



Doctoral Thesis

## **Bacterial genetics of catabolic adaptation to chloroaromatic compounds**

**Author(s):**

Leveau, Johannes Henricus Josephus

**Publication Date:**

1998

**Permanent Link:**

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-001931416> →

**Rights / License:**

[In Copyright - Non-Commercial Use Permitted](#) →

This page was generated automatically upon download from the [ETH Zurich Research Collection](#). For more information please consult the [Terms of use](#).

Diss. ETH No. 12536

**BACTERIAL GENETICS  
OF  
CATABOLIC ADAPTATION  
TO  
CHLOROAROMATIC COMPOUNDS**

A dissertation submitted to the  
SWISS FEDERAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY ZUERICH

for the degree of  
DOCTOR OF NATURAL SCIENCES

presented by  
JOHANNES HENRICUS JOSEPHUS LEVEAU  
Ir. Wageningen Agricultural University  
born August 12, 1969  
Citizen of The Netherlands

accepted on the recommendation of  
Prof. Dr. Alexander J. B. Zehnder, examiner  
PD Dr. Michael Schlömann, co-examiner  
Dr. Jan Roelof van der Meer, co-examiner

Zürich, 1998

## SUMMARY

The genetics and biochemistry of chloroaromatic degradation were studied in two bacterial strains: one, *Ralstonia eutropha* JMP134 (pJP4) which can grow at the expense of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D), the other *Pseudomonas* sp. strain P51 which is able to use di- and trichlorobenzenes. In both strains, the chloroaromatic substrate is channeled into a chlorocatechol degradative pathway, and the genes that code for this pathway in the two strains, i.e. *tfdCDEF* and *tcbCDEF*, respectively, are very similar. The regulatory specificities of these chlorocatechol degradative pathways were studied here.

The TcbR transcriptional activator protein, which is encoded by the *tcbR* gene on plasmid pP51 of *Pseudomonas* sp. strain P51 was purified from overproducing *Escherichia coli* cells and subsequently used in gel mobility shift assays and DNase I footprinting experiments to determine its interactions with the divergent promoter sequences of the *tcbR* gene and the *tcbCDEF* operon. The direct binding site of TcbR is located between positions -85 to -40 relative to the *tcbCDEF* transcriptional start site and contains a LysR-type recognition sequence motif (T-N<sub>11</sub>-A). The footprinting experiments revealed that TcbR protected an area on both strands of the intercistronic region which was actually larger than this binding site (from positions -74 to -24), suggesting additional contact sites (which are not necessary for binding) of TcbR in the -40 to -24 region. The stretch of protected DNA was interrupted by a series of DNase I hypersensitive nucleotides (positions -52 to -37) suggesting that TcbR induces a bend in the DNA at this site. On the basis of these findings, a 'binding-bending-bonding' model of the TcbR interaction was proposed.

Two regulatory genes were tested for their role in the regulation of *tfdCDEF* gene expression. The *tfdT* gene is located upstream of and transcribed divergently from *tfdCDEF* on plasmid pJP4 of strain JMP134. On the basis of its predicted amino acid sequence, the TfdT protein could be classified as a LysR-type transcriptional regulator, just like TcbR. The TfdT protein failed however to activate the expression of its presumed

target operon, *tfdCDEF*. This failure could be attributed to the inability of TfdT to bind the *tfdC* promoter region. It was postulated that the insertion sequence ISJP4 directly downstream of *tfdT* disrupted the *tfdT* open reading frame, leading to premature termination and the production of a truncated, dysfunctional TfdT protein. As an alternative to the inactivated TfdT, it was proposed that the product of the *tfdR* gene (or its identical twin, *tfdS*), located elsewhere on plasmid pJP4, can successfully take over the regulation of *tfdCDEF* expression. The TfdR protein, which is closely related to TfdT and TcbR, was indeed capable of binding to the *tfdC* promoter region, and of activating *tfdCDEF* gene expression.

