
**PATHWAYS METABOLICI MULTIPLI
PER LA DEGRADAZIONE DI COMPOSTI
AROMATICI: UNO STUDIO DI UPPER E
LOWER PATHWAYS IN *PSEUDOMONAS
STUTZERI OX1***

Paola Capasso

Dottorato in Scienze Biotechologiche – XVIII ciclo
Indirizzo Biotecnologie Industriali
Università di Napoli Federico II





**PATHWAYS METABOLICI MULTIPLI
PER LA DEGRADAZIONE DI COMPOSTI
AROMATICI: UNO STUDIO DI UPPER E
LOWER PATHWAYS IN *PSEUDOMONAS
STUTZERI OX1***

Paola Capasso

Dottoranda: Paola Capasso
Relatore: Prof. Alberto Di Donato
Coordinatore: Prof. Gennaro Marino

*Ai miei genitori
e a mia sorella Micaela*

INDICE

RIASSUNTO	pag.	8
SUMMARY	pag.	9
INTRODUZIONE		
Le trasformazioni microbiche per le biotecnologie: dalle biodegradazioni alle biotrasformazioni	pag.	15
I <i>pathways</i> di degradazione microbici	pag.	16
L'ingegneria metabolica per il biorisanamento	pag.	18
<i>Pseudomonas stutzeri</i> OX1: TOU e TOL <i>pathway</i>	pag.	20
Le monoossigenasi batteriche multicomponente (BMMs)	pag.	21
L' <i>upper pathway</i> di <i>P.stutzeri</i> OX1: gli enzimi ToMO e PH	pag.	23
Studio di attività monoossigenasiche e loro potenziali applicazioni	pag.	26
Il <i>lower pathway</i> di <i>P. stutzeri</i> OX1: gli enzimi HMSD e HMSH	pag.	27
Scopo del lavoro di tesi	pag.	30
MATERIALI E METODI	pag.	31
RISULTATI SPERIMENTALI E DISCUSSIONE		
I PARTE		
Studio degli <i>upper pathways</i> di <i>Pseudomonas stutzeri</i> OX1	pag.	46
Metabolismo del benzene	pag.	50
Metabolismo del toluene	pag.	54
Metabolismo dell' <i>o</i> -xilene	pag.	59
Ingegneria metabolica dell' <i>upper pathway</i> di <i>P. stutzeri</i> OX1	pag.	66
II PARTE		
Studio degli <i>upper pathways</i> da <i>Pseudomonas stutzeri</i> OX1 e <i>Pseudomonas PAW1</i> nel metabolismo dell' <i>o</i> - e del <i>p</i> -xilene	pag.	75
III PARTE		
Studio del <i>lower pathway</i> di <i>Pseudomonas sturzeri</i> OX1	pag.	80
CONCLUSIONI	pag.	90
BIBLIOGRAFIA	pag.	93

RIASSUNTO

Pseudomonas stutzeri OX1 utilizza come unica fonte di carbonio e di energia l'*o*-xilene, il toluene, i cresoli ed alcuni dimetilfenoli (DMP). Pertanto il microorganismo potrebbe essere efficacemente utilizzato per interventi di biorisanamento di aree inquinate da composti di natura aromatica. Lo stadio iniziale dell'ossidazione di molecole aromatiche è operato dalla Toluene/*o*-xilene Monoossigenasi (ToMO), e dalla Fenolo ossidrilasi (PH), che costituiscono l'*upper pathway* della via degradativa. Le molecole prodotte sono poi convertite dagli enzimi del *lower pathway* in intermedi del ciclo di Krebs. Sia ToMO che PH agiscono su un range simile di substrati e pertanto la loro funzione appare ridondante. I primi enzimi del *lower pathway* del batterio sono la catecolo 2,3 diossigenasi (C2,3O), enzima responsabile del taglio idrolitico dell'anello aromatico, la semialdeide 2-idrossimuconica deidrogenasi (HMSD) e la semialdeide 2-idrossimuconica idrolasi (HMSH). E' ancora da ricordare che in *P. stutzeri* OX1 è presente un differente *upper pathway*, il TOL *upper pathway*, responsabile dei primi passaggi di ossidazione di composti quali il *m*- ed il *p*-xilene. Il primo enzima di tale *pathway* è la xilene monoossigenasi (XMO). La contemporanea espressione di XMO e di ToMO sembra tuttavia essere letale per il microorganismo. L'obiettivo principale del presente progetto di tesi di dottorato è stata la comprensione delle proprietà di alcuni enzimi dei *pathway* catabolici di *P. stutzeri* OX1. Tale progetto si è articolato in diversi punti.

