 y de los mutantes derivados Y2T2 $paaF::Km$ e Y2T2 $paaF2::Km$ en LB, AFA y estireno.	100
2. La región promotora P_{paaF2} .	100
2.1. Análisis <i>in silico</i> de la región P_{paaF2} y localización del sitio STY4.	100
2.2. Determinación del punto de inicio de la transcripción del gen $paaF2$.	101
3. Papel de la proteína StyR en la regulación del promotor P_{paaF2} .	102
3.1. Estudio de la unión de StyR a P_{paaF2} .	102
3.1.1. Preparación de sondas.	102

3.1.2. Ensayos de retardo en gel con His ₆ -StyR.	103
3.2. Estudio <i>in vitro</i> del papel de Sty en la transcripción a partir de P_{paaF2} .	105
3.3. Estudio <i>in vivo</i> del papel de Sty en la transcripción a partir de P_{paaF2} mediante sistemas testigo en multicopia.	106
3.3.1. Construcción de los plásmidos testigo pRWF2A, pRWF2B y pRWF2C.	106
3.3.2. Ensayos de actividad β -galactosidasa.	106
3.4. Estudio <i>in vivo</i> del papel de StyR en la transcripción a partir de P_{paaF2} mediante sistemas testigo en monocopia.	107
3.4.1. Construcción de las estirpes testigo <i>Pseudomonas</i> sp. strain Y2 F2L, Y2 F2SL e Y2 F2L Δ styR::Gm.	107
3.4.2. Ensayos de actividad β -galactosidasa con las distintas estirpes testigo derivadas de <i>Pseudomonas</i> sp. Y2.	112
3.5. Estudio de inductores y represores de P_{paaF2} .	113
3.5.1. Estudio de inductores de P_{paaF2} .	113
3.5.2. Estudio de represores de P_{paaF2} .	115
4. Papel de la proteína PaaX en la regulación del promotor P_{paaF2} .	117
4.1. Estudio de la unión de PaaX a P_{paaF2} .	117
4.1.1. Diseño y construcción de sondas: F2, F2-2, F2-3 y F2-4.	117
4.1.2. Ensayos de retardo de banda electroforética de las sondas derivadas de P_{paaF2} con MBP-PaaX1.	118
4.1.3. Ensayos de protección frente a la digestión con DNasaI.	120
4.2. Estudio <i>in vitro</i> del papel de PaaX en la transcripción de P_{paaF2} .	121
4.3. Estudio <i>in vivo</i> del papel de PaaX en la transcripción de P_{paaF2} .	121
5. Papel de IHF en la regulación del promotor P_{paaF2} .	122
6. Papel de PaaF2 en la degradación del estireno.	123
6.1. Ensayos de actividad FA-CoA ligasa.	123
6.2. Expresión de los genes <i>paa</i> en la estirpe Y2T2 $paaF$::Km.	124
6.3. Estudios de crecimiento y competición de las estirpes Y2T2 e Y2T2 $paaF2$::Km.	124
VI. Discusión.	127
A. Regulación de la región promotora P_{styA}.	127
1. Características generales de la región promotora P_{styA} .	127
2. Papel de la proteína StyR en la regulación del promotor P_{styA} .	127
3. Papel de la proteína PaaX en la regulación del promotor P_{styA} .	129
4. Papel de IHF en la regulación del promotor P_{styA} .	138

B. Regulación de la región promotora P_{paaF2}.	141
1. La expresión del gen <i>paaF2</i> es dependiente de estireno.	141
2. Características generales de la región promotora P_{paaF2} .	142
3. Papel de la proteína StyR en la regulación del promotor P_{paaF2} .	142
4. Estudio de inductores y represores del promotor P_{paaF2} .	146
5. Papel de la proteína PaaX en la regulación del promotor P_{paaF2} .	147
6. Papel de IHF en la regulación del promotor P_{paaF2} .	148
7. PaaF2 es una FA-CoA ligasa auxiliar específica de estireno.	148
8. Papel de PaaF2 en la regulación del catabolismo del estireno.	149
VII. Conclusiones.	153
VIII. Anexo.	157
Anexo I. Secuencia del promotor P_{styA} de <i>Pseudomonas</i> sp. Y2.	157
Anexo II. Secuencia del promotor P_{paaF2} de <i>Pseudomonas</i> sp. Y2.	159
Anexo III. Genes <i>sty</i> y <i>paa</i> de <i>Pseudomonas</i> sp. Y2.	161
Anexo IV. Secuencias de distintas PaaX y PaaF de <i>Pseudomonas</i> .	163
IX. Bibliografía.	167
X. Artículos.	183

LISTA DE ABREVIATURAS

I. Lista de abreviaturas.

$A_{260\text{nm}}$; $A_{280\text{nm}}$	Absorbancia a 260 nm y a 280 nm
AFA	ácido fenilacético
FA-CoA	fenilacetil-Coenzima A
Ap	ampicilina
ATP	adenosina 5'-trifosfato
BSA	albúmina de suero bovino
cAMP	adenosina monofosfato cíclico
cDNA	DNA complementario
Ci	curios
Cm	cloramfenicol
CoA	coenzima A
Crc	proteína de control de la represión por catabolito (<i>catabolite repression control</i>)
CRP	proteína receptora de cAMP (<i>cAMP receptor protein</i>)
c(s)	función de distribución de coeficientes de sedimentación
CTP	citocina 5'-trifosfato
$DO_{600\text{nm}}$; $DO_{420\text{nm}}$; $DO_{550\text{nm}}$	Densidad óptica medida a 600 nm, 420 nm y 550 nm.
Da	Dalton
dATP	desoxiadenosina 5'-trifosfato
dCTP	desoxicitosina 5'-trifosfato
DEPC	dietilpirocarbonato
dGTP	desoxiguanosina 5'-trifosfato
DIG	digoxigenina
DMSO	dimetilsulfóxido
DNasa	desoxirribonucleasa
dNTPs	desoxirribonucleósidos 5'-trifosfato
DTT	ditiotreitól
dTTP	desoxitimidina 5'-trifosfato
EDTA	ácido etilendiaminotetracético
EXPASY	Sistema Experto de Análisis de Proteínas (<i>Expert Protein Analysis System</i>)
FAD	dinucleótido de flavina y adenina
FADH ₂	dinucleótido de flavina y adenina reducido
GTP	guanosina 5'-trifosfato
IHF	factor de integración del huésped (<i>integration host factor</i>)

IPTG	tiogalactósido de inositol fosfato
kb	kilobases
kDa	kilodalton
Km	kanamicina
LB	medio Luria-Bertani
MCS	sitio de clonación múltiple (<i>multicloning site</i>)
M _w	masa molecular
M _{w,ap}	masa molecular aparente
NAD	dinucleótido de nicotinamida y adenina
NADH	dinucleótido de nicotinamida y adenina reducido
NADPH	dinucleótido fosfato de nicotinamida y adenina reducido
nt	nucleótidos
N-terminal	amino terminal
NTPs	ribonucleótidos 5'-trifosfato
ONPG	<i>o</i> -nitrofenoltiogalactósido
ORF	marco abierto de lectura
pb	par(es) de bases
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
(p)ppGpp	polifosfatos de guanosina: pppGpp, pentafofosfato de guanosina; ppGpp, tetrafosfato de guanosina
RBS	sitio de unión al ribosoma
Rif	rifampicina
RNasa	ribonucleasa
rpm	revoluciones por minuto
RT	retrotranscriptasa o transcriptasa reversa
S	coeficiente de sedimentación en Svedverg
SDS	dodecilsulfato sódico
Sm	estreptomina
Tc	tetraciclina
TCA	ciclo de los ácidos tricarboxílicos (<i>tricarboxylic acid cycle</i>)
Tn	transposón
Tris	Trihidroximetilaminometano
TTP	timidina 5'-trifosfato
U	unidades de actividad enzimática
UTP	uracilo 5'-trifosfato
X-gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-galactósido

INTRODUCCIÓN

II. Introducción.

1. Biodegradación de compuestos aromáticos.

La incesante actividad humana ha provocado la acumulación de sustancias contaminantes en el medio ambiente (OCDE, 1994), ocasionando graves problemas en la salud humana y en el equilibrio de los ecosistemas. Algunos de estos contaminantes son compuestos sintéticos de origen industrial que presentan estructuras químicas desconocidas para la biosfera (xenobióticos), por lo que su degradación es muy lenta o imposible y constituyen una fuente muy importante de contaminación ambiental (Pieper y Reineke, 2000). Otros son compuestos naturales que han sido extraídos de sus depósitos y convertidos en una forma biodisponible que resulta tóxica para los seres vivos, como es el caso de los hidrocarburos presentes en los combustibles fósiles y de los metales pesados que se encuentran en ciertos minerales (Díaz, 2004).

El anillo bencénico constituye, junto con los residuos glucosídicos, una de las estructuras químicas más extensamente distribuidas de la naturaleza (Dagley, 1981). La configuración electrónica del anillo bencénico le dota de una alta estabilidad, lo que se traduce en una mayor persistencia de este tipo de compuestos en el medio ambiente, incrementándose así su capacidad contaminante (Dagley, 1981). La lignina, segundo polímero más abundante en la naturaleza después de la celulosa, es un polímero con estructuras aromáticas que se encuentra en la pared celular de las plantas y comprende el 25 % de la biomasa de la tierra, por lo que su reciclaje, es fundamental para el mantenimiento del ciclo del carbono en la biosfera (Harwood y Parales, 1996). Otros compuestos aromáticos como la fenilalanina, el ácido cinámico y derivados, y el ácido fenilpropiónico y derivados, son producidos por las plantas como consecuencia de su metabolismo secundario (Elder y Kelly, 1994). Durante los últimos años ha aumentado considerablemente la liberación de este tipo de compuestos a la biosfera como consecuencia de la actividad humana. Así, los hidrocarburos aromáticos, incluyendo el benceno, tolueno, etilbenceno y xilenos (BTEX), comprenden el 15% de la gasolina, y son producidos también en cantidades de megatoneladas por año para su uso industrial como disolventes y como material de partida para la producción de pesticidas, plásticos y fibras sintéticas (Swoboda-Colberg, 1995).

En general, la eliminación de los contaminantes ambientales mediante procedimientos físico-químicos es un proceso insuficiente. Desde hace tiempo se ha incorporado una nueva estrategia para luchar con éxito contra la contaminación que consiste en el aprovechamiento de las capacidades degradadoras de los microorganismos. Los microorganismos, conocidos por su enorme capacidad de adaptación, han desarrollado rutas metabólicas que les permiten degradar distintos contaminantes (Smith, 1990; Harayama y Timmis, 1992; van der Meer y col., 1992), entre los que se encuentran los compuestos aromáticos. La abundancia de los microorganismos, junto con su habilidad para transferir genes horizontalmente y su alta velocidad de crecimiento, les permite evolucionar rápidamente y

adaptarse a los cambios en el ambiente incluso en condiciones extremas que no permitirían la proliferación de otros seres vivos (Timmis y Pieper, 1999; Schmid y col., 2001; Dua y col., 2002).

La Biodegradación es una disciplina que estudia los diferentes aspectos (bioquímicos, genéticos, microbiológicos, etc) de los procesos catabólicos microbianos implicados en la degradación de estas moléculas contaminantes, así como el desarrollo experimental de nuevas rutas catabólicas para degradarlas (Ramos y col., 1994; Pieper y Reineke, 2000). Un mayor conocimiento de estos procesos puede conducirnos a lograr la eliminación de contaminantes del ambiente mediante bacterias modificadas genéticamente (de Lorenzo, 2001).

1.1. Rutas de degradación de compuestos aromáticos.

En el proceso catabólico de los diferentes compuestos aromáticos se distinguen dos tipos de rutas: periféricas y centrales. Las primeras llevan a cabo la conversión de los distintos compuestos aromáticos en unos pocos intermediarios centrales, mientras las segundas catalizan la ruptura del anillo aromático de estos intermediarios y canalizan sus productos al metabolismo central (Heider y Fuchs, 1997; Díaz, 2004). La diversidad de rutas periféricas es casi tan grande como la variedad de compuestos aromáticos existentes y las enzimas que las integran suelen ser bastante específicas y ser inducidas por los compuestos a degradar (Harwood y col., 1998; Heider y col., 1998). Por el contrario, sólo existen unas pocas rutas centrales. La convergencia de todas aquellas rutas periféricas en un número reducido de rutas centrales se ha denominado “embudo catabólico” (Harayama y Timmis, 1989).

El núcleo central del catabolismo de los compuestos aromáticos consiste en dos procesos enzimáticos secuenciales: a) la desestabilización del anillo aromático a través de una modificación de la densidad electrónica del mismo y b) la ruptura del anillo. Este catabolismo puede ser aerobio o anaerobio, en función de que el aceptor final de los electrones en la bacteria sea la molécula de oxígeno u otra molécula distinta (NO_3^- , Fe^{3+} , SO_4^{2-} , etc). Ambos tipos de catabolismo poseen características diferenciales. Así, los microorganismos aerobios suelen producir la desestabilización del anillo aromático a través de reacciones de oxidación, mientras que los microorganismos anaerobios lo hacen generalmente mediante la formación de un derivado tioesterificado que favorece las posteriores reacciones de reducción del anillo.

1.1.1. Rutas catabólicas anaerobias.

Las rutas periféricas del metabolismo anaeróbico de compuestos aromáticos convergen generalmente en la ruta central del benzoil-coenzima A (benzoil-CoA) (Heider y Fuchs, 1997; Harwood y col., 1998) (Figura 2.1).

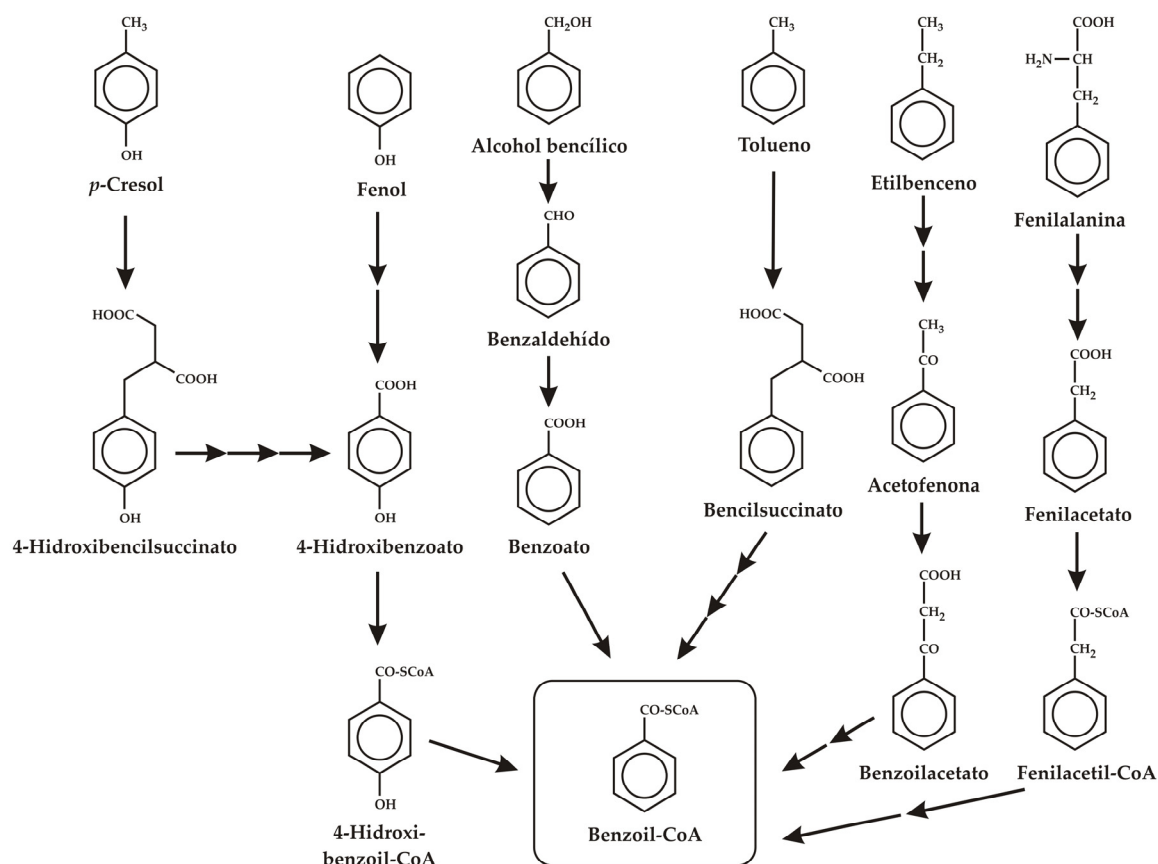


FIGURA 2.1. Ejemplos de rutas periféricas del catabolismo anaeróbico bacteriano de diversos compuestos aromáticos que originan benzoil-CoA (Harwood y col., 1998; Boll y col., 2002). Figura tomada de Bartolomé-Martín 2006.

La activación que resulta de la unión de la molécula de coenzima A (CoA) catalizada por diferentes CoA ligasas es fundamental para que pueda darse la posterior reducción del anillo aromático (Heider y Fuchs, 1997). Una vez en la ruta central, el benzoil-CoA pierde su carácter aromático por la acción de una reductasa multicomponente específica que requiere poder reductor y el gasto de 2 moléculas de ATP (Boll y col., 2002; Gibson y Harwood, 2002). Los productos alicíclicos y alifáticos formados sufren una mineralización posterior similar a la β -oxidación de los ácidos grasos (Gibson y Harwood, 2002; Carmona y Díaz, 2005) (Figura 2.2).

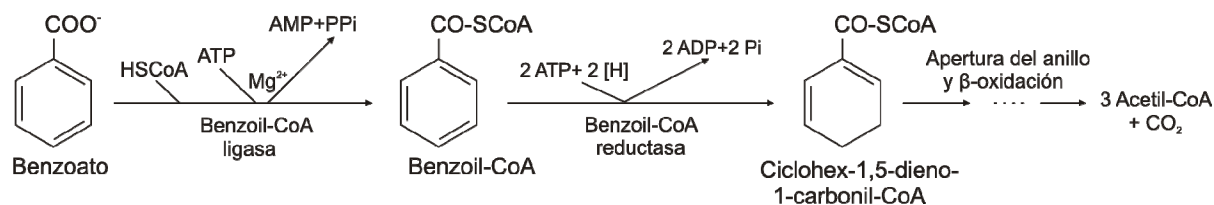


FIGURA 2.2. Esquema simplificado de la degradación anaerobia del benzoato en *Thauera aromatica*. Modificado a partir de (Gibson y Harwood, 2002; Díaz, 2004).

Se han descrito también rutas periféricas que convergen en compuestos hidroxilados como el floroglucinol (1,3,5-trihidroxibenceno), el resorcinol (1,3-dihidroxibenceno) o la hidroxihidroquinolona (1,2,4-trihidroxibenceno). La débil aromaticidad de estos compuestos permite que no requieran la activación mediada por CoA y la reducción de su anillo aromático es producida solamente por el aporte de poder reductor por el NADPH, en el caso del floroglucinol y la hidroxiquinona (Haddock y Ferry, 1989; Schink y col., 2000), o por una ferredoxina, en el caso del resorcinol (Kluge y col., 1990).

1.1.2. Rutas catabólicas aerobias.

Las rutas periféricas del catabolismo aeróbico de compuestos aromáticos implican la introducción de uno o dos grupos hidroxilo en el anillo mediante la acción de monooxigenasas y/o dioxigenasas, lo que provoca el aumento de la densidad electrónica y lo hace más susceptible a la oxidación. Se generan así derivados dihidroxilados que constituyen los principales sustratos de las rutas centrales: el catecol y sus derivados (protocatecuato, homoprotocatecuato, 3-metilcatecol, 4-metilcatecol), y el gentisato y sus derivados (homogentisato) (Figura 2.3). Estos intermediarios centrales sufren la apertura del anillo aromático mediante dioxigenasas de ruptura del anillo (Harayama y Reikik, 1989; Harayama y Timmis, 1992; van der Meer y col., 1992; Harwood y Parales, 1996), dando así lugar a compuestos no aromáticos que son oxidados progresivamente hasta intermediarios del ciclo de Krebs u otros directamente asimilables por el metabolismo central bacteriano (Figura 2.4).

Se han descrito también compuestos monohidroxilados sustrato de las dioxigenasas de ruptura, como el 2-aminofenol (Takenaka y col., 1997) y el 1-hidroxi-2-naftoato (Iwabuchi y Harayama, 1998), así como trihidroxilados, como el hidroxiquinol (Armengaud y col., 1999) y el galato (Nogales y col., 2005).

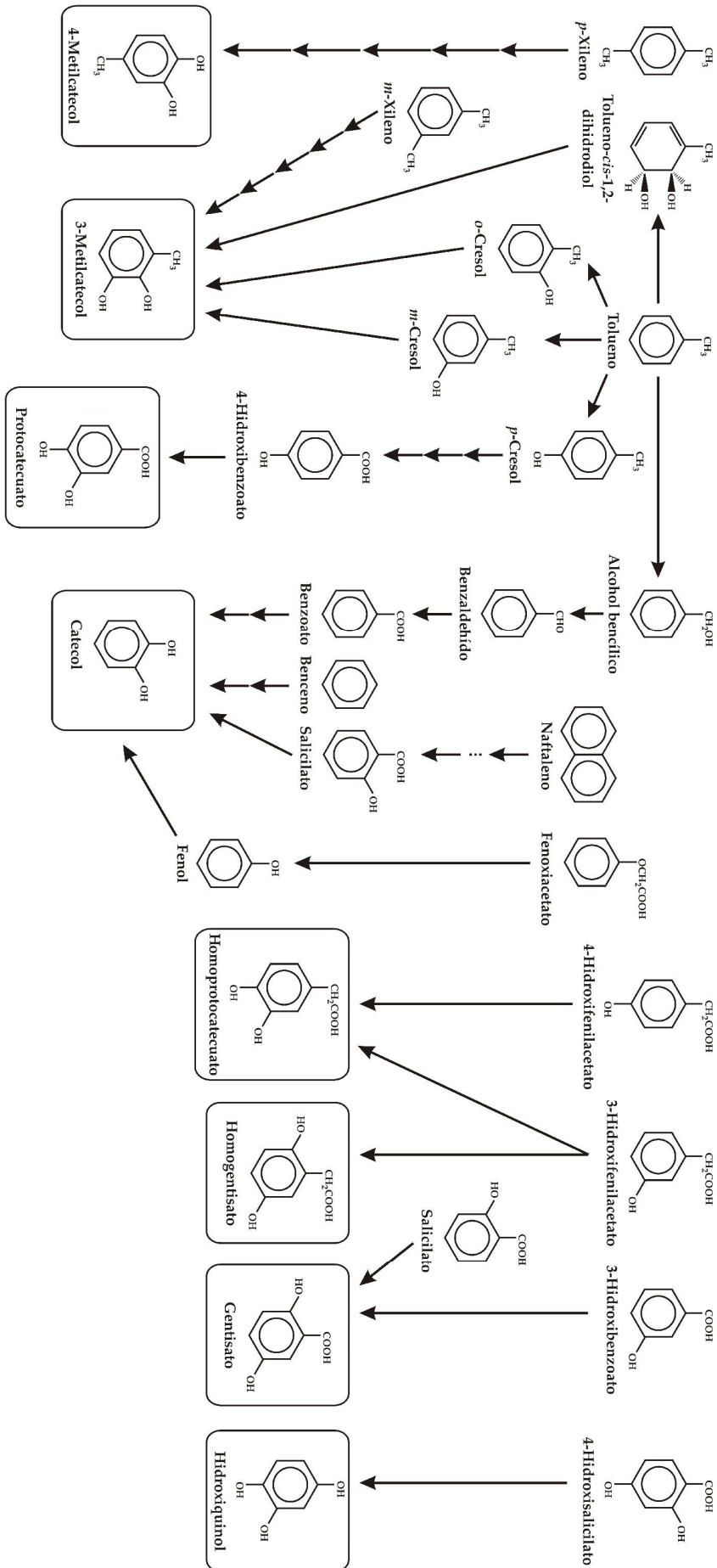


FIGURA 2.3. Esquema de algunas de las rutas perifericas del catabolismo aerobico bacteriano de compuestos aromaticos. Aparecen recuadrados los intermediarios centrales: el catecol y sus derivados (3-metilcatecol, 4-metilcatecol, protocatecuato y homoprotocatecuato), el gentisato (y homogentisato), y el hidroxiquinol. El hecho de que existan cinco rutas diferentes para el catabolismo aerobico del tolueno pone de manifiesto la diversidad metabolica bacteriana. Modificado a partir de (Gulensoy y Alvarez, 1999; Fernandez, 2005; Lopez-Barragan, 2005). Figura tomada de Bartolomé-Martin, 2006.

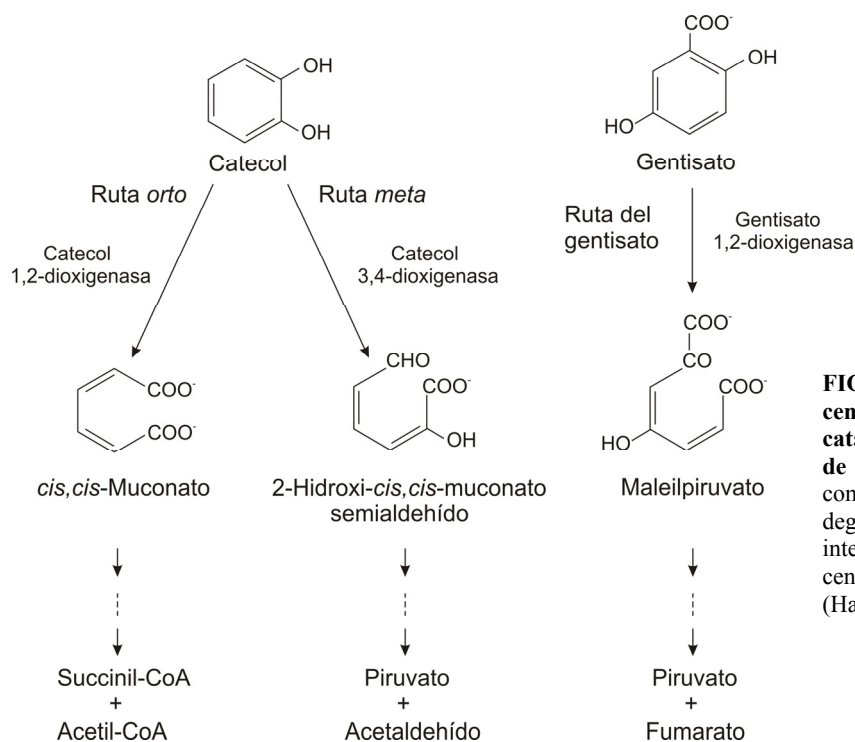


FIGURA 2.4. Rutas catabólicas centrales más habituales en el catabolismo aeróbico bacteriano de compuestos aromáticos. Los compuestos formados son degradados posteriormente hasta intermediarios del metabolismo central. Ampliado a partir de (Harwood y Parales, 1996).

1.1.3. Rutas híbridas.

Dentro del catabolismo aeróbico de compuestos aromáticos se han descrito algunas rutas que comparten características típicas del catabolismo anaeróbico. En estas rutas híbridas la activación del anillo aromático se produce mediante la tioesterificación con CoA, dando lugar a derivados de acil-CoA. La participación de CoA ligasas en esta primera etapa del catabolismo se ha descrito en la degradación del ácido fenilacético (AFA) en *Pseudomonas putida* U (Martínez-Blanco y col., 1990), *Pseudomonas* sp. Y2 (Velasco y col., 1998; Alonso y col., 2003; Bartolomé-Martín y col., 2004), *Azoarcus evansii* (Mohamed, 2000; Mohamed y col., 2002; Rost y col., 2002) y *E. coli* (Ferrández y col., 1998; Díaz y col., 2001; Ismail y col., 2003). Este es el caso también de la degradación del 2-aminobenzoato en *A. evansii* (Zaar y col., 2001), el benzoato en *A. evansii* (Zaar y col., 2004; Gescher y col., 2005; Gescher y col., 2006), *Bacillus stearothermophilus* (Zaar y col., 2001), *T. aromatica* (Schühle y col., 2003) y *Burkholderia xenovorans* LB400 (Denef y col., 2004), el ferulato en *P. putida* (Venturi y col., 1998) y *P. fluorescens* (Gasson y col., 1998) y el ácido 2-furoico en *P. putida* Fu1 (Koenig y Andreesen, 1990). Algunos mecanismos de deshalogenación de compuestos aromáticos también implican la tioesterificación con CoA en condiciones aeróbicas (Crooks y Copley, 1994; Dunaway-Mariano y Babbitt, 1994; Romanov y Hausinger, 1996; Zhuang y col., 2003).

Aunque las rutas híbridas comienzan con esta reacción típica del metabolismo anaerobio, la apertura del anillo aromático se produce mediante la hidroxilación y posterior actuación de una dioxigenasa, características habituales de las rutas aeróbicas. El porqué de este tipo de rutas híbridas es desconocido, aunque se ha sugerido la posibilidad de que representen una ventaja a los

microorganismos que tienen que sobrevivir en ambientes en los que la concentración de oxígeno puede sufrir importantes variaciones (Niemetz y col., 1995).

1.2. Regulación de las rutas de degradación de compuestos aromáticos.

La regulación de una ruta catabólica debe asegurar tanto una respuesta adecuada y rápida a la presencia de un determinado sustrato como una conexión apropiada con el estado fisiológico de la célula. Puesto que los compuestos aromáticos no suelen ser una fuente de carbono preferencial para las bacterias, la expresión de las rutas de degradación de dichos compuestos suele estar sometida a un estricto control transcripcional que se ejerce a dos niveles: a) una regulación específica de cada ruta y mediada por reguladores generalmente codificados por el propio *cluster* catabólico y b) una regulación sobrepuesta a la anterior que responde a mecanismos de regulación globales que operan en función del estado energético de la célula o de la presencia de una fuente de carbono preferencial para la bacteria (Díaz y Prieto, 2000; Cases y de Lorenzo, 2001; Rojo, 2001; Shingler, 2003; Prieto y col., 2004; Tropel y van der Meer, 2004; Cases y de Lorenzo, 2005).

Otro nivel de regulación distinto a los anteriores implica una respuesta en el comportamiento de la bacteria frente a la presencia de la fuente de carbono en el medio. Se trata de un acoplamiento de señales a través de funciones basales para permitir comportamientos beneficiosos en respuesta a la información recibida, como es el caso de la quimiotaxis o taxis energética (Shingler, 2003).

A pesar de que el control transcripcional ha sido el más estudiado, existe también un control post-transcripcional que modula los niveles de mRNA y la eficacia de la traducción (Cases y de Lorenzo, 1998; Laurie y col., 2003; Rojo y Dinamarca, 2004; Marqués y col., 2006). Por último, las rutas catabólicas se regulan a nivel post-traducciona mediante la inhibición de las enzimas correspondientes en presencia de distintos análogos de sustrato, a través de algún bloqueo (retroinhibición), o mediante el control de los transportadores específicos encargados de la entrada del compuesto aromático (Brzostowicz y col., 2003).

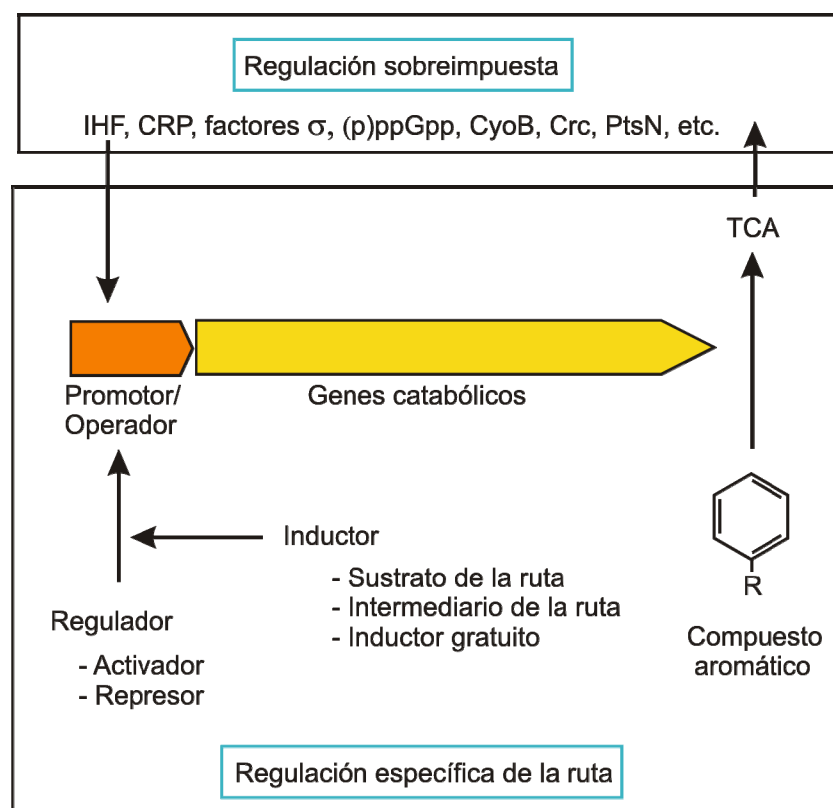


FIGURA 2.5. Esquema de los dos niveles de regulación transcripcional del catabolismo de compuestos aromáticos en bacterias. El primer nivel lo constituye el mecanismo de regulación específica de una determinada ruta catabólica, que se basa en la interacción regulador-promotor. El regulador puede actuar como un activador transcripcional en presencia del inductor, o como un represor transcripcional en ausencia del inductor. El segundo nivel de control transcripcional lo constituye la regulación sobreimpuesta, que ajusta el nivel de transcripción a partir de un determinado promotor dependiendo del estado fisiológico y energético de la célula. En este tipo de regulación participan reguladores y factores transcripcionales como IHF (*Integration Host Factor*), CRP (*cAMP Receptor Protein*), factores σ alternativos de la RNA polimerasa, (p)ppGpp, CyoB (Citocromo *o* ubiquinol oxidasa), Crc (*Catabolite repression control*), PtsN (proteína IIA^{Ntr} del sistema fosfoenol piruvato:azúcar fosfotransferasa), etc. Figura modificada a partir de (Díaz y Prieto, 2000).

1.2.1. Regulación específica.

Las proteínas reguladoras y los promotores regulados por ellas son los elementos clave que dirigen la regulación específica de la transcripción de los operones catabólicos, de forma que cuando el sustrato catabólico es abundante y puede servir como nutriente, la transcripción de estos operones se activa.

Existe una gran variedad de proteínas reguladoras, pertenecientes a diferentes familias de reguladores transcripcionales procariontes, que controlan la expresión de las rutas catabólicas de compuestos aromáticos. La mayor parte de estos reguladores son activadores de la transcripción, aunque también se han descrito algunos represores. El mecanismo de control se basa en la interacción de la proteína, a través de un dominio hélice-giro-hélice (HTH, *helix-turn-helix*) de unión al DNA, con la región operadora del promotor regulado en presencia del inductor apropiado, permitiendo así la expresión de los genes catabólicos correspondientes. La molécula inductora suele ser el propio sustrato aromático o alguno de los metabolitos (aromático o no aromático) que se generan en la degradación

(Díaz y Prieto, 2000; Tropel y van der Meer, 2004). La Tabla 2.1 recoge algunos ejemplos de este tipo de reguladores (Díaz y Prieto, 2000; Tropel y van der Meer, 2004).

TABLA 2.1. Reguladores específicos de rutas de degradación de compuestos aromáticos en bacterias (Díaz y Prieto, 2000; Tropel y van der Meer, 2004).

Proteína reguladora	Familia	Microorganismo [plásmido]	Sustrato(s) de la(s) ruta(s) regulada(s)	Función	Nº de acceso en el NCBI
XylR	NtrC	<i>P. putida</i> mt-2 [pWW0]	Tolueno, <i>m</i> - y <i>p</i> -xileno	Activador	AAB59162
TouR	NtrC	<i>Pseudomonas stutzeri</i> OX1	Tolueno, <i>o</i> -xileno, fenol	Activador	CAB52211
DmpR	NtrC	<i>Pseudomonas</i> sp. CF600 [pVII150]	Fenol, <i>o</i> -, <i>m</i> - y <i>p</i> -cresol, 3,4-dimetilfenol	Activador	CAA48174
CatR	LysR	<i>P. putida</i> / <i>Acinetobacter lwoffii</i> K24	Catecol, fenol	Activador	AAN69313 / AAC46229
ClcR	LysR	<i>P. putida</i> / <i>Rhodococcus opacus</i> 1CP	3-Clorocatecol	Activador	AAA25771 / AAC38250
NahR	LysR	<i>P. putida</i> [pNAH7] / <i>P. stutzeri</i> AN10	Naftaleno, salicilato	Activador	BAE92164 / AAD02145
XylS	AraC	<i>P. putida</i> mt-2 [pWW0]	<i>m</i> -Toluato (tolueno, ruta meta)	Activador	AAB59163
HpaA	AraC	<i>E. coli</i> W	4-OH-fenilacetato	Activador	CAA86047
PcaR	IclR	<i>P. putida</i> PRS2000	Protocatecuato	Activador	Q52154
MhpR	IclR	<i>E. coli</i> K-12 / <i>Comamonas testosteroni</i> TA441	3-OH-fenilpropionato	Activador	P77569 / BAA82877
TodS / TodT	TCRS ⁽¹⁾	<i>P. putida</i> F1	Tolueno	Activador	AAC45438 / AAC45439
TodS/TodT	TCRS	<i>P. putida</i> DOT-T1	Tolueno	Activador	CAB43735/ CAB43736
TutB/TutC	TCRS	<i>Thauera</i> sp. T1	Tolueno	Activador	AAD12185/ AAD12184
StyS / StyR	TCRS	<i>Pseudomonas</i> sp. Y2	Estireno	Activador	CAA03998 / CAA03999
StyS / StyR	TCRS	<i>P. fluorescens</i> ST	Estireno	Activador	AAC06272/ AAC06271
HbaR	FNR	<i>Rhodopseudomonas palustris</i>	4-OH-benzoato	Activador	AAF04013
BadR	MarR	<i>R. palustris</i>	Benzoato	Activador	AAC23923

HpaR	MarR	<i>E. coli</i> W	Homoprotocatecuato	Represor	CAA86039
CymR	TetR	<i>P. putida</i> F1	<i>p</i> -Cumeno, <i>p</i> -cumato	Represor	AAB62296
PaaX	GntR	<i>E. coli</i> W / <i>P. putida</i> U	Fenilacetato	Represor	CAA66101 / AAC24342
BphS	GntR	<i>Ralstonia eutropha</i> A5	Bifenilo, 4- clorobifenilo	Represor	CAC05302
VanR	GntR	<i>P. putida</i> WCS358	Vanillato	Represor	CAB64602

(1) TCRS, sistema regulador de dos componentes (*two-component regulatory system*).

1.2.2. Regulación global o sobreimpuesta.

La expresión de las rutas catabólicas bacterianas depende no sólo de la presencia o ausencia del sustrato que va a ser degradado, sino también del estado fisiológico de la célula en respuesta a condiciones ambientales generales (Cases y de Lorenzo, 1998). De hecho, muchos de los promotores catabólicos están sujetos a varios tipos de controles fisiológicos, que constituyen la regulación sobreimpuesta o global. Esta regulación suele ser dominante sobre el control específico al que se hace referencia en el anterior apartado, y está mediada por diversos factores o reguladores globales. En la tabla siguiente se muestran algunos casos representativos de regulación global.

TABLA 2.2. Ejemplos característicos de regulación global sobre la degradación de compuestos aromáticos en bacterias. A partir de la revisión de (Shingler, 2003). Tomado de (Bartolomé-Martín, 2006).

Proteína o factor global	Microorganismo [plásmido] en el que se encuentra la ruta catabólica	Tipo de regulación	Referencia
σ^S y σ^H	<i>P. putida</i> mt-2 [pWW0]	Su patrón de expresión permite la opción de transcripción continua a partir del promotor P_m (dependiente de XylS).	(Marqués y col., 1999)
σ^{54} y σ^{70}	<i>P. sp.</i> CF600 [pVI150]	La competición entre el factor constitutivo σ^{70} y el factor σ^{54} por cantidades limitantes del <i>core</i> o núcleo de la RNA polimerasa afecta a la expresión del promotor P_o (dependiente de σ^{54} y activado por DmpR).	(Laurie y col., 2003)
(p)ppGpp	<i>P. sp.</i> CF600 [pVI150] / <i>P. putida</i> mt-2 [pWW0]	En respuesta a un estrés nutricional, aumentan los niveles de la “alarmona” (p)ppGpp, que estimula de forma directa e indirectamente la transcripción en los sistemas DmpR - P_o y XylR - P_u .	(Carmona y col., 2000; Sze y col., 2002; Laurie y col., 2003)
IHF (factor de integración del huésped)	<i>P. putida</i> mt-2 [pWW0] / <i>P. sp.</i> CF600 [pVI150]	Tanto el sistema XylR - P_u como el sistema DmpR - P_o requieren el factor IHF para una expresión óptima.	(de Lorenzo y col., 1991; Sze y col., 2001)

IHF	<i>Pseudomonas fluorescens</i> ST	IHF se une a una región dentro del promotor P_{styA} y es esencial para la transcripción del operón $styABCD$.	(Santos y col., 2002)
PtsN (IIA ^{Ntr}) y PtsO (NPr)	<i>P. putida</i> mt-2 [pWW0]	Proteínas implicadas en la represión catabólica por glucosa sobre el promotor P_u .	(Cases y col., 1999; Cases y col., 2001)
Cyo (citocromo <i>o</i> ubiquinol oxidasa)	<i>P. putida</i> H [pPGH1]	Interviene en la represión catabólica por succinato del promotor P_{phlA} (degradación de fenol).	(Petruschka y col., 2001)
Crc (control de la represión por catabolito)	<i>P. putida</i> KT2440	Participa en la represión catabólica en medio rico LB de las rutas de degradación de 4-OH-fenilpiruvato, homogentisato, benzoato, catecol, 4-OH-benzoato y protocatecuato.	(Morales y col., 2004)
CRP (proteína receptora de cAMP)	<i>E. coli</i> W	Interviene activando la expresión de las rutas de degradación de AFA, 3- y 4-OH-fenilacetato, 3-OH-fenilpropiónico, feniletilamina, tiramina y dopamina cuando no hay represión catabólica por glucosa.	(Prieto y col., 2004)

Uno de los factores que juega un papel en la regulación sobreimpuesta es IHF, implicado en la regulación de la transcripción de muchos promotores dependientes del factor σ^{54} en diferentes estirpes bacterianas y también de algunos promotores dependientes de σ^{70} . IHF puede tanto estimular como reprimir la transcripción, actuando de forma directa o en conjunto con otras proteínas reguladoras (Freundlich y col., 1992; Pérez-Martin y col., 1994; Goosen y van de Putte, 1995). Esta proteína de unión al DNA produce una acusada curvatura en la molécula de DNA, de aprox. 160° (Rice y col., 1996). Se han descrito diferentes mecanismos de actuación para IHF, entre los que se encuentran el facilitar el contacto entre las proteínas activadoras unidas y la RNA polimerasa para que tenga lugar la transcripción, restringir la especificidad de la activación transcripcional a un único regulador unido a sus regiones UASs (*Upstream Activator Sequence*) (Claverie-Martin y Magasanik, 1992; Pérez-Martin y de Lorenzo, 1995; Dworkin y col., 1997), ayudar al reclutamiento de la RNA polimerasa por el promotor (Bertoni y col., 1998), ayudar a la unión de los reguladores a sus UASs (Jovanovic y col., 1999) y promover y/o estabilizar el complejo abierto de la transcripción (Sze y col., 2001).

Uno de los tipos de regulación global más importantes es la represión catabólica, fenómeno común en la regulación de las rutas catabólicas de compuestos aromáticos en *Pseudomonas* (Shingler, 2003) y que hace referencia tanto al proceso regulador que permite a las células usar preferentemente una fuente de carbono determinada frente a otras cuando hay una mezcla de ellas en el medio (Magasanik, 1970; Ullmann, 1996), como a una represión parcial que provoca un descenso en la transcripción a partir de un promotor en presencia de una fuente de carbono adicional (Shingler, 2003). Las estrategias de regulación que tienen lugar en los procesos de represión catabólica pueden interferir con

el sistema de transporte o bien con la expresión de las rutas catabólicas de las fuentes de carbono no preferentes (Stülke y Hillen, 1999).

2. El estireno.

2.1. Características generales del estireno.

El estireno (C_8H_8 , CAS-100-42-5), también conocido por feniletileno, vinilbenceno, estirol y cinameno, es el más simple de los alqueni-bencenos y es un compuesto aromático, hidrofóbico y extremadamente volátil que se emplea en las industrias petroquímicas y de procesamiento de polímeros, liberándose al medio ambiente importantes cantidades de este compuesto como consecuencia, tanto en forma líquida como gaseosa. Se emplea en la industria química, bien como material de partida en la fabricación de plásticos, diversos tipos de gomas y resinas sintéticas, bien como disolvente de otras sustancias en la industria de procesamiento de polímeros, lo que implica su presencia en muchos de los eluidos resultantes de estos procesos industriales. La cadena lateral vinilo presente en el estireno le confiere la capacidad de formar largas cadenas de polímeros y co-polímeros, característica aprovechada para la síntesis de multitud de materiales, entre los que destacan la espuma de poliestireno expandida, utilizada en embalajes, y la resina ABS, co-polímero de acrilonitrilo, butadieno y estireno. El poliestireno, producto resultante de la polimerización del estireno, es un plástico económico y resistente, con el que se fabrican multitud de materiales, como piezas de ordenadores, maquetas, juguetes, recipientes de uso industrial y doméstico, recubrimientos de paredes, revestimientos internos de refrigeradores, etc.

Los procesos de síntesis, almacenamiento y manipulación industrial del estireno suponen riesgos potenciales ya que incluso a muy bajas concentraciones es un compuesto nocivo para la salud humana. Su notable volatilidad dificulta su contención, siendo la inhalación accidental la causa más frecuente de intoxicación por estireno. Una vez dentro del organismo, su carácter liposoluble favorece su acumulación en las membranas celulares (Bond, 1989), afectando especialmente a la transmisión de la señal de las células del sistema nervioso. Se han llevado a cabo numerosos estudios que describen diversos síntomas relacionados con la exposición laboral a estireno. Los efectos en los trabajadores expuestos a la inhalación de estireno pueden ser de carácter leve, como la irritación de zonas expuestas a este compuesto (ojos, piel, vías respiratorias, etc) o más severo a largo plazo sobre el sistema nervioso, como somnolencia, dificultad en la concentración, pérdida de memoria, vértigo, alteraciones en la percepción de los colores, etc. Exposiciones a dosis elevadas de estireno pueden causar daños no sólo en el sistema nervioso sino en órganos relacionados con la absorción, catabolismo y excreción del estireno, como los pulmones, riñones e hígado (Fielder y Lowing, 1981). El metabolismo del estireno se lleva a cabo principalmente en el hígado, por acción de complejos enzimáticos de la familia del citocromo P-450 que catalizan la oxidación progresiva de la cadena lateral vinilo, transformándolo sucesivamente en epoxiestireno, feniletanodiol, ácido mandélico y ácido fenilglioxílico (Figura 2.6).

Algunos de los metabolitos que se forman durante el proceso de degradación del estireno son aún más peligrosos que el propio estireno. El epoxiestireno, el primero de los metabolitos intermediarios del catabolismo hepático, está reconocido como carcinógeno y presenta una importante actividad mutagénica (Conti y col., 1988).

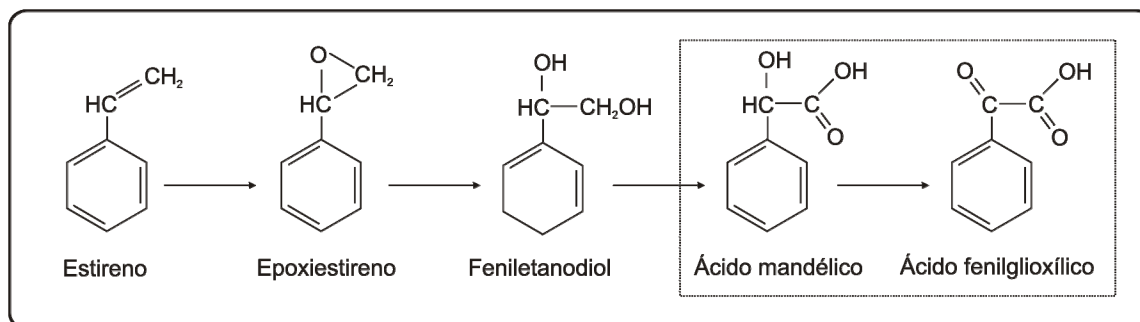


FIGURA 2.6. Metabolismo hepático del estireno. Los productos finales, ácido mandélico y ácido fenilgloxílico, son excretados finalmente en la orina.

El estireno se forma en la naturaleza a través de la descarboxilación del ácido cinámico, principalmente (Shirai y Hisatsuka, 1979; Shimada y col., 1992). También se ha descrito su presencia en pequeñas cantidades y de forma natural en algunas plantas y comidas, como frutas, vegetales, nueces, carnes, etc (Smith, 1994). Sin embargo, es su utilización masiva en la industria química la que le confiere un importante riesgo medioambiental. Los principales métodos utilizados para eliminar estos vertidos tóxicos son la inyección bajo tierra, esparcimiento en el suelo y combustión para la obtención de energía. Sin embargo, estos métodos no son adecuados. La combustión del estireno genera la emisión de compuestos orgánicos nocivos y contaminantes, incluyendo hidrocarburos aromáticos policíclicos y monóxido de carbono (Westblad y col., 2002). Cuando es liberado a la atmósfera, el estireno reacciona con el ozono troposférico con una vida media de 2,5 horas. Finalmente, estudios sobre la degradación del estireno cuando es liberado al suelo (Fu y Alexander, 1992) han demostrado que el porcentaje de eliminación varía en función del tipo de ambiente en el que se encuentra, el grado de oxigenación y el tipo de microorganismos presente, detectándose las mayores tasas de mineralización en suelos orgánicos y aguas residuales. Es en este sentido, cuando se pone de manifiesto el importante papel desempeñado por los microorganismos y la posible utilización de los mismos para la biorremediación de las zonas contaminadas, lo que hace importante un estudio más exhaustivo del funcionamiento del proceso catabólico del estireno y de la regulación de éste en los mismos.

2.2. Metabolismo microbiano del estireno.

Desde 1970 un gran número de microorganismos han sido aislados a lo largo de todo el planeta a partir de distintos suelos contaminados con estireno. Los microorganismos capaces de utilizar estireno como única fuente de carbono y energía incluyen especies de *Pseudomonas*, *Rhodococcus*, *Nocardia*, *Xanthobacter* y *Enterobacter*, así como la levadura negra *Exophiala jeanselmei* (revisado en (Hartmans, 1995).

2.2.1. Metabolismo anaeróbico del estireno.

Poco se conoce acerca del metabolismo anaeróbico del estireno. En 1990 se publicó el primer trabajo en el que se estudiaba la mineralización del estireno por asociaciones microbianas en condiciones de anaerobiosis (Grbic-Galic y col., 1990), en un consorcio anaeróbico enriquecido con estireno y ácido ferúlico. Pese a la detección de un gran número de intermediarios aromáticos, la principal ruta de degradación del estireno en condiciones de anaerobiosis consiste en su conversión en ácido fenilacético (AFA) vía 2-feniletanol y fenilacetaldehído. El AFA generado es transformado en ácido benzoico vía bencilalcohol y benzaldehído de forma parecida a la ruptura en meta de la degradación del tolueno codificada por el plásmido TOL, pWVO (Grbic-Galic y col., 1990) (Figura 2.7).

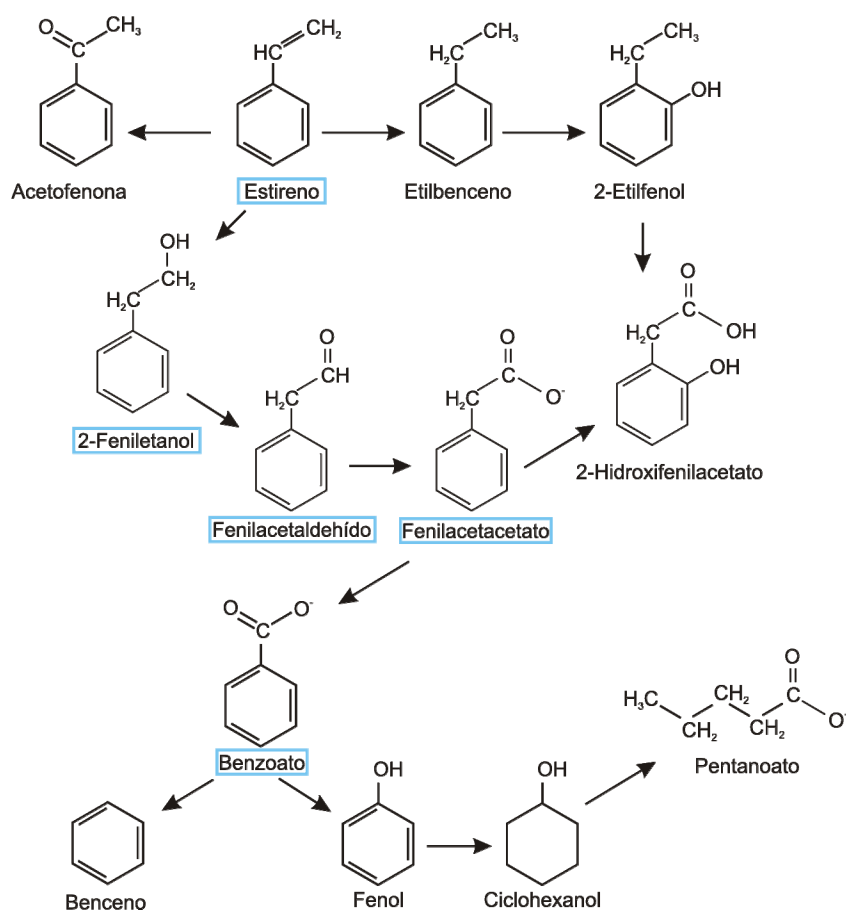


FIGURA 2.7. Posibles rutas del metabolismo anaeróbico del estireno. Los compuestos de la ruta principal se han señalado con un recuadro azul. Basada en una figura de (Grbic-Galic y col., 1990). Modificada de (Alonso, 2002).

2.2.2. Metabolismo aeróbico del estireno.

Se han descrito dos vías principales para la degradación aeróbica del estireno, una de las cuales implica la oxidación inicial de la cadena lateral de vinilo (O'Connor y col., 1996), mientras que la otra se basa en un ataque directo al núcleo aromático (Warhurst y col., 1994).

a) Ataque directo del anillo aromático.

Existen evidencias de que algunos microorganismos degradan el estireno mediante el ataque inicial de una oxigenasa sobre el anillo aromático. Así, se ha descrito que cuando se cultiva *P. putida* MST en estireno se detecta la acumulación de 1,2-hidroxi-3-vinil-3-ciclohexeno en el medio de cultivo (Bestetti y col., 1984). Un ataque directo al anillo aromático también ha sido propuesto en el caso de *Xanthobacter* sp. 124X (Hartmans y col., 1989). Sin embargo, tan sólo en *R. rhodochrous* NCIMB 13259 (Warhurst y col., 1994) se ha demostrado, mediante estudios de cromatografía en capa fina y RMN, que la ruta de degradación del estireno tiene lugar mediante la hidroxilación inicial del anillo aromático para dar lugar a 3-vinilcatecol, que es metabolizado más tarde a través de un proceso de ruptura meta que implica la acción de las enzimas catecol 2,3-dioxigenasa, semialdehído hidrolasa, hidratasa, y aldolasa, para dar lugar finalmente a acetaldehído y piruvato.

b) Oxidación de la cadena lateral.

En condiciones aeróbicas, el estireno es generalmente metabolizado vía oxidación de su cadena lateral vinilo (Hartmans y col., 1989; O'Connor y col., 1996). La literatura indica la existencia de una ruta predominante para la oxidación de la cadena lateral del estireno, que implica la conversión de dicho compuesto en AFA, aunque existen algunos trabajos que indican pequeñas variaciones en la misma. En *Pseudomonas*, las proteínas StyA, StyB, StyC, StyD y StyE han sido implicadas en este proceso (Figura 2.8).

El ataque a la cadena de vinilo implica un primer paso de oxidación catalizado por una estireno monooxigenasa de dos componentes para dar lugar a la formación del epóxido de estireno o epoxiestireno (Hartmans y col., 1990; Marconi y col., 1996; Beltrametti y col., 1997; Panke y col., 1998; Velasco y col., 1998; O'Leary y col., 2001; Otto y col., 2004). StyA es el componente principal, tiene actividad oxigenasa, dependiente de FADH₂, y cataliza la oxidación del doble enlace de la cadena lateral vinilo del estireno generando epoxiestireno. StyB presenta actividad FAD reductasa, es responsable de la regeneración del FADH₂ utilizado en la oxidación del estireno a expensas de la oxidación de NADH, y es el componente esencial para la completa actividad de la estireno monooxigenasa (Beltrametti y col., 1997).

En la mayoría de los casos, el epoxiestireno es isomerizado a fenilacetaldehído por la acción de la epoxiestireno isomerasa StyC (Hartmans y col., 1990; Utkin y col., 1991; Beltrametti y col., 1997; Velasco y col., 1998), aunque también se ha descrito la conversión del epoxiestireno en 2-feniletanol

en una cepa de *E. coli* que expresa un fragmento de DNA de 2,3 kb del cromosoma de *P. fluorescens* ST (Marconi y col., 1996).

Por último, el fenilacetaldehído es transformado en AFA gracias a una fenilacetaldehído deshidrogenasa dependiente de NADH (StyD). Esta actividad enzimática se ha descrito en varios microorganismos, como son *E. coli* (Ferrández y col., 1997; Hanlon y col., 1997), *Corynebacterium* sp. ST-10 (Itoh y col., 1996) y varias *Pseudomonas* (Hartmans y col., 1990; Beltrametti y col., 1997; Panke y col., 1998; Velasco y col., 1998). La reducción del fenilacetaldehído a 2-feniletanol mediante la actividad catalítica de una fenilacetaldehído reductasa ha sido descrita para *Xanthobacter* sp. 124X y *Corynebacterium* sp. ST-10 (Itoh y col., 1997; Jones y col., 1997).

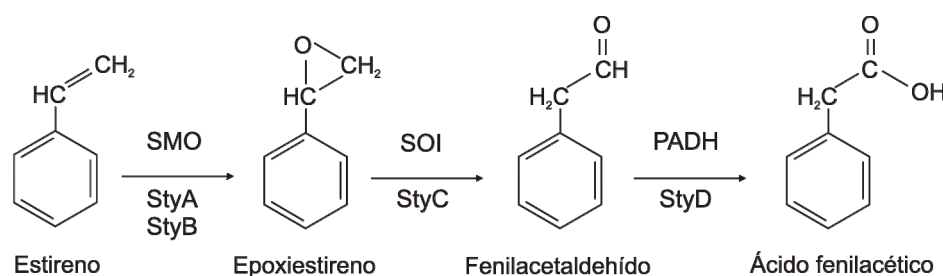
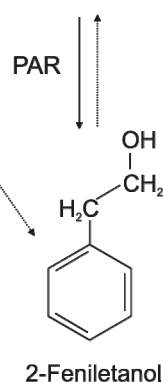


FIGURA 2.8. Pasos iniciales de la ruta de degradación del estireno en varias bacterias. SMO: estireno monooxigenasa; SOI: epoxiestireno isomerasa; PADH: fenilacetaldehído deshidrogenasa. La actividad fenilacetaldehído reductasa (PAR) ha sido caracterizada en *Corynebacterium* sp. ST-10 (Itoh y col., 1997), aunque su actividad se conoce también en *E. coli* (Beltrametti y col., 1997). En *Pseudomonas*: StyA y StyB, estireno monooxigenasa; StyC, epoxiestireno isomerasa; StyD, fenilacetaldehído deshidrogenasa.



Si bien se pensó en un principio que el 2-feniletanol era un intermediario de la ruta de oxidación, estudios más recientes parecen excluir esta posibilidad y apuntan a que en realidad este compuesto es un metabolito lateral que se genera y se excreta cuando los niveles de fenilacetaldehído intracelulares pueden tener efectos tóxicos. Se ha comprobado que la formación de 2-feniletanol no se produce por la reducción directa del epoxiestireno, sino del fenilacetaldehído generado por acción de la epoxiestireno isomerasa. Se han propuesto dos rutas divergentes para la mineralización del estireno en *Corynebacterium* sp. ST-10 (Itoh y col., 1997), la primera produciendo la oxidación del fenilacetaldehído en AFA y la segunda la reducción del fenilacetaldehído a 2-feniletanol. Sin embargo, el hecho de que la mayoría de las investigaciones sugieran que el metabolismo del 2-feniletanol se produce mayoritariamente a través de la formación de AFA, así como la baja especificidad por el sustrato que exhibe la fenilacetaldehído reductasa descrita en *Corynebacterium* sp.

ST-10, estarían en consonancia con una posible función destoxicadora de esta enzima (Alonso, 2002).

Se ha escrito que en *P. putida* CA-3 StyE es el transportador específico de estireno al interior celular, siendo su presencia esencial para que la degradación del estireno tenga lugar (Mooney y col., 2006). La proteína StyE presenta similitud con algunas proteínas de membrana bacterianas, especialmente con las implicadas en el transporte de compuestos aromáticos como son CumH de *P. fluorescens* IP01 (Habe y col., 1996), XylN de *P. putida* PAW1 (Kasai y col., 2001), TbuX de *Ralstonia picketti* PK01 (Kahng y col., 2000) y TodX de *P. putida* F1 (Wang y col., 1995). En cambio, en *Pseudomonas* sp. Y2 y *P. fluorescens* ST el gen *styE* se encuentra truncado, lo que parece indicar que su producto no juega un papel esencial en el metabolismo del estireno en estas bacterias.

Las distintas proteínas Sty de *Pseudomonas* sp. Y2 presentan una alta identidad con sus homólogas descritas en otras *Pseudomonas*, como aparece reflejado en la Tabla 2.3.

TABLA 2.3. Porcentaje de identidad de las proteínas Sty de *Pseudomonas* sp. Y2 (%) con las proteínas análogas descritas en otras bacterias.

Microorganismo	StyS	StyR	StyA	StyB	StyC	StyD	StyE
<i>P. fluorescens</i> ST	89,0	97,0	94,0	94,0	92,0	97,0	N.D.
<i>Pseudomonas</i> sp. VLB120	91,0*	97,0	94,0	98,0	97,0	96,0	N.D.
<i>P. putida</i> CA-3	N.D.	N.D.	95,0	90,0	N.D.	N.D.	98,0
<i>P. putida</i> SN-1	N.D.	N.D.	94,0	90,0	95,0	98,0	N.D.
<i>P. putida</i> S-12	N.D.	N.D.	94,0	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.

N.D.: secuencia no localizada en la base de datos de secuencia GenBank. * Porcentaje de identidad de los últimos 258 aminoácidos, ya que se desconoce la secuencia completa de StdS en *Pseudomonas* sp. VLB120. Código de acceso de las secuencias depositadas en GenBank: *P. fluorescens* ST (AF024619, Z92524), *Pseudomonas* sp. VLB120 (AF031161); *P. putida* CA-3 (EU155061, AY450871), *P. putida* SN-1 (DQ177365), *P. putida* S-12 (Q33471).

La conversión del estireno en AFA se ha denominado ruta superior de degradación del estireno (O'Connor y col., 1995; Velasco y col., 1998), y ha sido descrita en algunas de las bacterias estudiadas hasta la fecha, como son *Xanthobacter* sp. 124X (Hartmans y col., 1989), *Xanthobacter* sp. S5 (Hartmans y col., 1990), *P. putida* CA-3 (O'Connor y col., 1995), *P. fluorescens* ST (Marconi y col., 1996), *Pseudomonas* sp. VLB120 (Panke y col., 1999) y *Pseudomonas* sp. Y2 (Utkin y col., 1991; Velasco y col., 1998). Una versión truncada de la ruta superior parece operar en *Corynebacterium* sp. AC-5 (Itoh y col., 1996).

Las sucesivas etapas de degradación del AFA en condiciones aerobias incluyen su inicial conversión en FA-CoA (Olivera y col., 1994; Miñambres y col., 1996; Ferrández y col., 1998) seguida de una serie de transformaciones enzimáticas hasta intermediarios del ciclo de los ácidos tricarbóxicos (TCA). El conjunto de estas etapas se conoce como ruta inferior de degradación del estireno (Figura 2.9).

Los estudios en *E. coli* K-12 (Ismail y col., 2003) y *E. coli* W (Nogales y col., 2007) aportan la propuesta más completa hasta la fecha de los pasos de la ruta catabólica del AFA. Según el modelo propuesto, el AFA se transforma en FA-CoA mediante la actividad fenilacetil-CoA ligasa PaaF, como ya había sido demostrado anteriormente (Martínez-Blanco y col., 1990; Ferrández y col., 1998; Olivera y col., 1998). El FA-CoA es atacado por el complejo fenilacetil-CoA (di)oxigenasa/reductasa (PaaGHIJK), formándose un derivado *cis*-dihidrodiol de FA-CoA. Este intermediario no aromático sufre la apertura del anillo en una serie de reacciones en las que están implicadas las proteínas PaaB (enoil-CoA hidratasa/isomerasa), PaaN (enzima de ruptura del anillo, con módulos aldehído deshidrogenasa y MaoC-deshidratasa) y PaaE (cetotiolasa). El producto de la ruptura del anillo, el 3-hidroxiadipil-CoA, se degrada a través de un proceso similar a una β -oxidación, en el cual se transforma vía β -cetoadipil-CoA en succinil-CoA y dos moléculas de acetil-CoA. Estas últimas etapas están catalizadas por las proteínas PaaA (enoil-CoA hidratasa/isomerasa) y PaaC (3-hidroxiacil-CoA deshidrogenasa), que convierten el 3-hidroxiadipil-CoA en β -cetoadipil-CoA, y posteriormente por PaaE (cetotiolasa), que transforma el β -cetoadipil-CoA en succinil-CoA y acetil-CoA (Nogales y col., 2007). La proteína PaaD, implicada en propuestas iniciales, parece no tener un papel esencial en el catabolismo del AFA (o bien su función es reemplazada por alguna otra proteína de la bacteria), puesto que mutantes de *E. coli* K-12 en el gen que la codifica no ven afectada su capacidad de crecimiento empleando AFA como única fuente de carbono (Ismail y col., 2003).

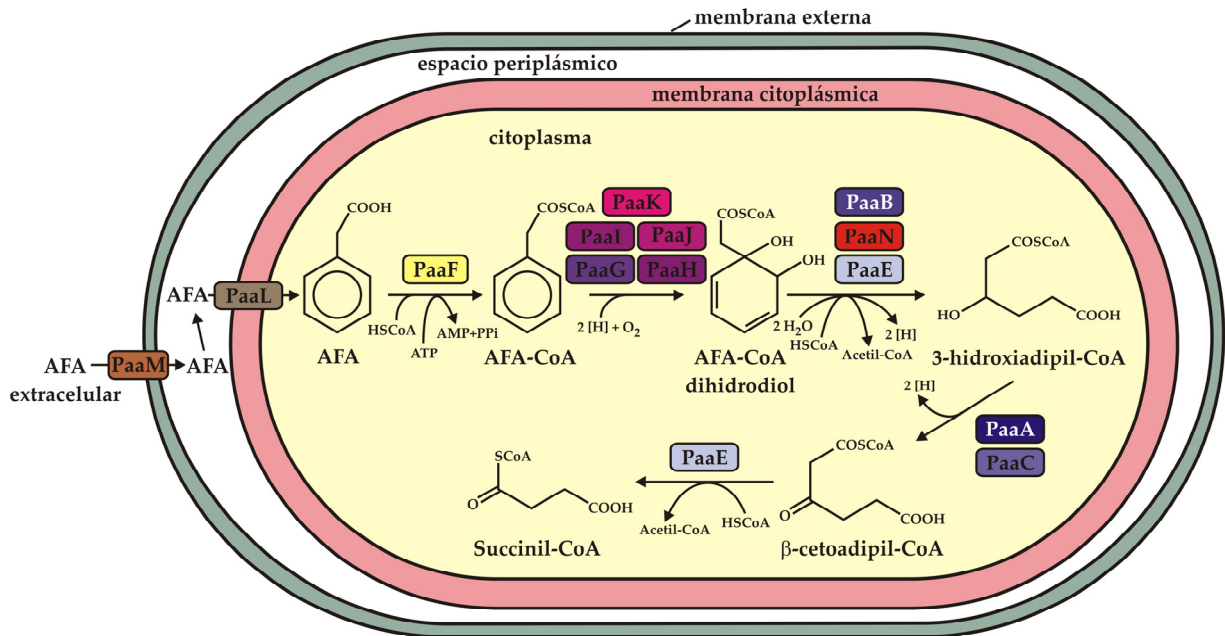


FIGURA 2.9. Ruta inferior del catabolismo del estireno. Esquema con la posible ruta catabólica del AFA, basada en los datos obtenidos en *E. coli* K-12 (Ismail y col., 2003) y *E. coli* W (Nogales y col., 2007). Se ha incluido el sistema de transporte (PaaM, porina; PaaL, permeasa) que se encuentra en *P. putida* U (Olivera y col., 1998). Figura tomada de (Bartolomé-Martín, 2006).

Se ha descrito que la degradación de otros compuestos aromáticos estructuralmente relacionados con el AFA, a parte del estireno, convergen con esta ruta, que por ello adquiere una gran importancia como ruta central en el metabolismo de compuestos aromáticos. El conjunto de rutas catabólicas convergentes han recibido el nombre de catabolón del FA-CoA (Olivera y col., 1998; Luengo y col., 2001) (Figura 2.10), que se presenta como una unidad funcional compleja integrada por diferentes rutas catabólicas que se encuentran reguladas de forma coordinada y que llevan a cabo la degradación de compuestos estructuralmente parecidos hasta un intermediario común. En este caso, el intermediario común es el FA-CoA (Figura 2.10).

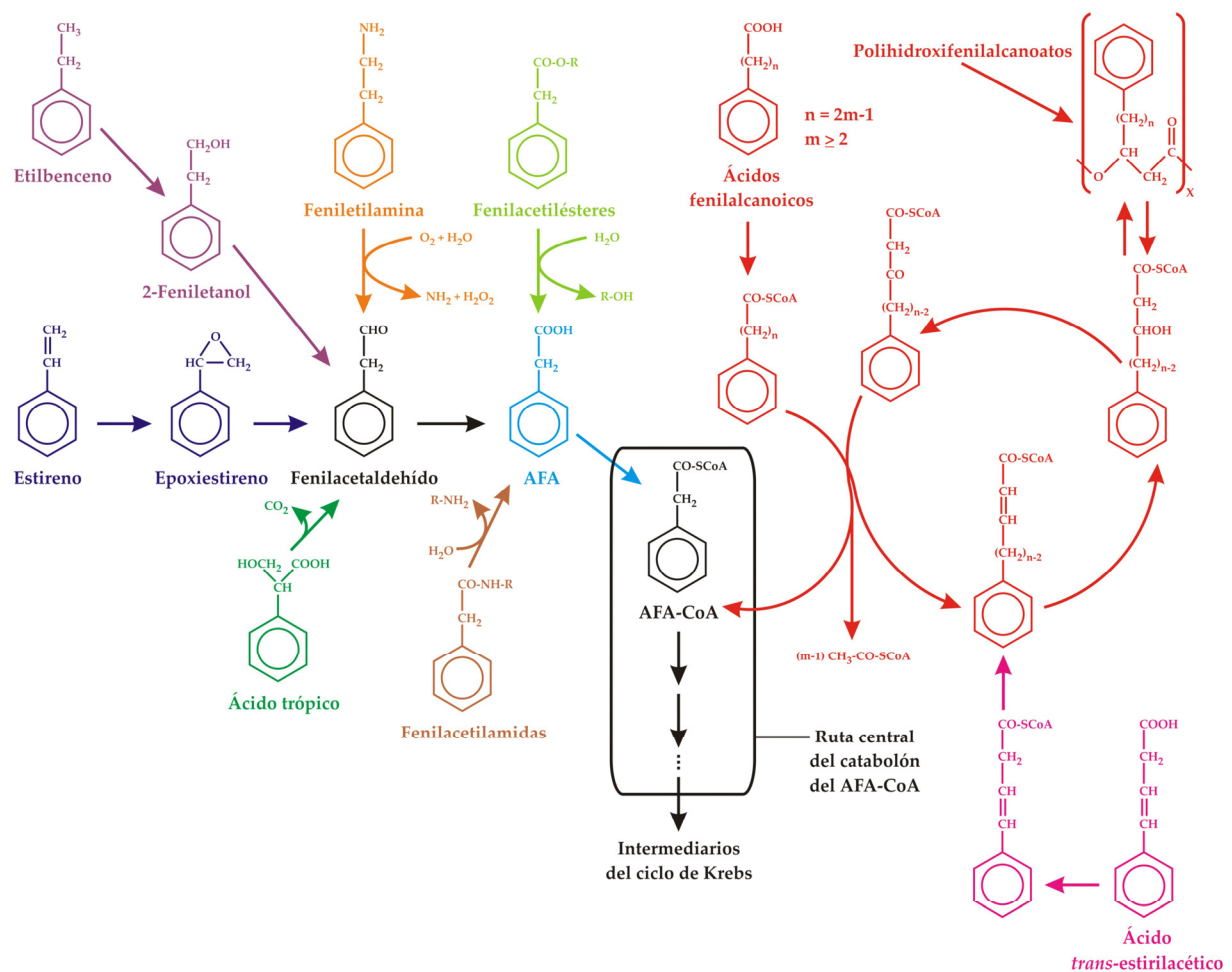


FIGURA 2.10. Organización bioquímica del catabolón del FA-CoA. Tomada de (Luengo y col., 2001).

2.3. Genética de la degradación del estireno.

En general, los genes responsables de la degradación de los compuestos aromáticos se encuentran agrupados dando lugar a conjuntos génicos (*clusters*) que codifican las actividades enzimáticas de las distintas rutas catabólicas y están distribuidos a lo largo del cromosoma bacteriano o del DNA plasmídico. A su vez, los grupos génicos están organizados en operones catabólicos, genes de transporte y genes reguladores.

2.3.1. Organización genética de la ruta *sty*.

En 1997 se publicó por primera vez la caracterización a nivel genético de la ruta superior de degradación del estireno o ruta *sty* en *P. fluorescens* ST (Beltrametti y col., 1997). Posteriormente este conjunto de genes ha sido caracterizado total o parcialmente en otras estirpes de *Pseudomonas*, como son *Pseudomonas* sp. Y2 (Velasco y col., 1998); *Pseudomonas* sp. VLB120 (Panke y col., 1998) y *P. putida* CA-3 (O'Leary y col., 2001; O'Leary y col., 2002).

La localización de los genes responsables de la ruta *sty* se ha definido para *P. fluorescens* ST (Beltrametti y col., 1997) y *Pseudomonas* sp. Y2 (Velasco y col., 1998), confirmándose que se encuentran en el cromosoma bacteriano.

Los genes *sty* de *Pseudomonas* están organizados en dos operones localizados en posiciones contiguas en el cromosoma. Son los operones *styABCDE* y *stySR*, que se transcriben como dos RNAs mensajeros policistrónicos (Velasco y col., 1998; Santos y col., 2000; O'Leary y col., 2001) (Figura 2.11). Los genes *styABCD* codifican las actividades enzimáticas encargadas de la transformación del estireno en AFA, siendo su función, por tanto, catabólica. Los genes *stySR* codifican proteínas con función reguladora y son responsables del control de la transcripción de los genes *sty* catabólicos en presencia de estireno. El grado de conservación de la organización de los genes *sty*, así como la similitud en la secuencia de los productos codificados, permite suponer un mismo origen evolutivo de todos ellos (Alonso, 2002) (Figura 2.11).

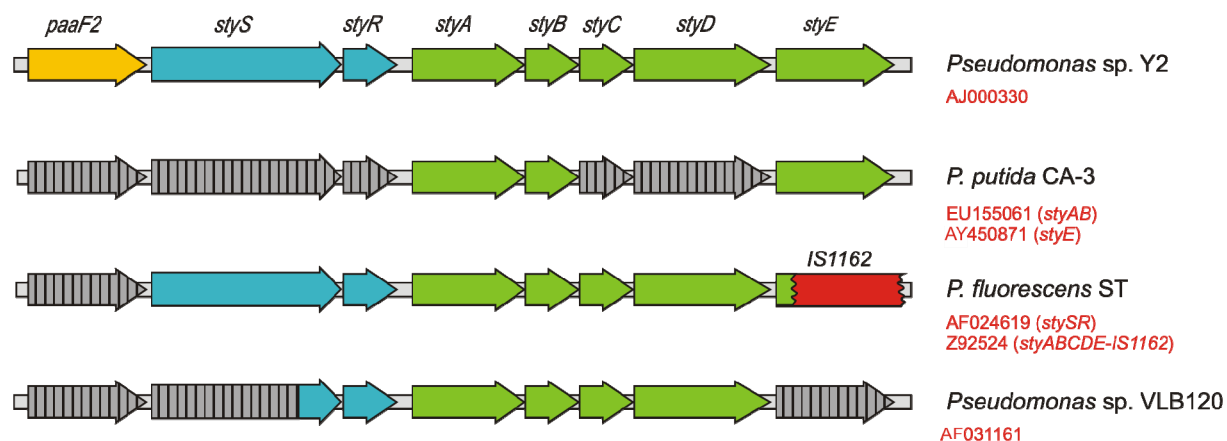


FIGURA 2.11. Genes implicados en la degradación aerobia del estireno en distintas *Pseudomonas*. Comparación de los genes *sty* de diferentes bacterias del género *Pseudomonas*. A la derecha de cada esquema se señala el microorganismo en el que se ha caracterizado la ruta y el código de acceso de las secuencias depositadas en el GenBank. Las áreas rayadas indican las regiones que no se encuentran disponibles en las bases de datos, pero de cuya existencia se tienen evidencias experimentales. El gen *styE* se encuentra interrumpido por la secuencia de inserción IS1162 en *P. fluorescens* ST, aunque es funcional en *P. putida* CA-3 (Mooney y col., 2006). Modificado a partir de (Alonso, 2002; O'Leary y col., 2002; Bartolomé-Martín, 2006)

3.2. Organización genética de la ruta *paa*.

Los genes responsables del catabolismo aeróbico del AFA han sido identificados y caracterizados en las bacterias degradadoras de estireno *Pseudomonas* sp. Y2 (Alonso y col., 2003; Bartolomé-Martín y col., 2004), *P. fluorescens* ST (di Gennaro y col., 2007) y, parcialmente en *P. putida* CA-3 (O'Connor y col., 1997; O'Leary y col., 2005). Estos genes también han sido identificados y completamente caracterizados en otros microorganismos que carecen de la ruta *sty*, como son *E. coli* W (Ferrández y col., 1998), *P. putida* U (Olivera y col., 1998; Luengo y col., 2001) y *A. Evansii* (Mohamed y col., 2002; Rost y col., 2002). Además, se ha descrito la presencia de los genes *paa* en otras bacterias, como es el caso de *P. putida* KT2440 (Luengo y col., 2001; Jiménez y col., 2002), *Rhodococcus* sp. RHA1 (Navarro-Llorens y col., 2005), *Arthrobacter oxydans* CECT386 (Navarro-Llorens y col., 2008) e incluso en especies del género *Thermus* (Kunishima y col., 2005; Song y col., 2006). Precisamente en *Pseudomonas* sp. Y2 se ha identificado la coexistencia de dos *clusters* génicos funcionales que codifican las actividades enzimáticas responsables de la degradación del AFA: el *cluster paa1*, que se encuentra localizado a continuación de los genes *sty*, y el *cluster paa2*, que se localiza en otro lugar del cromosoma.

La organización de los genes *paa* en distintas estirpes bacterianas presenta algunas diferencias, como puede observarse en la Figura 2.12. Así, en *E. coli*, los genes *paa* catabólicos se agrupan en dos operones divergentes (*paaGHIJKABCDEF* y *paaN*), mientras que los genes reguladores *paaXY* constituyen el tercer operón (Ferrández y col., 2000). En *P. putida* U los genes *paa* se encuentran organizados en cinco operones contiguos: *paaABCEF*, *paaGHIJK*, *paaLMN*, *paaY* y *paaX* (Olivera y col., 1998). En el caso de *Pseudomonas* sp. Y2, datos previos sugieren la existencia de 4 operones en el *cluster paa1*: *paaABCDEF*, *paaGHJK*, *paaLN* y *paaN2YX*; a continuación, en la región que separa

el *cluster paa1* del *cluster* génico *sty*, se localiza el gen *paaF2*, que parece transcribirse independientemente (Alonso y col., 2003). En el *cluster paa2* se ha propuesto la existencia de cuatro operones: *paaY2X2*, *paaA2B2C2D2E2F2*, *paaG2H2I2J2K2* y *paaP2L2MN3* (Bartolomé-Martín y col., 2004).

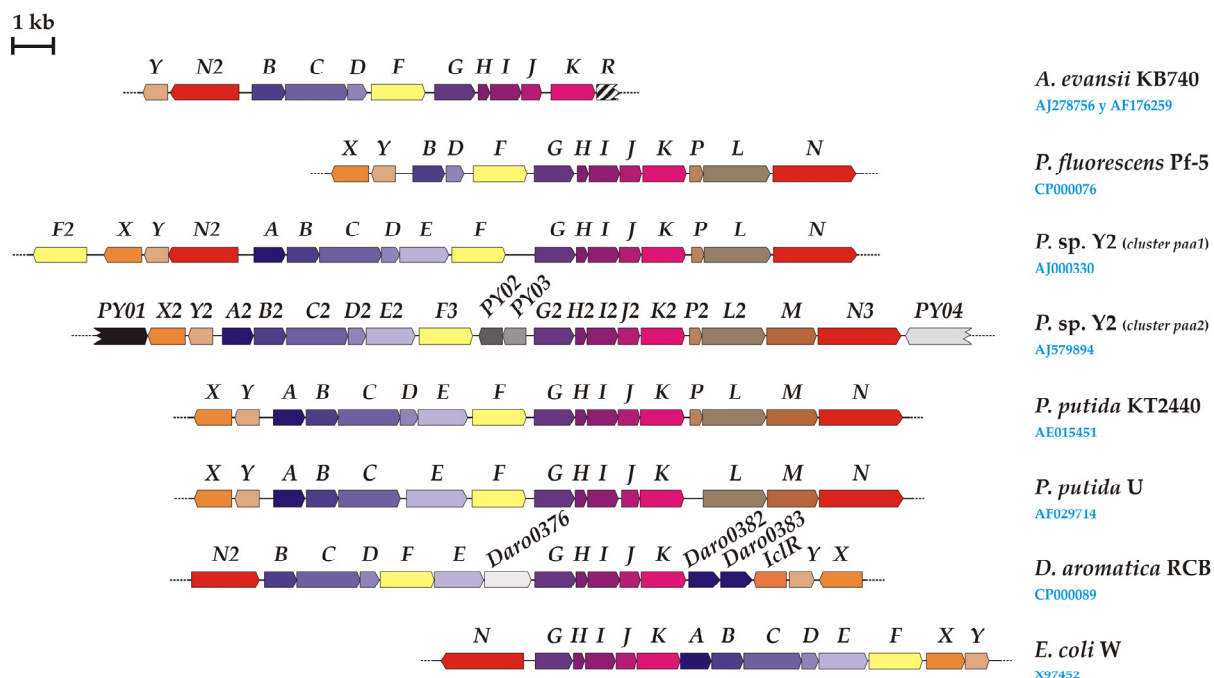


Figura 2.12. Comparación de la organización de los clusters *paa* en varios microorganismos. Los números de acceso en el GenBank de las secuencias correspondientes se muestran en azul. Se ha utilizado la nomenclatura consenso propuesta por Luengo y col. (2001), denominando *paaN2* a los genes de *A. evansii* KB740 y *D. aromatica* RCB similares a *paaN2* de *Pseudomonas* sp. Y2. El gen *paaR* de *A. evansii* KB740 codifica un regulador transcripcional de la familia TetR, que podría realizar las funciones del represor de la ruta, PaaX, ausente en esta bacteria (Mohamed y col., 2002; Rost y col., 2002). Los genes *Daro0376*, *Daro0382*, *Daro0383* y *IclR* de *D. aromatica* RCB, al igual que los genes *PY01*, *PY02*, *PY03* y *PY04* del *cluster paa2* de *Pseudomonas* sp. Y2, parecen no estar relacionados con el catabolismo del AFA. Figura tomada de Bartolomé-Martín, 2006.

Los genes *paaABCDEFGHIJK* codifican las correspondientes proteínas Paa, implicadas en la catálisis de las transformaciones que convierten el AFA en intermediarios del TCA (apartado 2.2.2).

El gen *paaX* codifica la proteína reguladora PaaX, cuyo papel como represor de la transcripción de los genes *paa* ha sido probado (Ferrández y col., 2000). El papel de la proteína PaaY es poco conocido aún, aunque parece intervenir en el proceso de inducción de la ruta, ya que su ausencia retrasa de forma significativa el crecimiento en AFA de *E. coli* W (Fernández, 2005). En *P. putida* U, *P. putida* KT2440 y *Pseudomonas* sp. Y2 ambos genes también están contiguos, aunque su orden es inverso (*paaYX*).

En *P. putida* U, *P. putida* KT2440 y *P. fluorescens* ST, aparecen dos genes que no están presentes en *E. coli* y cuya función puede estar relacionada con el transporte del AFA al interior celular: el gen *paaM*, que podría codificar una porina que conduciría el AFA al espacio periplásmico a través de la

membrana bacteriana externa, y el gen *paaL*, que podría codificar una permeasa que introduciría el AFA en la célula atravesando la membrana citoplásmica (Olivera y col., 1998). Estos dos genes también se han identificado en el *cluster paa2* *Pseudomonas* sp. Y2. En el *cluster paa1* de esta bacteria el gen *paaM* está ausente. Finalmente se ha propuesto la existencia en los dos *clusters paa* de *Pseudomonas* sp. Y2 de un gen *paaP*, cuya confirmación funcional está pendiente, pero cuya secuencia se ha descubierto también en los *cluster paa* de otras bacterias (Bartolomé-Martín y col., 2004).

2.4. Regulación del catabolismo aerobio del estireno: regulación las rutas *sty* y *paa*.

2.4.1. Regulación de la ruta *sty*.

2.4.1.1. Regulación del operón *sty* catabólico.

La transcripción del operón catabólico *styABCD* es dependiente de la presencia de estireno en el medio, lo que ha sido demostrado para distintas estirpes de *Pseudomonas*, como son *Pseudomonas* sp. Y2 (Velasco y col., 1998), *P. fluorescens* ST (Santos y col., 2000) y *P. putida* CA-3 (O'Leary y col., 2001). Estudios realizados en *E. coli* con elementos de la ruta *sty* de *Pseudomonas* sp. Y2, *Pseudomonas* sp. VLB120 y *P. fluorescens* ST, junto con experimentos de unión proteína-DNA, han permitido concluir que las proteínas StyS y StyR son imprescindibles para que tenga lugar la inducción dependiente de estireno de la transcripción de los genes *sty* catabólicos (Panke y col., 1998; Velasco y col., 1998; Santos y col., 2000; Leoni y col., 2005). También se ha demostrado en *P. putida* CA-3 que la expresión de los genes *sty* catabólicos es totalmente dependiente de la expresión de los genes *stySR* (O'Leary y col., 2001). Es importante señalar el papel que juega el AFA, producto final de la ruta, como represor de la expresión de los genes *sty* en *Pseudomonas* sp. Y2 (Alonso, 2002), *P. putida* CA-3 (O'Leary y col., 2001) y *P. fluorescens* ST (Santos y col., 2000), aunque el mecanismo de esta represión es todavía desconocido. La expresión de los genes *sty* se encuentra así mismo sometida a represión catabólica por otras fuentes de carbono, aunque, en este punto, existen algunas diferencias entre las distintas estirpes de *Pseudomonas*.

2.4.1.2. El sistema regulador StyS-StyR.

Los genes *stySR*, implicados en la regulación de la ruta *sty*, codifican dos proteínas, StyS y StyR, que presentan una elevada similitud en su composición en aminoácidos con miembros de la familia de sistemas de transducción de señales de dos componentes (Reizer y Saier, 1997). Ambos genes se agrupan formando parte de un mismo operón, constituyendo así una única unidad transcripcional (O'Leary y col., 2001). Los sistemas de regulación de dos componentes no son comunes en la regulación de las rutas de degradación de compuestos aromáticos, y son muy pocos los que se han

descrito; son los casos de la degradación del tolueno en *P. putida* F1 (Lau y col., 1997) y *Thauera* sp. T1 (Coschigano y Young, 1997) y de la degradación de bifenilos en *Rhodococcus* sp. M5 (Labbé y col., 1997).

Los sistemas de transducción de señales de dos componentes están formados por una proteína sensora con actividad histidina quinasa y un regulador de la respuesta. En presencia de una señal química adecuada, el componente HK cataliza la autofosforiación dependiente de ATP de un residuo de histidina (His) específico, transfiriendo seguidamente el grupo fosforilo a un residuo de aspártico (Asp) del dominio N-terminal del regulador de respuesta. Esta fosforilación dispara la activación del dominio C-terminal de la proteína reguladora, que se une entonces a secuencias específicas del DNA, en la mayoría de los casos, y regula la iniciación de la transcripción a partir de un determinado promotor (Milani y col., 2005).

a) La proteína sensora StyS.

Es el mayor de los dos componentes del sistema y presenta una gran similitud con otras proteínas quinasas sensoras, particularmente con TodS y TutC, que forman parte del sistema de regulación del tolueno en *P. putida* F1 (Lau y col., 1997) y *P. putida* DOT-T1E (Mosqueda y Ramos, 2000), y en *Thauera* sp. T1 (Coschigano y Young, 1997), respectivamente. Estas proteínas, junto con la quinasa sensora BpdS de *Rhodococcus* sp. M5 que responde a bifenilo y clorobifenilo (Labbé y col., 1997), son las únicas proteínas sensoras pertenecientes a sistemas de regulación de dos componentes implicados en el metabolismo de compuestos aromáticos descritas hasta la fecha.

La proteína StyS podría incluir en su estructura dos dominios histidina quinasa (HK1 y HK2), dos dominios sensores PAS y un dominio receptor del grupo fosfato (Velasco y col., 1998; O'Leary y col., 2002). Junto con StyS, TodT es la única histidina quinasa conocida que contiene dos núcleos quinasa perfectamente duplicados (Coschigano y Young, 1997; Lau y col., 1997). Los dominios sensores PAS se encuentran generalmente en proteínas sensoras relacionadas con la detección de los niveles de oxígeno, el potencial reductor y el nivel de energía intracelular (Taylor y Zhulin, 1999).

El mecanismo exacto por el que StyS detecta la presencia del estireno todavía no está claro. El primer dominio PAS es muy similar al primer módulo sensor de TodS (51 % de identidad), responsable de la detección del tolueno en *P. putida* F1 (Busch y col., 2007), lo que hace probable que el primer módulo sensor de StyS sea responsable de la detección del estireno. Así, se ha sugerido que el primer dominio PAS podría estar implicado en la detección del estireno extracelular, mientras que el otro dominio PAS podría sensar la presencia de estireno como resultado de un potencial redox alterado en la célula (Taylor y Zhulin, 1999; Santos y col., 2000; Milani y col., 2005).

Los módulos HK caracterizados en otras proteínas no sólo tienen una función catalítica, unión al ATP y transferencia del grupo fosfato desde el ATP hasta la histidina receptora, sino que también juegan un papel importante en la dimerización (Dutta y col., 1999). Debido a ello, es muy probable que StyS actúe como homodímero.

b) El regulador de respuesta StyR.