The expression dynamics of the entire catabolic pathway for 2,4-D of *R. eutropha* JMP134 (pJP4) were also studied. Of all 15 *tfd* genes of the 2,4-D pathway, individual mRNA levels were monitored during induction of the cells with 2,4-D. Cells were first grown in chemostat under fructose-limiting conditions, during which expression of all *tfd* genes was low. Upon exposure to 1 mM 2,4-D, there was an instantaneous increase in mRNA levels for *tfdA*, *tfdCDEF-B*, *tfdD<sub>II</sub>C<sub>II</sub>E<sub>II</sub>F<sub>II</sub>-B<sub>II</sub>*, and *tfdK*. During the following transient phase, several oscillations in levels of mRNA were observed. A first decline probably resulted from transient toxification by the accumulating pathway intermediate 2,4-dichlorophenol. The cells recovered from this toxicity, however, and eventually a new steady state on fructose plus 2,4-D was reached during which expression levels of *tfd* genes were stable. The expression of the regulatory genes *tfdR* and *tfdS* (and also *tfdT*) remained low throughout the entire adaptation phase and following new steady state. When 2,4-D was omitted from the feed again, mRNA levels instantly dropped to very low, uninduced values. These findings indicate that the expression of genes for 2,4-D utilization on pJP4 is tightly and concertedly regulated.

An additional adaptation to growth on 2,4-D by *R. eutropha* JMP134 was assigned to the TfdK protein which is coded for by plasmid pJP4. TfdK is a highly hydrophobic protein and shows resemblance to transporter proteins of the major facilitator superfamily. An interruption

of the *tfdK* gene on plasmid pJP4 decimated 2,4-D uptake rates, which implies a role for TfdK in the uptake. Uptake was an energy-dependent process, and followed saturation kinetics in the concentration range to 60  $\mu\text{M}$ . A mathematical model describing TfdK as an active transporter at low  $\mu\text{M}$  concentrations fitted the observed uptake data best.

The discovery of ISJP4 initiated a more detailed study of the element and its functionality. ISJP4 has the typical features of a bacterial insertion sequence, and occurs as a single, complete copy on plasmid pJP4. About 9 kb away from this copy, in the *tfdA-tfdS* intergenic region, a 71-bp duplication of the ISJP4 right-hand extremity was found. A second complete copy of ISJP4 exists on the chromosome of the *R. eutropha* JMP134 strain which was used routinely in the laboratory. This copy likely resulted from a recent simple transposition of the plasmid-borne ISJP4, since it was shown to be lacking from the chromosomes of *R. eutropha* JMP222 and JMP289, two previously pJP4-cured derivatives of JMP134. By comparing both complete copies and their flanking regions, it was established that element ISJP4 has a size of 915 bp and is bordered by 18-bp inverted repeats with one mismatch. Based on sequence similarity, ISJP4 could be classified into the IS5 group of the IS4 family of bacterial insertion sequences. It was shown that ISJP4 can act as a transposon: two complete ISJP4 copies or one complete copy plus the *tfdA-tfdS* intergenic remnant of ISJP4 mediated the transposition of intervening DNA. Possible roles of ISJP4 in the assembly of *tfd* genes on plasmid pJP4 and in the catabolic adaptation of *R. eutropha* JMP134 to 2,4-D were speculated on.

## ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wurden die Genetik und die Biochemie des Abbaus chlorierter aromatischer Verbindungen in den folgenden zwei Bakterienstämmen erforscht: in *Ralstonia eutropha* JMP134 (pJP4), einem Stamm, der mit 2,4-Dichlorophenoxyessigsäure (2,4-D) als Substrat wächst, sowie in *Pseudomonas* sp. Stamm P51, einem Stamm, der verschiedene Di- und Trichlorbenzole verwertet. In beiden Stämmen wird das chlorierte Substrat jeweils in den Abbauweg für Chlorcatechole geschleust. Die Gene, welche für die Abbauwege beider Bakterienstämme kodieren, *tfdCDEF* und *tcbCDEF*, ähneln einander sehr stark. Daher wurden Effektor-spezifitäten der regulatorischen Systeme beider Abbauwege eingehend untersucht.