In primo luogo è stato condotto uno studio cinetico degli enzimi ToMO e PH per comprendere le ragioni metaboliche della loro apparente ridondanza di funzioni. L'analisi dei parametri cinetici ha evidenziato che ToMO è più efficiente nel primo passaggio di ossidrilazione, mentre PH è più efficiente nel secondo. Inoltre i due enzimi mostrano una regioselettività diversa in entrambi gli stadi di ossidrilazione. I dati raccolti portano alla conclusione che le attività degli enzimi ToMO e PH non sono ridondanti ma complementari. L'efficienza catalitica dei due enzimi e le loro proprietà di regioselettività sembrano aver consentito l'ampliamento delle capacità metaboliche di *Pseudomonas stutzeri* OX1. Inoltre, sulla base dei risultati della caratterizzazione cinetica sono stati realizzati e caratterizzati mutanti dell'enzima ToMO con alterata regioselettività. In particolare è stato osservato che l'accoppiamento del mutante ToMO-E103G con l'enzima PH incrementa l'efficienza dell'*upper pathway* portando alla formazione preferenziale di prodotti che possono entrare nel *lower pathway*.

In questo lavoro di tesi è inoltre riportato uno studio preliminare del primo enzima dell'*upper TOL pathway*, XMO, per investigare se alla base della letalità associata alla contemporanea espressione dei due *pathway* (TOU e TOL) vi fosse qualche fenomeno di interferenza tra i due enzimi che iniziano le vie metaboliche, ToMO e XMO. I dati indicano che la contemporanea azione dei due enzimi porta a una perdita di efficienza metabolica, ma non permettono di avere indicazioni sulla eventuale dannosità dovuta all'accumulo di intermedi non ulteriormente metabolizzabili.

I dati presentati nella terza parte della tesi sono relativi allo studio di due enzimi del *lower pathway*, HMSD e HMSH, ed al loro utilizzo nella conversione dei prodotti generati da forme mutate dell'enzima C2,3O. I dati indicano che i primi enzimi del *pathway*, nel nostro caso ToMO e PH, presentano bassa specificità di substrato e quindi tendono ad ossidrilare un gran numero di composti aromatici. Al contrario gli enzimi successivi, come HMSD e HMSH, divengono progressivamente più specifici consentendo l'introduzione di poche molecole in *pathway* metabolici centrali. Alterare la specificità di substrato di un enzima localizzato in punti chiave del *pathway* (come è la C2,3O) implica che le caratteristiche degli enzimi che seguono devono necessariamente accordarsi con le nuove proprietà cataboliche acquisite.

SUMMARY

The investigation of bacterial strains able to degrade aromatic compounds, like benzene, toluene, ethylbenzene, xylenes (BTEX) is the starting point for the development of new strategies for environmental bioremediation.

The identification of the molecular details of the catabolic pathways prospects the possibility that either microorganisms or enzymes involved in degradative steps, could be profitably used in bioconversion processes for the production of intermediates at high added value, and also of great pharmaceutical interest.

The understanding of microbic degradation pathways represents an essential requirement for the use of specific enzymes or bacterial strains in environmental bioremediation or biocatalysis procedures.

Approximately 100 different species of bacteria that can metabolize aliphatic and aromatic hydrocarbons have been identified.

Bacteria belonging to genus *Pseudomonas* are known to be the most versatile in metabolizing aromatic substrates.

In this bacteria, the aerobic catabolic pathway for aromatic hydrocarbon degradation can be schematically divided into two major biochemical steps

The first step of the reaction, defined upper pathway, produces dihydroxylated aromatic intermediates by the action of monooxygenases, and the second step, the lower pathway, processes these intermediates down to molecules that enter the citric acid cycle.