La proteína StyR pertenece a la subfamilia FixJ/NarL de reguladores de respuesta (RR) y presenta una gran similitud con muchos reguladores de respuesta de sistemas de transducción de señales de dos componentes, como es el caso de TodT (Lau y col., 1997) y TutB (Coschigano y Young, 1997), pertenecientes al sistema de regulación del tolueno. Recientemente se ha caracterizado la estructura de StyR de *P. fluorescens* ST (Milani y col., 2005) mediante cristalización y se ha propuesto así mismo un mecanismo de acción para este RR. También se han llevado a cabo estudios estructurales y de funcionalidad con StyR de *Pseudomonas* sp. Y2 (Rodes, 2007).

StyR presenta dos dominios diferenciados, el dominio regulador N-terminal y el dominio C-terminal de unión al DNA, entre los que existe una región conectora que los mantiene completamente separados, permitiendo que puedan acceder a StyS, para su fosforilación, y al DNA, respectivamente (Milani y col., 2005). El dominio receptor/regulador N-terminal presenta el plegamiento una estructura semejante a la de otros reguladores de respuesta (Robinson y col., 2003), como CheY (Volz y Matsumura, 1991), NarL (Baikalov y col., 1996), PhoB (Solá y col., 1999) o FixJ (Birck y col., 1999). El dominio C-terminal de StyR de unión al DNA presenta el plegamiento típico de la subfamilia FixJ/NarL compuesto por cuatro hélices (α_6 - α_9), dos de las cuales forman un motivo HTH (*helix turn helix*) de unión al DNA. Los dominios N- y C-terminal se encuentran separados por una secuencia conectora, también denominada *Q-linker* debido a su alto contenido en residuos de glutamina (Wootton y Drummond, 1989). A diferencia de lo que ocurre para otros reguladores de respuesta, la región conectora de StyR mantiene a los dominios N- y C-terminal de la proteína separados como consecuencia de la disposición extendida y helicoidal que adopta el conector (Milani y col., 2005; Rodes, 2007). La estructura terciaria de StyR permite que la mayor parte de su región C-terminal se encuentre expuesta, lo que permite su interacción con el DNA.

El mecanismo propuesto para la activación de la proteína StyR de *Pseudomonas* sp. Y2 (Rodes, 2007) implica que la proteína, inicialmente desfosforilada y libre, sería fosforilada por StyS, lo que provocaría su dimerización y unión al DNA. La dimerización y la unión al DNA de StyR pueden ocurrir de forma simultánea y ser independientes de la fosforilación, aunque el porcentaje de StyR dimérica y unida al DNA es mucho menor en ausencia que en presencia de fosforilación. Además, la fosforilación es imprescindible para que StyR active el proceso de transcripción de los genes *sty* catabólicos (Rodes, 2007). Un comportamiento similar se ha descrito para StyR de *P. fluorescens* ST (Leoni y col., 2003; Milani y col., 2005) y para el regulador de respuesta PhoP de *Salmonella enterica* (Perron-Savard y col., 2005). En el caso de StyR la dimerización es imprescindible para el reconocimiento y la unión a las secuencias palindrómicas de DNA, y por tanto para su actividad (Rodes, 2007).

2.4.1.3. El promotor P_{styA} .

El estudio de la región promotora P_{styA} de *Pseudomonas* sp. Y2 (Velasco y col., 1998) descubrió la existencia de una secuencia palindrómica (5'-ATAAACCATGGTTTAT-3') centrada en la posición -41, que se denominó *StyRbox* (Figura A.1 del Apéndice), y que es prácticamente idéntica a la descrita para la unión de TodT al promotor de *todX* (5'-ATAAACCATCGTTTAT-3') (Lau y col., 1997). El sitio +1 de inicio de la transcripción se encuentra 33 nt antes del codón de inicio de *styA*. La región P_{styA} presenta una caja -10 extendida (TGTTAGCTT) y carece de la caja -35 típica de los promotores σ^{70} , implicada en el reconocimiento del promotor por parte del factor σ^{70} de la RNA polimerasa. StyR contiene un dominio de unión al DNA similar al de los reguladores de respuesta de la clase 3, cuya interacción con la RNA polimerasa y los distintos factores sigma ha sido descrita (Reizer y Saier, 1997). La unión de StyR al sitio *StyRbox* implica que StyR, una vez unido al DNA, estaría próximo al sitio que, en otros promotores, recibe al factor σ^{70} , por lo que es posible que el mecanismo de actuación de StyR implique la interacción de esta proteína con el factor σ^{70} o con alguna de las subunidades que componen el *core* de la RNA polimerasa, de forma que podría atraer a ésta hacia la caja -10 extendida de P_{styA} , iniciándose así la transcripción de los genes *sty* catabólicos (Velasco y col., 1998; O'Leary y col., 2001). Posteriormente se ha propuesto la existencia de tres sitios de unión para la proteína StyR, en la región P_{styA} de *P. fluorescens* ST: además del sitio STY2 (que coincide con la *StyRbox* de *Pseudomonas* sp. Y2), se proponen otros dos sitios de media (STY1) y baja afinidad (STY3) por StyR, en relación con la afinidad de la proteína por el sitio STY2, definido como de alta afinidad (Leoni y col., 2005). En *P. fluorescens* ST se ha sugerido que la unión de StyR al promotor P_{styA} tiene lugar de forma cooperativa (Leoni y col., 2003; Leoni y col., 2005). El sitio STY1 se encuentra situado delante del sitio STY2 y solapando parcialmente con el sitio de unión para IHF, constituyendo junto a éste la región URE (*Upstream Regulatory Element*) de este promotor. El factor IHF presenta un efecto potenciador de la activación de la transcripción de *styABCD* en *P. fluorescens* ST (Santos y col., 2002). Se ha propuesto que el sitio STY1 juega un papel positivo en la activación del promotor en condiciones de inducción, aunque también se apunta a que está involucrado en la represión del sistema mediada por glucosa en *P. fluorescens* ST (Leoni y col., 2005). Igualmente se ha propuesto que, cuando los niveles de StyR fosforilado presentes en la célula son muy elevados, dicha proteína activadora puede unirse también al sitio de regulación negativa STY3, situado al comienzo del gen *styA*, actuando entonces como represor de la transcripción (Leoni y col., 2003).

2.4.1.4. Regulación del operón *stySR*.

Poco se conoce acerca de la regulación del operón *stySR*, ya que la mayoría de los estudios realizados hasta la fecha se han centrado en la regulación del operón catabólico *styABCD*. Estudios de expresión llevados a cabo en *Pseudomonas* sp. Y2 y *P. putida* CA-3 han puesto de manifiesto que la expresión de *stySR* sólo es detectable en presencia de estireno (Velasco y col., 1998; O'Leary y col., 2001; Bartolomé-Martín, 2006), lo que indica o bien unos niveles de transcripción basales o bien una

baja estabilidad de los transcritos en ausencia del inductor. En cambio, la expresión de *stySR* en *P. fluorescens* ST parece ser constitutiva e independiente de la presencia o ausencia de estireno y de la fuente de carbono presente en el medio, aunque la transcripción de los genes *sty* catabólicos requiere la presencia de estireno (Santos y col., 2000).

2.4.1.5. Represión catabólica del sistema *sty*.

Algunas fuentes de carbono no aromáticas, como ácidos orgánicos y carbohidratos, producen una represión de la ruta de degradación del estireno en *P. putida* CA-3 y *P. fluorescens* ST (O'Connor y col., 1995; Santos y col., 2000; O'Leary y col., 2001). Sin embargo, el perfil de represión catabólica no es idéntico para ambas estirpes, como puede observarse en la Tabla 2.4. Los mecanismos por los que se produce la represión catabólica de la expresión de los genes *sty* permanecen desconocidos.

TABLA 2.4. Represión catabólica del sistema *sty* por distintas fuentes de carbono.

Estirpe	Fuentes de carbono que causan represión catabólica.	Fuentes de carbono no que causan represión catabólica.
<i>P. fluorescens</i> ST	Glucosa, acetato, glutamato, citrato, succinato*, lactato*, LB.	Arginina, glicerol.
<i>P. putida</i> CA-3	Citrato, glutamato.	Glucosa, succinato, acetato.

Los datos para *P. fluorescens* ST se han obtenido de (Santos y col., 2000). Los datos para *P. putida* CA-3 se han obtenido de (O'Connor y col., 1995; O'Leary y col., 2001). Las fuentes de carbono señaladas con un asterisco sólo ejercen una represión parcial.

2.4.2. Regulación de la ruta *paa*.

La expresión de los genes *paa* se induce en un medio con AFA (Ferrández y col., 1998; Olivera y col., 1998) aunque se ha demostrado, tanto en *E. coli* W (Ferrández y col., 2000) como en *P. putida* U (García y col., 2000), que el verdadero inductor de la ruta es el FA-CoA. Estudios llevados a cabo en *E. coli* W han puesto de manifiesto que la proteína PaaX actúa como represor transcripcional de los genes *paa* mediante su unión a las regiones promotoras y que, en presencia de FA-CoA, esa unión se deshace y la proteína se libera de sus secuencias operadoras, lo que permite que la transcripción tenga lugar (Ferrández y col., 2000). Este proceso ha sido descrito en *E. coli* W no sólo para la regulación de los promotores *Pa*, *Pz* y *Px* de los genes *paa* (Ferrández y col., 2000; Fernández, 2005), sino también para el gen *pac*, que codifica la penicilina G acilasa en *E. coli* W y *K. citrophila* (Galán y col., 2004; Kim y col., 2004).

La proteína PaaX ha sido clasificada dentro de la familia de reguladores transcripcionales de tipo GntR por similitud de secuencia, e incluida en una subfamilia formada por un conjunto de proteínas

similares al producto del gen *paaX* de *E. coli* W (Fernández, 2005). El extremo N-terminal de PaaX presenta un dominio HTH (*helix-turn-helix*) de unión al DNA. Los represores de tipo GntR ejercen su acción impidiendo bien la unión de la RNA polimerasa a la región promotora o bien la formación del complejo abierto de transcripción (Tropel y van der Meer, 2004).

La secuencia consenso de unión de PaaX a sus correspondientes regiones operadoras fue descrita en un principio tanto para *E. coli* W (Ferrández y col., 2000; Galán y col., 2004; Fernández, 2005) como para *Pseudomonas* sp. Y2 (Alonso y col., 2003; Bartolomé-Martín y col., 2004) como una secuencia palindrómica de 15 pb (5'-WWTRTGATTCGYGWT-3', siendo W=A ó T; Y=C ó T) y 14 pb (5'-WTWCTGTATCGCTT-3'), respectivamente. Estudios posteriores en *E. coli* W (Kim y col., 2004) permitieron describir un nuevo motivo de unión para PaaX, que engloba la secuencia anterior de 15 y la amplía, consistiendo en dos repeticiones invertidas de 6 pb separadas entre si por unas 27 pb (5'-TGATTC----27 pb----GAATCA-3').

La ruta *paa* se encuentra sometida a represión catabólica en presencia de glucosa en *P. putida* U (Olivera y col., 1998) y *E. coli* W (Ferrández y col., 2000; Fernández, 2005), pero no en *Pseudomonas* sp. Y2 (Bartolomé-Martín, 2006). En el caso de *E. coli* W, el efecto represor de la glucosa es mediado por CRP, y se ejerce exclusivamente sobre los promotores de los genes catabólicos (Ferrández y col., 2000; Fernández, 2005). Se ha comprobado que la regulación específica de estos genes a través del represor PaaX está sujeta a una regulación sobreimpuesta mediada por reguladores globales como CRP e IHF, que conectan la expresión de los genes catabólicos de la ruta *paa* al estado metabólico y energético de la célula (Ferrández y col., 2000).

3. *Pseudomonas* sp. Y2.

Este trabajo se ha centrado en el estudio de la regulación transcripcional de los genes responsables del catabolismo del estireno en *Pseudomonas* sp. Y2.

En 1991 se informó a la comunidad científica sobre el hallazgo de una bacteria perteneciente al género *Pseudomonas* capaz de crecer utilizando como única fuente de carbono y energía los siguientes compuestos: estireno, etilbenceno, 2-feniletanol, 1-feniletanol, acetofenona, fenilacetato y mandelato (Utkin y col., 1991). Esta bacteria, que fue denominada *Pseudomonas* sp. Y2, había sido aislada a partir de suelos contaminados con gasolina, suministrando etilbenceno como única fuente de carbono y energía. Los autores del artículo proponían que la degradación del etilbenceno y estireno transcurría vía 2-feniletanol y fenilacetato, sin descartar la existencia de rutas alternativas.

En 1996 nuestro grupo de investigación recibió una muestra de *Pseudomonas* sp. Y2. Todos los intentos que se realizaron para conseguir su cultivo en etilbenceno fueron infructuosos, sin que se hayan podido precisar las causas de esta pérdida de capacidades metabólicas (Alonso, 2002). Sin embargo, se logró la caracterización genética y funcional de los genes que codifican la ruta superior de degradación del estireno (genes *sty*) (Velasco y col., 1998; Alonso, 2002), que incluye las actividades enzimáticas encargadas de la transformación del estireno en AFA. Seguidamente, se llevó a cabo una caracterización análoga de los genes responsables de la ruta inferior de degradación del estireno, también denominada ruta de degradación del AFA (genes *paa*) (Alonso y col., 2003; Bartolomé-Martín y col., 2004; Bartolomé-Martín, 2006), que supone la transformación de este último compuesto en intermediarios del ciclo de Krebs. Como ya se ha señalado, en *Pseudomonas* sp. Y2 se ha identificado la coexistencia de dos *clusters* funcionales para la degradación del AFA, denominados *clusters paa1* y *paa2*, respectivamente. El primero se encuentra localizado contiguo de los genes *sty*, mientras que el *cluster paa2* se localiza en otro lugar del cromosoma (Figura A.3 del Apéndice).

Los *clusters paa1* y *paa2* de *Pseudomonas* sp. Y2 presentan algunas diferencias entre si. La organización de los genes *paa2* es prácticamente idéntica a la de los genes *paa* de *P. putida* KT2440 (Luengo y col., 2001; Jiménez y col., 2002; Nelson y col., 2002). En cambio, al comparar los *clusters paa1* y *paa2* se aprecian las siguientes diferencias: (1) el *cluster paa1* carece de la copia de *paaM* presente en *paa2*, que codifica una porina putativa; (2) el *cluster paa1* presenta una copia del gen *paaN2*, ausente en el *cluster paa2* y cuya función se encuentra bajo estudio; (3) en el *cluster paa2* aparecen, entre los genes *paaF3* y *paaG*, los ORFs PY02 y PY03, ausentes en el *cluster paa1* y cuya función es desconocida; (4) el *cluster paa1* contiene una copia adicional de *paaF*, denominada *paaF2*. La actividad FA-CoA ligasa de ambos genes, *paaF* y *paaF2*, ha sido descrita (Velasco y col., 1998; Alonso y col., 2003). Es interesante señalar que el gen *paaF2* se encuentra adyacente a los genes *sty* (entre *stySR* y el gen *paaX*) y alejado de los genes *paaABCDEFG*. Además, las estirpes degradadoras de estireno *P. fluorescens* ST y *P. putida* CA-3 también presentan una copia de *paaF* en la misma posición respecto a los genes *sty* que *paaF2* en *Pseudomonas* sp. Y2 (Santos y col., 2000; O'Leary y

col., 2001). Aunque las secuencias de *paaF* y *paaF2* de *Pseudomonas* sp. Y2 son muy similares (91,5 % de identidad en su secuencia de aminoácidos) se encuentran situados en regiones cromosómicas diferentes (Alonso y col., 2003). La existencia de dos copias funcionales y casi idénticas del gen *paaF* en el cluster *paa1*, junto con el hecho de que la copia *paaF3* del cluster *paa2* se localice en contexto génico equivalente al de *paaF* en el cluster *paa1*, podría implicar un papel de *paaF2* distinto al de sus homólogos.

El estudio de la regulación de los genes *sty* catabólicos fue iniciado previamente en el laboratorio (Alonso, 2002). *Pseudomonas* sp. Y2 es la primera bacteria en la que se han caracterizado las rutas superior (*sty*) e inferior (*paa*) del catabolismo del estireno. Este hecho proporciona una gran ventaja a la hora de realizar estudios de la regulación del catabolismo del estireno, ya que permite abordar la regulación transcripcional de los genes *sty* no sólo de forma aislada, sino estudiando la posible existencia de mecanismos que impliquen una regulación coordinada de ambas rutas *sty* y *paa*.

OBJETIVOS

III. Objetivos.

Como se ha comentado en la introducción, al comienzo de este trabajo nuestro grupo había descrito la naturaleza de los genes *sty* que codifican las etapas iniciales de la degradación del estireno en *Pseudomonas* sp. Y2, lo que se conoce como “ruta superior” y que provoca la transformación de esta molécula en AFA. Seguidamente, también en nuestro laboratorio, se llevó a cabo el aislamiento y la caracterización de los genes *paa* que codifican las actividades encargadas de la transformación del AFA en intermediarios del TCA y que constituyen la “ruta inferior” de la degradación del estireno.

El objetivo principal de este trabajo es la ampliación del conocimiento acerca de los mecanismos de regulación del sistema de degradación del estireno en *Pseudomonas* sp. Y2. El presente estudio se ha centrado en dos promotores: el promotor P_{styA} , que controla la transcripción del operón *sty* catabólico, y el promotor P_{paaF2} , región que antecede al gen *paaF2*. Este último gen es peculiar por su redundancia, ya que es la tercera copia de un gen que codifica una FA-CoA ligasa en *Pseudomonas* sp. Y2, y por su localización, independiente y próximo al *cluster sty*. Se han encontrado genes homólogos a *paaF2* adyacentes a los genes *stySR* reguladores en distintas estirpes de *Pseudomonas* degradadoras de estireno pero no en los *clusters paa* de otras estirpes capaces de metabolizar AFA pero carentes de los genes *sty*. Todo ello levantó sospechas acerca de una posible relación de *paaF2* con el sistema *sty*. Este estudio ha investigado especialmente la posible existencia de una regulación coordinada de las rutas *sty* y *paa*, concretamente si la expresión de los genes que codifican la ruta *sty*, cuya represión por AFA había sido anteriormente descrita, se encuentra regulada por elementos del sistema *paa*, y si la expresión del gen *paaF2* está relacionada de alguna manera con el sistema *sty*. Para ello se marcaron los siguientes objetivos parciales:

- A. Estudio de la región promotora P_{styA} del operón catabólico *styABCD* y del papel de las proteínas StyR, IHF y PaaX en la regulación de la transcripción a partir de P_{styA} .
- B. Estudio de la región promotora P_{paaF2} del gen *paaF2* y del papel de las proteínas StyR, IHF y PaaX en el control de la transcripción a partir de éste promotor.

MATERIALES Y MÉTODOS

IV. Materiales y métodos.

1. Estirpes bacterianas.

Las estirpes bacterianas utilizadas en este trabajo, su procedencia y características genotípicas o fenotípicas más relevantes se enumeran a continuación.

TABLA 4.1. Estirpes bacterianas.

Estirpe	Genotipo/fenotipo relevante	Referencia
<i>Pseudomonas</i> sp. Y2	AFA+, STY+, Ap ^R , Cm ^R , Km ^S , Tc ^S , Sm ^S , lacZ-	(Utkin y col., 1991)
<i>Pseudomonas</i> sp. Y2 K1	<i>Pseudomonas</i> sp. Y2Δ <i>paa1</i> ::Km ^R , AFA+, STY+, Ap ^R , Cm ^R , Km ^R , Tc ^S , Sm ^S , lacZ-	(Bartolomé-Martín y col., 2004)
<i>Pseudomonas</i> sp. Y2 T2	<i>Pseudomonas</i> sp. Y2Δ <i>paa2</i> ::Tc ^R , AFA+, STY+, Ap ^R , Cm ^R , Km ^S , Tc ^R , Sm ^S , lacZ-	(Bartolomé-Martín y col., 2004)
<i>Pseudomonas</i> sp. Y2 K1-T2	<i>Pseudomonas</i> sp. Y2Δ <i>paa1</i> ::Km ^R , Δ <i>paa2</i> ::Tc ^R , AFA-, STY-, Ap ^R , Cm ^R , Km ^R , Tc ^R , Sm ^S , lacZ-	(Bartolomé-Martín y col., 2004)
<i>Pseudomonas</i> sp. Y2 T2X1	<i>Pseudomonas</i> sp. Y2T2 Δ <i>paaX1</i> ::Km ^R , AFA+, STY+, Ap ^R , Cm ^R , Km ^R , Tc ^R , Sm ^S , lacZ-	(del Peso-Santos y col., 2006)
<i>Pseudomonas</i> sp. Y2 T2 <i>paaF</i> ::Km	AFA-, STY+, Ap ^R , Cm ^R , Km ^R , Tc ^R , Sm ^S , lacZ-	(del Peso-Santos y col., 2008)
<i>Pseudomonas</i> sp. Y2 T2 <i>paaF2</i> ::Km	AFA+, STY+, Ap ^R , Cm ^R , Km ^R , Tc ^R , Sm ^S , lacZ-	(del Peso-Santos y col., 2008)
<i>Pseudomonas</i> sp. Y2 PAL	<i>Pseudomonas</i> sp. Y2 mini-Tn5 (Km ^R) <i>P_{styA}</i> ::lacZ, AFA+, STY+, Ap ^R , Cm ^R , Km ^R , Tc ^S , Sm ^S	(Alonso y col., 2003)
<i>Pseudomonas</i> sp. Y2 F2L	<i>Pseudomonas</i> sp. Y2 mini-Tn5 (Km ^R) <i>P_{paaF2S}</i> ::lacZ, AFA+, STY+, Ap ^R , Cm ^R , Km ^R , Tc ^S , Sm ^S	(del Peso-Santos y col., 2008)
<i>Pseudomonas</i> sp. Y2 F2SL	<i>Pseudomonas</i> sp. Y2 mini-Tn5 (Km ^R) <i>P_{paaF2S}</i> ::lacZ, AFA+, STY+, Ap ^R , Cm ^R , Km ^R , Tc ^S , Sm ^S	(del Peso-Santos y col., 2008)
<i>Pseudomonas</i> sp. Y2 F2L Δ <i>styR</i> ::Gm ^R	AFA+, STY-, Ap ^R , Cm ^R , Km ^R , Gm ^R , Tc ^S , Sm ^S	(del Peso-Santos y col., 2008)
<i>Pseudomonas putida</i> U	AFA+, STY-, Ap ^R , Cm ^R , Km ^S , Tc ^S	(Martínez-Blanco y col., 1990)
<i>Pseudomonas putida</i> KT2442	AFA+, STY-, Ap ^R , Cm ^R . Mutante espontáneo Rif ^R de <i>P. putida</i> KT2440	(Franklin y col., 1981)
<i>Escherichia coli</i> W	(ATCC11105) derivada de <i>E. coli</i> ATCC9637 auxótrofa para vitamina B ₁₂ AFA+, STY-	(Davis y Mingioli, 1950)
<i>Escherichia coli</i> W14	<i>E. coli</i> W Δ <i>paa</i> . AFA-, STY-	(Ferrández y col., 1997)
<i>Escherichia coli</i> CC118 λpir	F ⁻ Δ(<i>ara-leu</i>) <i>araD</i> Δ <i>lacX74 galE galK phoA20 thi-1 rpsE rpoB argE</i> (Am) <i>recA1</i> lisógeno λpir	(Herrero y col., 1990)
<i>Escherichia coli</i> S17-1 λpir	F ⁺ <i>recA thi pro hsdR M⁺ RP4</i> ::2-Tc::Mu::Km Tn7 Tp ^R Sm ^R lisógeno λpir	(de Lorenzo y Timmis, 1994)

TABLA 4.1. Estirpes bacterianas (continuación).

Estirpe	Genotipo/fenotipo relevante	Referencia
<i>Escherichia coli</i> DH5 α	F ⁻ <i>endA1 hsdR17</i> (r _k ⁻ m _k ⁺) <i>supE44 thi-1 recA1 gyrA</i> (Nal ^R) <i>relA1</i> Δ (<i>argF-lac</i>)U169 <i>deoR</i> (ϕ 80 <i>dlac</i> Δ (<i>lacZ</i>)M15)	(Sambrook y col., 1989)
<i>Escherichia coli</i> DH5 α F ⁺	F ⁺ / <i>endA1 hsdR17</i> (r _k ⁻ m _k ⁺) <i>glnV44 thi-1 recA1 gyrA</i> (Nal ^R) <i>relA1</i> Δ (<i>lacIZYA-argF</i>)U169 <i>deoR</i> (ϕ 80 <i>dlac</i> Δ (<i>lacZ</i>)M15)	(Woodcock y col., 1989)
<i>Escherichia coli</i> HB101	F ⁻ <i>thi-1 hsdS20</i> (r _B ⁻ m _B ⁻) <i>recA13 ara-14 leuB6 proA2 lacY1 galK2 rpsL20</i> (Sm ^R) <i>xyl-5 mtl-1 supE44</i>	(Boyer y Roulland-Dussoix, 1969)
<i>Escherichia coli</i> MV1184	<i>ara</i> Δ (<i>lac-proAB</i>) <i>rps2 thi</i> Φ 80 <i>lacZ</i> Δ M15 Δ (<i>srl-recA</i>) 306::Tn10(<i>ter</i> ^R) F ⁺ [<i>traD36 proAB</i> ⁺ <i>lacI</i> ^R <i>lacZ</i> Δ M15]	(Sambrook y col., 1989)
<i>Escherichia coli</i> UT5600	F ⁻ <i>ara-14 leuB6 secA6 lacY1 proC14 tsx-67 D(ompT-fepC)266 entA403 trpE38 rfbD1 rpsL109 xyl-5 mtl-1 thi-1</i>	(Elish y col., 1988)
<i>Escherichia coli</i> S90CRif	Δ (<i>lac, pro</i>) <i>rpsL</i> (Sm ^R , Rif ^R)	(Ferrández y col., 2000)
<i>Escherichia coli</i> DPB101Rif	S90C <i>himD451::mini-tet</i> (Rif ^R)	(Ferrández y col., 2000)
<i>Escherichia coli</i> DPB102Rif	S90C <i>himA452::mini-tet</i> (Rif ^R)	(Ferrández y col., 2000)

2. Plásmidos.

A continuación se detallan los plásmidos empleados en este trabajo, señalando sus características y origen.

TABLA 4.2. Plásmidos.

Plásmido	Características	Referencia
pMAL-c2X	<i>oriColE1, rop, malE, lacZα, P_{lac}, lacF^l, Ap^R</i>	<i>New England Biolabs</i>
pQE-9	<i>oriColE1, P_{T5}, His-tag, Ap^R</i>	<i>Qiagen</i>
pSJ3	Vector de búsqueda de promotores (fusiones traduccionales), <i>lacZ</i> flanqueado por sitios <i>NotI</i> , <i>oriColE1, Ap^R</i>	(Ferrández y col., 1998)
pSJP18Not	Origen de pCK01, Cm ^R	(Jaenecke y Diaz, 1999)
pUTminiTn5Km2	<i>oriR6K, trp, miniTn5, Km^R, Ap^R</i>	(de Lorenzo y Timmis, 1994)
p34SGm	Ap ^R , Gm ^R	(Dennis y Zylstra, 1998)
pVLT31	<i>oriRSF1010, lacF^l, P_{lac}, Tc^R</i>	(de Lorenzo y col., 1993)
pVLTX	Derivado de pVLT31 con un inserto que contiene el gen <i>paaX1</i> de <i>Peudomonas</i> sp. Y2, Tc ^R	(del Peso-Santos y col., 2006)
pJ18X	Derivado de pSJP18Not con inserto que contiene el gen <i>paaX1</i> de <i>Peudomonas</i> sp. Y2, Cm ^R	(del Peso-Santos y col., 2006)
pBluescript II KS(+)	Fagómido derivado de pUC19 con los orígenes de replicación <i>f1</i> y <i>ColE1, P_{lac}, lacZα, Ap^R</i>	<i>StratageneTM</i>
pBlueKm	pBluescript II KS(+) con el casete de Km ^R de pUC4K, Ap ^R , Km ^R	(del Peso-Santos y col., 2006)
pBF2EX	Derivado de pBluescript II KS (+) con el gen <i>paaF2</i> de <i>Peudomonas</i> sp. Y2, Ap ^R	(del Peso-Santos y col., 2008)
pBF2Km	Derivado de pBluescript II KS (+) con un inserto que contiene el gen <i>paaF2</i> de <i>Peudomonas</i> sp. Y2 interrumpido por un casete de Km ^R , Ap ^R , Km ^R	(del Peso-Santos y col., 2008)
pBlueRGm	Derivado de pBluescript II KS (+) con un inserto que contiene el gen <i>styR</i> de <i>Peudomonas</i> sp. Y2 parcialmente deletado y sustituido por un casete de Gm ^R , Ap ^R , Gm ^R	(del Peso-Santos y col., 2008)
pUCP26	Vector de amplio rango de huésped, derivado de pUC18, <i>P_{lac}, lacZα, Tc^R</i>	(West y col., 1994)
pUXES	Derivado de pUCP26 con un inserto de <i>paaX1</i> de <i>Peudomonas</i> sp. Y2, Tc ^R	(del Peso-Santos y col., 2006)
pUXKm	Derivado de pUCP26 con un inserto que contiene el gen <i>paaX1</i> de <i>Peudomonas</i> sp. Y2 parcialmente deletado y sustituido por un casete de Km ^R , Tc ^R , Km ^R	(del Peso-Santos y col., 2006)
pTE103	Plásmido que porta un terminador transcripcional T7 fuerte <i>downstream</i> del MCS.	(Elliott y Geiduschek, 1984)
pTE-E1B1	Derivado de pTE103 que porta un inserto de 225 pb de la región <i>P_{styA}</i> y el inicio de <i>styA</i> de <i>Peudomonas</i> sp. Y2, Ap ^R	(del Peso-Santos y col., 2006)
pTE-E2B1	Derivado de pTE103 que porta un inserto de 154 pb de la región <i>P_{styA}</i> y el inicio de <i>styA</i> de <i>Peudomonas</i> sp. Y2, Ap ^R	Este trabajo

TABLA 4.2. Plásmidos (continuación).

Plásmido	Características	Referencia(Yuste y Rojo, 2001)
pTE-PF2	Derivado de pTE103 que porta un inserto de 492 pb de la región <i>P_{paaF2}</i> y el inicio de <i>paaF2</i> de <i>Pseudomonas</i> sp. Y2, Ap ^R	(del Peso-Santos y col., 2008)
pM-X1	Derivado de pMal-c2X con un inserto de <i>paaX1</i> de <i>Pseudomonas</i> sp. Y2, Ap ^R	(del Peso-Santos y col., 2006)
pQ-R	Derivado de pQE-9 que porta el gen <i>styR</i> de <i>Pseudomonas</i> sp. Y2 fusionado a un <i>His-Tag</i> , Ap ^R	(Alonso, 2002)
pUC4K	Vector derivado de pUC4 que contiene un casete de Km ^R flanqueado por dianas de restricción, <i>oriColE1</i> , Ap ^R , Km ^R	(Taylor y Rose, 1988)
pKNG101	<i>oriR6K</i> , <i>mob</i> RP4, vector “suicida” para mutagénesis mediante inserción de marcadores por recombinación homóloga, <i>sac</i> , Sm ^R	(Kaniga y col., 1991; Yuste y Rojo, 2001)
pKCoAKm	Derivado de pKNG101 con un inserto que contiene el gen <i>paaF</i> de <i>Pseudomonas</i> sp. Y2 interrumpido por un casete de Km ^R , Sm ^R , Km ^R	(Bartolomé-Martín, 2006)
pKF2Km	Derivado de pKNG101 con un inserto que contiene el gen <i>paaF2</i> de <i>Pseudomonas</i> sp. Y2 interrumpido por un casete de Km ^R , Sm ^R , Km ^R	(del Peso-Santos y col., 2008)
pKXKm	Derivado de pKNG101 con un inserto que contiene el gen <i>paaX1</i> de <i>Pseudomonas</i> sp. Y2 parcialmente deletado y sustituido por un casete de Km ^R , Sm ^R , Km ^R	(del Peso-Santos y col., 2006)
pKRGm	Derivado de pKNG101 con un inserto que contiene el gen <i>styR</i> de <i>Pseudomonas</i> sp. Y2 parcialmente deletado y sustituido por un casete de Gm ^R , Sm ^R , Gm ^R	(del Peso-Santos y col., 2008)
pUE14	Derivado de pUC19 con un inserto de 12,2 kb del genoma de <i>Pseudomonas</i> sp. Y2 que contiene parte de la región <i>sty</i> (el comienzo del gen <i>styC</i> y los genes <i>styA</i> , <i>styB</i> , <i>styR</i> y <i>styS</i>), así como los genes <i>paaF2</i> , <i>paaX</i> , <i>paaY</i> , <i>paaN2</i> y gran parte de <i>paaA</i> , Ap ^R	(Velasco y col., 1998)
pISm7.0R	Derivado de pUC19 con un inserto de 6,6 kb del genoma de <i>Pseudomonas</i> sp. Y2 que contiene los genes <i>styS</i> , <i>styR</i> , <i>styA</i> , <i>styB</i> , y parte de los genes <i>styC</i> y <i>paaF2</i> , Ap ^R	(Velasco y col., 1998)
pPaaK	Derivado de pUC18 con un inserto de 1,6 kb que incluye el gen <i>paaF2</i> completo bajo el control de <i>P_{lac}</i> , Ap ^R	(Velasco y col., 1998)
pSF2L	Derivado de pSJ3 con un inserto de 492 pb que contiene la región <i>P_{paaF2}</i> y el inicio de <i>paaF2</i> , Ap ^R	(del Peso-Santos y col., 2008)
pF2LKM	Derivado de pUTminiTn5Km2 con un inserto que porta la fusión traduccional <i>P_{paaF2}::lacZ</i> , Ap ^R , Km ^R	(del Peso-Santos y col., 2008)
pSF2SL	Derivado de pSJ3 con un inserto de 492 pb que contiene la región <i>P_{paaF2}</i> con la secuencia del sitio STY4 alterada (<i>P_{paaF2S}</i>) y el inicio de <i>paaF2</i> , Ap ^R	(del Peso-Santos y col., 2008)
pF2LSKM	Derivado de pUTminiTn5Km2 con un inserto que porta la fusión traduccional <i>P_{paaF2S}::lacZ</i> , Ap ^R , Km ^R	(del Peso-Santos y col., 2008)
pRW2A	<i>oriV</i> , <i>lacZ</i> sin promotor; Tc ^R	(Lodge y col., 1990)

TABLA 4.2. Plásmidos (continuación).

Plásmido	Características	Referencia
pRWF2A	Derivado de pRW2A con un inserto de 492 pb que contiene la región P_{paaF2} y el inicio de <i>paaF2</i> , Tc^R	(del Peso-Santos y col., 2008)
pRWF2B	Derivado de pRW2A con un inserto que contiene un fragmento que abarca desde la posición -2 de P_{paaF2} a la +292 de <i>paaF2</i> , Tc^R	(del Peso-Santos y col., 2008)
pRWF2C	Derivado de pRW2A con un inserto de 210 pb que contiene la región P_{paaF2} y el inicio de <i>paaF2</i> hasta la posición +10, Tc^R	(del Peso-Santos y col., 2008)

3. Oligonucleótidos sintéticos.

La síntesis de los oligonucleótidos utilizados en este trabajo fue encargada a la empresa SIGMA-Genosys. El nombre y la secuencia de los oligonucleótidos empleados en el desarrollo de este trabajo, así como el fin con el que se han utilizado en cada caso, se detallan en la siguiente Tabla. Las secuencias de reconocimiento de enzimas de restricción que aparecen en algunos de los oligonucleótidos (introducidas artificialmente) se han señalado mediante subrayado.

TABLA 4.3. Oligonucleótidos.

Nombre	Secuencia (5'→3')	Utilización
T3	AATTAACCCTCACTAAAGGG	Secuenciación de insertos de plásmidos derivados de pBluescript II KS(+)
T7	GTAATACGACTCACTATAGGGC	
Gm3	GGCTCTCTATACAAAGTTGGGCATAC	Secuenciación desde los extremos del casete de Gm^R hacia el exterior.
Gm5	CCTACATGTGCGAATGATGCCCATACTTGAG	
Km up	TCAGCAACACCTTCTTCACG	Secuenciación desde los extremos del casete de Km^R hacia el exterior.
Km down	TTGAGACACAACGTGGCTTT	
pRWF2A-3	TCAGCAGGTCGTTGAACTG	Secuenciación de insertos de plásmidos derivados de pRW2A.
pRWF2A-5	GACGAGAATTTCCCTGCGGTG	
483	CGCCTTTGAGTGAGCTGAT	Secuenciación de insertos de plásmidos derivados de pTE103.
484	CAAGCATCGTTGTCGCCAAT	
styAXR	TTTCAGGATATTTTTATAACC	Amplificación de la sonda STY
styAXL	CACTGTACTCATCGGGCTTA	
X5	CGGAATTCGAAAGGCCAGGTGTGATG	Amplificación de <i>paaX1</i> . Diana <i>EcoRI</i>
X3	GCTCTAGACCAGCAGCGGATTTCGAG	Amplificación de <i>paaX1</i> . Diana <i>XbaI</i>
BluntX5	ATGACGTCCCTCGCCCCACTGA	Amplificación de <i>paaX1</i>
BluntB5	CGCGGATCCGAAAGGCCAGGTGTGATG	Amplificación de <i>paaX1</i> . Diana <i>BamHI</i>

TABLA 4.3. Oligonucleótidos (continuación).

Nombre	Secuencia (5'→3')	Utilización
E1	CGGAATTCGTTGACTGCTCTG	Amplificación de la región P_{styA} . Diana <i>EcoRI</i> .
E2	CGGAATTCCTAATATCTATATCTATTTTTTCAG	
B1	CGCGGATCCTGCCTGCACCA	Amplificación de la región P_{styA} . Diana <i>BamHI</i> .
B2	CGCGGATCCCATGGCTTATACC	
PF2X	CGCTCTAGATTTCTACCAACG	Amplificación de la región P_{paaF2} . Diana <i>XbaI</i> .
PF2-5	CTCTCGAATTCGCTGCTGGTAT	Amplificación de la región P_{paaF2} . Diana <i>EcoRI</i> .
PF2E	CGCGGAATTCCTTCTACCAACG	
PF2EcoI+	GAATCAAGAATTCACTGTTGCGTC	
PF2E-3	CTTGGAAATTCGAGCAGTTG	
F2B	CGGGATCCAAGGCGGTATT	Amplificación de la región P_{paaF2} . Diana <i>BamHI</i> .
F2B(2)	GCGGGATCCGCGCTCTTACATCTC	
F2B(3)	GTGGGATCCGGTTTCGTCGAAG	
F2B10+	CCTAAGGATCCAACAGTGCTG	
S (R)	GAGACACCTCGATTGATTAAGTCGGGATCTCGACGAAG	Mutagénesis del sitio STY4 de P_{paaF2} .
S (F)	GAGATCCCGACTTAATCAATCGAGGTGTCTCGTTAC	
a	TACCATGGCACTTTTTTCATGGCTTATACCTTT	Mutagénesis del sitio de unión de PaaX de P_{styA}
b	GAAAAAGTGCCATGGTATTGTTGGTGCAGG	
R5-1	CTCTACGTCGACCACAAAGCCCACAGTA	Amplificación de <i>styR</i> . Diana <i>SalI</i> .
R3-1	CGGGATCCGCATGTCCAGAACC	Amplificación de <i>styR</i> . Diana <i>BamHI</i> .
R5-2	CGGGATCCGTGCGTGAGCAACAGGTA	
R3-2	GCTCTAGACCAGATGAACAAGATTGCCAGA	Amplificación de <i>styR</i> . Diana <i>XbaI</i> .
QstyA (F)	GAGCCTTGAGATCACCGTAGAAG	Cuantificación de los niveles de mRNA de <i>styA</i> por RT-PCR
QstyA (R)	TTTGGCTATTTTCGGTCACTACTACTAC	
QpaaF2 (F)	AGAGCTTTATGCCTTGGTGTCCGAG	Cuantificación de los niveles de mRNA de <i>paaF2</i> por RT-PCR
QpaaF2 (R)	CCACATCCTGCCGCTTACATCTC	
QTcR2 (F)	AATGCGCTCATCGTCATCCT	Cuantificación de los niveles de mRNA de <i>tetA</i> por RT-PCR
QTcR2 (R)	GGCAGTACCGCATAACCAA	
ApL2	ATCCGCCTCCATCCAGTCTA	Cuantificación de los niveles de mRNA de <i>bla</i> por RT-PCR
ApR2	AACAACGTTGCGCAAATATT	
QpaaD (F)	CAACTGATCGCCCTGTTCCAT	Cuantificación de los niveles de mRNA de <i>paaD</i> por RT-PCR
QpaaD (R)	GCTTCATTCATCTGCGTTCTCCT	

TABLA 4.3. Oligonucleótidos (continuación).

Nombre	Secuencia (5'→3')	Utilización
Pcu	CCTTTTTTGCTGCTGGTGT	Amplificación de una sonda de 125 pb para el estudio de la unión MBP-PaaX1 a la región <i>styA</i> por ultracentrifugación analítica
Acu	AGGAAGAGGCCAAGATGGA	
styS3	GTAAATCTCCTCCCTCCATCTG	Comprobación del mutante Y2 F2L Δ <i>styR</i> ::Gm ^R por PCR.
styR3	ATGGCTTGGGAAGGAAGCTCTAT	
paaF2-1 (F)	CCCAGGCGCAGCTTGAGGTC	Comprobación del mutante Y2T2X1 por PCR.
PaaY1 (R)	CCGAGCAATCCCTGGTGATG	
pe-150	GGTGGAGCACCGGCTCCACGAAGCTCT	Extensión del cebador del promotor <i>P_{paaF2}</i> .

4. Medios, conservación y condiciones de cultivo de los microorganismos.

Conservación:

La conservación de las diferentes bacterias se llevó a cabo por congelación a -80°C en medio de cultivo al que se añadió glicerol estéril hasta una concentración final del 20% v/v.

Medios de cultivo:

Los medios de cultivo utilizados fueron:

- Medio Luria Bertani (LB): bacto-triptona 10g/L, extracto de levadura 5g/L, NaCl 10g/L (Sambrook y col., 1989).
- Medio SOB: bacto-triptona 20g/L, extracto de levadura 5g/L, NaCl 10mM, KCl 2,5mM, MgSO₄ 10mM, MgCl₂ 10mM (Hanahan, 1983).
- Medio M9: Na₂HPO₄ 42mM, KH₂PO₄ 22mM, NaCl 10mM, NH₄Cl 20mM, MgSO₄ 1mM, CaCl₂ 0,1mM, pH 7,0 (Miller, 1972).
- Medio M63: KH₂PO₄ 100mM, (NH₄)SO₄ 15mM, FeSO₄ 1,7μM, MgSO₄ 1mM, pH 7,0 (Miller, 1972).

Los medios mínimos (M63 y M9) se complementaron con las siguientes sales a la concentración final que se indica: FeSO₄ 10μM, MnCl₂ 10μM, CoSO₄ 10μM, CaCl₂ 10μM, CuCl₂ 1μM, ZnSO₄ 1μM. La adición de estos oligoelementos a los medios mínimos se realizó a partir de una solución 1000 veces concentrada con todos estos componentes disueltos en HCl 1N (“solución 1000X de sales MT”).

Los medios M9 y M63 se suplementaron con la fuente de carbono apropiada a la concentración final siguiente: AFA al 0,4% (p/v), glicerol al 1% (p/v) para los cultivos de *Pseudomonas* y 0,4% para *E. coli*, glucosa al 0,4% (p/v) y estireno en fase gaseosa (concentración saturante).

Los medios de cultivo se esterilizaron en un autoclave 21L (Matachana) durante 30 minutos a 121°C y una presión de 1 kg/cm².

Vitaminas:

En los cultivos en medio mínimo de microorganismos auxótrofos para ciertas vitaminas, éstas se añadieron a una concentración final de 1µg/mL.

Antibióticos:

Los antibióticos empleados se suministraron a las concentraciones siguientes: ampicilina 100 µg/ml, cloranfenicol 34 µg/ml, kanamicina 50 µg/ml, tetracilina de 5 a 15 µg/ml para *E. coli* y de 50 a 100 µg/ml para *Pseudomonas*, piperacilina 100 µg/ml, carboxicilina 100 µg/ml, gentamicina 25 µg/ml para *E. coli* y 100 µg/ml para *Pseudomonas*, rifampicina 150 µg/ml y estreptomycinina 150 µg/ml.

Procedimientos de cultivo:

Los cultivos en medio líquido se realizaron en tubos de ensayo o matraces tipo Erlenmeyer. La temperatura de crecimiento fue 37°C para las estirpes de *E. coli* y 28-30°C para las diferentes estirpes de *Pseudomonas*. La incubación se realizó en un agitador orbital (200-250 rpm) en el caso de los matraces, o en rotores para tubos de ensayo colocados en cámaras acondicionadas. Se monitorizó el crecimiento de los cultivos midiendo la DO_{600nm} con un espectrofotómetro DU-640 (Beckman) frente al blanco apropiado.

Los cultivos en medio sólido se llevaron a cabo empleando Bacto-Agar (Pronadisa) al 1,5% (p/v) en la preparación del medio correspondiente. En el caso del LB, el agar se añadió antes de autoclavar el medio, mientras que en el del M9 y el M63 el agar se esterilizó por separado en agua y posteriormente se añadió un volumen apropiado de medio estéril diez veces concentrado, obteniéndose la concentración final adecuada. En todos los casos, tras la esterilización, se esperó a que se atemperase el medio (sin llegar a solidificar), se incorporaron los antibióticos, vitaminas, fuentes de carbono o suplementos diversos (según los casos) y se distribuyeron en placas Petri (aproximadamente 20mL de medio por cada placa Petri).

Para la selección de clones recombinantes utilizando el método de la α -complementación de la β -galactosidasa (selección blanco/azul) se suplementó cada placa de LB/agar con 50µl de X-Gal al 2% (p/v) (en dimetilformamida).

Para la selección de las células receptoras transconjugantes dobles recombinantes (frente a las simples recombinantes) en las conjugaciones en que se transfirieron plásmidos derivados de pKNG101, se prepararon placas de LB/agar (con los antibióticos adecuados en cada caso) a las que se añadió sacarosa para conseguir una concentración final del 10% p/v (aproximadamente 0.4 M).

Suministro de compuestos aromáticos en fase gaseosa:

Para suministrar el estireno, y con el objetivo de evitar el efecto tóxico que supone su administración directa sobre el cultivo, se equiparon los matraces con un depósito interno que permite la evaporación esta la fuente de carbono volátil y la consiguiente saturación de la fase gaseosa (Figura 4.1). En estos cultivos se consideró que la concentración del compuesto en la fase líquida alcanzaba, al cabo de unas horas, una concentración máxima igual a su constante de solubilidad en agua. Los cultivos en medio sólido se realizaron en placas Petri con la tapa modificada, de forma que incorporan un depósito en el que se puede dispensar el compuesto aromático, que llega a los microorganismos tras su difusión en la fase gaseosa (Figura 4.1).

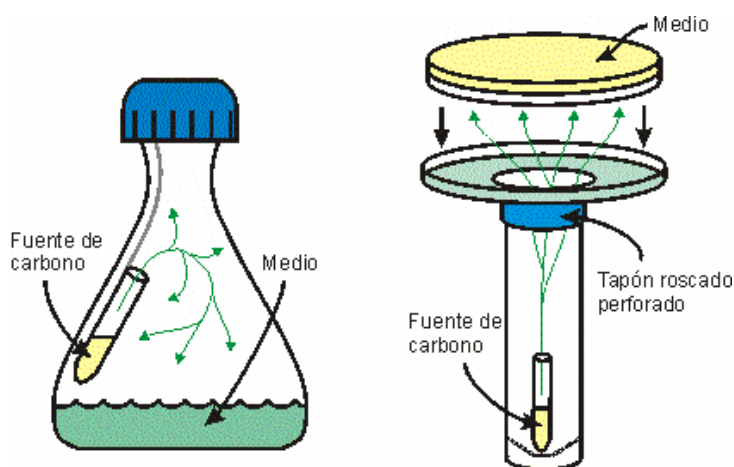


FIGURA 4.1. Matraz y placa de cultivo equipados con recipientes para el suministro de estireno, para cultivos en medio líquido (izquierda) o sólido (derecha). Tomado de (Alonso, 2002).

5. Procedimientos de transferencia genética.

5.1. Transformación bacteriana mediante choque térmico.

Las células competentes de *E. coli* se prepararon según el método del cloruro de calcio (Sambrook y col., 1989). La disolución del DNA plasmídico o el resultado de la reacción con ligasa se añadió a 200µl de células competentes, incubándose la mezcla durante 30 minutos en hielo. Tras un choque térmico a 42°C durante 1 minuto y medio, se realizó una incubación posterior en hielo de 5 minutos y a continuación se añadió 1ml de LB atemperado, incubándose a 37°C con agitación durante 1 hora, para permitir la expresión de los genes de resistencia a antibióticos codificados en los plásmidos (excepto para el caso de la tetraciclina, en el que se incrementó el tiempo de incubación a 2h). Finalmente, se sembraron las células en placas Petri con el medio sólido selectivo correspondiente y se incubaron a 37°C durante una noche.

5.2. Electrotransformación.

Para preparar células electrocompetentes de *E. coli* o *Pseudomonas*, éstas se cultivaron en medio líquido hasta alcanzar la fase exponencial, se enfriaron a 4°C y se lavaron 3 veces con agua destilada estéril a 4°C. Tras el último lavado se resuspendieron en un pequeño volumen de agua y se utilizaron a continuación.

Para la electrotransformación con DNA plasmídico se utilizó un equipo *Gene Pulser II* acoplado a un controlador de resistencia *Pulse Controller II* (Bio-Rad). Las transformaciones se realizaron empleando una diferencia de potencial de 18kV/cm, una capacitancia de 25µF y una resistencia de 200Ω; se utilizó una cubeta de electroporación de 0,2 cm. Posteriormente se adicionó 1mL de medio LB y se incubaron las células a su temperatura óptima de crecimiento (37°C para *E. coli* y 30°C en el caso de *Pseudomonas*) durante 1 hora (2 horas en el caso de selección mediante tetraciclina y también para los cultivos de *Pseudomonas*) para permitir la expresión de los genes de resistencia codificados en los plásmidos. Finalmente se sembraron e incubaron en el medio sólido selectivo oportuno.

5.3. Conjugación.

Para la transferencia de plásmidos mediante conjugación se empleó como donadora la estirpe *E. coli* S17-1 λpir (F⁺) y distintas estirpes de *Pseudomonas* (F⁻) como receptoras (conjugación biparental). Las células donadoras y receptoras se cultivaron por separado, en sus respectivas condiciones óptimas, hasta alcanzar la fase exponencial. Después de un lavado con una solución de cloruro sódico 0,14M, se mezclaron en una relación 1:1 sobre una placa de LB. Tras una incubación de 6-18h a 28°C las células se resuspendieron y lavaron en 2mL de cloruro sódico 0,14M, quedando finalmente en 1mL de la misma solución salina estéril. La siembra se realizó en medios selectivos que permitían el crecimiento exclusivamente de las células receptoras transformadas, impidiendo la proliferación tanto de las células donadoras como de las receptoras no transformadas.

5.4. Construcción de mutantes por doble recombinación.

Para la construcción de mutantes por el sistema de doble recombinación se utilizó el plásmido pKNG101, que presenta un origen de replicación R6K, la región *mob* (que le permite transferirse a otras bacterias por conjugación desde estirpes donadoras F⁺) y el gen *sacB*. El origen R6K requiere para el inicio de la replicación la presencia de la proteína π, codificada por el gen *pirR6K*, el cual se encuentra integrado en el cromosoma de estirpes λpir en forma de profago (Kolter y col., 1978). El gen *sacB* codifica la levansacarasa (EC 2.4.1.10), enzima cuya expresión es inducida por la presencia de sacarosa al 10% p/v y produce la lisis celular en un amplio rango de bacterias gram-

negativas (Gay y col., 1985). Gracias a estas dos características, este método permite seleccionar únicamente los clones en los que se ha producido doble recombinación (ver Figura 4.2).

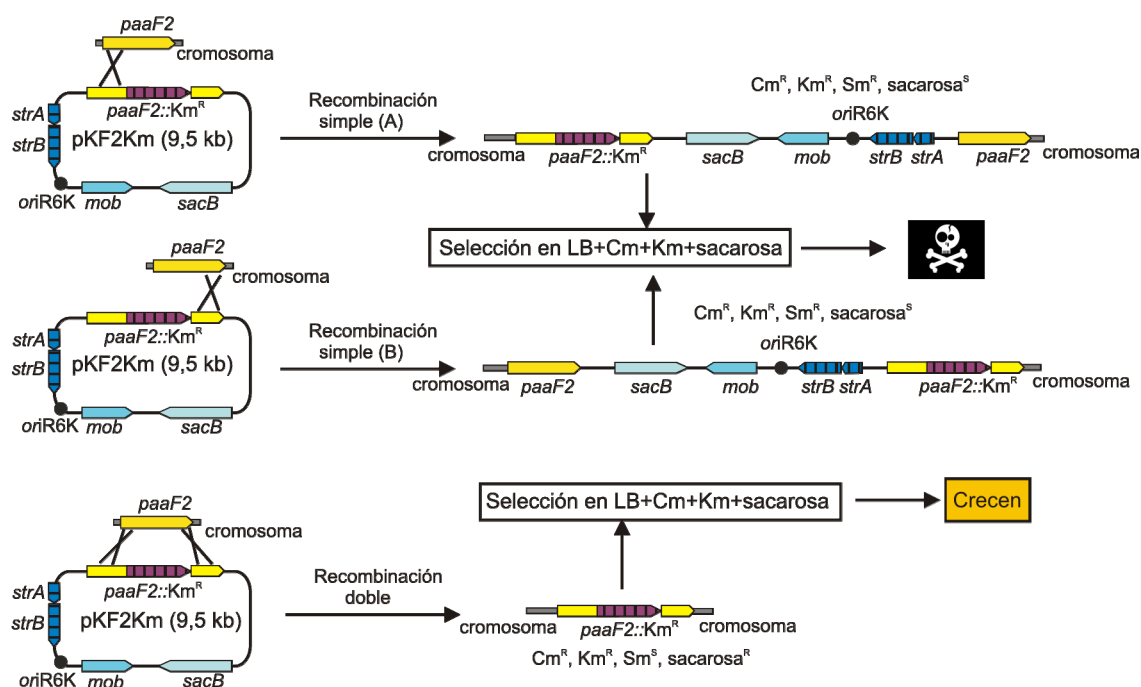


FIGURA 4.2. Ejemplo ilustrativo de la selección de dobles recombinantes empleando el sistema del plásmido pKNG101. En este caso se trata de mutar el gen *paaF2* de *Pseudomonas* sp. Y2 mediante la inserción de un casete de resistencia a Km (Km^R). El plásmido pKF2Km, derivado de pKNG101, se transfiere por conjugación desde *E. coli* S17.1 λ pir [pKF2Km] (Cm^S, Km^R, Sm^R, sacarosa^S) a *Pseudomonas* sp. Y2 (Cm^R, Km^S, Sm^R, sacarosa^R), según lo descrito en el apartado 5.3. El plásmido pKF2Km no es replicativo en *Pseudomonas* sp. Y2. En la figura se muestran las tres posibles situaciones que pueden ocurrir en el interior de la bacteria receptora, es decir, que se de una simple recombinación homóloga (de dos formas distintas) o una doble recombinación homóloga. Al seleccionar en el medio adecuado sólo crecerán aquellas bacterias receptoras que hayan incorporado el casete de Km^R en el cromosoma y, por tanto, la mutación. *strAB*, genes que proporcionan resistencia a Sm; *sacB*, gen que codifica la levansacarasa; *oriR6K*, origen de replicación R6K; *mob*, región de movilización que permite la transferencia del plásmido por conjugación.

6. Manipulación de ácidos nucleicos.

6.1. Aislamiento de DNA plasmídico.

El DNA plasmídico fue extraído por el método rápido de lisis alcalina (Birboim y Doly, 1979) y posteriormente purificado mediante dos extracciones con fenol:cloroformo:alcohol isoamílico 25:24:1 (v/v/v) y una última extracción con cloroformo:alcohol isoamílico 24:1 (v/v/v) (Sambrook y col., 1989). Para precipitar el DNA se añadieron 2 volúmenes de etanol absoluto ó 0,8 volúmenes de isopropanol y tras una centrifugación de 15 minutos a 12.000 rpm y 4°C se lavó el pellet con etanol 70% v/v para eliminar las sales. El DNA sedimentado se secó en un termobloque a 55-60°C

antes de resuspenderlo en agua destilada y desionizada o en TE 0,2X (Tris-HCl 2mM, EDTA 0,2mM, pH 8,0).

En ocasiones se purificó el DNA plasmídico usando los *kits* de extracción *Real Miniprep Turbo kit* y *Real Silica Plasmid Miniprep kit* (comercializados por REAL), *High PureTM Plasmid Purification Kit* (Roche) y *FavorPrepTM Plasmid DNA Mini Extraction Kit* (Favorgen), siguiendo las indicaciones en cada caso de la casa comercial correspondiente.

El DNA plasmídico empleado para los ensayos de transcripción *in vitro* y de extensión del cebador fue extraído y purificado a través de un gradiente con CsCl-bromuro de etidio (Sambrook y col., 1989), extensamente dializado y purificado utilizando las columnas del sistema *Micro Bio-Spin P30 columns* (Bio-Rad) equilibradas con Tris-HCl 20mM pH 7.5, para eliminar las trazas de CsCl.

6.2. Aislamiento de DNA total.

El DNA total se obtuvo mediante lisis enzimática con lizozima (1mg/mL) seguida de un tratamiento con proteinasa K (3mg/mL) y SDS (1,5% p/v). Posteriormente, el DNA se purificó mediante dos extracciones sucesivas con fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1) y una extracción con cloroformo:alcohol isoamílico (24:1). La fase acuosa se transfirió a un tubo de vidrio estéril y se añadieron cuidadosamente dos volúmenes de etanol absoluto frío, formándose dos fases. El DNA se recogió mediante *spooling* utilizando una varilla fina de vidrio. Tras lavarlo con etanol al 70% v/v para eliminar las sales, el DNA se dejó secar a temperatura ambiente. Finalmente el DNA se resuspendió en un volumen adecuado de agua destilada y desionizada o en TE 0,2X, y se conservó congelado a -20°C.

6.3. Purificación de fragmentos de DNA tras electroforesis preparativa.

Para purificar fragmentos de DNA separados por electroforesis en geles de agarosa se escindió la pieza del gel utilizando un bisturí estéril, se sumergió en TE 1X hasta un volumen de 500µl y se incubó a 55°C durante 5-10 minutos. Tras la adición de un volumen de fenol y agitación vigorosa en un vortex, la mezcla se congeló en nitrógeno líquido para potenciar la ruptura de la agarosa e inmediatamente se centrifugó a 15.000 rpm a temperatura ambiente durante 15 minutos. A la fase acuosa se añadieron acetato sódico hasta una concentración final de 300mM y 0,8 volúmenes de isopropanol. Tras incubación a -20°C durante 15 minutos, el DNA precipitado se separó por una centrifugación de 30 minutos a 4°C y 12.000 rpm, se lavó con etanol al 70% v/v, se resuspendió en TE 0,2X y se conservó a -20°C.

Alternativamente, se llevó a cabo el proceso de purificación utilizando los *kits* comerciales *GeneClean Turbo Kit* (Q-BIOgene) y *High PureTM PCR Product Purification Kit* (Roche), siguiendo el correspondiente protocolo del fabricante.

6.4. Aislamiento de RNA.

Para todo el trabajo de laboratorio con RNA se utilizó siempre material libre de RNasas (de fábrica o por esterilización rigurosa); las soluciones y reactivos que lo permitieron fueron tratados con dietilpirocarbonato (DEPC) y esterilizadas.

El RNA total se aisló utilizando el reactivo *RNAwiz* (Ambion), o bien el reactivo *TRI-Reagent* (Ambión), siguiendo las indicaciones del fabricante. Cultivos de *Pseudomonas* sp. Y2 (silvestre y mutantes), o bien de distintas estirpes de *E. coli*, crecidos hasta una DO_{600nm} de 0,6 (en la mitad de la fase exponencial de crecimiento, aproximadamente) fueron usados como material de partida. Para facilitar la lisis, las células fueron resuspendidas vigorosamente en el correspondiente reactivo (*RNAwiz* o *TRI-Reagent*) y congeladas en nitrógeno líquido, continuando seguidamente con el protocolo o bien conservándose a $-80^{\circ}C$ hasta proceder a la extracción del RNA. Tras el aislamiento, el RNA se resuspendió en agua destilada, desionizada, estéril y tratada con DEPC, y se conservó congelado a $-80^{\circ}C$.

En ciertas ocasiones, las preparaciones de RNA total fueron purificadas con el *RNAqueous kit* (Ambion), con vistas a la síntesis subsiguiente de cDNA para los experimentos de PCR cuantitativa. Este tratamiento mejora sustancialmente la calidad de las muestras, eliminando restos de DNA genómico contaminante así como RNAs de muy pequeño tamaño molecular (5S rRNA, tRNAs).

La integridad y calidad general de las muestras de RNA fue estimada mediante electroforesis en geles de agarosa.

6.5. Cuantificación de ácidos nucleicos.

La concentración de ácidos nucleicos en las muestras se determinó mediante medida de la absorbancia a 260 nm (A_{260nm}), teniendo en cuenta las siguientes relaciones:

DNA de doble hebra	→	1 unidad de A_{260nm} equivale a una concentración de 50 μ g/mL
DNA monohebra (cDNA, oligonucleótidos)	→	1 unidad de A_{260nm} equivale a una concentración de 33 μ g/mL
RNA	→	1 unidad de A_{260nm} equivale a una concentración de 40 μ g/mL

Se prepararon diluciones de las muestras para obtener valores de A_{260nm} entre 0,1 y 1,0, y asegurarse así una estimación fiable. Las medidas se realizaron en un espectrofotómetro DU-640 (Beckman), utilizando cubetas de cuarzo de 1 cm de paso óptico con capacidad para 1ml, 100 μ l ó

10µl de muestra, según fuera conveniente, o bien en un *NanoDrop*[®] *ND-1000 UV-Vis Spectrophotometer* (*NanoDrop Technologies*).

Se midió también la absorbancia a 280 nm, puesto que la relación $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ da idea de la pureza de la preparación: valores entre 1,8 y 2,1 son aceptables, mientras que valores por debajo de 1,8 indican posible contaminación con proteínas y valores por encima de 2,1 indican la existencia de degradación de los ácidos nucleicos.

6.6. Modificación de ácidos nucleicos.

Reacciones de restricción.

Para la digestión de DNA mediante endonucleasas de restricción se siguieron las recomendaciones de las casas suministradoras de cada enzima, principalmente Amersham Biosciences, New England Biolabs y Roche. La inactivación de estas enzimas se realizó por un tratamiento con calor (60, 65 ó 70°C durante 15 minutos, dependiendo de la enzima) cuando fue posible o mediante una desproteización de las muestras por tratamiento con una mezcla de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico 25:24:1 (v/v/v) y precipitación mediante la adición de acetato sódico 300 mM y 0,8 volúmenes de isopropanol (Sambrook y col., 1989).

Tratamiento con fosfatasa alcalina.

Tras la digestión del DNA e inactivación de la enzima de restricción, en algunos casos el vector se desfosforiló, con el objetivo de mejorar el rendimiento en la obtención de plásmidos recombinantes. Para ello se añadió 1 unidad de *shrimp alkaline phosphatase* (SAP) (Promega) por µg de DNA y se incubó 15 minutos a 37°C, seguido de una posterior inactivación de la enzima por tratamiento de la mezcla a 75°C durante 15 minutos.

Rellenado de extremos.

Para el relleno de extremos 5' protuberantes y su conversión en extremos romos, se empleó el fragmento *Klenow* de la DNA polimerasa I (USB), en presencia de dNTPs, siguiendo las indicaciones del fabricante.

Unión de fragmentos de DNA.

En las reacciones de unión de fragmentos de DNA se utilizó la DNA ligasa del fago T4 (USB). Las reacciones tuvieron lugar a 16°C durante 16h. Cuando se requirió, la enzima se inactivó mediante una incubación a 65°C durante 10 minutos.

Alternativamente se utilizó el *LigaFast*TM *Rapid DNA ligation System* (Promega), incubando la mezcla a 37°C durante 1h, según las indicaciones del fabricante.

7. Síntesis de ácidos nucleicos.

7.1. Síntesis de cDNA.

Para la síntesis de cDNA se utilizó la enzima *SuperScript II RT* (200 U/ μ l; Invitrogen), siguiendo las instrucciones del fabricante. Para una reacción de 20 μ l se utilizaron 10 μ g de RNA total tratado con *RNAqueous* (ver apartado 6.4), 2 μ l de *Random primers* (3 μ g/ μ l) de Amersham (hexámeros) y H₂O destilada, desionizada, estéril y libre de RNasas hasta 12 μ l. La mezcla se incubó durante 5 minutos a 65°C en un termobloque y luego 2 minutos en hielo, adicionando después 4 μ l de tampón de reacción *First-Strand Buffer 5X*, 2 μ l de DTT 0,1M, 2 μ l de una mezcla de dNTPs 10mM (dATP, dCTP, dGTP y dTTP) y 1 μ l de *SuperScript II RT* (200 U/ μ l). La mezcla de reacción de 20 μ l se incubó durante 10 minutos a 25°C y luego a 42°C en un baño durante 3 horas, añadiendo 0,5 μ l de enzima al cabo de 90 minutos.

Tras la síntesis del cDNA, se eliminó el RNA añadiendo 1 μ l de RNasa A (10mg/mL) (Roche) y 0,5 μ l de RNasa H (5 U/ μ l) (USB) e incubando durante 30 minutos a 37°C. Después se adicionaron 25 μ l de H₂O estéril destilada y desionizada y 2,7 μ l de acetato sódico 3M, pH 5,2, para lograr un pH < 7,5. Se procedió entonces a la purificación del cDNA sintetizado (con el objetivo de eliminar enzimas, tampones, dNTPs, etc) empleando el *QIAquick PCR purification kit* (Qiagen), según las instrucciones de la casa comercial. Se efectuaron dos eluciones consecutivas con 30 μ l de H₂O estéril (pH ajustado a 8,0 con 0,2N NaOH) previamente calentada a 60-70°C.

7.2. Transcripción *in vitro*.

Para la obtención de transcritos de *styA*, las mezclas de reacción conteniendo distintas concentraciones de His₆-StyR purificada y fosforilada (de 0 a 10 μ M) y de MBP-PaaX1 purificada (de 0 a 600 nM), σ^{70} -RNA polimerasa de *E. coli* (Epicenter) (10nM) y el correspondiente plásmido utilizado como molde derivado de pTE-103 (pTE-E1B1, pTE-E1B2 y pTE-E2B1) (5nM) en un volumen final de 20 μ l, se incubaron durante 15 min a 30°C en tampón Txn (Tris-HCl 50mM, pH 7,5; KCl 50mM, MgCl₂ 20mM, DTT 1mM, EDTA 0,1mM y BSA 0,2 mg/ml), para permitir la formación del complejo abierto. El proceso de transcripción "*multiple round*" se inició mediante la adición de 2,5 μ l de una mezcla de RNasin (Promega), ATP 500 μ M, GTP 200 μ M, CTP 200 μ M, UTP 80 μ M y 5 μ Ci de [α^{32} -P]UTP (>3.000 Ci/mmol; Amersham Biosciences), e incubación durante 5 min a 30°C, tras lo cual se añadió heparina (0,1 mg/ml) para impedir la reiniciación, se incubó durante 5 min a 30°C, y finalmente se detuvo la reacción mediante la adición de 5 μ l de *stop/loading buffer* (EDTA 150mM, NaCl 1,05M, urea 14M, glicerol 10%, xilencianol 0,037%, azul de bromofenol 0,037%).

Para la obtención del transcrito de *paaF2*, y en ocasiones de *styA*, se siguió una modificación del procedimiento anterior. En este caso las mezclas de reacción conteniendo distintas concentraciones de His₆-StyR purificada y fosforilada (de 0 a 10 μM) y de MBP-PaaX1 purificada (de 0 a 600 nM), σ⁷⁰-RNA polimerasa de *Pseudomonas putida* (25nM) y el plásmido utilizado como molde pTE-PF2 (o también pTE-E1B1 en algunos casos) (10nM) en un volumen final de 20 μl, se incubaron durante 20 min a 30°C en tampón ACB (Tris-acetato 35 mM, pH 7,9; KAc 70 mM, Mg Ac₂ 5 mM, NH₄Ac 20 mM, DTT 1mM y BSA 0,2 mg/ml) para permitir la formación del complejo abierto. Tras añadir la mezcla de nucleótidos se realizó una incubación de 10 min a 30°C, y otra incubación de 8 min a 30°C tras la adición de heparina a la mezcla de reacción, añadiendo finalmente 5 μl de *stop/loading buffer* para parar la reacción.

Tras calentar las muestras a 95°C durante 5 min, éstas fueron analizadas en geles desnaturalizantes de poliacrilamida (con una concentración variable entre el 4,5% (p/v) y el 5% (p/v), según el tamaño de los fragmentos esperados)- urea 7M, y los transcritos obtenidos se cuantificaron usando un *Phosphorimager* (Amersham Biosciences). La producción del transcrito objeto de estudio se normalizó a la producción del transcrito RNA-1 del vector pTE103.

7.3. Extensión del cebador.

Se realizaron cultivos de *Pseudomonas* sp. Y2, *E. coli* CC118 λpir [pUE14] (que porta un inserto que contiene la región *P_{paaF2}*, junto con otros genes *sty* y *paa*; Tabla 4.2) y *E. coli* CC118 λpir [pKNG101] (utilizado como control negativo). *Pseudomonas* sp. Y2 se creció en medio M9 con estireno hasta alcanzar una DO_{600nm} de aproximadamente 1,0. *E. coli* CC118 λpir [pUE14] se creció en M9 suplementado con glicerol 1% hasta alcanzar una DO_{600nm} de unos 0,58; en ese punto se indujo con estireno suministrado en fase gaseosa hasta una DO_{600nm} de 0,85. *E. coli* CC118 λpir [pKNG101] se cultivó en M9 con glicerol 1% y, al alcanzar una DO_{600nm} de 0,4, se indujo con estireno y se recogió el cultivo a una DO_{600nm} de unos 0,7. Para llevar a cabo el ensayo de extensión del cebador se extrajo el RNA de las células de los cultivos anteriores, empleando para ello los *kits RNA protect* y *RNeasy Bacterial Reagent* (Qiagen), según las instrucciones del fabricante. A continuación, se trataron los RNAs con DNasa I a 37°C durante 15 minutos y las reacciones se pararon mediante la adición de EDTA 0,5 M. Tras una extracción con fenol-cloroformo, las muestras se precipitaron con acetato sódico pH 4,5 y etanol absoluto, se lavaron con etanol al 70% y finalmente se secaron por centrifugación a vacío.

Las reacciones de extensión del cebador se llevaron a cabo utilizando la *Reverse transcriptase* AMW (Roche), empleando como cebador el oligonucleótido pe-150 (Tabla 4.3), que hibrida con *paaF2*, y entre 5 y 15 μg de RNA total. El RNA total se resuspendió en 4 μl de una solución que contenía 2 pmoles del oligonucleótido pe-150 previamente marcado con [γ-P]³²-ATP (6.000 Ci/mmol, Amersham Biosciences) y se añadieron 4 μl de tampón de hibridación 2X (Tris-HCl 100

mM, pH 8,3, DTT 20 mM, NaCl 120 mM), calentando durante 5 minutos a 80°C para que tuviera lugar la desnaturalización térmica y enfriando rápidamente en hielo después durante 5 minutos. A la mezcla de reacción anterior se añadió una “mezcla de extensión” consistente en 4,5 µl de inhibidor de RNAsas (RNAsin, Promega), 1,25 µl de *Reverse transcriptase* AMW (24 U/ µl, Roche) y 70 µl de “tampón de extensión” 2X (Tris-HCl 50 mM, pH 8,3, NaCl 60 mM, MgCl₂ 30 mM, DTT 2,5 mM, dATP 2 mM, dTTP 2 mM, dGTP 2 mM y dCTP 2 mM) en un volumen final de 140 µl, y se incubó a 42°C durante 1 hora. La reacción se detuvo mediante la adición de 5 µl de una solución STOP (formamida desionizada 95% (v/v), azul de bromofenol 0,1%, xilencianol 0,1%, orange G 0,1%, EDTA 10 mM). Las muestras se desnaturalizaron por calentamiento a 80°C durante 3 minutos y se analizaron en un gel de poliacrilamida al 6% - urea 8M en tampón de electroforesis TBE “assars” 1X (Tris 100 mM, ácido bórico 99 mM, pH 8,0, EDTA 2,2 mM) (apartado 9.5). Para determinar el sitio de inicio de la transcripción se analizaron en el mismo gel las reacciones de secuenciación llevadas a cabo con el plásmido pTE-PF2 (Tabla 4.2) y el mismo oligonucleótido (pe-150) utilizando el *Sequenase 2.0 Kit* (USB) y [α^{32} -P] dATP (250 µCi, Amersham Biosciences). Los productos de reacción se detectaron por autorradiografía con Hyperfilm MP (Amersham Biosciences).

7.4. Técnicas basadas en el uso de la PCR

Amplificación de fragmentos de DNA mediante PCR.

La amplificación de fragmentos de DNA mediante PCR (reacción en cadena de la polimerasa; (Saiki y col., 1985; Mullis y col., 1986)) se llevó a cabo utilizando un termociclador *Mastercycler personal* de la casa Eppendorf y utilizando el *Expand High Fidelity PCR System* (Roche), basado en una mezcla de una *Taq* DNA polimerasa termoestable y una DNA polimerasa que posee actividad exonucleasa 3'→5' correctora de errores (Barnes, 1994). En ciertas ocasiones se empleó la *Pfu* DNA polimerasa (Biotools), que es una polimerasa termófila con actividad correctora, no presenta actividad endonucleasa ni exonucleasa 5'→3', no tiene actividad transferasa terminal y tiene una tasa de error de 1×10^{-6} . El tampón de reacción utilizado fue el suministrado con las enzimas. La concentración de los reactivos (dNTPs, oligonucleótidos, tampón, mezcla enzimática y DNA molde) en la mezcla de reacción fue generalmente la recomendada por el fabricante, aunque hubo de optimizarse en ocasiones. La temperatura de hibridación y el número de ciclos de amplificación se ajustaron empíricamente en cada ensayo hasta obtener la cantidad y pureza adecuada de producto amplificado. El tiempo de elongación o polimerización dependió del tamaño del producto de PCR que se esperaba obtener y se determinó siguiendo las instrucciones del fabricante. Tras la PCR, se comprobó la amplificación de fragmentos del tamaño esperado mediante electroforesis en un gel de agarosa, tras lo que se purificaron directamente del gel. Los

clones obtenidos mediante amplificación por PCR fueron secuenciados para verificar la ausencia de mutaciones introducidas por la polimerasa.

Mutagénesis dirigida.

La mutagénesis de secuencias en el DNA (del sitio de unión de PaaX en *styA*, Figura 5.11, y del sitio STY4 en el promotor P_{paaF2} , figura 5.32) se llevó a cabo mediante *overlapping PCR*. Para ello se diseñaron dos oligonucleótidos externos al fragmento de DNA que se deseaba amplificar y dos oligonucleótidos internos y complementarios que portaban la mutación deseada. En primer lugar se realizaron dos PCRs individuales utilizando, en cada una de ellas, uno de los oligonucleótidos mutantes y uno de los oligonucleótidos externos, obteniendo así dos productos parciales del fragmento de DNA incluyendo la mutación. Se purificaron ambos fragmentos, se mezclaron en la misma proporción, y dicha mezcla se empleó como molde para una nueva PCR, usándose esta vez los dos oligonucleótidos externos para amplificar. El producto generado abarca la secuencia a amplificar entera e incluye la mutación introducida. Posteriormente el producto mutante se aisló de un gel de agarosa, se clonó o se empleó como sonda para los ensayos de retardo de banda electroforética, secuenciándose previamente para comprobar tanto la presencia de la mutación introducida como la ausencia de mutaciones en otras posiciones.

RT-PCR cuantitativa.

Para cuantificar los niveles de mRNA se empleó la técnica de PCR a tiempo real o PCR cuantitativa. Esto se llevó a cabo usando un *ABI PRISM 7700 sequence detection system* (Applied Biosystems) y placas de 96 pocillos *MicroAmp® Optical 96-Well Reaction Plates* (Applied Biosystems). Las mezclas de reacción, conteniendo el cDNA, los oligonucleótidos y *SYBR Green PCR master mix* (Applied Biosystems), se prepararon según lo recomendado por el fabricante, empleando una concentración de cDNA y de oligonucleótidos previamente optimizada en cada caso. Para llevar a cabo la cuantificación de los niveles de mRNA se realizaron, para cada pareja de oligonucleótidos y por duplicado, curvas estándar con diluciones de cDNA de 1:10 a 1:10.000. La cuantificación relativa de la expresión de los genes objeto de estudio se llevó a cabo mediante el “Método de la curva estándar” descrito en el manual de usuario de *ABI PRISM 7700 sequence detection system* (Applied Biosystems).

Oligonucleótidos cebadores.

La síntesis de los oligonucleótidos utilizados en este trabajo fue encargada a la empresa SIGMA-Genosys. El diseño de oligonucleótidos se llevó a cabo utilizando el programa *Primer Select* incluido en el paquete informático DNASTARTM de Lasergene

(<http://www.dnastar.com/web/index.php>), así como mediante el servidor Primer3 (http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi).

8. Secuenciación de DNA.

8.1. Secuenciación automática.

Las reacciones de secuenciación automática se realizaron en la Unidad de Genómica (Campus de Moncloa) del Parque Científico de Madrid, donde se empleó un secuenciador multicapilar ABI PRISM 3730 (Applied Biosystems), o en el Servicio de Secuenciación Automática de DNA de la empresa Secugen, ubicada en el Centro de Investigaciones Biológicas, que dispone de los secuenciadores automáticos ABI PRISM 3700 (Applied Biosystems) y ABI PRISM 3730. Generalmente se utilizaron como cebadores oligonucleótidos comerciales que hibridan en zonas conocidas de los vectores en los que se encontraban clonados los fragmentos de DNA analizados. Sin embargo, para el estudio de aquellas zonas cuya clonación presentaba mayores dificultades, se diseñaron oligonucleótidos específicos (Tabla 4.3) que se utilizaron como cebadores en la reacción de secuenciación.

8.2. Secuenciación manual.

La secuenciación manual realizada en los ensayos de extensión del cebador (apartado 7.3) y en los ensayos de protección frente a la digestión con DNasa I (apartado 13.3) se llevó a cabo según el método descrito por Maxam y Gilbert (Maxam y Gilbert, 1980). Alternativamente se empleó el *kit* comercial *Sequenase 2.0 Kit* (USB), siguiendo las instrucciones del fabricante.

Los productos de la secuenciación se separaron en un gel de poliacrilamida según se detalla en el apartado 9.5.

9. Técnicas electroforéticas

9.1. Electroforesis de DNA en geles de azarosa.

El análisis electroforético de DNA se realizó en geles horizontales de agarosa D2 (Pronadisa) a una concentración del 0,8%-2,0% p/v en TAE 1X (Tris 40 mM, ácido acético 40 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0) sumergidos en una cubeta con el mismo tampón. A las muestras se les añadió tampón de carga (glicerol 50% v/v, azul de bromofenol 0,25% p/v, xilencianol FF 0,25% p/v, EDTA 0,2 M pH 8,0). Como marcadores de tamaño se utilizaron (en función del tamaño esperado de los fragmentos) el DNA de λ digerido con *BstEII* (Fermentas) o bien una escalera de 100 pb (Biotools). El campo eléctrico aplicado se ajustó en función de las características de los fragmentos

analizados, variando entre 4V/cm y 8V/cm. Tras la electroforesis, el gel se tiñó mediante inmersión en una solución de bromuro de etidio (1µg/mL) y el DNA se visualizó bajo luz ultravioleta ($\lambda=302$ nm) en un transiluminador *UVIPro VI.0 de UVItec Limited* equipado con un sistema de captura y análisis de imágenes. En otras ocasiones, el bromuro de etidio se añadió previamente a la agarosa durante el proceso de gelificación.

En el caso de electroforesis preparativas y con la finalidad de extraer fragmentos de DNA del gel, se empleó agarosa LM (Pronadisa), de baja temperatura de fusión y gelificación, para facilitar el proceso y mejorar el rendimiento de la purificación.

9.2. Electroforesis de RNA en geles de agarosa.

La integridad de las extracciones de RNA total se comprobó mediante electroforesis en condiciones nativas utilizando geles horizontales de agarosa al 2% p/v en TBE 0,5X (Tris 45 mM, ácido bórico 45 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0) y siguiendo el protocolo, con ligeras modificaciones, que aparece en el manual del *RNAqueous kit* (Ambion). Se analizó 1µg de cada muestra de RNA, añadiendo tampón de carga (15% Ficoll 400, azul de bromofenol 0,25% p/v, xilencianol FF 0,25% p/v), y se desarrolló la electroforesis a 5V/cm. La tinción del gel y visualización de las bandas correspondientes se realizó según lo indicado en el apartado 9.1.

9.3. Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida.

El análisis de muestras de proteínas purificadas o bien de extractos proteicos se llevó a cabo en condiciones desnaturizantes en presencia de SDS, en geles de poliacrilamida (PAGE) a una concentración del 12,5% (en el caso de MBP-PaaX1 y extractos proteicos) o bien del 15% (en el caso de His₆-StyR) según el método de Laemmli (1970). Las muestras se calentaron a 95°C durante 5 minutos en presencia de tampón de ruptura (Tris-HCl 125 mM, glicerol 20% (v/v), β-mercaptoetanol 10% (v/v), SDS 4% (p/v), azul de bromofenol 0,04 mg/ml) y se sometieron a un campo eléctrico de 18 V/cm en tampón Tris-HCl 25 mM, pH 8,0, glicina 192 mM y SDS 0,1% (p/v) en equipos *Miniprotean II* (Bio-Rad). Los geles se fijaron y tiñeron con una solución de Coomasie (2,5 g/l de Coomasie G-250 en una mezcla de agua:ácido acético:metanol 40:10:50 (v/v/v)) durante 15 minutos y se destiñeron posteriormente con una solución de agua:ácido acético:metanol 67:8:25 (v/v/v). Los geles se secaron sobre papel de filtro Whatman 3 MM por calentamiento durante 1 hora a 80°C utilizando un equipo seca-geles acoplado a una bomba de vacío.

Las mezcla de proteínas empleadas como marcadores de tamaño molecular (fosforilasa B, 97,4 kDa; BSA, 66,2 kDa; ovoalbúmina 45 kDa; anhidrasa carbónica, 31 kDa; inhibidor de tripsina, 21,4 kDa) se adquirió en Bio-Rad.

9.4. Electroforesis de DNA en geles de poliacrilamida en condiciones nativas.

Los ensayos de retardo de banda electroforética realizados con las proteínas MBP-PaaX1 e IHF purificadas (apartado 12.2) se llevaron a cabo en geles nativos de poliacrilamida al 5% (p/v). Las electroforesis se llevaron a cabo en cubetas *Miniprotean III* (Bio-Rad) a 100 V en tampón TBE 0,5X (Tris-borato 45 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0) a temperatura ambiente durante 1 hora. Los ensayos de retardo de banda electroforética con His₆-StyR purificada (apartado 12.1) se analizaron en geles nativos de poliacrilamida al 10% (p/v). Las electroforesis se llevaron a cabo en cubetas *Protean II* (Bio-Rad) a 100 V en tampón TBE 0,5X a 4°C durante 6 horas. Los geles se secaron sobre papel de filtro Whatman 3 MM por calentamiento durante 1 hora a 80°C utilizando un equipo seca-geles acoplado a una bomba de vacío, y a continuación fueron expuestos en películas *Hyperfilm MP* (Amersham Biosciences), o bien usando un equipo *Phosphorimager* (Amersham Biosciences).

9.5. Electroforesis de DNA en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes.

Las muestras procedentes de los ensayos de extensión del cebador (apartado 7.3) y de protección frente a la digestión con DNasa I (apartado 13.3) se analizaron en geles de poliacrilamida al 6 ó 7% (p/v), respectivamente, y urea 8M en tampón “TBE *assars* 1X” (Tris 100 mM, ácido bórico 99 mM, pH 8,0, EDTA 2,2 mM), y se corrieron en un sistema *Dedicated sequencing kit* (CBS Scientific Co, model 1# DH-400-33) a 50 W durante 2-3 horas. Los geles se secaron sobre papel de filtro Whatman 3 MM por calentamiento durante 1 hora a 80°C utilizando un equipo seca-geles acoplado a una bomba de vacío, y a continuación fueron expuestos en películas *Hyperfilm MP* (Amersham Biosciences), o bien usando un equipo *Phosphorimager* (Amersham Biosciences).

9.6. Electroforesis de RNA en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes.

Para observar los fragmentos de mRNA resultantes del proceso de transcripción *in vitro* (apartado 7.2) se emplearon geles de poliacrilamida (con una concentración variable entre el 4,5% (p/v) y el 5% (p/v), según el tamaño de los fragmentos esperados) y urea 7 M en tampón “TBE *assars* 1X” (Tris 100 mM, ácido bórico 99 mM, pH 8,0, EDTA 2,2 mM) que se desarrollaron a un voltaje constante de 360 V en un sistema *Protean II xi* (Bio-Rad) durante 3-6 horas. Los geles se secaron sobre papel de filtro Whatman 3MM por calentamiento durante 1 hora a 80°C utilizando un equipo seca-geles acoplado a una bomba de vacío, y a continuación fueron expuestos en películas *Hyperfilm MP* (Amersham Biosciences), o bien usando un equipo *Phosphorimager* (Amersham Biosciences).

10. Transferencia e hibridación de ácidos nucleicos.

10.1. Marcaje de sondas con digoxigenina.

Los fragmentos de DNA utilizados como sondas se marcaron con digoxigenina mediante el método *random priming* descrito en el manual *The DIG System User's Guide for Filter Hybridization* editado por Roche y utilizando los reactivos suministrados por esta misma compañía.

10.2. Southern blot.

La transferencia de fragmentos de DNA desde geles de agarosa a membranas de Nylon se realizó siguiendo el método descrito por Sambrook y col. (1989). Se utilizaron membranas de Nylon cargadas positivamente suministradas por Roche y Amersham Biosciences. Tras la transferencia, el DNA se fijó a la membrana (Hybond-N+, Amersham Biosciences) mediante la exposición a luz ultravioleta (254 nm) durante 3 minutos. Una vez fijado, el DNA se sometió a hibridación con sondas marcadas con digoxigenina (apartado 10.1). El marcaje de sondas con digoxigenina, la hibridación y posterior detección de señales se llevaron a cabo utilizando los reactivos suministrados por Roche y siguiendo los protocolos especificados en el manual *The DIG System User's Guide for Filter Hybridization* de esta misma compañía. La detección de la señal quimioluminiscente se llevó a cabo por autorradiografía mediante exposición de las membranas utilizando películas X-OMAT UV de KODAK en un casete equipado con un amplificador de señal *BioMax TranScreen-HE* (Kodak).

11. Ensayos enzimáticos.

11.1. Inducción de los promotores P_{styA} y P_{paaF2} .

Se prepararon cultivos de 100 ml de medio M9 suplementado con glicerol al 1% como única fuente de carbono, y se incubaron a 30°C hasta alcanzar una DO_{600nm} de 0,4. En este punto cada uno de los cultivos se distribuyó en varios matraces de 10 ml, en los que se dispensó un volumen adecuado de cada uno de los compuestos cuya capacidad inductora se quería estudiar, a partir de disoluciones *stock* preparadas a una concentración de 1 mM en agua, hasta una concentración final de 90 μ M. Una hora después se midió el nivel de actividad β -galactosidasa, tal y como se describe a continuación (apartado 11.2).

11.2. Medida de actividad β -galactosidasa.

La actividad β -galactosidasa de distintos clones y estirpes, tanto de *E. coli* como de *Pseudomonas*, se determinó según el ensayo descrito por Miller (1972). Las células se cultivaron en los medios adecuados y condiciones de inducción variables según el experimento. A partir de

alícuotas de 1 ml de cultivo, las células se lavaron con buffer Z (tampón fosfato sódico 0,1 M pH 7,0, KCl 10 mM, MgSO₄ 10 mM, β-mercaptoetanol 50 mM) y se tomaron 100 µl ó 250 µl de muestra, según los casos, adicionándose buffer Z hasta completar un volumen final de 1 ml. Se añadieron 50 µl de cloroformo y 100 µl de SDS al 0,1% (p/v) y se agitó mediante vortex durante 10 segundos para provocar la permeabilización de la membrana. Las muestras se atemperaron en un baño a 28°C durante 5 minutos, se añadieron 200 µl de una solución de ONPG (*o*-nitrofenil-β-D-galactósido 4 mg/ml en tampón fosfato 0,1M pH 7,0) y se incubaron con agitación suave hasta observar la aparición de una coloración amarilla, producto de la formación del *o*-nitrofenol resultante de la ruptura enzimática del ONPG. La reacción se detuvo mediante la adición de 500 µl de Na₂CO₃ 1 M. Tras valorar la DO_{420nm} y la DO_{550nm} de las muestras, así como la DO_{600nm} del cultivo en el momento de la recolección de la muestra, las unidades Miller se calcularon según la fórmula:

$$\text{Unidades Miller} = 1000 \cdot \frac{\text{DO}_{420\text{nm}} - 1,75 \cdot \text{DO}_{550\text{nm}}}{\text{Tiempo} \cdot \text{volumen} \cdot \text{DO}_{600\text{nm}}}$$

Esta fórmula relaciona el *o*-nitrofenol producido (DO_{420nm}) con el tiempo de reacción (en minutos) y con una estimación del número de células en la muestra (volumen·DO_{600nm}). La DO_{550nm} se incluye para disminuir el error producido por la presencia de restos celulares en las muestras. Los resultados que se muestran son una media de al menos tres experimentos independientes con una desviación menor del 10%.

11.3. Valoración de la actividad FA-CoA ligasa.

La medida de actividad FA-CoA ligasa se llevó a cabo empleando extractos celulares según el método descrito por Martínez-Blanco y col. (1990). Las células se cultivaron en medio M9 suplementado con la fuente de carbono apropiada hasta que los cultivos alcanzaron una DO_{600nm} de entre 0,6 y 0,9. Los cultivos se concentraron en 0,05 volúmenes de tampón Tris-HCl 50 mM pH 8,2, se sonicaron y se centrifugaron a 12.000 rpm durante 30 minutos a 4°C. El sobrenadante se utilizó como extracto crudo para la realización del ensayo. La formación de FA-CoA se valoró acoplado esta reacción a la formación de N-hidroxifenilacetamida, mediante la adición de una solución de hidroxilamina. Así, la mezcla de reacción empleada para valorar la actividad PA-CoA ligasa del extracto contenía 12,5 µl de MgCl₂, 50 µl de ATP 0,1 M, 30 µl de CoA 20 mM, 30 µl de AFA 0,2 mM, 50 µl de solución de hidroxilamina y 100 µl de extracto. La mezcla se incubó durante 20 minutos a 30°C y se detuvo la reacción mediante la adición de 450 µl de solución de cloruro férrico. Las muestras se mantuvieron 30 minutos en hielo, se centrifugaron a 12.000 rpm

durante 2 minutos y se valoró espectrofotométricamente la aparición del color rojo-púrpura debido a la formación del fenilacetilhidroxamato mediante medida de la absorbancia a 540 nm de los sobrenadantes. El coeficiente de extinción molar del fenilacetilhidroxamato en estas condiciones es de $0,9 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

La solución de hidroxilamina (pH 8,0) fue preparada justo antes de su adición al ensayo mezclando 0,1 ml de H₂O destilada, 0,5 ml de KOH 4 M y 0,4 ml de hidrocloreuro de hidroxilamina 5M. La solución de cloruro férrico se preparó a partir de FeCl₃ 0,37 M, ácido tricloroacético 20 mM y HCl 0,66 M.