Das Regulatorprotein TcbR ist ein Transkriptionsaktivator, der durch das *tcbR*-Gen auf dem pP51-Plasmid von *Pseudomonas* sp. Stamm p51 kodiert wird. Das Protein wurde aus *Escherichia coli*-Zellen aufgereinigt, in denen eine Überproduktion dieses Proteins erreicht wurde. Das gereinigte Protein wurde in Gel-mobility-shift-Experimenten und DnaseI-Footprinting-Versuchen eingesetzt, um spezifische Interaktionen des Regulatorproteins mit der DNA zu studieren. Die spezifische Bindungsstelle des TcbR-Proteins liegt zwischen den kodierenden Sequenzen des *tcbR*-Gens und des *tcbCDEF*-Operons. Die direkte Bindungsstelle von TcbR liegt zwischen den Positionen -85 und -40 (vom Transkriptionsstartpunkt des *tcbCDEF*-Operons aus gerechnet), und enthält eine Erkennungssequenz des LysR-Typs (T-N<sub>11</sub>-A). Die Footprinting-Experimente ergaben, dass das TcbR-Protein auf beiden DNA-Strängen einen Bereich von Nukleotiden abdeckte, der sich von Position -74 bis -24 erstreckte und somit länger als die eigentliche Bindungsstelle war. Dieses Ergebnis liess noch weitere Bindungsstellen oder zumindest Kontakte von TcbR in der -40-Region vermuten, die eventuell nicht essentiell für die endgültige DNA-Bindung sind. Da der geschützte DNA-Abschnitt jedoch durch einige Nukleotide im Bereich von Position -52 bis -37 unterbrochen war, wurde angenommen, dass das

TcbR-Protein an dieser Stelle einen Knick in der DNA induziert. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde ein sogenanntes 'binding-bending-bonding' Modell für die Interaktion von TcbR mit der DNA vorgeschlagen, das die Gesamtinteraktion als Abfolge nacheinander ablaufender Prozesse wie Andocken, Abknicken und Bindung umschreibt.

Im weiteren wurden zwei regulatorische Gene, *tfdT* und *tfdR*, hinsichtlich ihrer Funktion bei der Expression der *tfdCDEF*-Gene untersucht. Das *tfdT*-Gen befindet sich auf dem pJP4-Plasmid oberhalb (stromaufwärts) von den *tfdCDEF*-Genen. Die Transkription von *tfdT* findet in umgekehrter Leserichtung statt als die der *tfdCDEF*-Gene (divergente Transkription). Mithilfe der abgeleiteten Aminosäuresequenzen wurden das TfdT-Protein und das TcbR-Protein als Transkriptionsregulatoren des LysR-Typs klassifiziert. TfdT war jedoch überraschenderweise nicht in der Lage, die Expression der vermuteten Zielgene, *tfdCDEF*, zu aktivieren. Diese Tatsache wurde auf die Unfähigkeit des Regulatorproteins TfdT zurückgeführt, an die Promoterregion von *tfdC* zu binden. Es wurde postuliert, dass die Insertionssequenz ISJP4, die sich direkt unterhalb des *tfdT*-Gens befindet, dessen offenes Leseraster zerstört hat. Dies hätte einen vorzeitigen Transkriptionsstopp und letztendlich die Bildung eines verstümmelten, inaktiven TfdT-Proteins zur Folge. Als eine Alternative zu einem funktionslosen TfdT-Protein ist denkbar, dass das Produkt des sich an anderer Stelle auf dem pJP4-Plasmid befindenden *tfdR*-Gens (oder seiner identischen Kopie, des *tfdS*-Gens), die Regulation der *tfdCDEF*-Genexpression erfolgreich übernehmen kann. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass das TfdR-Protein, dessen Sequenz eng mit TfdT und TcbR verwandt ist, an die Promoterregion des *tfdC*-Gens bindet und dass es in der Lage ist, die Expression der *tfdCDEF*-Gene zu aktivieren.

In einem weiteren Teil dieser Arbeit wurden auf mRNA-Ebene die dynamischen Vorgänge bei der Expression des gesamten 2,4-D-Abbauwegs in *Ralstonia eutropha* JMP134 (pJP4) untersucht. Während Induktion der Zellen mit 2,4-D wurden die zeitabhängigen Veränderungen der mRNA-Konzentrationen aller 15 am 2,4-D-Abbau beteiligten Gene untersucht. Die