The genes coding for upper and lower pathways may be clustered in one, two or more operons, independently but co-ordinately regulated.

Recently, a *Pseudomonas* strain, known as *Pseudomonas stutzeri* OX1 has been isolated.

Pseudomonas stutzeri OX1 is able to grow on a large spectrum of aromatic compounds, particularly recalcitrant to degradation, like *o*-xylene, phenol, toluene, cresols and dimethylphenols.

In *P. stutzeri* OX1 the first step of the degradation of aromatic compounds is the hydroxylation of the aromatic ring, catalyzed by multicomponent monooxygenases. This particular metabolic upper pathway is known as TOU upper pathway (toluene/*o*-xylene utilization). Hydroxylation is carried out by two distinct bacterial multicomponent monooxygenases, toluene *o*-xylene monooxygenase (ToMO) and phenol hydroxylase (PH).

Both ToMO and PH complexes are oligomeric proteins whose subunits transfer electrons from NADH to oxygen, which is eventually incorporated into the aromatic substrate.

ToMO and PH are able to catalyze the oxidation of the aromatic substrates into the corresponding methyl- and dimethyl-catechols, to be degraded subsequently by the lower pathway enzymes.

ToMO and PH complexes oxidize aromatic compounds in two subsequent hydroxylation steps, with a similar range of substrates. Therefore, it would appear that two apparently similar functions are present in the same microorganism.

Moreover, whereas both ToMO and PH are able to convert the xylene isomers into the respective dimethylcatechols (DMC), only the *ortho* isomer can productively used as growth substrate by *P. stutzeri* OX1.

This depends on the fact that dimethylcatechols produced by ToMO and PH from *m*- and *p*-xylene are not recognized by the following enzymes of the pathway. Consequently *m*- and *p*-xylene cannot be degraded through the TOU upper pathway.

However, *m*-xylene and *p*-xylene can be metabolized by the progressive oxidation of a methyl group, through a different pathway called TOL pathway.

XMO is the first enzyme in the upper TOL pathway. XMO consists of two polypeptide subunits, encoded by *xylM* and *xylA*. XylA, the NADH acceptor reductase component, is an electron transport protein transferring reducing equivalents from NADH to XylM. XylM, the hydroxylase component, is located in the membrane.

In *P. stutzeri* OX1 genome both operons *tou* and *tol* are present, even if they are mutually inactivated, according to the xylene isomer available as growth substrate. Simultaneous expression of the *tou* and *tol* upper operon seems to be harmful for the microorganism. It has been hypothesized that accumulation of partially hydroxylated compounds, generated by ToMO and PH, starting from *m*- and *p*-xylene might be lethal for the microorganism.

The first enzyme of the lower pathway is catechol 2,3-dioxygenase (C2,3O), which catalyzes the cleavage of the aromatic ring.

Subsequently, two different reactions take place, which depend on the nature of the ring-fission product: one catalyzed by 2-hydroxymuconic semialdehyde dehydrogenase (HMSD), the other one catalyzed by 2-hydroxymuconic semialdehyde hydrolase (HMSH).

HMSD is a NAD⁺ dependent dehydrogenase able to catalyze the oxidation of the aldehydic group in the substrate; HMSH appears to be an enzymes of α/β hydrolase-fold family able to catalyze a non common reaction, the hydrolysis of carbon- carbon bond.

The main scope of the present investigation has been the analysis and the comprehension of the catabolic properties of the enzymes, responsible for the peculiar degradative capabilities in *P. stutzeri* OX1.

The project has followed the following research lines:

1. Kinetic analysis of the upper TOU pathway enzymes ToMO and PH, in order to shed light on their apparent redundancy.
2. Characterization of ToMO mutants, in order to verify any possible improvement of pathway metabolic potential.
3. Analysis of properties of XMO, the first enzyme of the TOL upper pathway, for understanding the reasons of the incompatibility between TOU upper pathway and TOL upper pathway in *P. stutzeri* OX1.
4. Analysis of the lower pathway enzymes, HMSD e HMSH, in order to better understand the metabolic degradative pathway of aromatic molecules.