12. Hiperexpresión y purificación de proteínas de fusión.

12.1. Proteínas de fusión con histidinas.

La hiperexpresión y purificación de la proteína de fusión His₆-StyR se realizó usando el sistema *QIAexpress System* (Qiagen) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se empleó la estirpe de *E. coli* MV1184, que contiene la mutación *lacI^r* en su cromosoma y por tanto sobreexpresa el represor LacI, y el vector de hiperexpresión pQE-9. El plásmido pQ-R porta la secuencia que codifica StyR clonada en pQE-9, de forma que se incorpora un péptido de 6 histidinas (6xHis) en el extremo N-terminal de StyR.

Las condiciones de inducción fueron las siguientes: se creció *E.coli* MV1184 [pQ-R] a 37°C en 1 litro de medio LB con ampicilina 100 µg/ml hasta alcanzar una DO_{600nm} de unas 0,5 unidades; en ese momento se indujo el cultivo mediante la adición de IPTG 0,5 mM e incubación 6 horas a 37°C con una agitación de unas 250 rpm. Se separaron las células del medio de cultivo mediante centrifugación a 5.000 rpm durante 20 minutos a 4°C. A continuación se resuspendió el precipitado celular, concentrando el cultivo inicial 25 veces en el tampón de lisis (tampón fosfato potásico 20 mM pH 7,5; NaCl 500 mM), y se sometió a sonicación con un equipo *Sonifier II W250-W450* (Branson) aplicando unos 10 pulsos de 10 segundos a una intensidad del 30% con pausas de 10 segundos entre pulsos y en un baño de hielo-agua. La proteína de fusión His₆-StyR se purificó en forma de cuerpos de inclusión en condiciones desnaturalizantes y posterior plegamiento para recuperar su conformación nativa. Así, tras la sonicación y centrifugación del extracto (5.000 rpm, 4°C, 30 minutos), se resuspendió el sedimento (donde permanece la proteína en forma de cuerpos de inclusión) en 10 ml de tampón de lisis suplementado con urea 8 M (de modo que se desnaturaliza la proteína) y, tras una posterior centrifugación (5.000 rpm, 4°C, 30 min) se llevó a cabo una dilución 1:10 del sobrenadante (donde permanecía la proteína, desplegada, que vuelve a replegarse al disminuir la concentración de urea) con el tampón de lisis. La proteína de fusión se purificó por cromatografía de afinidad usando la resina *Chelating Sepharose Fast Flow* (Amersham Biosciences) previamente cargada con NiCl₂ 5 mg/ml y equilibrada con el tampón de lisis. La

columna se lavó repetidas veces con tampón de lisis, para eliminar las proteínas retenidas inespecíficamente en la columna, y con el mismo tampón conteniendo imidazol 75 mM. Finalmente, se eluyó la proteína con tampón de lisis en presencia de imidazol 500 mM, tomando alícuotas de 500 μ l. La pureza de las distintas fracciones se analizó mediante electroforesis en geles de acrilamida en condiciones desnaturizantes. Posteriormente se realizó un cambio de tampón a Tris-HCl 20 mM pH 7,5, KCl 250 mM y glicerol 5% con el sistema *Micrococon YM-10 Centrifugal Filter Unit* (Millipore) y se recogieron alícuotas de 200 μ l, que se congelaron inmediatamente con nitrógeno líquido y se almacenaron a -80°C hasta su uso.

12.2. Proteínas de fusión con la proteína de unión a maltosa (MBP).

La hiperexpresión y purificación de la proteína de fusión MBP-PaaX1 se realizó empleando el sistema *pMAL Protein Fusion and Purification System* (New England Biolabs) siguiendo las indicaciones de la casa comercial. Se utilizó la estirpe de *E. coli* UT5600, defectiva para la proteasa OmpT, y el vector de hiperexpresión pMAL-c2X (New England Biolabs). El plásmido pM-X1 porta la secuencia que codifica PaaX1 clonada en pMAL-c2X. Las condiciones de inducción fueron las siguientes: se creció *E. coli* UT5600 [pM-X1] en 100 ml de medio LB a 37°C con ampicilina 50 μ g/ml y glucosa 10 mM hasta alcanzar una DO_{600nm} de 0,5; en ese momento se añadió IPTG a una concentración final de 0,3 mM y se incubó durante 2 horas a 37°C con agitación (250 rpm). El cultivo se concentró 20 veces en tampón de lisis (Tris-HCl 20 mM, pH 7,5; KCl 250 mM) y se sometió a sonicación con un equipo *Sonifier II W250-W450* (Branson) aplicando unos 10 pulsos de 10 segundos a una intensidad del 30% con pausas de 10 segundos entre pulsos en un baño de hielo-agua. La proteína de fusión MBP-PaaX1 se purificó en condiciones no desnaturizantes por cromatografía de afinidad usando una resina de amilosa (New England Biolabs), según las indicaciones del fabricante. La elución se realizó en tampón de lisis en presencia de maltosa 150 mM. La proteína purificada se repartió en alícuotas de 500 μ l, cuya pureza fue analizada mediante electroforesis en geles de acrilamida en condiciones desnaturizantes. Las distintas alícuotas fueron inmediatamente congeladas con nitrógeno líquido y almacenadas a -80°C

12.3. Obtención de extractos proteicos.

Para la preparación de los extractos proteicos utilizados en los ensayos de retardo de banda electroforética (apartado 13.2), se crecieron los cultivos durante la noche en el medio correspondiente y a la temperatura adecuada, y se recogieron las células por centrifugación a 5.000 rpm durante 10 minutos en una centrífuga Sorvall equipada con un rotor GSA (Sorvall Instruments). Las células se resuspendieron a continuación en 2 ml de tampón de ruptura (Tris-HCl 20 mM, pH 7,5; KCl 50 mM, β -mercaptoetanol 2 mM, EDTA 10 mM, glicerol 10%) y se

rompieron por ultrasonidos en un sonicador B-12 A de Branson Sonic Power Co. (Danbury, Connecticut) mediante 3 pulsos de sonicación de 10 segundos con intervalos de 10 segundos en un baño de hielo-agua. El lisado se centrifugó a 15.000 rpm durante 15 minutos en un rotor SS-34 (Sorvall Instruments) y el sobrenadante decantado fue empleado como extracto crudo.

Para la preparación de los extractos proteicos empleados para los ensayos de actividad PA-CoA ligasa (apartado 11.3) se crecieron las células en medio M9 suplementado con la fuente de carbono apropiada hasta que los cultivos alcanzaron una OD_{600nm} de entre 0,6 y 0,9. Los cultivos se concentraron en 0,05 volúmenes de tampón Tris-HCl 50 mM pH 8,2, se sometieron a dos pulsos de sonicación de 10 segundos con un intervalo de 10 segundos en un baño de hielo-agua con una amplitud del 30% en un Branson Digital Sonifier y se centrifugaron a 12.000 rpm durante 30 minutos a 4°C. El sobrenadante se utilizó como extracto crudo para la realización del ensayo.

12.4. Determinación de la concentración de proteínas.

La concentración de las proteínas purificadas, así como concentración de proteína total de los extractos crudos, se determinó mediante el método de Bradford (Bradford, 1976) empleando albúmina de suero bovino (BSA) como patrón.

12.5. Fosforilación de His₆-StyR.

La fosforilación de la proteína His₆-StyR purificada se llevó a cabo de dos formas distintas. En la mayoría de los casos, se procedió a la fosforilación de la proteína mediante incubación durante 45-60 minutos a 28°C en tampón P-B (Tris-acetato 45 mM pH 8,0, acetato potásico 30 mM, MgCl₂ 8 mM, acetato amónico 27 mM, DTT 1 mM, KCl 80 mM, glicerol al 10% (v/v) y polietilenglicol 4% (v/v)) en presencia de acetilfosfato 20 mM (Leoni y col., 2005).

En algunos experimentos de transcripción *in vitro* en los que se utilizó tampón Txn la fosforilación se llevó a cabo suplementado dicho tampón hasta alcanzar una concentración final de acetilfosfato 20 mM y MgCl₂ 20 mM, incubándose entonces la proteína durante 45-60 minutos a 28°C.

12.6. σ^{70} -RNA polimerasa de *P. putida* KT2440.

La σ^{70} -RNA polimerasa de *P. putida* KT2440 (Bagdasarian y col., 1981) fue purificada según lo descrito para la holoenzima de *E. coli* (Hager y col., 1990) y fue un regalo de Lisandro Bernardo (Umeå University).

13. Ensayos de unión proteína-DNA.

13.1. Marcaje de sondas.

Marcaje de sondas con [$\gamma^{32}\text{P}$] ATP y T4 polinucleótido quinasa.

El marcaje de los oligonucleótidos empleados en la amplificación de sondas radiactivas se logró mezclando 2,5 μl del oligonucleótido en cuestión a 2 μM (0,5 μM final), 1 μl de tampón T4 polinucleótido quinasa 10X, 3 U de T4 polinucleótido quinasa (30 U/ μl) y 3 μl de [$\gamma^{32}\text{P}$]ATP 10 $\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$ (Amersham Biosciences) en un volumen final de 10 μl e incubando la mezcla de reacción a 37°C durante 30 minutos. El nivel de incorporación del nucleótido radiactivo al oligonucleótido se comprobó mediante una cromatografía en capa fina (TLC), para lo cual se depositaron 0,5 μl de la sonda marcada sobre una membrana de sílica gel 60 (Merck) utilizando HCl 1N como fase móvil y se realizó a continuación una autorradiografía empleando una película *Hyperfilm MP* (Amersham Biosciences). A partir del oligonucleótido marcado se llevó a cabo la reacción de PCR, para lo cual se añadieron a la mezcla de reacción 10 μl del oligonucleótido marcado radiactivamente (5 pmoles), 7,5 μl del oligonucleótido no marcado a 1 μM (7,5 pmoles), 4 μl de dNTPs a 2,5 mM (0,2 mM final), 5 μl de tampón *Pfu* 5X, 1 μl de *Pfu* (Biotools), 1 μl de DNA molde (aproximadamente 10 ng/ μl) en un volumen final de 50 μl . La cantidad y el tamaño del fragmento de DNA obtenido en la PCR se comprobó cargando 3 μl en un gel de acrilamida al 7,5%. El producto de la PCR se purificó utilizando el *High PureTM PCR Product Purification Kit* (Roche).

Marcaje de sondas con [$\alpha^{32}\text{P}$]dATP y el fragmento *Klenow* de la DNA polimerasa.

El marcaje de sondas mediante el rellenado de extremos 5' protuberantes se realizó utilizando una mezcla de dNTPs que incluía [$\alpha^{32}\text{-P}$]dATP (250 μCi , Amersham Biosciences) y el fragmento *Klenow* de la DNA polimerasa I. La reacción de marcaje se realizó en un volumen total de 50 μl y con una mezcla de reacción de 1 μg de DNA (previamente digerido con *EcoRI* y/o *BamHI*, según el caso), 5 μl de tampón *Klenow* 10X, 5 μl de una mezcla de dGTP, dCTP y dTTP (2 mM), 1 μl de [$\alpha^{32}\text{-P}$]dATP y 2,5 μl de polimerasa *Klenow* (diluída 1:30) (Roche). Tras una incubación de 30 minutos a 37°C y 10 minutos a 75°C, la mezcla se dejó enfriar lentamente a temperatura ambiente, y, a partir de ella, se purificó la sonda marcada empleando *Micro Bio Spin P30 columns* (Bio-Rad) equilibradas con Tris-HCl 20 mM pH 7,5.

13.2. Ensayos de retardo de banda electroforética.

Las mezclas de reacción para los ensayos de retardo de la migración de la banda electroforética en gel se llevaron a cabo en un volumen final de 9 μ l, conteniendo de 0,1 nM a 0,5 nM de la sonda de DNA (previamente marcada según lo descrito en el apartado 13.1), 50-100 μ g/ml de DNA de esperma de salmón (utilizado como DNA competidor), 100 μ g/ml de BSA y distintas concentraciones de la proteína purificada en cuestión (o de extracto proteico) en el tampón adecuado. En los ensayos de retardo en gel realizados con las proteínas IHF y MBP-PaaX1 purificadas, las mezclas de reacción fueron incubadas durante 20 minutos a temperatura ambiente (aproximadamente 20°C) en tampón TRRG 1X (Tris-HCl 20 mM pH 7,5; KCl 50 mM, β -mercaptoetanol 2 mM y glicerol 10%). Para los ensayos de retardo en gel con His₆-StyR purificada y previamente fosforilada, las mezclas de reacción se incubaron a 30°C durante 15 minutos en tampón B-B 1X (Tris-HCl 20 mM pH 8.0, KCl 30 mM, EDTA 2 mM, MgCl₂ 5 mM y glicerol 5%) (Leoni y col., 2005). En el caso de los ensayos de retardo en gel con extractos proteicos las mezclas de reacción se incubaron a temperatura ambiente durante 20 minutos en tampón TRRG 1X.

En los ensayos de competición con sonda fría se procedió de la forma anteriormente descrita, añadiendo también a la mezcla de reacción DNA sin marcar a la concentración oportuna, normalmente en bastante exceso con respecto a la concentración usada de sonda de DNA marcada.

Las muestras procedentes de estas reacciones de incubación se analizaron en geles nativos de poliacrilamida (apartado 9.4).

13.3. Ensayos de protección frente a la digestión con DNasaI.

Los complejos proteína-DNA para los experimentos de protección frente a la digestión con DNasaI se formaron incubando durante 20 minutos a temperatura ambiente y en un volumen final de 15 μ l, 0,5 nM del fragmento de DNA marcado, 100 μ g/ml de DNA de esperma de salmón, 100 μ g/ml de BSA y las proteínas a ensayar en cada caso en tampón TRRG 1X (Tris-HCl 20 mM pH 7,5; KCl 50 mM, β -mercaptoetanol 2 mM y glicerol 10%). A continuación se añadieron 3 μ l de solución de DNasa I (1 μ g/ μ l en Tris-HCl 10 mM pH 7, MgCl₂ 10 mM, CaCl₂ 10 mM y KCl 125 mM) y se incubó a 37°C durante 20-25 segundos. La reacción se detuvo mediante la adición de 180 μ l de la solución DNasa STOP, que contiene acetato sódico 0,4 M, EDTA 2,5 mM, DNA de esperma de salmón 100 μ g/ml y glucógeno 0,3 μ l/ml. Tras una extracción con fenol-cloroformo las muestras se precipitaron y se lavaron con etanol absoluto y etanol al 70%. Las muestras se secaron y resuspendieron en 4 μ l de tampón de carga que contenía formamida al 90% (v/v), EDTA 20 mM, azul de bromofenol al 0,05% (v/v) y xilencianol al 0,05% (v/v). Seguidamente se desnaturalizaron por calentamiento a 95°C durante 5 minutos y se analizaron en un gel desnaturalizante de acrilamida al 7% (v/v) y urea 8M. Los geles se secaron al vacío sobre papel Whatman 3MM y se

expusieron en películas Hyperfilm MP (Amersham Biosciences). La secuenciación del fragmento se llevó a cabo mediante el método A+G descrito por Maxam y Gilbert (Maxam y Gilbert, 1980).

14. Ultracentrifugación analítica.

Estos ensayos se llevaron a cabo en el Servicio de ultracentrifugación analítica del Centro de Investigaciones Biológicas (CSIC, Madrid).

Los experimentos de equilibrio y velocidad de sedimentación se llevaron a cabo a 20°C en una ultracentrífuga analítica XL-A (Beckman-Coulter) equipada con un sistema de detección óptico UV-VIS, que permite la selección de longitudes de onda en el rango de 200 a 700 nm. Se utilizó un rotor An-50Ti y celdas de doble sector y de seis agujeros de ventana de cuarzo de 12 mm de paso óptico.

La proteína MBP-PaaX1 purificada se preparó a distintas concentraciones en tampón Tris-HCl 20 mM pH 7,5, KCl 250 mM y maltosa 15 mM. Previamente a los experimentos de ultracentrifugación analítica se midió la absorbancia a 230 nm del tampón, así como la dispersión del mismo a 300 nm, con el objetivo de descartar una posible interferencia de la maltosa en las medidas posteriores.

14.1. Equilibrio de sedimentación.

Los experimentos de equilibrio de sedimentación se llevaron a cabo con un volumen de muestra de 80 μ l, centrifugándose a velocidades sucesivas de 7.000, 9.000 y 11.000 rpm. Las medidas de absorbancia (0,001 cm de tamaño de paso, de 5 promedios) fueron tomadas a las longitudes de onda apropiadas. En todos los casos la línea base (contribución del material que no es proteína) fue obtenida a una alta velocidad de sedimentación de 43.000 rpm. Las longitudes de onda se seleccionaron teniendo en cuenta el valor del ϵ_{280} de cada muestra estudiada y la concentración de las mismas. Así, en los casos de baja absorbancia, se eligieron longitudes de onda próximas a la absorción del enlace peptídico y del máximo de emisión de la lámpara de xenon, mientras que grandes concentraciones de proteína (que saturan las medidas de Abs_{280}), hacen preferibles valores de longitud de onda en torno a 255 nm.

Una vez alcanzado el equilibrio de sedimentación a cada una de las velocidades, se determinó la masa molecular aparente promedio de flotación ($M_{w,ap}^*$) ajustando la ecuación que describe la distribución radial del gradiente de concentración de proteína en el equilibrio de sedimentación para un soluto ideal a los datos experimentales, mediante los programas EQASSOC y XLAEQ (Minton, 1994). Estos valores se convirtieron en las correspondientes masas moleculares promedio ($M_{w,ap}$) usando los respectivos volúmenes específicos parciales, calculados a partir de la

composición de aminoácidos y corregidos por la temperatura (Laue y col., 1992), a partir de la siguiente ecuación:

$$M_{w,a}^* = M_{w,a} (1 - \rho_0 \cdot V_p)$$

Donde ρ_0 es la densidad del tampón de la muestra y V_p el volumen específico parcial de la proteína.

14.2. Velocidad de sedimentación.

Estos ensayos se realizaron a una velocidad de 30.000 o 38.000rpm, según los casos, en un volumen de muestra de 350-400 μ l. Se hicieron medidas de la absorbancia a 260 nm y 280 nm, en dos experimentos diferentes.

Las distribuciones de los coeficientes de sedimentación diferenciales, $c(s)$, se calcularon por modelado mediante el método de mínimos cuadrados de los datos de velocidad de sedimentación. Para estos cálculos se utilizó el programa SEDFIT (Schuck, 2000; Schuck y col., 2002).

15. Análisis informático de secuencias.

15.1. Visualización y corrección de los cromatogramas.

Los cromatogramas obtenidos en la secuenciación automática se analizaron y corrigieron utilizando el programa Chromas 1.43 (Conor McCarthy. School of Biomolecular and Biomedical Science. Faculty of Science and Technology. Griffith University. Brisbane, Queensland. Australia. Programa de libre distribución; <http://trishul.sci.gu.edu.au/~conor/chromas.html>). Este programa permite la edición de cromatogramas archivados en los formatos ABI y SCF.

15.2. Mapas de restricción.

La búsqueda de dianas de restricción en las secuencias se realizó mediante el programa pDRAW32 (Kjeld Olesen. ACACLONE software. Programa de libre distribución; <http://www.geocities.com/acaclone>). Alternativamente se utilizó el programa MapDraw perteneciente al paquete informático DNASTAR de Lasergene (<http://dnastar.com>).

15.3. Comparación de secuencias con las bases de datos (SwissProt y trEMBL) y alineamiento de proteínas.

La comparación de las secuencias de aminoácidos de los ORFs con las secuencias de proteínas almacenadas en las bases de datos trEMBL y SwissProt se realizó mediante el programa BLAST de los servidores EXPASY (<http://ca.expasy.org/>) y EMBL (<http://www.embl.org/>). Para el alineamiento múltiple de proteínas se utilizó el programa ClustalW, que se encuentra disponible en varios servidores a los que se puede llegar desde EXPASY.

15.4. Plegamiento de secuencias de DNA.

El plegamiento teórico de las secuencias de DNA se realizó empleando el servidor Bend.it® (Andrei Gabrielian, Kristian Vlahovicek and Sándor Pongor, 1998; http://hydra.icgeb.trieste.it/dna/bend_it.html).

15.5. Plegamiento de secuencias de RNA.

El plegamiento teórico de las regiones de RNA se ha llevado a cabo utilizando los programas m-fold (M. Zuker, D.H. Mathews and D.H. Turner. “Algorithms and Thermodynamics for RNA Secondary Structure Prediction: A Practical Guide in RNA”. Biochemistry and Biotechnology, J. Barciszewski and B.F.C. Clark, eds., NATO ASI Series, Kluwer Academic Publishers, (1999); <http://frontend.bioinfo.rpi.edu/applications/mfold/>) y RNAfold (Vienna RNA secondary structure servers; <http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAfold.cgi>).

15.6. Comparación y búsqueda de secuencias en el DNA.

La comparación de secuencias de DNA con las almacenadas en las bases de datos se llevó a cabo utilizando el servidor del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). La búsqueda de secuencias específicas en el DNA se realizó empleando los programas Fuzznuc (<http://emboss.sourceforge.net/>), Virtual Footprint (Münch y col., 2005) (http://www.prodoric.de/vfp/vfp_promoter.php) y WebLogo (Crooks y col., 2004) (<http://weblogo.berkeley.edu/>).

RESULTADOS

V. Resultados.

A. Estudio de la región promotora P_{styA} .

El estudio de la región promotora P_{styA} de *Pseudomonas* sp. Y2 fue iniciado anteriormente por Sergio Alonso (Alonso, 2002). El trabajo que se presenta a continuación pretende ampliar los conocimientos ya existentes acerca de la regulación transcripcional de los genes *styABCD* catabólicos a partir de su promotor P_{styA} .

Este estudio se ha centrado sobre todo en el papel que desempeña PaaX en dicha regulación, por ser éste el aspecto más novedoso de la presente investigación. Además, se han llevado a cabo ensayos con la proteína activadora StyR y el factor de integración de huésped (IHF), comparando los resultados obtenidos con los anteriormente descritos para *P. fluorescens* ST y para la propia *Pseudomonas* sp. Y2. El conjunto de estos resultados ha permitido avanzar en la comprensión de la compleja regulación de este sistema.

1. La región promotora P_{styA} .

Como ya se ha comentado en la introducción, la región promotora de los genes *styABCD* catabólicos, P_{styA} , comprende 148 pb entre el codón de terminación de *styR* y el sitio de inicio de la transcripción (+1) de *styA* y es similar, pero no idéntica, a las correspondientes de *Pseudomonas fluorescens* ST (Beltrametti y col., 1997) y *Pseudomonas* sp. VLB120 (Panke y col., 1998). Estudios *in silico* llevados a cabo anteriormente (Velasco y col., 1998; Alonso, 2002) sobre la región P_{styA} de *Pseudomonas* sp. Y2 permitieron localizar una secuencia palindrómica de 16 pb entre las posiciones -49 y -34, que constituye el sitio de unión para StyR, descrito como “*StyR box*”, y una posible secuencia de unión de IHF en la región comprendida entre las posiciones -105 y -79 (Figura A.1).

La región P_{styA} presenta regiones ricas en A y T, lo que suele estar asociado a estructuras curvadas del DNA, y un contenido en G+C de un 36,4% (Velasco y col., 1998). Empleando el servidor Bent.it ® (apartado 15.4 de Materiales y métodos), se ha llevado a cabo un análisis de la curvatura de la región comprendida entre el codón de terminación de *styR* y el ATG de inicio de la traducción de *styA*, cuyo resultado se muestra en la figura 5.1. Como puede observarse en la secuencia de esta región, el contenido en A y T es muy grande en la zona central de la secuencia promotora, entre el motivo STY1 y la caja -10 extendida (ver Figura A.1), lo que coincide con el bajo contenido en G+C que aparece en la figura 5.1 (entre las posiciones 40 y 100 de la secuencia), muy inferior al contenido promedio en G+C de la región *sty*, que es de un 57,7 % (Velasco y col., 1998). También se aprecia en la Figura 5.1 que las regiones de bajo contenido en G+C presentan

una curvatura más acusada en el DNA. Así, la región promotora P_{styA} presenta una secuencia bastante curvada, especialmente en su región central.

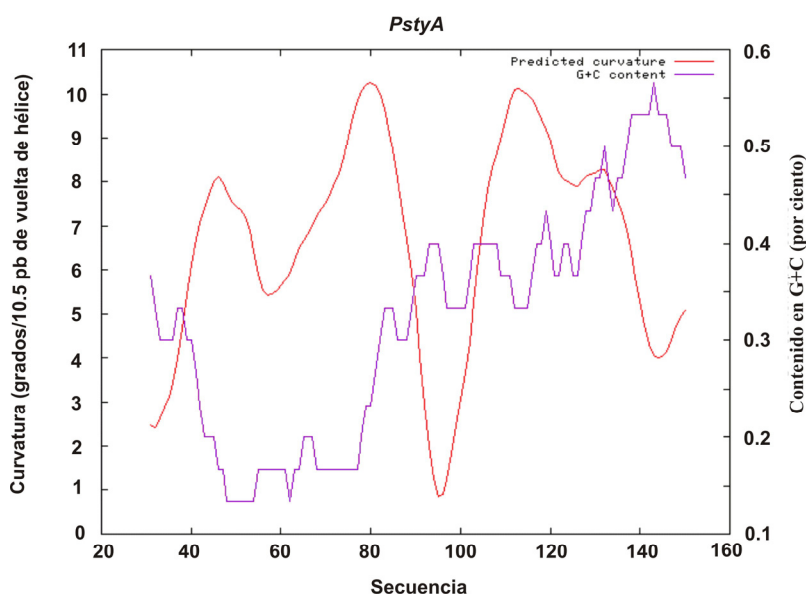


FIGURA 5.1. Curvatura y contenido en G+C de la región promotora P_{styA} de *Pseudomonas* sp. Y2. Representación de la curvatura del DNA de la región comprendida entre el codón de terminación de *styR* y el ATG de inicio de *styA*, así como del contenido en G+C de dicha secuencia, determinadas empleando el servidor Bent.it®.

2. Papel de la proteína StyR en la regulación del promotor P_{styA} .

2.1. Sitios STY en P_{styA} .

Estudios *in silico* llevados a cabo sobre la región P_{styA} de *Pseudomonas* sp. Y2 han permitido localizar tres secuencias putativas de unión para StyR, que coinciden con los sitios de alta (STY2), media (STY1) y baja (STY3) afinidad previamente descritos para la estirpe *P. fluorescens* ST (Leoni y col., 2005); Figura A.1). El sitio putativo STY1 localizado se extiende entre las posiciones -112 y -97 relativas al sitio de inicio de la transcripción. El sitio putativo STY2 se localiza entre los sitios -49 y -34, y coincide con el sitio de unión de StyR anteriormente propuesto para *Pseudomonas* sp. Y2 (Velasco y col., 1998). El sitio putativo STY3 se localiza en el interior de *styA*, entre las posiciones +15 y +30.

2.2. Expresión y purificación de His₆-StyR.

La proteína de fusión His₆-StyR, que incorpora un péptido de 6 histidinas (péptido 6xHis) en el extremo N-terminal de StyR, se encuentra codificada en el plásmido pQ-R (Alonso, 2002), derivado del vector de hiperexpresión pQE-9 (Figura 5.2A). Para disminuir la posibilidad de una traducción alternativa del mensajero que diera lugar a la traducción de StyR sin el péptido 6xHis, la secuencia de *styR* clonada en el vector pQE-9 no incluye el codón de inicio de StyR (Alonso, 2002). La hiperexpresión de His₆-StyR a partir de *Escherichia coli* MV1184 [pQ-R] y su posterior

purificación en columnas de sheparosa equilibrada con NiCl_2 se llevó a cabo según lo descrito en el apartado 12.1 de Materiales y métodos. Las distintas etapas de la expresión y purificación de His₆-StyR se recogen en la Figura 5.2B.

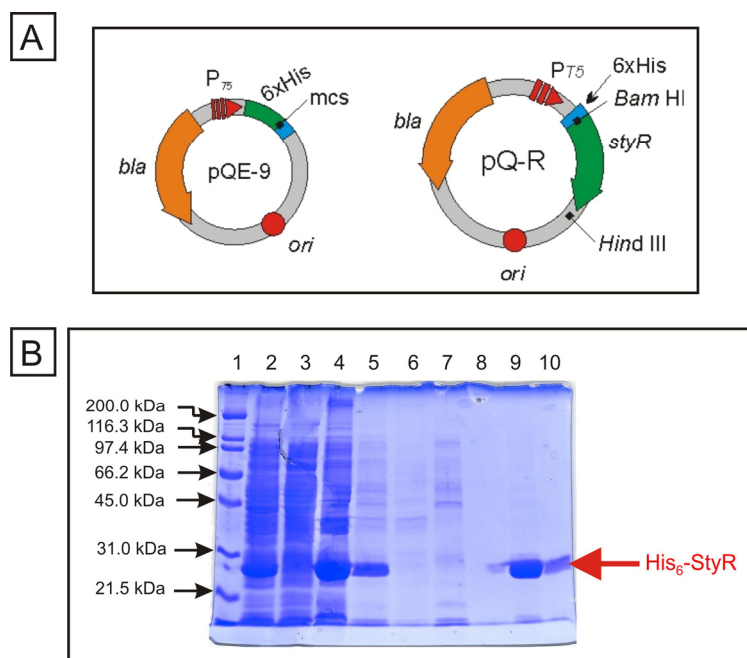


FIGURA 5.2. Expresión y purificación de His₆-StyR. **A.** Esquema del vector pQE-9 y del plásmido pQ-R, derivado del anterior y que codifica la proteína de fusión His₆-StyR (tomado de Alonso, 2002). **B.** Análisis electroforético en geles de poliacrilamida de los intermediarios de las distintas etapas de la purificación de His₆-StyR. Calle 1: marcadores de masa molecular. Calle 2: extracto proteico crudo del cultivo de *E. coli* MV1184 [pQ-R] tras 6 horas de inducción con IPTG y antes del proceso de sonicación. Calle 3: sobrenadante (Sb1) obtenido tras centrifugar el cultivo después de la etapa de sonicación. Calle 4: sobrenadante (Sb2) obtenido tras la adición de urea 8M al pellet anterior, resuspensión y posterior centrifugación. Calle 5: disolución que se aplica en la columna de cromatografía, resultante de la dilución 1:10 del Sb2 en tampón de lisis. Calle 6: primer eluido recogido de la columna. Calle 7: primer lavado con imidazol 75 mM. Calle 8: quinto lavado con imidazol 75 mM. Calle 9: eluido con imidazol 500mM (fracción 18, máxima concentración de His₆-StyR). Calle 10: eluido con imidazol 500 mM (fracción 30).

2.3. Ensayos de la unión de StyR a la región P_{styA} .

Para estudiar la unión de StyR a la región P_{styA} de *Pseudomonas* sp. Y2 se utilizaron las sondas E1B1 (225 pb), que contiene la región P_{styA} completa y el inicio de *styA* hasta la posición +72, y E2B1 (154 pb), que tiene delecionada parte de la región P_{styA} , de forma que carece del sitio de unión STY1 (Figura 5.3A). Ambas sondas fueron amplificadas por PCR utilizando el plásmido pISm7.0R (Tabla 4.2, Materiales y métodos) como molde y los oligonucleotidos E1 y B1, en el caso de la sonda E1B1, o bien E2 y B1, para la sonda E2B1 (Tabla 4.3, Materiales y métodos; Figura A.1). Los fragmentos obtenidos fueron digeridos con *EcoRI* y *BamHI*, purificados y marcados radiactivamente con $[\alpha^{32}\text{-P}]\text{dATP}$ (apartado 13.1 de Materiales y métodos).

Resultados

La proteína His₆-StyR fue fosforilada (apartado 12.5 de Materiales y métodos) y utilizada para los ensayos de unión proteína-DNA, llevados a cabo mediante incubación de las sondas de DNA con distintas cantidades de His₆-StyR fosforilada (His₆-StyR-P; 0, 1, 2,5, 5, 7,5 y 10 μM) (apartado 13.2 de Materiales y métodos). Los resultados de estas incubaciones se analizaron por electroforesis en geles nativos de poliacrilamida al 10% (Figura 5.3B).

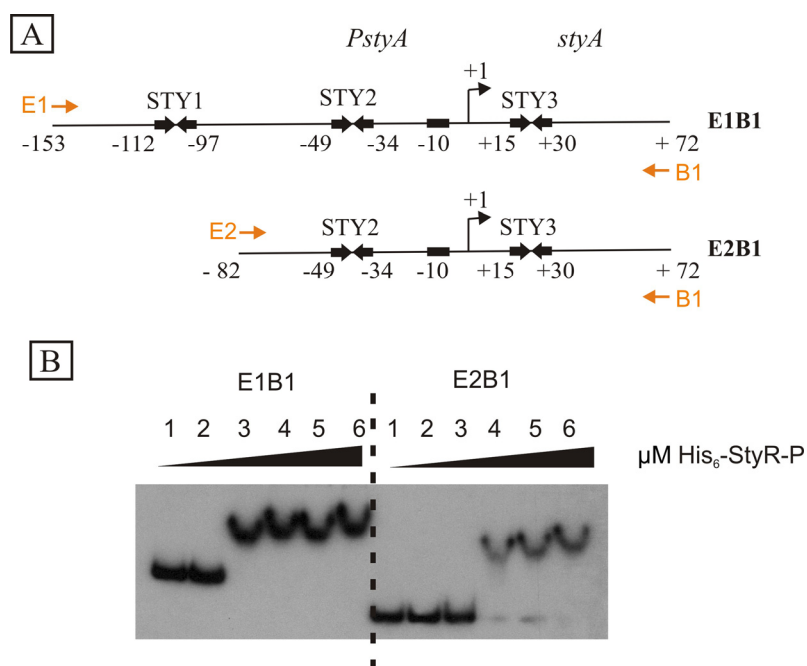


FIGURA 5.3. Unión de His₆-StyR-P a la región promotora *P_{styA}*. **A.** Esquema de las sondas E1B1 y E2B1 derivadas de la región *P_{styA}-styA* de *Pseudomonas* sp. Y2. Estos fragmentos fueron preparados mediante amplificación por PCR empleando el plásmido pUE14 como molde y los oligonucleótidos E1 y B1 (para obtener el fragmento E1B1) o bien E2 y B1 (para obtener el fragmento E2B1) (ver figura A.1), posterior digestión con *Eco*RI y *Bam*HI y marcaje radiactivo con [α^{32} -P]dATP. El sitio +1 del inicio de la transcripción de *styA* aparece indicado con una flecha. La caja -10 extendida del promotor aparece representada por un rectángulo (-10). Los sitios de unión de alta (STY2), media (STY1) y baja afinidad (STY3) se representan con dos flechas invertidas, indicándose las posiciones que ocupan en la región promotora, relativas al sitio de inicio de la transcripción de *P_{styA}*. Las posiciones de los extremos de ambas sondas también aparecen indicadas. En naranja se han señalado los oligonucleótidos empleados para amplificar ambos fragmentos. **B.** Ensayo de retardo de banda electroforética de las sondas E1B1 o E2B1 (0,1 nM) con concentraciones crecientes de His₆-StyR-P. Calles 1 a 6: His₆-StyR-P 0, 1, 2,5, 5, 7,5 y 10 μM.

Puede observarse como al incrementar la concentración de His₆-StyR-P se produce un retardo de la banda de ambas sondas como resultado de la formación del complejo proteína-DNA. La aparición de dicho complejo tiene lugar a una menor concentración de His₆-StyR-P en el caso de la sonda E1B1, que tiene tres sitios de unión de StyR, que en el caso de la sonda E2B1, que carece del sitio STY1 y sólo presenta dos sitios de unión para StyR.

2.4. El papel de StyR en la activación de la transcripción a partir de P_{styA} .

El efecto de StyR sobre la transcripción a partir del promotor P_{styA} se ha estudiado mediante ensayos de transcripción *in vitro*. En estos experimentos se ha analizado la capacidad de His₆-StyR para activar la transcripción a partir de P_{styA} *in vitro* en función de su concentración en el medio y de su nivel de fosforilación.

Como DNA molde para estos ensayos se usó el plásmido pTE-E1B1, construido a partir del vector pTE103 (Elliott y Geiduschek, 1984). En primer lugar, el fragmento E1B1 fue amplificado por PCR según lo descrito anteriormente (apartado 2.3 de Resultados), purificado, digerido con *Eco*RI y *Bam*HI y finalmente clonado en los sitios correspondientes de pTE103, obteniéndose así el plásmido pTE-E1B1 (Figura 5.4A) que permite monitorizar la transcripción dependiente de StyR a partir del promotor P_{styA} .

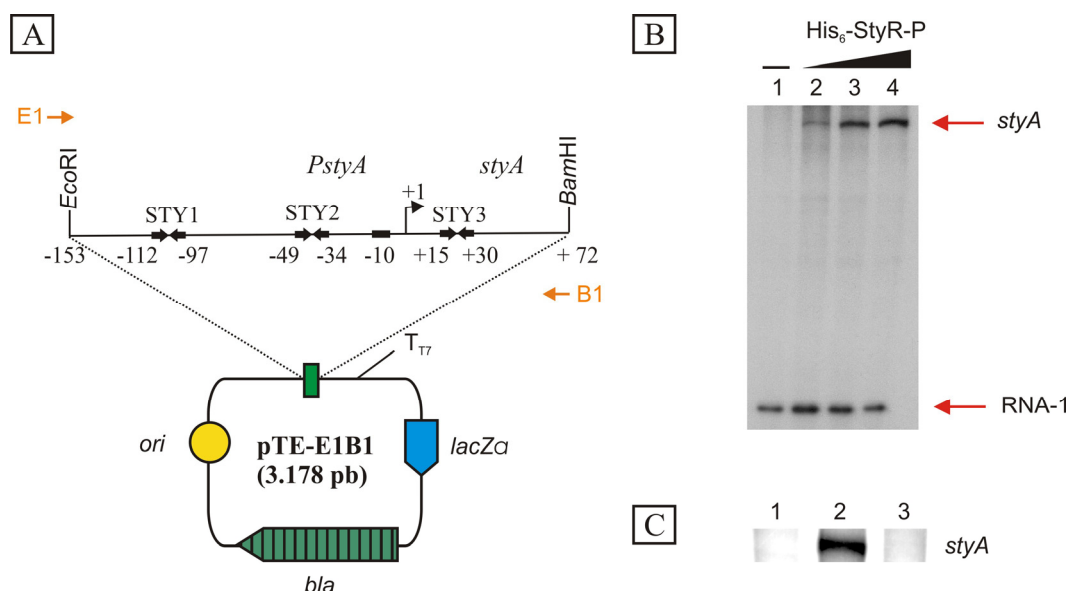


FIGURA 5.4. Construcción del plásmido pTE-E1B1 y transcripción *in vitro* a partir de P_{styA} en presencia de His₆-StyR-P. **A.** Esquema del plásmido pTE-E1B1, derivado del vector pTE103, con detalle del inserto correspondiente a P_{styA} y el inicio de *styA* clonado entre los sitios *Eco*RI y *Bam*HI. Este fragmento fue amplificado por PCR empleando el plásmido pUE14 como molde y los oligonucleótidos E1 y B1. El sitio +1 del inicio de la transcripción de *styA* aparece indicado con una flecha. La caja -10 extendida del promotor aparece representada por un rectángulo (-10). Las flechas invertidas representan los sitios STY1, STY2 y STY3 de unión de StyR. Los números indican las posiciones de los extremos de las cajas STY y de los extremos del fragmento, relativas al sitio de inicio de la transcripción de P_{styA} . En naranja se han señalado los oligonucleótidos empleados para amplificar el fragmento E1B1 (ver figura A.1). **B.** Análisis del transcrito de *styA* producido en ensayos de transcripción *in vitro* en tampón Txn empleando el plásmido pTE-E1B1 como molde (5 nM), σ^{70} -RNA polimerasa de *E. coli* (10 nM) y cantidades crecientes de His₆-StyR (calles 1 a 4: 0, 0,5, 1 y 2 μM) purificada y previamente fosforilada durante 60 minutos. Los mRNAs producidos se analizaron según lo descrito en el apartado 9.6 de Materiales y métodos. Las flechas señalan las bandas correspondientes al transcrito de *styA* y al del RNA-1 utilizado como control interno del ensayo. **C.** Banda electroforética del transcrito de *styA* obtenida tras realizar el ensayo de transcripción *in vitro* con el plásmido pTE-E1B1 como molde en ausencia de His₆-StyR (calle 1) o en presencia de His₆-StyR 10 μM fosforilada durante 60 minutos (calle 2) y de His₆-StyR 10 μM sin fosforilar (calle 3).

Los ensayos de transcripción *in vitro* se realizaron según lo descrito en el apartado 7.2 de Materiales y métodos, empleando σ^{70} -RNA polimerasa de *E. coli*, pTE-E1B1 y concentraciones crecientes de His₆-StyR-P. En ausencia de His₆-StyR-P no aparece el transcrito correspondiente a *styA*, pero sí el transcrito control RNA-1 (que indica que el ensayo de transcripción *in vitro* ha funcionado); sólo es posible detectar el transcrito de *styA* al emplear concentraciones de His₆-StyR-P de 0.5 μ M o superiores. Al incrementarse la concentración de la proteína activadora se incrementa también la cantidad de transcrito *styA* obtenido en el ensayo (Figura 5.4B). Cuando se emplea en el ensayo His₆-StyR sin fosforilar no se obtiene transcrito de *styA* (Figura 5.4C), lo que demuestra que la fosforilación es imprescindible para la funcionalidad de esta proteína *in vitro*.

Los resultados presentados confirman el papel activador de la proteína StyR fosforilada sobre la transcripción a partir del promotor P_{styA} .

3. Papel de la proteína PaaX en la regulación del promotor P_{styA} .

La proteína PaaX reprime la transcripción de los genes *paa* en ausencia de FA-CoA en el medio, como ya se ha explicado en la introducción. La expresión del gen *pac* de *E. coli* W, que codifica la penicilina G acilasa (Galán y col., 2004; Kim y col., 2004), y está relacionado con el catabolón del FA-CoA, también se encuentra regulada por PaaX, sugiriendo la posibilidad de que PaaX no sea sólo un regulador específico de los genes *paa*, sino que intervenga también en la regulación de otras rutas convergentes con el catabolón del FA-CoA. Puesto que la expresión de los genes *sty* catabólicos se reprime por AFA aún en presencia de estireno (Santos y col., 2000; O'Leary y col., 2001; Alonso, 2002), cabría pensar en una posible intervención de elementos reguladores propios del sistema *paa* en la expresión de los genes *sty* catabólicos. Por ello se quiso comprobar si PaaX desempeña algún papel en la regulación de los genes *sty*.

3.1. Estudio *in silico* de P_{styA} : localización de un motivo de unión para PaaX.

La realización de estudios *in silico* con el programa informático Fuzznuc (apartado 15.6, Materiales y métodos) sobre los genes *paa* de *Pseudomonas* sp. Y2 y de otras especies del mismo género permitieron redefinir la secuencia consenso del sitio de unión de PaaX en *Pseudomonas* (anteriormente 5'-WTWCTGTATCGCTT-3' donde W=A ó T; (Alonso y col., 2003a; Bartolomé-Martín y col., 2004)) como dos repeticiones invertidas de 6 pb separadas por unas 26 pb (5'-GATACA----26 pb----TGTATC-3'). El análisis de la región intergénica entre *styR* y *styA* de *Pseudomonas* sp. Y2 descubrió al comienzo del gen *styA* una secuencia parecida al nuevo consenso para el sitio de unión de PaaX en *Pseudomonas* (Figura A.1).

La estructura de este sitio revela una secuencia de 6 pb (CGTATC) que sólo difiere en 1 base del consenso (TGTATC), mientras que la otra repetición (ACAACA), separada por 25 nt de la

anterior, es bastante más imperfecta, ya que sólo conserva las tres últimas bases de la correspondiente secuencia consenso (GATACA).

Para confirmar si dicha secuencia constituye una caja operadora para PaaX se han llevado a cabo una serie de estudios, tanto *in vitro* como *in vivo*, que se describen a continuación.

3.2. Estudios de la unión de PaaX a la región P_{styA} .

3.2.1. Preparación de la sonda STY.

La unión de PaaX a la posible región operadora detectada al comienzo del gen *styA* se ha estudiado mediante ensayos de retardo de banda electroforética. La sonda STY (227 bp) se diseñó de manera que engloba parte de la región P_{styA} y el comienzo del gen *styA*, desde la posición -73 hasta el sitio +154, relativo al sitio de inicio de la transcripción (Figura 5.6A). Esta sonda no incluye el sitio de unión de IHF descrito para *P. fluorescens* ST (Leoni y col., 2005; Figura A.1), situado delante de la posición -73, con objeto de poder realizar ensayos de unión con extractos celulares sin obtener interferencias por la unión de IHF a la sonda.

La sonda STY fue obtenida mediante PCR utilizando el plásmido pISm7.0R (Tabla 4.2, Materiales y métodos) como molde y los oligonucleótidos styAXL (previamente marcado con [γ^{32} -P]ATP (>3.000 Ci/mmol) y la T4 polinucleótido quinasa) y styAXR (apartado 13.1 de Materiales y métodos) (Figura A.1). El fragmento radiactivo resultante de la PCR se purificó y empleó para los ensayos de retardo en gel y de protección frente a la digestión con DNasa I (apartado 3.3 de Resultados).

La unión de PaaX a la sonda STY se ha estudiado mediante ensayos de retardo de banda electroforética, primero empleando extractos celulares crudos y más adelante con la proteína purificada en forma de la proteína de fusión MBP-PaaX1.

3.2.2. Ensayos de retardo en gel con extractos celulares.

Para estos ensayos se prepararon extractos proteicos crudos a partir de distintas cepas de *Pseudomonas* que difieren en la presencia o en la naturaleza del gen *paaX*: *Pseudomonas* sp. Y2T2 ($\Delta paa2$, sólo porta la copia *paaX1* en su cromosoma), *Pseudomonas* sp. Y2K1 ($\Delta paa1$, sólo contiene la copia *paaX2*), *P. putida* KT2442, *P. putida* U y *Pseudomonas* sp. Y2K1T2 ($\Delta paa1 \Delta paa2$, no tiene ninguna copia del gen *paaX* en su cromosoma).

Igualmente se usó la cepa *Pseudomonas* sp. Y2 [pVLTX1], portadora de un plásmido que contiene el gen *paaX1* bajo el control del promotor inducible P_{tac} (Figura 5.5). Para su construcción, el plásmido pJ18X1 (Tabla 4.2, Materiales y métodos; Figura 5.14) fue digerido con *EcoRI* y *Hind III* y el fragmento de 1,06 kb que contiene el gen *paaX1* fue purificado y clonado en los sitios correspondientes del vector de amplio rango de huésped pVLT31 (Tabla 4.2, Materiales y métodos).

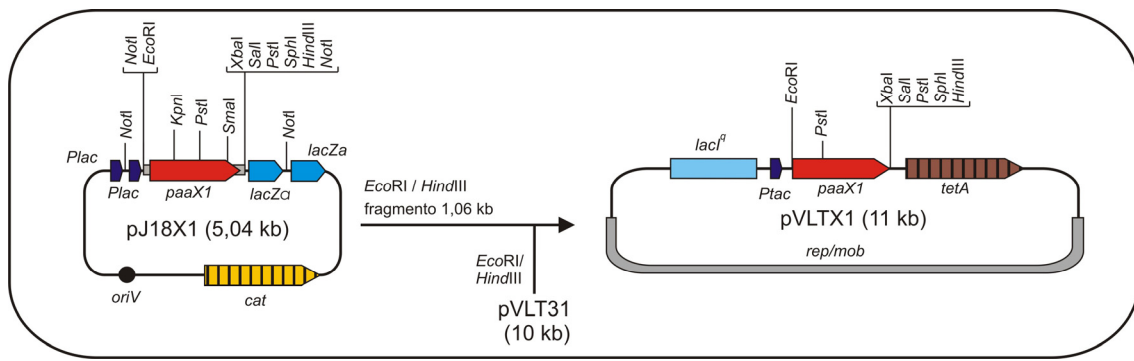


FIGURA 5.5. Construcción del plásmido pVLTX1. El plásmido pJ18X1 (Figura 5.14) fue digerido con *EcoRI* y *HindIII* y el fragmento de 1,06 Kb que contiene el gen *paaX1* de *Pseudomonas* sp. Y2 fue clonado en los mismos sitios del vector de amplio rango de huésped pVLT31 (Tabla 4.2, Materiales y métodos), obteniéndose así pVLTX1 (11 Kb). La región *rep/mob* contiene las funciones de replicación y movilización de pVLTX1, confiréndole la capacidad de ser transferido mediante conjugación desde la estirpe *E.coli* S17.1 λ pir (F+) a *Pseudomonas* sp. Y2, donde es capaz de mantenerse de forma estable gracias a la selección en presencia de tetraciclina. En la cepa Y2, el plásmido pVLTX1 puede sobreexpresar PaaX1 de forma controlada a partir del promotor *P_{tac}*, inducible por IPTG. Este plásmido también porta el gen *lacI^f* que codifica el represor LacI, el cual contribuye a mantener cerrada la transcripción a partir de *P_{tac}* en condiciones de no-inducción, evitando así que se produzca un escape desde este promotor.

Los resultados de estos retardos se muestran en la Figura 5.6. En todos los casos ensayados se observa la aparición de una banda de retardo en el gel, excepto al usar el extracto de la estirpe *Pseudomonas* sp. Y2K1T2, deficiente en el gen *paaX*. La proteína PaaX de *E. coli* W purificada (cedida por Cristina Fernández) también produce un retardo de la sonda STY (Figura 5.6C).

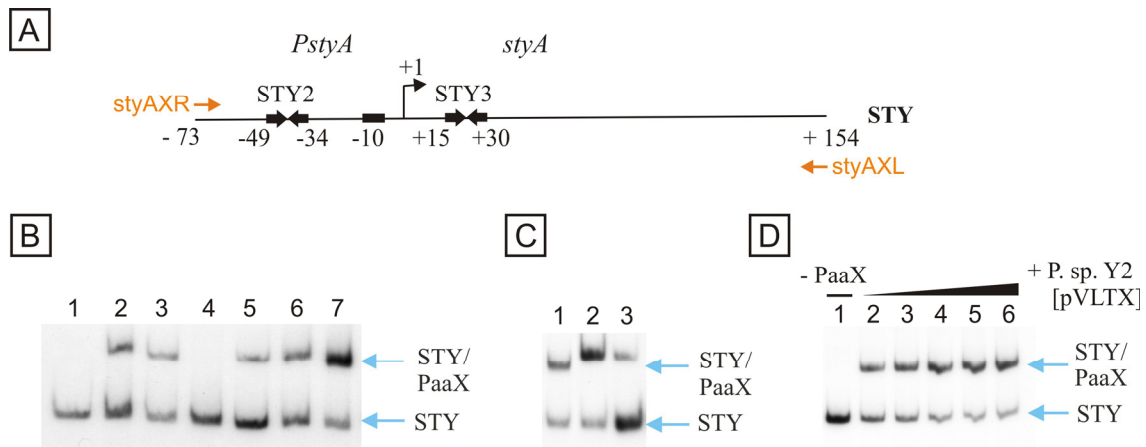


FIGURA 5.6. Unión de PaaX nativa a la sonda STY. **A.** Esquema de la sonda STY derivada de la región $P_{styA-styA}$ de *Pseudomonas* sp. Y2. Este fragmento fue preparado mediante amplificación por PCR empleando el plásmido pUE14 como molde y los oligonucleótidos styAXL (previamente marcado con $[\gamma^{32}\text{-P}]\text{ATP}$ y T4 polinucleotido quinasa) y styAXR (Figura A.1). El sitio +1 del inicio de la transcripción de *styA* aparece indicado con una flecha. La caja -10 extendida del promotor aparece representada por un rectángulo (-10). Los sitios de unión de alta (STY2), media (STY1) y baja afinidad (STY3) se representan con dos flechas invertidas, indicándose las posiciones que ocupan en la región promotora, relativas al sitio de inicio de la transcripción de P_{styA} . Las posiciones de los extremos de ambas sondas también aparecen indicadas. En naranja se han señalado los oligonucleótidos empleados para amplificar el fragmento. **B.** Ensayos de retardo de banda electroforética realizados con la sonda STY (0,1 nM) y extractos celulares de distintas cepas de *Pseudomonas*. Calle 1: sonda STY libre. Calle 2: extracto celular de *Pseudomonas* sp. Y2K1 (4,4 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$). Calle 3: extracto celular de *Pseudomonas* sp. Y2T2 (4,2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$). Calle 4: extracto celular de *Pseudomonas* sp. Y2K1T2 (3,5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$). Calle 5: extracto celular de *P. putida* KT2442 (2,3 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$). Calle 6: extracto celular de *P. putida* U (5,5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$). Calle 7: extracto celular de *Pseudomonas* sp. Y2 [pVLTX] (3,3 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$). **C.** Ensayos de retardo de banda electroforética realizados con la sonda STY (0,1 nM) incubada con PaaX de *E. coli* W purificada. Calle 1: extracto celular de *Pseudomonas* sp. Y2T2 (4,2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$). Calle 2: PaaX de *E. coli* W 300 nM. Calle 3: PaaX de *E. coli* W 150 nM. **D.** Ensayos de retardo de banda electroforética con la sonda STY (0,1 nM) y extracto celular de *Pseudomonas* sp. Y2 [pVLTX]. Calle 1: sonda STY libre. Calles 2 a 6: sonda STY incubada con 0,25, 0,5, 1, 2 y 3,3 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de extracto celular.

3.2.3. Preparación de MBP-PaaX1.

La proteína de fusión MBP-PaaX1 se preparó utilizando el vector comercial pMAL-c2X (*New England Biolabs*). El gen *paaX1* fue amplificado por PCR empleando el plásmido pUE14 (Figura 5.14; Tabla 4.2, Materiales y métodos) como DNA molde y los oligonucleótidos BluntX5 y X3 (Tabla 4.3, Materiales y métodos; Figura A.3) como cebadores. El producto amplificado se digirió con *Xba*I y el fragmento resultante de 956 pb se ligó al vector pMAL-c2X previamente digerido con *Xmn*I y *Xba*I. La estirpe *E. coli* DH5 α se transformó con el resultado de la reacción, llevándose a cabo la selección de los clones positivos en placas de LB con ampicilina y X-Gal. El plásmido obtenido, denominado pM-X1, se analizó por secuenciación para comprobar la ausencia de mutaciones (Figura 5.7A) y se transfirió por electroporación a *E. coli* UT5600, estirpe deficiente en la proteasa *OmpT*, por lo que aumenta su rendimiento en la hiperproducción de proteínas al evitar la degradación enzimática mediada por esta proteasa.

La hiperexpresión a partir de cultivos de *E. coli* UT5600 [pM-X1] y posterior purificación de MBP-PaaX1 se llevó a cabo según lo descrito en el apartado 12.2 de Materiales y métodos. El resultado se recoge en la Figura 5.7B.

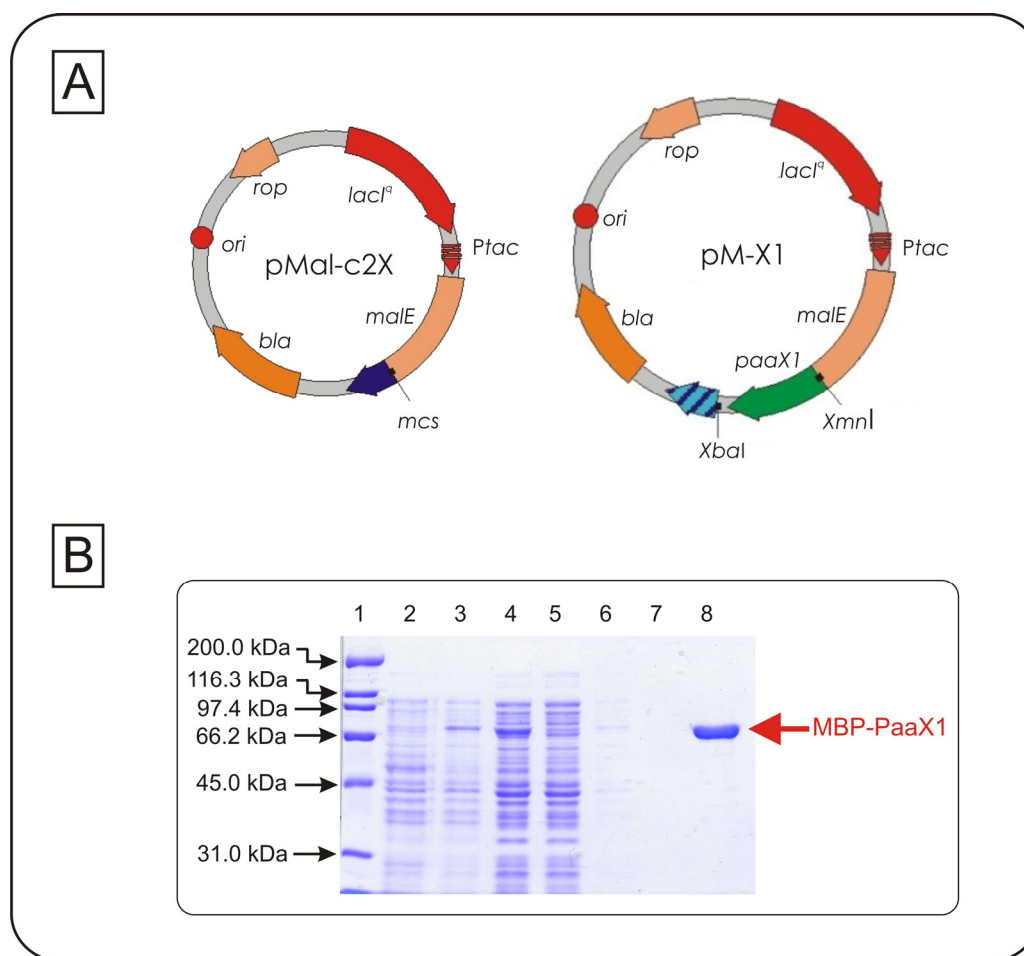


FIGURA 5.7. Expresión y purificación de MBP-PaaX1. A. Mapa del vector de hiperexpresión pMal-c2X y del plásmido derivado, pM-X1, que contiene el gen *paaX1* clonado entre los sitios *XmnI* y *XbaI* y cuya expresión queda bajo el control de *P_{tac}*. B. Análisis electroforético de las proteínas presentes en las distintas etapas de la purificación de MBP-PaaX1. Calle 1: marcadores de masa molecular. Calle 2: proteínas del extracto celular del cultivo de *E. coli* UT5600 [pM-X1] antes de la inducción con IPTG. Calle 3: proteínas del extracto celular del cultivo de *E. coli* UT5600 [pM-X1] tras dos horas de inducción con IPTG y antes del proceso de sonicación. Calle 4: proteínas de la fracción soluble del extracto crudo de *E. coli* UT5600 [pM-X1]. Calle 5: proteínas obtenidas en la primera elución de la columna de amilosa. Calle 6: proteínas de la primera etapa de lavado. Calle 7: proteínas de la última etapa de lavado. Calle 8: proteínas eluidas con maltosa 15 mM.

3.2.4. Ensayos de retardo en gel con MBP-PaaX1.

Los ensayos de retardo de la sonda STY (Figura 5.6A) en presencia de la proteína MBP-PaaX1 purificada se muestran en la figura 5.8. El retardo en la migración de la sonda depende de la concentración de la proteína (Figura 5.8A). En paralelo, se llevó a cabo un experimento control con la sonda STY y la proteína MBP-lacZ purificada, que no produjo ningún retardo de la sonda (resultado no mostrado). El retardo provocado por MBP-PaaX1 en la migración de la sonda STY marcada desaparece en presencia de una concentración superior (100 veces) de sonda STY no marcada (figura 5.8B), todo lo que demuestra que PaaX1 (MPB-PaaX1, en este caso) se une de forma específica al fragmento STY.

También se estudió el efecto que provoca la presencia de FA-CoA en la unión de MBP-PaaX1 a la sonda STY. El retardo electroforético de la sonda STY provocado por MBP-PaaX1 es claramente dependiente de la concentración de FA-CoA. La proporción de sonda retardada disminuye a concentraciones crecientes de FA-CoA, lo que refleja que el FA-CoA debilita y llega a anular la unión de PaaX1 a la sonda STY (Figura 5.8B).

Por el contrario, la presencia de AFA no altera el retardo de la migración de la sonda STY producido por MBP-PaaX1 (Figura 5.8B). Esto coincide con lo ya descrito para *E. coli* W (Ferrández y col., 2000; C. Fernández 2005).

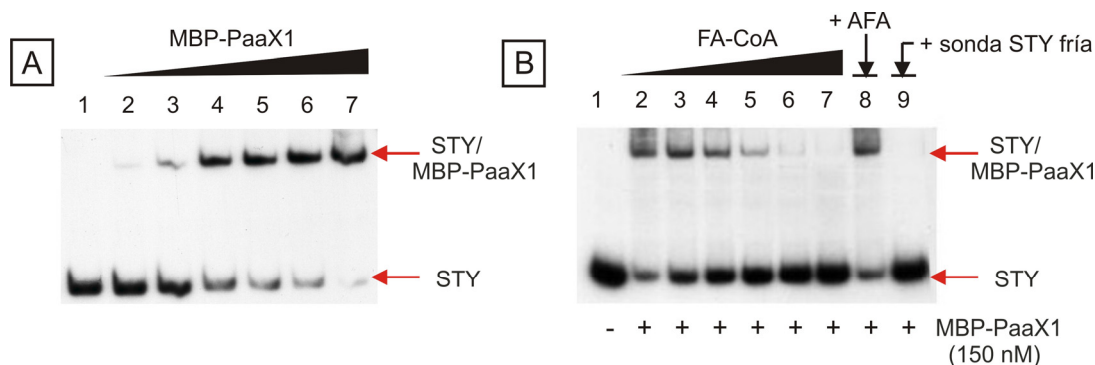


FIGURA 5.8. Unión de la proteína MBP-PaaX1 a la sonda STY y efecto de la concentración del FA-CoA en dicha unión. **A.** Ensayo de retardo de banda electroforética de la sonda STY (0,1 nM) en presencia de distintas concentraciones de MBP-PaaX1. Calle 1: sonda STY libre. Calles 2 a 7: retardo de la sonda STY (0,1 nM) en presencia de MBP-PaaX1 5, 10, 25, 50, 100 y 150 nM, respectivamente. **B.** Ensayo de retardo de banda electroforética de la sonda STY (0,1 nM) con MBP-PaaX1 (150 nM) en presencia de FA-CoA o de AFA. Calle 1: sonda STY libre. Calles 2 a 7: retardo de la sonda STY (0,1 nM) en presencia de MBP-PaaX1 150 nM y de FA-CoA 0, 25, 50, 100, 500 y 1000 μ M, respectivamente. Calle 8: retardo de la sonda STY (0,1 nM) en presencia de MBP-PaaX1 150 nM y AFA 1 mM. Calle 9: retardo de la sonda STY (0,1 nM) en presencia de MBP-PaaX1 150 nM y de sonda STY sin marcar 10 nM.

3.3. Localización y definición de la región operadora de PaaX en P_{styA} -*styA*.

3.3.1. Ensayo de protección frente a la digestión con DNasa I.

Con el fin de definir la zona de unión de PaaX a la región P_{styA} -*styA* se llevó a cabo un ensayo de protección frente a la digestión con DNasa I (Figura 5.9). La sonda STY (Figura 5.6A) se incubó con distintas concentraciones de MBP-PaaX1, y se sometió a digestión con DNasa I, según lo expuesto en el apartado 13.3 de Materiales y métodos. El resultado, mostrado en la Figura 5.9, revela que MBP-PaaX1 protege una región de la sonda STY de 48 nucleótidos, que se localiza entre las posiciones +4 y +52 del gen *styA*. Esta región contiene las dos secuencias repetidas invertidas de 6 nucleótidos separadas por 25 nucleótidos definidas *in silico* (apartado 3.1 de Resultados; Figura 5.10).

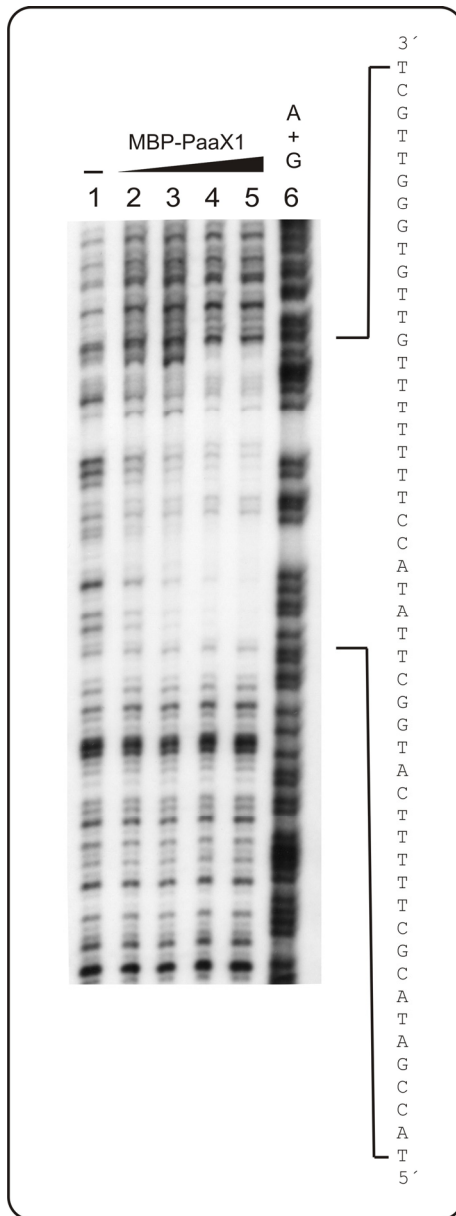


FIGURA 5.9. Resultado del ensayo de protección frente a la digestión con DNasa I del complejo formado por la unión de MBP-PaaX1 a la sonda STY. Calles 1 a 5: ensayos de protección con MBP-PaaX1 0, 25, 50, 150 y 300 nM, respectivamente. Calle 6: reacción A+G de secuenciación (método de Maxam y Gilbert) de la sonda STY. En vertical se muestra la secuencia de nucleótidos complementaria a la región protegida.

5´-agcaaccccaca**ACA**aaaaaaggtataagccatgaaaaagc**GTATC**ggta- 3´ *styA* (Y2) (+12/+48)
**GATACA**-----26 pb aprox-----**TGTATC**... **CONSENSO** *paa Pseudomonas*

FIGURA 5.10. Secuencia operadora de PaaX en la región P_{styA} -*styA*. Secuencia que se extiende entre las posiciones +4 y +52 del gen *styA* de *Pseudomonas* sp. Y2 y que resulta protegida frente a la digestión con DNasa I. En mayúscula y negrita se han señalado aquellas posiciones que coinciden con las de las secuencias repetidas invertidas (GATACA y TGTATC) establecidas como consenso para los genes *paa* de *Pseudomonas* sp. strain Y2 (secuencia inferior).

3.3.2. Mutación de la región operadora de PaaX y ensayos de retardo en gel con MBP-PaaX1.

Una vez localizada la región operadora de PaaX en la región *P_{styA}-styA* se quiso profundizar en su estructura y definir la importancia de las dos repeticiones invertidas de 6 pb en la unión de la proteína. Para ello se decidió repetir los ensayos de retardo en gel anteriores utilizando tres sondas de DNA distintas (Figura 5.12). La sonda E1B1, ya descrita anteriormente, contiene la región promotora *P_{styA}* entera y el inicio del gen *styA* (posiciones -153 a +72). La sonda E1B2 incluye la región *P_{styA}* y el inicio de *styA* (posiciones -153 a +41), pero no el motivo distal de 6 pb que se encuentra más conservado respecto a la secuencia consenso descrita para *Pseudomonas* (Figura 5.10). La sonda E1B3 tiene la misma longitud que la sonda E1B1, pero incluye mutaciones en el motivo distal de 6 pb que han alterado su secuencia de bases sin variar la proporción de las mismas (Figura 5.12). Las sondas E1B1 y E1B2 se obtuvieron mediante amplificación por PCR, empleando pUE14 como molde (Tabla 4.2, Materiales y métodos) y los oligonucleótidos E1 y B1 o bien E1 y B2 (Tabla 4.3, Materiales y métodos; Figura A.1), posterior digestión con *EcoRI* y *BamHI*, purificación y marcaje mediante rellenado de extremos 5' protuberantes utilizando el fragmento Klenow de la DNA polimerasa I y [α^{32} -P]dATP, según lo descrito en el apartado 13.1 de Materiales y métodos.

Para llevar a cabo la mutagénesis dirigida de la repetición invertida de 6 pb más conservada de la región de unión a PaaX, se diseñaron los oligonucleótidos a y b (Tabla 4.3, Materiales y métodos), cuyas secuencias permiten sustituir el motivo CTGATC por TGCCAT, con lo que se logra alterar la secuencia manteniendo la misma proporción de bases (Figura 5.11). En primer lugar, empleando el plásmido pTE-E1B1 como molde (Figura 5.11), se amplificó por PCR un fragmento de 208 pb, con la pareja de oligonucleótidos E1 y a, y otro de 160 pb, con los oligonucleótidos b y 484. La mezcla en proporción 1:1 de ambos fragmentos, que contienen la mutación incorporada en la secuencia, se empleó como molde para llevar a cabo una nueva PCR utilizando los oligonucleótidos E1 y B1. El fragmento obtenido, denominado E1B3, fue digerido con *EcoRI* y *BamHI*, purificado, comprobado por secuenciación, marcado con el fragmento Klenow de la DNA polimerasa I y [α^{32} -P]dATP (apartado 13.1 de Materiales y métodos) y empleado como sonda para los ensayos de retardo en gel.

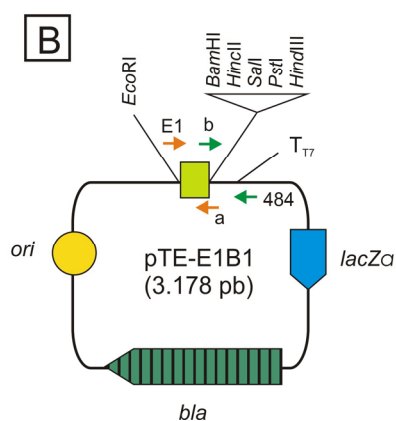
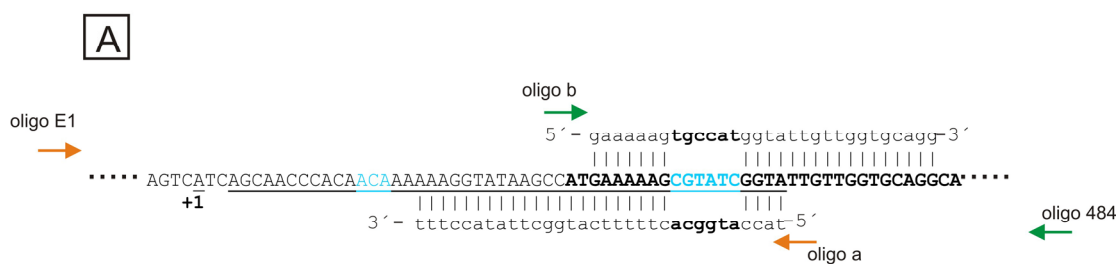


FIGURA 5.11. Mutagénesis dirigida del motivo de unión de PaaX en la región *styA* de *Pseudomonas* sp. Y2. **A.** Detalle de la secuencia que rodea a la caja de unión de PaaX en la región *styA* de *Pseudomonas* sp. Y2. La secuencia protegida frente a la digestión por DNasa I aparece subrayada. Los dos motivos de 6 bp de la caja de unión de PaaX encontrados en la región *styA* de *Pseudomonas* sp. Y2 (en la de la izquierda sólo se han marcado los tres nucleótidos conservados respecto a la secuencia consenso) se han destacado en azul. La secuencia de los oligonucleótidos a y b, diseñados con el fin de mutagenizar el motivo de 6 pb más conservado (CGTATC), se muestran en minúsculas. **B.** Plásmido pTE-E1B1 utilizado como molde para realizar las PCRs en el proceso de mutagénesis dirigida. Las correspondientes parejas de oligonucleótidos E1 y a, por un lado, y b y 484, por otro lado, se representan mediante flechas naranjas y verdes, respectivamente.

Los ensayos de retardo de banda electroforética realizados con estas tres sondas y concentraciones crecientes de MBP-PaaX1 purificada (apartado 13.2 de Materiales y métodos), mostraron que cuando el motivo de unión formado por las dos secuencias de 6 pb no está completo (sonda E1B2) o está alterado (sonda E1B3) la proteína no se une a la sonda y no se observa ningún retardo en la migración de esta última (Figura 5.12).

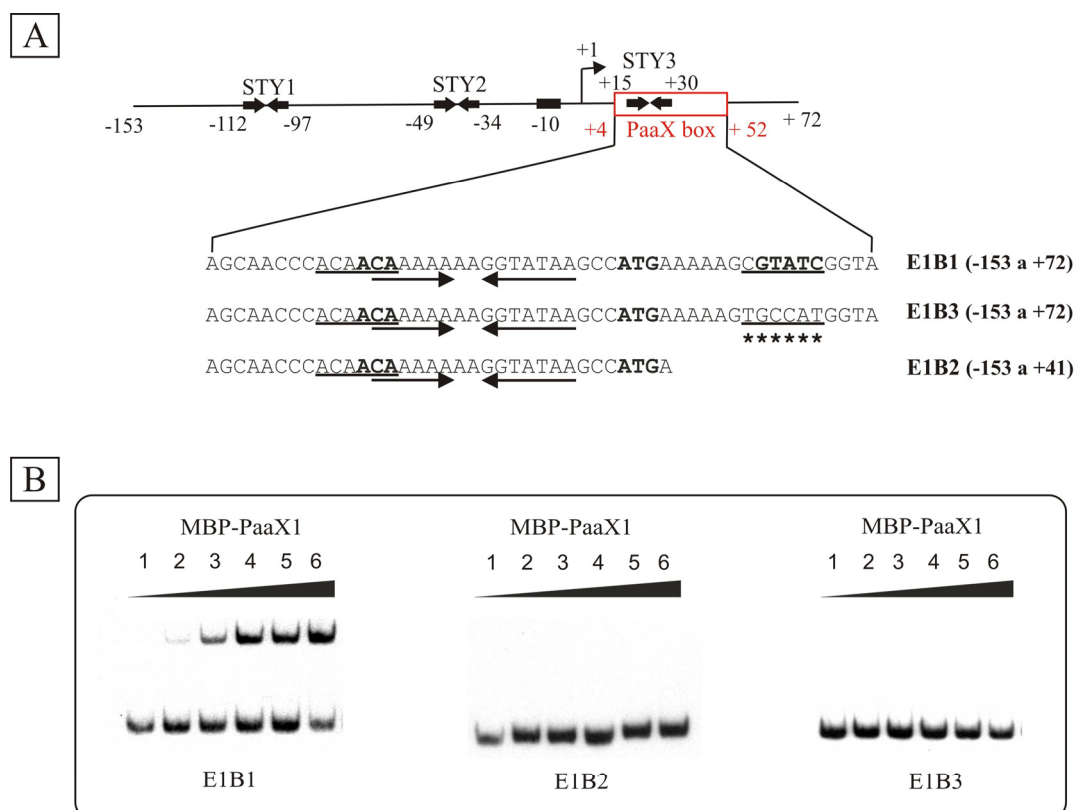


FIGURA 5.12. Ensayos de retardo de banda electroforética con MBP-PaaX1 y las sondas E1B1, E1B2 y E1B3. **A.** Esquema de la región P_{styA} -*styA* y detalle de la secuencia de las sondas E1B1, E1B2 y E1B3. Los sitios STY se representan mediante dos flechas invertidas, indicándose su posición en la secuencia relativa al sitio de inicio de la transcripción. La región de unión de PaaX, determinada por el ensayo de protección frente a la digestión por DNasa I, se indica en rojo. En la secuencia detallada de esta última región, se indica en negrita el ATG de inicio de *styA* y el sitio STY3 para la unión de StyR mediante dos flechas invertidas. Las dos secuencias de 6 pb que forman el motivo para la unión de PaaX se muestran subrayadas y los nucleótidos que coinciden con los de la secuencia consenso de unión de PaaX en *Pseudomonas* (GATACA y TGTATC) aparecen en negrita. La sonda E1B1 abarca la región promotora P_{styA} y el inicio de *styA*, extendiéndose entre las posiciones -153 y +72 relativas al sitio de inicio de la transcripción de P_{styA} . La sonda E1B2 se extiende entre las posiciones -153 y +41 relativas al sitio de inicio de la transcripción de P_{styA} y no contiene el motivo de 6 pb de unión de PaaX que se encuentra más conservado respecto al consenso (GATACA) descrito para *Pseudomonas* sp. Y2. La sonda E1B3 tiene la misma longitud que la sonda E1B1, pero incorpora mutaciones en la secuencia de 6 pb de unión de PaaX más conservada (señaladas con asteriscos). **B.** Ensayos de retardo de banda electroforética de las sondas E1B1, E1B2 y E1B3 (0,1 nM) con concentraciones crecientes de MBP-PaaX1. Calles 1 a 6: MBP-PaaX1 0, 25, 50, 150, 300 y 600 nM.

3.4. Estudio *in vitro* del efecto de la unión de PaaX al operador en P_{styA} . Transcripción *in vitro*.

Los ensayos de transcripción *in vitro* se realizaron según lo descrito en el apartado 7.2 de Materiales y métodos. Se empleó como DNA molde el plásmido pTE-E1B1 (Figura 5.4), que lleva la región intergénica entre *styR* y *styA* completa y la región 5' de *styA*, lo que permite monitorizar la transcripción dependiente de StyR del promotor P_{styA} . Se utilizó σ^{70} -RNA polimerasa de *E. coli*, His₆-StyR-P 2 μ M y concentraciones crecientes de MBP-PaaX1 (de 0 a 600 nM). Los resultados se muestran en la figura 5.13. Puede verse como, en presencia de His₆-StyR-P, la adición de concentraciones crecientes de MBP-PaaX1 provoca una disminución muy notable en los niveles de transcrito de *styA*, y como la presencia de FA-CoA reduce de forma significativa el efecto represor

producido por MBP-PaaX1 (Figura 5.13B, inserto). Estos resultados permiten concluir que PaaX1 actúa como represor de la transcripción a partir de P_{styA} en *Pseudomonas* sp. Y2 *in vitro* y que dicho efecto represor se ve anulado por la presencia de FA-CoA, al igual que ocurre en la regulación mediada por PaaX de los genes *paa* en *E. coli* W (Ferrández y col., 2000; Fernández, 2005).

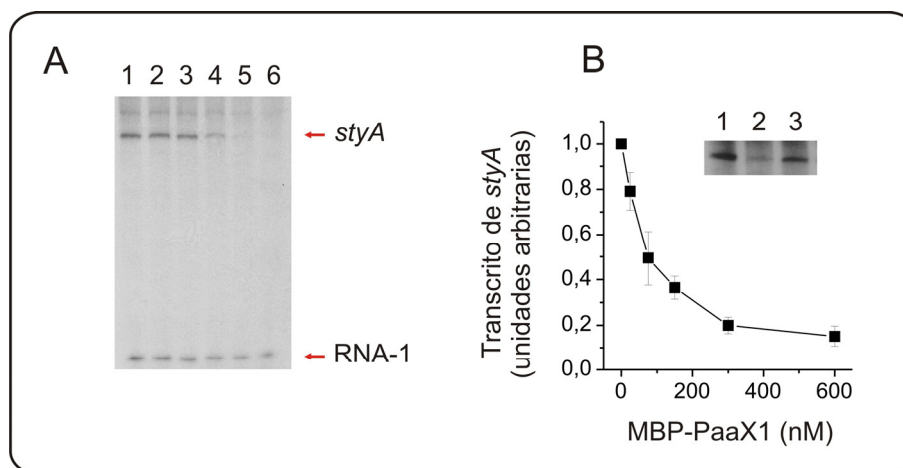


FIGURA 5.13. Efecto de MBP-PaaX1 y del FA-CoA sobre la transcripción *in vitro* a partir del promotor P_{styA} . **A.** Imagen electroforética de los transcritos de *styA* y RNA-1 (control interno) obtenidos a partir de pTE-E1B1 (Figura 5.4) en presencia de His₆-StyR-P 2μM y distintas concentraciones de MBP-PaaX1. Calles 1 a 6: MBP-PaaX1 0, 25, 75, 150, 300 y 600 nM. **B.** Gráfica que muestra los niveles de transcritos de *styA* (en unidades arbitrarias) obtenidos a partir de pTE-E1B1 en función de la cantidad de MBP-PaaX1 empleada en el ensayo (de 0 a 600 nM). Los resultados corresponden a la media normalizada de 6 experimentos independientes. Las barras de error indican el error estándar. El inserto muestra una autorradiografía de los transcritos de *styA* que se generan en ausencia de MBP-PaaX1 (calle 1), en presencia de MBP-PaaX1 600 nM (calle 2) y en presencia de MBP-PaaX1 600 nM y de FA-CoA 1 mM (calle 3).

3.5. Estudio *in vivo* del efecto de la unión de PaaX al operador en P_{styA} mediante un sistema heterólogo de dos plásmidos.

Los datos obtenidos en los estudios *in vitro* anteriores muestran que PaaX1 tiene un potencial para reprimir la transcripción a partir de P_{styA} en ausencia de FA-CoA y que esta represión contrarresta la activación de la transcripción por StyR fosforilado en este promotor. Para ver si PaaX1 ejerce el mismo efecto represor *in vivo* se ha recurrido a la técnica de PCR cuantitativa.

En primer lugar se llevó a cabo el estudio utilizando un sistema de dos plásmidos en el huésped heterólogo *E. coli* W14. Esta estirpe deriva de *E. coli* W y es incapaz de utilizar AFA como fuente de carbono (Ferrández y col., 1997) al tener deletados todos los genes *paa*. El plásmido pISm7.0R (Velasco y col., 1998) es derivado del vector pUC19 con un inserto que contiene la región *stySR-P_{styA}-styAB* bajo el control del promotor inducible P_{lac} (Tabla 4.2, Materiales y métodos), de forma que proporciona el promotor P_{styA} dentro de su contexto génico nativo junto

con los componentes necesarios para que tenga lugar la transcripción inducida por estireno. El plásmido corresidente fue, en unos casos, el vector control pSJP18Not (Tabla 4.2, Materiales y métodos) y en otros el plásmido pJ18X1, que porta el gen *paaX1* de *Pseudomonas* sp. Y2 bajo el control del promotor P_{lac} (Figura 5.14), completando así el sistema genético necesario para monitorizar el efecto de PaaX1 en la transcripción.

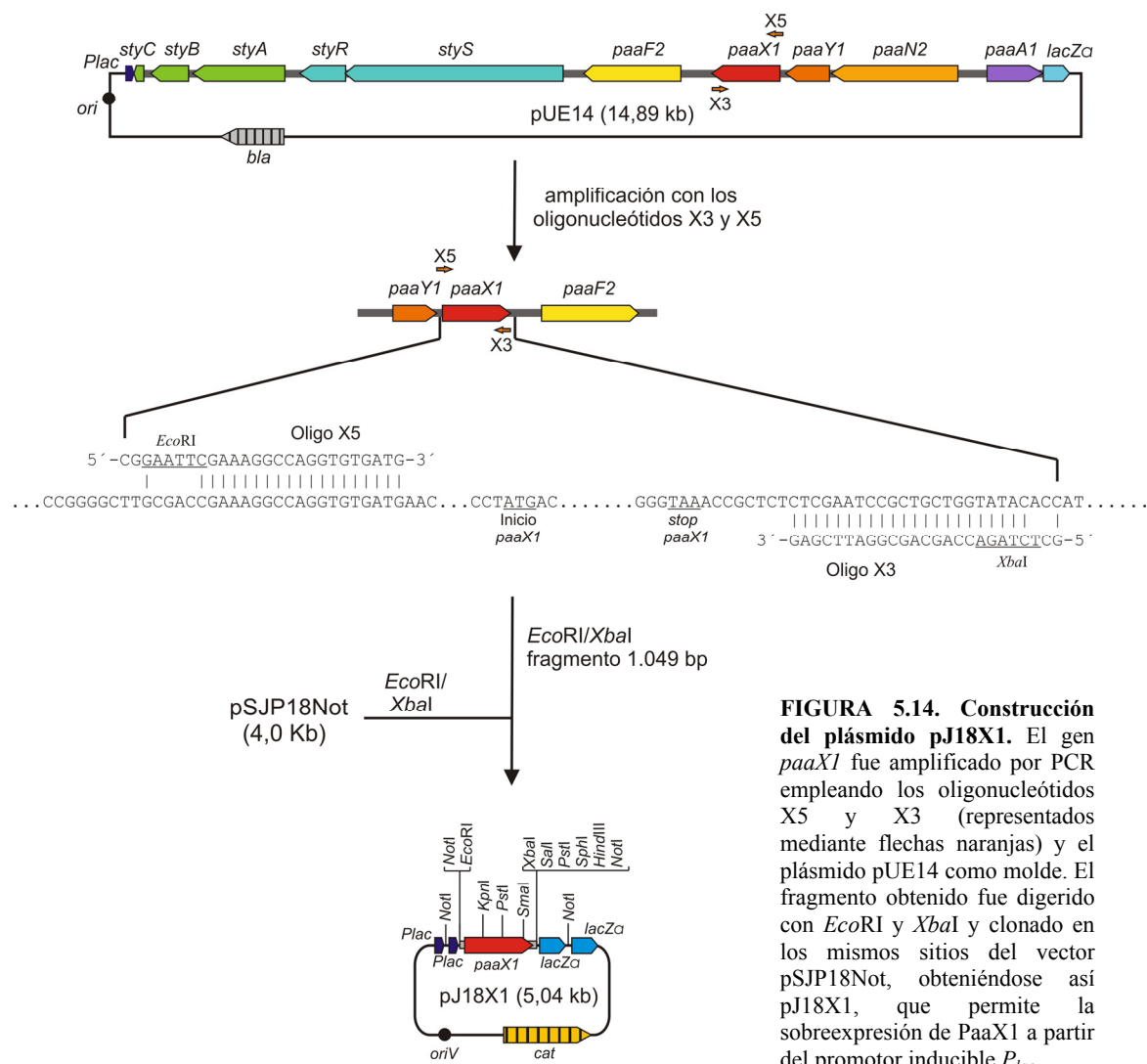


FIGURA 5.14. Construcción del plásmido pJ18X1. El gen *paaX1* fue amplificado por PCR empleando los oligonucleótidos X5 y X3 (representados mediante flechas naranjas) y el plásmido pUE14 como molde. El fragmento obtenido fue digerido con *EcoRI* y *XbaI* y clonado en los mismos sitios del vector pSJP18Not, obteniéndose así pJ18X1, que permite la sobreexpresión de PaaX1 a partir del promotor inducible P_{lac} .

Los cultivos de *E. coli* W14 [pISm7.0R] [pJ18X1] y *E. coli* W14 [pISm7.0R] [pSJP18Not] se crecieron en medio mínimo M63 suplementado con glicerol al 0,4% hasta alcanzar una DO_{600nm} de 0,4; en ese momento se añadió IPTG para inducir la expresión a partir de los dos plásmidos. Cuando los cultivos alcanzaron una DO_{600nm} de 0,6 se dividieron en dos, uno se indujo con estireno suministrado en fase gaseosa y el otro permaneció sin inducir. Transcurridos 30 minutos se tomaron muestras de ambos cultivos, con las que, tras el correspondiente proceso de extracción de

RNA y síntesis de cDNA (apartados 6.4 y 7.1 de Materiales y métodos), se llevó a cabo el ensayo de PCR cuantitativa para monitorizar los niveles de expresión de *styA*. Como control interno se utilizó el gen *bla*, cuya expresión es continua (los cultivos se crecen en ampicilina) y constante independientemente de las condiciones de cultivo. Tras 30 minutos de inducción con estireno los niveles de transcrito obtenidos de los cultivos de *E. coli* W14 [pISm7.0R] [pJ18X1] eran inferiores a los obtenidos a partir de los cultivos de *E. coli* W14 [pISm7.0R] [pSJP18Not] (Figura 5.15), confirmando que PaaX1 reprime la transcripción a partir de P_{styA} .

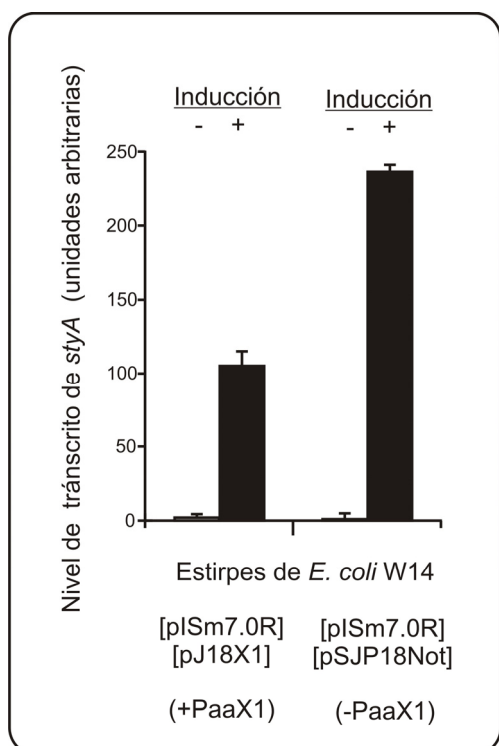


FIGURA 5.15. Cuantificación por PCR a tiempo real de los niveles de RNA mensajero de *styA* en distintas estirpes de *E. coli*. Los niveles de transcrito de *styA* se determinaron en cultivos de las estirpes indicadas en condiciones basales (barras grises) o tras 30 minutos de inducción con estireno (barras negras). Los resultados son la media de tres experimentos independientes. Las barras de error indican el error estándar.

3.6. Estudio *in vivo* del efecto de la unión de PaaX al operador en P_{styA} en *Pseudomonas* sp. Y2.

3.6.1. Construcción del mutante *Pseudomonas* sp. Y2T2X1.

Para realizar los estudios en el propio sistema de *Pseudomonas* sp. Y2 se construyó el mutante *Pseudomonas* sp. Y2T2X1 a partir de la estirpe derivada de ella *Pseudomonas* sp. Y2T2 ($\Delta paa2$), que sólo contiene la copia de *paaX1* en su cromosoma. La mutación del gen *paaX1* produjo una estirpe deficiente en *paaX*, pero que porta el resto de los genes *sty* y *paa* (ya que tiene el cluster *paa1* en su cromosoma), y que se ha denominado *Pseudomonas* sp. Y2T2X1.