Zellen wurden zunächst in einem Chemostaten unter Fruktose-limitierten Bedingungen angezogen, so dass die Induktion aller *tfd*-Gene äusserst gering gehalten wurde. Nach Zugabe von 1 mM 2,4-D wurde ein sofortiger Anstieg in den mRNA-Niveaus der Gene *tfdA*, *tfdCDEF-B*, *tfdD<sub>II</sub>C<sub>II</sub>E<sub>II</sub>F<sub>II</sub>-B<sub>II</sub>* und *tfdK* beobachtet. Während der darauffolgenden Phase wurden mehrere Konzentrationsschwankungen für einzelne mRNA-Spezies beobachtet. Eine erste Abnahme aller mRNA könnte auf eine vorübergehende Vergiftung der Zellen durch 2,4-Dichlorphenol zurückzuführen sein, welches sich als Zwischenprodukt des Abbaus von 2,4-D kurzfristig anhäufte. Als sich die Zellen jedoch wieder erholten, führte vermutlich die Einstellung eines neuen Gleichgewichts aus Fruktose und 2,4-D zu einer konstanten Expressionsrate der *tfd*-Gene. Die Expression der Gene *tfdR* und *tfdS* sowie *tfdT* blieb während der gesamten Adaptationsphase und der folgenden, neuen Gleichgewichtsphase konstant. Enthielt die zugeführte Nährlösung ab einem bestimmten Zeitpunkt kein 2,4-D mehr, fielen die Niveaus der verschiedenen mRNA-Spezies sofort auf Werte im Bereich des nichtinduzierten Zustands. Diese Ergebnisse zeigten deutlich, dass die Expression der für den 2,4-D-Abbau benötigten Gene auf dem pJP4-Plasmid gemeinsam und sehr straff reguliert wird.

Die Existenz von TfdK, kodiert auf dem pJP4-Plasmid, wurde als weitere Anpassung an das Wachstum auf 2,4-D durch *R. eutropha* JMP134 interpretiert. Es handelt sich bei TfdK um ein sehr hydrophobes Protein, das mit Transportproteinen der Familie der 'major facilitators' Ähnlichkeit zeigt. Da ein herbeigeführtes Auseinanderreißen des *tfdK*-Gens auf dem pJP4-Plasmid die Aufnahmeraten für 2,4-D in die Zellen drastisch reduzierte, wird eine Beteiligung von TfdK an der 2,4-D-Aufnahme in die Zellen angenommen. Die Aufnahme erwies sich als energieabhängig und folgte bis zu Konzentrationen von 60  $\mu$ M einer Sättigungskinetik. Mithilfe eines mathematischen Modells, das TfdK bei Konzentrationen im Mikromolar-Bereich als einen aktiven Transporter ansieht, liessen sich die Kurven aus den gemessenen Aufnahmeraten optimal beschreiben.



Das auf dem pJP4-Plasmid entdeckte Insertionselement ISJP4 wurde in dieser Arbeit eingehend untersucht. ISJP4 hat die typischen Eigenschaften einer vollständigen bakteriellen Insertionssequenz und existiert als eine einzige Kopie auf dem Plasmid. Ungefähr 9 kb von dieser Kopie entfernt, in der Region zwischen dem *tfdA*- und dem *tfdS*-Gen, wurde eine 71-bp lange Verdoppelung der rechten Flanke des ISJP4-Elements gefunden. Eine zweite, ebenfalls vollständige Kopie des IS-Elements ISJP4 befindet sich auf dem Chromosom von *R. eutropha* JMP134. Die Kopie auf dem Chromosom entstand vermutlich erst kürzlich durch einfache Transposition des IS-Elements auf dem pJP4-Plasmid, da die durch künstliche Plasmid-Entfernung entstandenen Stämme JMP222 und JMP289, beide Abkömmlinge des Stammes JMP134, noch keine ISJP4-Kopie in ihrem Chromosom trugen. Durch Vergleich der beiden vollständigen IS-Elemente und ihrer flankierenden Sequenzen wurde bestätigt, dass das ISJP4-Element eine Grösse von 915 bp besitzt und durch 18 bp lange IR-Elemente seitlich begrenzt wird. Aufgrund von Sequenzübereinstimmungen wurde das ISJP4-Element in die IS5-Gruppe der IS4-Familie bakterieller Insertionselemente eingeordnet. ISJP4 kann als ein Transposon agieren, indem es zwei komplette IS-Elemente oder eine vollständige Kopie zusammen mit dem 71-bp langen ISJP4-Bruchstück von ISJP4 die dazwischenliegende DNA transloziert. Eine mögliche Beteiligung des ISJP4-Elements beim Zusammenführen der *tfd*-Gene zu einem funktionstüchtigen Abbauweg auf dem pJP4-Plasmid wurde in der vorliegenden Arbeit eingehend diskutiert, ebenso wie der Zusammenhang zwischen ISJP4 und einer möglichen Adaptation von *R. eutropha* JMP134 an 2,4-D.