As for the first point, it has been carried out a kinetic characterization of ToMO and PH, by using *E. coli* cells expressing ToMO and PH complexes.

ToMO and PH metabolic role has been investigated with particular reference to the metabolism of common aromatic pollutants, like benzene, toluene and *o*-xylene, and in particular, by determining the kinetic parameters of the two enzymes for each aromatic compound and for their relevant oxidrilated derivates.

The analysis of the kinetic parameters related to benzene and to phenol has demonstrated that ToMO is more efficient in the first hydroxylation step, whereas PH is more efficient in the second hydroxylation step.

The investigation of the oxidation kinetic of benzene, carried out by mixtures of *E. coli* cells expressing ToMO and PH complexes, led to the conclusion that the two enzymes constitute a metabolic chain in which ToMO efficiently produces phenol, that subsequently is converted by PH into catecol.

Similar results have been obtained by using toluene as a substrate.

In fact, ToMO shows a higher catalytic efficiency in the conversion of toluene into cresols, whereas PH is more active in the conversion of cresols in methylcatechols (3-MC and 4-MC).

Moreover, in the first hydroxylation step, ToMO converts toluene mainly into *p*-cresol, which is efficiently used by PH in the second hydroxylation step.

As far as the *o*-xylene degradation is concerned, the data we have collected confirm that both the monooxygenases catalyze the hydroxylation steps, even if differently, in terms of efficiency and regioselectivity.

Also for this process, ToMO seems to be more efficient for catalyzing the first hydroxylation reaction, whereas PH performs better the second one.

In fact, ToMO specificity constant on *o*-xylene is higher than the PH one, whereas PH is more efficient than ToMO in the conversion of DMP, obtained from *o*-xylene hydroxylation (2,3-DMP and 3,4-DMP).

Both enzymes show different regioselectivity in the hydroxylation process.

In particular, in the *o*-xylene transformation, ToMO produces predominantly DMP (3,4-DMP), on which PH is mostly active.

In the second hydroxylation step, ToMO produce mainly 4,5-DMC from 3,4-DMP, whereas PH produces exclusively 3,4-DMC.

These results lead to the conclusion that ToMO action on *o*-xylene induces the predominant formation of 4,5-DMC, which is not a substrate for C2,3O, the following enzyme of the pathway.

Therefore, 4,5-DMC could be accumulated and could damage the microorganism.

Results obtained by using *E.coli* cells expressing ToMO and PH complexes, have confirmed that the sequential action of both enzymes on *o*-xylene leads to an efficient and exclusive production of dimethylcatechol, well recognized by the C2,3O.

Therefore, this analysis has shown that ToMO and PH activity is not redundant but complementary. Their catalytic efficiency and regioselectivity appear to expand the *Pseudomonas stutzeri* OX1 catabolic potential, capable to thus optimizing the degradation of benzene, toluene and *o*-xylene.

As for the second research line, a kinetic characterization of mutant forms of ToMO has been carried out, to verify any possible improvement of the total metabolic pathway potentialities.

The metabolic consequences, deriving from a possible coupling with PH, have been clarified.

ToMO H structure has been analyzed in order to determine the potential residues responsible for ToMO regioselectivity on methylated substrate like toluene and xylenes.

Manual docking of alcohol products, like phenol, cresols and dimethylphenols, has been carried out to determine the orientation that aromatic compounds assume, after the hydroxylation reaction and therefore to determine the orientation of the correspondent substrates inside the active site.

When dimethylphenols, bearing a methyl group *ortho* to the hydroxylated group, are docked to this cavity, it can be seen that they can be accommodated in a putative sub-site between the methylene groups of the E103 side chain and the side chains of A107 and M180.

On the other hand a methyl group in *meta* can be accommodated in a sub-site between the methylene groups of E103 side chain and the side chain of F176.

Finally, a methyl group in *para* can be accommodated in a sub-site between the side chains of F205 and I100.

Thus, the docking analysis shows that the residue at position 103, has an important role for the orientation of methylated substrate in the active site.