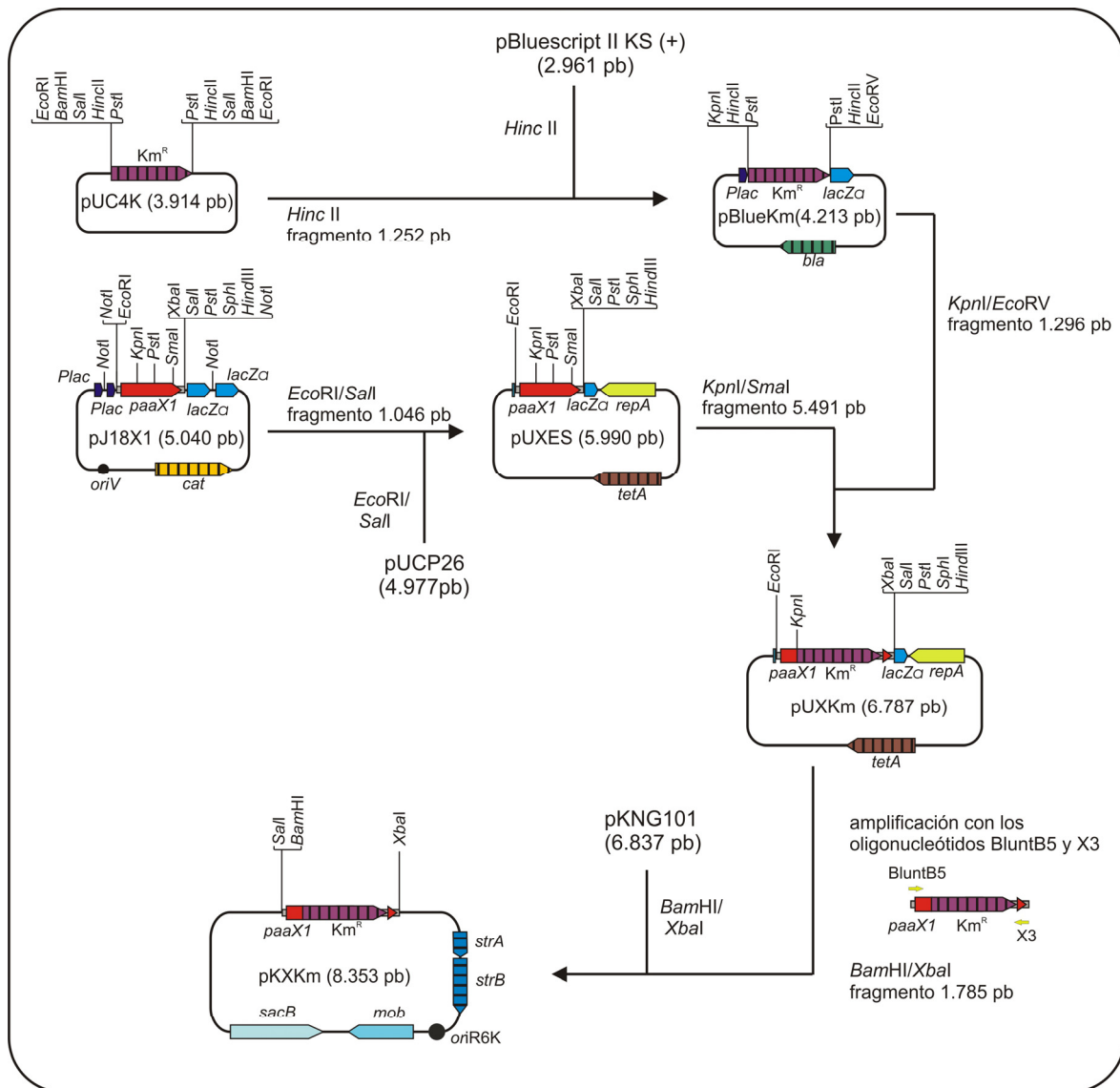


FIGURA 5.16. Construcción del plásmido pKXKm. En este esquema se detallan las sucesivas etapas de la construcción de pKXKm, derivado de pKNG101 con un inserto que contiene el gen *paaX1* de *Pseudomonas* sp. Y2 parcialmente delecionado e interrumpido por un casete de *Km^R*. En primer lugar, se aisló de pUC4K (Tabla 4.2, Materiales y métodos) el fragmento *HincII* de 1.252 bp que contiene el casete de resistencia a *Km^R* y se clonó en el sitio *HincII* de pBluescript II KS (+) (Tabla 4.2, Materiales y métodos), dando lugar al plásmido pBlueKm. El casete de *Km^R* fue extraído de este último como un fragmento de 1.296 pb por digestión con *EcoRV* y *KpnI* y fue usado para reemplazar un fragmento interno de 499 pb de *paaX1* comprendido entre las dianas de restricción *KpnI* y *SmaI* en el plásmido pUXES, obteniéndose así el plásmido pUXKm. Mediante PCR, utilizando los oligonucleótidos BluntB5 y X3 (Tabla 4.3, Materiales y métodos) y pUXKm como molde, se amplificó un fragmento *BamHI*-*XbaI* que contiene *paaX1* parcialmente delecionado y reemplazado por el casete de *Km^R*, que se clonó en los mismos sitios de vector suicida pKNG101, dando lugar a pKXKm. Este plásmido se transfirió por conjugación desde *E. coli* S17.1 λ pir a *Pseudomonas* sp. Y2T2, para conseguir así la estirpe mutante *Pseudomonas* sp. Y2T2 Δ *paaX1*::*Km^R*, denominada *Pseudomonas* sp. Y2T2X1.

La construcción del plásmido pKXKm, empleado para la obtención de la estirpe mutante *Pseudomonas* sp. Y2T2X1 se encuentra esquematizada en la figura 5.16. El plásmido suicida pKXKm fue transferido por conjugación desde *E. coli* S17.1 λ pir hasta *Pseudomonas* sp. Y2T2

según el procedimiento descrito en el apartado 5.4 de Materiales y métodos. Los dobles recombinantes se seleccionaron en función de su resistencia a sacarosa, Km, Cm y Tc y se identificaron por su sensibilidad a Sm. Se seleccionó uno de las conjugantes obtenidos y en él se comprobó la mutación del gen *paaX1* mediante PCR (Figura 5.17).

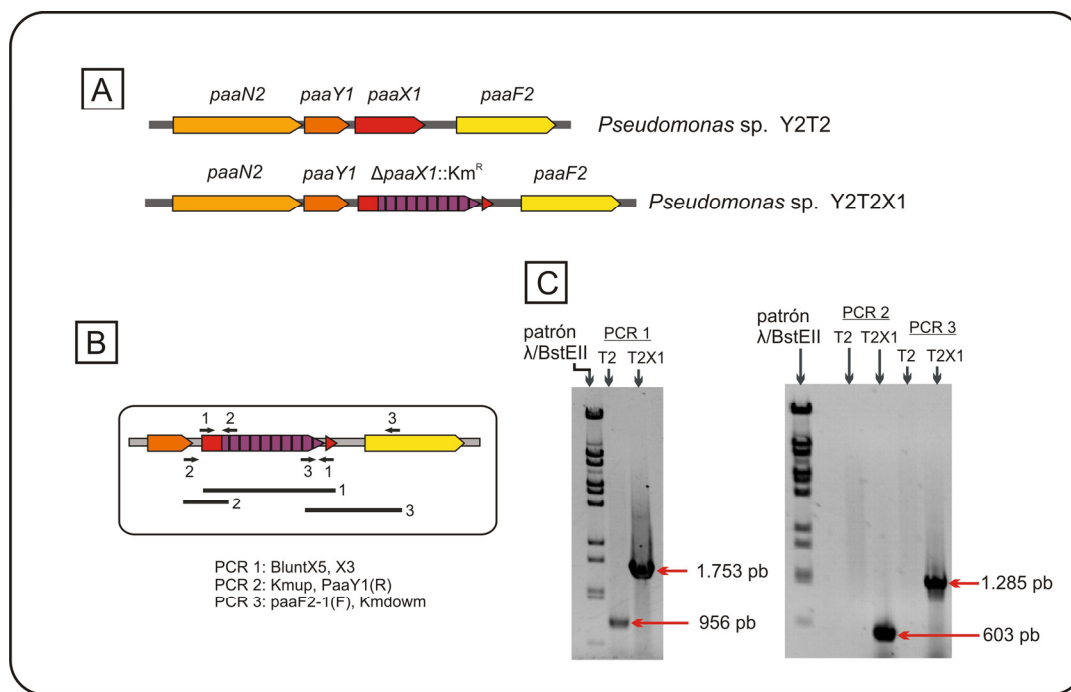


FIGURA 5.17. Comprobación de la mutación en *paaX1* de la estirpe mutante *Pseudomonas sp. Y2T2X1*. **A.** Esquema del contexto cromosómico en el que se encuentra *paaX1* en *Pseudomonas sp. Y2T2* y en *Pseudomonas sp. Y2T2X1*, en el que el gen *paaX1* se encuentra parcialmente deletado y truncado por un casete de Km^R. **B.** Esquema de la región $\Delta paaX1$ del mutante Y2T2X1, en el que las parejas de cebadores utilizadas para las PCR 1, 2 y 3 se señalan con flechas numeradas, y los productos de amplificación de las respectivas reacciones con barras horizontales. **C.** Imágenes electroforéticas donde se muestran los fragmentos amplificados por PCR empleando las parejas de oligonucleótidos 1, 2 y 3 y, como molde, el DNA cromosómico de las estirpes Y2T2 e Y2T2X1.

3.6.2. Crecimiento de Y2T2X1 en estireno y en AFA.

Las estirpes Y2T2 e Y2T2X1 se crecieron en medio M9 en presencia de AFA o de estireno suministrado en fase gaseosa, siguiéndose su crecimiento a lo largo de la curva y comparando el crecimiento de ambas (Figura 5.18). El mutante Y2T2X1 no tiene alterada su capacidad para crecer en medio mínimo más estireno suministrado en fase gaseosa y ambas cepas tienen un patrón de crecimiento muy parecido en ese medio (Figura 5.18A). Sin embargo, en presencia de AFA, la estirpe Y2T2X1 presenta una fase de adaptación al medio más rápida (Figura 5.18B). Estos resultados se comentarán más adelante en el apartado de Discusión.

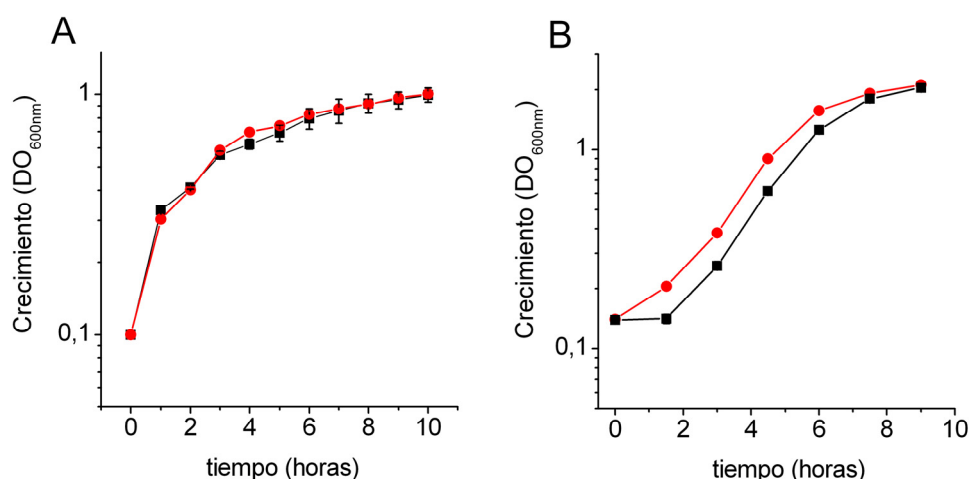


FIGURA 5.18. Crecimiento de las estirpes Y2T2 e Y2T2X1 en estireno y en AFA. **A.** Curvas de crecimiento de *Pseudomonas* sp. Y2T2 (en negro) y *Pseudomonas* sp. Y2T2X1 (en rojo) en medio líquido M9 en presencia de estireno suministrado en fase gaseosa. **B.** Curvas de crecimiento de *Pseudomonas* sp. Y2T2 (en negro) y *Pseudomonas* sp. Y2T2X1 (en rojo) en medio líquido M9 suplementado con AFA. Los resultados son la media de tres ensayos independientes. Las barras de error corresponden al error estándar.

3.6.3. Estudio de la transcripción a partir de P_{styA} en el mutante Y2T2X1.

Se prepararon cultivos de *Pseudomonas* sp. Y2T2 y de *Pseudomonas* sp. Y2T2X1 en medio mínimo M9 suplementado con glicerol hasta alcanzar una DO_{600nm} de 0,6. En ese momento los cultivos se dividieron en dos, induciendo uno de ellos con estireno suministrado en fase gaseosa, y manteniendo el otro sin inducir. A partir de muestras tomadas después de 5 y 30 minutos se procedió a la extracción de RNA, síntesis de cDNA y ensayos de PCR cuantitativa. Los niveles de expresión de *styA* se cuantificaron en referencia a los obtenidos para el gen *tetA* (insertado en monocopia en el cromosoma de estas estirpes), gen de expresión constante (en presencia de Tc) y usado como estándar interno. En condiciones basales, esto es, de no-inducción, la ausencia de PaaX1 en la estirpe Y2T2X1 conlleva un incremento de unas tres veces (de $1 \pm 0,18$ a $3,02 \pm 0,41$) en la expresión de *styA* respecto a la obtenida para la estirpe Y2T2. En los cultivos inducidos con estireno los niveles de *styA* siguen siendo mayores en Y2T2X1 que en Y2T2, aunque la diferencia se va acortando al incrementarse el tiempo de exposición a estireno (Figura 5.19).

Los resultados presentados confirman el papel represor de PaaX1 en el proceso de transcripción a partir del promotor P_{styA} . Esto se comentará más ampliamente en la discusión.

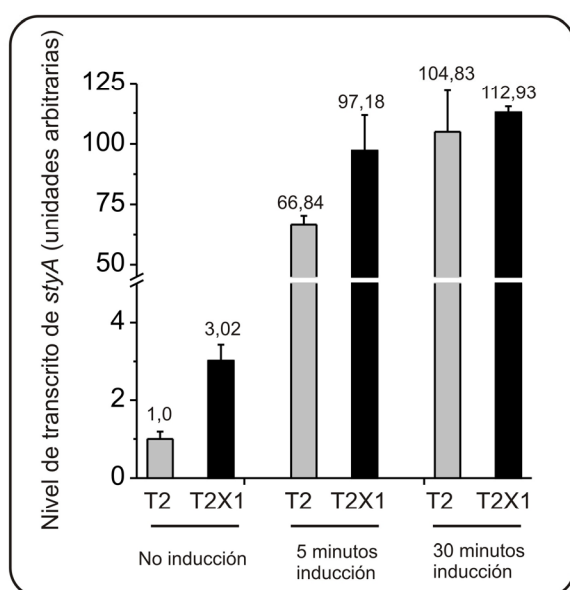


FIGURA 5.19. Cuantificación por PCR a tiempo real de los niveles de RNA mensajero de *styA* en *Pseudomonas* sp. Y2T2 y *Pseudomonas* sp. Y2T2X1. Los niveles de transcrito de *styA* se determinaron en cultivos en condiciones basales (no inducción) y tras 5 y 30 minutos de inducción con estireno. Las barras grises corresponden a la estirpe Y2T2 (abreviada en la figura como T2) y las barras negras a Y2T2X1 (abreviada en la figura como T2X1). Los resultados son la media de tres experimentos independientes. Las barras de error indican el error estándar.

3.7. Estudios físicos de la interacción de PaaX y el operador *styA*.

Con el fin de profundizar en los detalles moleculares de la interacción entre PaaX y su región operadora en *P_{styA}* se procedió a analizar el grado de oligomerización de la proteína, así como la estequiometría de su unión a la secuencia operadora en el DNA.

El grado de oligomerización de MBP-PaaX1 se determinó mediante experimentos de velocidad y equilibrio de sedimentación, según lo descrito en el apartado 14 de Materiales y métodos. Se realizaron distintos experimentos de equilibrio y velocidad de sedimentación utilizando diferentes concentraciones de proteína (1,28 μM , 3,2 μM , 6,44 μM , 9,65 μM y 12,87 μM). En la Figura 5.20 se muestra el resultado obtenido en uno de estos experimentos. El valor de la masa promedio aparente obtenido (Figura 5.20) fue de 154.000 Da, aproximadamente el doble de la masa molecular teórica calculada para MBP-PaaX1 (77.672,5 Da). Así, se puede concluir que MBP-PaaX1 se encuentra en forma dimérica en disolución con un coeficiente de sedimentación de 6,26 S. El análisis hidrodinámico indicó que la relación friccional del pico obtenido en la velocidad de sedimentación era 1,51, lo que sugiere que la proteína tiene una forma algo achatada en disolución.

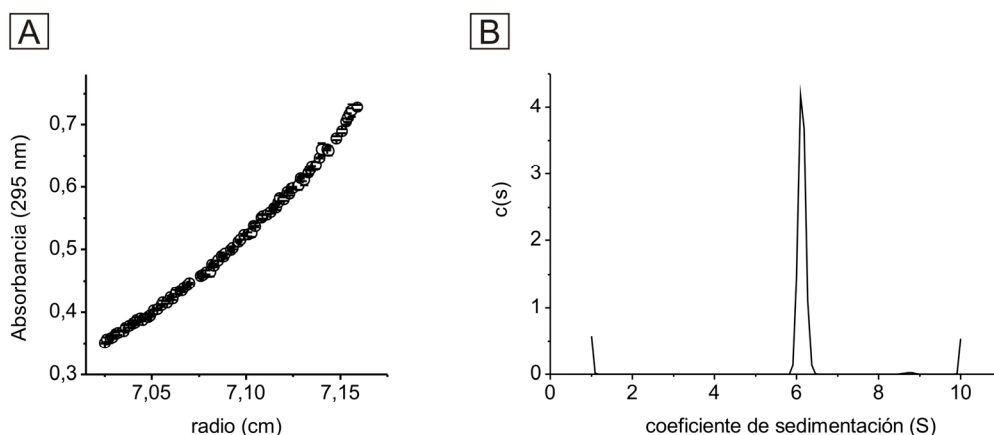


FIGURA 5.20. Resultados de los experimentos de equilibrio y velocidad de sedimentación con MBP-PaaX1. **A.** Equilibrio de sedimentación de MBP-PaaX1 9,65 μ M. Los símbolos representan los datos experimentales obtenidos a 11.000 rpm y 20°C. El mejor ajuste de los datos al gradiente en el equilibrio de sedimentación corresponde con el de una especie única ($M_w = 154000$ Da). **B.** Velocidad de sedimentación de MBP-PaaX1 9,65 μ M. (S), coeficiente de sedimentación en Svedverg; c(s), función de distribución de coeficientes de sedimentación.

Además se determinó la estequiometría de la interacción de MBP-PaaX1 con el DNA. Para ello se empleó la sonda de DNA STYc (125 pb), que se obtuvo mediante amplificación por PCR a partir de pISm7.0R (Tabla 4.2, Materiales y métodos) como molde y los oligonucleótidos Pcu y Acu (Tabla 4.3, Materiales y métodos; Figura A1) como cebadores. Se realizaron experimentos de equilibrio y velocidad de sedimentación utilizando mezclas de STYc y MBP-PaaX1 en proporciones 1:1, 1:2, 1:4 y 1:10, comparándose con los realizados con STYc y MBP-PaaX1 por separado. Los resultados de los experimentos de velocidad de sedimentación se muestran en la Figura 5.21. El coeficiente de sedimentación es de 5 para STYc y de 6,26 para MBP-PaaX1. Al aumentar en el ensayo la proporción de proteína se observa cómo va desapareciendo el pico correspondiente al DNA, a la vez que va apareciendo un pico de un coeficiente de sedimentación de 7,2 que corresponde al complejo proteína-DNA formado. Los resultados de estos experimentos permiten concluir que la asociación de MBP-PaaX1 con la sonda STYc se da en forma dimérica, siendo por tanto la estequiometría de la unión DNA-proteína de 1:2.

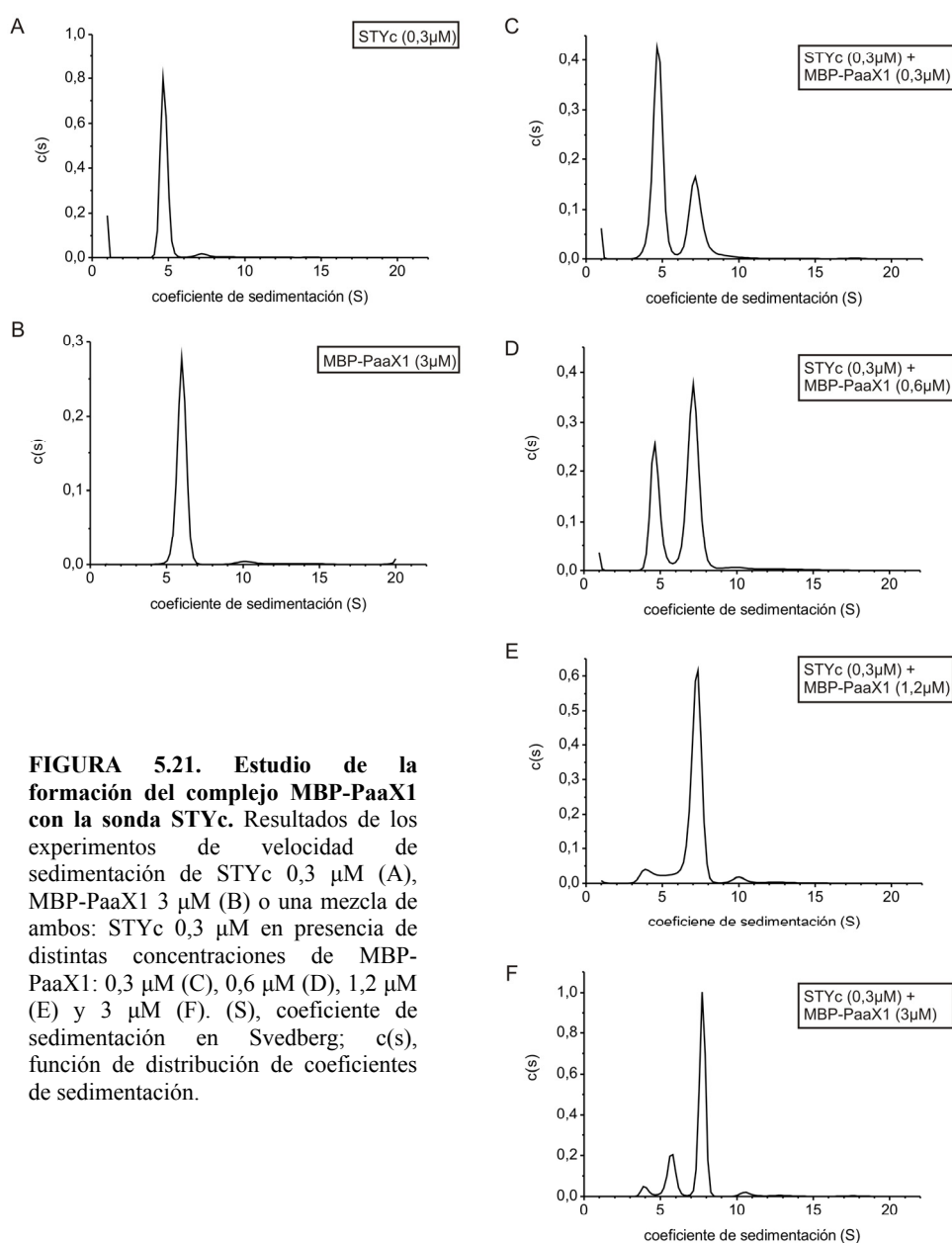


FIGURA 5.21. Estudio de la formación del complejo MBP-PaaX1 con la sonda STYc. Resultados de los experimentos de velocidad de sedimentación de STYc 0,3 µM (A), MBP-PaaX1 3 µM (B) o una mezcla de ambos: STYc 0,3 µM en presencia de distintas concentraciones de MBP-PaaX1: 0,3 µM (C), 0,6 µM (D), 1,2 µM (E) y 3 µM (F). (S), coeficiente de sedimentación en Svedberg; c(s), función de distribución de coeficientes de sedimentación.

4. Papel de IHF en la regulación del promotor P_{styA} .

Estudios previos de la región P_{styA} de *Pseudomonas* sp. Y2 empleando el servidor SEQScan (Alonso, 2002) permitieron localizar un posible sitio de unión para IHF en la región comprendida entre las posiciones -105 y -79. Esta secuencia tiene un alto índice de identidad con la secuencia consenso de unión del factor IHF (5'- WWWWW- - - - - WATCAR- - - - TTR-3', donde W es A o T, y R es A o G) (Alonso, 2002). Sin embargo, estudios *in vivo* realizados en ese mismo

trabajo (Alonso, 2002) no advirtieron una diferencia en la actividad del promotor P_{styA} en presencia o ausencia de IHF (Alonso, 2002). Por el contrario, estudios realizados en *Pseudomonas fluorescens* ST pusieron de manifiesto que IHF contribuye a potenciar la transcripción de los genes *sty* catabólicos (Santos y col., 2002) en esta estirpe y que su sitio de unión solapa parcialmente con la caja STY1 de esta estirpe, formando el conjunto de ambas la región URE (*Upstream Regulatory Element*) (Leoni y col., 2005).

Con el objetivo de ampliar los estudios acerca de un posible efecto de IHF en la regulación de la expresión de los genes *sty* catabólicos en *Pseudomonas* sp. Y2 se han llevado a cabo la serie de experimentos que se describen a continuación.

4.1. Ensayos de la unión de IHF a la región P_{styA} .

La unión de IHF a la región P_{styA} se estudió mediante ensayos de retardo de banda electroforética empleando las sondas radiactivas E1B1 y E2B1, ya descritas anteriormente (apartado 2.3 de Resultados) y la proteína IHF purificada (cedida por Victoria Shingler). Un esquema de ambas sondas aparece representado en la Figura 5.22A. El sitio de unión de IHF, marcado entre las posiciones -105 y -93, se ha señalado en función del descrito para *P. fluorescens* ST (Leoni y col., 2005). Como puede observarse en la figura 5.22B, IHF es capaz de provocar un retraso dependiente de la concentración en la migración de la sonda E1B1 en el gel, mientras que no produce alteración alguna en la migración de la sonda E2B1, que lleva delecionada la secuencia de unión de IHF.

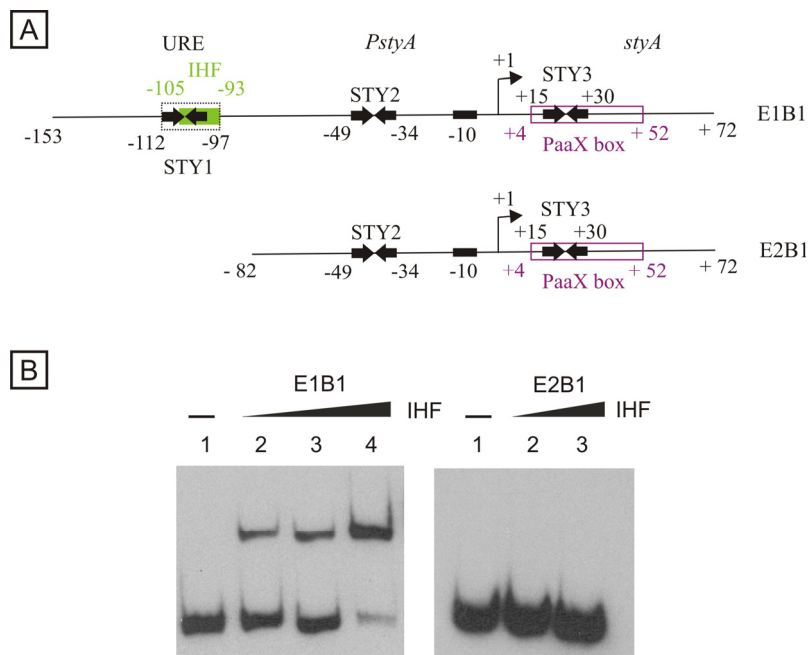


FIGURA 5.22. Unión de IHF a la región P_{styA} . **A.** Esquema de las sondas E1B1 y E2B1 derivadas de la región promotora P_{styA} . La sonda E1B1 abarca toda la región promotora P_{styA} y el inicio de $styA$, extendiéndose desde la posición -153 a la +72. La sonda E2B1 carece de la región URE y, por tanto, del sitio de unión para IHF. Los sitios STY1, STY2 y STY3 de unión de StyR aparecen representados como dos flechas convergentes. El sitio +1 de inicio de la transcripción de $styA$ se ha señalado con una flecha y la caja -10 extendida con un rectángulo negro. El sitio de unión de IHF descrito para *P. fluorescens* ST (Leoni y col., 2005), situado entre las posiciones -105 y -93, se ha señalado en verde. La región URE se encuentra recuadrada con línea discontinua. La región operadora de PaaX se encuentran recuadrada en morado. **B.** A la izquierda, ensayo de retardo de la banda electroforética de la sonda E1B1 con concentraciones crecientes de IHF. Calles 1 a 4: IHF 0, 20, 50, y 100 nM. A la derecha, ensayo de retardo de la banda electroforética de la sonda E2B1 con concentraciones crecientes de IHF. Calles 1 a 3: IHF 0, 50 y 100 nM.

4.2. Estudio de la secuencia de unión de IHF en la región P_{styA} .

Para confirmar si el sitio de unión de IHF en la región P_{styA} de *Pseudomonas* sp. Y2 coincide con el descrito para *P. fluorescens* ST, se llevó a cabo un ensayo de protección frente a la digestión con DNasa I del complejo formado por la unión de IHF a la sonda E1B1, cuyo resultado se muestra en la Figura 5.23. La sonda E1B1 se obtuvo según lo descrito en el apartado 2.3 de Resultados. La secuencia de DNA que resultó protegida en el ensayo se extiende entre las posiciones -110 y -81, englobando el motivo descrito para *P. fluorescens* ST (que se extendería entre las posiciones -105 y -93 en nuestro caso), y coincide prácticamente con el sitio de unión teórico obtenido mediante el análisis con el servidor SEQScan (que abarca la región comprendida entre los sitios -105 y -79), aunque algo desplazada.

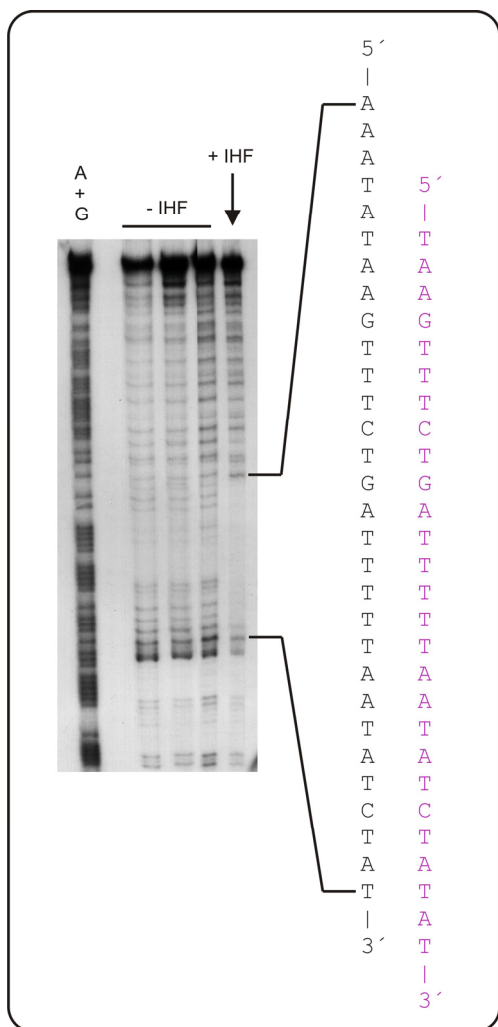


FIGURA 5.23. Ensayo de protección frente a la digestión con DNasa I del complejo formado por la unión de IHF a la sonda E1B1. Calles 1: reacción de secuenciación A+G de Maxam y Gilbert de la sonda E1B1. Calles 2-4: ensayos sin IHF. Calle 5: ensayo de protección con IHF 250 nM. A la derecha, en vertical, se detalla la secuencia de nucleótidos de la región protegida. En morado se muestra la secuencia teórica de unión de IHF calculada por el programa SEQScan (Alonso, 2002).

4. 3. Estudio del papel de IHF en la transcripción a partir de la región P_{styA} *in vitro*.

Se llevaron a cabo ensayos de transcripción *in vitro* empleando los plásmidos pTE-E1B1 o pTE-E2B1 (Figura 5.24) como molde (5 nM), σ^{70} -RNA polimerasa de *E. coli* (10 nM), tampón Txn, His₆-StyR-P 2 μ M y concentraciones crecientes de IHF purificado, según lo descrito en el apartado 7.2 de Materiales y métodos. El plásmido pTE-E2B1 carece de parte de la región promotora P_{styA} y, por tanto, del sitio de unión de IHF. La presencia de IHF en concentraciones de hasta 40 nM no provocó ninguna alteración en los niveles de transcrito de *styA* obtenido empleando tanto pTE-E1B1 como pTE-E2B1 (Figura 5.24C). El experimento se repitió utilizando concentraciones de IHF de hasta 1 μ M. Tampoco en este caso se observó un incremento en los niveles de transcrito de *styA* al aumentar la concentración de IHF en el ensayo. Incluso, a concentraciones elevadas de IHF (0,5 y 1 μ M), llega a apreciarse una disminución en los niveles de transcrito de *styA* al emplear cualquiera de los plásmidos como molde (Figura 5.24D), lo que, en una primera interpretación, puede achacarse al hecho de que, a concentraciones muy elevadas, el

Resultados

IHF se une a regiones curvadas del DNA (y la secuencia de esta región promotora es rica en A y T; Figura 5.1) y provoca estructuras en el DNA que dificultan el desarrollo del proceso de transcripción.

Para investigar si el IHF pudiese actuar favoreciendo la formación del complejo abierto de la transcripción se llevó a cabo un nuevo ensayo de IVT, empleando los plásmidos pTE-E1B1 o pTE-E2B1 como molde (5 nM), σ^{70} -RNA polimerasa de *E. coli* (10 nM), tampón Txn, His₆-StyR-P 2 μ M e IHF (20 mM), según lo descrito en el apartado 7.2 de Materiales y métodos, pero, en este caso, incubando a distintos tiempos para analizar el proceso de formación del complejo abierto (1, 3, 6, 12 y 18 minutos). Se quería comprobar así si el efecto de IHF era apreciable a tiempos cortos de incubación, esto es, al inicio del proceso de formación del complejo abierto. Sin embargo, tampoco se observó ningún efecto diferencial en los niveles de transcrito de *styA* obtenidos a partir de cada molde al emplear distintos tiempos de incubación, ni al comparar los resultados obtenidos para ambos plásmidos (Figura 5.24E).

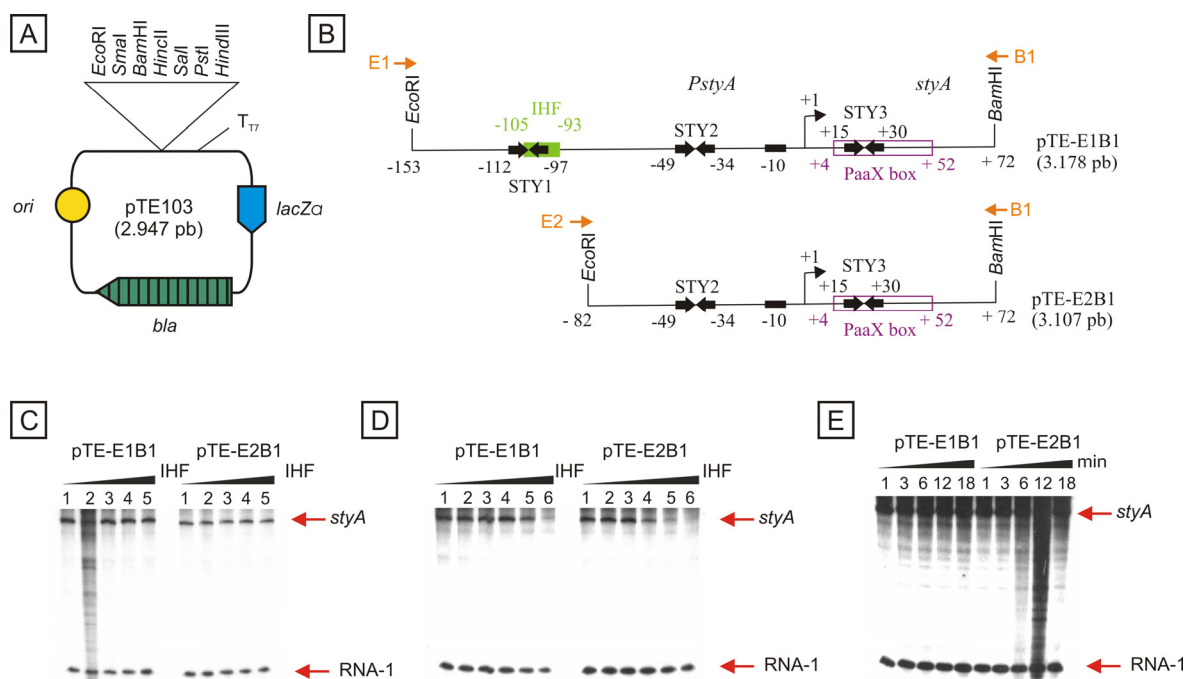


FIGURA 5.24. Ensayos de transcripción *in vitro* a partir de P_{styA} con los plásmidos molde pTE-E1B1 y pTE-E2B1 para determinar el efecto de IHF. **A.** Esquema del plásmido pTE103 empleado como vector para construir los plásmidos pTE-E1B1 (figura 5.4) y pTE-E2B1. **B.** Detalle de los fragmentos clonados en los sitios *EcoRI* y *BamHI* de pTE103 para dar lugar a los plásmidos pTE-E1B1 y pTE-E2B1, respectivamente. El sitio +1 de inicio de la transcripción de *styA* aparece indicado con una flecha. La caja -10 extendida se muestra con un rectángulo. Las flechas invertidas representan los distintos sitios STY de unión de StyR. El rectángulo verde indica el sitio de unión de IHF descrito para *P. fluorescens* ST (Leoni y col., 2005). La región protegida por PaaX está recuadrada en morado. Los números hacen referencia a las posiciones de los extremos de las sondas, las cajas STY, la caja PaaX y el motivo de unión de IHF, respectivo al sitio de inicio de la transcripción. En naranja se han señalado los oligonucleótidos empleados para amplificar ambos fragmentos. **C.** Análisis electroforético de los transcritos de *styA* y RNA-1 obtenidos a partir de pTE-E1B1 y pTE-E2B1 en presencia de His₆-StyR-P 2μM y distintas concentraciones de IHF. Calles 1 a 5: IHF 0, 10, 20, 30 y 40 nM. **B.** Análisis electroforético de los transcritos de *styA* y RNA-1 obtenidos a partir de pTE-E1B1 y pTE-E2B1 en presencia de His₆-StyR-P 2μM y distintas concentraciones de IHF. Calles 1 a 6: IHF 0, 50, 125, 250, 500 y 1000 nM. **C.** Transcritos de *styA* y RNA-1 obtenidos a partir de pTE-E1B1 y pTE-E2B1 en presencia de His₆-StyR-P 2μM, IHF 20 nM y utilizando distintos tiempos de incubación para la formación del complejo abierto en los ensayos (1, 3, 6, 12 y 18 minutos).

4.4. Estudio del papel de IHF en la transcripción a partir de la región P_{styA} *in vivo*.

Los clones *E. coli* S90C [pJ18RPAT], *E. coli* DPB101 [pJ18RPAT] (mutante de S90C en la subunidad β del factor IHF) y *E. coli* DPB102 [pJ18RPAT] (mutante de S90C en la subunidad α del factor IHF), portadores del plásmido pJ18RPAT ((Alonso, 2002); Figura 5.25A), se crecieron en medio mínimo M63 suplementado con glicerol al 0,4 % hasta alcanzar una DO_{600nm} de 0,4, aproximadamente; en ese momento, se añadió IPTG a una concentración final de 1 mM para inducir la expresión del gen *styR* presente en el plásmido, y se valoró la actividad β-galactosidasa de los cultivos después de 2 y 7 horas de inducción, pero no se observaron diferencias suficientemente significativas que permitieran relacionarlas con la presencia o ausencia del factor IHF (Figura 5.25).

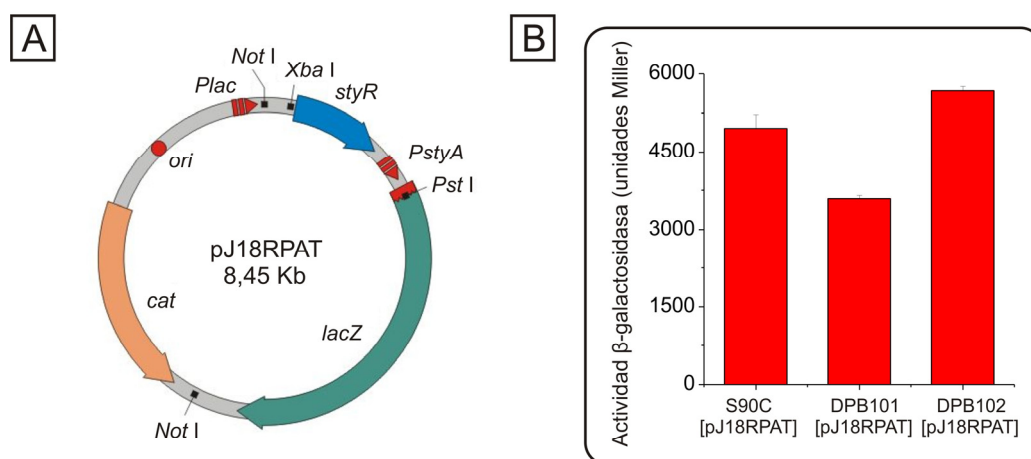


FIGURA 5.25. Actividad del promotor P_{styA} en las estirpes de *E. coli* S90C, DPB101 y DPB102. **A.** Esquema del plásmido pJ18RPAT, que porta el gen *styR* bajo el control de P_{lac} y la fusión *styA::lacZ* cuya transcripción está dirigida por el promotor P_{styA} (tomado de Alonso, 2002). **B.** Actividad β-galactosidasa inducida a partir del promotor P_{styA} del plásmido pJ18RPAT presente en las estirpes de *E. coli* S90C, DPB101 y DPB102 (expresada en unidades Miller tras dos horas de inducción con IPTG).

Resultados

Estos resultados confirman la afinidad de IHF para unirse a la secuencia P_{styA} , en una región concreta y definida, que coincide con la anteriormente descrita para *P. fluorescens* ST (Leoni y col., 2005). Sin embargo, los datos obtenidos a partir de los experimentos desarrollados *in vitro* e *in vivo* no permiten confirmar un efecto activador claro de este factor sobre la transcripción a partir de P_{styA} . En la sección final de discutirán estos resultados más ampliamente.

B. Estudio de la región promotora *P_{paaF2}*.

Como ya se ha visto en la introducción, *Pseudomonas* sp. Y2 contiene en su cromosoma tres copias del gen *paaF* que codifican la actividad PA-CoA ligasa. Tanto el gen *paaF*, integrante del *cluster paa1*, como *paaF3*, ubicado en el *cluster paa2*, codifican PA-CoA ligasas cuya expresión está controlada por PaaX y depende de la presencia de AFA en el medio. Además, existe una tercera copia de este gen, denominada *paaF2*, localizada al final del *cluster paa1* y adyacente a los genes reguladores *stySR*. Además de la estirpe Y2, *P. fluorescens* ST y *P. putida* CA-3 también tienen una copia de un gen homólogo a *paaF2* (previamente denominado *paaK*) situada delante del operón *stySR* (Santos y col., 2000; O'Leary y col., 2001). Las copias *paaF* y *paaF2* de *Pseudomonas* sp. Y2 fueron asignadas inicialmente al *cluster paa1*, pero sus contextos génicos son diferentes. Esto, junto con el hecho de que el *cluster paa2* contiene un único gen (*paaF3*) que codifica la actividad PA-CoA ligasa, hizo pensar en un posible distinto significado fisiológico de *paaF2*.

Estudios de crecimiento en distintos medios de estirpes derivadas de Y2 mutantes en los diferentes genes *paaF* permitieron observar que la expresión del gen *paaF2* es dependiente de la presencia de estireno en el medio, pero no de AFA. Este hecho diferencial respecto a la expresión de *paaF* y *paaF3* sugirió la posibilidad de que la expresión de *paaF2* fuera dependiente del sistema de regulación de los genes *sty*, y dio lugar a la investigación que se desarrolla en este capítulo.

1. Construcción y estudios de crecimiento de distintos mutantes *paaF* derivados de *Pseudomonas* sp. Y2.

Para estudiar el posible papel de *paaF2* en el catabolismo del estireno se construyeron mutantes derivados de la cepa Y2 que contienen únicamente el gen *paaF* o el gen *paaF2*. Para ello se escogió como estirpe parental *Pseudomonas* sp. Y2T2, que tiene delecionado el *cluster paa2* y por tanto sólo contiene las copias *paaF* y *paaF2* en su cromosoma. A partir de esta cepa se construyeron los mutantes en *paaF* y *paaF2* mediante truncamiento del gen blanco con un casete de resistencia a Km^R.

1.1. Construcción de la estirpe *Pseudomonas* sp. strain Y2T2 *paaF*::Km.

La estirpe *Pseudomonas* sp. Y2T2 *paaF*::Km (a partir de ahora abreviada como Y2T2 *paaF*::Km) se obtuvo por conjugación de la estirpe donadora *E. coli* S17.1 λ pir [pKCoAKm] con la aceptora *Pseudomonas* sp. Y2T2 y posterior selección de los dobles recombinantes en placas de LB con Cm, Tc, Km y sacarosa. El plásmido pKCoAKm (Bartolomé-Martín, 2006); Figura 5.26A)

es derivado del vector suicida pKNG101 y porta el gen *paaF* interrumpido por un casete de Km^R. Los dobles recombinantes fueron verificados por sensibilidad a estreptomicina y por *Southern blot* (Figura 5.26B).

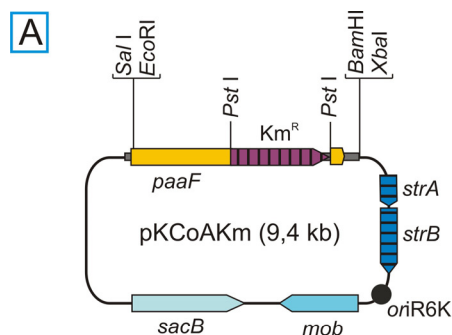
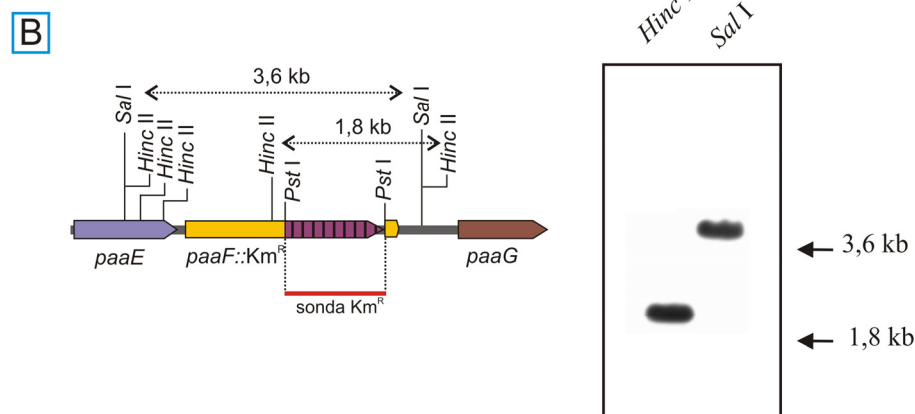


FIGURA 5.26. Construcción del mutante *Pseudomonas* sp. Y2T2 *paaF*::Km. **A.** Esquema del plásmido pKCoAKm derivado del vector suicida pKNG101 y que porta el gen *paaF* interrumpido por el casete de Km^R (Bartolomé-Martín, 2006). **B.** Comprobación del mutante Y2T2 *paaF*::Km. El esquema de la izquierda representa el entorno genético del gen *paaF* con la inserción del casete de Km^R en el mutante. La autorradiografía muestra los resultados del *Southern blot* realizado con la sonda del casete de Km^R y el DNA genómico de *Pseudomonas* sp. Y2T2 *paaF*::Km digerido con *HincII* y *SalI*.



1.2. Construcción de la estirpe *Pseudomonas* sp. Y2T2 *paaF2*::Km.

La construcción de la estirpe *Pseudomonas* sp. Y2T2 *paaF2*::Km (en adelante abreviado como Y2T2 *paaF2*::Km) se logró mediante transferencia del plásmido pKF2Km por conjugación desde la estirpe donadora *E. coli* S17.1 λ pir a la receptora *Pseudomonas* sp. Y2T2 y selección en placas de LB con Cm, Tc, Km y sacarosa. Los dobles recombinantes fueron verificados por sensibilidad a estreptomicina y por *Southern blot*. La obtención del plásmido suicida pKF2Km se encuentra esquematizada en la Figura 5.27.

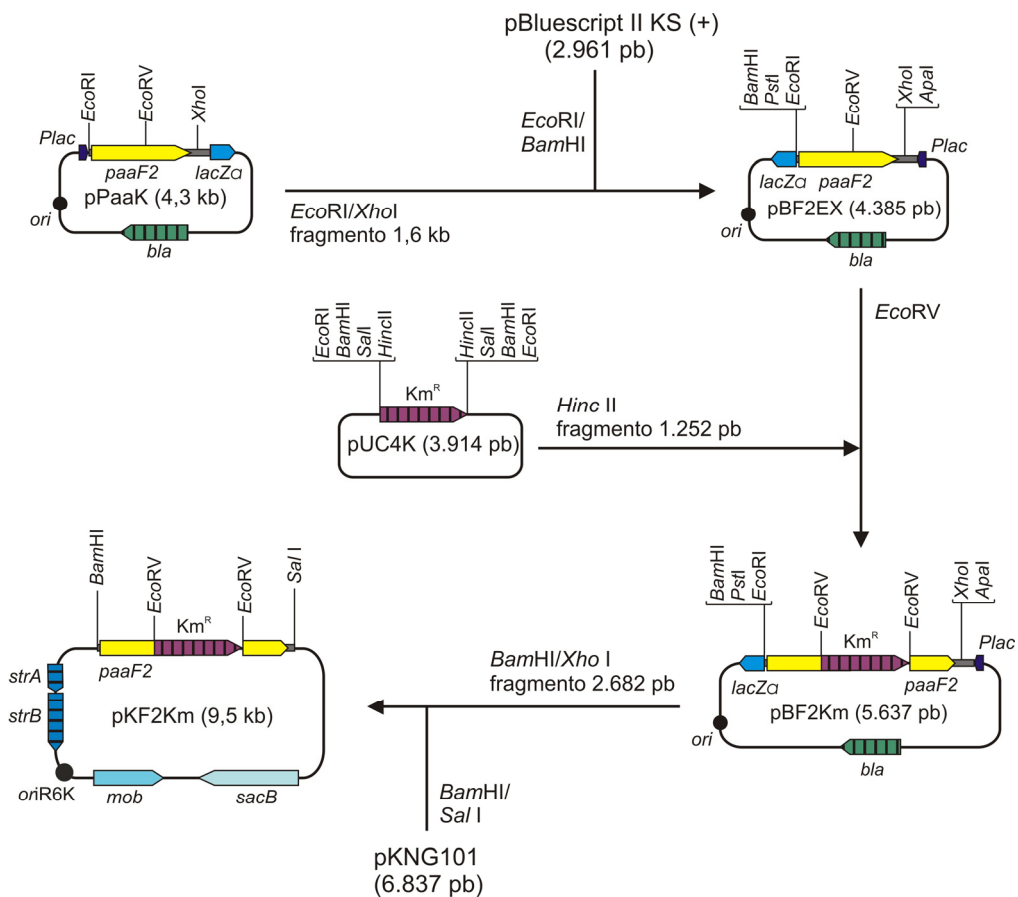


FIGURA 5.27. Construcción del plásmido pKF2Km. Sucesivas etapas en la construcción de pKF2Km a partir del gen *paaF2* clonado en el plásmido pPaaK (Tabla 4.2, Materiales y métodos) mediante su truncamiento con un casete de Km^R y clonaje final en el vector pKNG101 (Tabla 4.2, Materiales y métodos). En primer lugar se obtuvo el fragmento de 1,6 kb que porta el gen *paaF2* por digestión del plásmido pPaaK con *EcoRI* y *XhoI*; este fragmento fue clonado en los mismos sitios de pBluescript II KS (+) (Tabla 4.2, Materiales y métodos) dando lugar al plásmido pBF2EX. La inserción del casete de Km^R procedente de la digestión de pUC4K con *HincII* en el sitio *EcoRV* de pBF2EX dio lugar a pBF2Km. La digestión de este último plásmido con *BamHI* y *XhoI*, aislamiento del fragmento de 2.682 pb que contiene el gen *paaF2* truncado y su posterior clonaje en pKNG101 previamente digerido con *BamHI* y *SalI* permitió la obtención del plásmido suicida pKF2Km. Este plásmido se transfirió por conjugación desde *E. coli* S17.1 λ pir a *Pseudomonas* sp. Y2T2 para conseguir la estirpe mutante *Pseudomonas* sp. Y2T2 *paaF2::Km*.

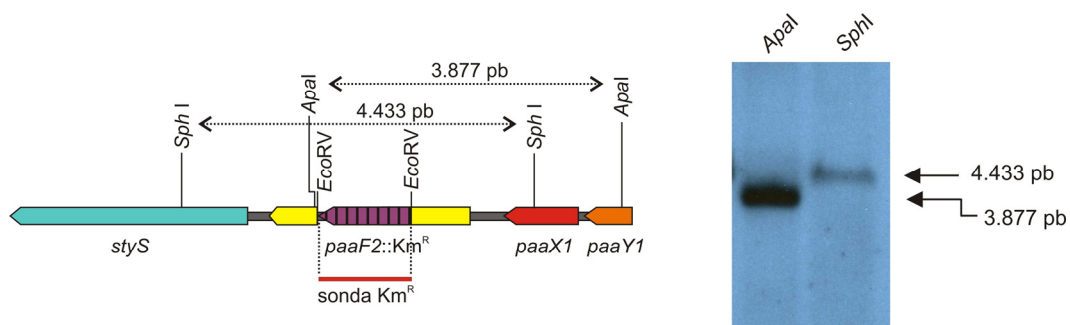


FIGURA 5.28. Comprobación del mutante *Pseudomonas* sp. Y2 *paaF2::Km* mediante *Southern blot*. El esquema de la izquierda representa el entorno genético del gen *paaF2* con la inserción del casete de Km^R en el mutante. Se señala en él el fragmento de DNA que se usó como sonda. En la autorradiografía, se muestran los resultados obtenidos con el DNA genómico de *Pseudomonas* sp. Y2T2 *paaF2::Km* digerido con *Apal I* y *Sph I*.

1.3. Crecimiento de Y2T2 y de los mutantes derivados Y2T2 *paaF*::Km e Y2T2 *paaF2*::Km en LB, AFA y estireno.

La capacidad de crecimiento de los mutantes construidos y la de su estirpe parental Y2T2 se comprobó en placas de LB y de medio mínimo M9 suplementado bien con AFA al 0,2%, o bien con estireno suministrado en fase gaseosa (Figura 5.29). Tanto la cepa Y2T2, como el mutante Y2T2 *paaF2*::Km, que sólo contiene la copia del gen *paaF* en su cromosoma, son capaces de crecer en los tres medios. Sin embargo, Y2T2 *paaF*::Km, que sólo mantiene la copia *paaF2* intacta, crece en LB y en M9 en presencia de estireno pero no en M9 suplementado con AFA.



FIGURA 5.29. Cultivos en placa de las estirpes Y2T2 (3), Y2T2 *paaF2*::Km (2) e Y2T2 *paaF*::Km (1) en LB, en medio mínimo M9 en presencia de estireno, o en M9 en presencia de AFA.

Estos resultados sugirieron la posibilidad de que la expresión de la PA-CoA ligasa codificada por *paaF2* sólo tuviera lugar en presencia de estireno. Puesto que el gen *paaF2* se encuentra situado delante y adyacente al operón *stySR*, cabría la posibilidad de que la transcripción a partir del promotor de *paaF2*, denominado P_{paaF2} , se activara en presencia de estireno, tal vez por el mismo sistema que activa a los genes *sty* catabólicos: el sistema bicomponente StyS-StyR. La confirmación de esta hipótesis fue la que nos movió a desarrollar los trabajos que se incluyen a continuación.

2. La región promotora P_{paaF2} .

2.1. Análisis *in silico* de la región P_{paaF2} y localización del sitio STY4.

La región promotora P_{paaF2} abarca 426 pb que se extienden desde el codón de terminación de *paaX1* hasta el ATG de inicio del gen *paaF2*, previamente localizado mediante el uso de los programas informáticos Artemis y MapDraw (Velasco y col., 1998; Alonso y col., 2003a). En esta región se han localizado dos motivos potenciales y solapantes para la unión del factor σ^{70} de la RNA polimerasa: una secuencia -35 / -10 canónica no del todo mala (GTGTCT -18 pb- CAGAAT, siendo el consenso TTGACA -17 pb- TATAAT) y otra que presenta homología con una secuencia promotora -10 extendida (TGATACCAG, frente al consenso TGnTAATAT) (Figura A2).

Este análisis de la región P_{paaF2} permitió localizar, 299 pb antes del ATG de inicio, una secuencia similar a los motivos de unión de StyR previamente descritos para los promotores P_{styA} de *Pseudomonas* sp. Y2 (Figura A.1) y *P. fluorescens* ST (Leoni y col., 2005), que fue denominada STY4. En la figura 5.30 se puede observar una comparación de las secuencias de los sitios STY1, STY2 y STY3 de los promotores P_{styA} de *Pseudomonas* sp. Y2 y *P. fluorescens* ST y del sitio STY4 de P_{paaF2} .

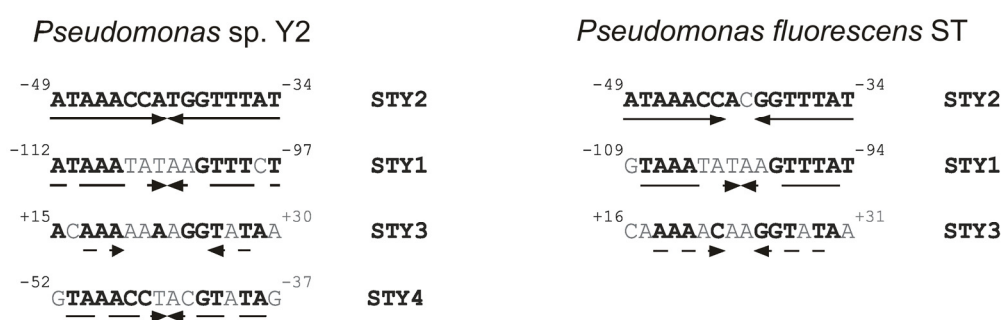


FIGURA 5.30. Posible sitio de unión (STY4) de StyR en la región P_{paaF2} . Secuencia de los sitios de alta (STY2), media (STY1) y baja afinidad (STY3) de unión de StyR encontrados en la región P_{styA} de *Pseudomonas* sp. Y2 (Figura A.1) y *P. fluorescens* ST (Leoni y col., 2005) y secuencia del sitio STY4 de P_{paaF2} . Las flechas indican las repeticiones invertidas. Las posiciones conservadas respecto a la secuencia STY2 se indican en negrita. Los números indican las posiciones de los extremos de las cajas STY1, STY2, STY3 y STY4, relativas a los sitios de inicio de la transcripción de los correspondientes promotores.

2.2. Determinación del punto de inicio de la transcripción del gen $paaF2$.

Análisis informáticos previos con los programas NNPP2.2 y BPRM (Bartolomé-Martín, 2006) habían localizado tres posibles sitios +1 de inicio de la transcripción de $paaF2$ que se encuentran a una distancia de 193, 217 y 268 pb del ATG de inicio de $paaF2$, respectivamente.

La determinación del punto de inicio de la transcripción del gen $paaF2$ se llevó a cabo mediante extensión del cebador (apartado 7.3 de Materiales y métodos). A partir de cultivos de *Pseudomonas* sp. Y2, *E. coli* CC118 λ pir [pUE14] (portador de un inserto que contiene la región P_{paaF2} , junto con otros genes sty y paa ; Tabla 4.2, Materiales y métodos; Figura 5.14) y *E. coli* CC118 λ pir [pKNG101] (utilizado como control negativo) se preparó el RNA total que se utilizó como molde en la reacción (apartado 7.3 de Materiales y métodos), para la que se usó el oligonucleótido pe-150 como cebador (Tabla 4.3, Materiales y métodos; Figura A.2). El producto de la extensión fue analizado en un gel de acrilamida en condiciones desnaturalizantes, y su tamaño se comparó frente a la secuencia de la región P_{paaF2} obtenida con pe-150 como cebador y el plásmido pTE-PF2 como molde (Tabla 4.2, Materiales y métodos; Figura 5.34). El resultado se muestra en la figura 5.31.

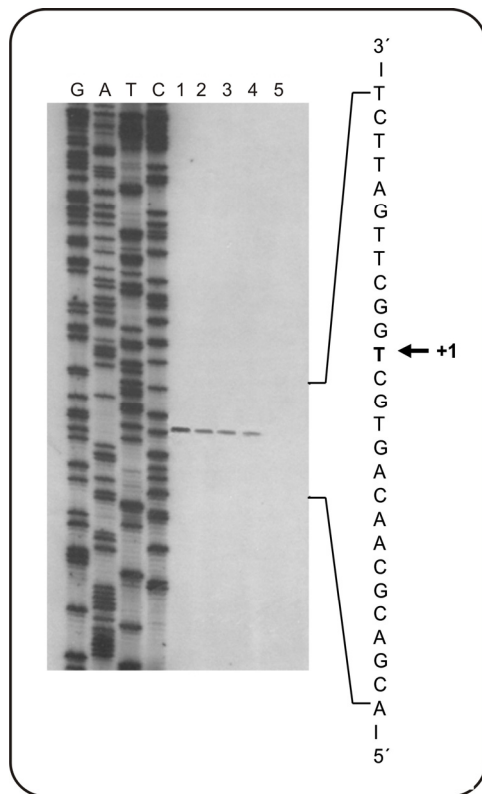


FIGURA 5.31. Determinación del sitio +1 de la transcripción de *paaF2*. Resultado de la reacción de extensión del cebador sobre el RNA mensajero de la región *P_{paaF2}* en cultivos de *Pseudomonas* sp. Y2 crecidos en M9 y estireno (calle 1, 20 mg de RNA; calle 2, 5 mg de RNA), cultivos de *E. coli* CC118 λ pir [pUE14] crecidos en M9 con glicerol e inducidos con estireno (calle 3, 15 mg de RNA; calle 4, 5 mg de RNA) y de *E. coli* CC118 λ pir [pKNG101] (calle 5, 5 mg de RNA; control negativo). El tamaño del producto extendido se determinó por comparación con la secuencia del DNA de la región *P_{paaF2}* (G, A, T, C) usando el plásmido pTE-PF2 (Tabla 4.2, Materiales y métodos) como molde. Las reacciones de extensión del cebador y de secuenciación se llevaron a cabo con el oligonucleótido pe-150 (Figura A.2). A la derecha y en vertical se muestra la secuencia de la región que flanquea al sitio de inicio de la transcripción (+1) de *paaF2*.

3. Papel de la proteína StyR en la regulación del promotor *P_{paaF2}* .

Para comprobar si el sitio STY4 localizado era un auténtico lugar de unión para StyR y si esta proteína estaba implicada en la regulación de la transcripción de *P_{paaF2}* se han realizado la serie de ensayos *in vitro* e *in vivo* que se describe a continuación.

3.1. Estudio de la unión de StyR a *P_{paaF2}*.

3.1.1. Preparación de sondas.

En los ensayos de retardo de banda electroforética se utilizaron varias sondas. Las sondas E1B1 y E2B1, derivadas de la región *P_{styA}* (apartado 2.3 de Resultados; Figura 5.3), se han empleado con el fin de comparar la afinidad de His₆-StyR fosforilada por las regiones *P_{styA}* y *P_{paaF2}*. La sonda E1B1 se extiende entre las posiciones -153 y +72 de *P_{styA}* y contiene los tres sitios STY1, STY2 y STY3 de unión a StyR, mientras que la sonda E2B1 abarca la región de *P_{styA}* comprendida entre las posiciones -82 y +72 y sólo tiene los sitios STY2 y STY3. Además, se diseñó la sonda F2 (Figura 5.33B), de 294 pb, que se extiende entre las posiciones -152 y +142 y contiene la mayor parte de la región *P_{paaF2}* y el inicio de *paaF2*. La sonda F2 se amplificó por PCR utilizando el plásmido pISm7.0R (Tabla 4.2, Materiales y métodos) como molde y los oligonucleótidos PF2-5 y F2B(2) (Tabla 4.3, Materiales y métodos; Figura A.2) como cebadores. El fragmento obtenido se digirió

con *EcoRI* y *BamHI* y se marcó radiactivamente con [α^{32} -P]dATP utilizando el fragmento *Klenow* de la DNA polimerasa I (apartado 13.1 de Materiales y métodos).

De forma paralela se obtuvo la sonda F2S, de idéntica longitud a la anterior, pero que tiene el sitio STY4 mutado: se ha alterado su secuencia aunque manteniendo constante la proporción de las distintas bases en la misma. Esto se llevó a cabo por mutagénesis dirigida mediante el empleo de los oligonucleótidos mutagénicos S (R) y S (F) (Tabla 4.3, Materiales y métodos), que portan la secuencia STY4 alterada (Figura 5.32). Así, se amplificó un fragmento de 128 pb empleando pUE14 (Tabla 4.2, Materiales y métodos) como molde y los oligonucleótidos PF2-5 y S (R), y otro fragmento de 199 pb utilizando el mismo DNA molde y los oligonucleótidos S (F) y F2B(2). Ambos fragmentos amplificados se mezclaron en una proporción 1:1, y se utilizó dicha mezcla como molde en una nueva reacción de PCR con los oligonucleótidos PF2-5 y F2B(2), obteniéndose así la sonda F2S, cuya secuencia fue comprobada por secuenciación. Al igual que en el caso anterior, el fragmento F2S se digirió con *EcoRI* y *BamHI* y se marcó radiactivamente con [α^{32} -P]dATP utilizando el fragmento *Klenow* de la DNA polimerasa I (apartado 13.1 de Materiales y métodos).



FIGURA 5.32. Mutagénesis dirigida del sitio STY4 de la región P_{paaF2} . La secuencia de los oligonucleótidos S (F) y S (R), diseñados con el fin de mutagenizar el motivo STY4 (señalado en azul), se muestran en minúsculas. Las correspondientes parejas de oligonucleótidos PF2-5 y S (R), por un lado, y S (F) y F2B(2), por otro lado, se representan mediante flechas naranjas y verdes, respectivamente.

3.1.2. Ensayos de retardo en gel con His₆-StyR.

Los ensayos de unión proteína-DNA se llevaron a cabo mediante incubación de las sondas anteriores con distintas cantidades de His₆-StyR purificada (apartado 12.1 de Materiales y métodos) y previamente fosforilada, según lo especificado en el apartado 13.2 de Materiales y métodos. Las mezclas de reacción se analizaron por electroforesis en geles nativos de poliacrilamida al 10% y la migración de los distintos complejos se visualizó mediante autorradiografía (Figura 5.33).

His₆-StyR-P es capaz de retardar a la sonda F2 de una forma dependiente de la concentración de proteína, pero no a la sonda F2S, lo que confirma que STY4 es el sitio de unión de StyR a la región P_{paaF2} .

Al comparar los resultados de los ensayos llevados a cabo con las sondas de la región P_{styA} (Figura 5.33C) con las de la región P_{paaF2} (Figura 5.33D), se puede apreciar un patrón de retardo similar en el caso de las sondas E2B1 y de F2, mientras que la sonda E1B1 parece tener más

afinidad por StyR, ya que resulta retardada a la mitad de concentración de His₆-StyR-P. El diferente número de sitios STY podría ser la causa de esta diferencia en la afinidad de la proteína.

En ensayos de retardo de las sondas F2 y E2B1 con His₆-StyR-P en presencia de concentraciones crecientes de la sonda F2 sin marcar (Figura 5.33 E y F) se observa cómo la sonda sin marcar compite con las sondas F2 y E2B1 marcadas de una forma parecida, indicando de nuevo que la afinidad de His₆-StyR-P por ambas sondas es muy similar. En cambio, concentraciones crecientes de la sonda F2S no marcada no eliminan el retardo de las otras (Figura 5.33 E y F), confirmando que la secuencia STY4 es el sitio que dirige la unión específica de StyR.

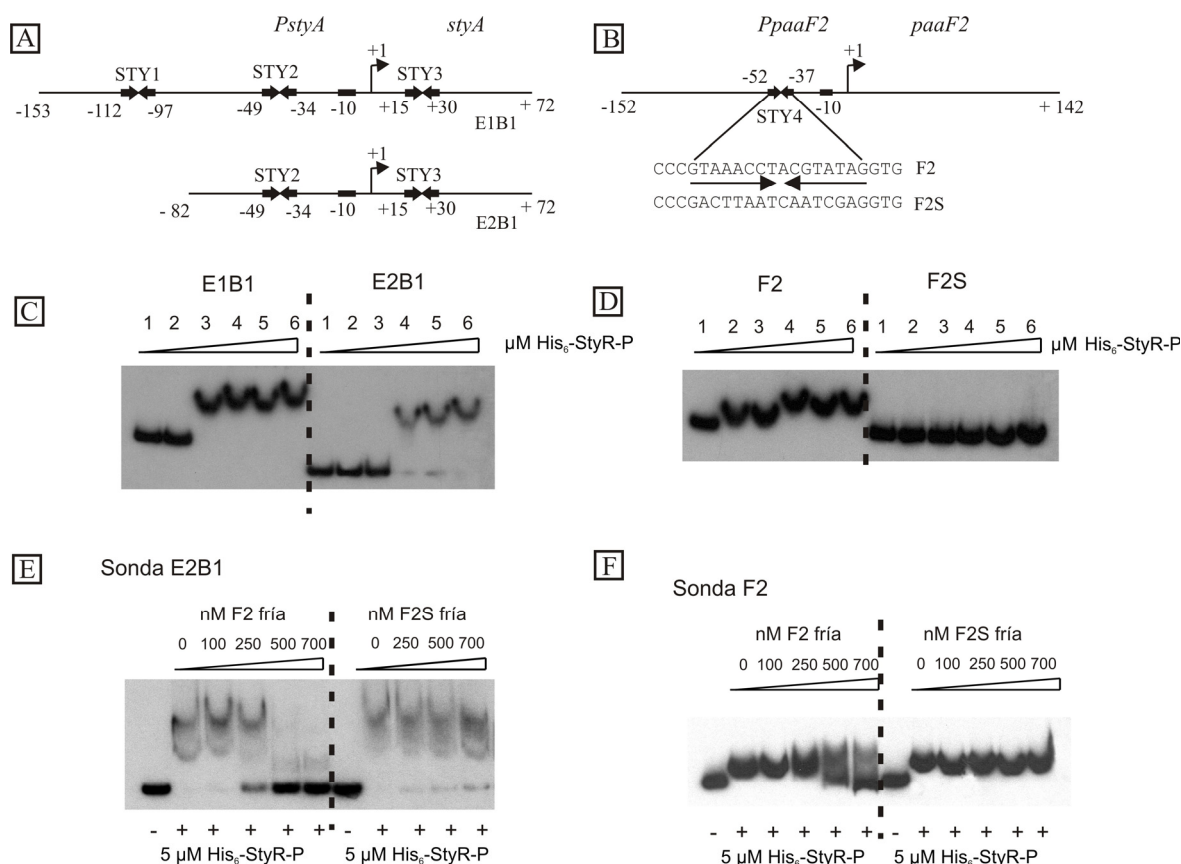


FIGURA 5.33. Ensayos de retardo de la banda electroforética de las sondas derivadas de la región *P_{paaF2}* y de la región *P_{styA}* por su unión con la proteína His₆-StyR fosforilada. A. Esquemas de las sondas derivadas de la región *P_{styA}*: E1B1 y E2B1. La sonda E1B1 contiene los tres sitios de unión de StyR, mientras que la E2B1 carece del sitio STY1. **B.** Esquema de las sondas derivadas de la región *P_{paaF2}*: F2 y F2S. Ambas sondas tienen la misma longitud, pero la sonda F2S acumula mutaciones que hacen desaparecer el sitio STY4 (señalado con dos flechas invertidas en la secuencia de la sonda F2). **C.** Ensayos de retardo de las sondas E1B1 y E2B1 por concentraciones crecientes de His₆-StyR-P. Calles 1 a 6: His₆-StyR-P 0, 1, 2,5, 5, 7,5 y 10 μM. **D.** Ensayos de retardo de las sondas F2 y F2S por concentraciones crecientes de His₆-StyR-P. Calles 1 a 6: His₆-StyR-P 0, 1, 2,5, 5, 7,5 y 10 μM. **E.** Ensayos de competición por la unión a His₆-StyR-P (5 μM) de la sonda marcada E2B1 (0,1 nM) y concentraciones crecientes de sonda sin marcar F2 (0, 100, 250, 500 y 700 nM) ó F2S (0, 100, 250, 500 y 700 nM). **F.** Ensayos de competición por la unión a His₆-StyR-P (5 μM) de la sonda marcada F2 (0,1 nM) y concentraciones crecientes de sonda fría F2 (0, 100, 250, 500 y 700 nM) ó F2S (0, 100, 250, 500 y 700 nM).

3.2. Estudio *in vitro* del papel de StyR en la transcripción a partir de P_{paaF2} .

Para los ensayos de transcripción *in vitro* a partir de P_{paaF2} se empleó como DNA molde el plásmido pTE-PF2 (Figura 5.34). El fragmento que contiene la región promotora P_{paaF2} entera y el inicio de $paaF2$ fue amplificado por PCR empleando como molde el plásmido pUE14 (Tabla 4.2, Materiales y métodos) y los oligonucleótidos PF2E y F2B (Tabla 4.3, Materiales y métodos; Figura A.2) como cebadores, purificado, digerido con *EcoRI* y *BamHI* y finalmente clonado en los mismos sitios de pTE103, obteniéndose así pTE-PF2. (Figura 5.34). Los ensayos de transcripción *in vitro* se realizaron según lo descrito en el apartado 7.2 de Materiales y métodos. Como control positivo se llevaron a cabo de forma paralela los mismos ensayos con el plásmido pTE-E1B1 (Figura 5.4). Los resultados de estos ensayos (Figura 5.34) muestran claramente el papel activador de StyR fosforilada sobre la transcripción *in vitro* a partir de P_{paaF2} , al igual que en el caso de P_{styA} .

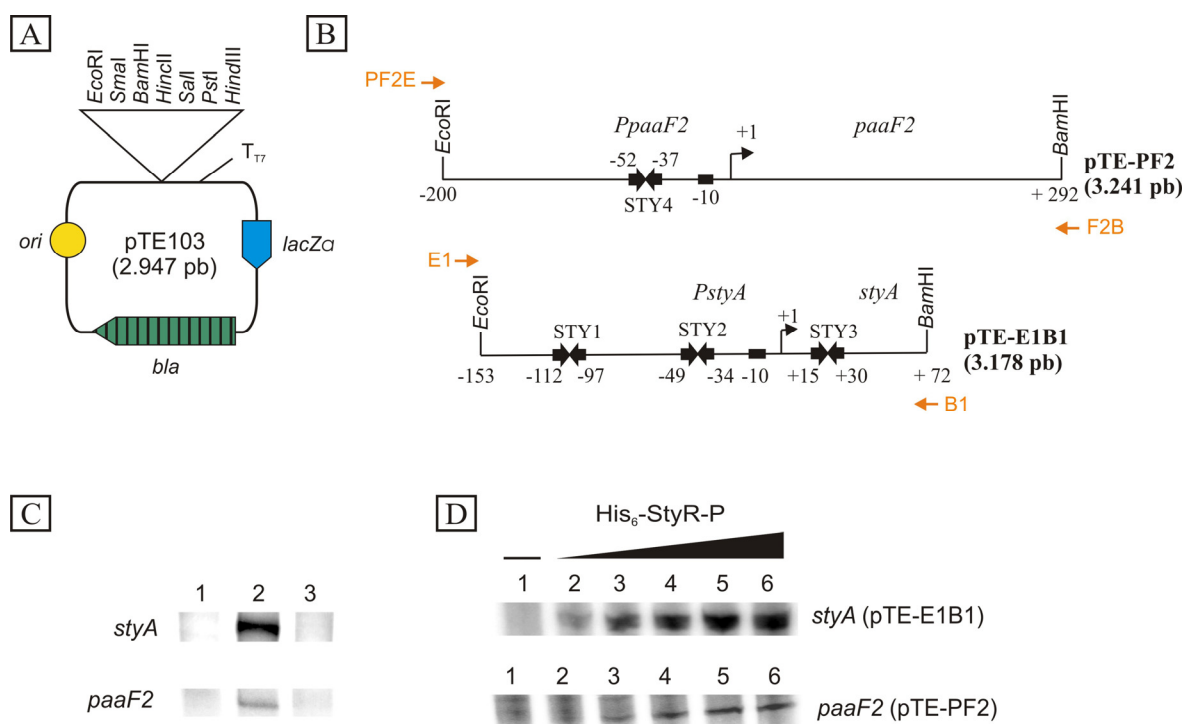


FIGURA 5.34. Plásmidos pTE-PF2 y pTE-E1B1 y resultados de la transcripción *in vitro* a partir de P_{styA} y P_{paaF2} . **A.** Esquema del plásmido pTE103 empleado como vector para construir los plásmidos pTE-PF2 y pTE-E1B1 (Figura 5.4). **B.** Detalle de los fragmentos clonados en los sitios *EcoRI* y *BamHI* de pTE103 para dar lugar a los plásmidos pTE-PF2 y pTE-E1B1, respectivamente. Los sitios +1 de inicio de la transcripción de $paaF2$ y $styA$ aparecen indicados con una flecha. La caja -10 extendida se muestra con un rectángulo. Las flechas invertidas representan los distintos sitios STY de unión de StyR. Los números hacen referencia a las posiciones de los extremos de las sondas y de las cajas STY respecto al sitio de inicio de la transcripción. En naranja se han señalado los oligonucleótidos empleados para amplificar ambos fragmentos. **C** y **D.** Transcripción *in vitro* a partir de P_{styA} y P_{paaF2} . Los ensayos se llevaron a cabo empleando los plásmidos pTE-E1B1 o pTE-PF2 como molde (10 nM), σ^{70} -RNA polimerasa de *P. putida* (25 nM) y distintas cantidades de His_6 -StyR. **C.** Bandas electroforéticas de los transcritos de $styA$ y $paaF2$ obtenidas tras realizar el ensayo con los plásmidos pTE-E1B1 y pTE-PF2 en ausencia de His_6 -StyR (calle 1) o en presencia de His_6 -StyR 10 μ M fosforilada (calle 2) y His_6 -StyR 10 μ M sin fosforilar (calle 3). **D.** Bandas electroforéticas de los transcritos de $styA$ y $paaF2$ obtenidas tras realizar el ensayo con los plásmidos pTE-E1B1 y pTE-PF2 y cantidades crecientes de His_6 -StyR fosforilada 0, 0,5, 1, 2, 4 y 8 μ M (calles 1 a 6).

3.3. Estudio *in vivo* del papel de StyR en la transcripción a partir de P_{paaF2} mediante sistemas testigo en multicopia.

Con el fin de determinar la importancia de StyR en la activación transcripcional *in vivo* a partir de P_{paaF2} en presencia de estireno se han construido diferentes sistemas testigo basados en la fusión de distintos fragmentos del promotor P_{paaF2} al gen *lacZ*. La figura A.2 (Apéndice) muestra la secuencia de la región P_{paaF2} -*paaF2* y los distintos oligonucleótidos empleados para la obtención de dichos fragmentos mediante PCR.

3.3.1. Construcción de los plásmidos testigo pRWF2A, pRWF2B y pRWF2C.

A partir del vector pRW2A (Tabla 4.2, Materiales y métodos) se han construido los plásmidos pRWF2A, pRWF2B y pRWF2C, que portan distintos fragmentos de la región P_{paaF2} -*paaF2* fusionados transcripcionalmente al gen testigo *lacZ*. Los fragmentos fueron amplificados por PCR empleando el plásmido pUE14 (Tabla 4.2, Materiales y métodos) como DNA molde y los oligonucleótidos correspondientes (Figura 5.35A), digeridos con *EcoRI* y *BamHI* y clonados en los mismos sitios de pRW2A. Así, pRWF2A lleva un fragmento que abarca desde la posición -200 a la +292 y que fue amplificado empleando los oligonucleótidos PF2E y F2B (Tabla 4.3, Materiales y métodos; Figura A.2). El plásmido pRWF2B lleva un fragmento que se extiende entre los sitios -2 y +292 y fue amplificado con los oligonucleótidos PF2Eco1+ y F2B (Tabla 4.3, Materiales y métodos; Figura A.2). Por último, pRWF2C porta la región comprendida entre los sitios -200 y +10, obtenida por amplificación con los oligonucleótidos PF2E y F2B10+ (Tabla 4.3, Materiales y métodos; Figura A.2).

Los tres plásmidos testigo, así como el plásmido control pRW2A, fueron introducidos en *Pseudomonas* sp. Y2 por conjugación desde *E. coli* S17.1 λ pir y posterior selección en placas de LB con Cm y Tc.

3.3.2. Ensayos de actividad β -galactosidasa.

Los cultivos de *Pseudomonas* sp. Y2 portadores de los distintos plásmidos se crecieron en medio M9 suplementado con glicerol y con estireno en fase gaseosa. Tras 9 horas de inducción con estireno se midió en ellos la actividad β -galactosidasa (Figura 5.35B).

El plásmido pRWF2A, que lleva la región comprendida entre las posiciones -200 y +292 de P_{paaF2} -*paaF2*, presenta los niveles de actividad más elevados. Sin embargo pRWF2B, que lleva la región entre los sitios -2 y +292 de *paaF2*, y por tanto carece del sitio STY4 y de las posibles regiones promotoras -10 extendida y -10/-35 canónica de P_{paaF2} , tan sólo presenta niveles de actividad basal comparables a los del vector control pRW2A. Estos resultados aportan un dato más acerca de la capacidad activadora de StyR sobre el promotor P_{paaF2} . Es llamativo que el plásmido pRWF2C, que porta el gen *lacZ* bajo el control de la región que se extiende entre las posiciones -

200 y +10 de P_{paaF2} , presenta niveles de actividad de aproximadamente la mitad de los de pRWF2A. Estos resultados se comentarán más adelante en el apartado de discusión.

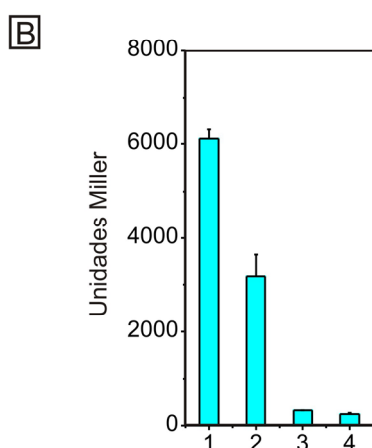
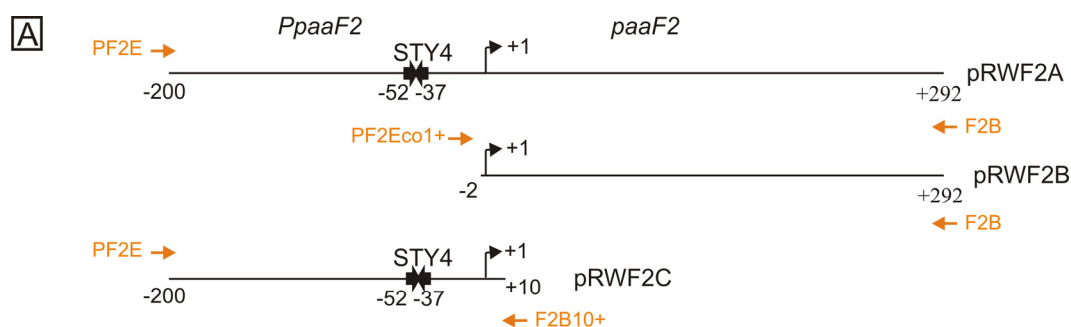


FIGURA 5.35. Respuesta a la inducción con estireno de las estirpes testigo Y2 [pRWF2A], Y2 [pRWF2B] e Y2 [pRWF2C]. A. Esquema de los fragmentos de la región P_{paaF2} - $paaF2$ clonados en los sitios *EcoRI* y *BamHI* de pRW2A para dar lugar a los plásmidos pRWF2A, pRWF2B y pRWF2C. El sitio +1 de inicio de la transcripción de $paaF2$ aparece indicado con una flecha. Las flechas invertidas representan el sitio STY4 de unión de StyR. En naranja se han señalado los oligonucleótidos empleados para amplificar los distintos fragmentos. B. Medida de la actividad β-galactosidasa detectada en los cultivos de las cepas de *Pseudomonas* sp. Y2 que portan los plásmidos pRWF2A (calle 1), pRWF2C (calle 2), pRWF2B (calle 3) y pRW2A (control; calle 4) tras 9 horas de inducción con estireno en fase gaseosa. Los resultados corresponden a la media de tres experimentos independientes. Las barras de error representan el error estándar.

3.4. Estudio *in vivo* del papel de StyR en la transcripción a partir de P_{paaF2} mediante sistemas testigo en monocopia.

3.4.1. Construcción de las estirpes testigo *Pseudomonas* sp. Y2 F2L , Y2 F2SL e Y2 F2L $\Delta styR::Gm$.

Para profundizar en el papel de StyR en la regulación de la transcripción a partir de P_{paaF2} *in vivo* se han seguido dos estrategias complementarias que implicaron la construcción de tres estirpes testigo derivadas de *Pseudomonas* sp. Y2. En primer lugar se obtuvo la estirpe Y2 F2L que porta la fusión traduccional P_{paaF2} -*lacZ* insertada en monocopia en su cromosoma, de modo que la actividad del promotor puede determinarse mediante la realización de ensayos de actividad β-galactosidasa. A partir de esta estirpe se construyó un mutante en *styR*, denominado Y2 F2L $\Delta styR::Gm$, por sustitución de una porción interna de este gen por un casete de Gm^R (Figura 5.37), de modo que carece de proteína StyR funcional. Por último se obtuvo Y2 F2SL, idéntica a la Y2 F2L pero que

presenta la región STY4 de P_{paaF2} mutada, de manera que esta estirpe tiene StyR funcional, pero presenta alterada la secuencia de unión de esta proteína al DNA. Las distintas etapas seguidas en el proceso de construcción de estas estirpes testigo se detallan a continuación.

a) Construcción de *Pseudomonas* sp. Y2 F2L

La construcción de la estirpe testigo *Pseudomonas* sp. Y2 F2L, portadora de la fusión P_{paaF2} -*lacZ* integrada en monocopia y al azar en su cromosoma, se logró a través de las etapas que aparecen detalladas en la Figura 5.36. Entre los clones seleccionados en Cm y Km, se escogieron 20 para su análisis posterior. Todos resultaron sensibles a piperacilina (lo que permitió descartar una integración a través de recombinación homóloga simple) y todos eran capaces de crecer en medio mínimo M9 en presencia de estireno, AFA ó 2-feniletanol (demostrando que la inserción del minitransposón no había truncado ningún gen importante para el crecimiento o el catabolismo de esos compuestos).

Finalmente, los clones seleccionados se estriaron en placas de M9 con glicerol y X-Gal en ausencia o presencia de estireno en fase gaseosa, mostrando una pigmentación normal en las primeras y un fenotipo azul en presencia de estireno, lo que puso de manifiesto la activación del promotor P_{paaF2} . De los 20 clones positivos se seleccionaron 5 al azar y se crecieron en medio M9 con glicerol hasta alcanzar una DO_{600nm} de 0,4; en ese punto los cultivos se repartieron en 2 matraces, induciendo uno de ellos con estireno suministrado en fase gaseosa y dejando el otro sin inducir. Los ensayos de actividad β -galactosidasa demostraron que el sistema P_{paaF2} -*lacZ* presentaba actividad en presencia de estireno, pero niveles muy bajos en ausencia de inducción (niveles basales). Además, los 5 clones presentaban niveles de actividad β -galactosidasa muy similares. Se seleccionó finalmente uno de ellos que se denominó *Pseudomonas* sp. Y2 F2L y con el que se realizaron los ensayos que se detallan más adelante.

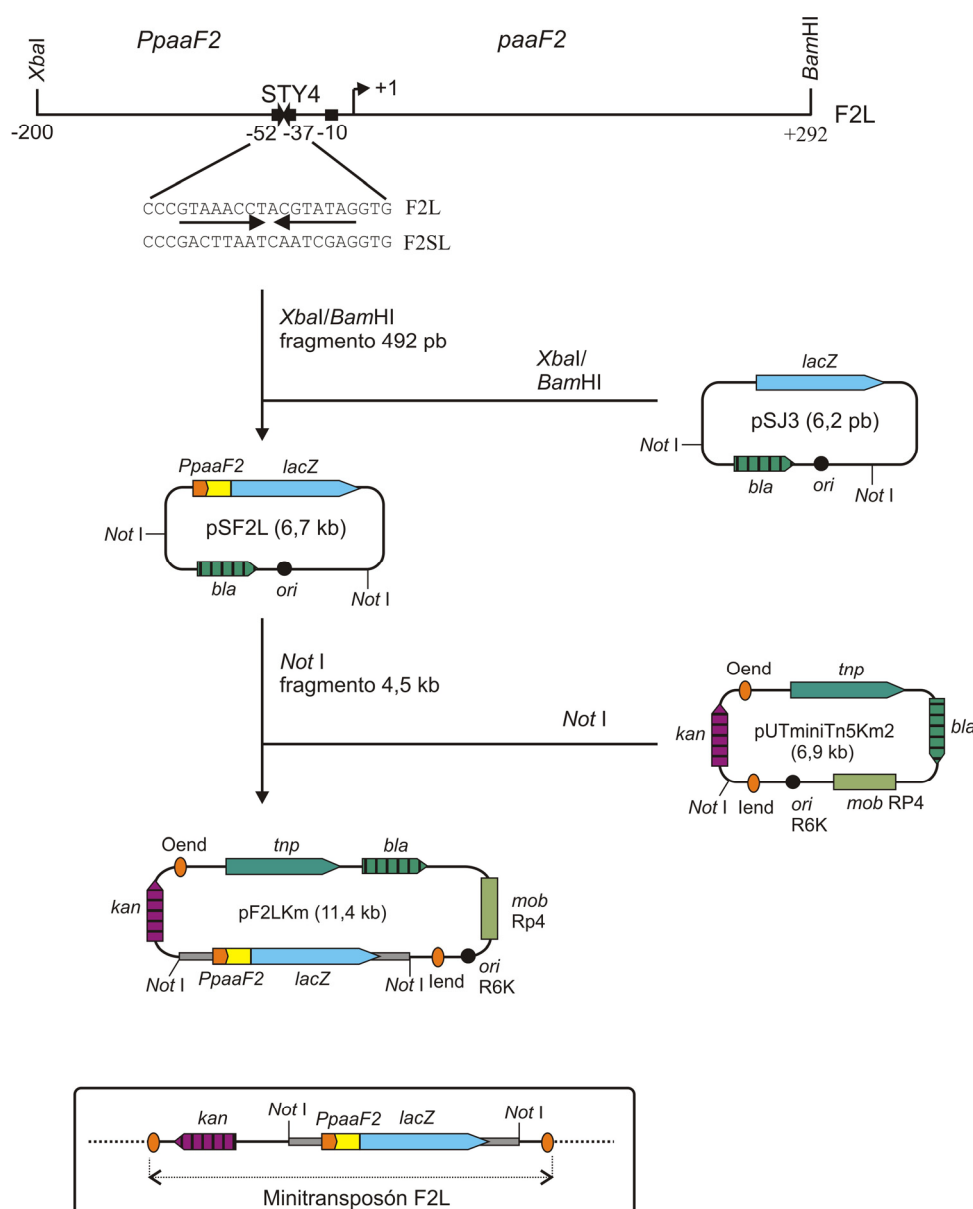


FIGURA 5.36. Construcción del minitransposón pF2LKm y de la estirpe testigo Y2F2L. Esquema de las distintas etapas de la construcción de pF2LKm, plásmido transferible capaz de integrar al azar el mini-transposón F2L (recuadrado en la parte baja de la figura) en el cromosoma de la célula huésped. La secuencia comprendida entre las posiciones -200 y +292 de la región *PpaaF2-paaF2* se amplificó mediante PCR empleando el plásmido pUE14 (Tabla 4.2, Materiales y métodos) como molde y los oligonucleótidos PF2X y F2B como cebadores (Tabla 4.3, Materiales y métodos; Figura A.2). El producto amplificado se digirió con *XbaI* y *BamHI* y se clonó en los mismos sitios del vector de fusión traduccional pSJ3 (Tabla 4.2, Materiales y métodos), dando lugar al plásmido pSF2L que expresa una proteína híbrida que contiene los 9 primeros residuos de PaaF2 fusionados a *lacZ*. El fragmento *NotI* de 4,5 kb de pSF2L que contiene la fusión *PpaaF2-lacZ* fue clonado en el sitio *NotI* de pUTminiTn5-Km2 (Tabla 4.2, Materiales y métodos), obteniéndose así el plásmido pF2LKm. Este plásmido posee un origen de replicación R6K dependiente de la proteína π del fago λ , por lo que sólo es replicativo en estirpes que expresen el gen *pir* que codifica esta proteína. Además, tiene una región de movilización RP4, que permite su transferencia mediante conjugación desde estirpes F+, y el gen *tnp*, que codifica una transposasa responsable de la integración del mini-transposón que contiene (miniTn5-Km2) en el cromosoma de la célula huésped. El plásmido pF2LKm fue transferido por conjugación desde *E. coli* S17.1 λ *pir* a *Pseudomonas* sp. Y2 y las bacterias que recibieron el mini-transposón (portando la fusión *PpaaF2-lacZ*) se seleccionaron en placas de LB con Cm y Km. Uno de esos clones recibió el nombre de Y2 F2L. La estirpe Y2 F2SL se consiguió por un camino paralelo a partir del casete testigo F2SL, idéntico al anterior pero con la secuencia *STY4* mutada, tal y como se muestra en la parte superior de la figura. La construcción del casete se llevó a cabo de idéntica forma, a través de la obtención de los plásmidos pSF2L y pF2SLKm, respectivamente.

b) Construcción de *Pseudomonas* sp. Y2 F2SL

De forma paralela a la estirpe F2L se construyó el sistema testigo F2SL, que porta la fusión P_{paaF2S} -*lacZ* en el mini-transposón, pero con el motivo STY4 de la región P_{paaF2} alterado. El fragmento de 492 pb que se extiende entre las posiciones -200 y +292 de la región P_{paaF2} - $paaF2$ y que tiene alterada la secuencia STY4 se obtuvo por mutagénesis dirigida utilizando pUE14 (Tabla 4.2, Materiales y métodos; Figura 5.14) como molde y los oligonucleótidos PF2X, F2B, S (R) y S (F) (Tabla 4.3, Materiales y métodos); estos dos últimos incorporan el motivo STY4 con la secuencia alterada, pero respetando la misma proporción de las bases. El procedimiento de mutagénesis dirigida se llevó a cabo de forma idéntica al empleado para obtener la sonda F2S utilizada en los ensayos de retardo en gel (Figura 5.32). Así, se amplificó un fragmento de 170 pb empleando pUE14 como molde y los oligonucleótidos PF2X y S (R), y otro fragmento de 199 pb utilizando el mismo DNA molde y los oligonucleótidos S (F) y F2B(2). Ambos fragmentos amplificados se mezclaron en una proporción 1:1, y se utilizó dicha mezcla como molde en una nueva reacción de PCR con los oligonucleótidos PF2X y F2B(2). El fragmento obtenido fue digerido con *Xba*I y *Bam*HI y clonado en los mismos sitios de pSJ3 para dar lugar al plásmido pSF2SL, que fue comprobado mediante secuenciación. El fragmento *Not* I de 4,5 kb que contiene la fusión P_{paaF2S} -*lacZ* se clonó en pUTminiTn5-Km2, obteniéndose así el plásmido pF2SLKm, que fue transferido por conjugación desde *E. coli* S17.1 λ pir a *Pseudomonas* sp. Y2. Al igual que en el caso anterior, la selección se llevó a cabo en placas de LB con Cm y Km, y se comprobó su sensibilidad a piperacilina, así como su capacidad de crecimiento en M9 suplementado con AFA, estireno ó 2-feniletanol. Se seleccionaron tres clones, denominados *Pseudomonas* sp. Y2F2SL n° 1, 2 y 3, con los que se realizaron los ensayos de actividad β -galactosidasa (Figura 5.39).

c) Construcción de *Pseudomonas* sp. Y2 F2L Δ *styR*::Gm

La estirpe Y2 F2L Δ *styR*::Gm, portadora de un casete de resistencia Gm^R sustituyendo una porción interna de *styR*, se construyó siguiendo el procedimiento que aparece esquematizado en la figura 5.37. Tras la transferencia del plásmido pKRKm a *Pseudomonas* sp. Y2F2L, los dobles recombinantes fueron seleccionados por su resistencia a sacarosa, Cm, Km y Gm y confirmados por su sensibilidad frente a Sm. La construcción del mutante fue comprobada por PCR (Figura 5.37).

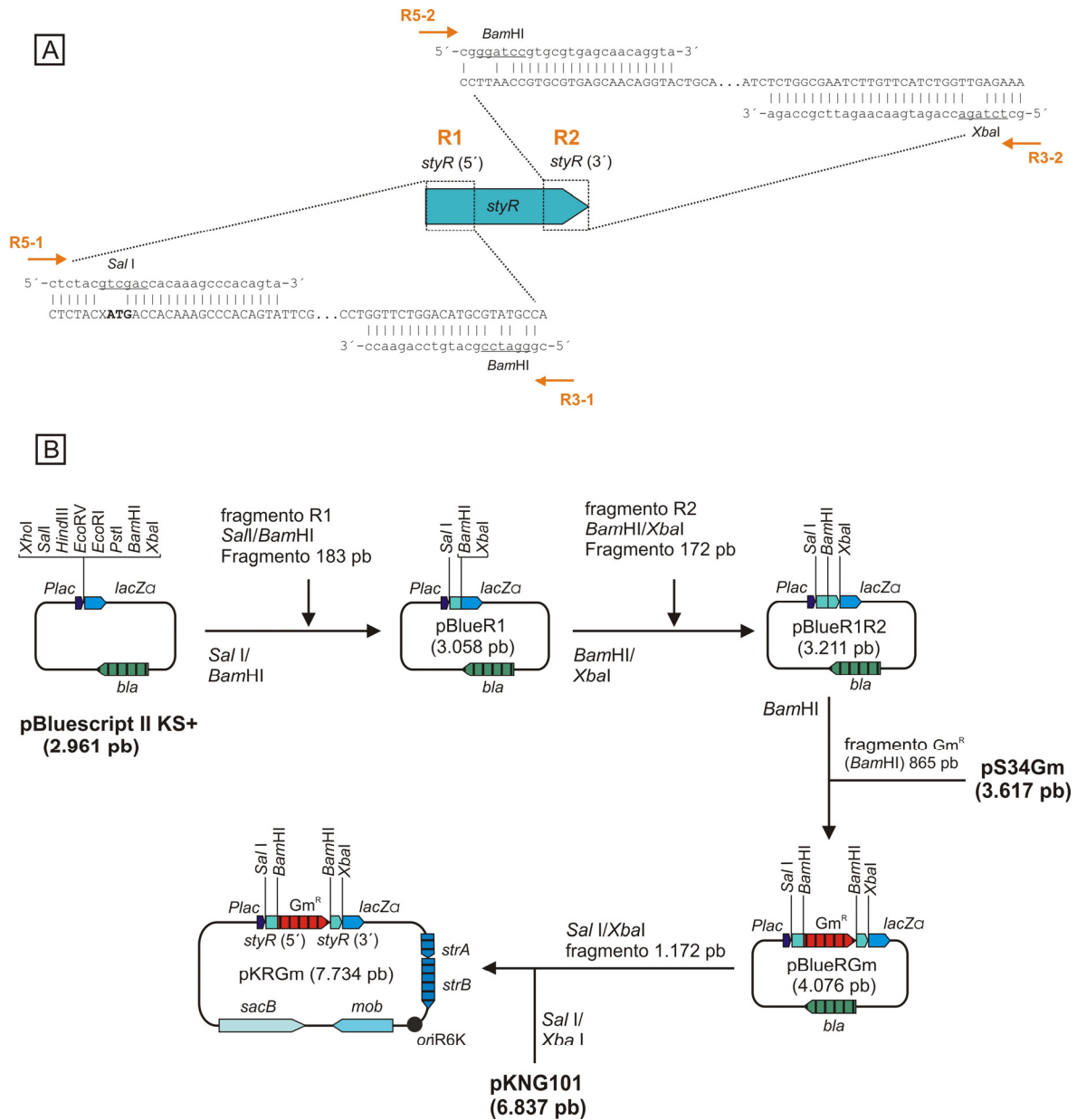


FIGURA 5.37. Construcción del plásmido suicida pKRGm y del mutante *Pseudomonas* sp. Y2T2Δ*styR*::Gm. **A.** Oligonucleótidos empleados como cebadores para la amplificación de los fragmentos R1 y R2 del gen *styR*; su secuencia se representa en minúsculas, con las dianas de restricción subrayadas. **B.** Esquema detallado de las sucesivas etapas de la construcción del plásmido pKRGm, derivado de pKNG101 (Tabla 4.2, Materiales y métodos) con un inserto que contiene el gen *styR* de *Pseudomonas* sp. Y2 parcialmente deletionado y sustituido por un casete de Gm^R. Se amplificó por PCR un fragmento de 183 pb del extremo 5' de *styR*, empleando los oligonucleótidos R5-1 y R3-1 y el plásmido pUE14 (Tabla 4.2, Materiales y métodos; Figura 5.14) como molde. Este fragmento fue digerido con *SalI* y *BamHI* y clonado en los mismos sitios de pBluescript II KS (+), dando lugar al plásmido pBlueR1. Seguidamente, se amplificó mediante PCR un fragmento de 172 pb del extremo 3' de *styR* a partir de pUE14 y los oligonucleótidos R5-2 y R3-2, que fue digerido con *BamHI* y *XbaI* y clonado en esos sitios de pBlueR1, obteniéndose así el plásmido pBlueR1R2. El fragmento *BamHI* de 865 pb que contiene un casete de Gm^R procedente de la digestión del vector pS34Gm (Tabla 4.2, Materiales y métodos) fue clonado en el sitio *BamHI* de pBlueR1R2, dando lugar a pBlueRGm. El fragmento de 1.172 pb *SalI*-*XbaI* que contiene Δ*styR*::Gm se clonó en los mismos sitios de pKNG101, generando el plásmido suicida pKRGm, que fue transferido por conjugación desde *E. coli* S17.1 λpir a *Pseudomonas* sp. Y2F2L para conseguir así la estirpe mutante *Pseudomonas* sp. Y2 F2L Δ*styR*::Gm^R.

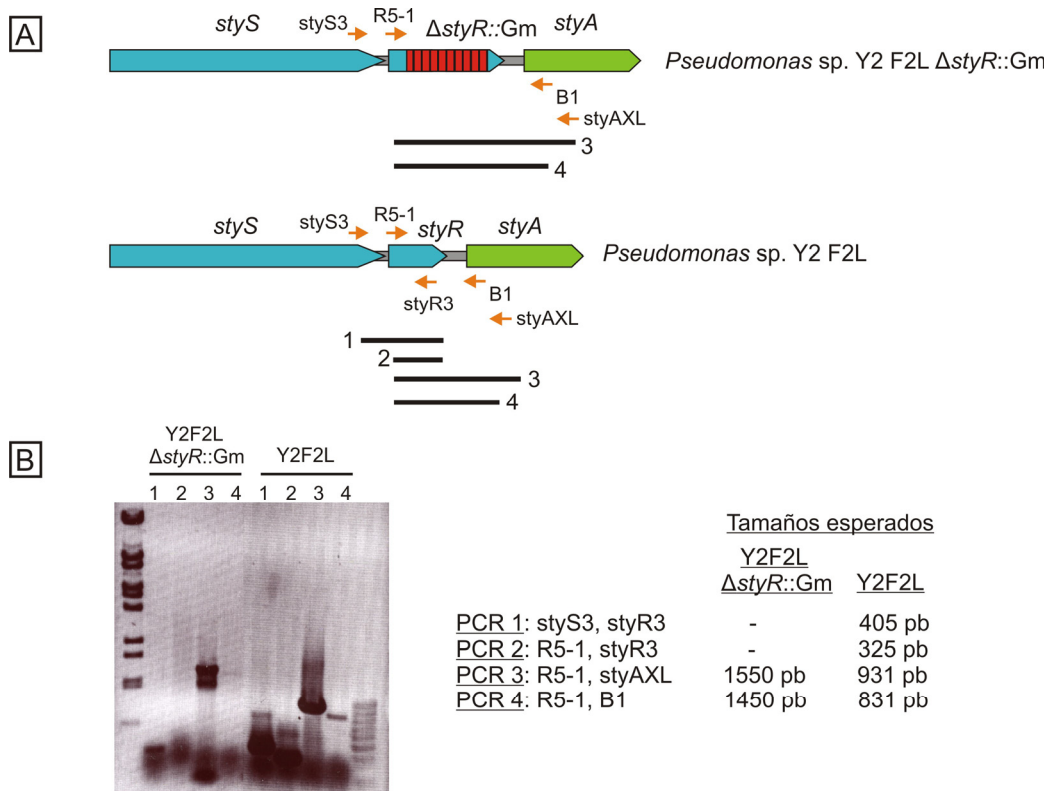


FIGURA 5.38. Comprobación del mutante *Pseudomonas* sp. Y2 F2L Δ *styR*::Gm. **A.** Esquema del contexto cromosómico en el que se encuentra *styR* en *Pseudomonas* sp. Y2 F2L y en el cromosoma de *Pseudomonas* sp. Y2 F2L Δ *styR*::Gm. Las flechas naranjas representan los oligonucleótidos que se han empleado para comprobar el truncamiento de *styR* mediante PCR. En la parte baja se muestran los fragmentos (1, 2, 3 y 4) que resultarían en las correspondientes PCRs realizadas sobre el DNA cromosómico de Y2 F2L y de Y2 F2L Δ *styR*::Gm. **B.** Gel de electroforesis con los fragmentos amplificados en 4 reacciones de PCR distintas (Calles 1 a 4: PCRs 1, 2, 3 y 4, respectivamente) empleando los oligonucleótidos que se muestran en el panel A y como molde el DNA cromosómico de la estirpe Y2 F2L (control) y de la estirpe mutante Y2 F2L Δ *styR*::Gm. A la derecha se señalan los tamaños esperados en las distintas amplificaciones realizadas.

3.4.2. Ensayos de actividad β -galactosidasa con las distintas estirpes testigo derivadas de *Pseudomonas* sp. Y2.

El efecto de la inducción de P_{paaF2} por estireno en las cepas testigo se evaluó mediante ensayos de actividad β -galactosidasa, tal y como se detalla en la figura 5.39. La exposición a estireno activa la transcripción a partir del promotor P_{paaF2} , en contraste con los valores basales observados en ausencia de estireno. La estirpe testigo *Pseudomonas* sp. Y2 F2L Δ *styR*::Gm, que tiene truncado el gen *styR*, no muestra activación del promotor P_{paaF2} , ni en ausencia ni en presencia de estireno (Figura 5.39B), confirmando que StyR es imprescindible para la activación de P_{paaF2} .

Por otro lado se comparó la actividad β -galactosidasa de la estirpe Y2 F2L y de tres clones distintos de la cepa Y2 F2SL en cultivos crecidos en glicerol e inducidos con estireno (Figura 5.39C). Ninguno de los clones de Y2 F2SL presentó actividad β -galactosidasa, demostrando que la desaparición de la región STY4 anula la inductibilidad de P_{paaF2} por estireno.

En conjunto, estos resultados indican que la activación transcripcional de P_{paaF2} en presencia de estireno está mediada por StyR y que esta proteína ejerce su acción a través de su unión a la región STY4.

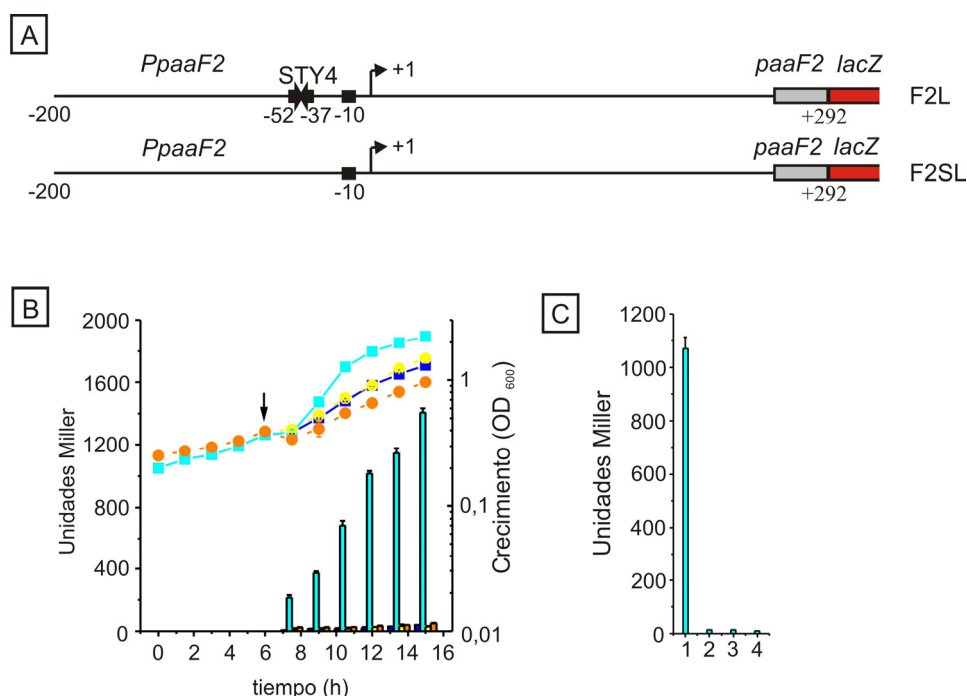


FIGURA 5.39. Respuesta a la inducción con estireno de las estirpes testigo Y2 F2L, Y2 F2L $\Delta styR::Gm$ e Y2 F2SL. **A.** Esquema de la región promotora P_{paaF2} y de la fusión traducciónal PaaF2- β gal que portan los casetes testigo F2L y F2SL. **B.** Ensayos de actividad β -galactosidasa con las estirpes Y2 F2L e Y2 F2L $\Delta styR::Gm$. Las células se crecieron en medio M9 con glicerol hasta una DO_{600nm} de 0,4 y a partir de este punto cada cultivo se repartió en 6 matraces, sometiendo tres de ellos a inducción con estireno suministrado en fase gaseosa y manteniendo los otros tres sin inducir. Se ensayó la actividad β -galactosidasa de estos cultivos a distintos tiempos. Las barras representan las unidades Miller alcanzadas en los ensayos, los cuadrados y círculos los valores de DO_{600nm} de los distintos cultivos: Y2 F2L inducidos con estireno (azul claro); Y2 F2L sin inducir con estireno (azul oscuro); Y2 F2L $\Delta styR::Gm$ inducidos con estireno (naranja); Y2 F2L $\Delta styR::Gm$ sin inducir con estireno (amarillo). La flecha representa el momento en el que fue llevada a cabo la inducción con estireno. Las barras de error corresponden al error estándar. Los valores representan la media de tres experimentos independientes. **C.** Ensayos de actividad β -galactosidasa con las estirpes Y2 F2L e Y2 F2SL (clones 1, 2 y 3) crecidas en medio M9 con glicerol y tras 8 horas de inducción con estireno. Calles 1 a 4: Y2 F2L, Y2 F2SL (clon 1), Y2 F2SL (clon 2) y Y2 F2SL (clon 3).

3.5. Estudio de inductores y represores de P_{paaF2} .

3.5.1. Estudio de inductores de P_{paaF2} .

Estudios previos llevados a cabo con la estirpe testigo *Pseudomonas* sp. Y2 PAL, portadora de la fusión $P_{styA}-lacZ$ insertada en monocopia en su cromosoma (Alonso, 2002; Alonso y col., 2003b), pusieron de manifiesto que, aunque el estireno es el inductor fundamental de la transcripción a partir de P_{styA} otros compuestos son capaces de hacerlo aunque en menor medida.

Resultados

Entre ellos se encuentran los metabolitos intermediarios de la transformación del estireno en AFA, es decir el epoxiestireno y el fenilacetaldehído, y otros compuestos no metabolizables por *Pseudomonas* sp. Y2 pero estructuralmente semejantes al estireno, como el tolueno, el etilbenceno y el 2-feniletanol. Por el contrario, el AFA no actúa como inductor de *P_{styA}*, al igual que ocurre con el *p*-xileno, el α -metilestireno, el *p*-metilestireno y el fenol.

Puesto que la activación por estireno de la transcripción a partir de *P_{paaF2}* también está mediada por StyR, se quiso estudiar el rango de inductores de *P_{paaF2}* y compararlo con el de *P_{styA}*, para lo que se realizaron ensayos de actividad β -galactosidasa con las estirpes Y2 F2L e Y2 PAL. Así, ambas estirpes se cultivaron en medio M9 suplementado con glicerol hasta alcanzar una DO_{600nm} de 0,4. En ese momento, cada cultivo se dividió en varios matraces a los que se añadió cada uno de los compuestos a estudiar a una concentración final de 90 μ M (Figura 5.40). Tras 1 hora de inducción, se valoró la actividad β -galactosidasa en cada cultivo (apartado 11.2 de Materiales y métodos). El nivel de inducción se calculó por comparación con la actividad del cultivo control (sin inducir, crecido en M9 con glicerol), al que se asignó el valor de 1. Los datos, recogidos en la Tabla 5.1, muestran los valores obtenidos de la media de al menos 5 ensayos distintos, con sus correspondientes errores estándar.

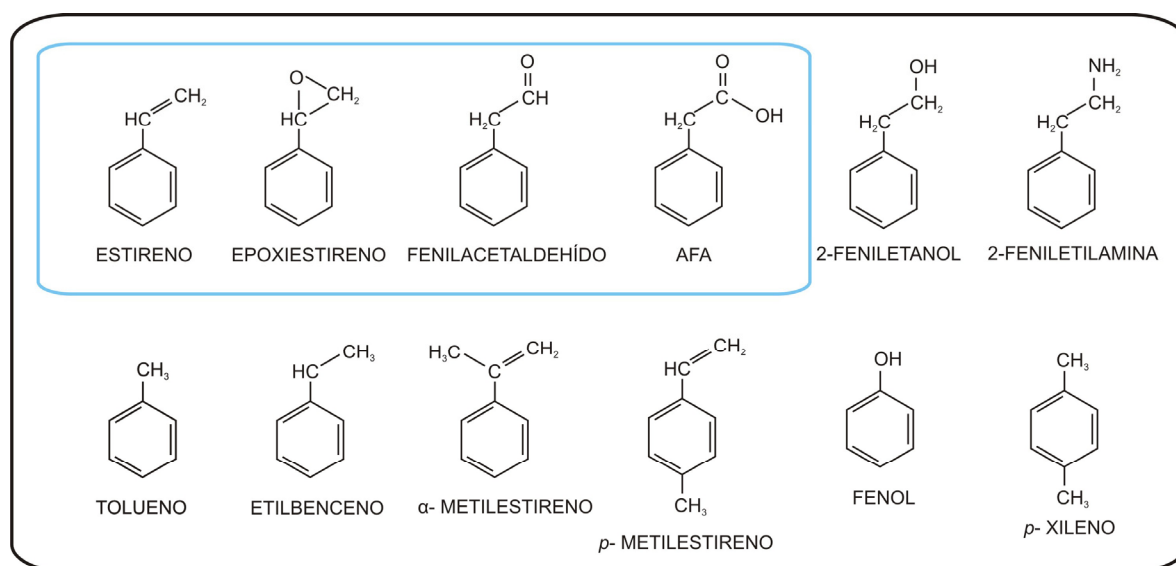


FIGURA 5.40. Compuestos utilizados en los ensayos de inducción de las estirpes Y2 F2L e Y2 PAL. En el recuadro azul se muestran los metabolitos intermediarios de la ruta superior de degradación del estireno en *Pseudomonas* sp. Y2.

Compuesto	Nivel de inducción	
	$P_{paaF2-lacZ}$	$P_{styA-lacZ}$
Estireno	9 ± 1,3	10,1 ± 1,9
Fenilacetaldehído	3,7 ± 0,3	5,4 ± 1,1
Epoxiestireno	3,3 ± 0,3	3,8 ± 0,6
2-Feniletanol	3,5 ± 0,5	3,3 ± 0,5
2-Feniletanolamina	3,6 ± 0,5	5,7 ± 1,3
Etilbenceno	1,9 ± 0,3	2,8 ± 0,7
Tolueno	1,7 ± 0,4	1,8 ± 0,6
p-Xileno	1 ± 0,1	1,3 ± 0,1
α- Metilestireno	1,4 ± 0,1	1,2 ± 0,1
p- Metilestireno	1,3 ± 0,2	1,2 ± 0,3
Ácido fenilacético	1,2 ± 0,1	1,2 ± 0,1
Fenol	1,3 ± 0,1	1 ± 0,1

TABLA 5.1. Respuesta de los sistemas testigo $P_{paaF2-lacZ}$ y $P_{styA-lacZ}$ frente a la inducción con diferentes compuestos. Los niveles de los cultivos crecidos en glicerol se tomaron como 1,00 ± 0,0.

Los resultados obtenidos demuestran que el promotor P_{paaF2} responde a los compuestos ensayados de la misma manera que P_{styA} , siendo el rango de inducción muy parecido para ambos promotores.

En un experimento análogo llevado a cabo con la estirpe testigo *Pseudomonas* sp. Y2 F2L $\Delta styR::Gm$, no se observó inducción con ninguno de los compuestos ensayados (datos no mostrados). Esto hace pensar que la expresión de los genes *sty* catabólicos bajo el control de P_{styA} y la expresión de *paaF2* a través de P_{paaF2} están reguladas de forma coordinada a través del sistema activador de la transcripción StyS/StyR.

3.5.2. Estudio de represores de P_{paaF2} .

El patrón de expresión de los genes *sty* catabólicos a partir de P_{styA} en cultivos de *Pseudomonas* sp. Y2 PAL crecidos en estireno y en presencia fuentes de carbono adicionales (glicerol, glucosa, AFA y LB) había sido estudiado anteriormente en el laboratorio (Alonso, 2002). Una vez más se quiso comparar la regulación del promotor P_{paaF2} con la de P_{styA} . Para ello se cultivaron las estirpes Y2 F2L e Y2 PAL en medio M9 con estireno y en presencia o ausencia de varias fuentes de carbono (glicerol, glucosa y AFA) y también en medio LB con estireno, para ver si estos compuestos reprimen la transcripción a partir de P_{paaF2} . Se monitorizó el crecimiento de los distintos cultivos midiendo la DO_{600nm} y se tomaron alícuotas cada 1,5 horas, analizándose en ellas la actividad β -galactosidasa. Los resultados, recogidos en la Figura 5.41, muestran un mismo patrón de comportamiento para ambos promotores. Así, el glicerol y la glucosa no ejercen un efecto represor sobre la transcripción a partir de estos dos promotores, mientras que el AFA reprime la transcripción a partir de P_{styA} y P_{paaF2} en presencia de estireno. El medio rico LB también presenta un efecto represor en ambos promotores, que empieza a desaparecer cuando los cultivos entran en fase estacionaria.

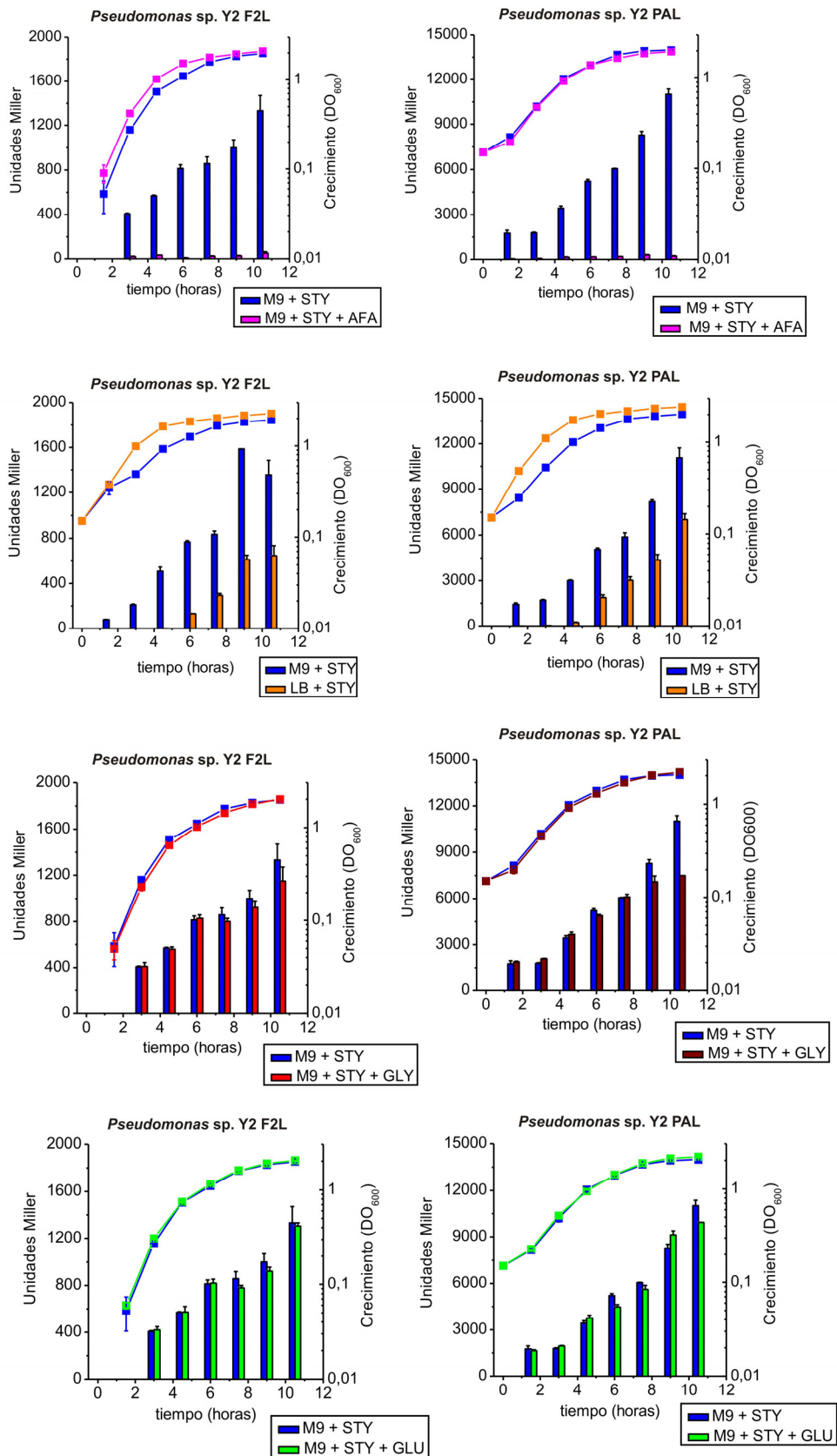


FIGURA 5.41. Estudio de represores de la inducción de P_{styA} y P_{paaF2} . Ensayos de actividad β -galactosidasa de las estirpes F2L y PAL crecidas en estireno (STY) y en presencia y ausencia de glicerol (GLY), glucosa (GLU), AFA y LB. Las barras indican las unidades Miller obtenidas en los distintos ensayos. Las curvas indican el crecimiento de F2L y PAL en los distintos medios. Las barras de error corresponden al error estándar. Los resultados corresponden a la media de tres experimentos independientes.

4. Papel de la proteína PaaX en la regulación del promotor P_{paaF2} .

El hecho de que los promotores P_{styA} y P_{paaF2} estén regulados por StyR y que ambos respondan frente al mismo rango de inductores indujo a pensar que, al igual que P_{styA} está sujeto a represión por PaaX en ausencia de FA-CoA, P_{paaF2} también podría estarlo.

Se realizaron estudios *in silico* sobre la región promotora P_{paaF2} y el inicio del gen *paaF2* (región P_{paaF2} -*paaF2*) con el objetivo de indentificar alguna posible secuencia que pudiera constituir una región operadora para PaaX por comparación con el consenso ya descrito anteriormente (GATACA---26 pb---TGTATC). Sin embargo, no se localizó ninguna secuencia parecida, aunque sí se encontraron varias secuencias similares a alguna de las repeticiones de 6 pb (GATACA o TGTATC) que diferían del consenso en una o dos bases, pero que se encontraban separadas por una distancia muy distinta a la que las separa en las cajas de unión a PaaX en las distintas regiones operadoras de *Pseudomonas*.

4.1. Estudio de la unión de PaaX a P_{paaF2} .

4.1.1. Diseño y construcción de sondas: F2, F2-2, F2-3 y F2-4.

Se realizaron ensayos de retardo de banda electroforética con cuatro sondas diseñadas de forma que cubren distintas zonas de la región P_{paaF2} y el inicio de *paaF2*. Todas ellas fueron amplificadas por PCR empleando el plásmido pUE14 (Tabla 4.2, Materiales y métodos; Figura 5.14) como molde y los oligonucleótidos correspondientes, digeridas con *EcoRI* y *BamHI* y marcadas radiactivamente con [α^{32} -P]dATP utilizando el fragmento *Klenow* de la DNA polimerasa I (según lo descrito en el apartado 13.1 de Materiales y métodos). La sonda F2 (294 pb) se obtuvo según lo anteriormente explicado (Figura 5.33). Las sondas F2-2 (294 pb), F2-3 (323 pb) y F2-4 (444 pb) se obtuvieron por amplificación con los oligonucleótidos PF2Eco1+ y F2B, PF2-3 y F2B(3) y PF2-5 y F2B (Tabla 4.3 de Materiales y métodos), respectivamente. La secuencia y ubicación de los oligonucleótidos empleados para la amplificación de estas sondas se muestra en la Figura A.2 del Apéndice.

4.1.2. Ensayos de retardo de la banda electroforética de las sondas derivadas de P_{paaF2} con MBP-PaaX1.

Los ensayos de retardo de banda electroforética se llevaron a cabo con estas 4 sondas de la región P_{paaF2} (0,5 nM) y la proteína MBP-PaaX1 purificada (300 ó 600 nM), según lo descrito en el apartado 13.2 de Materiales y métodos. En paralelo se utilizaron dos sondas de la región P_{styA} : E1B1 como control positivo, ya que contiene la región de unión a PaaX, y E1B2 como control negativo, ya que carece de la mitad de la región operadora de PaaX.

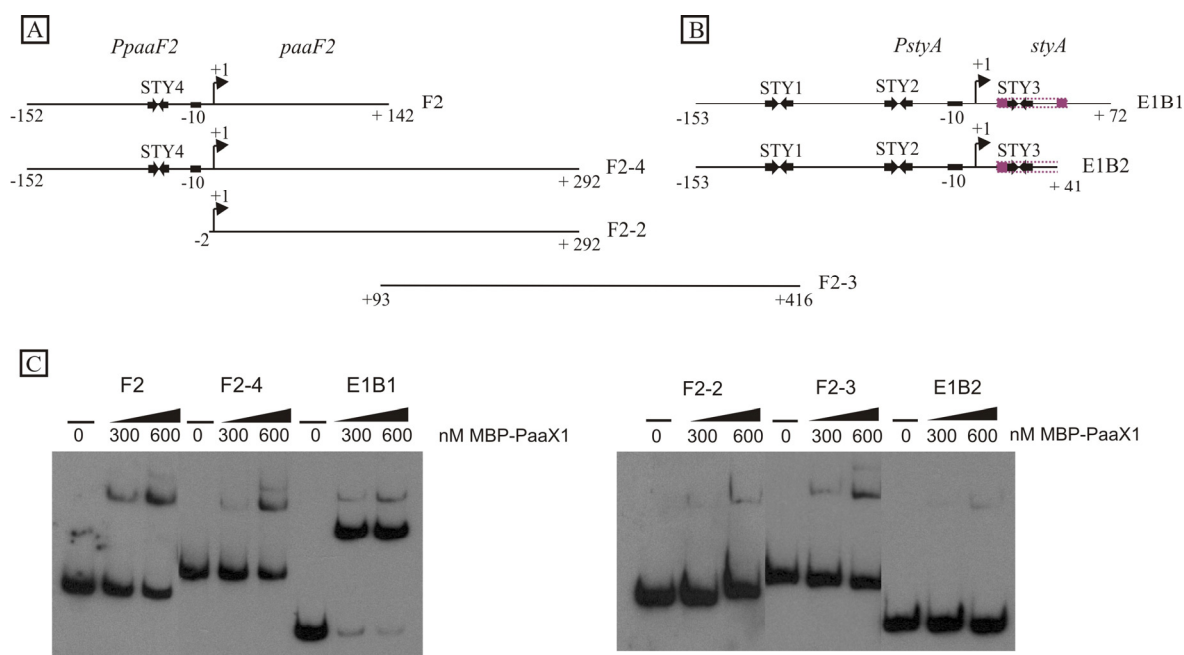


FIGURA 5.42. Ensayos de retardo de la banda electroforética de distintas sondas de la región P_{paaF2} y P_{styA} con MBP-PaaX1. A y B. Representaciones esquemáticas de las sondas de la región P_{paaF2} - $paaF2$ y P_{styA} - $styA$ empleadas en los experimentos de retardo en gel. El sitio +1 de inicio de la transcripción, las cajas -10 extendidas de ambos promotores y los sitios STY de unión de StyR aparecen señalados. En morado se representan los dos motivos de 6 pb que constituyen la caja operadora de PaaX en P_{styA} . Obsérvese que la sonda E1B2 carece de uno de estos motivos. C. Ensayos de retardo de la banda electroforética de distintas sondas de las regiones P_{paaF2} y P_{styA} (0,5 nM) con MBP-PaaX1 (300 ó 600 nM).

Los resultados de este experimento se muestran en la figura 5.42. Las sondas F2 y F2-4 parecen mostrar cierta afinidad por MBP-PaaX1, ya que su banda aparece retardada en el gel sobre todo a la concentración de 600 nM, aunque esta afinidad es claramente inferior a la que muestra la sonda E1B1 (control positivo). Las sondas F2-2 y F2-3 presentan un retardo muy débil, semejante al que se observa en el caso de la sonda E1B2 (control negativo). Aunque la sonda E1B2 presenta el motivo de unión de PaaX parcialmente deletado, mantiene una de las repeticiones invertidas de 6 pb (concretamente la menos conservada respecto al consenso), lo que podría ser responsable de la ténue banda de retardo que se observa en el gel. Esto sugiere que el débil retardo observado para las sondas F2-2 y F2-3 podría resultar de una unión a MBP-PaaX1 semejante, de naturaleza

básicamente inespecífica. La afinidad mostrada por las sondas F2 y F2-4 hacia MBP-PaaX1, aunque dista mucho de la que manifiesta la sonda E1B1, es mayor que la de las otras dos sondas de la región P_{paaF2} , lo que sugiere que la proteína MBP-PaaX1 podría unirse a la región de P_{paaF2} comprendida entre las posiciones -152 y -2 (figura A.2).

El estudio de la unión de MBP-PaaX1 a la región P_{paaF2} se completó con ensayos de competición por la unión a MBP-PaaX1 (600 nM) de las sondas radiactivas E1B1 o F2 (0,2 nM) frente a un exceso de distintas sondas no marcadas (490 nM). Los resultados obtenidos aparecen recogidos en la figura 5.43. La sonda E1B1 sin marcar compite por la unión de MBP-PaaX1 con la sonda F2 marcada (Figura 5.43A; calle 8), eliminando el retardo de la banda casi por completo, mientras que, a la inversa, la propia sonda F2 sin marcar no elimina el retardo producido por la sonda E1B1 (Figura 5.43B; calle 5 y Figura 5.43C). El resto de las sondas sin marcar ensayadas, F2-2, F2-3 y F2-4, no compiten por la unión de MBP-PaaX1 con la sonda F2 marcada, ya que los ensayos de competición realizados con ellas presentan el mismo patrón de retardo que el llevado a cabo con la sonda E1B2 sin marcar (utilizada a modo de control negativo, ya que tiene el sitio de unión de PaaX parcialmente deletado) (Figura 5.43A). Al utilizar sonda E1B1 marcada en los ensayos de unión con MBP-PaaX1 sólo la sonda fría E1B1 es capaz de competir y eliminar el retardo de la banda (Figura 5.43B; calle 8 y figura 5.43C), mientras que un exceso del resto de las sondas sin marcar ensayadas no compite por la unión a la proteína (Figura 5.43B y C).

El efecto de la presencia de FA-CoA en la unión de MBP-PaaX1 a la sonda F2 (0,2 nM) se estudió realizando ensayos de retardo de banda electroforética con MBP-PaaX1 (600 nM) en presencia de FA-CoA 1 mM (Figura 5.43A; calle 3), observándose un patrón de comportamiento similar al de la sonda E1B1 (Figura 5.43B; calle 3).

Los resultados obtenidos en estos experimentos sugieren que la unión observada entre la proteína MBP-PaaX1 y la sonda F2 es de naturaleza inespecífica, ya que la proteína parece tener mucha menos afinidad por la sonda F2 que por la E1B1 (utilizada como control positivo), y además un exceso de sonda F2 fría no es capaz de competir por la unión específica de MBP-PaaX1 con la sonda E1B1 marcada. Para aportar algún dato más al estudio de esta interacción se llevó a cabo el experimento de protección frente a la digestión con DNasa I que se describe en el siguiente apartado.

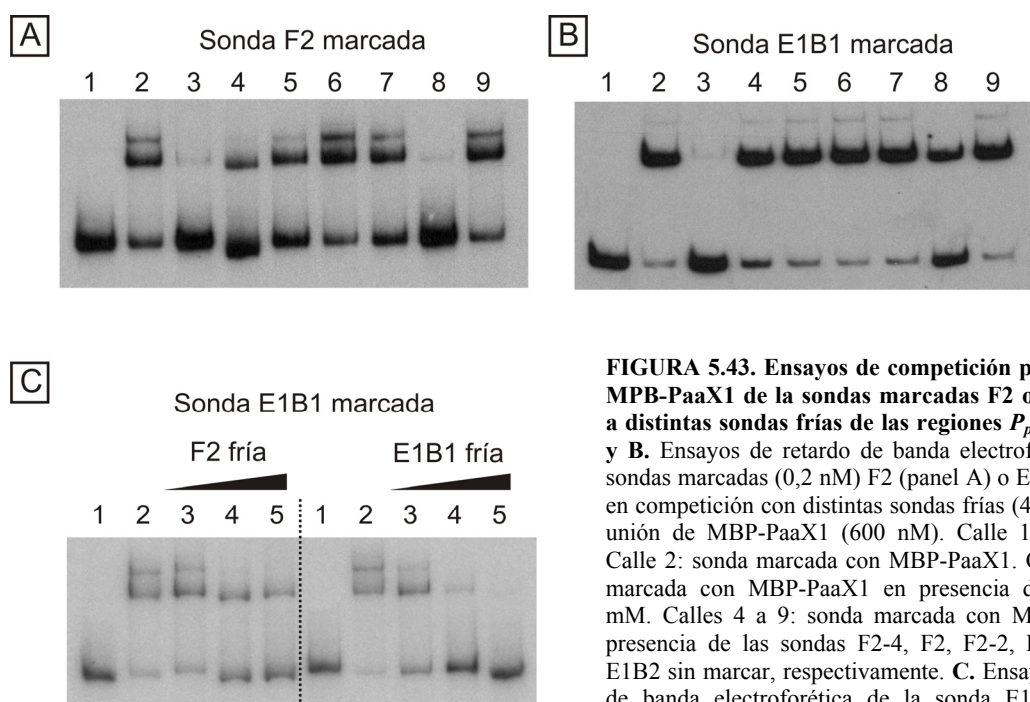


FIGURA 5.43. Ensayos de competición por la unión a MPB-PaaX1 de las sondas marcadas F2 o E1B1 frente a distintas sondas frías de las regiones P_{paaF2} y P_{styA} . **A** y **B.** Ensayos de retardo de banda electroforética de las sondas marcadas (0,2 nM) F2 (panel A) o E1B1 (panel B) en competición con distintas sondas frías (490 nM) por la unión de MBP-PaaX1 (600 nM). Calle 1: sonda libre. Calle 2: sonda marcada con MBP-PaaX1. Calle 3: sonda marcada con MBP-PaaX1 en presencia de FA-CoA 1 mM. Calles 4 a 9: sonda marcada con MBP-PaaX1 en presencia de las sondas F2-4, F2, F2-2, F2-3, E1B1 y E1B2 sin marcar, respectivamente. **C.** Ensayos de retardo de banda electroforética de la sonda E1B1 (0,2 nM) marcada y concentraciones crecientes de sonda F2 o E1B1 sin marcar (Calles 2 a 4: 0, 100, 200, y 490 nM) en competición por la unión a MBP-PaaX1 (600 nM). Calle 1: sonda libre.

4.1.3. Ensayos de protección frente a la digestión con DNasaI.

En los experimentos de protección de la región $P_{paaF2-paaF2}$ por PaaX1 frente a la digestión con DNasa I se utilizaron las sondas F2-E y F2-B (derivadas de F2) y E1B1, que se incubaron con distintas concentraciones de MBP-PaaX1 y se sometieron a digestión con DNasa I, según lo expuesto en el apartado 13.3 de Materiales y métodos. La sonda F2 se obtuvo por amplificación mediante PCR utilizando el plásmido pUE14 (Tabla 4.2, Materiales y métodos; Figura 5.14) como molde y los oligonucleótidos PF2E y F2B(2) (Tabla 4.3, Materiales y métodos; Figura A.2), y fue digerida con *EcoRI* (sonda F2-E) o con *BamHI* (sonda F2-B). En cada una de estas sondas se marcó un extremo distinto, permitiendo analizar la secuencia de las dos hebras del DNA de la sonda F2. La sonda E1B1 amplificada por PCR (Figura 5.3) fue digerida con *BamHI* y fue utilizada a modo de control positivo. Las tres sondas fueron marcadas radiactivamente con [α^{32} -P]dATP utilizando el fragmento Klenow de la DNA polimerasa I (apartado 13.1 de Materiales y métodos).

Los resultados permitieron ver que MBP-PaaX1, incluso a una concentración de 2,4 μ M, no ofrece ninguna protección a las sondas F2-E y F2-B frente a la digestión con DNasa I, mientras que es suficiente una concentración de MBP-PaaX1 de 300 nM para observar una clara protección de la sonda E1B1 (datos no mostrados).

4.2. Estudio *in vitro* del papel de PaaX en la transcripción a partir de P_{paaF2} .

Los ensayos de transcripción *in vitro* se realizaron empleando como molde el plásmido pTE-PF2, que porta la región promotora P_{paaF2} entera y el inicio de *paaF2* (desde la posición -200 a la +292) y el plásmido pTE-E1B1, a modo de control positivo (ver Figura 5.34).

Los ensayos se llevaron a cabo con las mismas condiciones descritas en el apartado 3.2 del capítulo B de Resultados y los resultados se muestran en la Figura 5.44. Se puede concluir de estos datos que, a diferencia de lo que ocurre en el caso de P_{styA} , PaaX no presenta ningún efecto represor en la transcripción a partir de P_{paaF2} *in vitro*.

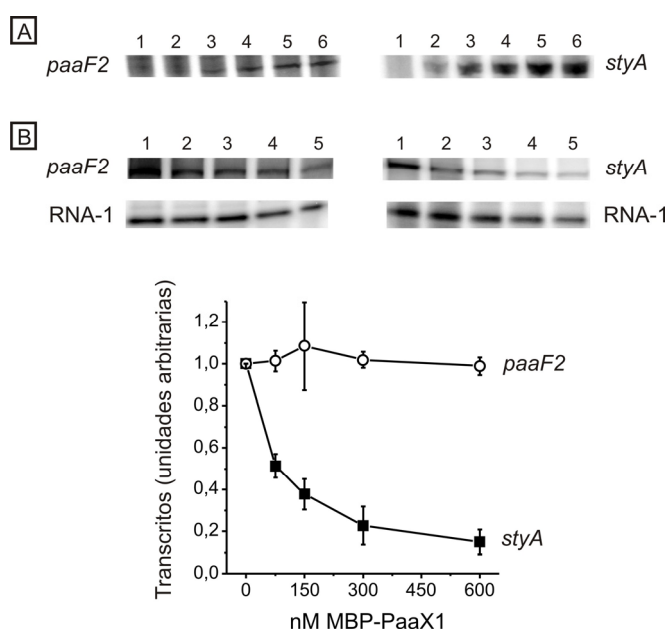


FIGURA 5.44. Efecto de MBP-PaaX1 sobre la transcripción *in vitro* a partir de los promotores P_{styA} y P_{paaF2} . **A.** Transcritos de *paaF2* y *styA* obtenidos a partir de pTE-PF2 y pTE-E1B1 (Figura 5.34), respectivamente, en presencia de distintas concentraciones de His₆-StyR fosforilada. Calles 1 a 6: His₆-StyR-P 0, 0,5, 1, 2, 4 y 8 μ M. **B.** Transcritos de *paaF2*, *styA* y sus correspondientes RNA-1 obtenidos a partir de pTE-PF2 y pTE-E1B1 en presencia de 4 μ M de His₆-StyR fosforilada y distintas concentraciones de MBP-PaaX1. Calles 1 a 5: MBP-PaaX1 0, 75, 150, 300 y 600 nM. La gráfica muestra los niveles de los transcritos de *paaF2* (círculos) respecto a los del RNA-1 control (en unidades arbitrarias) obtenidos a partir de pTE-PF2 y pTE-E1B1, respectivamente, en función de la cantidad de MBP-PaaX1 empleada en el ensayo. Los resultados corresponden a la media normalizada de 3 experimentos independientes. Las barras de error indican el error estándar.

4.3. Estudio *in vivo* del efecto de PaaX en la transcripción a partir de P_{paaF2} .

Mediante análisis con PCR cuantitativa de los cDNAs sintetizados a partir de cultivos de *Pseudomonas* sp. Y2T2 y *Pseudomonas* sp. Y2T2X1 inducidos con estireno o sin inducir, se valoraron los niveles de expresión de *paaF2* y de *styA* (a modo de control positivo). Como estándar interno se usó el gen *tetA*, que codifica la resistencia a Tc, se encuentra en monocopia en el cromosoma y, en presencia de tetraciclina, se expresa de manera constante.

En condiciones de no-inducción, la expresión de *styA* es unas 4 veces mayor en el caso de la estirpe Y2T2X1 que en el de estirpe Y2T2; sin embargo, los niveles de *paaF2* no varían significativamente al comparar ambas estirpes. Para los cultivos inducidos con estireno los niveles de RNA mensajero de *styA* siguen siendo mayores para la estirpe Y2T2X1 que para la Y2T2, aunque la diferencia es menor, ya que tras la exposición a estireno se genera FA-CoA en el medio y

desaparece en parte el efecto represor mediado por PaaX. En cambio, los niveles de transcrito de *paaF2* en esas mismas condiciones tampoco varían significativamente entre ambas estirpes, incluso parecen un poco menores en la estirpe Y2T2X1. Estos resultados permiten concluir que PaaX no ejerce un papel represor sobre la transcripción a partir de P_{paaF2} *in vivo*, a diferencia de lo que ocurre para P_{styA} .

TABLA 5.2. Cuantificación por PCR a tiempo real de los niveles de los RNA mensajeros de *paaF2* y *styA* en las estirpes *Pseudomonas* sp. Y2T2 y *Pseudomonas* sp. Y2T2X1.

	Y2T2-Glicerol	Y2T2X1-Glicerol	Y2T2-Gly + 5'estireno	Y2T2X1-Gly + 5'estireno
<i>styA</i>	1 ± 0,5	4,06 ± 1,4	36,5 ± 3,23	40,98 ± 5,9
<i>paaF2</i>	1 ± 0,02	1,66 ± 0,15	26,86 ± 4,3	22,94 ± 2,97

Los niveles de transcrito de *paaF2* y *styA* se determinaron en cultivos de las estirpes indicadas en condiciones basales (no inducción) y tras 5 minutos de inducción con estireno y se han normalizado respecto a los niveles de RNA mensajero de *tetA*. Los resultados son la media de tres experimentos independientes. Los errores corresponden al error estándar.

5. Papel de IHF en la regulación del promotor P_{paaF2} .

Como ya se ha visto anteriormente, IHF se une a la región P_{styA} tanto en *Pseudomonas* sp. Y2 (apartado 4.1 del capítulo A de Resultados; Figuras 5.22 y 5.23) como en *P. fluorescens* ST (Santos y col., 2002; Leoni y col., 2005). En esta última estirpe, además, se ha descrito que IHF potencia la activación de la transcripción inducida por estireno a partir de P_{styA} *in vivo* (Leoni y col., 2005).

Para comprobar si IHF ejerce algún efecto sobre la regulación de la transcripción a partir del promotor P_{paaF2} se estudió en primer lugar si aquel es capaz de unirse a la región P_{paaF2} . Se llevaron a cabo ensayos de retardo de banda electroforética con concentraciones crecientes de IHF (0, 20, 40 y 100 nM) y la sonda F2 (0,1 nM). Los mismos ensayos se realizaron en paralelo con las sondas E1B1 (control positivo) y con E2B1 (que presenta la caja de unión de IHF delecionada, sirviendo por tanto a modo de control negativo).

Los resultados, recogidos en la figura 5.45 muestran que IHF no se une a la sonda F2 en las mismas condiciones que lo hace con la sonda E1B1.

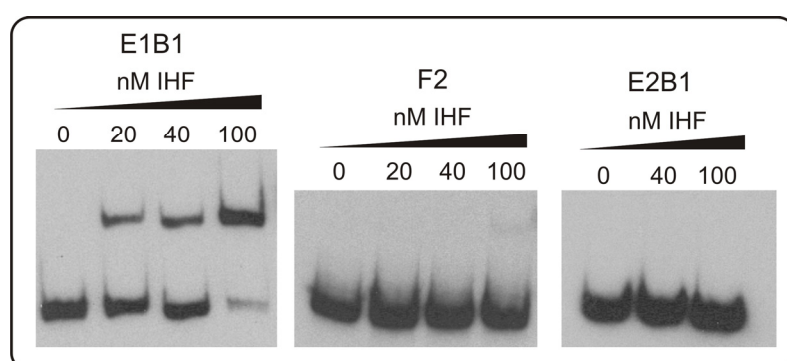


FIGURA 5.45. Unión de IHF a las regiones P_{paaF2} y P_{styA} . Ensayos de retardo en gel con las sondas F2 (Figura 5.33), E1B1 (Figura 5.3; control positivo) y E2B1 (Figura 5.3; control negativo) y concentraciones crecientes de IHF.

6. Papel de PaaF2 en la degradación del estireno.

6.1. Ensayos de actividad FA-CoA ligasa.

Se llevaron a cabo ensayos de actividad FA-CoA ligasa con cultivos de las estirpes Y2T2 (PaaF⁺, PaaF2⁺), Y2T2 *paaF*::Km (PaaF2⁺) e Y2T2 *paaF2*::Km (PaaF⁺) (apartados 1.1 y 1.2 del capítulo B de Resultados) crecidos en medio mínimo M9 suplementados con glicerol 1%, glicerol 1% más AFA 0,2% o glicerol 1% con estireno suministrado en fase gaseosa, según lo descrito en el apartado 11.3 de Materiales y métodos. Ninguna de las tres estirpes presentó actividad en los cultivos crecidos en glicerol. La actividad FA-CoA ligasa de los cultivos crecidos en presencia de estireno fue aproximadamente del triple para Y2T2 que para Y2T2 *paaF*::Km e Y2T2 *paaF2*::Km. En el caso de los cultivos crecidos en AFA, Y2T2 *paaF*::Km (PaaF2⁺) no presentó actividad FA-CoA ligasa, mientras que las estirpes Y2T2 e Y2T2 *paaF2*::Km mostraron niveles de actividad parecidos (Figura 5.46). Esto confirma el hecho de que la expresión de *paaF2* se induce en presencia de estireno pero no de AFA y sugiere que la actividad codificada por *paaF2* es una FA-CoA ligasa auxiliar dependiente de estireno.

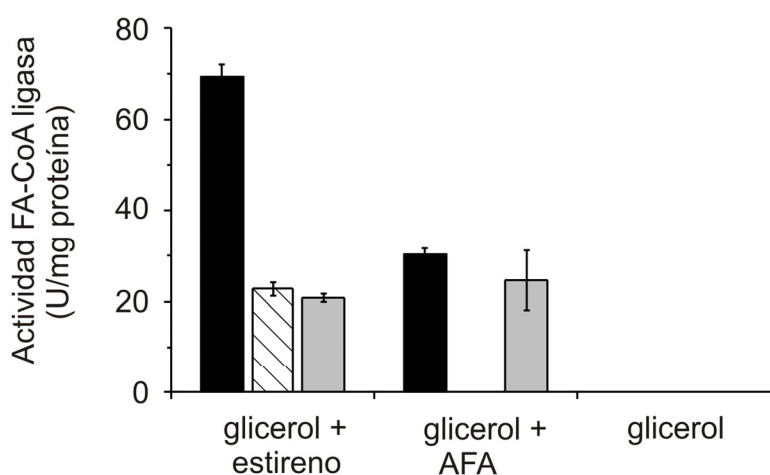


FIGURA 5.46. Actividad FA-CoA ligasa de las estirpes Y2T2, Y2T2 *paaF2*::Km e Y2T2 *paaF*::Km en distintos medios. Las estirpes *Pseudomonas* sp. Y2T2 (barras negras), *Pseudomonas* sp. Y2T2 *paaF2*::Km (barras grises) y *Pseudomonas* sp. Y2T2 *paaF*::Km (barras rayadas) se cultivaron en medio mínimo M9 en presencia de glicerol 1%, glicerol 1% y AFA 0,2% o glicerol 1% más estireno suministrado en fase gaseosa, hasta alcanzar una $DO_{600\text{ nm}}$ de aprox. 0,8. La preparación de los extractos celulares y posterior medida de la actividad FA-CoA ligasa de los mismos se llevó a cabo según lo descrito en el apartado 11.3 de Materiales y métodos. Los resultados corresponden a la media de 3 experimentos independientes. Las barras de error hacen referencia al error estándar.

6.2. Expresión de los genes *paa* en la estirpe Y2T2 *paaF2::Km*.

Se quiso comprobar si en los cultivos de la estirpe Y2T2 *paaF2::Km* ($PaaF2^+$) suplementados con AFA, en los que no se detecta actividad FA-CoA ligasa (Figura 5.46), se estaban expresando los genes *paa*. Se prepararon cultivos de Y2T2 *paaF2::Km* en medio mínimo M9 suplementado con glicerol, glicerol y AFA o glicerol y estireno suministrado en fase gaseosa, hasta alcanzar una DO_{600nm} de 0,8. Se procedió a la extracción de RNA, síntesis de cDNA y ensayos de PCR cuantitativa. Los niveles de expresión de *paaD* se cuantificaron en referencia a los obtenidos para el gen *tetA* (insertado en monocopia en el cromosoma de esta estirpe), gen de expresión constante (en presencia de Tc) y usado como estándar interno. En los cultivos crecidos en presencia de estireno se observó un claro nivel de expresión del gen *paaD*, a diferencia de los niveles basales que se obtuvieron en los cultivos crecidos en glicerol o en presencia de AFA (Figura 5.47). Estos resultados explican la incapacidad de la estirpe Y2T2 *paaF2::Km* para crecer en AFA (Figura 5.29), ya que, en presencia de este compuesto, los genes *paa* que codifican las actividades encargadas de degradarlo no se expresan. En presencia de estireno, en cambio, la actividad FA-CoA ligasa codificada por *paaF2* se induce (Figura 5.46), por lo que se genera FA-CoA suficiente, a expensas del estireno suministrado, para que se elimine la represión mediada por PaaX y tenga lugar la expresión de los genes *paa* (Figura 5.47).

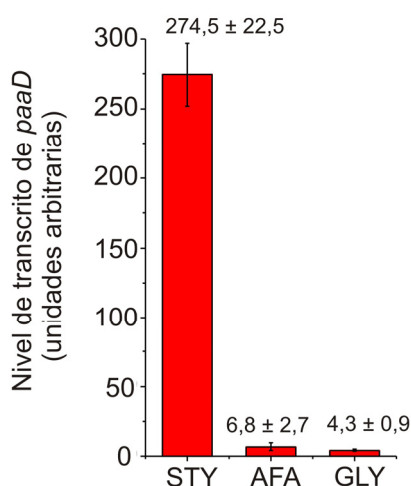


FIGURA 5.47. Cuantificación por PCR a tiempo real de los niveles de RNA mensajero de *paaD* en *Pseudomonas* sp. Y2T2 *paaF2::Km* en distintos medios. Los niveles de transcrito de *paaD* se determinaron en cultivos de la estirpe *paaF2::Km* crecidos en medio M9 en presencia de glicerol 1% (GLY), en medio M9 en presencia de glicerol 1% y de AFA 0,2% (AFA) o en medio M9 en presencia de glicerol 1% más estireno suministrado en fase gaseosa (STY), hasta alcanzar una DO_{600nm} de aprox. 0,8. Los resultados son la media de 3 experimentos independientes. Las barras de error indican el error estándar.

6.3. Estudios de crecimiento y competición de las estirpes Y2T2 e Y2T2 *paaF2::Km*.

Con el fin de estudiar si la presencia del gen *paaF2* aporta a *Pseudomonas* sp. Y2 una ventaja a la hora de competir en ambientes con estireno, se comparó el crecimiento de las estirpes Y2T2 e Y2T2 *paaF2::Km* en medio mínimo M9 suplementado con glicerol 1%, AFA 0,2% o estireno suministrado en fase gaseosa. Paralelamente, se siguió el crecimiento de un cultivo mixto obtenido al mezclar los dos anteriores en igual proporción. Los tres cultivos presentan un mismo patrón de

crecimiento a lo largo de la curva en presencia de glicerol y de AFA como fuente de carbono. Sin embargo, la cepa Y2T2 *paaF2*::Km presenta una fase de adaptación al medio con estireno más lenta que Y2T2 o que el cultivo mixto, aunque la velocidad de crecimiento no está afectada (Figura 5.47). Se tomaron alícuotas de los cultivos mixtos en la fase exponencial del crecimiento, se plaquearon en medio LB y se aislaron colonias. Se reestriaron entre 240 y 360 colonias de cada tipo en placas de LB en presencia y ausencia de Km, con el objetivo de contabilizar la proporción de la estirpe mutante (resistente a Km) en el cultivo mixto. Los resultados se muestran recuadrados en la Figura 5.47.

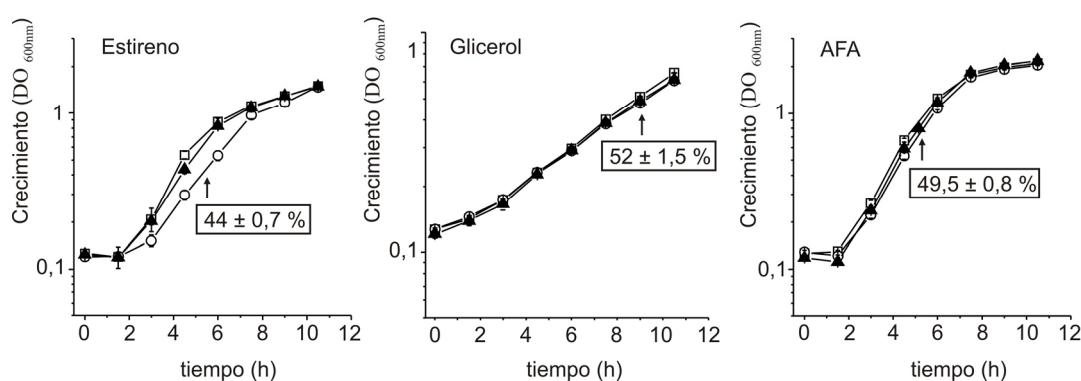


FIGURA 5.47. Curvas de crecimiento y ensayos de competición de las estirpes Y2T2 e Y2T2 *paaF2*::Km. *Pseudomonas* sp. Y2T2 (cuadrados blancos), *Pseudomonas* sp. Y2T2 *paaF2*::Km (círculos blancos) o una mezcla equitativa de ambas estirpes (triángulos negros) fueron cultivadas en medio mínimo M9 suplementado con glicerol 1%, AFA 0,2% o estireno suministrado en fase gaseosa. Los datos son la media de cultivos realizados por triplicado y de dos experimentos independientes. Las flechas indican los puntos en los que se tomaron alícuotas de los cultivos mixtos, para su siembra en medio sólido. De cada placa se analizaron entre 240 y 360 colonias, con el fin de determinar el porcentaje de la estirpe mutante en el cultivo mixto según la capacidad de las colonias de crecer en presencia de Km. Los resultados obtenidos aparecen recuadrados, y son la media de 4 a 7 experimentos independientes, con su error estándar correspondiente.

Los resultados obtenidos en este bloque de experimentos, que ponen de relevancia el papel de PaaF2 en el catabolismo del estireno, se comentarán más detalladamente en el apartado de Discusión.

DISCUSIÓN

VI. Discusión.

A. Regulación de la región promotora P_{styA} .

1. Características generales de la región promotora P_{styA} .

La región promotora del operón *styABCD*, integrado por los genes que codifican las actividades enzimáticas responsables de la transformación del estireno en AFA, ha sido estudiada en *Pseudomonas* sp. Y2 (Velasco y col., 1998; Alonso, 2002), *Pseudomonas* sp. VLB120 (Panke y col., 1998) y *P. fluorescens* ST (Beltrametti y col., 1997; Leoni y col., 2005). La secuencia de esta región promotora se encuentra muy conservada en los tres casos, aunque no es idéntica entre ellos. En *Pseudomonas* sp. Y2, los análisis previos realizados sobre la región P_{styA} (Velasco y col., 1998; Alonso, 2002) determinaron el sitio +1 de inicio de la transcripción y, mediante estudios informáticos, la localización de un sitio putativo de unión de StyR denominado “*StyRbox*”, la de un posible sitio de unión de IHF y la de la caja -10 extendida para la unión del factor σ^{70} de la RNA polimerasa. Es interesante señalar que, sin embargo, no se ha encontrado en la secuencia del promotor P_{styA} un motivo canónico -35 de unión a la RNA polimerasa, típico de los promotores σ^{70} . Se ha propuesto que la unión de StyR en una región próxima a la posición -35 facilitaría la unión de la RNA polimerasa a la región -10 extendida (O’Leary y col., 2002), pudiendo el mecanismo de actuación de StyR implicar interacciones con el factor σ^{70} o con alguna de las subunidades que constituyen el *core* de la RNA polimerasa (Alonso, 2002). Este tipo de promotores σ^{70} que presentan una caja -10 extendida no son infrecuentes en los casos en que los reguladores positivos atraen a la RNA polimerasa al unirse cerca o solapando la posición -35 (Collado-Vides, 1992; Barne y col., 1997). Otro ejemplo lo constituye el promotor P_{todX} de la ruta TOD de degradación del tolueno, que también presenta una caja -10 extendida y carece del motivo -35 (Lacal y col., 2006).

2. Papel de la proteína StyR en la regulación del promotor P_{styA} .

La comparación con la región P_{styA} de *P. fluorescens* ST ha permitido localizar en la secuencia de *Pseudomonas* sp. Y2 tres motivos de unión de StyR que coinciden con los sitios de alta (STY2), media (STY1) y baja (STY3) afinidad previamente descritos para la estirpe *P. fluorescens* ST (Leoni y col., 2005). El sitio STY2 coincide con la caja “*StyRbox*” anteriormente descrita en Y2 (Velasco y col., 1998). La estructura de ambos promotores P_{styA} es muy parecida, aunque no idéntica, existiendo algunas variaciones en la secuencia, incluso en las cajas STY.

Los ensayos de retardo en gel realizados en este trabajo muestran que la proteína His₆-StyR fosforilada se une de forma específica y dependiente de la concentración a la región P_{styA} de

Pseudomonas sp. Y2 (Figura 5.3). La sonda E1B1, que contiene la región P_{styA} completa, es retardada por una menor concentración de His₆-StyR fosforilada que la sonda E2B1, que carece del sitio STY1. Esta diferencia en el patrón de retardo puede ser debida a que un menor número de sitios de unión para StyR conlleve una menor afinidad de la sonda para su unión con esta proteína. Esto podría estar relacionado con lo observado en estudios realizados en *P. fluorescens* ST, que han puesto de manifiesto que la unión de StyR a los sitios STY1 y STY2 parece ser cooperativa (Leoni y col., 2003; Leoni y col., 2005).

El proceso de unión al DNA de la proteína StyR y su dependencia del grado de fosforilación de la misma se ha estudiado con detalle en el sistema de *P. fluorescens* ST. La fosforilación de StyR no es condición indispensable para que se produzca su unión con el DNA (Leoni y col., 2003), aunque la forma fosforilada se une con mayor afinidad. La proteína StyR fosforilada se encuentra mayoritariamente en forma dimérica (Leoni y col., 2003; Milani y col., 2005), aunque la forma de StyR no fosforilada también es capaz de formar dímeros, si bien en menor proporción (Milani y col., 2005). Estos resultados son parecidos a los descritos para otros reguladores de respuesta, como FixJ (Da Re y col., 1999) y SpoA (Lewis y col., 2002). La estructura de StyR de *P. fluorescens* ST se ha resuelto mediante cristalización de la proteína de fusión HE-StyR sin fosforilar (Milani y col., 2005) y comparación con los dominios N-terminal de FixJ y C-terminal de NarL, usados como referencia. En el modelo propuesto para StyR no fosforilada, el dominio C-terminal de unión al DNA se encuentra orientado al medio, de forma que permite su unión al DNA. Los autores proponen un mecanismo en el cual la fosforilación desplazaría el equilibrio desde una forma activa (monomérica) a una forma activa (dimérica), a través de la estabilización de esta última especie. Con respecto a esto, se ha descrito que la fosforilación del dominio receptor de FixJ dispara un efecto dual; por un lado, abre la estructura de FixJ y por otro induce la dimerización. Los autores proponen que la apertura de la estructura de FixJ es esencial para su actividad en la activación de la transcripción, mientras que la dimerización contribuye a una mayor afinidad por el DNA (Da Re y col., 1999).

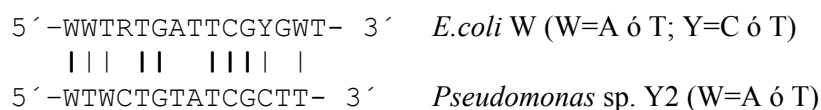
La proteína StyR de *Pseudomonas* sp. Y2 presenta un 96% de identidad en su secuencia de aminoácidos con respecto a su homóloga de *P. fluorescens* ST. Se ha propuesto un mecanismo para su activación (Rodes, 2007) según el cual la proteína desfosforilada no estaría asociada al DNA. Una vez producida la fosforilación, tendría lugar la dimerización de la misma y unión al DNA. La dimerización es imprescindible para el reconocimiento y la unión a las secuencias palindrómicas de DNA. Además, la fosforilación es indispensable para que StyR active el proceso de transcripción de los genes *sty* catabólicos (Rodes, 2007). Un comportamiento similar se ha descrito para el regulador de respuesta PhoP de *Salmonella enterica*. Dicho regulador de respuesta dimeriza y se une al DNA tanto en su forma fosforilada como no fosforilada, aunque la fosforilación es necesaria para la actividad transcripcional (Perron-Savard y col., 2005).

En este trabajo se ha comprobado, mediante ensayos de transcripción *in vitro*, que la fosforilación de la proteína StyR de *Pseudomonas* sp. Y2 es requisito imprescindible para que manifieste su capacidad de activar la transcripción a partir de P_{styA} (Figuras 5.4C y 5.34C), lo cual coincide con lo previamente descrito (Rodes, 2007).

3. Papel de la proteína PaaX en la regulación del promotor P_{styA} .

Trabajos previos en *E. coli* W han demostrado el papel represor que ejerce PaaX sobre la transcripción de los genes *paa*: en ausencia de AFA, PaaX se une a las cajas operadoras de los promotores P_G , P_N y P_x impidiendo que tenga lugar la transcripción de los genes correspondientes (Ferrández y col., 2000; Fernández, 2005). En presencia de AFA, éste es transformado en FA-CoA, cuya interacción con PaaX provoca la liberación de esta proteína de las secuencias operadoras, iniciándose entonces de la transcripción de los genes *paa*. Además de los genes *paa*, el gen *pac*, que codifica la penicilina G acilasa y está relacionado con el catabolón del FA-CoA, está sujeto a un mismo mecanismo de represión por PaaX en *E. coli* W (Galán y col., 2004; Kim y col., 2004). La proteína PaaX pertenece a la familia de reguladores de tipo GntR y más concretamente a la subfamilia PF07848, cuyo miembro representativo es, precisamente, la proteína PaaX de *E. coli* W (Fernández, 2005). Puesto que los genes *paa* codifican las actividades que constituyen la ruta inferior de degradación del estireno en la estirpe Y2, nos planteamos la posibilidad de que algunos elementos comunes al sistema *paa* interviniesen en la regulación de la expresión de los genes *sty* catabólicos. Se iniciaron así los estudios que se han descrito en este trabajo con el objetivo de comprobar si PaaX desempeña algún papel en la regulación de los genes *sty*.

La secuencia consenso de unión de PaaX a sus correspondientes regiones operadoras fue inicialmente definida en *E. coli* W (Ferrández y col., 2000; Galán y col., 2004; Fernández, 2005) mediante ensayos de protección frente a la digestión con DNasa I. Se presentó como una secuencia palindrómica de 15 pb, si bien la región protegida resultaba ser más amplia, de unas 50 pb. El análisis de los promotores de los genes *paa* de *Pseudomonas* sp. Y2 y *P. putida* KT2440 llevó a proponer una secuencia consenso de 14 pb para la caja de unión a PaaX (Alonso y col., 2003a; Bartolomé-Martín y col., 2004) que muestra un cierto parecido con la de *E. coli*.



Posteriormente, el motivo de unión de PaaX en *E. coli* W fue redefinido (Kim y col., 2004), como una región de 39 pb que contiene dos repeticiones invertidas de 6 pb separadas por 27 nucleótidos (Figura 6.1). Esta nueva secuencia consenso engloba a la anterior de 15 bp y la amplía.

Estudios *in silico* con el programa informático Fuzznuc (<http://emboss.sourceforge.net/>) sobre los genes *paa* de *Pseudomonas* sp. Y2 y de otras *Pseudomonas* han permitido redefinir también la secuencia consenso de unión de PaaX en estos casos como dos repeticiones invertidas de 6 pb separadas por unos 26 nucleótidos (Figura 6.1, (del Peso-Santos y col., 2006). Resultó muy interesante en su momento que el análisis *in silico* de la región intergénica entre *styR* y *styA* (P_{styA}) y el comienzo del gen *styA* permitiera el descubrimiento de una secuencia putativa de unión a PaaX localizada entre las posiciones +12 y +48 de *styA* (Figuras A.1 y 6.1). Para determinar si esta secuencia constituía un sitio de unión real para PaaX se han llevado a cabo una serie de estudios *in vitro* en este trabajo. Los ensayos de retardo de banda electroforética han permitido comprobar que la proteína purificada MBP-PaaX1 se une de forma específica a una sonda que contiene la región P_{styA} y el comienzo de *styA* de *Pseudomonas* sp. Y2, y que posee por tanto la secuencia putativa de unión de PaaX identificada (Figura 5.8A). La unión de MBP-PaaX1 se elimina en presencia de FA-CoA pero no de AFA (Figura 5.8B), de forma idéntica a lo que ocurre para los promotores de los genes *paa* y *pac* en *E. coli* W (Ferrández y col., 2000; Galán y col., 2004; Kim y col., 2004; Fernández, 2005). Los ensayos de protección por MBP-PaaX1 frente a la digestión por DNasa I muestran que la protección se extiende entre las posiciones +4 y +52 de *styA*, lo que coincide con el sitio anteriormente propuesto (Figura 5.9). El motivo de unión de PaaX situado al inicio de *styA* presenta la secuencia de 6 pb distal muy conservada respecto a la consenso, ya que mantiene 5 de las 6 bases (cTGATC frente al consenso TGTATC), mientras que la otra repetición de 6 pb está bastante menos conservada, puesto que sólo mantiene 3 de las 6 bases (acaACA frente al consenso GATACA). La delección o la mutagénesis del motivo de 6 pb más conservado impide la unión de MBP-PaaX1 a la sonda de DNA correspondiente (Figura 5.12). Se ha demostrado que, en el promotor P_{pac} de *E. coli* W ATCC11105, la sustitución de nucleótidos en cualquiera de las dos repeticiones invertidas de 6 pb que constituyen el palíndrome conlleva la pérdida de unión de la proteína PaaX (Kim y col., 2004). Estudios de mutación realizados en los promotores P_G (anteriormente P_a) y P_N (anteriormente P_s) de los genes *paa* de *E. coli* W (Ferrández y col., 2000) en el lado izquierdo del palíndrome (concretamente, en la región de 15 pb anteriormente propuesta como secuencia consenso, ver Figura 6.1) también provocaban una pérdida de unión de la proteína (curiosamente, las mutaciones que provocaban la pérdida de unión de PaaX correspondían a alguna de las bases del motivo TGATTC). Aunque en el caso del promotor P_{styA} de *Pseudomonas* sp. Y2, sería necesario realizar estudios de mutagénesis más detallados en ambas repeticiones de 6 pb, todo parece apuntar a que la presencia de los dos motivos de 6 pb que forman el palíndromo invertido es imprescindible para que la proteína se una y ejerza, por tanto, su efecto represor sobre la región promotora correspondiente.

Los estudios de equilibrio y velocidad de sedimentación de MBP-PaaX1 realizados en este trabajo han permitido concluir que la proteína está presente como dímero en disolución, siendo la

forma de éste algo achatada, y que la unión al operador de la región *styA* (apartado 3.7 del capítulo A de Resultados) tiene lugar en su forma dimérica, siendo la estequiometría de dicha unión de 2 moléculas de proteína por molécula de DNA. Estos resultados inducen a pensar en la posibilidad de que cada monómero de PaaX interactúe con una de las repeticiones de 6 pb que constituyen el motivo de unión de PaaX y explicaría en cierto modo la importancia de la ausencia de una de estas repeticiones. Se ha descrito que las proteínas de la familia GntR se unen en forma de dímeros al DNA, de manera que cada subunidad se une a uno de los dos motivos repetidos de los operadores (Rigali y col., 2002). Sin embargo, hasta el momento no se ha definido para ninguna de las proteínas reguladoras de esta familia una secuencia de reconocimiento con un palíndromo separado por un número tan alto de nucleótidos como ocurre para el caso de PaaX. Esta observación resalta el hecho de que PaaX constituya una subfamilia distinta dentro de la familia GntR (Fernández, 2005).

Las cajas de unión de PaaX identificadas en distintos promotores de *E. coli*, *Kluyvera citrophila* y *Pseudomonas* se muestran en la Figura 6.1, así como sus posiciones relativas respecto al sitio +1 de la transcripción y su similitud con sus respectivas secuencias consenso de unión de PaaX.

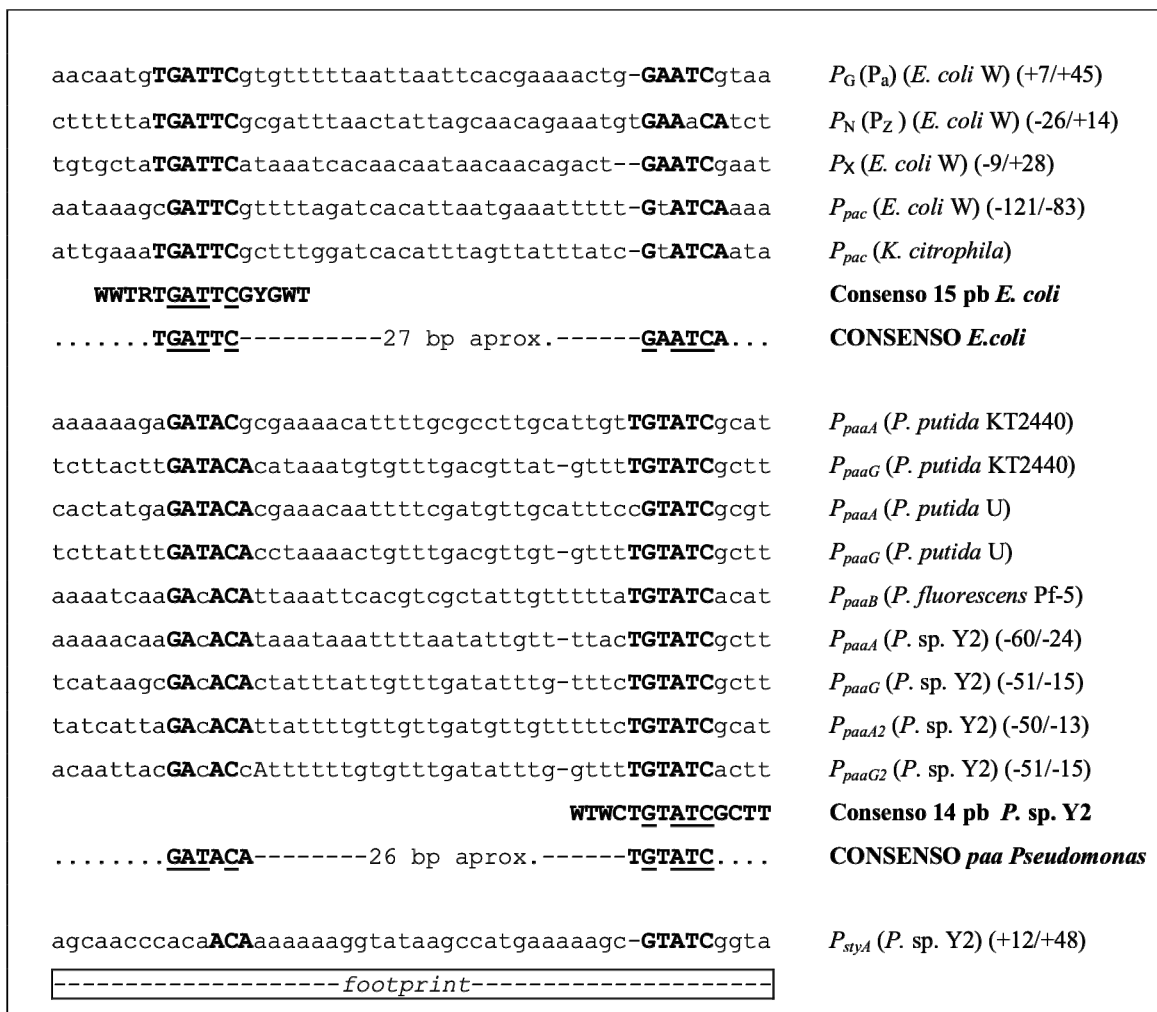


FIGURA 6.1. Sitios de unión de PaaX. Comparación de los sitios de unión de PaaX de distintos promotores de *E. coli* W (número de acceso en el GenBank X97452) y *Kluyvera citrophila* (M15418) con los sitios de unión de PaaX putativos encontrados en los promotores *paa* de *P. putida* KT2440 (AE015451), *P. putida* U (AF029714), *P. fluorescens* Pf-5 (NC004129) y *Pseudomonas* sp. Y2 (AJ000330 y AJ579894) y el sitio de unión de PaaX localizado en el promotor *P_{styA}*. *P_G* (anteriormente *Pa*), *P_N* (anteriormente *P_Z*) y *P_X* son los promotores que controlan la transcripción de los genes *paa* en *E. coli* W. *P_{pac}* es el promotor del gen *pac* que codifica la penicilina G acilasa. *P_{paaA}*, *P_{paaG}*, *P_{paaA2}*, *P_{paaG2}* y *P_{paaB}* son promotores de los genes *paa* de *Pseudomonas*. *P_{styA}* es el promotor que controla la transcripción del operón *styABCD* catabólico en *Pseudomonas* sp. Y2. Las posiciones de la región flanqueada por las repeticiones invertidas de 6 pb, que constituyen el motivo de unión de PaaX, relativas al sitio de inicio de la transcripción, aparecen entre paréntesis para cada promotor. Las secuencias consenso de unión de PaaX para *E. coli* y *Pseudomonas* aparecen en negrita. Los nucleótidos de las cajas de unión de PaaX de los distintos promotores que se encuentran conservados respecto a la secuencia consenso se muestran en negrita. Los nucleótidos conservados entre las secuencias consenso de *E. coli* y *Pseudomonas* están subrayados. La secuencia consenso de unión de PaaX descrita inicialmente para *E. coli* (15 pb) y *Pseudomonas* (14 pb) se han situado debajo de la secuencia consenso descrita posteriormente. La región de *P_{styA}*-*styA* que resulta protegida en la digestión por DNasa I se encuentra resaltada por un rectángulo.

El alineamiento de las secuencias de unión de PaaX (Figura 6.2) localizadas en *Pseudomonas*, por un lado, y en enterobacterias (*E. coli* y *Kluyvera*), por otro lado, empleando el programa Weblogo (apartado 15.6 de Materiales y métodos), nos permiten tener una idea de las posiciones que se encuentran más conservadas en la secuencia de estas regiones operadoras. En el caso de *Pseudomonas*, cabe destacar que la parte de la secuencia situada más a la derecha (próxima al motivo TGTATC) se encuentra más conservada entre las distintas regiones promotoras, y que la región de 26 pb situada entre las repeticiones invertidas de 6 pb es muy rica en A y T, existiendo algunas posiciones en las que la presencia de A ó, sobre todo, de T está muy conservada. Las regiones ricas en A y T suelen presentar una curvatura intrínseca, por lo que existe la posibilidad de que dicha curvatura facilite de alguna manera la unión del dímero de PaaX a las dos cajas que constituyen el motivo operador.

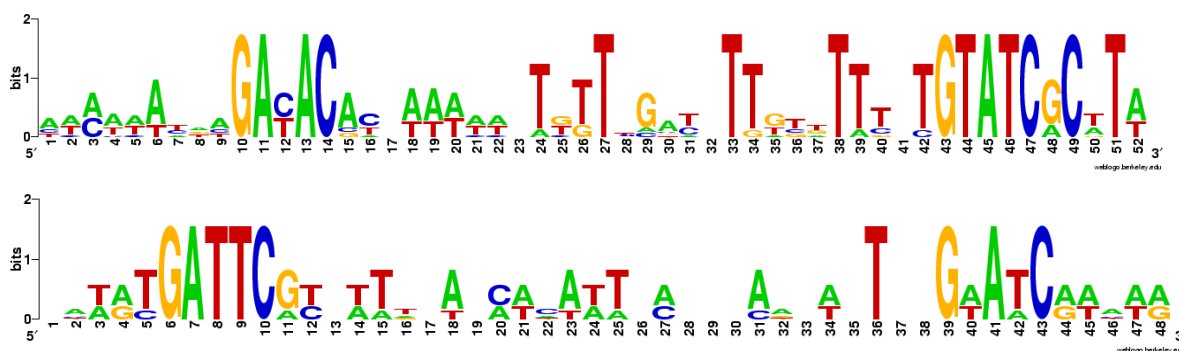


FIGURA 6.2. Alineamiento de los sitios de unión de PaaX. Resultado del alineamiento de las distintas secuencias de unión de PaaX localizadas en *Pseudomonas* (parte superior) y enterobacterias (parte inferior) (Figura 6.1) mediante en empleo del programa Weblogo.

Los ensayos de retardo en gel con una sonda derivada de la región *P_{styA}* de Y2 y extractos celulares de distintas *Pseudomonas* (Figura 5.6) muestran que, además de la copia PaaX1 de *Pseudomonas* sp. Y2 (con la que se han realizado todos los ensayos en la forma de MBP-PaaX1), PaaX2 de Y2 también es capaz de unirse a la sonda, al igual que PaaX de *P. putida* KT2440 y PaaX de *P. putida* U. La proteína PaaX purificada de *E. coli* W también se une a esta sonda. La identidad en secuencia de aminoácidos con respecto a PaaX1 de *Pseudomonas* sp. Y2 es de un 86 % para PaaX2, de un 83 % para PaaX de *P. putida* U y *P. putida* KT2440 y de un 43 % para PaaX de *E. coli* W. Como ya se ha comentado, la proteína PaaX pertenece a la familia de reguladores de tipo GntR. El análisis mediante SMART (Letunic y col., 2006) de PaaX1 y PaaX2 de la estirpe Y2 (Bartolomé-Martín, 2006) revela que estas proteínas pertenecen a la subfamilia PF07848, cuyo miembro representativo es la PaaX de *E. coli* W, y en la que también se encuentra PaaX de *P. putida* U (Ferrández y col., 2000; García y col., 2000). El extremo N-terminal de estas proteínas presenta un motivo de unión al DNA de tipo hélice-giro-hélice alado (*winged helix-turn-helix*,

wHTH) (Aravind y col., 2005), según se indica en un estudio (Fernández, 2005) en el que se puede observar un alineamiento entre varios miembros de la subfamilia PaaX, incluyendo a PaaX1 de *Pseudomonas* sp. Y2. Precisamente, es el dominio N-terminal el que se encuentra más conservado entre las distintas proteínas pertenecientes a esta subfamilia, lo que permitiría explicar que PaaX de *E. coli* W, que sólo presenta un 43 % de identidad en secuencia de aminoácidos, sea capaz de unirse a la región *P_{styA}* de *Pseudomonas* sp. Y2. Un alineamiento de la secuencia N-terminal de distintas proteínas de la subfamilia de PaaX aparece representado en la Figura 6.3, y permite apreciar que esta región está bastante conservada. La comparación de la secuencia de aminoácidos completa de distintas PaaX de diferentes *Pseudomonas* puede verse en la Figura A.4 del Apéndice, lo que permite observar que, si bien toda la secuencia es, en general, muy parecida, son las regiones N-terminal las que presentan una mayor homología.

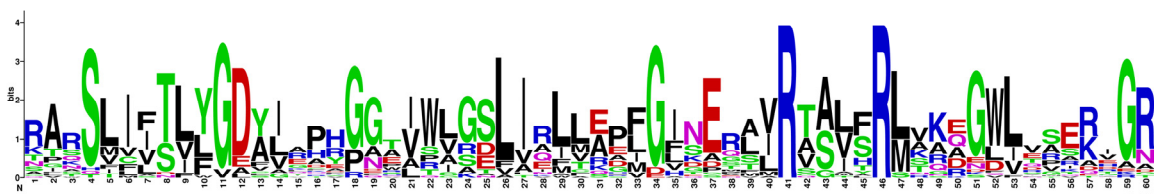


FIGURA 6.3. Alineamiento de las regiones N-terminal de distintas proteínas pertenecientes a la subfamilia PF07848. El alineamiento se llevó a cabo con el programa Weblogo empleando 36 secuencias correspondientes a la región N-terminal de distintas PaaX u otras proteínas miembros de la subfamilia PF07848, cuyo miembro representativo es la proteína PaaX de *E. coli* W. Figura tomada de Bartolomé-Martín.

La mayoría de los reguladores de tipo GntR que controlan la degradación de compuestos aromáticos son represores transcripcionales en ausencia del sustrato de la ruta. En presencia del mismo la represión resulta eliminada a través de la interacción del regulador con el compuesto aromático en cuestión o alguno de sus metabolitos (Tropel y van der Meer, 2004), lo que se interpreta como una disminución de la afinidad del represor por la unión al DNA mediada por el inductor (Fernández y col., 2000; Ohtsubo y col., 2001). La región N-terminal de unión al DNA de los reguladores de la familia GntR se encuentra bastante conservada, mientras que la región C-terminal, que presenta los dominios de oligomerización y de unión con la molécula efectora, es muy heterogénea (Harwood y Parales, 1996). Esto está de acuerdo con lo observado para PaaX.