To experimentally check whether changes into the *ortho* and *meta* sub-sites would affect the regioselectivity of the enzyme, we started changing residue E103 of ToMO A to glycine, leucine and methionine.

Three ToMO variants, (E103G)-ToMO, (E103M)-ToMO, and (E103L)-ToMO were produced by site directed mutagenesis.

E103G, E103M, and E103L mutations do not significantly change the efficiency of the enzyme in the first hydroxylation step, with k_{cat} values on benzene, toluene and *o*-xylene very similar to those measured for *wild type* ToMO.

Apparent kinetic constants on cresols were measured only for mutant E103G and they were found to be identical to those measured for wild type ToMO.

Although the mutations to the ToMO A subunit do not significantly influence the apparent catalytic parameters, they cause major alterations in ToMO regioselectivity, and in particular, E103G mutation causes the greatest changes with respect to wild type ToMO. Mutation E103G increases the frequency of hydroxylation at positions *para* to methyl groups, reducing the percentages of *o*- and *m*-cresol. The percentage of *p*-cresol obtained from toluene is about doubled, whereas the percentage of 3,4-DMP increases up to 99%.

It should be noted that mutation E103G removes the two methyl groups that constitute a large part of the *ortho* and *meta* sub-sites and consequently it reduces their ability to hold the methyl group.

Also mutation E103L causes a similar, more limited, increase in the frequency of *para* hydroxylation of toluene and *o*-xylene.

The side chain of the leucine residue at position 103, probably depending on the ramification on carbon γ , is able to fill, at least partially, the sub-sites for *ortho* and *meta* position, and therefore it produces the same effect than mutation E103G, even if through a different mechanism.

Finally, mutation E103M causes the inversion of the percentages of *o*- and *p*-cresol produced from toluene, but no change in the distribution of dimethylphenols produced from *o*-xylene. The unbranched side chain of methionine residue at position 103 can assume a conformation similar to the E103's one, inducing consequently only limited variations to regioselectivity.

In conclusion, the change in regioselectivity in *o*-xylene transformations by the E103L and E103G mutants are metabolically relevant because they lead to an increase in 3,4-DMP production, which is efficiently transformed by PH in the second step of reaction into 3,4-DMC, the only dimethylcatechol which can be further transformed by C2,3O.

To verify the effect of regioselectivity changes in ToMO mutants on the upper pathway efficiency, the formation rate of 3,4-dimethylcatechol from *o*-xylene has been measured using a fixed concentration of *E. coli* cells expressing PH and variable concentrations of *E. coli* cells expressing wild type ToMO or the (E103G)-ToMO mutant, this one being the mutation mostly able to increase the formation of 3,4-DMP, the best PH substrate.

The combined use of mutant (E103G)-ToMO and PH led to obtain a formation rate of 3,4-DMC higher than the formation rate obtained using wild type ToMO.

Larger differences in the reaction rates measured using (E103G)-ToMO and ToMO were obtained at low (E103G)-ToMO concentrations. This difference decreased as ToMO concentration increased likely because, at higher ToMO concentrations, the concentration of PH becomes the rate limiting factor.

Therefore, experimental data support the thesis that the efficiency of the metabolic pathway can be controlled not only through mutations increasing catalytic efficiency of the enzymes involved, but also through tuning their substrate specificity and their regioselectivity.

These considerations can be crucial for the development of future metabolic engineering strategies.

As for the third research line, a first approach to understand the reasons of the incompatibility between TOU upper pathway and TOL upper pathway in *P. stutzeri* OX1 has been carried out.

Gene cloning, expression and a partial functional characterization of the first TOL pathway enzyme (XMO) have been carried out. Combined assays of XMO and ToMO, by using cells expressing the two complexes incubated in presence of *o*- and *p*-xylene, have demonstrated that the two enzymes are independent: the action of each enzyme is not influenced by the presence of the other.

Moreover, experimental results indicate that ToMO, even if acting preferentially on *o*-xylene, recognize also *p*-xylene, converting it into 2,5 DMP, a molecule that is transformed by PH into 3,6 DMC in the second hydroxylation step. This DMC is not further metabolised, because it is not recognized by C2,3O.