En general, se ha descrito que los reguladores tipo GntR implicados en la regulación de compuestos aromáticos ejercen su represión a través de dos mecanismos diferentes. En algunos casos, estas proteínas se unen en la región promotora, concretamente entre las cajas -10 y -35, de forma que impiden la unión de la RNA polimerasa. En otros casos, el represor se une entre los sitios de inicio de la transcripción y de la traducción, de forma que permite la unión de la RNA polimerasa pero impide la formación del complejo abierto (Tropel y van der Meer, 2004). Los

estudios *in vitro* realizados con los promotores P_X y P_N de *E. coli* W (Fernández, 2005) han puesto de manifiesto la existencia de una competición entre PaaX y la RNA polimerasa por la unión a la zona promotora, lo que responde al modelo clásico de represores transcripcionales que ejercen su función mediante la competición con la RNA polimerasa por la unión al DNA (Fernández, 2005). Las secuencias operadoras de estos reguladores se superponen, total o parcialmente, a las cajas -10 y/o -35, dificultando la unión de la RNA polimerasa al promotor en cuestión. Esto está de acuerdo con lo observado para los promotores P_X y P_N , ya que estudios de protección frente a la digestión con DNasa I permitieron observar que PaaX protege desde la posición -16 a la +34 en el caso del promotor P_X , y desde la -30 a la +17 en el caso del promotor P_N (Ferrández y col., 2000; Fernández, 2005). Sin embargo, en el promotor P_G de *E. coli* W la región protegida por PaaX se extiende entre las posiciones -1 y +51 (Ferrández y col., 2000). Los ensayos de retardo de banda electroforética llevados a cabo con la RNA polimerasa y PaaX demostraron que, en este caso, PaaX no puede impedir la unión de la RNA polimerasa en presencia de CRP (en el promotor P_G la presencia de CRP es necesaria para que se una la RNA polimerasa y tenga lugar la transcripción), aunque no se ha determinado si PaaX y la RNA polimerasa pueden unirse simultáneamente en presencia de CRP, ni tampoco si el efecto represor de PaaX podría ser debido, a diferencia de lo que ocurre en P_X y P_N , a un mecanismo de inhibición de formación del complejo abierto o inhibición de etapas posteriores en la iniciación de la transcripción (Fernández, 2005). En la región P_{styA} de *Pseudomonas* sp. Y2, la secuencia protegida por PaaX frente a la digestión con DNasa I se encuentra al inicio del gen *styA*, y se extiende entre las posiciones +4 y +52. Si bien no se han llevado a cabo ningún tipo de ensayos de retardo de banda electroforética o de transcripción *in vitro* que nos permitieran aclarar el motivo por el que PaaX ejerce su represión en dicha región promotora, todo parece indicar que el mecanismo de regulación en este caso podría ser similar al del promotor P_G de *E. coli* W, es decir, que PaaX no impidiese la unión de la RNA polimerasa a la región promotora pero si la formación del complejo abierto. Es importante tener en cuenta además que la regulación de P_{styA} no esta sujeta exclusivamente a la acción de PaaX, ya que la transcripción a partir de este promotor sólo puede tener lugar en presencia de StyR fosforilado, y que la proteína CRP, imprescindible para la activación de P_G de *E. coli* W, no ejerce su acción sobre P_{styA} , por lo que se trata de dos mecanismos de activación que dependen de factores diferentes. En el caso de los promotores de los genes *paa* de *Pseudomonas* sp. Y2 analizados mediante estudios *in silico* (P_{paaA} , P_{paaG} , P_{paaA2} y P_{paaG2} , Figura 6.1) las cajas de unión de PaaX se superponen entre las cajas -10 y -35, sugiriendo un mecanismo de actuación de PaaX que consistiría, probablemente, en impedir la unión de la RNA polimerasa a la región promotora. Un mecanismo inusual y totalmente diferente a los anteriores por el cual PaaX ejerce su represión se ha descrito en la regulación del promotor del gen *pac* de *E. coli* W (Galán y col., 2004; Kim y col., 2004). En este caso, PaaX se une entre las posiciones -121 y -83 del promotor, y no parece afectar a la RNA polimerasa, sino al activador

CRP. Así, mientras que la mayor parte de los represores de la transcripción inhiben la unión de la RNA polimerasa o bien la formación del complejo abierto, en este caso PaaX compite con CRP por el mismo sitio de unión al DNA, de modo que, en ausencia de FA-CoA, PaaX desplaza la unión de CRP, proteína activadora necesaria para que tenga lugar la transcripción del gen *pac* (Galán y col., 2004; Kim y col., 2004).

La localización de la región operadora de PaaX al comienzo del gen *styA* de Y2, junto con el hecho de que la unión de PaaX a la región P_{styA} revierta en presencia de FA-CoA y no de AFA (Figura 5.8B), al igual que ocurre con los promotores de los genes *paa* y *pac* de *E. coli* W, sugería que PaaX podría estar actuando como un represor transcripcional. Los estudios de transcripción *in vitro* han demostrado que, en presencia de His₆-StyR fosforilada, MBP-PaaX1 reprime *in vitro* la transcripción a partir de P_{styA} unas 5 veces, y que la presencia de FA-CoA en el medio reduce de forma significativa este efecto represor de MBP-PaaX1 (Figura 5.13). Para estudiar el papel de PaaX sobre la transcripción de P_{styA} *in vivo* se han llevado a cabo estudios de PCR cuantitativa utilizando un sistema de dos plásmidos presentes en el hospedador heterólogo *E. coli* W14 que carece de los genes *sty* y *paa*. El plásmido pISm7.0R porta la región *stySR-P_{styA}-styAB* bajo el control del promotor inducible P_{lac} , de forma que P_{styA} se encuentra en su contexto génico nativo junto con los elementos reguladores necesarios para que pueda tener lugar la transcripción mediada por estireno. Como plásmido co-residente se utilizó pJ18X1, que sobreexpresa el gen *paaX1* de Y2 bajo el control del promotor inducible P_{lac} , o bien el plásmido pSJP18Not, utilizado como vector en la construcción de aquel y usado aquí como control negativo. Los resultados (Figura 5.15) muestran que en cultivos crecidos en medio mínimo M9 con glicerol y expuestos a estireno durante 30 minutos, los niveles de transcrito de *styA* son aproximadamente 2,5 veces inferiores en los cultivos de *E. coli* W14 [pISm7.0R] [pJ18X1] que en los de *E. coli* W14 [pISm7.0R] [pSJP18Not]. La estirpe *E. coli* W14 carece de los genes *paa* y de los genes *sty*, por lo que no se genera FA-CoA a partir del estireno suministrado. El efecto represor de PaaX es más notable en estas condiciones, ya que la ausencia de FA-CoA impide que PaaX se libere de sus regiones operadoras y, aún en presencia de StyR fosforilado, el sistema permanece parcialmente cerrado. Sin embargo, el hecho de que en presencia de PaaX exista transcripción a partir de P_{styA} cuando los cultivos son expuestos a estireno da una idea de que el efecto del activador de la transcripción, StyR fosforilado, es más fuerte que el del represor PaaX, y consigue anularlo en cierta medida, aunque no totalmente, indicando que el FA-CoA es el agente encargado de abrir por completo el sistema.

El efecto de PaaX sobre la regulación de P_{styA} en el propio sistema de *Pseudomonas* sp. Y2 se ha estudiado empleando las estirpes Y2T2 e Y2T2X1. La primera contiene la copia *paaX1* en su cromosoma y la segunda, derivada de la anterior, tiene el gen *paaX1* truncado y sustituido por un casete de resistencia a Km, de modo que es deficiente en PaaX. Los experimentos de PCR cuantitativa realizados con el cDNA sintetizado a partir de cultivos de ambas cepas, crecidos en

presencia o ausencia de estireno, han producido resultados interesantes. En ausencia de inducción con estireno los niveles de RNA mensajero de *styA* son 3 veces mayores en la estirpe Y2T2X1 que en Y2T2, como resultado de la ausencia del represor PaaX1 en la primera. En los cultivos sometidos a inducción con estireno se detecta también una mayor cantidad de transcrito de *styA* en la estirpe Y2T2X1 que en Y2T2, si bien la diferencia en los niveles de transcrito se acorta al incrementarse el tiempo de exposición a estireno (Figura 5.19). En este caso el estireno sí se transforma en FA-CoA, lo que provoca una pérdida notable y progresiva de la capacidad represora de PaaX, por lo que la transcripción a partir de P_{styA} se llega a abrir por completo.

La ausencia del gen *paaX1* en la estirpe Y2T2X1 no provoca una diferencia en el crecimiento en atmósfera de estireno respecto a Y2T2 (Figura 5.18A). En cambio, el crecimiento de Y2T2X1 en medio mínimo con AFA es más rápido que para Y2T2 (Figura 5.18B). Esta diferencia puede ser debida a los diferentes sistemas que controlan la expresión de los genes *paa* y los genes *sty*. Los primeros están sujetos únicamente a represión por PaaX, mientras que los genes *sty* necesitan además la activación aportada por el sistema StyS/StyR. Así, en presencia de estireno, el sistema StyS/StyR activa la transcripción de los genes *sty*, proceso que se abre por completo cuando se genera FA-CoA y PaaX se libera de su región operadora en *styA*. El efecto de la represión por PaaX podría quedar atenuado por la apertura inmediata del proceso a través del sistema StyS/StyR, lo que podría justificar que no se aprecie apenas diferencia en el crecimiento entre Y2T2 e Y2T2X1. En cambio, los genes *paa* están regulados directa y únicamente por el sistema PaaX-FA-CoA. En presencia de AFA la transcripción de los genes *paa* se encuentra desde el comienzo totalmente abierta en el caso de la estirpe Y2T2X1, lo que le aporta una ventaja frente a la estirpe Y2T2, que tiene que hacer frente en un comienzo a la represión mediada por PaaX.

El conjunto de los resultados anteriores pone de manifiesto que PaaX juega un papel en la regulación de los genes *sty* catabólicos, proporcionando un nivel de control adicional a la activación de la transcripción a partir P_{styA} . El sistema responde a la presencia del sustrato de la ruta (el estireno, a través del sistema regulador de dos componentes StyS/StyR) y a un metabolito intermediario (el FA-CoA, a través de PaaX). Un mecanismo de regulación funcionalmente análogo, en el que el sustrato y un intermediario de la ruta actúan como inductores de la transcripción, ha sido descrito también para el catabolismo del benzoato, donde el benzoato (sustrato) y el *cis,cis*-muconato (intermediario de la ruta) activan la transcripción de *benA* de forma sinérgica mediante su unión al regulador BenM (Bundy y col., 2002; Clark y col., 2004). El benzoato inicia la transcripción de *benA*, pero no se alcanzan los niveles máximos de transcripción hasta que la señal constituida por el *cis,cis*-muconato está presente en el medio, siendo ésta un indicativo de que el proceso de degradación está teniendo lugar de forma apropiada. Por otra parte, cuando la disponibilidad de benzoato disminuye, la señal proporcionada por el *cis,cis*-muconato permite que la transcripción sea todavía suficiente para que se complete el consumo del sustrato

(Clark y col., 2004). Este mecanismo de regulación recuerda en cierto modo al desempeñando por estireno y FA-CoA en la transcripción de los genes *sty* catabólicos, aunque en este caso ambas señales actúan a través de dos reguladores diferentes (StyR y PaaX). En el caso del catabolismo del estireno, PaaX modularía la transcripción de los genes *sty* mediada por StyS/StyR hasta que se alcanzasen niveles suficientes de FA-CoA como para eliminar el efecto represor de PaaX y permitir que la transcripción se abriese totalmente. De igual forma, cuando el estireno se ha degradado y la inducción mediada por StyS/StyR disminuye, los niveles de FA-CoA todavía serían suficientes para permitir una actividad transcripcional suficiente para completar la degradación de los intermediarios. Además, este sistema de respuesta a dos señales (estireno y FA-CoA) podría permitir una rápida disminución de los niveles de transcripción de los genes *sty* catabólicos en circunstancias tales como: i) cuando el estireno no es oxidado a AFA de forma eficaz y algunos de los intermediarios tóxicos de la ruta superior de degradación, como el epoxiestireno o el fenilacetaldehído, pueden acumularse en la célula, ii) cuando otros compuestos aromáticos, como el tolueno y etilbenceno, inducen el sistema StyS-StyR (Alonso y col., 2003b) pero no son transformados en AFA.

Este trabajo amplía el concepto del “regulón de PaaX” al incluir al operón *styABCD* bajo su control, lo que sostiene la idea de que PaaX, modulada por FA-CoA, juega un papel muy importante en la regulación del catabolón del FA-CoA, ya que no sólo regula la expresión de los genes *paa*, sino que también ajusta los niveles de expresión de diferentes unidades transcripcionales (como el operón *styABCD* o el gen *pac*) al de los genes de la ruta central *paa*. Este mecanismo de regulación facilita la expresión coordinada de los genes de la ruta superior (*sty*) e inferior (*paa*) de degradación del estireno en *Pseudomonas* sp. Y2. Además, es probable que PaaX intervenga también en la regulación de otras rutas convergentes con el catabolón del FA-CoA, adquiriendo un carácter de regulador más global del inicialmente considerado.

4. Papel de IHF en la regulación del promotor P_{styA} .

El factor IHF está implicado en la regulación de la transcripción de distintos promotores dependientes del factor σ^{54} y también del factor σ^{70} en diferentes estirpes bacterianas. IHF puede tanto estimular como reprimir la transcripción, actuando de forma directa o en conjunto con otras proteínas reguladoras (Freundlich y col., 1992; Pérez-Martin y col., 1994; Goosen y van de Putte, 1995). Esta proteína de unión al DNA produce una acusada curvatura en la molécula de DNA de aproximadamente 160° (Rice y col., 1996), facilitando en algunos casos la interacción entre proteínas reguladoras de la transcripción y la RNA polimerasa, como sucede en el promotor dependiente de σ^{54} P_u de la ruta metabólica del tolueno codificada en el plásmido pWWO (Pérez-Martín y de Lorenzo, 1995). Existe un sitio de unión de IHF en la región P_{styA} de *P. fluorescens* ST, que solapa parcialmente con el sitio STY1 de unión de StyR, formando el conjunto de ambas la

denominada región URE (*upstream regulatory element*). En esta cepa, IHF potencia la transcripción a partir de este promotor (Santos y col., 2002; Leoni y col., 2005).

Estudios anteriores (Alonso, 2002) empleando el servidor SEQScan identificaron, en la región comprendida entre las posiciones -105 y -79 de la región P_{styA} de *Pseudomonas* sp. Y2, una secuencia de alto índice de identidad con la secuencia consenso de unión de IHF (5´-WWWWW- - - - - -WATCAR- - - - -TTR-3´, donde W es A ó T y R es A ó G). En el presente trabajo se ha comprobado, mediante ensayos de retardo de banda electroforética (Figura 5.22) y de protección frente a la digestión con DNasa I (Figura 5.23), que IHF se une específicamente a la región promotora P_{styA} de *Pseudomonas* sp. Y2 y protege la región que se extiende entre las posiciones -110 y -81. Esta secuencia coincide casi por completo con la anteriormente propuesta (Alonso, 2002) y solapa con el sitio STY1 identificado, al igual que en *P. fluorescens* ST (Leoni y col., 2005). Sin embargo, los ensayos de transcripción *in vitro* realizados no han puesto de manifiesto un incremento en los niveles de transcrito de *styA* frente a concentraciones crecientes de IHF (Figura 5.24C y D); es más, cuando las concentraciones de IHF utilizadas son muy altas se detectan niveles de transcrito inferiores. Este efecto puede ser debido a que, a concentraciones tan elevadas, el IHF se une a zonas de P_{styA} con un alto contenido en A+T y curvatura intrínseca, provocando una alteración en la estructura del promotor que puede llegar a impedir la correcta unión de StyR o de la RNA polimerasa, dificultando así la transcripción. En relación con esto, se ha visto que IHF es capaz de unirse a una sonda derivada de la región P_{styA} de *P. fluorescens* ST que carece de la secuencia de unión de IHF pero presenta la región rica en A y T que se localiza antes del sitio STY2 y presenta curvatura intrínseca (Santos y col., 2002). Se ha descrito que este tipo de regiones curvadas del DNA son capaces de unir IHF en ausencia de un elemento consenso, aunque con menor afinidad (Shimizu y col., 1995). También se ha estudiado en este trabajo mediante transcripción *in vitro* la posibilidad de que IHF actúe ayudando a la formación del complejo abierto de la RNA polimerasa (Figura 5.24E), pero tampoco se ha detectado ningún efecto de IHF en la transcripción a partir de P_{styA} en este caso. Así pues, parece que IHF no ejerce ningún efecto *in vitro* sobre la transcripción a partir de P_{styA} , al menos bajo las condiciones aquí ensayadas. Sin embargo, esto podría ser debido a la ausencia de algún factor celular adicional necesario. Los ensayos *in vivo* realizados (Alonso, 2002; Figura 5.25) tampoco muestran un efecto claro de IHF en la activación de P_{styA} , aunque hay que tener en cuenta que estos estudios se realizaron en *E. coli* y empleando plásmidos que sobreexpresan StyR, condiciones que probablemente compliquen la interpretación de los resultados.

Los ensayos realizados por Sergio Alonso (Alonso, 2002) y los desarrollados en este trabajo parecen apuntar a que, en *Pseudomonas* sp. Y2, IHF se une la región P_{styA} pero no ejerce un efecto potenciador de la transcripción a partir de este promotor. De ser esta suposición cierta, esto constituiría una diferencia respecto al mecanismo de regulación de P_{styA} de *P. fluorescens* ST

(Santos y col., 2002; Leoni y col., 2005). Una situación previamente descrita en la que el factor IHF se une a una región promotora pero no ejerce ningún efecto en su regulación es el caso de la región promotora del gen regulador *xyIR* para la ruta de degradación de toluenos y xilenos (Holtel y col., 1992; Ramos y col., 1997; Marqués y col., 1998).

Los estudios realizados hasta el momento acerca del papel del IHF en la regulación de P_{styA} en *Pseudomonas* sp. Y2 no son suficientes ni concluyentes y se debería profundizar en ellos para poder llegar a una conclusión fiable. Con respecto a esto, sería de gran ayuda la construcción de una estirpe deficiente en IHF derivada de la propia *Pseudomonas* sp. Y2 sobre la que estudiar la transcripción a partir de P_{styA} *in vivo*, con el objetivo de eliminar resultados engañosos debidos a los mecanismos de regulación del hospedador heterólogo.

B. Regulación de la región promotora P_{paaF2} .

1. La expresión del gen $paaF2$ es dependiente de estireno.

Pseudomonas sp. Y2 contiene en su cromosoma tres copias del gen $paaF$ que codifica la actividad FA-CoA ligasa. Estas tres proteínas, PaaF, PaaF2 y PaaF3, presentan una alta identidad en su secuencia de aminoácidos (Figura A.4 del Apéndice). El gen $paaF$, que forma parte del operón $paaABCDEF$ del cluster $paa1$, y el gen $paaF3$, que forma parte del operón $paaA2B2C2D2E2F3$ del cluster $paa2$, codifican FA-CoA ligasas cuya expresión está controlada por PaaX y depende de la presencia de FA-CoA en el medio. La tercera copia de este gen, denominada $paaF2$, se localiza al final del cluster $paa1$ y adyacente a los genes $stySR$ reguladores. Además de la estirpe Y2, las bacterias degradadoras de estireno *P. fluorescens* ST y *P. putida* CA-3 también tienen una copia de un gen homólogo a $paaF$ (originalmente denominado $paaK$) situada delante del operón $stySR$ (Santos y col., 2000; O'Leary y col., 2001). El hecho de que el cluster $paa1$ tenga dos genes ($paaF$ y $paaF2$) que codifican FA-CoA ligasas es una situación muy particular, ya que no se conoce ninguna otra bacteria con una duplicación del gen que codifica esta actividad dentro del mismo agrupamiento génico. Algunos microorganismos (*D. aromatica* RCB, *Burkholderia thailandensis* E264, *Azoarcus* sp. EbN1 y *R. eutropha* JMP134) contienen dos genes que codifican FA-CoA ligasas aerobias en su genoma, pero siempre en localizaciones distintas, no formando parte del mismo cluster (Bartolomé-Martín, 2006). Aunque las copias $paaF$ y $paaF2$ de *Pseudomonas* sp. Y2 se encuentran situadas en el mismo cluster, sus contextos génicos son diferentes. El gen $paaF$ ocupa en el cluster $paa1$ una posición totalmente análoga a la de $paaF3$ en el cluster $paa2$ y a la de genes homólogos $paaF$ en otras especies de *Pseudomonas*. Por el contrario, $paaF2$ no aparece en esos clusters paa , pero sí en posiciones adyacentes al operón $stySR$ en otras estirpes degradadoras de estireno. Todo ello nos indujo a pensar que $paaF2$ podría tener un significado fisiológico distinto, quizá relacionado con el sistema sty .

A partir de *Pseudomonas* sp. Y2T2 ($PaaF^+ PaaF2^+$) se han construido las estirpes mutantes Y2T2 $paaF::Km$ ($PaaF2^+$) e Y2T2 $paaF2::Km$ ($PaaF^+$). Los estudios de crecimiento de estas tres cepas en distintos medios han puesto de manifiesto que las tres son capaces de crecer en placas de LB y en placas de medio mínimo M9 en presencia de estireno suplementado en fase gaseosa. En cambio, mientras que Y2T2 e Y2T2 $paaF2::Km$ ($PaaF^+$) pueden crecer en placas de M9 con AFA como única fuente de carbono, la estirpe Y2T2 $paaF::Km$ ($PaaF2^+$) no es capaz de crecer en estas condiciones (Figura 5.29). Puesto que para el crecimiento en AFA o en estireno es necesaria al menos una actividad FA-CoA ligasa que transforme el AFA en FA-CoA, estos resultados sugieren que la ligasa codificada por $paaF2$ se estaría expresando en presencia de estireno pero no de AFA y

abren la posibilidad de que la expresión de *paaF2* sea dependiente del sistema de regulación de los genes *sty*.

2. Características generales de la región promotora P_{paaF2} .

La región *paaI* de *Pseudomonas* sp. Y2 ha sido estudiada previamente (Velasco y col., 1998; Alonso y col., 2003a; Bartolomé-Martín, 2006) utilizando los programas NNPP2.2 y BPROM para la predicción de posibles promotores σ^{70} . Este estudio sugirió la existencia de cuatro posibles secuencias promotoras tipo σ^{70} situadas antes del gen *paaF2*. Además, la búsqueda de posibles terminadores empleando el programa TransTerm (programado por Sergio Alonso y basado en el algoritmo TransTerm; (Ermolaeva y col., 2000)), condujo a dos posibles terminadores Rho independientes al final del gen *paaX1* y otro al final del gen *paaF2* (aunque este último en sentido contrario a la secuencia) (Bartolomé-Martín, 2006). Estos estudios *in silico* indujeron a pensar que, probablemente, el gen *paaF2* se transcriba como una unidad monocistrónica.

La región intergénica entre *paaX1* y *paaF2*, denominada P_{paaF2} , abarca 426 pb que se encuentran entre el codón de terminación de *paaX1* y el ATG de inicio del gen *paaF2*, anteriormente localizado mediante el uso de los programas informáticos Artemis y MapDraw (Velasco y col., 1998; Alonso y col., 2003a). Análisis informáticos previos (Bartolomé-Martín, 2006) con los programas NNPP2.2 y BPROM permitieron localizar tres posibles sitios +1 de inicio de la transcripción de *paaF2*, situados a 193, 217 y 268 pb del ATG de inicio de *paaF2*, respectivamente. En este trabajo se ha determinado el sitio de inicio de la transcripción real mediante extensión del cebador (Figura 5.31), localizándose éste a 262 pb del ATG de inicio. El sitio +1 identificado está situado después de dos motivos potenciales y solapantes para la unión del factor σ^{70} de la RNA polimerasa: una secuencia -35 / -10 canónica no del todo mala (GTGTCT -18 pb- CAGAAT; consenso TTGACA -17 pb- TATAAT), y otra que presenta homología con una secuencia promotora -10 extendida (TGATACCAG; consenso TGnTAATAT) (Figura A.2). Aunque es atractivo proponer que el promotor P_{paaF2} contiene una región -10 extendida, semejante a la presente en el promotor P_{styA} , sería necesaria la realización de estudios de mutagénesis y funcionalidad para poder determinar si la RNA polimerasa se une y activa la transcripción a partir del posible motivo canónico -35/-10 encontrado o bien a partir de la caja -10 extendida.

3. Papel de la proteína StyR en la regulación del promotor P_{paaF2} .

Los análisis *in silico* de la región P_{paaF2} permitieron localizar la existencia de un sitio putativo de unión de StyR, denominado STY4, entre las posiciones -52 y -37 relativas al sitio de inicio de la transcripción, en una localización parecida a la del sitio STY2 de los promotores P_{styA} de *Pseudomonas* sp. Y2 y *P. fluorescens* ST (Velasco y col., 1998; Leoni y col., 2005; del Peso-Santos y col., 2006). Respecto al sitio STY2 de alta afinidad de unión a StyR de los promotores

P_{styA} de Y2 y *P. fluorescens* ST, el sitio STY4 posee aproximadamente el mismo grado de homología que los sitios STY1 de afinidad media de estos promotores (Figura 5.30).

Los ensayos de retardo de banda electroforética realizados con la sonda F2, derivada de la región promotora P_{paaF2} , y la proteína de fusión His₆-StyR han permitido comprobar que la unión de His₆-StyR fosforilada al DNA es específica y dependiente de la concentración de la proteína y que, al mutagenizar la secuencia STY4, la proteína pierde su capacidad de unión al DNA, confirmando que STY4 es un sitio real para la unión, al menos *in vitro*, de StyR. Además, His₆-StyR fosforilada se une y retarda a la sonda F2 a concentraciones similares a las que retarda a la sonda E2B1, derivada de P_{styA} y que contiene el sitio STY2 de alta afinidad (Figura 5.33). La sonda E1B1 (con los sitios de unión STY1, STY2 y STY3) parece tener más afinidad por StyR, ya que resulta retardada a la mitad de concentración de His₆-StyR fosforilada. Como ya se comentó anteriormente, el diferente número de sitios STY en estas sondas podría ser la causa de esta diferencia en la afinidad de la proteína por unirse a ellas, ya que se ha propuesto que la unión se realiza de forma cooperativa (Leoni y col., 2003; Leoni y col., 2005). Ensayos previos llevados a cabo por Leoni y col. (2005) pusieron de manifiesto la distinta afinidad de StyR por la unión a los diferentes sitios STY, de forma que son necesarias concentraciones de His₆-StyR fosforilada de 0,5, 2,7 y 16 μ M para comenzar a apreciar un retardo de las sondas de DNA que tienen únicamente las cajas STY2, STY1 ó STY3, respectivamente (Leoni y col., 2005). Basándonos en estos resultados cabría esperar que la máxima concentración de His₆-StyR fosforilada que se ha empleado en los ensayos llevados a cabo en este trabajo no fuera suficiente para unirse a STY3, por lo podríamos considerar entonces que la sonda E2B1 sólo dispondría de un sitio efectivo de unión a StyR (STY2) y la E1B1 de dos sitios de unión de la proteína (STY2 y STY1) efectivos. La afinidad aparente de StyR por las diferentes cajas STY *in vitro* se analizó mediante varios experimentos de competición entre distintas sondas (Figura 5.33E y F), observándose que un exceso de la sonda F2 sin marcar competía por la unión de His₆-StyR fosforilada con las sondas F2 ó E2B1 de manera parecida, mientras que la sonda F2S (que contiene el motivo STY4 mutado) no competía por esa unión. Esto indica que la sonda F2 sin marcar compite con la unión de StyR a la caja STY2 de la sonda E2B1 al menos de una forma tan eficaz como compite con la unión de StyR a la caja STY4 de F2 (Figura 5.33E y F), y permite concluir que la caja STY4 constituye un sitio de alta afinidad por StyR, a pesar de ser un palíndromo incompleto.

Además de unirse a la región P_{paaF2} , la proteína His₆-StyR fosforilada activa la transcripción *in vitro* a partir de P_{paaF2} (Figura 5.34), aunque este promotor parece ser algo más débil que P_{styA} , ya que los niveles de transcrito obtenidos en las mismas condiciones son inferiores (Figura 5.34).

Para confirmar el papel de StyR como activador de la transcripción a partir de P_{paaF2} se han llevado a cabo una serie de estudios *in vivo*. En primer lugar se introdujeron en *Pseudomonas* sp. Y2 tres plásmidos testigo (pRWF2A, pRWF2B y pRWF2C) que contienen distintos fragmentos de

la región P_{paaF2} fusionados al gen $lacZ$, y se llevaron a cabo ensayos de actividad β -galactosidasa (Figura 5.35). Los cultivos de Y2 en los que se había introducido pRWF2A, que contiene la región comprendida entre las posiciones -200 y +292 de P_{paaF2} - $paaF2$ fusionada a $lacZ$, presenta los niveles de actividad más elevados. En el caso del plásmido pRWF2B, que lleva únicamente la región comprendida entre los sitios -2 y +292 de $paaF2$, sólo se detectaron niveles de transcripción basal comparables a las del plásmido control pRW2A, puesto que carece de los motivos putativos del promotor σ^{70} identificados y también del sitio STY4. El hecho de que plásmido pRWF2C, que porta el gen $lacZ$ bajo el control de la región que se extiende entre las posiciones -200 y +10 de P_{paaF2} , presente niveles de actividad de aproximadamente la mitad de los de pRWF2A resulta de especial interés. Como ya se ha mencionado, el sitio de inicio de la transcripción de P_{paaF2} se sitúa 262 nt antes del codón de inicio de $paaF2$, de forma que la región comprendida entre las posiciones +1 y +262 codifica una región del RNA mensajero que no se traduce (5'-UTR, *untranslated leader region*). El hecho de que la mayoría de la 5'-UTR no se encuentre en el plásmido pRWF2C podría explicar la diferencia en los niveles de transcripción observados en los cultivos de Y2 con los plásmidos pRWF2A ó pRWF2C. En los organismos procariontes, las 5'-UTR's pueden controlar la expresión génica a través de diversos mecanismos (Fuglsang, 2005; Komarova y col., 2005; Kaberdin y Bläsi, 2006) que normalmente implican un incremento o una disminución en los niveles de la transcripción o de la traducción, mediante la formación de estructuras secundarias que permiten la unión de elementos reguladores y/o afectan la estabilidad del RNA mensajero. Estos mecanismos incluyen cortes por RNasas, presencia de *riboswitches* que unen pequeños metabolitos, o elementos que unen RNAs pequeños reguladores. El análisis de la curvatura de la 5'-UTR de P_{paaF2} mediante el uso del servidor m-fold (apartado 15.5 de Materiales y métodos), muestra que esta región de 262 pb es capaz de formar estructuras secundarias y horquillas en su RNA mensajero. La Figura 6.4 muestra las dos estructuras secundarias más probables que son predichas para estos 262 nt mediante el servidor m-fold. Los resultados preeliminares que se muestran en este trabajo abren la posibilidad de que la 5'-UTR que se localiza al comienzo de $paaF2$ participe de alguna manera en la modulación de los niveles de PaaF2. El análisis del papel que juega esta region en el control de los niveles de PaaF2 es una cuestión interesante para futuras investigaciones.

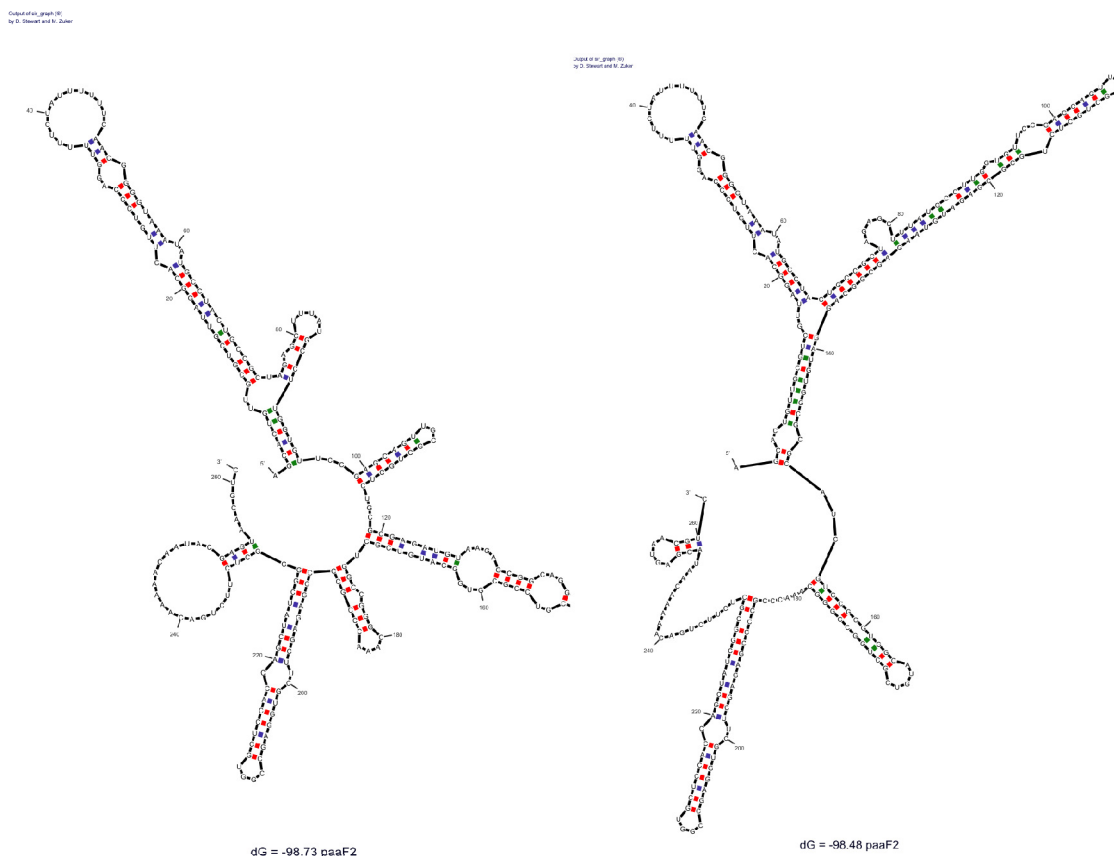


FIGURA 6.4. Predicción de la estructura secundaria de la 5'-UTR de *paaF2*. En la figura se muestran las dos estructuras secundarias más estables que se formarían en esta región del RNA según la predicción utilizando el servidor m-fold.

El estudio *in vivo* del papel que ejerce StyR en la transcripción a partir de P_{paaF2} se ha completado utilizando sistemas testigo en monocopia. Para ello se construyeron diversas estirpes derivadas de *Pseudomonas* sp. Y2: i) *Pseudomonas* sp. Y2 F2L, que lleva la fusión traduccional P_{paaF2} (posiciones -200 a +292 relativas al sitio de inicio de la transcripción)-*lacZ* integrada en monocopia en el cromosoma de Y2; ii) la estirpe *Pseudomonas* sp. Y2 F2L *styR*::Gm, derivada de la anterior pero en la que *styR* se encuentra parcialmente deletado y sustituido por un casete de resistencia a Gm, y iii) la estirpe *Pseudomonas* sp. Y2 F2SL, portadora de la fusión traduccional P_{paaF2S} (-200 a +292)-*lacZ* en monocopia en la que la secuencia STY4 está mutagenizada de la misma forma que la sonda F2S empleada en los ensayos de retardo en gel (Figura 5.32). La exposición a estireno activa la transcripción a partir del promotor P_{paaF2} en la estirpe F2L, en contraste con lo observado en la cepa testigo F2L Δ *styR*::Gm y en los clones ensayados de F2SL (Figura 5.39). Los resultados anteriores confirman que la activación transcripcional de P_{paaF2} tiene lugar en presencia de estireno y está mediada por StyR, que ejerce su acción a través de su unión a la región STY4.

4. Estudio de inductores y represores del promotor P_{paaF2} .

Trabajos anteriores (Alonso y col., 2003b) realizados con la estirpe testigo Y2PAL, que contiene la fusión P_{styA} -*lacZ* en monocopia, habían demostrado que el promotor P_{styA} de *Pseudomonas* sp. Y2 se induce no sólo por estireno sino también por una serie de compuestos estructuralmente relacionados (tolueno, etilbenceno, 2-feniletanol) y por metabolitos intermediarios de la ruta de degradación del estireno (epoxiestireno, fenilacetaldehído). Los ensayos realizados en este trabajo, simultáneamente con las cepas testigo Y2PAL e Y2F2L, han puesto de manifiesto que el promotor P_{paaF2} se comporta de forma muy similar al promotor P_{styA} , ya que se induce, con niveles diferentes, por una batería de compuestos, entre los que se encuentran el estireno, epoxiestireno, fenilacetaldehído, 2-feniletanol, 2-feniletilamina, tolueno y etilbenceno (Tabla 5.1). Un experimento análogo llevado a cabo con la estirpe F2L $\Delta styR::Gm$ no permitió detectar inducción con ninguno de los compuestos ensayados, lo que demuestra que la expresión de los genes *sty* catabólicos bajo el control de P_{styA} y la expresión de *paaF2* a través de P_{paaF2} están reguladas de forma coordinada a través del sistema activador de la transcripción StyS/StyR, sensible a una batería de compuestos. Así pues, la regulación del gen *paaF2* parece estar integrada, junto con los genes *styABCD* catabólicos, dentro de lo que se podría definir como “regulón de StyR”.

Se ha descrito, en base a la homología del sistema StyS/StyR con otros sistemas reguladores de dos componentes, que, en presencia de estireno u otra señal inductora, StyS se autofosforila y transfiere el fosfato a StyR, que adquiere entonces su conformación activa para facilitar el inicio de la transcripción a partir de P_{styA} (O'Leary y col., 2002). Sin embargo, aunque se han realizado estudios acerca de la estructura de StyR y de los residuos de esta proteína que podrían estar implicados en el proceso de fosforilación, dimerización y unión al DNA (Milani y col., 2005; Rodes, 2007), hasta la fecha no hay en la bibliografía información acerca del mecanismo molecular por el cual la proteína sensora StyS reconoce la correspondiente señal activadora (el estireno u otros compuestos inductores del sistema StyS/StyR) y se activa. Recientemente se han producido avances en el estudio del mecanismo por el cual el sistema TodS/TodT, que controla la expresión de la ruta tolueno dioxigenasa responsable de la transformación del tolueno en intermediarios TCA (Zylstra y Gibson, 1989; Mosqueda y col., 1999), se induce frente a determinados estímulos (Lacal y col., 2006; Busch y col., 2007). Este sistema es parecido a StyS/StyR y la proteína sensora histidina quinasa, TodS, presenta una estructura muy similar a StyS, ya que tiene dos supradominios, conteniendo cada uno un dominio sensor PAS y un dominio HK, que están separados por un dominio receptor (Lau y col., 1997; Mosqueda y col., 1999). El tolueno y una serie de compuestos estructuralmente relacionados que inducen la transcripción a partir de P_{todX} se unen al subdominio PAS del dominio N-terminal de TodS y promueven la autofosforilación de TodS (Busch y col., 2007).

Por el contrario, otros compuestos estructuralmente relacionados con el estireno no son capaces de inducir la transcripción de los promotores P_{styA} y P_{paaF2} de *Pseudomonas* sp. Y2 (Alonso y col., 2003b; Tabla 5.1), poniendo otra vez de manifiesto la similitud en la regulación de ambos promotores.

El promotor P_{paaF2} de *Pseudomonas* sp. Y2 es reprimido por el AFA y por medio rico LB incluso en presencia de estireno, mientras que ni el glicerol ni la glucosa ejercen represión catabólica sobre él. Este patrón de regulación es idéntico al observado para P_{styA} (Figura 5.41), lo que sugiere la posibilidad de una regulación global conjunta de ambos promotores.

El mecanismo que subyace al efecto represor del AFA, común a los sistemas *sty* de distintas estirpes de *Pseudomonas* (Santos y col., 2000; O'Leary y col., 2001; Alonso, 2002; Alonso y col., 2003b) permanece todavía desconocido. En *Pseudomonas* sp. Y2 el AFA reprime la expresión de los genes *sty* catabólicos y *stySR* reguladores (Bartolomé-Martín, 2006), al igual que ocurre en *P. putida* CA-3 (O'Leary y col., 2001). En *P. fluorescens* ST, en cambio, la expresión de *stySR* es constitutiva (Santos y col., 2000). Estudios recientes sobre la expresión de los genes *sty* en *Pseudomonas* sp. Y2 apuntan a que, tanto el AFA como el LB, reprimen la expresión de los genes *sty* catabólicos y reguladores por mecanismos que podría implicar en parte a la proteína Crc, aunque parece que la represión ejercida por aquellos es canalizada mayoritariamente a través de otras vías de regulación, lo que implicaría la existencia de varios niveles superimpuestos e independientes de regulación en respuesta a la misma señal, que sería transmitida a través de diferentes vías (Bartolomé-Martín, 2006). En cualquier caso, la semejanza entre los promotores P_{styA} y P_{paaF2} que se describen en este trabajo, tanto a nivel estructural como funcional, hacen sospechar que ambos tienen una participación paralela en el proceso de represión por AFA.

5. Papel de la proteína PaaX en la regulación del promotor P_{paaF2} .

Se ha querido estudiar también si la expresión de *paaF2* está controlada transcripcionalmente por el represor PaaX, de la misma forma que lo está la transcripción de los genes *sty* catabólicos y el resto de los genes *paa*. Los análisis *in silico* de la región P_{paaF2} y el comienzo de *paaF2* no han llevado a localizar ninguna secuencia similar al consenso (GATACA- 26 pb- TGTATC) definido para los sitios de unión de PaaX en otros promotores, aunque sí se localizaron motivos aislados de 6 pb que diferían en 1 ó 2 bases respecto alguna de las dos repeticiones invertidas (GATACA ó TGTATC) de la caja. Los ensayos de retardo de la banda electroforética de distintas sondas derivadas de la región P_{paaF2} y del comienzo de *paaF2* por su unión a MBP-PaaX1 permitieron detectar una cierta unión que parecía de naturaleza inespecífica (Figuras 5.42 y 5.43). Esta sospecha se confirmó al realizar ensayos de protección frente a la digestión por DNasa I, donde no se vislumbraba protección alguna por MBP-PaaX1 en las condiciones en que se puede observar la protección de una sonda derivada de la región P_{styA} . Los ensayos de transcripción *in vitro* pusieron

de manifiesto que PaaX no reprime *in vitro* la transcripción de P_{paaF2} , a diferencia de su acción represora de la transcripción a partir de P_{styA} en las mismas condiciones (Figura 5.44). Además, se realizaron ensayos de PCR cuantitativa a partir de cultivos de Y2T2 e Y2T2X1 crecidos en M9 con glicerol (condiciones de no inducción) expuestos o no a una atmósfera saturada de estireno, con el objetivo de determinar si PaaX afecta de alguna forma a la expresión de $paaF2$ *in vivo*. En condiciones basales, la transcripción de $styA$ es 4 veces mayor en el caso de la estirpe Y2T2X1 que en el caso de Y2T2, mientras que los niveles de transcrito de $paaF2$ no varían significativamente al comparar ambas estirpes. Cuando los cultivos se exponen a estireno durante 5 minutos, se pueden apreciar niveles de expresión de $styA$ algo mayores para Y2T2X1 que para Y2T2, aunque la diferencia es muy pequeña, debido a que, tras la exposición a estireno, el FA-CoA generado anula casi totalmente el efecto represor de PaaX. Los niveles de transcrito de $paaF2$ en esas mismas condiciones no varían significativamente entre ambas estirpes, incluso parecen un poco menores en la estirpe Y2T2X1, lo que parece indicar que PaaX no ejerce un papel represor sobre la transcripción a partir de P_{paaF2} *in vivo*, a diferencia de lo que ocurre para P_{styA} .

Los resultados de este bloque de experimentos sugieren que la transcripción a partir de P_{paaF2} no está sujeta a represión por PaaX, a diferencia de lo que ocurre con P_{styA} .

6. Papel de IHF en la regulación del promotor P_{paaF2} .

El análisis *in silico* de la región P_{paaF2} no ha permitido encontrar ningún sitio putativo de unión de IHF en esta región. Así mismo, los ensayos de retardo de banda electroforética realizados en este trabajo ponen de manifiesto que IHF no se une a esta región promotora (Figura 5.45). Por tanto, parece que IHF no participa en la regulación de la transcripción del gen $paaF2$, o al menos de una forma directa.

7. PaaF2 es una FA-CoA ligasa auxiliar específica de estireno.

La funcionalidad de las FA-CoA ligasas PaaF y PaaF2 se ha comprobado mediante ensayos de actividad FA-CoA ligasa en cultivos de las estirpes Y2T2 ($PaaF^+$, $PaaF2^+$), Y2T2 $paaF::Km$ ($PaaF2^+$) e Y2T2 $paaF2::Km$ ($PaaF^+$) crecidas en distintos medios (Figura 5.46). Según lo esperado, no se detectó actividad en los cultivos crecidos en glicerol, ya que este compuesto no induce la expresión de esos genes. En presencia de estireno, la actividad observada para Y2T2 era unas 3 veces mayor ($69,37 \pm 2,63$ U/mg proteína) que para las estirpes mutantes derivadas de ella ($22,74 \pm 1,54$ U/mg proteína para Y2T2 $paaF::Km$ y $20,86 \pm 0,9$ U/mg proteína para Y2T2 $paaF2::Km$). Esto es el resultado, probablemente, de la existencia de dos copias activas del gen en la cepa Y2T2. En presencia de AFA, Y2T2 $paaF::Km$ ($PaaF2^+$) no muestra actividad ligasa, demostrando una vez más que es el estireno, y no el AFA, el responsable de la inducción del gen $paaF2$. En este medio sólo se detecta actividad FA-CoA ligasa en las cepas Y2T2 e Y2T2

paaF2::Km (30.36 ± 1.25 U/mg proteína y 24 ± 6.54 U/mg proteína, respectivamente). La actividad de ambas estirpes es muy parecida, de acuerdo con el hecho de que el AFA sólo induce la expresión de *paaF*, presente en ambas. Ensayos de PCR cuantitativa indican que, en el caso de Y2T2 *paaF::Km* (PaaF⁺), el gen *paaD* del cluster *paa1* se expresa en cultivos crecidos en medio con estireno, pero no en glicerol y AFA (Figura 5.47). Estos resultados indican que la ausencia de la expresión de *paaF2* en los cultivos de Y2T2 *paaF::Km* no sólo interrumpe el proceso de degradación del AFA (al estar bloqueada la primera etapa de la degradación de este compuesto), sino que impide que se genere el FA-CoA necesario para que se elimine la represión por PaaX y, como consecuencia de lo anterior, no se produce expresión alguna de los genes *paa*, todo lo cual conlleva a la incapacidad de esta estirpe para crecer en medio con AFA. Estos resultados permiten interpretar los crecimientos en placa comentados anteriormente (Figura 5.29), demostrando que es necesaria la expresión de al menos un gen codificador de la actividad FA-CoA ligasa para que tenga lugar la expresión de los genes *paa*.

Todos estos datos parecen indicar que PaaF2 es una ligasa auxiliar dependiente de estireno. Con el objetivo de profundizar en el significado biológico de la presencia de esta copia adicional de ligasa se llevaron a cabo ensayos de crecimiento de Y2T2 (PaaF⁺ PaaF2⁺) e Y2T2 *paaF2::Km* (PaaF⁺) en medio mínimo con glicerol, estireno o AFA como fuente de carbono. La ausencia de PaaF2 no altera la velocidad de crecimiento en ninguno de los medios ensayados, sugiriendo que la presencia de PaaF2 no es imprescindible para el crecimiento de esta estirpe. Sin embargo, en los cultivos en estireno, el mutante Y2T2 *paaF2::Km* presenta una adaptación más lenta al sustrato, lo que se traduce en una fase de latencia más larga que para la cepa Y2T2. Paralelamente, se llevaron a cabo cultivos mixtos partiendo de una misma proporción de ambas estirpes y se determinó el porcentaje de la estirpe mutante en *paaF2* en muestras tomadas en la fase exponencial de esos cultivos. La adaptación más lenta del mutante al medio con estireno se tradujo en un menor porcentaje de esta estirpe en el cultivo mixto ($44 \pm 0,7$ %) a diferencia de lo que ocurre en los cultivos en glicerol ($52 \pm 1,5$ %) y AFA ($49,5 \pm 0,8$ %), donde la proporción de ambas estirpes es prácticamente idéntica (Figura 5.48). Por tanto, PaaF2 parece jugar un papel clave en la respuesta inicial a la presencia de estireno en el medio, acelerando el proceso de la adaptación y crecimiento frente a esta fuente de carbono en los primeros momentos.

8. El papel de PaaF2 en la regulación del catabolismo del estireno.

Los resultados obtenidos en este trabajo ponen al descubierto un mecanismo de regulación que sitúa al gen *paaF2* de *Pseudomonas* sp. Y2, previamente considerado como parte del cluster *paa1*, bajo el control del sistema de dos componentes StyS/StyR y, por tanto, bajo un mecanismo de regulación dependiente de estireno. Esta afirmación se apoya en hechos tales como: i) el estireno y otros compuestos relacionados que activan el sistema regulador StyS/StyR inducen la transcripción

de los promotores P_{styA} (del operón *styABCD* catabólico) y P_{paaF2} de forma coordinada; ii) la actividad FA-CoA ligasa codificada en *paaF2* es inducida de forma específica en respuesta a estireno pero no a AFA; iii) la transcripción a partir de P_{paaF2} es estrictamente dependiente de StyR fosforilado, tanto *in vitro* como *in vivo*; iv) StyR se une de forma específica al motivo STY4 localizado en la región P_{paaF2} antes del sitio de inicio de la transcripción y de los potenciales motivos de unión de σ^{70} localizados que podrían constituir el *core* del promotor P_{paaF2} .

A pesar de que la existencia de tres actividades FA-CoA ligasa en *Pseudomonas* sp. Y2 pueda parecer metabólicamente redundante, el hecho de que en *P. fluorescens* ST y *P. putida* CA-3 también se encuentre un gen homólogo a *paaF2* adyacente a los genes *stySR* induce a pensar que estas estirpes degradadoras de estireno han conservado esta FA-CoA ligasa auxiliar dependiente de estireno porque probablemente les aporte una ventaja selectiva en la competición frente a otros microorganismos a la hora de crecer en un medio con este compuesto.

Pseudomonas sp. Y2 posee 3 copias del gen *paaF* y, en condiciones de laboratorio, la presencia única de PaaF ó PaaF3 es suficiente para permitir el crecimiento empleando estireno o AFA como fuentes de carbono ((Bartolomé-Martín y col., 2004); Figuras 5.29 y 5.48). Aunque la actividad de PaaF2 no es condición indispensable para el crecimiento de la cepa Y2 a expensas de estireno (por lo menos en las condiciones de laboratorio ensayadas), su ausencia provoca una adaptación más lenta frente a esta fuente de carbono.

En presencia de estireno, StyR se encuentra en su forma activa (fosforilada) para poder iniciar la transcripción de los genes *sty* catabólicos. Sin embargo, P_{styA} se encuentra sometido a represión por PaaX, por lo que la activación de la transcripción no es completa en los primeros momentos, y sólo es del todo completa cuando se ha generado el suficiente FA-CoA, a expensas del estireno, para poder liberar a PaaX de sus regiones operadoras. PaaX proporciona de esta forma un mecanismo para coordinar la expresión de las actividades de los genes de la ruta superior *sty* con las de los genes de la ruta inferior de degradación del estireno o ruta *paa*, evitando así que se produzca una acumulación de metabolitos intermediarios de la degradación del estireno que pudieran resultar tóxicos para la célula en la ausencia de las actividades codificadas por los genes *paa*. Sin embargo, este mecanismo de regulación supondría un retraso en la adaptación al crecimiento en estireno hasta que se hubiera generado suficiente FA-CoA como para que se produjera la total des-represión de los genes *sty* y *paa*. La expresión del gen *paaF2* tiene lugar en presencia de estireno gracias al sistema StyS/StyR, pero no está sujeta a represión por PaaX, siendo el único gen de todo el sistema *sty-paa* que no se encuentra regulado por PaaX, por lo que su transcripción se producirá más rápido. Así, la regulación de PaaF2 mediada por StyR proporciona un sistema fisiológico para la rápida producción de una de las proteínas encargadas de generar el FA-CoA necesario para eliminar de forma coordinada la represión por PaaX de las actividades *sty* y *paa* requeridas para el catabolismo del estireno. Además, es posible que el 5'-UTR localizado al

comienzo de *paaF2* participe de alguna manera en la fina modulación de los niveles PaaF2. De esta forma, PaaF2 puede considerarse como una FA-CoA ligasa auxiliar dependiente de estireno, cuya función es proporcionar una des-represión rápida y coordinada de los genes *sty* y *paa*.

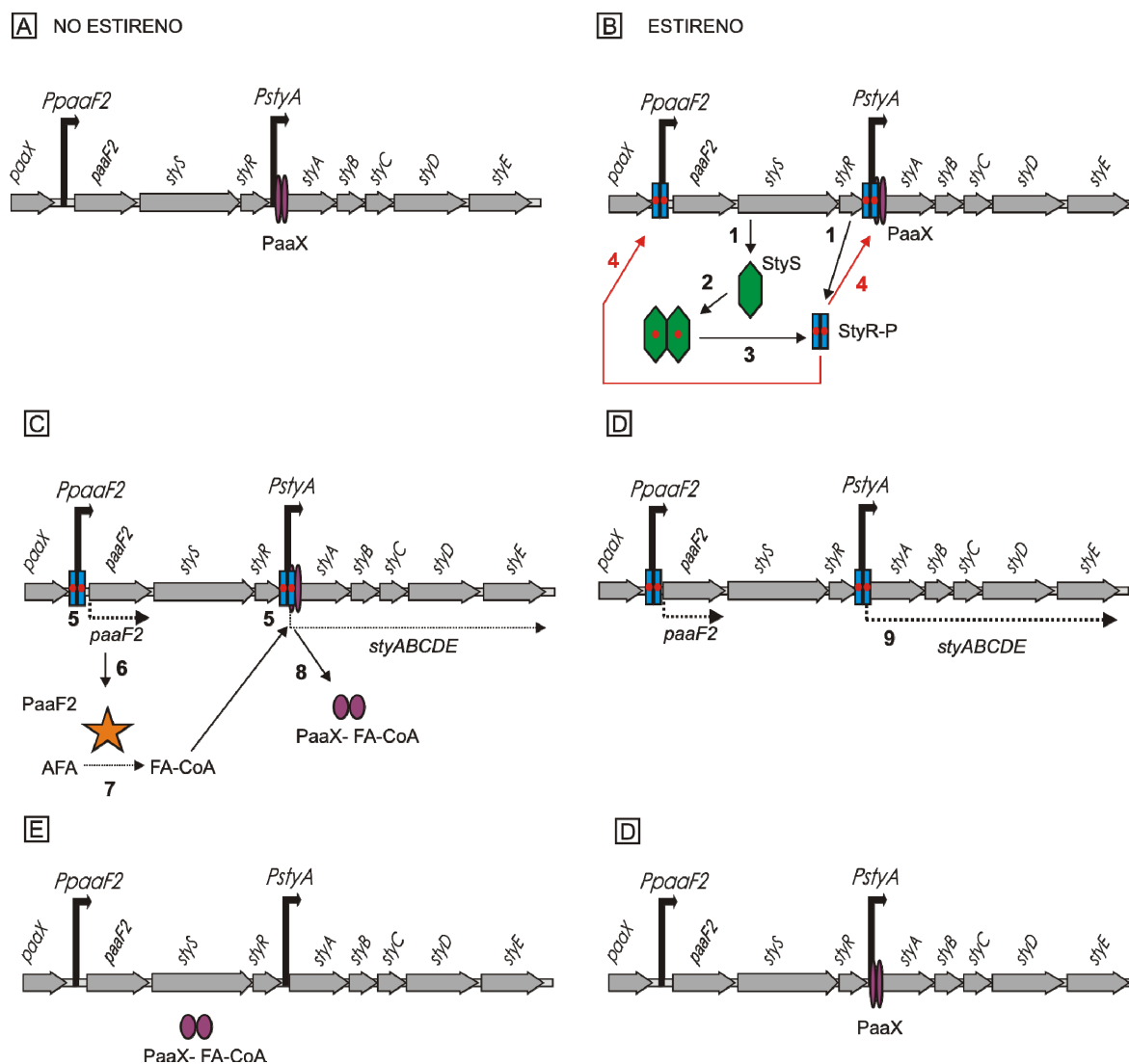


FIGURA 6.5. Mecanismo propuesto para la regulación de los genes *sty* catabólicos. **A.** En ausencia de estireno (condiciones de no inducción) la proteína PaaX (en morado) se encuentra unida a su región operatoria al comienzo de *styA* y la transcripción de los genes *sty* catabólicos está cerrada. **B.** En presencia de estireno en el medio, se sintetizan las proteínas StyS y StyR (1); StyS se autofosforila (2) y transfiere el grupo fosfato a StyR (3), que presenta así su conformación activa para unirse en forma dimérica a los correspondientes sitios STY de los promotores *P_{paaF2}* y *P_{styA}*. **C.** En un primer momento la transcripción a partir de *P_{styA}* no está del todo abierta, ya que aún está presente el efecto represor de PaaX (5). En cambio, la transcripción a partir de *P_{paaF2}* está totalmente activada (5), ya que sólo está regulada positivamente por StyR-P. De esta forma, se genera rápidamente PaaF2 (6), que transforma el AFA procedente de la degradación del estireno en FA-CoA (7). El FA-CoA provoca un cambio conformacional en la proteína PaaX, que se libera de sus regiones operatorias (8). **D.** Cuando se ha generado suficiente FA-CoA a expensas del estireno se vence la represión por PaaX y la transcripción de los genes *sty* catabólicos está totalmente abierta (9). **E.** Cuando el estireno empieza a escasear en el medio disminuyen progresivamente los niveles de la proteína activadora StyR, hasta llegar a desaparecer; sin embargo, todavía queda suficiente FA-CoA para que la transcripción de los genes *paa* permanezca abierta para que se acaben de degradar los distintos intermediarios procedentes del metabolismo del estireno. **F.** En ausencia de estireno, y cuando los niveles de FA-CoA disminuyen, el sistema vuelve a estar cerrado.

CONCLUSIONES

VII. Conclusiones.

1. El promotor P_{styA} de los genes *styABCD* catabólicos de *Pseudomonas* sp. Y2 contiene tres sitios putativos (STY1, STY2 y STY3) para la unión de StyR análogos a los descritos para P_{styA} de *P. fluorescens* ST y localizados entre las posiciones -112 y -97, -49 y -34, y +15 y +30, respectivamente. Además, este promotor incluye un sitio putativo para la unión de PaaX al comienzo del gen *styA*, entre las posiciones +12 y +48, y una secuencia putativa para la unión de IHF, que se extiende entre las posiciones -105 y -79 y solapa parcialmente con el sitio STY1.
2. La proteína StyR se une a la región P_{styA} y activa la transcripción de los genes *styABCD* catabólicos a partir de este promotor. La fosforilación de StyR es imprescindible para que se produzca esta activación.
3. La proteína PaaX se une de forma específica al comienzo del gen *styA*, en un sitio de unión cuya secuencia coincide con la determinada mediante el análisis *in silico* y consiste en dos repeticiones invertidas de 6 pb separadas por 25 nt. La mutación de la repetición de 6 pb más conservada respecto al consenso no permite la unión de PaaX al DNA. PaaX es un dímero, y se une a su operador en *styA* en forma dimérica. La unión de PaaX a su región operadora se deshace en presencia de FA-CoA pero no de AFA.
4. La proteína PaaX reprime la transcripción del operón *styABCD* catabólico a partir de P_{styA} *in vitro*. Esta represión es eliminada en presencia de FA-CoA.
5. La proteína PaaX ejerce un papel represor *in vivo* sobre la transcripción a partir de P_{styA} , tal y como demuestran tanto los estudios realizados con *Pseudomonas* sp. Y2T2 y la estirpe deficiente en *paaXI* derivada de ella Y2T2X1 como los realizados en *E. coli* W14 utilizando un sistema de dos plásmidos. Este efecto represor es más notable en condiciones basales (ausencia de estireno) y va desapareciendo a medida que el sistema es inducido y se incrementan los niveles de FA-CoA.
6. El factor IHF se une de forma específica al promotor P_{styA} y protege la región comprendida entre las posiciones -110 y -81.

7. La unión del factor IHF al promotor P_{styA} no produce ningún efecto sobre la transcripción ni *in vitro* ni *in vivo*, al menos en las condiciones experimentales utilizadas en este trabajo.
8. El sitio +1 de la transcripción de $paaF2$ se localiza 266 nt antes que el ATG de inicio de la ORF. El promotor P_{paaF2} contiene una secuencia -10 extendida putativa y un motivo canónico -35/-10, también putativo.
9. El promotor P_{paaF2} del gen $paaF2$ de *Pseudomonas* sp. Y2 contiene un sitio putativo, STY4, para la unión de StyR cuya secuencia es análoga a los sitios STY descritos para P_{styA} . Sin embargo, no se han encontrado en él sitios putativos para la unión de PaaX o de IHF.
10. La proteína StyR se une específicamente a la región promotora P_{paaF2} . La unión tiene lugar en el sitio STY4 localizado mediante los análisis *in silico* y que se extiende entre las posiciones -52 y -37 respecto al sitio de inicio de la transcripción. La mutación de la secuencia del sitio STY4 impide la unión de StyR al DNA.
11. La proteína StyR fosforilada activa la transcripción a partir de P_{paaF2} *in vitro*.
12. La transcripción a partir de P_{paaF2} en presencia de estireno es mediada *in vivo* por StyR. Esta proteína ejerce su acción a través de su unión a STY4. La mutación del gen $styR$ o la alteración del sitio STY4 impiden la actividad del promotor *in vivo*.
13. La proteína PaaX no se une de forma específica a la región P_{paaF2} en condiciones en las que sí lo hace a $styA$. PaaX no reprime la transcripción a partir del promotor P_{paaF2} ni *in vitro* ni *in vivo*.
14. El factor IHF no se une a la región P_{paaF2} .
15. El mensajero de $paaF2$ presenta una larga secuencia (5'-UTR) que no se traduce. La ausencia de esta región 5'-UTR de 266 nt provoca una reducción a la mitad de la actividad de P_{paaF2} .

16. La transcripción a partir de los promotores P_{styA} y P_{paaF2} se induce por estireno y por los intermediarios de la ruta de la transformación de este compuesto en AFA, así como por otros compuestos aromáticos estructuralmente relacionados.
17. La transcripción a partir del promotor P_{paaF2} no sufre represión catabólica por glicerol ni por glucosa, aunque sí se reprime en presencia de LB y de AFA, de forma análoga a lo que ocurre con el promotor P_{styA} .
18. La expresión de los dos genes que codifican la actividad FA-CoA ligasa en *Pseudomonas* sp. Y2T2 está regulada de manera distinta, tal y como demuestra el crecimiento de las estirpes mutantes *Pseudomonas* sp. Y2T2 $paaF::Km$ e Y2T2 $paaF2::Km$. La estirpe *Pseudomonas* sp. Y2T2 $paaF2::Km$ puede crecer en LB o en medio mínimo con estireno o AFA, mientras que la estirpe *Pseudomonas* sp. Y2T2 $paaF::Km$, que sólo tiene la copia $paaF2$ en su cromosoma, es capaz de crecer en LB o en medio mínimo con estireno, pero es incapaz de crecer en AFA como única fuente de carbono. Esto demuestra que el gen $paaF$ se expresa en presencia de estireno o de AFA, pero el gen $paaF2$ se expresa únicamente en presencia de estireno.
19. La actividad FA-CoA ligasa codificada por el gen $paaF2$ sólo es detectable en cultivos en estireno, pero no en AFA o glicerol.
20. Los genes paa no se expresan en cultivos de Y2T2 $paaF::Km$ crecidos en medio mínimo con glicerol y AFA, como consecuencia de la ausencia de una actividad FA-CoA ligasa funcional en estas condiciones.
21. PaaF2 es una FA-CoA ligasa auxiliar dependiente de estireno que permite una adaptación más rápida de *Pseudomonas* sp. Y2 a medios con estireno, tal y como demuestra el hecho de que la estirpe *Pseudomonas* sp. Y2T2 $paaF2::Km$ sigue el mismo patrón de crecimiento que la estirpe Y2T2 en medio con AFA o con glicerol y, sin embargo, presenta una fase de adaptación al medio con estireno más lenta que *Pseudomonas* sp. Y2T2.

ANEXO



VIII. Anexo.

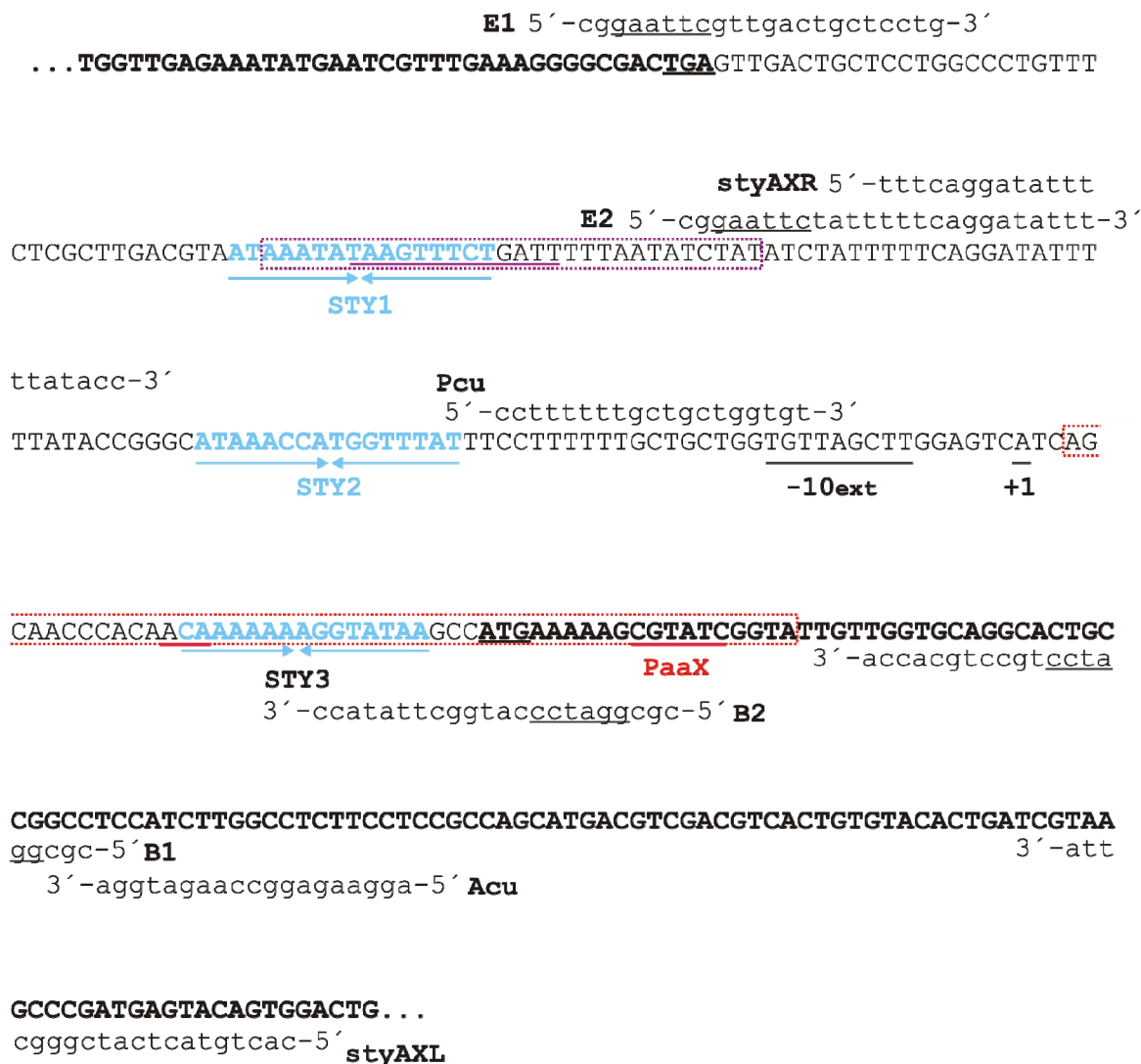
Anexo I. Secuencia del promotor P_{styA} de *Pseudomonas* sp. Y2.

FIGURA A.1. Secuencia de la región promotora P_{styA} de *Pseudomonas* sp. Y2. Las regiones 3' de *styR* y 5' de *styA* se muestran en negrita. Los sitios de unión de StyR de alta (STY2), media (STY1) y baja afinidad (STY3) se representan en azul y con dos flechas invertidas. El sitio STY2 coincide con el sitio de unión de StyR propuesto anteriormente para *Pseudomonas* sp. strain Y2 (Stybox; Velasco y col., 1998). La caja -10 extendida (-10ext) del promotor P_{styA} , el sitio +1 de inicio para la transcripción de *styA*, el codón de inicio de *styA* y el codón de terminación de *styR* están subrayados. Las dos secuencias equivalentes a las repeticiones invertidas de 6 pb que constituyen el motivo de unión de PaaX aparecen subrayadas en rojo. Nótese que en la secuencia situada más a la izquierda sólo se han señalado los tres nucleótidos que coinciden con la secuencia consenso. La secuencia que resulta protegida por MBP-PaaX1 frente a la digestión con DNasa I aparece recuadrada con línea discontinua roja. El sitio de unión de IHF (propuesto por Leoni y col., 2005) aparece subrayado en morado. La secuencia que resulta protegida por IHF frente a la digestión con DNasa I aparece recuadrada con línea discontinua morada. Los distintos oligonucleótidos que se han utilizado para amplificar la región P_{styA} entera, o un fragmento de la misma, aparecen en minúsculas. Las secuencias amplificadas se han usado como sondas para los experimentos de ultracentrifugación analítica, ensayos de retardo en gel y ensayos de protección frente a la digestión con DNasa I, o bien se han clonado en el vector pTE103, obteniéndose así los distintos plásmidos empleados como moldes para los ensayos de transcripción *in vitro*. Las secuencias subrayadas de los oligonucleótidos indican sitios de corte para enzimas de restricción.

Anexo II. Secuencia del promotor *P_{paaF2}* de *Pseudomonas* sp. Y2.

PF2X 5'-cgcgctctagattctaccaacg-3'

PF2E 5'-cgcggaattcttctaccaacg-3'

...TGGAGACCGCTGACGGCCCGTTGCCGGACGTGGGGGAAAGTTTCTACCAACGCTTTG

PF2-5 5'-ctctcgaattcgcctgctggtat-3'

GAGGATTAGGGTAAACCCTCTCTCGAATCCGCTGCTGGTATACACCATAGCTGCCTGCC

GCCGCCGATCAGAGGGCGGCTTTTCCCCGCTCTGTGCCAAATTCCCCTTGCTTCGTCGA

PF2Eco1+ 5'-gaatcaagaatt

GATCCC **GTAACCTACGTATAC** GGTCTCTCGTTACCGCATTTGATACCAGAAATCAAGCCAG

←
STY4

-35

-10ext -10

+1

3'-gtc

caactgttgcgctc-3'

CACTGTTGCGTCGTTAGGCACTTGTCCCAGGTTTTTCTATTTTTTCAACGGGGTAAATAT

gtgacaacctaggaatcc-5' **PF2B10+**

PF2E-3 5'-cttggaattccgagcagttg-3'

ATGCCTACTGCCGCTAGAGCTTTATGCCTTGTTCCGAGCAGTTGCGCTGCTCTGCGC

GAGATGTAAGAGCGGCAGGATGTGGCGCGCATCGTCCGCGTGGCATGTCGCTGGCCGGGC
3'-ctctacattctcgccgtcctagggcg-5' **F2B (2)**

AAACCCGCCCCGAGAGCTTCGTGGAGCCGGTGCTCCACCAGCTATCGGCGCTCTTCTGAC

3'-tctcgaagcacctcggccacgaggtgg-5' **pe-150**

AAAAACAATACGAGTAACGTC **ATGAACATGATCGCCAATACCGCCTTGCTTGATCCGATG**

S-D

3'-ttatggcggaacctagggc-5'

F2B

GAAACCGCCAGCGTTGACGAACTTCGCCAGCACCAGCTGGAACGCCTGCGCTGGAGCCTC

AAGCACGCCTACGACAACGTCCCGCTGTATCGCCAGCGCTTCGACGAAACCGGCGTGCACCC...

3'-gaagctgctttggcctagggcg-5'

F2B (3)

FIGURA A.2. Secuencia de la región promotora P_{paaF2} de *Pseudomonas* sp. Y2. Las secuencias 3' de *paaX1* y 5' de *paaF2* se muestran en negrita, con sus correspondientes codones de terminación y de inicio subrayados. El sitio de unión de StyR, denominado STY4, aparece en azul y subrayado por dos flechas, que representan las repeticiones invertidas. El sitio +1 de inicio para la transcripción de *paaF2*, el sitio de unión del ribosoma (S-D) y la posible caja -10 extendida (-10 ext) del promotor P_{paaF2} están subrayados. Los posibles motivos canónicos -10 (-10) y -35 (-35) del sitio de unión de σ^{70} al promotor P_{paaF2} están subrayados con línea discontinua. Los distintos oligonucleótidos que se han utilizado para amplificar la región P_{paaF2} entera, o un fragmento de la misma, aparecen en minúsculas. Las secuencias amplificadas se han utilizado como sondas para los ensayos de retardo en gel y ensayos de protección frente a la digestión con DNasa I, o bien se han utilizado para obtener los distintos plásmidos basados en el vector pTE103 empleados como molde para los ensayos de transcripción *in vitro* o para la elaboración de sistemas testigo mediante fusión al gen *lacZ*. Las secuencias subrayadas de los oligonucleótidos indican sitios de corte para enzimas de restricción. El oligonucleótido pe-150 se ha usado para determinar el sitio +1 de la transcripción de *paaF2* mediante el método de extensión del cebador.

Anexo IV.

A continuación se muestran los alineamientos múltiples, tomados de Bartolomé-Martín 2006, de las proteínas PaaX y PaaF codificadas por los genes que se encuentran en las regiones *paa1* y *paa2* de *Pseudomonas* sp. Y2 y en las regiones *paa* de otras estirpes. Las comparaciones se efectuaron mediante el programa ClustalW por David Bartolomé Martín. El código de símbolos y colores empleados se indica a continuación:

- * (aminoácidos en rojo)-> residuo conservado en todas las proteínas
- : (aminoácidos en verde)-> cambio conservativo
- . (aminoácidos en azul)-> cambio neutro

1. Alineamiento de distintas PaaF.

Nº de acceso NCBI	Proteína	
CAA03997	PaaF2 de <i>Pseudomonas</i> sp. Y2	
CAD76926	PaaF de <i>Pseudomonas</i> sp. Y2	
AAC24333	PaaF de <i>P. putida</i> U	
AAN68886	PP3279 de <i>P. putida</i> KT2440	
CAE45107	PaaF3 de <i>Pseudomonas</i> sp. Y2	
CAA03997	MNMI--ANTALLDPMETASVDEL	RQHQLERLRWSLKHAYDNVPL
CAD76926	MNMI--ANTALLDPMETASIDQ	RQHQLERLRWSLKHAYDNVPL
AAC24333	MNMYHDADRALLDPMETASVD	ALRQHQLERLRWSLKHAYDNVPL
AAN68886	MNMYHDADRALLDPMETASVD	ALRQHQLERLRWSLKHAYDNVPL
CAE45107	MNMQ-LSPASVLDPMETASVDE	LRAHQQLRRLWSLEHAYQNVPM
Consenso	MNM HDA ALLDPMETASVD	LRQHQLERLRWSLKHAYDNVPL
CAA03997	SLDDLAKYPFTGKNEVRDNYPF	GMFAVPQSEIVRLHASSGTTGKPT
CAD76926	SLDDLAKYPFTGKNDLRDNYPF	GMFAVPQSEIVRLHASSGTTGKPT
AAC24333	CLEDLAKFPFTGKNDLRDNYPY	GMFAVPQEEVRLHASSGTTGKPT
AAN68886	CLEDLAKFPFTGKNDLRDNYPY	GMFAVPQEEVRLHASSGTTGKPT
CAE45107	SFEDLARFPFTVKNDLRDNYPF	GMFAVPQHDIVRLHASSGTTGKPT
Consenso	SLEDLAKFPFTGKNDLRDNYPF	GMFAVPQ EIVRLHASSGTTGKPT
CAA03997	VVARSIRAAGGRKGDKVHVS	YGYGLFTGGLGAHYGAERL
CAD76926	VVARSIRAAGGRKGDKVHVS	YGYGLFTGGLGAHYGAERL
AAC24333	VVARSIRAAGGRKGDKVHVS	YGYGLFTGGLGAHYGAERL
AAN68886	VVARSIRAAGGRKGDKVHVS	YGYGLFTGGLGAHYGAERL
CAE45107	LVARSIIRAAGGRKGDKVHVS	YGYGLFTGGLGAHYGAERL
Consenso	VVARSIRAAGGRKGDKVHVS	YGYGLFTGGLGAHYGAERL
CAA03997	FQPDIIIMVTPSYMLNLADEI	ERQGIDPHDLKLRLGIFGAEPWT
CAD76926	FQPDIIIMVTPSYMLNLADEI	ERQGIDPHQLALRLGIFGAEPWT
AAC24333	FQPDIIIMVTPSYMLNLADEI	ERQGIDPHDLKLRLGIFGAEPWT
AAN68886	FHPDIIIMVTPSYMLNLADEI	ERQGIDPHDLKLRLGIFGAEPWT
CAE45107	FQPDIIIMVTPSYMLNLADEI	ERQGIDPHKLALRLGIFGAEPWT
Consenso	FQPDIIIMVTPSYMLNLADEI	ERQGIDPHDLKLRLGIFGAEPWT
CAA03997	IYGLSEIMGPGVAMECAETK	DGPTVWEDHFPYPEIIDPATG
CAE45107	IYGLSEIMGPGVAMECAETK	DGPTVWEDHFPYPEIIDPATG
Consenso	IYGLSEIMGPGVAMECAETK	DGPTVWEDHFPYPEIIDPATG

CAD76909 LPQDKRKQVREELEWQGFGAISPVVLLACPRCDRVDVAATLQDLDALEDTILFDTYAQDVL 180
 CAE45100 LPQDKRKIVREELEWQGFGAISPGVLLGCPDRADVNATLVDLGAQEDTILFETTAQDVL 180
 YP_260234 LSVELRKQVREELEWQGFGAMSPVLLACPRSDRADINATLAELGAQEDTIVFETTPQDVL 180
 AAN68892 LEAGKRKAVREELEWQGFVMAPNLLGCPADRADLVATLHDLEAGDDSI VFETHHTQEV L 180
 AAC24342 LEAGKRKALREELEWQGFVMAPNLLGCPADRADLTATLRDLEASDDSI VFETHHTQEV L 180
 * ** :*****.:* :*.***.*.*: *** :* * :*:*:*:* * :*:*
 Consenso L KRK VREELEWQGFGAMSP LLGCPR DRAD NATL DL AQEDTIVFET QDVL

CAD76909 ASKALRMQVRESWKIDELASHYSEFIQLFRPLWQALREKDSLQPADCFIARILLIHEYRK 240
 CAE45100 ASKALRMQVRESWKIDELAAHYSEFIQLFRPLWQSLKEQDSLDPKACFLARVLLIHEYRK 240
 YP_260234 GSRALRLQVRESWNIDELAAHYSEFIQLFRPLWQALREQEQLQPDQCFIARILLIHEYRK 240
 AAN68892 ASKAMRAQVRESWRIDELGQYSEFIQLFRPLWQGLKEQPILLDAQDCF IARTLLIHEYRR 240
 AAC24342 ASKAMRAQVRESWRIDELGQYSEFIQLFRPLWQSLKEQQLLDAQDCF IARTLLIHEYRR 240
 .*:*:* *****.****.:*****.*:* :*:. ***** *****:
 Consenso ASKALR QVRESW IDELA HYSEFIQLFRPLWQ LKEQD LDPQDCF IARTLLIHEYRK

CAD76909 LLLRDPQLPDELLPGDWEGRAARQLCRNIYRLIHAEAEQWLNDTLETADGPLPDVGESFY 300
 CAE45100 LLLRDPQLPDELLPGDWEGRAARQLCRNIYRLIHGAAEQWLEAAMETADGPLPEAGEGFY 300
 YP_260234 LLLRDPQLPDELLPGDWEGRAARQLCRNIYRLIQARAEWLATALENADGPLPDVGESYY 300
 AAN68892 LLLRDPQLPDELLPGDWEGRAARQLCRNLYRLVFAKAEEWLNAALETADGPLPDVSESFY 300
 AAC24342 LLLRDPQLPDELLPGDWEGRAARQLCRNLYRLVFAKAEEWLNAALETADGPLPDVNEGFY 300
 *****.*:*:* :*:*:* :*:
 Consenso LLLRDPQLPDELLPGDWEGRAARQLCRNIYRLI AKAEEWLNAALETADGPLPDVGESFY

CAD76909 QRFGLG 307
 CAE45100 KRFGLG 307
 YP_260234 RRFGLV 307
 AAN68892 KRFGLA 307
 AAC24342 QRFGLA 307
 :*****
 Consenso RFGGL

BIBLIOGRAFÍA

IX. Bibliografía.

1. **Alonso, S.** (2002). "*Estudio de la ruta catabólica del estireno de Pseudomonas sp. Y2.*" Tesis doctoral. Universidad Complutense de Madrid.
2. **Alonso, S., D. Bartolomé-Martín, M. del Álamo, E. Díaz, J.L. García y J. Perera** (2003a). "*Genetic characterization of the styrene lower catabolic pathway of Pseudomonas sp. strain Y2.*" *Gene* **319** pp.71-83.
3. **Alonso, S., J.M. Navarro-Llorens, A. Tormo y J. Perera** (2003b). "*Construction of a bacterial biosensor for styrene.*" *J Biotechnol* **102** (3) pp.301-306.
4. **Aravind, L., V. Anantharaman, S. Balaji, M.M. Babu y L.M. Iyer** (2005). "*The many faces of the helix-turn-helix domain: transcription regulation and beyond.*" *FEMS Microbiol Rev* **29** (2) pp.231-262.
5. **Armengaud, J., K.N. Timmis y R.M. Wittich** (1999). "*A functional 4-hydroxysalicylate/hydroxyquinol degradative pathway gene cluster is linked to the initial dibenzo-p-dioxin pathway genes in Sphingomonas sp. strain RW1.*" *J Bacteriol* **181** (11) pp.3452-3461.
6. **Bagdasarian, M., R. Lurz, B. Ruckert, F.C. Franklin, M.M. Bagdasarian, J. Frey y K.N. Timmis** (1981). "*Specific-purpose plasmid cloning vectors. II. Broad host range, high copy number, RSF1010-derived vectors, and a host-vector system for gene cloning in Pseudomonas.*" *Gene* **16** (1-3) pp.237-247.
7. **Baikalov, I., I. Schroder, M. Kaczor-Grzeskowiak, K. Grzeskowiak, R.P. Gunsalus y R.E. Dickerson** (1996). "*Structure of the Escherichia coli response regulator NarL.*" *Biochemistry* **35** (34) pp.11053-11061.
8. **Barne, K.A., J.A. Bown, S.J. Busby y S.D. Minchin** (1997). "*Region 2.5 of the Escherichia coli RNA polymerase sigma70 subunit is responsible for the recognition of the 'extended-10' motif at promoters.*" *Embo J* **16** (13) pp.4034-4040.
9. **Barnes, W.M.** (1994). "*PCR amplification of up to 35-kb DNA with high fidelity and high yield from lambda bacteriophage templates.*" *Proc Natl Acad Sci U S A* **91** (6) pp.2216-2220.
10. **Bartolomé-Martín, D.** (2006). "*Estudio de los genes implicados en la degradación del ácido fenilacético en Pseudomonas sp. Y2.*" Universidad Complutense de Madrid
11. **Bartolomé-Martín, D., E. Martínez-García, V. Mascaraque, J. Rubio, J. Perera y S. Alonso** (2004). "*Characterization of a second functional gene cluster for the catabolism of phenylacetic acid in Pseudomonas sp. strain Y2.*" *Gene* **341** pp.167-179.
12. **Beltrametti, F., A.M. Marconi, G. Bestetti, C. Colombo, E. Galli, M. Ruzzi y E. Zennaro** (1997). "*Sequencing and functional analysis of styrene catabolism genes from Pseudomonas fluorescens ST.*" *Appl Environ Microbiol* **63** (6) pp.2232-2239.
13. **Bertoni, G., N. Fujita, A. Ishihama y V. de Lorenzo** (1998). "*Active recruitment of sigma54-RNA polymerase to the Pu promoter of Pseudomonas putida: role of IHF and alphaCTD.*" *EMBO J* **17** (17) pp.5120-5128.

14. **Bestetti, G., E. Galli, M. Ruzzi, G. Baldacci, E. Zennaro y L. Frontali** (1984). "*Molecular characterization of a plasmid from Pseudomonas fluorescens involved in styrene degradation.*" *Plasmid* **12** (3) pp.181-188.
15. **Birboim, H.C. y J. Doly** (1979). "*A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA.*" *Nucl Acids Res* **7** pp.1513.
16. **Birck, C., L. Mourey, P. Gouet, B. Fabry, J. Schumacher, P. Rousseau, D. Kahn y S. JP** (1999). "*Conformational changes induced by phosphorylation of the FixJ receiver domain.*" *Structure* **7** (12) pp.1505-1515.
17. **Boll, M., G. Fuchs y J. Heider** (2002). "*Anaerobic oxidation of aromatic compounds and hydrocarbons.*" *Curr Opin Chem Biol* **6** (5) pp.604-611.
18. **Bond, J.A.** (1989). "*Review of the toxicology of styrene.*" *Crit Rev Toxicol* **19** (3) pp.227-249.
19. **Boyer, H.W. y D. Roulland-Dussoix** (1969). "*A complementation analysis of the restriction and modification of DNA in Escherichia coli.*" *J Mol Biol* **41** (3) pp.459-472.
20. **Bradford, M.M.** (1976). "*A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.*" *Anal Biochem* **72** pp.248-254.
21. **Brzostowicz, P.C., A.B. Reams, T.J. Clark y E.L. Neidle** (2003). "*Transcriptional cross-regulation of the catechol and protocatechuate branches of the β -ketoacid pathway contributes to carbon source-dependent expression of the Acinetobacter sp. strain ADPI *pobA* gene.*" *Appl Environ Microbiol* **69** (3) pp.1598-1606.
22. **Bundy, B.M., L.S. Collier, T.R. Hoover y E.L. Neidle** (2002). "*Synergistic transcriptional activation by one regulatory protein in response to two metabolites.*" *Proc Natl Acad Sci U S A* **99** (11) pp.7693-7698.
23. **Busch, A., J. Lacal, A. Martos, J.L. Ramos y T. Krell** (2007). "*Bacterial sensor kinase TodS interacts with agonistic and antagonistic signals.*" *Proc Natl Acad Sci U S A* **104** (4) pp.13774-13779.
24. **Carmona, M. y E. Díaz** (2005). "*Iron-reducing bacterial unravel novel strategies for the anaerobic catabolism of aromatic compounds.*" *Mol Microbiol* **58** (5) pp.1210-1215.
25. **Carmona, M., M.J. Rodriguez, O. Martinez-Costa y V. De Lorenzo** (2000). "*In vivo and in vitro effects of (p)ppGpp on the sigma(54) promoter Pu of the TOL plasmid of Pseudomonas putida.*" *J Bacteriol* **182** (17) pp.4711-4718.
26. **Cases, I. y V. de Lorenzo** (1998). "*Expression systems and physiological control of promoter activity in bacteria.*" *Curr Opin Microbiol* **1** (3) pp.303-310.
27. **Cases, I. y V. de Lorenzo** (2001). "*The black cat/white cat principle of signal integration in bacterial promoters.*" *Embo J* **20** (1-2) pp.1-11.
28. **Cases, I. y V. de Lorenzo** (2005). "*Promoters in the environment: transcriptional regulation in its natural context.*" *Nat Rev Microbiol* **3** (2) pp.105-118.
29. **Cases, I., J. Perez-Martin y V. de Lorenzo** (1999). "*The IIANtr (PtsN) protein of Pseudomonas putida mediates the C source inhibition of the sigma54-dependent Pu promoter of the TOL plasmid.*" *J Biol Chem* **274** (22) pp.15562-15568.

30. **Cases, I., F. Velazquez y V. de Lorenzo** (2001). "Role of *ptsO* in carbon-mediated inhibition of the *Pu* promoter belonging to the *pWW0* *Pseudomonas putida* plasmid." *J Bacteriol* **183** (17) pp.5128-5133.
31. **Clark, T.J., R.S. Phillips, B.M. Bundy, C. Momany y E.L. Neidle** (2004). "Benzoate decreases the binding of *cis,cis*-muconate to the *BenM* regulator despite the synergistic effect of both compounds on transcriptional activation." *J Bacteriol* **186** (4) pp.1200-1204.
32. **Claverie-Martin, F. y B. Magasanik** (1992). "Positive and negative effects of DNA bending on activation of transcription from a distant site." *J Mol Biol* **227** (4) pp.996-1008.
33. **Collado-Vides, J.** (1992). "Grammatical model of the regulation of gene expression." *Proc Natl Acad Sci U S A* **89** (20) pp.9405-9409.
34. **Conti, B., C. Maltoni, G. Perino y A. Ciliberti** (1988). "Long-term carcinogenicity bioassays on styrene administered by inhalation, ingestion and injection and styrene oxide administered by ingestion in Sprague-Dawley rats, and para-methylstyrene administered by ingestion in Sprague-Dawley rats and Swiss mice." *Ann N Y Acad Sci* **534** pp.203-234.
35. **Coschigano, P.W. y L.Y. Young** (1997). "Identification and sequence analysis of two regulatory genes involved in anaerobic toluene metabolism by strain *T1*." *Appl Environ Microbiol* **63** (2) pp.652-660.
36. **Crooks, G.E., G. Hon, J.M. Chandonia y S.E. Brenner** (2004). "Weblogo: A sequence logo generator." *Genome Research* **14** pp.1188-1190
37. **Crooks, G.P. y S.D. Copley** (1994). "Purification and characterization of 4-chlorobenzoyl *CoA* dehalogenase from *Arthrobacter* sp. strain 4-CB1." *Biochemistry* **33** (38) pp.11645-11649.
38. **Da Re, S., J. Schumacher, P. Rousseau, J. Fourment, C. Ebel y D. Kahn** (1999). "Phosphorylation-induced dimerization of the *FixJ* receiver domain." *Mol Microbiol* **34** (3) pp.504-511.
39. **Dagley, S.** (1981). "New perspectives in aromatic catabolism." En: T. Leisinger, y col., *Degradation of xenobiotics and recalcitrant compounds*. Academic Press, New York, pp.181-186.
40. **Davis, B.D. y E.S. Mingioli** (1950). "Mutants of *Escherichia coli* requiring methionine or vitamin B12." *J Bacteriol* **60** (1) pp.17-28.
41. **de Lorenzo, V.** (2001). "Cleaning up behind us. The potential of genetically modified bacteria to break down toxic pollutants in the environment." *EMBO Rep* **2** (5) pp.357-359.
42. **de Lorenzo, V., L. Eltis, B. Kessler y K.N. Timmis** (1993). "Analysis of *Pseudomonas* gene products using *lacIq/Ptrp-lac* plasmids and transposons that confer conditional phenotypes." *Gene* **123** (1) pp.17-24.
43. **de Lorenzo, V., M. Herrero, M. Metzke y K.N. Timmis** (1991). "An upstream *XylR*- and *IHF*-induced nucleoprotein complex regulates the sigma 54-dependent *Pu* promoter of *TOL* plasmid." *Embo J* **10** (5) pp.1159-1167.

44. **de Lorenzo, V. y K.N. Timmis** (1994). "*Analysis and construction of stable phenotypes in gram-negative bacteria with Tn5- and Tn10-derived minitransposons.*" *Methods Enzymol* **235** pp.386-405.
45. **del Peso-Santos, M.T., D. Bartolomé-Martín, C. Fernández, S. Alonso, J.L. García, E. Díaz, V. Shingler y J. Perera** (2006). "*Coregulation by phenylacetyl-coenzyme A-responsive PaaX integrates control of the upper and lower pathways for the catabolism of styrene by Pseudomonas sp. strain Y2.*" *J Bacteriol* **188** (13) pp.4812-4821.
46. **del Peso-Santos, T., V. Shingler y J. Perera** (2008). "*The styrene-responsive StyS/StyR regulation system controls expression of an auxiliary phenylacetyl-coenzyme A ligase: implications for rapid metabolic coupling of the styrene upper- and lower-degradative pathways.*" *Mol Microbiol* pp. pendiente de publicación.
47. **Denef, V.J., J. Park, T.V. Tsoi, J.M. Rouillard, H. Zhang, J.A. Wibbenmeyer, W. Verstraete, E. Gulari, S.A. Hashsham y J.M. Tiedje** (2004). "*Biphenyl and benzoate metabolism in a genomic context: outlining genome-wide metabolic networks in Burkholderia xenovorans LB400.*" *Appl Environ Microbiol* **70** (8) pp.4961-4970.
48. **Dennis, J.J. y G.J. Zylstra** (1998). "*Improved antibiotic-resistance cassettes through restriction site elimination using Pfu DNA polymerase PCR.*" *Biotechniques* **25** (5) pp.772-774, 776.
49. **di Gennaro, P., S. Ferrara, I. Ronco, E. Galli, G. Sello, M. Papacchini y G. Bestetti** (2007). "*Styrene lower catabolic pathway in Pseudomonas fluorescens ST: identification and characterization of genes for phenylacetic acid degradation.*" *Arch Microbiol* **188** (2) pp.117-125.
50. **Díaz, E.** (2004). "*Bacterial degradation of aromatic pollutants: a paradigm of metabolic versatility.*" *Int Microbiol* **7** (3) pp.173-180.
51. **Díaz, E., A. Ferrández, M.A. Prieto y J.L. García** (2001). "*Biodegradation of aromatic compounds by Escherichia coli.*" *Microbiol Mol Biol Rev* **65** (4) pp.523-569, table of contents.
52. **Díaz, E. y M.A. Prieto** (2000). "*Bacterial promoters triggering biodegradation of aromatic pollutants.*" *Curr Opin Biotechnol* **11** (5) pp.467-475.
53. **Dua, M., A. Singh, N. Sethunathan y A.K. Johri** (2002). "*Biotechnology and bioremediation: successes and limitations.*" *Appl Microbiol Biotechnol* **59** (2-3) pp.143-152.
54. **Dunaway-Mariano, D. y P.C. Babbitt** (1994). "*On the origins and functions of the enzymes of the 4-chlorobenzoate to 4-hydroxybenzoate converting pathway.*" *Biodegradation* **5** (3-4) pp.259-276.
55. **Dutta, R., L. Qin y M. Inouye** (1999). "*Histidine kinases: diversity of domain organization.*" *Mol Microbiol* **34** (4) pp.633-640.
56. **Dworkin, J., G. Jovanovic y P. Model** (1997). "*Role of upstream activation sequences and integration host factor in transcriptional activation by the constitutively active prokaryotic enhancer-binding protein PspF.*" *J Mol Biol* **273** (2) pp.377-388.
57. **Elder, D.J. y D.J. Kelly** (1994). "*The bacterial degradation of benzoic acid and benzenoid compounds under anaerobic conditions: unifying trends and new perspectives.*" *FEMS Microbiol Rev* **13** (4) pp.441-468.

58. **Elish, M.E., J.R. Pierce y C.F. Earhart** (1988). "Biochemical analysis of spontaneous *fepA* mutants of *Escherichia coli*." *J Gen Microbiol* **134** (Pt 5) pp.1355-1364.
59. **Elliott, T. y E.P. Geiduschek** (1984). "Defining a bacteriophage T4 late promoter: absence of a "-35" region." *Cell* **36** (1) pp.211-219.
60. **Ermolaeva, M.D., H.G. Khalak, O. White, H.O. Smith y S.L. Salzberg** (2000). "Prediction of transcription terminators in bacterial genomes." *J Mol Biol* **301** (1) pp.27-33.
61. **Fernández, C.** (2005). "Avances en la caracterización del catabolismo del ácido fenilacético en *Escherichia coli*." Tesis doctoral. Universidad Complutense de Madrid.
62. **Ferrández, A., J.L. García y E. Díaz** (1997a). "Genetic characterization and expression in heterologous hosts of the 3- (3-hydroxyphenyl)propionate catabolic pathway of *Escherichia coli* K-12." *J Bacteriol* **179** (8) pp.2573-2581.
63. **Ferrández, A., J.L. García y E. Díaz** (2000). "Transcriptional regulation of the divergent *paa* catabolic operons for phenylacetic acid degradation in *Escherichia coli*." *J Biol Chem* **275** (16) pp.12214-12222.
64. **Ferrández, A., B. Miñambres, B. García, E.R. Olivera, J.M. Luengo, J.L. García y E. Díaz** (1998). "Catabolism of phenylacetic acid in *Escherichia coli*. Characterization of a new aerobic hybrid pathway." *J Biol Chem* **273** (40) pp.25974-25986.
65. **Ferrández, A., M.A. Prieto, J.L. García y E. Díaz** (1997b). "Molecular characterization of *PadA*, a phenylacetaldehyde dehydrogenase from *Escherichia coli*." *FEBS Lett* **406** (1-2) pp.23-27.
66. **Fielder, R.J. y R. Lowing** (1981). "Toxicity Review I: Styrene." Health and Safety Executive.
67. **Franklin, F.C., M. Bagdasarian, M.M. Bagdasarian y K.N. Timmis** (1981). "Molecular and functional analysis of the TOL plasmid *pWWO* from *Pseudomonas putida* and cloning of genes for the entire regulated aromatic ring meta cleavage pathway." *Proc Natl Acad Sci U S A* **78** (12) pp.7458-7462.
68. **Freundlich, M., N. Ramani, E. Mathew, A. Sirko y P. Tsui** (1992). "The role of integration host factor in gene expression in *Escherichia coli*." *Mol Microbiol* **6** (18) pp.2557-2563.
69. **Fu, M.H. y M. Alexander** (1992). "Biodegradation of styrene in samples of natural environments." *Environmental Science and Technology* **26** pp.1540-1544.
70. **Fuglsang, A.** (2005). "Analysis of 5' UTR composition and gene expression: canonical versus non-canonical start codons." *Biochem Biophys Res Commun* **335** (1) pp.71-75.
71. **Galán, B., J.L. García y M.A. Prieto** (2004). "The *PaaX* repressor, a link between penicillin G acylase and the phenylacetyl-coenzyme A catabolon of *Escherichia coli* W." *J Bacteriol* **186** (7) pp.2215-2220.
72. **García, B., E.R. Olivera, B. Miñambres, D. Carnicero, C. Muniz, G. Naharro y J.M. Luengo** (2000). "Phenylacetyl-coenzyme A is the true inducer of the phenylacetic acid catabolism pathway in *Pseudomonas putida* U." *Appl Environ Microbiol* **66** (10) pp.4575-4578.

73. **Gasson, M.J., Y. Kitamura, W.R. McLauchlan, A. Narbad, A.J. Parr, E.L. Parsons, J. Payne, M.J. Rhodes y N.J. Walton** (1998). "*Metabolism of ferulic acid to vanillin. A bacterial gene of the enoyl-SCoA hydratase/isomerase superfamily encodes an enzyme for the hydration and cleavage of a hydroxycinnamic acid SCoA thioester.*" *J Biol Chem* **273** (7) pp.4163-4170.
74. **Gay, P., D. Le Coq, M. Steinmetz, T. Berkelman y C.I. Kado** (1985). "*Positive selection procedure for entrapment of insertion sequence elements in gram-negative bacteria.*" *J Bacteriol* **164** (2) pp.918-921.
75. **Gescher, J., W. Eisenreich, J. Worth, A. Bacher y G. Fuchs** (2005). "*Aerobic benzoyl-CoA catabolic pathway in *Azoarcus evansii*: studies on the non-oxygenolytic ring cleavage enzyme.*" *Mol Microbiol* **56** (6) pp.1586-1600.
76. **Gescher, J., W. Ismail, E. Olgeschlager, W. Eisenreich, J. Worth y G. Fuchs** (2006). "*Aerobic benzoyl-coenzyme A (CoA) catabolic pathway in *Azoarcus evansii*: conversion of ring cleavage product by 3,4-dehydroadipyl-CoA semialdehyde dehydrogenase.*" *J Bacteriol* **188** (8) pp.2919-2927.
77. **Gibson, J. y C.S. Harwood** (2002). "*Metabolic diversity in aromatic compound utilization by anaerobic microbes.*" *Annu Rev Microbiol* **56** pp.345-369.
78. **Goosen, N. y P. van de Putte** (1995). "*The regulation of transcription initiation by integration host factor.*" *Mol Microbiol* **16** (1) pp.1-7.
79. **Grbic-Galic, D., N. Churchman-Eisel y I. Mrakovic** (1990). "*Microbial transformation of styrene by anaerobic consortia.*" *J Appl Bacteriol* **69** (2) pp.247-260.
80. **Gülensoy, N. y P.J. Álvarez** (1999). "*Diversity and correlation of specific aromatic hydrocarbon biodegradation capabilities.*" *Biodegradation* **10** (5) pp.331-340.
81. **Habe, H., K. Kasuga, H. Nojiri, H. Yamane y T. Omori** (1996). "*Analysis of cumene (isopropylbenzene) degradation genes from *Pseudomonas fluorescens* IP01.*" *Appl Environ Microbiol* **62** (12) pp.4471-4477.
82. **Haddock, J.D. y J.G. Ferry** (1989). "*Purification and properties of phloroglucinol reductase from *Eubacterium oxidoreducens* G-41.*" *J Biol Chem* **264** (8) pp.4423-4427.
83. **Hager, D.A., D.J. Jin y R.R. Burgess** (1990). "*Use of Mono Q high-resolution ion-exchange chromatography to obtain highly pure and active *Escherichia coli* RNA polymerase.*" *Biochemistry* **29** pp.7890-7894.
84. **Hanahan, D.** (1983). "*Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids.*" *J Mol Biol* **166** (4) pp.557-580.
85. **Hanlon, S.P., T.K. Hill, M.A. Flavell, J.M. Stringfellow y R.A. Cooper** (1997). "*2-phenylethylamine catabolism by *Escherichia coli* K-12: gene organization and expression.*" *Microbiology* **143** (Pt 2) pp.513-518.
86. **Harayama, S. y M. Rekik** (1989). "*Bacterial aromatic ring-cleavage enzymes are classified into two different gene families.*" *J Biol Chem* **264** (26) pp.15328-15333.
87. **Harayama, S. y K.N. Timmis** (1989). "*Catabolism of aromatic hydrocarbons by *Pseudomonas*.*" En: D.A. Hopwood y K.F. Chater, *Genetics of bacterial diversity*. Academic Press, Inc, N.Y., pp.151-174.

88. **Harayama, S. y K.N. Timmis** (1992). "*Aerobic biodegradation of aromatic hydrocarbons by bacteria.*" En: H.S.A. Sigel, *Metal ions in biological systems*. New York, pp.99-156.
89. **Hartmans, S.** (1995). "*Microbial degradation of styrene.*" *Biotransformations: microbiological degradation of health risk compounds*. Elsevier Science. 227-238
90. **Hartmans, S., J.P. Smits, M.J. van der Werf, F. Volkering y J.A.M. de Bont** (1989). "*Metabolism of styrene oxide and 2-phenylethanol in the styrene-degrading Xanthobacter strain 124X.*" *Appl Environ Microbiol* **55** pp.2850-2855.
91. **Hartmans, S., M.J. van der Werf y J.A. de Bont** (1990). "*Bacterial degradation of styrene involving a novel flavin adenine dinucleotide-dependent styrene monooxygenase.*" *Appl Environ Microbiol* **56** (5) pp.1347-1351.
92. **Harwood, C.S., H. Burchhardt, H. Herrmann y G. Fuchs** (1998). "*Anaerobic metabolism of aromatic compounds via the benzoyl-CoA pathway.*" *FEMS Microbiol. Rev.* **22** (5) pp.439-458.
93. **Harwood, C.S. y R.E. Parales** (1996). "*The beta-ketoadipate pathway and the biology of self-identity.*" *Annu Rev Microbiol* **50** pp.553-590.
94. **Heider, J., M. Boll, K. Breese, S. Breinig, C. Ebenau-Jehle, U. Feil, N. Gad'on, D. Laempe, B. Leuthner, M.E. Mohamed, S. Schneider, G. Burchhardt y G. Fuchs** (1998). "*Differential induction of enzymes involved in anaerobic metabolism of aromatic compounds in the denitrifying bacterium Thauera aromatica.*" *Arch Microbiol* **170** (2) pp.120-131.
95. **Heider, J. y G. Fuchs** (1997). "*Anaerobic metabolism of aromatic compounds.*" *Eur J Biochem* **243** (3) pp.577-596.
96. **Herrero, M., V. de Lorenzo y K.N. Timmis** (1990). "*Transposon vectors containing non-antibiotic resistance selection markers for cloning and stable chromosomal insertion of foreign genes in gram-negative bacteria.*" *J Bacteriol* **172** (11) pp.6557-6567.
97. **Holtel, A., K.N. Timmis y J.L. Ramos** (1992). "*Upstream binding sequences of the XylR activator protein and integration host factor in the xylS gene promoter region of the Pseudomonas TOL plasmid.*" *Nucleic Acids Res* **20** (7) pp.1755-1762.
98. **Ismail, W., M. El-Said Mohamed, B.L. Wanner, K.A. Datsenko, W. Eisenreich, F. Rohdich, A. Bacher y G. Fuchs** (2003). "*Functional genomics by NMR spectroscopy. Phenylacetate catabolism in Escherichia coli.*" *Eur J Biochem* **270** (14) pp.3047-3054.
99. **Itoh, N., R. Morihama, J. Wang, K. Okada y N. Mizuguchi** (1997). "*Purification and characterization of phenylacetaldehyde reductase from a styrene-assimilating Corynebacterium strain, ST-10.*" *Appl Environ Microbiol* **63** (10) pp.3783-3788.
100. **Itoh, N., K. Yoshida y K. Okada** (1996). "*Isolation and identification of styrene-degrading Corynebacterium strains, and their styrene metabolism.*" *Biosci Biotechnol Biochem* **60** (11) pp.1826-1830.
101. **Iwabuchi, T. y S. Harayama** (1998). "*Biochemical and molecular characterization of 1-hydroxy-2-naphthoate dioxygenase from Nocardioides sp. KP7.*" *J Biol Chem* **273** (14) pp.8332-8336.

102. **Jaenecke, S. y E. Diaz** (1999). "Construction of plasmid vectors bearing a *NotI*-expression cassette based on the *lac* promoter." *Int Microbiol* **2** (1) pp.29-31.
103. **Jiménez, J.I., B. Miñambres, J.L. García y E. Díaz** (2002). "Genomic analysis of the aromatic catabolic pathways from *Pseudomonas putida* KT2440." *Environ Microbiol* **4** (12) pp.824-841.
104. **Jones, B.E., V. Dossonnet, E. Kuster, W. Hillen, J. Deutscher y R.E. Klevit** (1997). "Binding of the catabolite repressor protein *CcpA* to its DNA target is regulated by phosphorylation of its corepressor *HPr*." *J Biol Chem* **272** (42) pp.26530–26535.
105. **Jovanovic, G., J. Rakonjac y P. Model** (1999). "In vivo and in vitro activities of the *Escherichia coli* sigma54 transcription activator, *PspF*, and its DNA-binding mutant, *PspFDeltaHTH*." *J Mol Biol* **285** (2) pp.469-483.
106. **Kaberdin, V.R. y U. Bläsi** (2006). "Translation initiation and the fate of bacterial mRNAs." *FEMS Microbiol Rev* **30** (6) pp.967-979.
107. **Kahng, H.Y., A.M. Byrne, R.H. Olsen y J.J. Kukor** (2000). "Characterization and role of *tbuX* in utilization of toluene by *Ralstonia pickettii* PKO1." *J Bacteriol* **182** (5) pp.1232-1242.
108. **Kaniga, K., I. Delor y G.R. Cornelis** (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** (1) pp.137-141.
109. **Kasai, Y., J. Inoue y S. Harayama** (2001). "The *TOL* plasmid *pWW0 xylN* gene product from *Pseudomonas putida* is involved in *m*-xylene uptake." *J Bacteriol* **183** (22) pp.6662-6666.
110. **Kim, H.S., T.S. Kang, J.S. Hyun y H.S. Kang** (2004). "Regulation of penicillin G acylase gene expression in *Escherichia coli* by repressor *PaaX* and the *cAMP*-*cAMP* receptor protein complex." *J Biol Chem* **279** (32) pp.33253-33262.
111. **Kluge, C., A. Tschsch y G. Fuchs** (1990). "Anaerobic metabolism of resorcylic acids (*m*-dihydroxybenzoic acids) and resorcinol (1,3-benzenediol) in a fermenting and a denitrifying bacterium." *Arch Microbiol* **155** pp.68-74.
112. **Koenig, K. y J.R. Andreesen** (1990). "Xanthine dehydrogenase and 2-furoyl-coenzyme A dehydrogenase from *Pseudomonas putida* *Ful*: two molybdenum-containing dehydrogenases of novel structural composition." *J Bacteriol* **172** (10) pp.5999-6009.
113. **Kolter, R., M. Inuzuka y D.R. Helinski** (1978). "Trans-complementation-dependent replication of a low molecular weight origin fragment from plasmid *R6K*." *Cell* **15** (4) pp.1199-1208.
114. **Komarova, A.V., L.S. Tchufistova, M. Dreyfus y I.V. Boni** (2005). "AU-rich sequences within 5' untranslated leaders enhance translation and stabilize mRNA in *Escherichia coli*." *J Bacteriol* **187** (4) pp.1344-1349.
115. **Kunishima, N., Y. Asada, M. Sugahara, J. Ishijima, Y. Nodake, M. Sugahara, M. Miyano, S. Kuramitsu, S. Yokoyama y M. Sugahara** (2005). "A novel induced-fit reaction mechanism of asymmetric hot dog thioesterase *PAAI*." *J Mol Biol* **352** (1) pp.212-228.

116. **Labbé, D., J. Garnon y P.C. Lau** (1997). "Characterization of the genes encoding a receptor-like histidine kinase and a cognate response regulator from a biphenyl/polychlorobiphenyl- degrading bacterium, *Rhodococcus* sp. strain M5." *J Bacteriol* **179** (8) pp.2772-2776.
117. **Lacal, J., A. Busch, M.E. Guazzaroni, T. Krell y J.L. Ramos** (2006). "The *TodS-TodT* two-component regulatory system recognizes a wide range of effectors and works with DNA-bending proteins." *Proc Natl Acad Sci U S A* **103** (21) pp.8191-8196.
118. **Lau, P.C., Y. Wang, A. Patel, D. Labbe, H. Bergeron, R. Brousseau, Y. Konishi y M. Rawlings** (1997). "A bacterial basic region leucine zipper histidine kinase regulating toluene degradation." *Proc Natl Acad Sci U S A* **94** (4) pp.1453-1458.
119. **Laue, T.M., B.D. Shah, T.M. Ridgeway y S.L. Pelletier** (1992). Analytical Ultracentrifugation in Biochemistry and Polymer Science (Harding, S., Rowe, A. , and Horton, J., eds) , pp. 90-125, Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK.
120. **Laurie, A.D., L.M. Bernardo, C.C. Sze, E. Skarfstad, A. Szalewska-Palasz, T. Nystrom y V. Shingler** (2003). "The role of the alarmone (*p*)ppGpp in sigma N competition for core RNA polymerase." *J Biol Chem* **278** (3) pp.1494-1503.
121. **Leoni, L., P. Ascenzi, A. Bocedi, G. Rampioni, L. Castellini y E. Zennaro** (2003). "Styrene-catabolism regulation in *Pseudomonas fluorescens* ST: phosphorylation of *StyR* induces dimerization and cooperative DNA-binding." *Biochem Biophys Res Commun* **303** (3) pp.926-931.
122. **Leoni, L., G. Rampioni, V. Di Stefano y E. Zennaro** (2005). "Dual role of response regulator *StyR* in styrene catabolism regulation." *Appl Environ Microbiol* **71** (9) pp.5411-5419.
123. **Letunic, I., R.R. Copley, B. Pils, S. Pinkert, J. Schultz y P. Bork** (2006). "SMART 5: domains in the context of genomes and networks." *Nucleic Acids Res* **34** (Database issue) pp.D257-260.
124. **Lewis, R.J., D.J. Scott, J.A. Brannigan, J.C. Ladds, M.A. Cervin, G.B. Spiegelman, J.G. Hoggett, I. Barák y A.J. Wilkinson** (2002). "Dimer formation and transcription activation in the sporulation response regulator *Spo0A*." *J Mol Biol* **316** (2) pp.235-245.
125. **Lodge, J., R. Williams, A. Bell, B. Chan y S. Busby** (1990). "Comparison of promoter activities in *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*: use of a new broad-host-range promoter-probe plasmid." *FEMS Microbiol Lett* **55** (1-2) pp.221-225.
126. **López-Barragán, M.J.** (2005). "Caracterización molecular de la ruta central de degradación anaeróbica de compuestos aromáticos de *Azoarcus* sp. CIB." Tesis doctoral. Universidad Complutense de Madrid.
127. **Luengo, J.M., J.L. García y E.R. Olivera** (2001). "The phenylacetyl-CoA catabolon: a complex catabolic unit with broad biotechnological applications." *Mol Microbiol* **39** (6) pp.1434-1442.
128. **Magasanik, B.** (1970). "Glucose effects: inducer exclusion and repression." En: J. Beckwith, *The lactose operon*. Cold Spring Harbor, N. Y., pp.189-220.

129. **Marconi, A.M., F. Beltrametti, G. Bestetti, F. Solinas, M. Ruzzi, E. Galli y E. Zennaro** (1996). "Cloning and characterization of styrene catabolism genes from *Pseudomonas fluorescens* ST." *Appl Environ Microbiol* **62** (1) pp.121-127.
130. **Marqués, S., I. Aranda-Olmedo y J.L. Ramos** (2006). "Controlling bacterial physiology for optimal expression of gene reporter constructs." *Curr Opin Biotechnol* **17** (1) pp.50-56.
131. **Marqués, S., M.T. Gallegos, M. Manzanera, A. Holtel, K.N. Timmis y J.L. Ramos** (1998). "Activation and repression of transcription at the double tandem divergent promoters for the *xylR* and *xylS* genes of the TOL plasmid of *Pseudomonas putida*." *J Bacteriol* **180** (11) pp.2889-2894.
132. **Marqués, S., M. Manzanera, M.M. González-Pérez, M.T. Gallegos y J.L. Ramos** (1999). "The *XylS*-dependent *Pm* promoter is transcribed in vivo by RNA polymerase with sigma 32 or sigma 38 depending on the growth phase." *Mol Microbiol* **31** (4) pp.1105-1113.
133. **Martínez-Blanco, H., A. Reglero, L.B. Rodríguez-Aparicio y J.M. Luengo** (1990). "Purification and biochemical characterization of phenylacetyl-CoA ligase from *Pseudomonas putida*. A specific enzyme for the catabolism of phenylacetic acid." *J Biol Chem* **265** (12) pp.7084-7090.
134. **Maxam, A.M. y W. Gilbert** (1980). "Sequencing end-labeled DNA with base-specific chemical cleavages." *Methods Enzymol* **65** (1) pp.499-560.
135. **Milani, M., L. Leoni, G. Rampioni, E. Zennaro, P. Ascenzi y M. Bolognesi** (2005). "An active-like structure in the unphosphorylated *StyR* response regulator suggests a phosphorylation-dependent allosteric activation mechanism." *Structure* **13** (9) pp.1289-1297.
136. **Miller, J.H.** (1972). "Experiments in Molecular Genetics." Cold Spring Harbor, New York.
137. **Minton, A.P.** (1994). "Modern Analytical Ultracentrifugation." T. M. Schuster and T. M. Laue, Editors. Birkhäuser, Boston.
138. **Miñambres, B., H. Martínez-Blanco, E.R. Olivera, B. Garca, B. Díez, J.L. Barredo, M.A. Moreno, C. Schleissner, F. Salto y J.M. Luengo** (1996). "Molecular cloning and expression in different microbes of the DNA encoding *Pseudomonas putida* U phenylacetyl-CoA ligase. Use of this gene to improve the rate of benzylpenicillin biosynthesis in *Penicillium chrysogenum*." *J Biol Chem* **271** (52) pp.33531-33538.
139. **Mohamed, M.E.** (2000). "Biochemical and molecular characterization of phenylacetate-coenzyme A ligase, an enzyme catalyzing the first step in aerobic metabolism of phenylacetic acid in *Azoarcus evansii*." *J Bacteriol* **182** (2) pp.286-294.
140. **Mohamed, M.E., W. Ismail, J. Heider y G. Fuchs** (2002). "Aerobic metabolism of phenylacetic acids in *Azoarcus evansii*." *Arch Microbiol* **178** (3) pp.180-192.
141. **Mooney, A., N.D. O'Leary y A.D. Dobson** (2006). "Cloning and functional characterization of the *styE* gene, involved in styrene transport in *Pseudomonas putida* CA-3." *Appl Environ Microbiol* **72** (2) pp.1302-1309.
142. **Morales, G., J.F. Linares, A. Beloso, J.P. Albar, J.L. Martínez y F. Rojo** (2004). "The *Pseudomonas putida* *Crc* global regulator controls the expression of genes from several chromosomal catabolic pathways for aromatic compounds." *J Bacteriol* **186** (5) pp.1337-1344.

143. **Mosqueda, G., M.I. Ramos-Gonzalez y J.L. Ramos** (1999). "Toluene metabolism by the solvent-tolerant *Pseudomonas putida* DOT-T1 strain, and its role in solvent impermeabilization." *Gene* **232** (1) pp.69-76.
144. **Mosqueda, G. y J.L. Ramos** (2000). "A set of genes encoding a second toluene efflux system in *Pseudomonas putida* DOT-T1E is linked to the *tod* genes for toluene metabolism." *J Bacteriol* **182** (4) pp.937-943.
145. **Mullis, K., F. Faloona, S. Scharf, R. Saiki, R. Horn y H. Erlich** (1986). "Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction." *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, **51** pp.263-273.
146. **Münc, R., K. Hiller, A. Grote, M. Scheer, J. Klein, M. Schobert y D. Jahn** (2005). "Virtual Footprint and PRODORIC: an integrative framework for regulon prediction in prokaryotes." *Bioinformatics* **21** (22) pp.4187-4189.
147. **Navarro-Llorens, J.M., O. Drzyzga y J. Perera** (2008). "Genetic analysis of phenylacetic acid catabolism in *Arthrobacter oxydans* CECT386." *Arch Microbiol*
148. **Navarro-Llorens, J.M., M.A. Patrauchan, G.R. Stewart, J.E. Davies, L.D. Eltis y W.W. Mohn** (2005). "Phenylacetate catabolism in *Rhodococcus* sp. strain RHA1: a central pathway for degradation of aromatic compounds." *J Bacteriol* **187** (13) pp.4497-4504.
149. **Nelson, K.E., C. Weinl, I.T. Paulsen, R.J. Dodson, H. Hilbert, V.A. Martins dos Santos, D.E. Fouts, S.R. Gill, M. Pop, M. Holmes, L. Brinkac, M. Beanan, R.T. DeBoy, S. Daugherty, J. Kolonay, R. Madupu, W. Nelson, O. White, J. Peterson, H. Houry, I. Hance, P. Chris Lee, E. Holtzapple, D. Scanlan, K. Tran, A. Moazzez, T. Utterback, M. Rizzo, K. Lee, D. Kosack, D. Moestl, H. Wedler, J. Lauber, D. Stjepandic, J. Hoheisel, M. Straetz, S. Heim, C. Kiewitz, J. Eisen, K.N. Timmis, A. Dusterhoft, B. Tumbler y C.M. Fraser** (2002). "Complete genome sequence and comparative analysis of the metabolically versatile *Pseudomonas putida* KT2440." *Environ Microbiol* **4** (12) pp.799-808.
150. **Niemetz, R., U. Altenschmidt, S. Brucker y G. Fuchs** (1995). "Benzoyl-coenzyme-A 3-monooxygenase, a flavin-dependent hydroxylase. Purification, some properties and its role in aerobic benzoate oxidation via gentisate in a denitrifying bacterium." *Eur J Biochem* **227** (1-2) pp.161-168.
151. **Nogales, J., A. Canales, J. Jimenez-Barbero, J.L. Garcia y E. Diaz** (2005). "Molecular characterization of the gallate dioxygenase from *Pseudomonas putida* KT2440. The prototype of a new subgroup of extradiol dioxygenases." *J Biol Chem* **280** (42) pp.35382-35390.
152. **Nogales, J., R. Macchi, F. Franchi, D. Barzagli, C. Fernández, G. J.L., G. Bertoni y E. Díaz** (2007). "Characterization of the last step of the aerobic phenylacetic acid degradation pathway." *Microbiology* **153** (2) pp.357-365.
153. **O'Connor, K., C.M. Buckley, S. Hartmans y A.D. Dobson** (1995). "Possible regulatory role for nonaromatic carbon sources in styrene degradation by *Pseudomonas putida* CA-3." *Appl Environ Microbiol* **61** (2) pp.544-548.
154. **O'Connor, K., W. Duetz, B. Wind y A.D. Dobson** (1996). "The effect of nutrient limitation on styrene metabolism in *Pseudomonas putida* CA-3." *Appl Environ Microbiol* **62** (10) pp.3594-3599.
155. **O'Connor, K.E., A.D. Dobson y S. Hartmans** (1997). "Indigo formation by microorganisms expressing styrene monooxygenase activity." *Appl Environ Microbiol* **63** (11) pp.4287-4291.

156. **O'Leary, N.D., K.E. O'Connor y A.D. Dobson** (2002). "*Biochemistry, genetics and physiology of microbial styrene degradation.*" *FEMS Microbiol Rev* **26** (4) pp.403-417.
157. **O'Leary, N.D., K.E. O'Connor, W. Duetz y A.D. Dobson** (2001). "*Transcriptional regulation of styrene degradation in Pseudomonas putida CA-3.*" *Microbiology* **147** (Pt 4) pp.973-979.
158. **O'Leary, N.D., K.E. O'Connor, P. Ward, M. Goff y A.D. Dobson** (2005). "*Genetic characterization of accumulation of polyhydroxyalkanoate from styrene in Pseudomonas putida CA-3.*" *Appl Environ Microbiol* **71** (8) pp.4380-4387.
159. **Ohtsubo, Y., M. Delawary, K. Kimbara, M. Takagi, A. Ohta y Y. Nagata** (2001). "*BphS, a key transcriptional regulator of bph genes involved in polychlorinated biphenyl/biphenyl degradation in Pseudomonas sp. KKS102.*" *J Biol Chem* **276** (39) pp.36146-36154.
160. **Olivera, E.R., B. Miñambres, B. García, C. Muniz, M.A. Moreno, A. Ferrández, E. Díaz, J.L. García y J.M. Luengo** (1998). "*Molecular characterization of the phenylacetic acid catabolic pathway in Pseudomonas putida U: the phenylacetyl-CoA catabolon.*" *Proc Natl Acad Sci USA* **95** (11) pp.6419-6424.
161. **Olivera, E.R., A. Reglero, H. Martinez-Blanco, A. Fernandez-Medarde, M.A. Moreno y J.M. Luengo** (1994). "*Catabolism of aromatics in Pseudomonas putida U. Formal evidence that phenylacetic acid and 4-hydroxyphenylacetic acid are catabolized by two unrelated pathways.*" *Eur J Biochem* **221** (1) pp.375-381.
162. **Otto, K., K. Hostetter, M. Rothlisberger, B. Witholt y A. Schmid** (2004). "*Biochemical characterisation of StyAB from Pseudomonas sp. Strain VLB120 as a two-component flavin-diffusible monooxygenase.*" *J Bacteriol* **186** (16) pp.5292-5302.
163. **Panke, S., V. de Lorenzo, A. Kaiser, B. Witholt y M.G. Wubbolts** (1999). "*Engineering of a stable whole-cell biocatalyst capable of (S)-styrene oxide formation for continuous two-liquid-phase applications.*" *Appl Environ Microbiol* **65** (12) pp.5619-5623.
164. **Panke, S., B. Witholt, A. Schmid y M.G. Wubbolts** (1998). "*Towards a biocatalyst for (S)-styrene oxide production: characterization of the styrene degradation pathway of Pseudomonas sp. strain VLB120.*" *Appl Environ Microbiol* **64** (6) pp.2032-2043.
165. **Pérez-Martín, J. y V. de Lorenzo** (1995). "*Integration host factor suppresses promiscuous activation of the sigma 54-dependent promoter Pu of Pseudomonas putida.*" *Proc Natl Acad Sci U S A* **92** (16) pp.7277-7281.
166. **Pérez-Martin, J., F. Rojo y V. de Lorenzo** (1994). "*Promoters responsive to DNA bending: a common theme in prokaryotic gene expression.*" *Microbiol Rev* **58** (2) pp.268-290.
167. **Perron-Savard, P., G. De Crescenzo y H. Le Moual** (2005). "*Dimerization and DNA binding of the Salmonella enterica PhoP response regulator are phosphorylation independent.*" *Microbiology* **151** (12) pp.3979-3987.
168. **Petruschka, L., G. Burchhardt, C. Muller, C. Weihe y H. Herrmann** (2001). "*The cyo operon of Pseudomonas putida is involved in carbon catabolite repression of phenol degradation.*" *Mol Genet Genomics* **266** (2) pp.199-206.
169. **Pieper, D.H. y W. Reineke** (2000). "*Engineering bacteria for bioremediation.*" *Curr Opin Biotechnol* **11** (3) pp.262-270.

170. **Prieto, M.A., B. Galán, B. Torres, A. Ferrández, C. Fernández, B. Miñambres, J.L. García y E. Díaz** (2004). "Aromatic metabolism versus carbon availability: the regulatory network that controls catabolism of less-preferred carbon sources in *Escherichia coli*." *FEMS Microbiol Rev* **28** (4) pp.503-518.
171. **Ramos, J.L., E. Diaz, D. Dowling, V. de Lorenzo, S. Molin, F. O'Gara, C. Ramos y K.N. Timmis** (1994). "The behavior of bacteria designed for biodegradation." *Biotechnology (N Y)* **12** (13) pp.1349-1356.
172. **Ramos, J.L., S. Marqués y K.N. Timmis** (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** pp.341-373.
173. **Reizer, J. y M.H. Saier, Jr.** (1997). "Modular multidomain phosphoryl transfer proteins of bacteria." *Curr Opin Struct Biol* **7** (3) pp.407-415.
174. **Rice, P.A., S. Yang, K. Mizuuchi y H.A. Nash** (1996). "Crystal structure of an IHF-DNA complex: a protein-induced DNA U-turn." *Cell* **87** (7) pp.1295-1306.
175. **Rigali, S., A. Derouaux, F. Giannotta y J. Dusart** (2002). "Subdivision of the helix-turn-helix *GntR* family of bacterial regulators in the *FadR*, *HutC*, *MocR*, and *YtrA* subfamilies." *J Biol Chem* **277** (15) pp.12507-12515.
176. **Robinson, V.L., T. Wu y A.M. Stock** (2003). "Structural analysis of the domain interface in *DrrB*, a response regulator of the *OmpR/PhoB* subfamily." *J Bacteriol* **185** (14) pp.4186-4194.
177. **Rodes, M.J.** (2007). "Caracterización estructural y funcional del regulador *StyR* de la ruta de biodegradación de estireno en *Pseudomonas* sp. Y2." Universidad Miguel Hernández.
178. **Rojo, F.** (2001). "Mechanisms of transcriptional repression." *Curr Opin Microbiol* **4** (2) pp.145-151.
179. **Rojo, F. y A. Dinamarca** (2004). "Catabolite repression and physiological control in *Pseudomonas*." *Pseudomonas*. Vol. 2. Ramos, J.L. (ed) New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers.
180. **Romanov, V. y R.P. Hausinger** (1996). "NADPH-dependent reductive ortho dehalogenation of 2,4-dichlorobenzoic acid in *Corynebacterium sepedonicum* KZ-4 and *Coryneform bacterium* strain NTB-1 via 2,4-dichlorobenzoyl coenzyme A." *J Bacteriol* **178** (9) pp.2656-2661.
181. **Rost, R., S. Haas, E. Hammer, H. Herrmann y G. Burchhardt** (2002). "Molecular analysis of aerobic phenylacetate degradation in *Azoarcus evansii*." *Mol Genet Genomics* **267** (5) pp.656-663.
182. **Saiki, R.K., S. Scharf, F. Faloona, K.B. Mullis, G.T. Horn, H.A. Erlich y N. Arnheim** (1985). "Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia." *Science* **230** (4732) pp.1350-1354.
183. **Sambrook, J., E.F. Fritsch y T. Maniatis** (1989). "Molecular cloning: A Laboratory Manual." Cold Spring Harbor, N.Y.

184. **Santos, P.M., J.M. Blatny, I. Di Bartolo, S. Valla y E. Zennaro** (2000). "*Physiological analysis of the expression of the styrene degradation gene cluster in Pseudomonas fluorescens ST.*" *Appl Environ Microbiol* **66** (4) pp.1305-1310.
185. **Santos, P.M., L. Leoni, I. Di Bartolo y E. Zennaro** (2002). "*Integration host factor is essential for the optimal expression of the styABCD operon in Pseudomonas fluorescens ST.*" *Res Microbiol* **153** (8) pp.527-536.
186. **Schink, B., B. Philipp y J. Muller** (2000). "*Anaerobic degradation of phenolic compounds.*" *Naturwissenschaften* **87** (1) pp.12-23.
187. **Schmid, A., J.S. Dordick, B. Hauer, A. Kiener, M. Wubbolts y B. Witholt** (2001). "*Industrial biocatalysis today and tomorrow.*" **409** pp.258-268.
188. **Schuck, P.** (2000). "*Size-distribution analysis of macromolecules by sedimentation velocity ultracentrifugation and lamm equation modeling.*" *Biophys J* **78** (3) pp.78(73):1606-1619.
189. **Schuck, P., M.A. Perugini, N.R. Gonzales, G.J. Howlett y D. Schubert** (2002). "*Size-distribution analysis of proteins by analytical ultracentrifugation: strategies and application to model systems.*" *Biophys J* **82** (2) pp.1096-1111.
190. **Schühle, K., J. Gescher, U. Feil, M. Paul, M. Jahn, H. Schagger y G. Fuchs** (2003). "*Benzoate-coenzyme A ligase from Thauera aromatica: an enzyme acting in anaerobic and aerobic pathways.*" *J Bacteriol* **185** (16) pp.4920-4929.
191. **Shimada, K., E. Kimura, T. Yasui, H. Tanaka, S. Matsushita, H. Hagihara, M. Nagakura y M. Kawahisa** (1992). "*Styrene formation by the decomposition by Pichi carsonii of trans-cinnamic acid added to a ground fish product.*" *Appl Environ Microbiol* **58** (5) pp.1577-1582.
192. **Shimizu, M., M. Miyake, F. Kanke, U. Matsumoto y H. Shindo** (1995). "*Characterization of the binding of HU and IHF, homologous histone-like proteins of Escherichia coli, to curved and uncurved DNA.*" *Biochim Biophys Acta* **1264** (3) pp.330-336.
193. **Shingler, V.** (2003). "*Integrated regulation in response to aromatic compounds: from signal sensing to attractive behaviour.*" *Environ Microbiol* **5** (12) pp.1226-1241.
194. **Shirai, K. y K. Hisatsuka** (1979). "*Isolation and identification of styrene assimilating bacteria.*" *Agric Biol Chem* **43** (7) pp.1595-1596.
195. **Smith, M.R.** (1990). "*The biodegradation of aromatic hydrocarbons by bacteria.*" *Biodegradation* **1** (2-3) pp.191-206.
196. **Smith, M.R.** (1994). "*The physiology of aromatic hydrocarbons degrading bacteria.*" *Ratledge C (ed) Biochemistry of microbial degradation.* Kluwer, Dordrecht pp.347-378.
197. **Solá, M., F.X. Gomis-Rüth, L. Serrano, A. González y M. Coll** (1999). "*Three-dimensional crystal structure of the transcription factor PhoB receiver domain.*" *J Mol Biol* **285** (2) pp.675-687.
198. **Song, F., Z. Zhuang, L. Finci, D. Dunaway-Mariano, R. Kniewel, J.A. Buglino, V. Solorzano, J. Wu y C.D. Lima** (2006). "*Structure, function, and mechanism of the phenylacetate pathway hot dog-fold thioesterase PaaI.*" *J Biol Chem* **281** (16) pp.11028-11038.

199. **Stülke, J. y W. Hillen** (1999). "Carbon catabolite repression in bacteria." *Curr Opin Microbiol* **2** (2) pp.195-201.
200. **Swoboda-Colberg, N.G.** (1995). "Chemical contamination of the environment: sources, types, and fates of synthetic organic chemicals." En: L.Y. Young y C.E. Cerniglia, *Microbial transformations and degradation of toxic organic chemicals*. Wiley-Liss, Inc., New York, pp.27-74.
201. **Sze, C.C., L.M. Bernardo y V. Shingler** (2002). "Integration of global regulation of two aromatic-responsive sigma(54)-dependent systems: a common phenotype by different mechanisms." *J Bacteriol* **184** (3) pp.760-770.
202. **Sze, C.C., A.D. Laurie y V. Shingler** (2001). "In vivo and in vitro effects of integration host factor at the DmpR-regulated sigma(54)-dependent Po promoter." *J Bacteriol* **183** (9) pp.2842-2851.
203. **Takenaka, S., S. Murakami, R. Shinke, K. Hatakeyama, H. Yukawa y K. Aoki** (1997). "Novel genes encoding 2-aminophenol 1,6-dioxygenase from *Pseudomonas* species AP-3 growing on 2-aminophenol and catalytic properties of the purified enzyme." *J Biol Chem* **272** (23) pp.14727-14732.
204. **Taylor, B.L. y I.B. Zhulin** (1999). "PAS domains: internal sensors of oxygen, redox potential, and light." *Microbiol Mol Biol Rev* **63** (2) pp.479-506.
205. **Taylor, L.A. y R.E. Rose** (1988). "A correction in the nucleotide sequence of the Tn903 kanamycin resistance determinant in pUC4K." *Nucleic Acids Res* **16** (1) pp.358.
206. **Timmis, K.N. y D.H. Pieper** (1999). "Bacteria designed for bioremediation." *Trends Biotechnol* **17** (5) pp.200-2004.
207. **Tropel, D. y J.R. van der Meer** (2004). "Bacterial transcriptional regulators for degradation pathways of aromatic compounds." *Microbiol Mol Biol Rev* **68** (3) pp.474-500.
208. **Ullmann, A.** (1996). "Catabolite repression: a story without end." *Res Microbiol* **147** (6-7) pp.455-458.
209. **Utkin, I.B., M.M. Yakimov, L.N. Matveeva, E.I. Kozlyak, I.S. Rogozhin, Z.G. Solomon y A.M. Bezbzorodov** (1991). "Degradation of styrene and ethylbenzene by *Pseudomonas* species Y2." *FEMS Microbiology Letters* (77) pp.237-242.
210. **van der Meer, J.R., W.M. de Vos, S. Harayama y A.J. Zehnder** (1992). "Molecular mechanisms of genetic adaptation to xenobiotic compounds." *Microbiol Rev* **56** (4) pp.677-694.
211. **Velasco, A., S. Alonso, J.L. García, J. Perera y E. Díaz** (1998). "Genetic and functional analysis of the styrene catabolic cluster of *Pseudomonas* sp. strain Y2." *J Bacteriol* **180** (5) pp.1063-1071.
212. **Venturi, V., F. Zennaro, G. Degrassi, B.C. Okeke y C.V. Bruschi** (1998). "Genetics of ferulic acid bioconversion to protocatechuic acid in plant- growth-promoting *Pseudomonas putida* WCS358." *Microbiology* **144** (Pt 4) pp.965-973.
213. **Volz, K. y P. Matsumura** (1991). "Crystal structure of *Escherichia coli* CheY refined at 1.7-Å resolution." *J Biol Chem* **266** (23) pp.15511-15519.

214. **Wang, Y., M. Rawlings, D.T. Gibson, D. Labbe, H. Bergeron, R. Brousseau y P.C. Lau** (1995). "Identification of a membrane protein and a truncated *LysR*-type regulator associated with the toluene degradation pathway in *Pseudomonas putida* F1." *Mol Gen Genet* **246** (5) pp.570-579.
215. **Warhurst, A.M., K.F. Clarke, R.A. Hill, R.A. Holt y C.A. Fewson** (1994). "Metabolism of styrene by *Rhodococcus rhodochrous* NCIMB 13259." *Appl Environ Microbiol* **60** (4) pp.1137-1145.
216. **West, S.E., H.P. Schweizer, C. Dall, A.K. Sample y L.J. Runyen-Janecky** (1994). "Construction of improved *Escherichia*-*Pseudomonas* shuttle vectors derived from pUC18/19 and sequence of the region required for their replication in *Pseudomonas aeruginosa*." *Gene* **148** (1) pp.81-86.
217. **Westblad, C., Y.A. Levindis, H. Richter, J.B. Howard y J. Carlson** (2002). "A study on toxic emissions from batch combustion of styrene." *Chemosphere* **49** (4) pp.395-412.
218. **Woodcock, D.M., P.J. Crowther, J. Doherty, S. Jefferson, E. DeCruz, M. Noyer-Weidner, S.S. Smith, M.Z. Michael y M.W. Graham** (1989). "Quantitative evaluation of *Escherichia coli* host strains for tolerance to cytosine methylation in plasmid and phage recombinants." *Nucleic Acids Res* **17** (9) pp.3469-3478.
219. **Wootton, J.C. y M.H. Drummond** (1989). "The *Q*-linker: a class of interdomain sequences found in bacterial multidomain regulatory proteins." *Protein Eng* **2** (7) pp.535-543.
220. **Yuste, L. y F. Rojo** (2001). "Role of the *crc* gene in catabolic repression of the *Pseudomonas putida* GPO1 alkane degradation pathway." *J Bacteriol* **183** (21) pp.6197-6206.
221. **Zaar, A., W. Eisenreich, A. Bacher y G. Fuchs** (2001). "A novel pathway of aerobic benzoate catabolism in the bacteria *Azoarcus evansii* and *Bacillus stearothermophilus*." *J Biol Chem* **276** (27) pp.24997-25004.
222. **Zaar, A., J. Gescher, W. Eisenreich, A. Bacher y G. Fuchs** (2004). "New enzymes involved in aerobic benzoate metabolism in *Azoarcus evansii*." *Mol Microbiol* **54** (1) pp.223-238.
223. **Zhuang, Z., K.H. Gartemann, R. Eichenlaub y D. Dunaway-Mariano** (2003). "Characterization of the 4-hydroxybenzoyl-coenzyme A thioesterase from *Arthrobacter* sp. strain SU." *Appl Environ Microbiol* **69** (5) pp.2707-2711.
224. **Zylstra, G.J. y D.T. Gibson** (1989). "Toluene degradation by *Pseudomonas putida* F1. Nucleotide sequence of the *todC1C2BADE* genes and their expression in *Escherichia coli*." *J Biol Chem* **264** (25) pp.14940-14946.

ARTÍCULOS

Coregulation by Phenylacetyl-Coenzyme A-Responsive PaaX Integrates Control of the Upper and Lower Pathways for Catabolism of Styrene by *Pseudomonas* sp. Strain Y2

Teresa del Peso-Santos,¹ David Bartolomé-Martín,¹ Cristina Fernández,² Sergio Alonso,³ José Luis García,² Eduardo Díaz,² Victoria Shingler,⁴ and Julián Perera^{1*}

Department of Biochemistry and Molecular Biology, I, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Complutense, 28040 Madrid, Spain¹; Department of Molecular Microbiology, Centro de Investigaciones Biológicas, CSIC, 28040 Madrid, Spain²; The Burnham Institute for Medical Research, La Jolla, California 92037³; and Department of Molecular Biology, Umeå University, S-901 87 Umeå, Sweden⁴

Received 2 February 2006/Accepted 6 April 2006

The P_{styA} promoter of *Pseudomonas* sp. strain Y2 controls expression of the *styABCD* genes, which are required for the conversion of styrene to phenylacetate, which is further catabolized by the products of two *paa* gene clusters. Two PaaX repressor proteins (PaaX1 and PaaX2) regulate transcription of the *paa* gene clusters of this strain. In silico analysis of the P_{styA} promoter region revealed a sequence located just within *styA* that is similar to the reported PaaX binding sites of *Escherichia coli* and the proposed PaaX binding sites of the *paa* genes of *Pseudomonas* species. Here we show that protein extracts from some *Pseudomonas* strains that have *paaX* genes, but not from a *paaX* mutant strain, can bind and retard the migration of a P_{styA} specific probe. Purified maltose-binding protein (MBP)–PaaX1 fusion protein specifically binds the P_{styA} promoter proximal PaaX site, and this binding is eliminated by the addition of phenylacetyl-coenzyme A. The sequence protected by MBP–PaaX1 binding was defined by DNase I footprinting. Moreover, MBP–PaaX1 represses transcription from the P_{styA} promoter in a phenylacetyl-coenzyme A-dependent manner in vitro. Finally, the inactivation of both *paaX* gene copies of *Pseudomonas* sp. strain Y2 leads to a higher level of transcription from the P_{styA} promoter, while heterologous expression of the PaaX1 in *E. coli* greatly decreases transcription from the P_{styA} promoter. These findings reveal a control mechanism that integrates regulation of styrene catabolism by coordinating the expression of the styrene upper catabolic operon to that of the *paa*-encoded central pathway and support a role for PaaX as a major regulatory protein in the phenylacetyl-coenzyme A catabolon through its response to the levels of this central metabolite.

Aerobically, phenylacetic acid (PA) is catabolized through phenylacetyl-coenzyme A (PA-CoA), which is the common intermediate of the large PA-CoA catabolon (23). The *paa* gene clusters that encode the enzymes responsible for PA catabolism (Fig. 1) are widely distributed in bacteria (1, 4, 15, 26, 27, 30, 32). GntR-type PaaX repressors that bind to specific operator sites of the cognate promoter regions control transcription of the *paa* gene clusters. The interaction of PaaX with PA-CoA leads to its release from the operator sequence to allow transcription (14). More recently, PaaX has also been reported to act on the expression of the *pac* gene of *Escherichia coli*. This gene encodes the industrially useful penicillin G acylase, which appears to play a fundamental role in the PA-CoA catabolon by acting as a PA scavenger (17, 20).

Channeling of styrene to PA by means of the styrene upper catabolic pathway encoded by the *styABCD* operon (Fig. 1) has been documented for several *Pseudomonas* species (5, 28, 29, 31, 38). A typical two-component regulatory system comprising the StyS sensor kinase and the StyR DNA-binding response regulator is necessary for transcription from the P_{styA} promoter of the *styABCD* operon (29, 31, 38). In the presence of styrene,

StyS catalyzes the phosphorylation of StyR, which forms a dimer that recognizes three operator sites in the P_{styA} promoter region (21, 22). This promoter region also contains a putative site for the binding of the integration host factor (IHF) (22, 33, 38).

Pseudomonas sp. strain Y2, a strain able to degrade styrene via the *sty* pathway (*styABCD*) (38), contains two functional copies of the *paa* gene cluster, named *paa1* and *paa2* (1, 4), that serve as the styrene lower catabolic pathways. Therefore, this strain also contains two copies of the PaaX regulator, designated PaaX1 and PaaX2, which share 86% identity (1, 4). In this work, we present in vivo and in vitro evidence that the regulation of the P_{styA} promoter in *Pseudomonas* sp. strain Y2 is more complex than previously envisioned, since the PaaX regulator also binds to this promoter to repress transcription in the absence of PA-CoA. This finding expands our current view of the PaaX regulon to include the catabolism of toxic aromatic compounds, such as styrene, and places the PaaX protein at the center of an interesting case of an integrated regulatory strategy for the catabolism of aromatic compounds (reviewed by Shingler [34]), namely, a mechanism in which transcriptional control of the expression of the catabolic genes integrates responses to both a substrate (styrene through StyR/StyS) and a pathway intermediate (PA-CoA through PaaX). Conceptually, this regulatory scheme is reminiscent of that reported for the sub-

* Corresponding author. Mailing address: Department of Biochemistry and Molecular Biology, I, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Complutense, 28040 Madrid, Spain. Phone: 34-913944145. Fax: 34-913944672. E-mail: perera@bio.ucm.es.

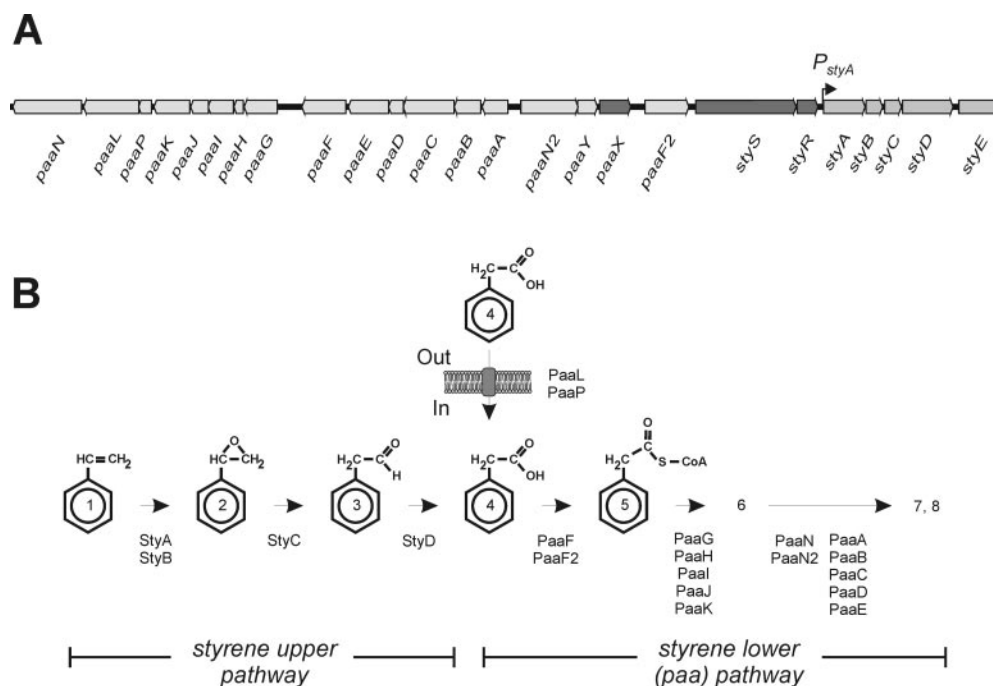


FIG. 1. Styrene catabolic genes and enzymatic pathway of *Pseudomonas* sp. strain Y2. (A) Genetic map of the *sty* and *paa1* gene clusters of *Pseudomonas* sp. strain Y2. The P_{styA} promoter controlled by the StySR proteins regulates expression of the *sty* catabolic genes (*styABCD*) that encode the enzymes responsible for the transformation of styrene to phenylacetate; *styE* encodes a putative porin (38). The *paaF2N2ABCDEFGHIJKPLN* genes encode the enzymes that transform phenylacetate into metabolites of the Krebs cycle; *paaXY* genes encode regulatory proteins. The consensus nomenclature for the *paa* genes proposed by Luengo et al. (23) has been used. Arrows indicate the direction of transcription (1). (B) Styrene upper and lower catabolic pathways. Compounds are as follows: 1, styrene; 2, styrene oxide; 3, phenylacetaldehyde; 4, phenylacetate; 5, phenylacetyl-CoA; 6, hydroxy derivative of phenylacetyl-CoA; 7, aliphatic derivative of phenylacetyl-CoA; 8, intermediate metabolites of tricarboxylic acid cycle. Enzymes and proteins are as follows: StyAB, styrene monooxygenase; StyC, epoxystyrene isomerase; StyD, phenylacetaldehyde dehydrogenase; PaaL, permease; PaaP, membrane protein; PaaF and PaaF2, phenylacetyl-CoA ligases; PaaGHIJK, putative multicomponent phenylacetyl-CoA oxygenase; PaaN, PaaN2 and PaaABCDE, putative enzymes involved in ring-cleavage and β -oxidation-like reactions of the aliphatic-CoA intermediate. "Out" and "in" refer to the periplasmic and cytoplasmic spaces, respectively (1, 4).

strate benzoate and intermediate *cis*-muconate in control of benzoate catabolism through the β -ketoacid pathway (7, 8).

MATERIALS AND METHODS

Strain and plasmid constructions. Bacterial strains, plasmids, and sequences of primers used in DNA manipulations are listed in Tables 1 and 2. Plasmids used for expressing the *paaX1* gene of *Pseudomonas* sp. strain Y2 under the control of the P_{lac} promoter of different vectors were generated as follows. The *paaX1* gene, amplified from pUE14 using primers X5 and X3, was digested with EcoRI to XbaI and the resulting 1,049-bp fragment cloned between the corresponding sites of pSJP18Not to give rise to pJ18X1. The broad-host-range pVLTX1 plasmid carrying P_{lac} -*paaX1* was generated by cloning the *paaX1* gene excised from pJ18X1 as an EcoRI-to-HindIII fragment between the corresponding sites of pVLT31. As an intermediate in construction of a *paaX1* deletion mutant, the 1,046-bp EcoRI-to-SalI *paaX1* gene fragment from pJ18X1 was cloned between the same sites of pUCP26 to give plasmid pUXES. For expression of the maltose-binding protein (MBP)-PaaX1 fusion protein, the *paaX1* gene was PCR amplified from pUE14 plasmid by using primers BluntX5 and X3 and a 956-bp XbaI product cloned into XmnI to XbaI sites of pMAL-c2X vector to generate pM-X1.

Pseudomonas sp. strain Y2T2X1, which harbors a kanamycin resistance (Km^r) cassette replacing an internal portion of the *paaX1* gene of *Pseudomonas* sp. strain Y2T2, was generated by recombination as follows. A 1,252-bp HincII kanamycin-resistant fragment was isolated from pUC4K (Table 1) and cloned in the HincII site of pBluescript II KS(+) to give pBlueKm that allows recovery of the Km^r cassette as a 1,296-bp EcoRV-KpnI fragment. The EcoRV-KpnI Km^r cassette was used to replace the internal 499-bp SmaI-to-KpnI *paaX1* fragment of pUXES, yielding pUXKm. Primers BluntB5 and X3 (Table 2) were used to

PCR amplify the *paaX1*- Km^r deletion/replacement of pUXKm as a BamHI-to-XbaI fragment that was cloned between these sites of R6K-based suicide vector pKNG101 to give pKXKm in the replication permissive *E. coli* S17-1 λ pir strain. Finally, the mobilizable pKXKm suicide plasmid was conjugated to *Pseudomonas* sp. strain Y2T2 as previously described (1). Plating on kanamycin, tetracycline, and sucrose-containing medium was used as the method of selection for double recombinants, which were verified by screening for loss of the suicide plasmid by testing sensitivity to streptomycin and by PCR (data not shown) using BluntX5 and X3 primers (Table 2).

The *in vitro* transcription plasmid pTE-E1B1 was generated using primers E1 and B1 that amplify the -148-to-+67 P_{styA} region (Fig. 2) as an EcoRI-to-BamHI fragment that was cloned between these sites of pTE103. Supercoiled DNA was prepared by CsCl gradient, extensively dialyzed, and clarified through Micro Bio-Spin P30 columns (Bio-Rad) equilibrated with 20 mM Tris-HCl, pH 7.5, to remove trace CsCl prior to use in *in vitro* transcription assays.

Crude extracts and purification of MBP-PaaX1 and His-StyR. Crude extracts were prepared from *Pseudomonas* strains grown at 30°C in M9 minimal medium supplemented with 0.4% (wt/vol) glycerol and harvested at optical density at 600 nm (OD_{600}) of 1.0. Cells were washed and resuspended in 0.05 volumes of 20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 10% glycerol, 2 mM β -mercaptoethanol, and 50 mM KCl prior to disruption by sonication. Crude extracts were clarified by removal of cell debris by centrifugation at 5,000 rpm for 45 min at 4°C and protein concentration was determined by the method of Bradford (6), using bovine serum albumin as the standard.

The MBP-PaaX1 fusion protein expressed by *E. coli* UT5600 harboring pM-X1 was purified through amylose chromatography columns as described in the pMAL protein fusion and purification system protocol (New England Biolabs) and conserved in the elution buffer (20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 250 mM KCl, 15 mM maltose). Expression of the His-StyR fusion protein in *E. coli* MV1184 cells carrying plasmid pQ-R was induced by culturing in the presence of 1 mM

TABLE 1. Bacterial strains and plasmids

Bacterial strain or plasmid	Relevant genotype/phenotype ^a	Reference/source
Strains		
<i>Pseudomonas</i> sp. strain Y2	<i>paa</i> ⁺ <i>sty</i> ⁺ <i>lacZ</i> Ap ^r Cm ^r	37
<i>Pseudomonas</i> sp. strain Y2T2	Δ <i>paa2</i> deletion mutant of <i>Pseudomonas</i> sp. strain Y2; <i>paa</i> ⁺ <i>sty</i> ⁺ Ap ^r Cm ^r Tc ^r	4
<i>Pseudomonas</i> sp. strain Y2K1	Δ <i>paa1</i> deletion mutant of <i>Pseudomonas</i> sp. strain Y2; <i>paa</i> ⁺ <i>sty</i> ⁺ Ap ^r Cm ^r Km ^r	4
<i>Pseudomonas</i> sp. strain Y2K1T2	Δ <i>paa1</i> Δ <i>paa2</i> double deletion mutant of <i>Pseudomonas</i> sp. strain Y2; <i>paa</i> <i>sty</i> Ap ^r Cm ^r Km ^r Tc ^r	4
<i>Pseudomonas</i> sp. strain Y2T2X1	Δ <i>paaX1</i> mutant of <i>Pseudomonas</i> sp. strain Y2T2; <i>paa</i> ⁺ <i>sty</i> ⁺ Ap ^r Cm ^r Tc ^r Km ^r	This work
<i>Pseudomonas putida</i> KT2442	<i>paa</i> ⁺ <i>sty</i> Ap ^r Cm ^r	3
<i>Pseudomonas putida</i> U	<i>paa</i> ⁺ <i>sty</i> Ap ^r Cm ^r	30
<i>E. coli</i> UT5600	F ⁻ <i>ara-14 leuB6 secA6 lacY1 proC14 tsx-67</i> Δ (<i>ompT-fepC</i>)266 <i>entA403 trpE38 rfbD1 rpsL109 xyl-5 mtl-1 thi-1</i>	11
<i>E. coli</i> MV1184	<i>ara</i> Δ (<i>lac-proAB</i>) <i>rpsL thi</i> (Φ 80 <i>lacZ</i> Δ M15) Δ (<i>srl-recA</i>)306::Tn10 (Tc ^r) F ['] [<i>traD36 proAB</i> ⁺ <i>lacI</i> ^q <i>lacZ</i> Δ M15]	39
<i>E. coli</i> S17-1 λ pir	<i>recA thi hsdR</i> M ⁺ RP4::2-Tc::Mu::Km::Tn7, λ pir lysogen, Tp ^r Sm ^r	10
<i>E. coli</i> W14	Δ <i>paa</i> derivative of <i>E. coli</i> W	16
Plasmids		
pISm7.0R	pUC19-based plasmid containing <i>stySR-styAB</i> genes of <i>Pseudomonas</i> sp. strain Y2 after <i>P</i> _{lac} ; Ap ^r	38
pUE14	pUC19-based plasmid carrying a chromosomal EcoRI fragment of <i>Pseudomonas</i> sp. strain Y2 that spans part of <i>paaA</i> , <i>paaN2</i> , <i>paaY</i> , <i>paaX</i> , <i>paaF2</i> , <i>styS</i> , <i>styR</i> , <i>styA</i> , <i>styB</i> , and part of <i>styC</i> gene; Ap ^r	38
pSJP18Not	<i>ori</i> pCK01 Cm ^r	18
pJ18X1	<i>paaX1</i> inserted between XbaI and EcoRI sites of pSJP18Not; Cm ^r	This work
pVLT31	<i>ori</i> RSF1010 <i>lacI</i> ^q / <i>P</i> _{lac} Tc ^r	9
pVLTX1	<i>paaX1</i> inserted between the EcoRI and HindIII sites of pVLT31; Tc ^r	This work
pMal-c2X	<i>ori</i> ColE1 <i>rop male lacZ</i> α <i>lacI</i> ^q / <i>P</i> _{lac} Ap ^r	New England Biolabs
pM-X1	<i>paaX1</i> inserted between the XmnI and XbaI sites of pMal-c2X; Ap ^r	This work
pTE103	Plasmid which carries a strong T7 transcriptional terminator downstream of a multicloning site	12
pTE-E1B1	pTE103 carrying the <i>P</i> _{styA} promoter; Ap ^r	This work
pQ-R	pQE-9 (QIAGEN)-based plasmid carrying the <i>Pseudomonas</i> sp. strain Y2 <i>styR</i> gene fused to a amino-terminal polyhistidine (six-His) tag	S. Alonso
pUC4K	pUC4 derivative containing a Km resistance cassette; <i>ori</i> ColE1 Ap ^r Km ^r	35
pBluescript II KS(+)	General purpose cloning vector; <i>ori</i> ColE1 Ap ^r	Stratagene
pBlueKm	pBluescript II KS(+) with Km ^r cassette from pUC4K	This work
pUCP26	Broad-host-range <i>P</i> _{lac} cloning vector; <i>lacZ</i> α Tc ^r	40
pUXES	<i>paaX1</i> inserted in pUCP26; Tc ^r	This work
pUXKm	Δ <i>paaX1</i> -Km ^r gene deletion/replacement cassette on pUCP26; Km ^r Tc ^r	This work
pKNG101	Mobilizable suicide vector for marker-exchange mutagenesis; <i>ori</i> R6K Sm ^r <i>sacB</i>	19
pKXKm	Δ <i>paaX1</i> -Km ^r gene deletion/replacement cassette on pKNG101; Km ^r Sm ^r <i>sacB</i>	This work

^a Ap^r, ampicillin resistant; Cm^r, chloramphenicol resistant; Tc^r, tetracycline resistant; Km^r, kanamycin resistant; Tp^r, trimethoprim resistant; Sm^r, streptomycin resistant.

IPTG (isopropyl- β -D-thiogalactoside) for 6 h. The fusion protein was purified from crude extracts prepared in lysis buffer (20 mM potassium phosphate, pH 7.5, 500 mM NaCl) by affinity chromatography using a Chelating Sepharose Fast Flow matrix (Amersham Biosciences) previously charged with NiCl₂ and equilibrated with lysis buffer. After washing with lysis buffer containing 75 mM imidazole, the His-StyR protein was eluted with lysis buffer containing 500 mM imidazole and buffer exchanged to 20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 250 mM KCl, 5% glycerol using the Micrococon YM-10 centrifugal filter unit system (Millipore). Purified proteins were stored at -80°C.

Electromobility shift and DNA footprinting assays. The STY DNA probe was generated by PCR amplification using plasmid pISm7.0R and primers styAXL and styAXR (Fig. 2; Tables 1 and 2). Radioactivity was incorporated via the styAXL primer that was pre-labeled by using [γ -³²P]ATP (>3,000 Ci/mmol) and T4 polynucleotide kinase. The resulting radioactive PCR product was purified using the High Pure PCR product purification kit (Roche). Electromobility shift reaction mixtures (9 μ l final volume) containing 0.1 nM STY probe, 50 μ g/ml salmon sperm DNA, the indicated amount of crude extract or purified MBP-PaaX1, and 50 μ g/ml bovine serum albumin in T buffer (20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 10% glycerol, 2 mM β -mercaptoethanol, 50 mM KCl) were incubated for 20 min at 20°C. The resulting complexes were analyzed by electrophoresis in 5% polyacrylamide gels buffered with 0.5 \times TBE (45 mM Tris-borate, 1 mM EDTA). The gels were dried onto Whatman 3MM filter paper and exposed to Hyperfilm MP (Amersham Biosciences).

DNase I footprinting reaction mixtures (15 μ l final volume) were prepared and incubated with the indicated amount of MBP-PaaX1 as described above. Three microliters of DNase I (0.05 units DNase I from Amersham Biosciences prepared in 10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 10 mM MgCl₂, 10 mM CaCl₂, 125 mM KCl) was added and reaction mixtures further incubated at 37°C for 20 to 25 s. The reactions were terminated by the addition of 180 μ l of a solution containing 0.4 M sodium acetate, 2.5 mM EDTA, 50 μ g/ml calf thymus DNA, and 0.3 μ l/ml glycogen. After phenol-chloroform extraction, the samples were precipitated and washed with 70% ethanol, dried, and resuspended in 4 μ l of 90% (vol/vol) formamide loading buffer (10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 20 mM EDTA, 0.05% [wt/vol] bromophenol blue, 0.05% [wt/vol] xylene cyanol). Samples were denatured at 95°C for 5 min and analyzed on a 7% denaturing polyacrylamide-urea gel. A+G Maxam and Gilbert sequencing reactions (24) with the same DNA fragment were loaded along the footprinting samples, and the gels were treated as described above.

In vitro transcription assays. Reactions (20 μ l final volume) were performed at 30°C in transcriptional buffer containing 50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 50 mM KCl, 20 mM MgCl₂, 1 mM dithiothreitol, 0.1 mM EDTA, and 0.2 mg/ml bovine serum albumin. Purified His-StyR was phosphorylated just prior to in vitro-transcription assays by incubation at 28°C for 45 min in the same buffer supplemented to 20 mM MgCl₂ and 20 mM acetylphosphate. *E. coli* σ ⁷⁰-RNA polymerase (Epicenter) (10 nM), the pTE-E1B1 template (5 nM), purified *E. coli* IHF (20 nM), phosphorylated His-StyR (2 μ M), and the indicated amounts of purified MBP-PaaX1 and PA-CoA

aacaatg TGATT Cgtgtttttaattaattcacgaaaactg- GAAT Cgtaa	<i>P_G</i> (formerly <i>P_a</i>) (<i>E. coli</i> W)
cttttta TGATT Cgcgatttaactatttagcaacagaaatgt GAA aCA t ct	<i>P_N</i> (formerly <i>P₂</i>) (<i>E. coli</i> W)
tgtgcta TGATT Cataaatcacaacaataacaacagact-- GAAT Cgaat	<i>P_X</i> (<i>E. coli</i> W)
aataaagc GATT CgTTTTtagatcacattaatgaaatTTTT- G t ATCA aaa	<i>P_{paaC}</i> (<i>E. coli</i> W)
attgaaa TGATT Cgctttggatcacatttagttattttatc- G t ATCA ata	<i>P_{paaC}</i> (<i>K. citrophila</i>)
..... TGATT C-----27 bp apx----- GAAT CA...	CONSENSUS <i>E. coli</i>
aaaaaaga GATAC GcgaaaacatTTTTgCgCcttgCattgt TGTAT Cgcat	<i>P_{paaA}</i> (<i>P. putida</i> KT2440)
tcttactt GATACA cataaatgtgTTtgacgTTatgTTt- TGTAT Cgctt	<i>P_{paaG}</i> (<i>P. putida</i> KT2440)
cactatga GATACA cgaaaacaatTTTTcgatgTTgCatttcc GTAT CgCgt	<i>P_{paaA}</i> (<i>P. putida</i> U)
tcttattt GATACA cctaaaaactgTTtgacgTTgTgTTt- TGTAT Cgctt	<i>P_{paaG}</i> (<i>P. putida</i> U)
aaaatcaa GACACA ttaaattcagcTgCtattgTTTTta TGTAT Cacat	<i>P_{paaB}</i> (<i>P. fluorescens</i> Pf-5)
aaaaacaa GACACA taataaattTTtaattgTTTTac- TGTAT Cgctt	<i>P_{paaA}</i> (<i>P. sp.</i> strain Y2) (-60/-24)
tcataagc GACACA ctattttattgTTtgatattgTTtc- TGTAT Cgctt	<i>P_{paaG}</i> (<i>P. sp.</i> strain Y2) (-51/-15)
tatcatta GACACA tatttttTgTgTgatgTTgTTTTc TGTAT Cgcat	<i>P_{paaA2}</i> (<i>P. sp.</i> strain Y2) (-50/-13)
acaattac GACAC CAtttttTgTgTgatattgTTt- TGTAT Cactt	<i>P_{paaG2}</i> (<i>P. sp.</i> strain Y2) (-51/-15)
..... GATACA -----26 bp apx----- TGTAT C....	CONSENSUS <i>paa Pseudomonas</i>
agcaaccacaca ACA aaaaaaggTataagccatgaaaagc- GTAT Cggta	<i>P_{styA}</i> (strain Y2) (+12/+48)
----- footprint -----	

FIG. 3. PaaX binding sites. Comparison of PaaX binding sites of several promoters of *E. coli* W (GenBank accession number X97452) and *Kluyvera citrophila* (M15418) with putative PaaX binding sites found in the *paa* promoters of *P. putida* KT2440 (AE015451), *P. putida* U (AF029714), *P. fluorescens* Pf-5 (NC004129), and *Pseudomonas* sp. strain Y2 (AJ000330 and AJ579894) and with the PaaX binding site identified in *P_{styA}*. *P_G* (formerly *P_a*), *P_N* (formerly *P₂*), and *P_X* refer to the promoters that control transcription of the three *paa* operons of *E. coli*. *P_{paaC}* is the promoter that drives the transcription of the penicillin G acylase gene. *P_{paaA}*, *P_{paaG}*, *P_{paaA2}*, *P_{paaG2}*, and *P_{paaB}* are promoters of the corresponding *paa* genes of *Pseudomonas* species. *P_{styA}* is the promoter that controls the transcription of the *styABCD* styrene catabolic operon of *Pseudomonas* sp. strain Y2. The location of the region encompassing both 6-bp inverted repeats relative to the putative transcription start point is given in parentheses at right. Consensus sequences of putative PaaX binding sites are also displayed. Nucleotides identical to the consensus are shown in uppercase bold letters. Conserved nucleotides between the *E. coli* and *Pseudomonas* consensus sequences are underlined. The region of *P_{styA}* protected by PaaX1 of *Pseudomonas* sp. strain Y2 against DNase I is displayed as a box (see the text).

OD₆₀₀ of 0.6. At that point, each culture was divided into two flasks. One flask of every pair was induced with styrene supplied in gas phase via saturated atmosphere (*Pseudomonas* cultures for 5 min; *E. coli* cultures for 30 min), whereas the other was left uninduced. TRI reagent (Ambion) and RNAqueous kit (Ambion) were used to extract the total RNA from 12-ml culture samples according to the manufacturer's instructions. Agarose gel electrophoresis confirmed the integrity of the RNA. For cDNA synthesis, 2.5 µg of total RNA as determined spectrophotometrically was incubated for 3 h at 42°C with 200 U of SuperScript II reverse transcriptase (Invitrogen) in the presence of random hexamer primers. Control reactions to assess the level of DNA contamination in the RNA samples were carried out without reverse transcriptase. Once the reactions were completed, RNase A (Roche) and RNase H (USB) were added to the reaction mixtures to remove the remaining RNA. The synthesized cDNA was purified using a QIAquick PCR purification kit (QIAGEN), and its concentration was determined spectrophotometrically. Real-time PCR (RT-PCR) was performed using an ABI PRISM 7700 sequence detection system (Applied Biosystems) with SYBR green PCR master mix (Applied Biosystems). Master mixtures were prepared as recommended by the manufacturer, with primer concentrations optimized for each primer pair. The QstyA (F) and QstyA (R) primers (Table 2) amplify a 73-bp fragment of *styA*. Internal standards for normalization were provided by the QTcR2 (F) and QTcR2 (R) primers and the ApL2 and ApR2 primers (Table 2) that amplify a 74-bp fragment and an 82-bp fragment from the *tetA* (tetracycline resistance) and *bla* (ampicillin resistance) genes, respectively. For quantification, standard curves of cDNA dilutions (1:10 to 1:10,000) were made in duplicate for each primer pair. PCR efficiencies were similar, allowing direct comparison of results.

RESULTS AND DISCUSSION

The *P_{styA}* promoter region of *Pseudomonas* sp. strain Y2 contains a putative binding site for PaaX. Initially, a 15-bp consensus sequence was proposed as the binding site for PaaX at different *paa* promoters (14, 17), but this sequence was later extended to a 39-bp region with two perfect 6-bp inverted repeats (TGATTTC and GAATCA) separated by 27 nucleotides (20) as shown in Fig. 3. An in silico analysis of the *paa* clusters of *Pseudomonas* sp. strain Y2, made using the Fuzznuc program from the Emboss suite (<http://emboss.sourceforge.net/>), revealed the existence of several putative PaaX binding sites very similar to putative PaaX binding sites proposed for homologous *paa* operons of other *Pseudomonas* species. The *Pseudomonas* consensus sequence for putative PaaX binding sites consists of two perfect inverted repeats (GATACA and TGTATC) about 26 bp apart, which bear some similarity to those reported for *E. coli* (Fig. 3). Given that PaaX operator sequences have also been found to function within promoters of non-*paa* genes (17, 20), we also performed an in silico analysis of the promoter region of the styrene upper catabolic genes of *Pseudomonas* sp. strain Y2. This analysis revealed a previously unidentified putative

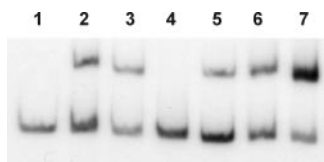


FIG. 4. Electrophoretic mobility shift assays of the STY probe with cell extracts from different *Pseudomonas* species. Lane 1, free STY probe; lane 2, cell extracts of *Pseudomonas* sp. strain Y2K1 ($\Delta paa1$) (4.4 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$); lane 3, cell extracts of *Pseudomonas* sp. strain Y2T2 ($\Delta paa2$) (4.2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$); lane 4, cell extracts of *Pseudomonas* sp. strain Y2K1T2 ($\Delta paa1 \Delta paa2$) (3.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$); lane 5, cell extracts of *P. putida* KT2442 (2.3 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$); lane 6, cell extracts of *P. putida* U (5.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$); lane 7, cell extracts of *Pseudomonas* sp. strain Y2 (pVLTX1) (3.3 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$).

PaaX binding site located between positions +12 and +48 with respect to the transcriptional start site from P_{styA} , just within the *styA* gene of the *styABCD* operon (Fig. 2 and 3). This putative site contains five of the six nucleotides present in the right-half inverted repeat of the consensus, but only the last three of the six consensus residues of the left hand repeat (Fig. 3, bottom panel). Although divergent from the consensus, this finding suggested to us that PaaX might bind the P_{styA} promoter of *Pseudomonas* sp. strain Y2, adding previously unsuspected complexity to the regulation of this promoter.

PaaX binds the P_{styA} promoter region in vitro. To explore the possibility that PaaX binds the P_{styA} promoter region, we performed electrophoretic mobility shift assays using a STY DNA probe containing the putative PaaX binding site in the P_{styA} promoter and cell extracts from different *Pseudomonas* strains that either contain or lack *paaX* genes. To avoid interferences by IHF in the assays with cellular crude extracts, the DNA fragment used (–73 to +154) (Fig. 2) lacks the binding site for IHF. As shown in Fig. 4, crude extracts from the *Pseudomonas* strains containing a single *paaX* gene, e.g., *Pseudomonas putida* KT2442, *P. putida* U, and the two *Pseudomonas* sp. strain Y2 deletion mutants, K1 ($\Delta paa1$) and T2 ($\Delta paa2$), that lack either *paaX1* or *paaX2*, were able to bind and retard the migration of the STY probe. However, crude extracts from *Pseudomonas* sp. strain Y2K1T2, a double *paa* deletion mutant ($\Delta paa1 \Delta paa2$), did not retard migration of the STY probe (Fig. 4, lane 4). Interestingly, retardation of the STY probe increased significantly when using a crude extract from *Pseudomonas* sp. strain Y2 harboring pVLTX1 (Fig. 4,

lane 7), which overexpresses PaaX1 from the P_{lac} promoter of the plasmid. *P. putida* KT2442 and *P. putida* U lack the specific StyR regulator; therefore, these results suggest that the *paaX* gene products of different *Pseudomonas* strains might bind the P_{styA} promoter and that both the *paaX1* and *paaX2* gene products of *Pseudomonas* sp. strain Y2 are capable of binding to the P_{styA} proximal PaaX binding site (Fig. 2).

To confirm specific binding and to study the interaction between PaaX and the P_{styA} promoter, we purified the PaaX1 regulator with an N-terminal fusion to the maltose-binding protein. The purified MBP-PaaX1 protein retards the STY DNA probe in a dose-dependent fashion (Fig. 5A), and retardation can be specifically blocked by the addition of cold competitor STY DNA (Fig. 5B, lane 9). Controls made with MBP alone do not retain the probe (data not shown). In *E. coli*, PA-CoA induces the transcription of PaaX-dependent promoters through a mechanism that involves the direct binding of PA-CoA to PaaX and consequent release of this repressor (14, 17, 20). Therefore, we analyzed whether a similar process might control binding of PaaX to the P_{styA} proximal binding site. As shown in Fig. 5B, this appears to be the case, since MBP-PaaX1 binding to the STY DNA probe is inhibited by PA-CoA but not by PA (Fig. 5B). Thus, PA-CoA controlled binding of PaaX may play an integral role in regulation of the expression of *sty* genes.

Characterization of the PaaX operator site within the P_{styA} promoter region. To define the limits of the sequence bound to PaaX1 in the P_{styA} region, we performed a DNase I footprinting analysis. Consistent with the in silico analysis, MBP-PaaX1 protects a region spanning from positions +4 to +52 with respect to the transcriptional start site of the *styABCD* operon (Fig. 6). The +4-to-+52 region is hereafter referred to as the PaaX operator region (Fig. 2). Interestingly, this PaaX operator region is located just inside the open reading frame of *styA*. This contrasts the location of the putative PaaX operators proposed for the *paa* operons of *Pseudomonas* sp. strain Y2, which overlap the –35 box of the putative promoters (Fig. 3). In these instances, PaaX would presumably repress transcription by the common repressor mechanism of inhibiting RNA polymerase binding. In the case of the P_{styA} PaaX operator, any effect of PaaX binding on transcription would have to operate by a different mechanism. The possibility that it could function through hindrance of the formation of the open transcription complex, as previously suggested for the homologous PaaX

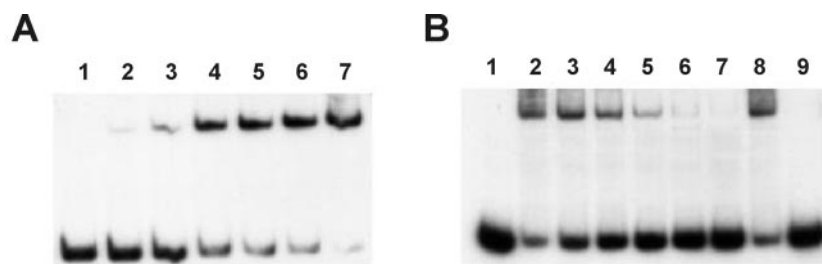


FIG. 5. Electrophoretic mobility shift assays of the STY probe with purified MBP-PaaX1 protein. (A). Lanes 1 to 7, retardation assays of the STY probe with 0, 5, 10, 25, 50, 100, and 150 nM MBP-PaaX1, respectively. (B). Lane 1, free STY probe. Lanes 2 to 7, retardation assays produced by 150 nM purified MBP-PaaX1 in the presence of 0, 25, 50, 100, 500, and 1,000 μM PA-CoA, respectively. Lane 8, retardation assay produced in the presence of 150 nM MBP-PaaX1 and 1 mM PA. Lane 9, retardation produced by 150 nM MBP-PaaX1 in the presence of 10 nM unlabeled STY probe.

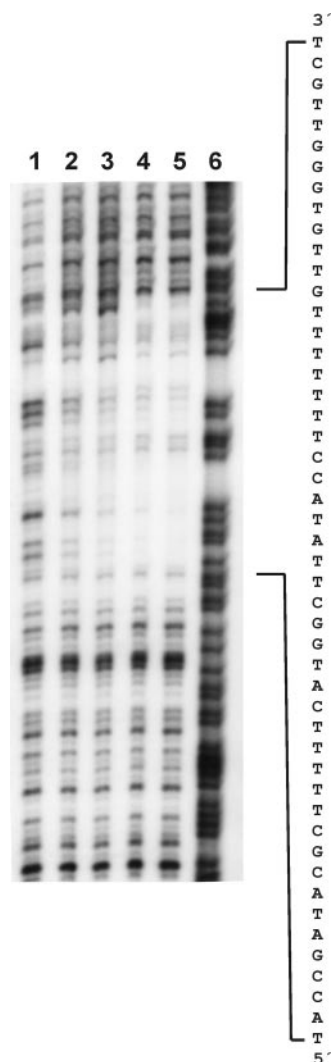


FIG. 6. DNase I footprinting analysis of the interaction of purified MBP-PaaX1 with the STY probe. Lanes 1 to 5 show footprints with 0, 25, 50, 150, and 300 nM purified MBP-PaaX1, respectively. Lane 6, A+G Maxam and Gilbert sequencing reaction. The nucleotide sequence of the protected region, complementary to that shown in Fig. 2 and 3, is shown within brackets.

repressor protein of *E. coli* (13, 36), will be a matter of further study.

MBP-PaaX1 is a PA-CoA-responsive transcriptional repressor of transcription from P_{styA} in vitro. The location of the PaaX operator site and the PaaX-binding studies described above suggest that PaaX might act as a transcriptional repressor of the P_{styA} promoter. To determine if this is the case in vitro, we constructed plasmid pTE-E1B1 that carries the P_{styA} promoter region (-148 to +67) that includes the whole of the *styR* to *styA* intergenic region and the 5' end of *styA* (Fig. 2). This template allows monitoring of StyR-dependent transcription from the P_{styA} promoter (Fig. 7). In the absence of StyR, no *styA* transcript band was seen (data not shown). In the presence of phosphorylated StyR, the addition of increasing concentrations of MBP-PaaX1 causes a significant reduction in the transcript levels from the P_{styA} promoter. Moreover, the

presence of PA-CoA significantly reduces the repressive effect of MBP-PaaX1 on P_{styA} transcription (Fig. 7B, inset). Thus, we conclude that, like PaaX-mediated regulation of the *paa* genes in *E. coli*, PaaX1 can serve as a PA-CoA-responsive repressor of the *Pseudomonas* sp. strain Y2 P_{styA} promoter in vitro.

PaaX1 represses both basal and styrene-induced P_{styA} transcription in vivo. The in vitro data described above show that PaaX1 has the potential to repress P_{styA} transcription in the absence of PA-CoA and that this repression counteracts StyR activated transcription from the promoter. To see if PaaX1 also counteracts styrene-induced transcription in vivo, we first employed quantitative RT-PCR analysis of transcription from the P_{styA} promoter using a two-plasmid system in the heterologous host *E. coli* W14. This host is a derivative of *E. coli* W that is unable to use PA as a carbon source (16) and hence unable to make PA-CoA from styrene added to induce transcription. The pISm7.0R plasmid carries P_{lac} -*stySR*- P_{styA} -*styAB* DNA and thus provides the P_{styA} promoter in its native DNA context along with genetic components necessary for styrene-induced transcription (38). The cosubstituent plasmid, either the vector control pSJP18Not or pJ18X1 that carries *paaX1* under the control of the P_{lac} promoter, completes the genetic system to monitor the effects of PaaX1 on transcription. As shown in Fig. 8A, in the absence of PA-CoA, the PaaX1 protein can repress styrene-induced transcription from P_{styA} since the levels of transcripts in *E. coli* W14(pISm7.0R)(pJ18X1) after 30 min of exposure to styrene are markedly lower than those of *E. coli* W14(pISm7.0R)(pSJP18Not).

To determine the in vivo consequences of the action of PaaX1 at the P_{styA} promoter in its native host, we measured *styA* mRNA levels by using *Pseudomonas* sp. strain Y2 derivatives lacking either PaaX2 (*Pseudomonas* sp. strain Y2T2) or both PaaX1 and PaaX2 (*Pseudomonas* sp. strain Y2T2X1). Consistent with its role as a repressor in vitro (Fig. 7B), lack of PaaX1 in the native host also results in higher transcription from P_{styA} after 5 min of exposure to styrene (Fig. 8B). Even in the absence of induction, the lack of PaaX1 allowed a three-times-higher basal transcription level (from 1.0 ± 0.18 to 3.02 ± 0.41). Both of these strains retain one *paa* gene cluster and are thus capable of converting styrene to the PA-CoA effector molecule that relieves MBP-PaaX1 binding (Fig. 5B) and transcriptional repression (Fig. 7B) in vitro. Hence, these results suggest that despite the presence of PA-CoA, native levels of PaaX1 still repress styrene-activated transcription.

PaaX2 is highly similar (86% identity) to PaaX1 and extracts expressing just PaaX2 can retard the STY DNA probe (Fig. 4, lane 2). Thus, it is probable that PaaX2 can act like PaaX1 to play a similar regulatory role at the P_{styA} promoter. Notably, as mentioned above, the lack of both PaaX1 and PaaX2 also results in comparatively high noninduced basal levels of transcription from P_{styA} (Fig. 8B). These results suggest that, in addition to modulating styrene-induced levels of transcription, PaaX1 and, by inference, PaaX2 may play an important regulatory role in maintaining tight regulation of P_{styA} in the absence of substrate for the pathway it regulates.

Concluding remarks. This work reveals a previously unsuspected role for a PaaX protein in regulating expression of *sty* genes involved in styrene catabolism. The existence of a PaaX-binding site at the P_{styA} promoter provides an additional level of transcriptional control that integrates transcription from the

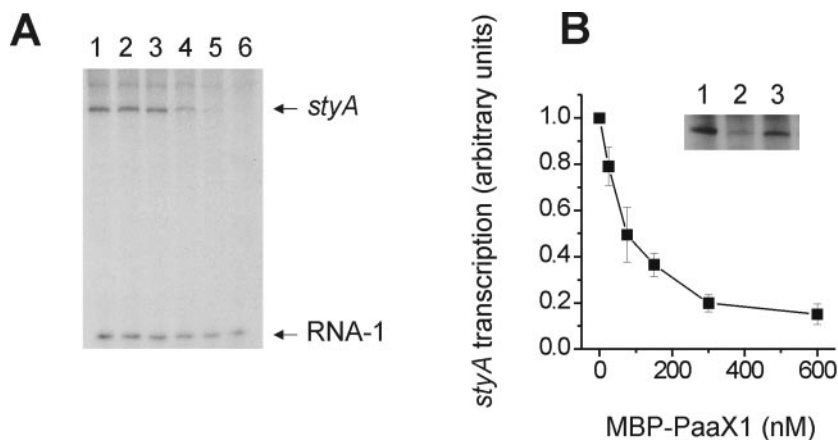


FIG. 7. Repression of in vitro transcription from P_{styA} promoter by MBP-PaaX1 and effect of the presence of PA-CoA. (A). Transcripts from pTE-E1B1 in the presence of phosphorylated StyR and different amounts of MBP-PaaX1. Lane 1 to lane 6, 0, 25, 75, 150, 300, and 600 nM MBP-PaaX1, respectively. Arrows point to the *styA* transcript (*styA*) and to the internal control transcript (RNA-1). (B). *styA* transcript levels (in arbitrary units) produced from pTE-E1B1 template in the presence of 0 to 600 nM purified MBP-PaaX1. The results are the normalized averages of six independent experiments. Error bars, standard errors. The inset shows the autoradiography of *styA* transcripts produced in the absence of MBP-PaaX1 (lane 1), in the presence of 600 nM MBP-PaaX1 (lane 2), and in the presence of 600 nM MBP-PaaX1 challenged with 1 mM PA-CoA (lane 3).