This preliminary analysis represents the starting point for projecting and for realizing modified upper pathway through protein engineering techniques, in order to realize biodegradation of xylene mixtures.

The last experimental research line has concerned a preliminary study of two enzymes of the lower pathway of *Pseudomonas stutzeri* OX1: the 2-hydroxymuconic semialdehyde dehydrogenase (HMSD) and the 2-hydroxymuconic semialdehyde hydrolase (HMSH).

The genes coding for HMSD and HMSH have been completely sequenced.

The amino acidic sequences obtained by the translation of HMSD and HMSH gene have shown an high percentage of identity to different hydrolases and dehydrogenases involved in the metabolism of aromatic hydrocarbons.

HMSD and HMSH have been expressed in a recombinant system and purified through two chromatographic steps. In both cases an anionic exchange chromatography, followed by an exclusion molecular chromatography has been performed.

Enzymes identity has been verified by the determination of the N-terminal sequences.

Functional characterization of HMSD and HMSH has been carried out, by determining their kinetic parameters of catechol, 3-MC and 4-MC ring fission products. Kinetic constants result to be very similar to the ones reported for dehydrogenases and hydrolases of homologous metabolic pathways.

In fact, **HMSD** was found to have high affinity ($K_M = 1,6 \mu\text{M}$) for 2-hydroxymuconic semialdehyde (catechol ring fission product), and for 2-hydroxy-5-methyl-hexa-2,4-diene-1,6-dienoate (4-methyl-catechol ring fission product) whereas the 3-methyl-catechol ring fission product is not recognized by HMSD as substrate, this one not including an aldehydic group.

On the contrary **HMSH** exhibited low affinity for these compounds ($K_M = 250 \mu\text{M}$) and moderate affinity for 2-hydroxy-6-oxohepta-hexa-2,4-dienoate (3-methyl-catechol ring fission product) ($K_M = 16,5 \mu\text{M}$).

Availability of recombinant HMSD and HMSH was used to investigate the possible expansion of the catabolic potential of *P.stutzeri* OX1.

In the laboratory where present project has been developed, C2,3O mutants have been realized, able to hydrolyze non natural substrates, like 3,5- and 3,6-DMC, produced by the action of ToMO and PH on *m*- and on *p*-xylene. The interest in such molecules comes from the fact that they would be intermediates of a metabolic degradative pathway for microorganisms able to grow on *m*- and *p*-xylene.

To verify if these compounds, after the hydrolytic cleavage operated by C2,3O, could be subsequently degraded by the following enzymes of the pathway, the activity of HMSD and HMSH on the 3,5- and 3,6-DMC fission products has been tested.

The results obtained show that the two compounds are not recognized neither by the dehydrogenase nor by hydrolase. This is a clear indication that not only the kinetic and regioselectivity properties of ToMO, PH and C2,3O have been evolutionarily optimized in *P.stutzeri*, but, accordingly, also the properties of other enzymes of the pathway were optimized too.

In conclusion, these experiments represent only the starting point for generating optimized recombinant lower pathways modified by using protein engineering techniques. Our experiments suggest that this goal is feasible, but difficult to reach. It will be necessary, in fact, to predict changes of the properties of many enzymes of the pathway, like HMSD and HMSH for example, in order to match their specificity properties and catalytic efficiency with that of mutant forms of C2,3O.

INTRODUZIONE

- **Le trasformazioni microbiche per le biotecnologie: dalle biodegradazioni alle biotrasformazioni**

Nel corso dell'evoluzione i batteri hanno sviluppato grandi proprietà di adattamento alle diverse condizioni ambientali riuscendo a sfruttare come fonte di carbonio e di energia un numero vasto ed eterogeneo di composti chimici [1].

In tempi relativamente recenti sono stati isolati particolari ceppi batterici e comunità microbiche in grado di utilizzare come unica fonte di carbonio e di energia idrocarburi alifatici e aromatici, convertendoli in intermedi del loro metabolismo centrale [2, 3].