P_{styA} promoter, making it responsive to both initial styrene pathway substrate, through StySR, and the central intermediate PA-CoA produced by the *paa* genes, through the action of PaaX. Thus, this regulatory mechanism is likely to facilitate balanced and coordinated expression of the styrene upper (*sty* operon) and lower (*paa* genes) pathways and central metabolism. In this respect, it is interesting that inactivation of the *paaX* homologue of *P. putida* U (*phaN*) relieves the repression of the *paa* genes when this strain grows in the presence of glucose (30). The P_{styA} proximal PaaX-binding site identified

here overlaps the very-low-affinity StyR-binding site (STY3) recently described in the *sty* operon of *P. fluorescens* ST (22). In the *P. fluorescens* ST system, StyR has been postulated to behave as a transcriptional repressor when it binds to STY3, and this binding is involved in the glucose-mediated repression of P_{styA} . In agreement with this, mutations in the STY3 operator region in *P. fluorescens* ST, which corresponds to the PaaX-binding site in *Pseudomonas* sp. strain Y2, partially alleviates the glucose-mediated repression of the P_{styA} promoter (22). While we cannot exclude the possibility that control of

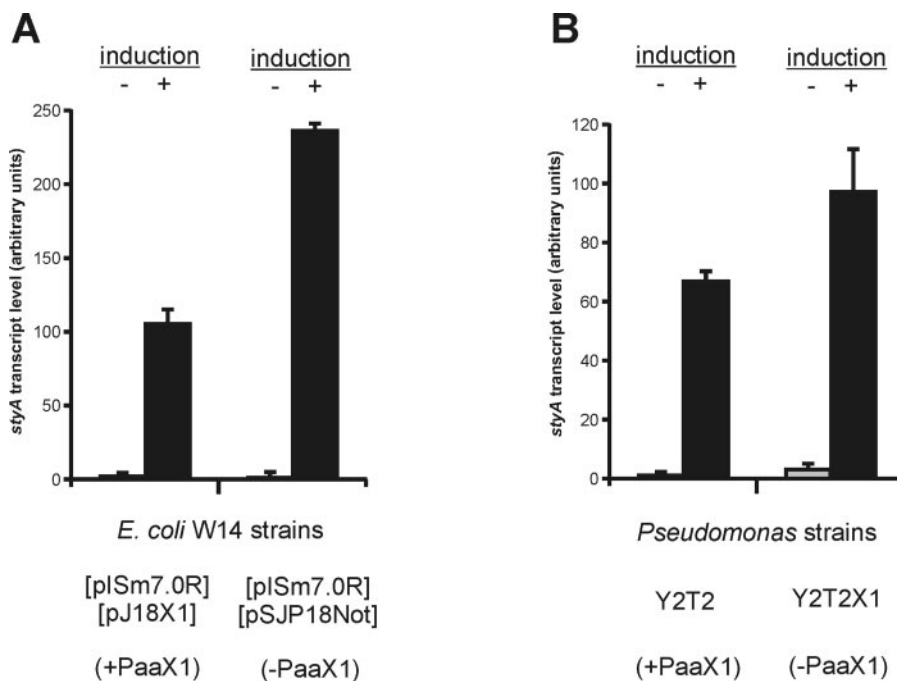


FIG. 8. RT-PCR quantification of *styA* mRNA levels in different *Pseudomonas* and *E. coli* strains. The *styA* transcript level was determined in cultures of the indicated strains grown under either noninduced (gray bars) or styrene-induced (black bars) conditions as described in Materials and Methods. Bars represent the means of *styA* transcript levels from three independent experiments, each performed in duplicate. Error bars, standard errors.

the *sty* genes in strains ST and Y2 might differ, our work offers an attractive alternative interpretation, namely, that PaaX binding, rather than StyR binding, to this region controls glucose-mediated catabolite repression of the *P_{styA}* promoter. Direct analysis of this putative role for the PaaX regulator is the subject of further research.

The work described here expands the known PaaX regulon to include the *styABCD* operon and supports the notion that PaaX, by sensing the PA-CoA, is a master regulatory protein in the PA-CoA catabolon that adjusts the expression of different operons to that of the *paa*-encoded central pathway (17). PaaX-mediated repression of the *P_{styA}* promoter acts in concert with the specific StyS-StyR regulatory system to provide a dual signal-responsive system that is functionally analogous to other genetic systems involved in the degradation of toxic compounds, such as the synergist effect of a pathway substrate and intermediate in benzoate catabolism (7, 8). In the case of styrene catabolism, the PaaX repressor would modulate StySR-induced transcription of the *sty* genes until the level of PA-CoA signals that the pathway can proceed. Conversely, as styrene is degraded and the StySR-mediated induction decreases, the PA-CoA signal would be anticipated to allow sufficient transcriptional activity to complete degradation of intermediates. In addition, this dual signal-responsive system is likely to ensure a quick transcriptional downshift of the *sty* catabolic genes under a number of conditions. These conditions include (i) whether styrene is not efficiently oxidized to PA and some toxic upper pathway intermediates, such as styrene oxide and/or phenylacetaldehyde, could accumulate within the cell and (ii) when other aromatic compounds, such as toluene and ethylbenzene, induce the StySR activator system (2) but are not enzymatically converted to PA.

ACKNOWLEDGMENTS

This work has been supported by the Ministerio de Educación y Ciencia (grants BIO2003-05309-C04-03, BIO2003-05309-C04-02, and GEN2001-4698-C05-02). T.P. is the recipient of a fellowship from the Consejería de Educación de la Comunidad de Madrid. C.F. is the recipient of a fellowship from the Ministerio de Educación y Ciencia.

REFERENCES

- Alonso, S., D. Bartolomé-Martín, M. del Álamo, E. Díaz, J. L. García, and J. Perera. 2003. Genetic characterization of the styrene lower catabolic pathway of *Pseudomonas* sp. strain Y2. *Gene* **319**:71–83.
- Alonso, S., J. M. Navarro-Llorens, A. Tormo, and J. Perera. 2003. Construction of a bacterial biosensor for styrene. *J. Biotechnol.* **102**:301–306.
- Bagdasarian, M., R. Lurz, B. Ruckert, F. C. Franklin, M. M. Bagdasarian, J. Frey, and K. N. Timmis. 1981. Specific-purpose plasmid cloning vectors. II. Broad host range, high copy number, RSF1010-derived vectors, and a host-vector system for gene cloning in *Pseudomonas*. *Gene* **16**:237–247.
- Bartolomé-Martín, D., E. Martínez-García, V. Mascaraque, J. Rubio, J. Perera, and S. Alonso. 2004. Characterization of a second functional gene cluster for the catabolism of phenylacetic acid in *Pseudomonas* sp. strain Y2. *Gene* **341**:167–179.
- Beltrametti, F., A. M. Marconi, G. Bestetti, C. Colombo, E. Galli, M. Ruzzi, and E. Zennaro. 1997. Sequencing and functional analysis of styrene catabolism genes from *Pseudomonas fluorescens* ST. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**:2232–2239.
- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**:248–254.
- Bundy, B. M., L. S. Collier, T. R. Hoover, and E. L. Neidle. 2002. Synergistic transcriptional activation by one regulatory protein in response to two metabolites. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**:7693–7698.
- Clark, T. J., R. S. Phillips, B. M. Bundy, C. Momany, and E. L. Neidle. 2004. Benzoate decreases the binding of *cis,cis*-muconate to the BenM regulator despite the synergistic effect of both compounds on transcriptional activation. *J. Bacteriol.* **186**:1200–1204.
- de Lorenzo, V., L. Eltis, B. Kessler, and K. N. Timmis. 1993. Analysis of *Pseudomonas* gene products using *lacI^q/Prp-lac* plasmids and transposons that confer conditional phenotypes. *Gene* **123**:17–24.
- de Lorenzo, V., and K. N. Timmis. 1994. Analysis and construction of stable phenotypes in gram-negative bacteria with Tn5- and Tn10-derived minitransposons. *Methods Enzymol.* **235**:386–405.
- Elish, M. E., J. R. Pierce, and C. F. Earhart. 1988. Biochemical analysis of spontaneous *sepA* mutants of *Escherichia coli*. *J. Gen. Microbiol.* **134**:1355–1364.
- Elliott, T., and E. P. Geiduschek. 1984. Defining a bacteriophage T4 late promoter: absence of a “–35” region. *Cell* **36**:211–219.
- Fernández, C. 2005. Avances en la caracterización del catabolismo del ácido fenilacético en *Escherichia coli*. Ph.D. thesis. Universidad Complutense, Madrid, Spain.
- Ferrández, A., J. L. García, and E. Díaz. 2000. Transcriptional regulation of the divergent *paa* catabolic operons for phenylacetic acid degradation in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **275**:12214–12222.
- Ferrández, A., B. Miñambres, B. García, E. R. Olivera, J. M. Luengo, J. L. García, and E. Díaz. 1998. Catabolism of phenylacetic acid in *Escherichia coli*. Characterization of a new aerobic hybrid pathway. *J. Biol. Chem.* **273**:25974–25986.
- Ferrández, A., M. A. Prieto, J. L. García, and E. Díaz. 1997. Molecular characterization of PadA, a phenylacetaldehyde dehydrogenase from *Escherichia coli*. *FEBS Lett.* **406**:23–27.
- Galán, B., J. L. García, and M. A. Prieto. 2004. The PaaX repressor, a link between penicillin G acylase and the phenylacetyl-coenzyme A catabolon of *Escherichia coli* W. *J. Bacteriol.* **186**:2215–2220.
- Jaenecke, S., and E. Díaz. 1999. Construction of plasmid vectors bearing a NotI-expression cassette based on the *lac* promoter. *Int. Microbiol.* **2**:29–31.
- Kaniga, K., I. Delor, and G. R. Cornelis. 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.
- Kim, H. S., T. S. Kang, J. S. Hyun, and H. S. Kang. 2004. Regulation of penicillin G acylase gene expression in *Escherichia coli* by repressor PaaX and the cAMP-cAMP receptor protein complex. *J. Biol. Chem.* **279**:33253–33262.
- Leoni, L., P. Ascenzi, A. Bocedi, G. Rampioni, L. Castellini, and E. Zennaro. 2003. Styrene-catabolism regulation in *Pseudomonas fluorescens* ST: phosphorylation of StyR induces dimerization and cooperative DNA-binding. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **303**:926–931.
- Leoni, L., G. Rampioni, V. Di Stefano, and E. Zennaro. 2005. Dual role of response regulator StyR in styrene catabolism regulation. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**:5411–5419.
- Luengo, J. M., J. L. García, and E. R. Olivera. 2001. The phenylacetyl-CoA catabolon: a complex catabolic unit with broad biotechnological applications. *Mol. Microbiol.* **39**:1434–1442.
- Maxam, A. M., and W. Gilbert. 1980. Sequencing end-labeled DNA with base-specific chemical cleavages. *Methods Enzymol.* **65**:499–560.
- Miller, J. H. 1972. Experiments in molecular genetics. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Mohamed, M. S., W. Ismail, J. Heider, and G. Fuchs. 2002. Aerobic metabolism of phenylacetic acids in *Azoarcus evansii*. *Arch. Microbiol.* **178**:180–192.
- Navarro-Llorens, J. M., M. A. Patrauchan, G. R. Stewart, J. E. Davies, L. D. Eltis, and W. W. Mohn. 2005. Phenylacetate catabolism in *Rhodococcus* sp. strain RHAI: a central pathway for degradation of aromatic compounds. *J. Bacteriol.* **187**:4497–4504.
- O’Leary, N. D., K. E. O’Connor, and A. D. W. Dobson. 2002. Biochemistry, genetics and physiology of microbial styrene degradation. *FEMS Microbiol. Rev.* **26**:403–417.
- O’Leary, N. D., K. E. O’Connor, W. Duetz, and A. D. W. Dobson. 2001. Transcriptional regulation of styrene degradation in *Pseudomonas putida* CA-3. *Microbiology* **147**:973–979.
- Olivera, E. R., B. Miñambres, B. García, C. Muñiz, M. A. Moreno, A. Ferrández, E. Díaz, J. L. García, and J. M. Luengo. 1998. Molecular characterization of the phenylacetic acid catabolic pathway in *Pseudomonas putida* U: the phenylacetyl-CoA catabolon. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**:6419–6424.
- Panke, S., B. Witholt, A. Schmid, and M. G. Wubbolts. 1998. Towards a biocatalyst for (S)-styrene oxide production: characterization of the styrene degradation pathway of *Pseudomonas* sp. strain VLB120. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**:2032–2043.
- Rost, R., S. Haas, E. Hammer, H. Herrmann, and G. Burchhardt. 2002. Molecular analysis of aerobic phenylacetate degradation in *Azoarcus evansii*. *Mol. Genet. Genomics* **267**:656–663.
- Santos, P. M., L. Leoni, I. Di Bartolo, and E. Zennaro. 2002. Integration host factor is essential for the optimal expression of the *styABCD* operon in *Pseudomonas fluorescens* ST. *Res. Microbiol.* **153**:527–536.
- Shingler, V. 2003. Integrated regulation in response to aromatic compounds: from signal sensing to attractive behaviour. *Environ. Microbiol.* **5**:1226–1241.
- Taylor, L. A., and R. E. Rose. 1988. A correction in the nucleotide sequence

- of the Tn903 kanamycin resistance determinant in pUC4K. *Nucleic Acids Res.* **16**:358.
36. **Tropel, D., and J. R. van der Meer.** 2004. Bacterial transcriptional regulators for degradation pathways of aromatic compounds. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **68**:474–500.
37. **Utkin, I. B., M. M. Yakimov, L. N. Matveeva, E. I. Kozlyak, I. S. Rogozhin, Z. G. Solomon, and A. M. Bezbodov.** 1991. Degradation of styrene and ethylbenzene by *Pseudomonas* species Y2. *FEMS Microbiol. Lett.* **77**:237–242.
38. **Velasco, A., S. Alonso, J. L. García, J. Perera, and E. Díaz.** 1998. Genetic and functional analysis of the styrene catabolic cluster of *Pseudomonas* sp. strain Y2. *J. Bacteriol.* **180**:1063–1071.
39. **Vieira, J., and J. Messing.** 1987. Production of single-stranded plasmid DNA. *Methods Enzymol.* **153**:3–11.
40. **West, S. E., H. P. Schweizer, C. Dall, A. K. Sample, and L. J. Runyen-Janecky.** 1994. Construction of improved *Escherichia-Pseudomonas* shuttle vectors derived from pUC18/19 and sequence of the region required for their replication in *Pseudomonas aeruginosa*. *Gene* **148**:81–86.

The styrene-responsive StyS/StyR regulation system controls expression of an auxiliary phenylacetyl-coenzyme A ligase: implications for rapid metabolic coupling of the styrene upper- and lower-degradative pathways

Teresa del Peso-Santos,¹ Victoria Shingler² and Julián Perera^{1*}

¹Department of Biochemistry and Molecular Biology, I, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Complutense, 28040 Madrid, Spain.

²Department of Molecular Biology, Umeå University, S-901 87 Umeå, Sweden.

Summary

Pseudomonas sp. strain Y2 degrades styrene through oxidation to phenylacetic acid via the *styABCD* operon-encoded enzymes, whose expression is induced in response to styrene by the StyS/StyR two-component regulatory system. Further transformation of phenylacetic acid to tricarboxylic acid cycle intermediates is mediated by the enzymes of *paa* catabolic genes, whose expression is regulated by the PaaX repressor. The first step of this *paa* degradation pathway is catalysed by *paaF*-encoded phenylacetyl-coenzyme A ligases that produce phenylacetyl-coenzyme A. This metabolic intermediate, upon being bound by PaaX, inactivates PaaX-mediated repression of both the *paa* genes and the *styABCD* operon. Strain Y2 is unique in having three *paaF* genes located within two complete copies of the *paa* gene clusters. Expression of both *paaF* and *paaF3* is controlled by the PaaX repressor. Here we use specific mutants in combination with *in vivo* and *in vitro* assays to demonstrate that *paaF2*, adjacent to the StyS/StyR regulatory genes, belongs to the StyR regulon and is not subject to repression by PaaX. We propose that this unexpected styrene-responsive regulatory strategy for the otherwise metabolically redundant PaaF2 auxiliary enzyme provides a system for rapid co-ordinate de-repression of the two sets of catabolic genes required for styrene degradation.

Introduction

Styrene is a widely used chemical in the plastic and synthetic resin industries that represents an environmental and human health risk due to its toxicity and carcinogenic effects. The genetic organization of the *sty* genes that encode the catabolic enzymes involved in the first steps of styrene degradation has been studied in different members of the genus *Pseudomonas* (Beltrametti *et al.*, 1997; Panke *et al.*, 1998; Velasco *et al.*, 1998; O'Leary *et al.*, 2001; 2002; Mooney *et al.*, 2006). In most of the strains studied so far, styrene is initially converted through side-chain oxidation to phenylacetic acid (PAA), although direct oxidation of the aromatic nucleus has also been reported (Bestetti *et al.*, 1989). After transformation of styrene by means of the styrene upper pathway encoded by the *styABCD* operon (Fig. 1), the PAA produced is further catabolized via phenylacetyl-coenzyme A (PA-CoA) to tricarboxylic acid cycle intermediates by a set of enzymes encoded by the *paa* genes. The *paa*-encoded enzymes thus constitute the styrene lower pathway. The genetic organization of the *paa* genes has been described for the styrene-degrading strains *Pseudomonas* sp. strain Y2 and *Pseudomonas fluorescens* ST (Alonso *et al.*, 2003a; Bartolomé-Martín *et al.*, 2004; Di Gennaro *et al.*, 2007), and other bacteria (Ferrández *et al.*, 1998; Olivera *et al.*, 1998; Mohamed *et al.*, 2002; Rost *et al.*, 2002; Navarro-Llorens *et al.*, 2005).

The promoter of the *styABCD* catabolic operon (P_{styA}) is regulated by a two-component system comprised of the StyS sensor kinase and the StyR DNA-binding response regulator, which is required for transcriptional activation (Panke *et al.*, 1998; Velasco *et al.*, 1998; O'Leary *et al.*, 2001). In the presence of styrene, StyS catalyses the phosphorylation of StyR, which forms a dimer that recognizes specific operator sites in the P_{styA} promoter region (Leoni *et al.*, 2003; 2005).

Expression of the lower catabolic pathway (*paa* genes) is regulated by PaaX that binds to specific operator sites of the promoter regions to repress transcription. Interaction of PaaX with the metabolic intermediate PA-CoA

Accepted 10 April, 2008. *For correspondence. E-mail perera@bio.ucm.es; Tel. (+34) 913944145; Fax (+34) 913944672.

© 2008 The Authors
Journal compilation © 2008 Blackwell Publishing Ltd

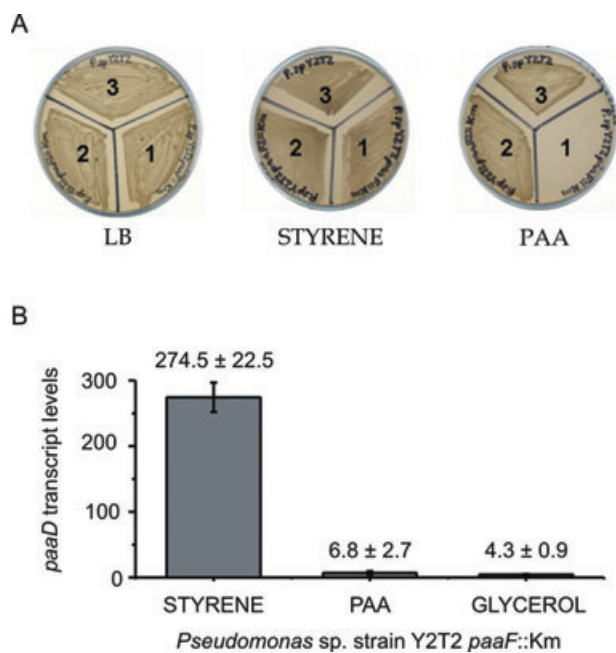


Fig. 2. A. Growth on LB and M9 minimal medium supplemented with styrene or PAA. Strains: 1, *Pseudomonas* sp. strain Y2T2 $paaF::Km$; 2, *Pseudomonas* sp. strain Y2T2 $paaF2::Km$; and 3, *Pseudomonas* sp. strain Y2T2. B. Quantitative RT-PCR analysis of transcript levels of *paaD* (from the *paaABCDEF* operon) in *Pseudomonas* sp. strain Y2T2 $paaF::Km$. Reactions were performed on cDNA derived from cells cultured in minimal M9 medium containing 1% glycerol with styrene delivered in the gaseous phase (bar 1), 1% glycerol and 0.2% PAA (bar 2) or 1% glycerol alone (bar 3), as described in *Experimental procedures*. The results are the average from two independent cultures \pm standard errors.

strain Y2T2 that lacks the *paa2* cluster (Fig. 1) and its otherwise isogenic PaaF2 null or PaaF null mutant derivatives. The three strains were tested for their ability to grow on rich media (LB) plates or minimal M9 medium plates containing either styrene or PAA as the carbon source (Fig. 2A). *Pseudomonas* sp. strain Y2T2 that carries two functional PA-CoA ligase genes (*paaF* and *paaF2*) grew efficiently on all three media. Likewise, *Pseudomonas* sp. strain Y2T2 $paaF2::Km$, which only contains a functional copy of the *paaF* gene, was also capable of efficient growth on all three media. In contrast, however, *Pseudomonas* sp. strain Y2T2 $paaF::Km$, which only possesses a functional copy of the *paaF2* gene, was incapable of growth at the expense of PAA. However, this strain was capable of growth at the expense of styrene (Fig. 2A, strain 1), demonstrating that the *paaF* mutation does not affect the functionality of the downstream genes within the *paa1* cluster.

Because the styrene lower catabolic pathway requires at least the activity of one active PA-CoA ligase, we reasoned that the most plausible explanation for the inability of *Pseudomonas* sp. strain Y2T2 $paaF::Km$ to grow at the

expense of PAA was that its functional *paaF2* gene was not expressed in response to PAA, but could be expressed in the presence of styrene. Under such a scenario, transcription of the *paaABCDEF* operon required for growth on styrene or PAA would only be de-repressed in response to the presence of styrene (not PAA), in *Pseudomonas* sp. strain Y2T2 $paaF::Km$. To test this idea we performed quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) using primers specific for *paaD* on *Pseudomonas* sp. strain Y2T2 $paaF::Km$ cultured in minimal M9 medium containing glycerol alone, or glycerol containing either PAA or exposed to styrene in the gaseous phase. As anticipated, only exposure to styrene led to significant de-repression of the *paaD* of the *paaABCDEF* operon (Fig. 2B). Taken together, these results implied to us that expression of *paaF2*, which is located close to the *stySR* regulatory genes (Fig. 1), might be controlled by the StyS/StyR styrene-responsive regulatory system.

The P_{paaF2} promoter region contains a putative StyR binding site

To explore the possibility that expression of *paaF2* might be controlled by StyR, we examined the intergenic region upstream of the *paaF2* gene for signature sequences reminiscent of known StyR binding sites of the P_{styA} promoters of *styABCD* catabolic operons. As illustrated in Fig. 3, a putative StyR binding site was identified 299 bp upstream the *paaF2* initiation codon. The nucleotide sequence of this putative StyR binding site, designated STY4, possesses approximately the same degree of homology to the high-affinity STY2 sites of the P_{styA} promoters of *Pseudomonas* sp. strain Y2 and *P. fluorescens* ST as the medium-affinity STY1 sites of these promoters (Fig. 3, bottom).

In order to define the transcription start site of *paaF2*, primer extension analysis was performed with total RNA isolated from styrene-induced *Pseudomonas* sp. strain Y2, and *E. coli* CC118 λ pir [pUE14] harbouring a plasmid carrying the *stySR* genes and the entire *paaX-paaF2* intergenic region together with flanking genes. The results shown in Fig. 4 identify the transcription initiation site as located 262 bp upstream of the proposed *paaF2* initiation codon (Fig. 3). This +1 transcription start site is located downstream of two overlapping potential σ^{70} promoter motifs: a canonical -35/-10 sequence (GTGTCT-18 bp-CAGAAT, consensus TTGACA-17 bp-TATAAT), and one with homology to an extended -10 promoter sequence (TGATACCAG, consensus TGnTAATAT) (see Fig. 3). The upstream putative STY4 site at positions -52 and -37 relative to the transcriptional start is in a similar position in relation to these signature promoter motifs as the STY2 boxes in P_{styA} promoters (Velasco *et al.*, 1998; Leoni *et al.*, 2005; del Peso-Santos *et al.*, 2006).

-235 **TGGAGACCGCTGACGGCCCGTTGCCGGACGTGGGGAAAGTTTCTACCAACGCTTTGGAGGATTAGGGTAAAC**
 -162 **CGCTCTCTCGAATCCGCTGCTGGTATACACCATAGCTGCCTGCCGCCCGCATCAGAGGGCGGCTTTTCCCC**
 -89 **GCTCTGTGCCAAATTCCTTGCCTCGTCGAGATCCCGTAAACCTACGTATAGGTGCTCTCGTTACCGCATTG**
 -16 **ATACCAGAATCAAGCCAGCACTGTTGCGTCGTTAGGCACTTGCCAGGTTTTTCTATTTTTCAACGGGGTA**
 +58 **AATATGCCTACTGCCGCTAGAGCTTTATGCCTTGGTGTCCGAGCAGTTGCGCTGCTCGCCGAGATGTAAG**
 +131 **AGCGGCAGGATGTGGCGCGCATCGTCCGCGTGGCATGTCGCTGGCCGGGCAAACCCGCCCGAGAGCTTCGTG**
 +204 **GAGCCGTGCTCCACCAGCTATCGGCGCTCTTCTGACAAAAACAATACGAGTAACTGATGAACATGATCGCC**
 +277 **AATACCGCTTGTCTGTATCCGATGGAAACCGCCAGCGTTGACGAACTTGCCAGCACCAGCTGGAACGCCTGC**

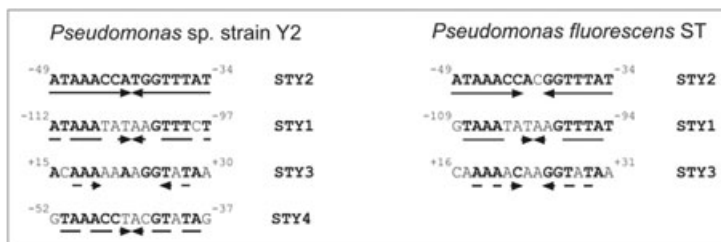


Fig. 3. Sequence of the P_{paaF2} promoter region of *Pseudomonas* sp. strain Y2. The 3' end of *paaX1* and the 5' start of *paaF2* are in boldface letters with cognate termination and initiation codons underlined. The *paaF2* transcription start site (+1) as determined by primer extension (Fig. 4), a putative canonical -35 (-35)/-10 (-10) (overlined) and an extended -10 (-10 ext) (underlined) σ^{70} -binding motifs and a Shine-Dalgarno sequence (S-D, underlined) are indicated. The proposed StyR binding site (STY4) is underlined by two arrows indicating the palindromic inverted repeat. The STY4 site is compared with other StyR sites in the boxed lower part of the figure. These include the high- (STY2), medium- (STY1) and very low-affinity (STY3) StyR binding sites found in P_{styA} promoters of both *Pseudomonas* sp. strain Y2 (del Peso-Santos *et al.*, 2006) and *P. fluorescens* ST (Leoni *et al.*, 2005). Arrows represent the palindromic inverted repeats. Conserved positions with respect to the STY2 sequence of strain Y2 are in boldface letters. Numbers indicate the positions of the ends of STY1, STY2, STY3 and STY4 boxes, relative to the transcription start points from the corresponding promoters.

StyR binds to the P_{paaF2} promoter STY4 box in vitro

To test if the identified STY4 is a functional binding site for the StyR activator protein, we performed electrophoretic mobility shift assays (EMSA). For this we used phosphorylated His-StyR in conjunction with DNA fragments spanning the P_{paaF2} promoter region and the previously analysed P_{styA} promoter region (see Fig. 5A and B). As shown in Fig. 5C and D, phosphorylated His-StyR formed complexes with both of the P_{styA} probes tested and with the P_{paaF2} F2 probe that possess the STY4 motif. In contrast, phosphorylated His-StyR was unable to bind a probe (F2S) in which the STY4 motif had been shuffled to destroy its dyad symmetry (Fig. 5D). These results clearly demonstrate that the STY4 sequence serves as a binding site for StyR *in vitro*.

Comparison of the data in Fig. 5C and D shows that StyR bound the P_{paaF2} F2 probe at similar concentrations as the P_{styA} probes, which both carry the previously defined high-affinity STY2 site (Leoni *et al.*, 2005). To further analyse the apparent affinities of StyR for different STY boxes *in vitro*, we performed competition experiments. In these experiments, phosphorylated His-StyR pre-bound to different radiolabelled DNA probes was challenged with increasing concentrations of unlabelled F2 probe that contains a functional STY4 box, or the negative F2S control probe, in which the STY4 motif had been destroyed. As would be expected, the STY4 F2 probe competed complex formation while the F2S probe did not (Fig. 5E and F). Most revealingly, the F2 probe specifically competed StyR binding to the STY2 box of E2B1 (Fig. 5E) at least as efficiently as StyR binding to the STY4 box of

F2 (Fig. 5F). Hence we conclude that the STY4 box constitutes a comparatively high-affinity binding site despite its incomplete dyad symmetry (Fig. 3).

StyR and the STY4 box are essential for transcription of P_{paaF2} in vivo

To study the *in vivo* regulation of the P_{paaF2} promoter we first constructed three plasmids in which a *lacZ* reporter gene was placed under control of different portions of the P_{paaF2} promoter region (see Fig. 6A). These plasmids were each introduced into *Pseudomonas* sp. strain Y2 and the resulting strains grown in minimal M9 medium containing glycerol and subsequently induced for 9 h by styrene provided in the gaseous phase. Determination of β -galactosidase activities of these styrene-induced cells revealed that the pRWF2A plasmid that carries the -200 to +292 sequence of the P_{paaF2} -*paaF2* region mediated the highest levels of transcription (bar 1, Fig. 6B). As expected, only background transcription could be observed from the pRWF2B plasmid that carries the -2 to +292 region and is thus devoid of the identified potential $\sigma^{70}P_{paaF2}$ promoter motifs (compare bars 3 and 4, Fig. 6B). Interestingly, the pRWF2C plasmid that carries the *lacZ* gene under control of the -200 to +10 region of the P_{paaF2} promoter mediated about half the levels of β -galactosidase activity as compared with that of pRWF2A (compare bars 1 and 2, Fig. 6B). The transcriptional start site from the P_{paaF2} promoter is located 262 bp upstream of the initiation codon, thus the +1 to +262 region encodes an untranslated region of the mRNA (5'-UTR). The majority of the 5'-UTR is lacking in pRWF2C, which may account for the different

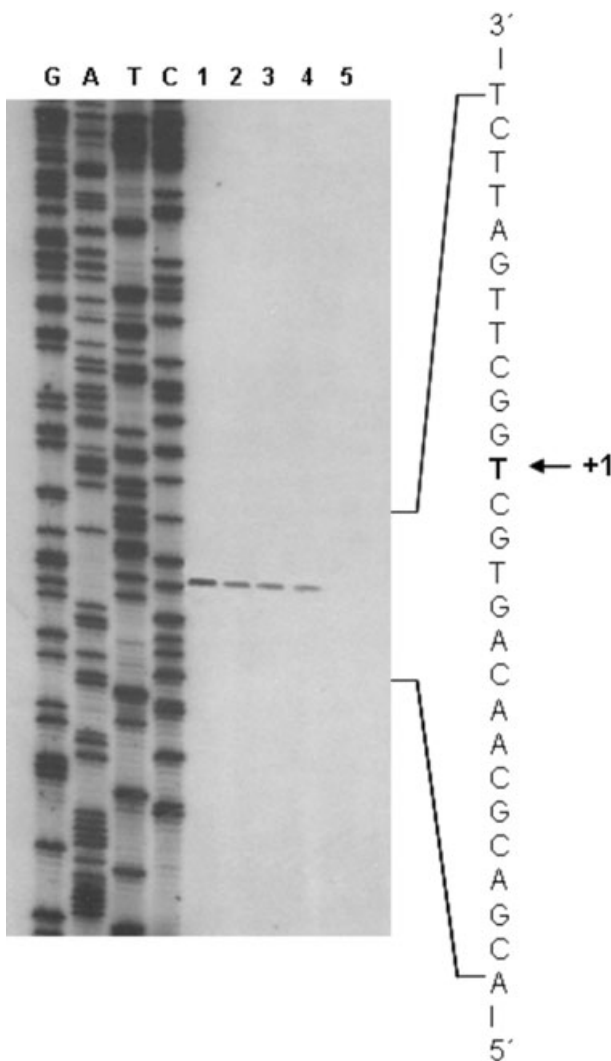


Fig. 4. Determination of the transcriptional start site from the P_{paaF2} promoter. Primer extension was performed on total RNA with primer pe-150 (Table S1). The location of the extended products was determined by comparison with a DNA-sequencing ladder of the P_{paaF2} promoter region obtained using plasmid pTE-PF2 (Table 3). Lanes 1 and 2, product from 20 μ g and 5 μ g of RNA isolated from styrene-exposed *Pseudomonas* sp. strain Y2 respectively; lanes 3 and 4, product from 20 μ g and 5 μ g of RNA from styrene-exposed *E. coli* CC118 λ pir [pUE14] respectively; lane 5, 5 μ g of negative control RNA from styrene-exposed *E. coli* CC118 λ pir [pKNG101]. An expanded view of the non-coding strand nucleotide sequence surrounding the transcription initiation site (+1) is shown to the right.

levels of transcription observed in strains harbouring pRWF2A and pRWF2C.

The results outlined above clarify the location of the P_{paaF2} promoter upstream of -2 relative to the transcriptional start. In order to determine the *in vivo* dependence of transcription from P_{paaF2} on StyR, we introduced a -200 to $+292$ P_{paaF2} -*lacZ* translational reporter fusion carried on a mini-transposon onto the chromosome of *Pseudomonas* sp. strain Y2 to generate the reporter strain

Y2 F2L as detailed in *Experimental procedures*. A StyR null mutant (*Pseudomonas* sp. strain Y2 F2L Δ styR::Gm) was then derived from the above Y2 F2L strain and used for *in vivo* assays. The data in Fig. 6C generated using these strains confirmed that both StyR and the presence of styrene were required for detectable transcription from P_{paaF2} *in vivo*. To determine dependence on the integrity of the STY4 box, an equivalent translational reporter (-200 to $+292$ P_{paaF2S} -*lacZ*) with the shuffled STY4 mutation that abolishes binding of His-StyR *in vitro* (Fig. 5D) was also generated from *Pseudomonas* sp. strain Y2. In three independent derivatives, the lack of the STY4 box also abolished detectable styrene-induced transcription *in vivo* (compare bar 1 with bars 2–4, Fig. 6D). Thus, we conclude that StyR mediates the control of the P_{paaF2} promoter through binding to the STY4 site *in vivo*.

The same compounds induce transcription from the P_{styA} and P_{paaF2} promoters

Previous work performed with a monocopy P_{styA} -*lacZ* translational reporter strain (*Pseudomonas* sp. strain Y2 PAL; Alonso *et al.*, 2003b) showed that expression from the P_{styA} promoter was induced in response to the presence of a range of compounds that included styrene, 2-phenylethanol, toluene, phenylacetaldehyde and epoxystyrene. Here we compared the responses of the P_{styA} -*lacZ* and the P_{paaF2} -*lacZ* translational reporter strains in response to a similar range of compounds. In these experiments, cells were cultured in minimal M9 medium supplemented with 1% glycerol to an optical density at 600 nm (OD_{600}) of ~ 0.4 prior to induction by the presence of 90 μ M of the respective compounds for 1 h. Equivalent un-induced glycerol cultures were used as a reference for fold induction in response to the different compounds tested. The results summarized in Table 1

Table 1. P_{paaF2} -*lacZ* and P_{styA} -*lacZ* response to different compounds.

Compound	Fold induction ^a	
	P_{paaF2} - <i>lacZ</i>	P_{styA} - <i>lacZ</i>
Styrene	9 \pm 1.3	10.1 \pm 1.9
Phenylacetaldehyde	3.7 \pm 0.3	5.4 \pm 1.1
Epoxystyrene	3.3 \pm 0.3	3.8 \pm 0.6
2-Phenylethanol	3.5 \pm 0.5	3.3 \pm 0.5
2-Phenylethylamine	3.6 \pm 0.5	5.7 \pm 1.3
Ethylbenzene	1.9 \pm 0.3	2.8 \pm 0.7
Toluene	1.7 \pm 0.4	1.8 \pm 0.6
p-Xylene	1 \pm 0.1	1.3 \pm 0.1
α -Methylstyrene	1.4 \pm 0.1	1.2 \pm 0.1
p-Methylstyrene	1.3 \pm 0.2	1.2 \pm 0.3
Phenylacetic acid	1.2 \pm 0.1	1.2 \pm 0.1
Phenol	1.3 \pm 0.1	1 \pm 0.1

a. Activity level of glycerol grown cultures was set as 1.

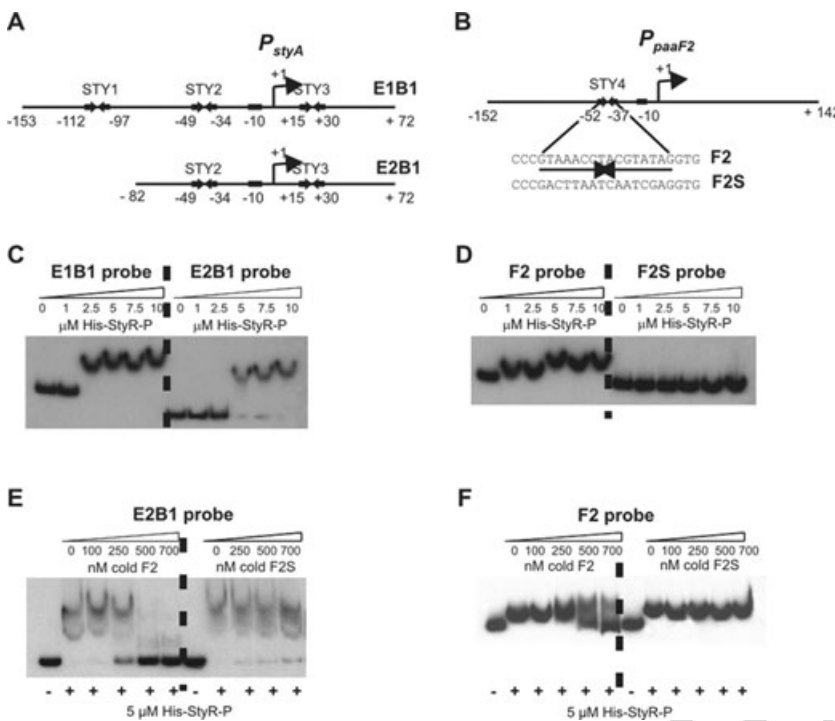


Fig. 5. StyR binding to the *P_{styA}* and *P_{paaF2}* promoters. A and B. Schematic illustration of the locations of StyR binding sites (STY boxes) within the promoter regions of *P_{styA}* (A) and *P_{paaF2}* (B), along with the extent of double-stranded DNA probes used in EMSA assays with phosphorylated His-StyR (His-StyR-P). In (A), note that the E1B1 and E2B1 probes differ with respect to inclusion of the medium-affinity STY1 box. In (B), note that the F2 and F2S probes possess the same base-pair composition, but that the STY4 motif (marked by arrows) has been rearranged and destroyed in F2S probe. C and D. EMSA of 0.1 nM of the indicated probes with increasing concentrations of His-StyR-P. E and F. Competition assay of His-StyR-P bound to 0.1 nM of the indicated radiolabelled probe by increasing amounts of either cold F2 or cold F2S probe DNA as indicated.

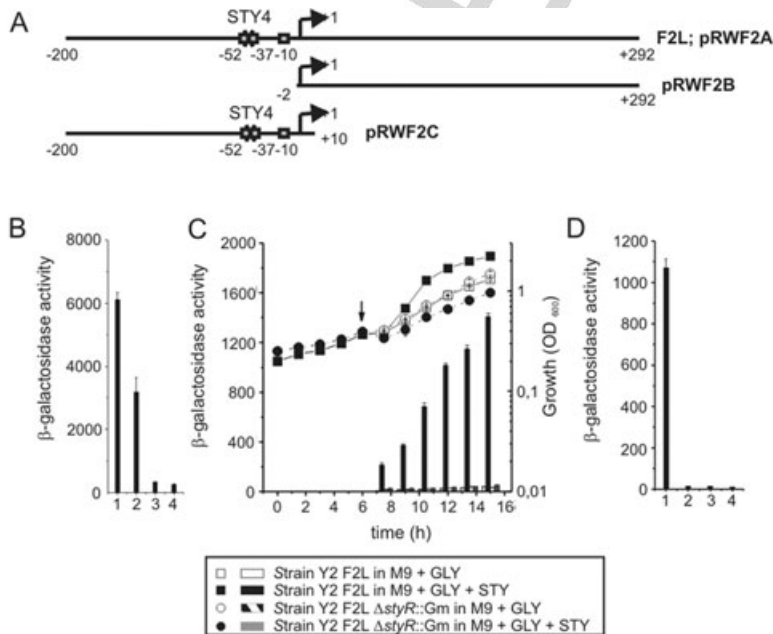


Fig. 6. Styrene induction of the *P_{paaF2}* promoter.

A. Schematic illustration of the *P_{paaF2}-paaF2* region in the transcriptional *lacZ* reporter plasmids used under (B), (C) and (D).
 B. β -Galactosidase activities of *Pseudomonas* sp. strain Y2 harbouring pRWF2A (bar 1), pRWF2C (bar 2), pRWF2B (bar 3) or pRWF2A (bar 4, negative control). Cells were grown on minimal M9 media supplemented with 1% glycerol and analysed after 9 h exposure to styrene present in the gaseous phase.
 C. β -Galactosidase activities of the *P_{paaF2}-lacZ* translational reporter strain *Pseudomonas* sp. strain Y2 F2L and its StyR null mutant derivative, *Pseudomonas* sp. strain Y2 F2L Δ styR::Gm, grown on minimal M9 medium supplemented with 1% glycerol either in the presence (+STY) or in the absence of styrene. An arrow indicates the point of addition of styrene to the +STY cultures. Closed symbols, log optical density at 600 nm (OD_{600}); bars, Miller β -galactosidase units.
 D. β -Galactosidase activities of the *P_{paaF2}-lacZ* translational reporter strain *Pseudomonas* sp. strain Y2 F2L (bar 1) and three independent derivatives carrying a *P_{paaF2S}-lacZ* translational fusion (bars 2, 3 and 4; *Pseudomonas* sp. strain Y2 F2SL) grown on minimal M9 medium supplemented with 1% glycerol and analysed after 8 h exposure to styrene present in the gaseous phase. Data are the average of triplicate experiments with standard errors.

demonstrate that both these StyR-regulated promoters respond by a similar induction to a whole range of inducers. When analogous experiments were performed with a P_{paaF2} -*lacZ* reporter strain that lacks StyR (*Pseudomonas* sp. strain Y2 F2L Δ *styR*::Gm), no induction was observed in response to any of the test compounds (data not shown). Thus we conclude that expression of the *sty*-catabolic genes under the control of the P_{styA} promoter, and the *paaF2* gene under the control of the P_{paaF2} promoter is co-ordinately regulated via the StyS/StyR system in response to a whole range of compounds.

Transcriptional activation of P_{paaF2} is not subjected to PaaX-mediated repression

In the absence of PA-CoA, the PaaX regulators repress transcription of *paa* and *sty* catabolic genes by binding to operator regions within their cognate regulatory regions. Given the co-ordinated StyR-mediated regulation of P_{styA} and P_{paaF2} promoters described above, we were interested in determining if PaaX likewise had the same repressive effects on transcription from these two promoters. The consensus binding site for PaaX in *Pseudomonas* sp. strain Y2 has previously been determined as consisting of two 6 bp inverted repeats (GATACA and TGTATC) separated by 26 bp (del Peso-Santos *et al.*, 2006). *In silico* analysis of the *paaX* to *paaF2* intergenic region did not identify any PaaX consensus binding site, but many mis-spaced 6 bp half boxes with one or two mismatches as compared with either GATACA or TGTATC were identified throughout this DNA region (data not shown). However, EMSA assays and DNase I footprinting using different DNA probes spanning the -200 to +292 region of the P_{paaF2} promoter did not detect binding of purified maltose-binding protein-PaaX1 fusion protein (MBP-PaaX1) under conditions that reproduced the previously reported binding of MBP-PaaX1 to its binding site within the P_{styA} promoter (del Peso-Santos *et al.*, 2006; and data not shown).

We also analysed the effect of StyR and PaaX1 on transcription from these two promoters by performing multiple-round *in vitro* transcription assays using the P_{styA} promoter plasmid pTE-E1B1 and the P_{paaF2} promoter plasmid pTE-PF2 (Fig. 7). The positive effect of phosphorylation on the StyR induction activity was confirmed by comparing the transcript level obtained with phosphorylated and unphosphorylated His-StyR (Fig. 7A, lanes 2 and 3). While production of transcripts from both these promoters was dependent on the presence of phosphorylated His-StyR (Fig. 7A), only transcription from the P_{styA} promoter was specifically inhibited by increasing concentrations of MBP-PaaX1 (Fig. 7B). Taken together, these data strongly suggest that, while transcription from the

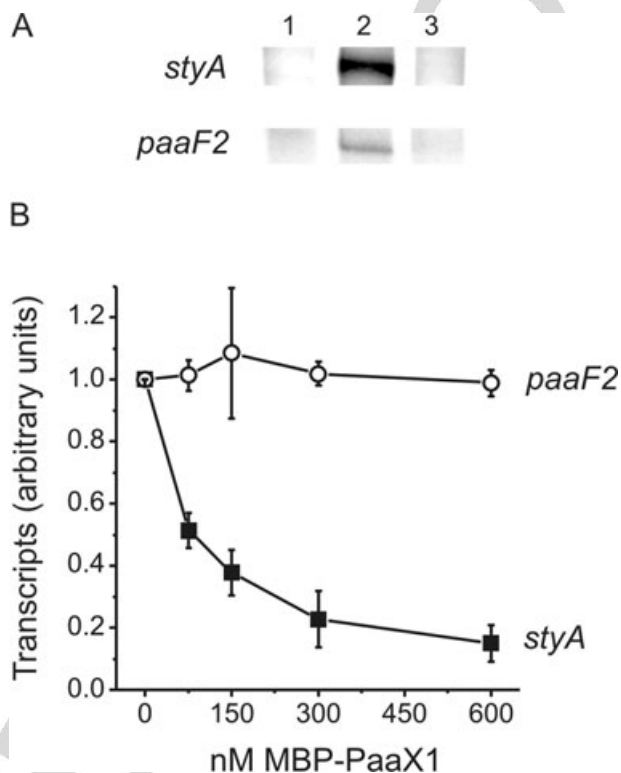


Fig. 7. StyR-dependent *in vitro* transcription from the P_{paaF2} and P_{styA} promoters.

A. Transcripts from P_{styA} promoter template pTE-E1B1 (top) and P_{paaF2} promoter template pTE-PF2 (bottom) in the presence of 0 μ M StyR (lane 1), 10 μ M phosphorylated His-StyR (lane 2) and 10 μ M non-phosphorylated His-StyR (lane 3).

B. Quantitative representation of the transcript levels from pTE-PF2 and pTE-E1B1 in the presence of 4 μ M phosphorylated His-StyR and increasing amounts of MBP-PaaX1: 0, 75, 150, 300 and 600 nM MBP-PaaX1. The results are the average of three independent experiments. Data were normalized by setting the levels in the absence of MBP-PaaX1 as 1 and are presented as the average \pm standard errors.

P_{styA} and P_{paaF2} promoters is co-ordinately positively activated by StyR, unlike the P_{styA} promoter, transcription from the P_{paaF2} promoter is not subject to repression by PaaX.

PaaF2 is a styrene-specific auxiliary PA-CoA ligase

To examine styrene and PAA-responsive regulation of PaaF and PaaF2 activities *in vivo*, we determined the PA-CoA ligase activities of *Pseudomonas* sp. strain Y2T2 (PaaF⁺ PaaF2⁺) and its PaaF null or PaaF2 null mutant derivatives under different growth regimes. As anticipated, none of the strains showed any detectable PA-CoA ligase activity when growing in minimal M9 medium containing 1% glycerol, while culturing in M9 medium in the presence of 1% glycerol with styrene supplied in the gaseous phase induced PA-CoA ligase activity in all three strains. However, that of *Pseudomonas* sp. strain Y2T2 (69.37 ± 2.63 U per mg of protein) was approximately

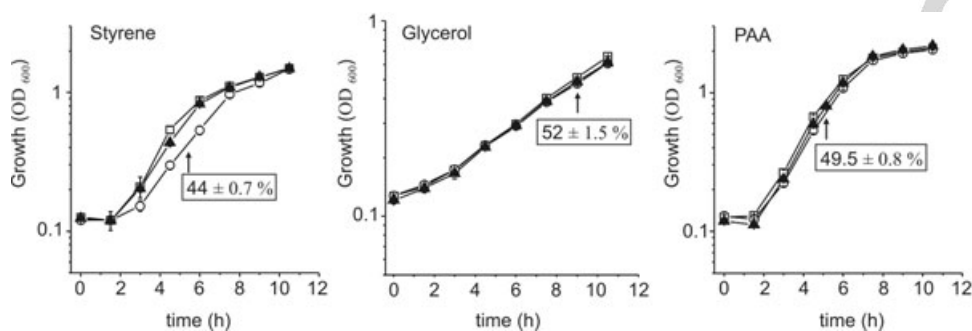


Fig. 8. Growth profiles and competition assays of the parental Y2T2 strain and its PaaF2 null counterpart. *Pseudomonas* sp. strain Y2T2 (open squares), *Pseudomonas* sp. strain Y2T2 *paaF2::Km* (open circles) or an equal mixture of both strains (black triangles) were grown in M9 minimal medium supplemented with either styrene supported in gaseous phase, 1% glycerol or 0.2% PAA. Data are the average of triplicate cultures and representative of two independent experiments. Arrows indicate when samples were withdrawn from mixed co-cultures for plating. A total of 240–360 colonies derived from each culture were scored for kanamycin resistance to determine the percentage of the *paaF2* null mutant in the mixed cultures (in boxes). Data are the average of four to seven independent experiments with standard errors.

threefold higher than that of its PaaF null (Y2T2 *paaF::Km*, 22.74 ± 1.54 U per mg of protein) or PaaF2 null (Y2T2 *paaF2::Km*, 20.86 ± 0.9 U per mg of protein) derivatives, demonstrating that loss of either gene resulted in lower net PA-CoA ligase activity. Consistent with styrene-specific induction of PaaF2 activity, only strains Y2T2 (PaaF⁺ PaaF2⁺) and its PaaF2 null derivative exhibited detectable PA-CoA ligase activities in response to PAA (30.36 ± 1.25 U per mg of protein and 24 ± 6.54 U per mg of protein respectively). Hence, this data clearly demonstrates that both the *paaF2* and *paaF* genes are expressed in the Y2T2 parental strain in response to styrene (which will then be converted to PA-CoA via PAA), but that *paaF2* expression is not induced in response to the presence of PAA. Hence, *paaF2*-encoded PA-CoA ligase activity is only induced in response to styrene *in vivo* and can be considered a styrene-specific PA-CoA ligase. Lack of the ability of the PaaF null mutant to express its remaining *paaF2*-encoded ligase activity in response to PAA presumably underlies the inability of this strain to grow at the expense of PAA as sole carbon source (Fig. 2A).

To examine the repercussions of styrene-specific PA-CoA ligase activity of PaaF2, we also determined the growth profiles of strain Y2T2 (PaaF⁺ PaaF2⁺) and its PaaF2 null derivative (Y2T2 *paaF2::Km*) in media with glycerol, styrene or PAA as sole carbon source (Fig. 8). Lack of PaaF2 did not alter maximal growth rates on any of the three media tested (compare squares and circles in Fig. 8), suggesting that reduced PA-CoA ligase activity in styrene- or PAA-induced cultures was not rate limiting for growth under the conditions used. However, in styrene-induced cultures, the PaaF2 null mutant exhibited a notable and reproducibly longer lag phase, suggesting that lack of styrene-induced PaaF2 activity results in slower adaptation to styrene as growth substrate. In co-cultivation experiments, in which equal

amounts of the parental and PaaF2 null strains were inoculated (triangles, Fig. 8), plating tests to distinguish parental and the PaaF2 null strains confirmed that this slower adaptation of the PaaF2 null mutant resulted in significantly lower percentage of the PaaF2 null strain than the parental strain after co-cultivated at the expense of styrene ($44 \pm 0.7\%$) but not at the expense of either glycerol ($52 \pm 1.5\%$) or PAA ($49.5 \pm 0.8\%$).

Discussion

This work reveals an unexpected regulation mechanism that places the *paaF2* gene, formerly believed to be part of the *paa* system, in the StyS/StyR regulon, and thus under a styrene-dependent control mechanism in *Pseudomonas* sp. strain Y2. This conclusion is based on the following findings: (i) styrene and other compounds that result in activation of the positive transcriptional regulator StyR co-ordinately stimulate transcription of both the *P_{styA}* promoter of the *styABCD* operon and the *P_{paaF2}* promoter of the monocistronic *paaF2* gene (Table 1), (ii) *paaF2*-encoded PA-CoA ligase activity is specifically induced in response to styrene but not PAA, (iii) transcription from *P_{paaF2}* is strictly dependent on active StyR both *in vivo* and *in vitro* (Figs 6 and 7), (iv) StyR specifically and tightly binds to a newly identified STY4 box (Fig. 5) analogous to those of the *P_{styA}* promoter, and (v) the STY4 binding site for StyR is appropriately located upstream of both the identified transcriptional start site (Fig. 4) and σ^{70} promoter motifs that might constitute the *P_{paaF2}* core promoter (Fig. 3).

Pseudomonas sp. strain Y2 possesses three *paaF* genes that encode PA-CoA ligases that convert PAA to PA-CoA. Either of the PaaF or PaaF3 proteins is sufficient to allow growth at the expense of PAA and styrene under laboratory conditions (Bartolomé-Martín *et al.*, 2004; and Figs 2 and 8). However, a strain that only has the *paaF2*

gene, while capable of growth on styrene, cannot grow at the expense of PAA (Fig. 2) because it is only styrene that provides the conditions necessary for its expression. Thus, the PaaF2 protein can be considered a styrene-specific auxiliary PA-CoA ligase.

The activity of PaaF2 is clearly not an absolute requirement for growth at the expense of styrene, at least under laboratory conditions (Figs 2 and 8). This begs the question of why *Pseudomonas* sp. strain Y2, and in all likelihood other similar strains such as *P. fluorescens* ST and *P. putida* CA-3, have evolved and/or retained the PaaF2 homologue in the face of its seeming metabolic redundancy. A plausible answer to this lies in the fact that PA-CoA ligases produce the metabolic intermediate that inactivates the repressive properties of PaaX, which otherwise inhibits transcription of *paa* genes and *sty* genes (through the P_{styA} promoter). Despite extensive efforts, we have not been able to detect any repressive effect of PaaX on transcription from the P_{paaF2} promoter (Fig. 7; ●, unpubl. data). Hence *paaF2* stands out among all the *sty* and *paa* catabolic genes as the only one not subjected to PaaX-mediated repression. In the presence of activated StyR, PaaX-mediated repression of the *sty* genes is incomplete and has been proposed to provide a mechanism to co-ordinate the activities of the upper *sty* pathway with those of the lower *sty* or *paa* pathway to prevent detrimental fluxes in which the final product of the former may build up in the absence of the *paa*-encoded activities (del Peso-Santos *et al.*, 2006). Hence, by having both the upper and lower pathways subject to PaaX repression, such a potentially detrimental situation would be avoided. However, such a scenario would be anticipated to also delay adaptation to growth on styrene until sufficient PA-CoA had accumulated to result in full de-repression of the *sty* and *paa* genes. We found that while lack of the

styrene-induced PaaF2 PA-CoA ligase activity did not affect maximal growth rates on styrene, its absence did cause a delay in adaptation to growth on styrene and a concomitant decrease in its competitive ability against an otherwise isogenic PaaF2⁺ to grow at the expense of styrene (Fig. 8). Based on these findings, we propose that the StyR-mediated regulation of PaaF2 expression provides a physiological system for the rapid production of a protein that encodes the capacity to generate the PA-CoA signal needed for fast co-ordinate de-repression of the two sets of enzymes required for styrene catabolism.

With respect to the above, it is also interesting to note that the mRNA for PaaF2 possess a 262 nt 5'-UTR (see Fig. 3). Transcriptional reporter gene fusions that differ with respect to possession of this 5'-UTR produce different levels of transcripts (Fig. 6). Untranslated regions of mRNAs can affect gene expression in a wide variety of ways through, for example, mRNA stability, ribo-switches or binding of small regulatory RNAs (Fugtsang, 2005; Komarova *et al.*, 2005; Kaberdin and Blasi, 2006). Hence, our initial results open up the possibility that the 5'-UTR may, in some as yet unknown way, further modulate and fine tune PaaF2 levels to provide co-ordinate rapid de-repression of the *sty* and *paa* genes. Direct analysis of the role of this region in controlling PaaF2 levels will be the subject of further research.

Experimental procedures

Bacterial cultures and general procedures

Luria broth (LB; Sambrook *et al.*, 1989) was used as rich medium, while M9 salts (Miller, 1972) supplemented with indicated carbon sources were used as minimal medium. *E. coli* strains and *Pseudomonas* strains (Table 2) were cultivated at 37°C and 30°C respectively. In co-culturing experi-

Table 2. Key bacterial strains.

Bacterial strains	Relevant genotype/phenotype	References
<i>E. coli</i> DH5 α F'	F' <i>endA1 hsdR17</i> ($r_{\kappa} m^{+}$) <i>glnV44 thi-1 recA1 gyrA</i> (Nal ^R) <i>relA1</i> Δ (<i>lacZYA-argF</i>) <i>U169 deoR</i> (Φ 80 <i>dLac</i> Δ (<i>lacZ</i>) <i>M15</i>)	Woodcock <i>et al.</i> (1989)
<i>E. coli</i> S17-1 λ <i>pir</i>	<i>recA thi hsdR</i> -M ⁺ RP4::2-Tc::Mu::Km::Tn7 λ <i>pir</i> lysogen; Tp ^R Sm ^R	de Lorenzo and Timmis (1994)
<i>E. coli</i> CC118 λ <i>pir</i>	Δ (<i>ara-leu</i>) <i>araD</i> Δ <i>lacX74 galE galK phoA20 thi-1 rpsE rpoB</i> <i>argE</i> (<i>Am</i>) <i>recA1</i> λ <i>pir</i> lysogen	Herrero <i>et al.</i> (1990)
<i>Pseudomonas</i> sp. strain Y2	<i>paa</i> ⁺ <i>sty</i> ⁺ <i>lacZ</i> ; Ap ^R Cm ^R Km ^R Tc ^S	Utkin <i>et al.</i> (1991)
<i>Pseudomonas</i> sp. strain Y2T2	Δ <i>paa2</i> deletion of strain Y2: <i>paa</i> ⁺ <i>sty</i> ⁺ Ap ^R Cm ^R Tc ^R	Bartolomé-Martín <i>et al.</i> (2004)
<i>Pseudomonas</i> sp. strain Y2 F2L	Strain Y2 carrying P_{paaF2} - <i>lacZ</i> on mini-Tn5-Km2; Ap ^R Cm ^R Km ^R	This work
<i>Pseudomonas</i> sp. strain Y2 F2SL	Strain Y2 carrying P_{paaF2S} - <i>lacZ</i> on mini-Tn5-Km2; Ap ^R Cm ^R Km ^R	This work
<i>Pseudomonas</i> sp. strain Y2 PAL	Strain Y2 carrying P_{styA} - <i>lacZ</i> on mini-Tn5-Km2; Ap ^R Cm ^R Km ^R	Alonso <i>et al.</i> (2003a)
<i>Pseudomonas</i> sp. strain Y2 F2L Δ <i>styR</i> ::Gm	StyR null mutant of strain Y2 F2L; Ap ^R Cm ^R Km ^R Gm ^R	This work
<i>Pseudomonas</i> sp. strain Y2T2X1	PaaX1 null mutant of strain Y2T2; Ap ^R Cm ^R Km ^R Tc ^R	del Peso-Santos <i>et al.</i> (2006)
<i>Pseudomonas</i> sp. strain Y2T2 <i>paaF</i> ::Km	PaaF null mutant of strain Y2T2; Ap ^R Cm ^R Km ^R Tc ^R	This work
<i>Pseudomonas</i> sp. strain Y2T2 <i>paaF2</i> ::Km	PaaF2 null mutant of strain Y2T2; Ap ^R Cm ^R Km ^R Tc ^R	This work

Ap, ampicillin; Cm, chloramphenicol; Gm, gentamicin; Km, kanamycin; Sm, streptomycin; Tc, tetracycline; Tp, trimethoprim.

Table 3. Plasmids.

Name	Relevant properties	Reference/source
pBluescript II KS(+)	General purpose cloning vector; <i>ori</i> ColE1 Ap ^R	Stratagene
pBF2EX	pBluescript II KS(+) carrying <i>paaF2</i> ; Ap ^R	This work
pBF2Km	pBluescript II KS(+) carrying <i>paaF2::Km^R</i> ; Ap ^R Km ^R	This work
pBlueR1	pBluescript II KS(+) with a 183 bp 5'- <i>styR</i> fragment; Ap ^R	This work
pBlueR1R2	pBluescript II KS(+) with a 183 bp 5'- <i>styR</i> fragment and a 172 bp 3'- <i>styR</i> fragment; Ap ^R	This work
pBlueRGm	pBluescript II KS(+) carrying a Δ <i>styR::Gm^R</i> gene replacement cassette; Ap ^R Gm ^R	This work
pKNG101	Mobilizable suicide vector for marker-exchange mutagenesis; <i>ori</i> R6K Sm ^R <i>sacB</i>	Kaniga <i>et al.</i> (1991)
pKF2Km	pKNG101 carrying a <i>paaF2::Km^R</i> gene insertion cassette; Km ^R Sm ^R <i>sacB</i>	This work
pKCoAKm	pKNG101 carrying a <i>paaF::Km^R</i> gene insertion cassette; Km ^R Sm ^R <i>sacB</i>	Bartolomé-Martín (2006)
pKRGm	pKNG101 carrying a Δ <i>styR::Gm^R</i> gene replacement cassette; Gm ^R Sm ^R <i>sacB</i>	This work
pPaaK	pUC18-based plasmid containing <i>paaF2</i> ; Ap ^R	Velasco <i>et al.</i> (1998)
pISm7.0R	pUC19-based plasmid containing <i>stySR-styAB</i> genes of <i>Pseudomonas</i> sp. strain Y2 after P_{lac} ; Ap ^R	Velasco <i>et al.</i> (1998)
pUE14	pUC19-based plasmid containing a chromosomal EcoRI fragment of <i>Pseudomonas</i> sp. strain Y2 that spans part of <i>paaA</i> , <i>paaN2</i> , <i>paaY</i> , <i>paaX</i> , <i>paaF2</i> , <i>styS</i> , <i>styR</i> , <i>styA</i> , <i>styB</i> , and part of <i>styC</i> genes; Ap ^R	Velasco <i>et al.</i> (1998)
pM-X1	MBP-PaaX1 expression plasmid; Ap ^R	del Peso-Santos <i>et al.</i> (2006)
pQ-R	His-StyR expression plasmid; Ap ^R	S. Alonso
pTE103	<i>In vitro</i> transcription vector with a strong transcriptional terminator downstream of a multicloning site; Ap ^R	Elliott <i>et al.</i> (1984)
pTE-E1B1	pTE103 carrying the P_{styA} promoter; Ap ^R	del Peso-Santos <i>et al.</i> (2006)
pTE-PF2	pTE103 carrying the P_{paaF2} promoter; Ap ^R	This work
pUC4K	Source of a kanamycin resistance cassette; Ap ^R Km ^R	Taylor <i>et al.</i> (1988)
p34SGm	Source of a gentamicin resistance cassette; Ap ^R Gm ^R	Dennis and Zylstra, 1998
pSJ3	<i>ori</i> ColE1, promoter-less <i>lacZ</i> ; Ap ^R	Ferrández <i>et al.</i> (1998)
pSF2L	P_{paaF2} promoter cloned XbaI to BamHI into pSJ3; Ap ^R	This work
pSF2SL	P_{paaF2S} promoter cloned XbaI to BamHI into pSJ3; Ap ^R	This work
pUT-miniTn5-Km2	<i>ori</i> R6K <i>trp</i> miniTn5-Km2 Km ^R Ap ^R	de Lorenzo <i>et al.</i> (1993)
PF2LKm	$P_{paaF2-lacZ}$ fusion cloned NotI into pUTmini-Tn5-Km2; Km ^R Ap ^R	This work
PF2LSKm	$P_{paaF2S-lacZ}$ fusion cloned NotI into pUTmini-Tn5-Km2; Km ^R Ap ^R	This work
pRW2A	RK2-based promoter-less <i>lacZ</i> promoter probe vector; Tc ^R	Lodge <i>et al.</i> (1990)
pRWF2A	pRW2A with a 492 bp EcoRI to BamHI (-200 to +292) P_{paaF2} promoter fragment controlling <i>lacZ</i> ; Tc ^R	This work
pRWF2B	pRW2A with a 294 bp EcoRI to BamHI (-2 to +292) <i>paaF2</i> fragment controlling <i>lacZ</i> ; Tc ^R	This work
pRWF2C	pRW2A with a 210 bp EcoRI to BamHI (-200 to +10) P_{paaF2} fragment controlling <i>lacZ</i> ; Tc ^R	This work

42

ments, aliquots containing the same number of each strain were prepared from independent cultures grown on minimal M9 medium supplemented with 1% glycerol and used to inoculate minimal M9 medium containing either 1% glycerol, 0.2% PAA or styrene supplemented in gaseous phase. At the indicated times, cells were plated on solid media and colonies replica plated on solid LB medium with or without kanamycin.

18

Plasmids and sequences of oligonucleotides used in this study are listed in Table 3 and Table S1 respectively. DNA manipulations were performed using standard techniques and the fidelity of regulatory and coding DNA generated through PCR amplification was verified by DNA sequencing.

Plasmids

The *in vitro* transcription plasmid pTE-PF2 was generated using pUE14 as template and primers PF2E and F2B that amplify the -200 to +292 sequence of the $P_{paaF2-paaF2}$ region as an EcoRI to BamHI fragment. This fragment was cloned between these sites of pTE103 to generate pTE-PF2, and between these sites of pRW2A to generate the $P_{paaF2-lacZ}$ reporter plasmid pRWF2A. Other *lacZ* transcriptional reporter plasmids, which carry the -2 to +292 and the -200 to +10 P_{paaF2} promoter regions as EcoRI to BamHI

fragment, were generated in an analogous manner using pUE14 as template and primers PF2Eco1+ and F2B (pRWF2B) and PF2E and F2B10+ (pRWF2C).

Construction of null mutant strains by double-site recombination

Null mutants of *Pseudomonas* were generated by a common step-wise procedure in which target genes, disrupted by an antibiotic resistance gene, were first assembled in pBluescript II KS(+). The inactivated gene cassettes were then cloned into an R6K-based suicide plasmid and maintained in the replication permissive *E. coli* S17-1 λ *pir* strain. Subsequently, the suicide plasmids were moved by conjugal transfer to the recipient strain with selection for double-site recombinants as previously described (Alonso *et al.*, 2003a) by plating on LB containing chloramphenicol, kanamycin, tetracycline and sucrose for the construction of PaaF and PaaF2 null mutants or chloramphenicol, kanamycin, gentamicin and sucrose in the case of the StyR null mutant. Correct recombinants were identified by screening for loss of the suicide plasmid by testing sensitivity to streptomycin and by Southern blot or diagnostic PCR to verify loss of the wild-type version of the gene.

For the construction of PaaF and PaaF2 null mutants, *Pseudomonas* sp. strain Y2T2 that lacks *paaF3*, the third *paaF* copy present in the *paa2* gene cluster, was used as the recipient strain. A PaaF null derivative (*Pseudomonas* sp. strain Y2T2 *paaF::Km*), which harbours a kanamycin resistance (Km^R) cassette inserted in the PstI site of the *paaF* gene, was constructed by introducing the pKNG101-derived suicide plasmid pKCoAKm plasmid (Bartolomé-Martín, 2006), which carries the *paaF::Km* disruption cassette. A PaaF2 null derivative (*Pseudomonas* sp. strain Y2T2 *paaF2::Km*), which harbours a Km^R cassette inserted in the EcoRV site of the *paaF2* gene, was generated as follows. A 1425 bp EcoRI to XhoI *paaF2* gene fragment from pPaaK was cloned between the same sites in pBluescript II KS(+) to generate pBF2EX. The *paaF2* gene was then inactivated by insertion of a 1252 bp HincII Km^R cassette from pUC4K to give pBF2Km. The resulting *paaF2::Km* cassette was then excised as a 2682 bp BamHI to XhoI fragment and cloned between the BamHI and Sall sites of pKNG101. The resulting suicide plasmid, pKF2Km, was then introduced into *Pseudomonas* sp. strain Y2T2.

A gene replacement null mutant of StyR (*Pseudomonas* sp. strain Y2 F2L $\Delta styR::Gm$), which harbours a gentamicin resistance (Gm^R) cassette replacing an internal portion of the *styR* gene of *Pseudomonas* sp. strain Y2 F2L, was generated as follows. A 183 bp Sall to BamHI fragment spanning the 5' end of *styR* was amplified using primers R51 and R31 and plasmid pUE14, and cloned between the same sites of pBlue-script II KS(+) to give pBlueR1. Then, a 172 bp BamHI to XbaI fragment spanning the 3' end of *styR* was amplified using primers R52 and R32 and plasmid pUE14 and cloned between these sites in pBlueR1, yielding pBlueR1R2. An 865 bp BamHI Gm^R cassette from pS34Gm was cloned into the BamHI site of pBlueR1R2, giving rise to pBlueRGm. The 1172 bp Sall to XbaI $\Delta styR::Gm$ gene replacement cassette was then excised from pBlueRGm and cloned between these sites of pKNG101 to generate the suicide plasmid pKRGm that was used to construct the null mutant by double-site recombination.

Construction of monocopy wild-type and mutant $P_{paaF2-lacZ}$ reporter strains

Pseudomonas sp. strain Y2 F2L, a derivative of *Pseudomonas* sp. strain Y2 which carries a $P_{paaF2-lacZ}$ fusion on the chromosome, was constructed as follows. A 492 bp XbaI to BamHI fragment, spanning the P_{paaF2} promoter to the ninth codon of *paaF2*, was amplified using PF2X and F2B primers and plasmid pUE14 as template. This fragment was cloned between these sites in frame with the coding region of *lacZ* gene on pSJ3. The resulting plasmid, pSF2L, contains a translational fusion $P_{paaF2-lacZ}$, which was excised as a 4.5 kb NotI fragment and cloned into the unique NotI site of the mini-transposon carried on the suicide plasmid pUT-miniTn5-Km2. The resulting plasmid, pF2LKm, which carries the $P_{paaF2-lacZ}$ fusion within the mini-Tn5-Km2, was then introduced by conjugation from *E. coli* S17 λpir to the recipient. Recipients that had received the mini-transposon were selected by plating on LB containing chloramphenicol and kanamycin. Six clones were chosen and their sensitivity to piperacilline was verified to ensure genuine transposition

rather than homologous recombination between the P_{paaF2} region present on the plasmid and the one on the chromosome. β -Galactosidase activity was measured in styrene-exposed cultures of the six clones at several points, with all giving similar activities throughout growth. One of these clones, designated Y2 F2L, was used in further experiments. An analogous strain but with the STY4 site motif shuffled to give a $P_{paaF2S-lacZ}$ fusion (*Pseudomonas* sp. strain Y2 F2SL) was constructed in the same way through sequential production of plasmids pSF2SL and pF2SLKm. These plasmids carry the STY4 mutation that was generated by overlapping PCR using the PF2X and F2B primers described above and the mutagenic primers S (R) and S (F).

Enzyme assays

To assay β -galactosidase activity, cultures were grown in minimal M9 medium supplemented with 1% glycerol until an OD_{600} of ~ 0.4 . At this point, the cultures were split into six different flasks. Three of them were induced with styrene provided in the gaseous phase, or with other test compounds to a final concentration of 90 μM . The other three were left un-induced. Samples were withdrawn at the indicated time points and the cells permeabilized by treatment with chloroform and sodium dodecyl sulphate and assayed for β -galactosidase activity as described by Miller (1972).

For the PA-CoA ligase assays, crude extracts were prepared from *Pseudomonas* strains grown at 30°C in M9 minimal medium supplemented with either 1% glycerol, 1% glycerol plus 0.2% PAA or 1% glycerol with styrene supplied in the gaseous phase. Cells were harvested at an OD_{600} of 1.0, washed and then re-suspended in 0.05 volumes of 50 mM Tris-HCl, pH 8.2 prior to disruption by sonication. Crude extracts were clarified by removal of cell debris by centrifugation at 12 000 r.p.m. for 30 min at 4°C and protein concentrations were determined by the method of Bradford (1976), using bovine serum albumin as the standard. PA-CoA ligase activity was followed by measuring the rate of formation of phenylacetylhydroxamate in the presence of cell-free extracts, ATP, Coenzyme A, PAA and neutral hydroxylamine as previously described (Martínez-Blanco *et al.*, 1990). The extinction coefficient of phenylacetylhydroxamate under these conditions is 0.9 $mM^{-1} cm^{-1}$. One unit of enzyme activity is defined as the catalytic activity leading to the formation of 1 nmol of phenylacetylhydroxamate in 1 min. Specific activity is given as units per mg of protein.

Quantitative RT-PCR

Pseudomonas sp. strain Y2T2 *paaF::Km* was cultured in M9 minimal medium with 1% glycerol alone, or 1% glycerol containing either 0.2% PAA or styrene supplied in the gaseous phase and cells were harvested at 0.8 units of OD_{600} . RNA isolation, cDNA synthesis and RT-PCR conditions were as previously described (del Peso-Santos *et al.*, 2006). Transcript levels of *paaD* mRNA were determined using primers QpaaD(F) and QpaaD(R) (Table S1) specific for the *paaD* gene and the results were normalized to those obtained using primers QTcR2(F) and QTcR2(R) specific for the control household *tetA* gene. For quantification, standard

curves of cDNA dilutions (1:10–1:10 000) were made in duplicate for each primer pair. Relative quantification of gene expression was calculated using the Standard Curve Method as described in the user bulletin of ABI PRISM 7700 sequence detection system (Applied Biosystems).

Primer extension

Pseudomonas sp. strain Y2 cells were grown in minimal M9 medium in the presence of styrene in the gaseous phase until cultures had reached an OD₆₀₀ of about 1.0. *E. coli* CC118 λ pir [pUE14] and CC118 λ pir [pKNG101] cells were grown on M9 media containing 1% glycerol until an OD₆₀₀ of 0.58 and 0.4 was reached respectively. Cultures were then exposed to styrene in the gaseous phase and cells harvested at OD₆₀₀ of 0.85 for CC118 λ pir [pUE14] and 0.7 for CC118 λ pir [pKNG101]. Total RNA from the different cells was isolated using the RNA protect and RNeasy Bacterial Reagent Kits (Qiagen) according to the manufacturer's instructions. RNA was then treated for 15 min at 37°C with DNase I and the reactions were stopped by addition of 0.5 M EDTA. After phenol-chloroform extraction, the samples were precipitated and washed with 70% ethanol, dried and re-suspended in RNase-free water. Primer extension reactions (16 μ l) were carried out with the indicated amounts of RNA, 30 units of Reverse Transcriptase AMV (Roche) and 2 pmol of primer pe-150 in the buffer provided with the enzyme. Sequencing reactions of pTE-PF2 were performed with the same primer using the Sequenase 2.0 Kit (USB) and [α -³²P]-dATP (250 μ Ci, Amersham) as indicated by the manufacturer. Products were analysed on 6% polyacrylamide-urea gels and exposed to Hyperfilm MP (Amersham).

Purified proteins

The MBP–PaaX1 and His–StyR, which has six consecutive His residues at its N-terminal end, were purified as previously described (del Peso-Santos *et al.*, 2006). *P. putida* KT2440 (Bagdasarian *et al.*, 1981) σ ⁷⁰-RNA polymerase was purified essentially as described for the *E. coli* holoenzyme (Hager *et al.*, 1990) and was a gift from L. Bernardo (Umeå University). His–StyR was phosphorylated just prior to use by incubation at 28°C for 45 min in phosphorylation buffer [43 mM Tris-acetate pH 8.0, 30 mM potassium acetate, 8 mM MgCl₂, 27 mM ammonium acetate, 1 mM DTT, 80 mM KCl, 10% (v/v) glycerol and 4% (v/v) polyethylenglycol] supplemented with 20 mM acetylphosphate.

Double-stranded DNA probes

Double-stranded DNA probes were generated by PCR amplification as follows. The 225 bp E1B1 and the 154 bp E2B1 probes were generated using primers E1 and B1, or E1 and B2, respectively, and plasmid pISm7.0R as template. The 298 bp F2 and F2S probes were obtained using primers PF2-5 and F2B(2) and plasmids harbouring the wild-type *P*_{paaF2} promoter region or the STY4 mutant variant. The different DNA probes were digested BamHI and/or EcoRI and the purified fragments were labelled by Klenow fragment DNA polymerase fill-in of 5'overhangs with [α -³²P]-dATP

(250 μ Ci, Amersham) and cold deoxynucleoside triphosphates. Unincorporated radioisotopes were removed using Micro Bio Spin P30 columns (Bio-Rad).

EMSA and DNase I footprinting assay

Assays were performed essentially as previously described (del Peso-Santos *et al.*, 2006). In brief, for EMSA, radiolabelled DNA fragments were diluted to a final concentration of 0.1 nM in 9 μ l of a buffer containing 20 mM Tris-HCl pH 8.0, 5% glycerol, 2 mM EDTA, 30 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 100 μ g ml⁻¹ salmon sperm DNA, 100 μ g ml⁻¹ bovine serum albumin, and the indicated amount of purified protein. The binding reaction mixtures were incubated for 20 min at 30°C for phosphorylated His–StyR or 20°C in the case of MBP–PaaX1. Complexes were analysed by electrophoresis in 10% polyacrylamide gels (for EMSA performed with His–StyR) or 5% polyacrylamide gels (for EMSA performed with MBP–PaaX1) buffered with 45 mM Tris-borate/1 mM EDTA. The gels were dried onto Whatman 3MM filter paper and exposed to Hyperfilm MP (Amersham Biosciences).

In vitro transcription assays

Assays were performed with CsCl gradient prepared supercoiled DNA templates that had been extensively dialysed and clarified through Micro Bio-Spin P30 (Bio-Rad) columns to remove trace CsCl. Reactions (20 μ l final volume) were performed at 30°C in acetate buffer containing 35 mM Tris-acetate, pH 7.9, 70 mM KAc, 5 mM MgAc₂, 20 mM NH₄Ac, 1 mM DTT and 0.2 mg ml⁻¹ bovine serum albumin. *P. putida* σ ⁷⁰-RNA polymerase (25 nM), the different templates (10 nM pTE-E1B1 or pTE-PF2), and the indicated amounts of phosphorylated His–StyR and/or MBP–PaaX1 were mixed and incubated for 20 min at 30°C to allow open complex formation. Similar experiments with either no StyR or unphosphorylated His–StyR were used as controls. Multiple-round transcription was initiated by adding a mixture of 500 μ M ATP, 200 μ M GTP, 200 μ M CTP, 80 μ M UTP and 5 μ Ci of [α -³²P]-UTP (> 3000 Ci mmol⁻¹; Amersham Biosciences). After 10 min of incubation at 30°C, reinitiation was prevented by the addition of heparin (0.1 mg ml⁻¹), and 8 min later the reactions were terminated by adding 5 μ l of stop per loading buffer (150 mM EDTA, 1.05 M NaCl, 14 M urea, 10% glycerol, 0.037% xylene cyanol, 0.037% bromophenol blue). Transcripts were analysed on 7 M urea–4.5% polyacrylamide gels and quantified using an Amersham Biosciences phosphorimager. Transcript production was normalized to the production of the RNA-1 transcript common to the two plasmids compared.

Acknowledgements

We are grateful to David Bartolomé-Martín for the gift of the pKCoAKm plasmid and for his continuous help and to Lisandro Bernardo (Umeå University) for the gift of purified σ ⁷⁰-RNA polymerase. T.P.-S. is the recipient of a fellowship from the Comunidad Autónoma de Madrid. This work was supported by the Spanish Ministry of Education and Science (Grant BFU 2006-15214-C03-02) and the Swedish National Research Council.

References

- Alonso, S., Navarro-Llorens, J.M., Tormo, A., and Perera, J. (2003a) Construction of a bacterial biosensor for styrene. *J Biotechnol* **102**: 301–306.
- Alonso, S., Bartolomé-Martín, D., del Álamo, M., Díaz, E., García, J.L., and Perera, J. (2003b) Genetic characterization of the styrene lower catabolic pathway of *Pseudomonas* sp. strain Y2. *Gene* **319**: 71–83.
- Bagdasarian, M., Lurz, R., Ruckert, B., Franklin, F.C., Bagdasarian, M.M., Frey, J., and Timmis, K.N. (1981) Specific-purpose plasmid cloning vectors. II. Broad host range, high copy number, RSF1010-derived vectors, and a host-vector system for gene cloning in *Pseudomonas*. *Gene* **16**: 237–247.
- Bartolomé-Martín, D. (2006) Estudio de los genes implicados en la degradación del ácido fenilacético en *Pseudomonas* sp. strain Y2. PhD Thesis. Madrid, Spain: Universidad Complutense.
- 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.
- Beltrametti, F., Marconi, A.M., Bestetti, G., Colombo, C., Galli, E., Ruzzi, M., and Zennaro, E. (1997) Sequencing and functional analysis of styrene catabolism genes from *Pseudomonas fluorescens* ST. *Appl Environ Microbiol* **63**: 2232–2239.
- Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**: 248–254.
- ~~Elish, M.E., Pierce, J.R., and Earhart, C.F. (1988) Biochemical analysis of spontaneous *topA* mutants of *Escherichia coli*. *J Gen Microbiol* **134**: 1355–1364.~~
- Elliott, T., and Geiduschek, E.P. (1984) Defining a bacteriophage T4 late promoter: absence of a '–35' region. *Cell* **36**: 211–219.
- ~~Fernández, C. (2005) Avances en la caracterización del catabolismo del ácido fenilacético en *Escherichia coli*. PhD Thesis. Madrid, Spain: Universidad Complutense.~~
- Ferrández, A., Miñambres, B., García, B., Olivera, E.R., Luengo, J.M., García, J.L., and Díaz, E. (1998) Catabolism of phenylacetic acid in *Escherichia coli*. Characterization of a new aerobic hybrid pathway. *J Biol Chem* **273**: 25974–25986.
- Ferrández, A., García, J.L., and Díaz, E. (2000) Transcriptional regulation of the divergent *paa* catabolic operons for phenylacetic acid degradation in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **275**: 12214–12222.
- Fugtsang, A. (2005) Analysis of 5'-UTR composition and gene expression: canonical versus non-canonical start codons. *Biochem Biophys Res Commun* **335**: 71–75.
- Galán, B., García, J.L., and Prieto, M.A. (2004) The PaaX repressor, a link between penicillin G acylase and the phenylacetyl-coenzyme A catabolon of *Escherichia coli* W. *J Bacteriol* **186**: 2215–2220.
- Hager, D.A., Jin, D.J., and Burgess, R.R. (1990) Use of Mono Q high-resolution ion-exchange chromatography to obtain highly pure and active *Escherichia coli* RNA polymerase. *Biochemistry* **29**: 7890–7894.
- Herrero, M., de Lorenzo, V., and Timmis, K.N. (1990) Transposon vectors containing non-antibiotic resistance selection markers for cloning and stable chromosomal insertion of foreign in gram-negative bacteria. *J Bacteriol* **172**: 6557–6567.
- Kaberlin, V.R., and Blasi, U. (2006) Translation initiation and the fate of bacterial mRNAs. *FEMS Microbiol Rev* **30**: 967–979.
- 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.
- Kim, H.S., Kang, T.S., Hyun, J.S., and Kang, H.S. (2004) Regulation of penicillin G acylase gene expression in *Escherichia coli* by repressor PaaX and the cAMP–cAMP receptor protein complex. *J Biol Chem* **279**: 33253–33262.
- Komarova, A.V., Tchufistova, L.S., Dreyfus, M., and Boni, I.V. (2005) AU-rich sequences within 5' untranslated leaders enhance translation and stabilize mRNA in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **187**: 1344–1349.
- Leoni, L., Ascenzi, P., Bocedi, A., Rampioni, G., Castellini, L., and Zennaro, E. (2003) Styrene-catabolism regulation in *Pseudomonas fluorescens* ST: phosphorylation of StyR induces dimerization and cooperative DNA-binding. *Biochem Biophys Res Commun* **303**: 926–931.
- Leoni, L., Rampioni, G., Di Stefano, V., and Zennaro, E. (2005) Dual role of response regulator StyR in styrene catabolism regulation. *Appl Environ Microbiol* **71**: 5411–5419.
- Lodge, L., Williams, R., Bell, A., Chan, B., and Busby, S. (1990) Comparison of promoter activities in *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*: use of a new broad-host-range promoter-probe plasmid. *FEMS Microbiol Lett* **67**: 221–226.
- de Lorenzo, V., and Timmis, K.N. (1994) Analysis and construction of stable phenotypes in gram-negative bacteria with Tn5- and Tn10-derived minitransposons. *Meth Enzymol* **235**: 386–405.
- ~~de Lorenzo, V., Eltis, L., Kessler, B., and Timmis, K.N. (1993) Analysis of *Pseudomonas* gene products using *lacIq/Ptrp-lac* plasmids and transposons that confer conditional phenotypes. *Gene* **123**: 17–24.~~
- ~~Luengo, J.M., García, J.L., and Olivera, E.L. (2001) The phenylacetyl-CoA catabolon: a complex catabolic unit with broad biotechnological applications. *Mol Microbiol* **39**: 1434–1442.~~
- Martínez-Blanco, H., Reglero, A., Rodríguez-Aparicio, L.B., and Luengo, J.M. (1990) Purification and biochemical characterization of phenylacetyl-CoA ligase from *Pseudomonas putida*. A specific enzyme for the catabolism of phenylacetic acid. *J Biol Chem* **265**: 7084–7090.
- ~~Milani, M., Leoni, L., Rampioni, G., Zennaro, E., Ascenzi, P., and Bolognesi, M. (2005) An active-like structure in the unphosphorylated StyR response regulator suggests a phosphorylation dependent allosteric activation mechanism. *Structure* **13**: 1289–1297.~~
- Miller, J.H. (1972) *Experiments in Molecular Genetics*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Mohamed, M.S., Ismail, W., Heider, J., and Fuchs, G. (2002) Aerobic metabolism of phenylacetic acids in *Azoarcus evansii*. *Arch Microbiol* **178**: 180–192.

- Mooney, A., Ward, P.G., and O'Connor, K.E. (2006) Microbial degradation of styrene: biochemistry, molecular genetics, and perspectives for biotechnological applications. *Appl Microbiol Biotechnol* **72**: 1–10.
- Navarro-Llorens, J.M., Patrauchan, M.A., Stewart, G.R., Davies, J.E., Eltis, L.D., and Mohn, W.W. (2005) Phenylacetate catabolism in *Rhodococcus* sp. strain RHA1: a central pathway for degradation of aromatic compounds. *J Bacteriol* **187**: 4497–4504.
- O'Leary, N.D., O'Connor, K.E., Duetz, W., and Dobson, A.D.W. (2001) Transcriptional regulation of styrene degradation in *Pseudomonas putida* CA-3. *Microbiology* **147**: 973–979.
- O'Leary, N.D., O'Connor, K.E., and Dobson, A.D.W. (2002) Biochemistry, genetics and physiology of microbial styrene degradation. *FEMS Microbiol Rev* **26**: 403–417.
- Olivera, E.R., Miñambres, B., García, B., Muñoz, C., Moreno, M.A., Ferrández, A., *et al.* (1998) Molecular characterization of the phenylacetic acid catabolic pathway in *Pseudomonas putida* U: the phenylacetyl-CoA catabolon. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 6419–6424.
- Panke, S., Witholt, B., Schmid, A., and Wubbolts, M.G. (1998) Towards a biocatalyst for (*S*)-styrene oxide production: characterization of the styrene degradation pathway of *Pseudomonas* sp. strain VLB120. *Appl Environ Microbiol* **64**: 2032–2043.
- del Peso-Santos, T., Bartolomé-Martín, D., Fernández, C., Alonso, S., García, J.L., Díaz, E., *et al.* (2006) Coregulation by phenylacetyl-coenzyme A-responsive PaaX integrates control of the upper and lower pathways for catabolism of styrene by *Pseudomonas* sp. strain Y2. *J Bacteriol* **188**: 4812–4821.
- Rost, R., Haas, S., Hammer, E., Herrmann, H., and Burchardt, G. (2002) Molecular analysis of aerobic phenylacetate degradation in *Azoarcus evansii*. *Mol Genet Genomics* **267**: 656–663.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd edn. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- ~~Santos, P.M., Leoni, L., Di Bartolo, I., and Zennaro, E. (2002) Integration host factor is essential for the optimal expres-~~
- ~~sion of the styABCD operon in *Pseudomonas fluorescens* ST. *Res Microbiol* **153**: 527–536.~~
- Shingler, V. (2003) Integrated regulation in response to aromatic compounds: from signal sensing to attractive behaviour. *Environ Microbiol* **5**: 1226–1241.
- Taylor, L.A., and Rose, R.E. (1988) A correction in the nucleotide sequence of the Tn903 kanamycin resistance determinant in pUC4K. *Nucleic Acids Res* **16**: 358.
- ~~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.~~
- Utkin, I.B., Yakimov, M.M., Matveeva, L.N., Kozlyak, E.I., Rogozhin, I.S., Solomon, Z.G., and Bezborodov, A.M. (1991) Degradation of styrene and ethylbenzene by *Pseudomonas* species Y2. *FEMS Microbiol Lett* **77**: 237–242.
- Velasco, A., Alonso, S., García, J.L., Perera, J., and Díaz, E. (1998) Genetic and functional analysis of the styrene catabolic cluster of *Pseudomonas* sp. strain Y2. *J Bacteriol* **180**: 1063–1071.
- ~~Vieira, J., and Messing, J. (1987) Production of single-stranded plasmid DNA. *Methods Enzymol* **153**: 3–11.~~
- Woodcock, D.M., Crowther, P.G., Doherty, J., Jefferson, S., DeCruz, E., Noyer-Weidner, M., *et al.* (1989) Quantitative evaluation of *Escherichia coli* host strains for tolerance to cytosine methylation in plasmid and phage recombinants. *Nucleic Acids Res* **17**: 3469–3478.

Supplementary material

This material is available as part of the online article from: <http://www.blackwell-synergy.com/doi/abs/10.1111/j.1365-2958.2008.06259.x>
(This link will take you to the article abstract).

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