I microorganismi individuati, il cui numero è in continuo aumento, hanno da subito suscitato grande interesse nella comunità scientifica per le possibili applicazioni in diversi ambiti delle biotecnologie, quali il biorisanamento ambientale [1, 4] e le bioconversioni [5, 6].

Le ragioni di tale interesse risiedono soprattutto nell'ampio intervallo di substrati di crescita utilizzati dai microorganismi che include composti tossici e difficili da degradare quali benzene, toluene, etilbenzene, xileni (BTEX), fenoli variamente sostituiti, ma anche composti aromatici policiclici (PAHs) e composti organici clorurati [2, 7, 8].

Diversi studi hanno definito i danni che quelle sostanze causano nei soggetti ad esse esposti ed i meccanismi con cui agiscono. I risultati di questi studi sono alla base delle normative che stabiliscono i livelli ambientali ammissibili per ciascuna sostanza. In particolare il benzene, il toluene e il *p*-xilene sono state individuate dall'Environment Canada come sostanze pericolose per l'ambiente e che possono creare danni alla salute umana [9].

Inoltre diversi PAHs sono stati indicati dalla U.S. Environmental Protection Agency (EPA) come inquinanti ad elevata priorità a causa della loro tossicità [10].

Molte di queste sostanze, tra cui in primo luogo il benzene, sono ormai da tempo ritenute pericolosi carcinogeni [11].

La scoperta di organismi capaci di degradare tali composti chimici, spesso recalcitranti alla degradazione, ha pertanto rappresentato il punto di partenza per lo sviluppo di nuove strategie di risanamento ambientale.

L'insieme dei processi che utilizza microorganismi per degradare o rimuovere componenti inquinanti dall'ambiente viene solitamente indicato con il termine "*bioremediation*" [12, 13].

Con gli sviluppi delle biotecnologie, la *bioremediation* è divenuto uno dei campi in più rapido sviluppo nell'ambito del recupero ambientale, utilizzando microorganismi per ridurre la concentrazione e la tossicità di vari inquinanti chimici [14, 15].

Le procedure di *bioremediation* o biorisanamento, rispetto ai tradizionali metodi di decontaminazione chimica, hanno un impatto positivo sull'ambiente, oltre ad essere caratterizzate da bassi consumi energetici e costi contenuti [16].

In generale tali procedure prevedono la stimolazione di popolazioni microbiche indigene mediante aggiunta di nutrienti e accettori di elettroni (*biostimulation*), oppure l'introduzione di popolazione microbiche esogene in grado di degradare i composti inquinanti (*bioaugmentation*) [17, 18]. Entrambe le tecniche sono state impiegate con successo nella decontaminazione di siti inquinati e pertanto offrono interessanti prospettive future.

D'altro canto la definizione dei processi catabolici di queste molecole ha evidenziato che i microorganismi, e gli enzimi coinvolti nelle singole tappe degradative, possono

essere strumenti proficuamente utilizzabili anche in un diverso ambito delle biotecnologie, ovvero quello delle bioconversioni.

Infatti è stato quasi da subito rilevato che il metabolismo parziale di un gran numero di composti organici comporta di frequente la formazione di intermedi ad alto valore aggiunto [5]. Infatti gli enzimi coinvolti in uno o più passaggi delle vie di degradazione batteriche mostrano solitamente attività anche su analoghi strutturali dei substrati naturali, portando talvolta alla formazione di composti derivati di grande interesse industriale [19, 20].

Pertanto l'abilità dei batteri di adattarsi per sfruttare nuovi composti chimici come substrati di crescita è un argomento di grande e crescente interesse non solo per le possibili applicazioni nell'ambito del biorisanamento ma anche in quello delle bioconversioni [21].

Ovviamente il fine ultimo delle tecniche di biorisanamento è quello di ottenere la totale degradazione del composto in esame, mentre nelle biotrasformazioni si impiegano le proprietà uniche dei microrganismi o di particolari enzimi catabolici per l'ottenimento di prodotti ad alto valore aggiunto.

Il numero di processi industriali per la sintesi di prodotti di chimica fine, che coinvolgono microrganismi o enzimi purificati, è in continuo aumento [22]. Le biocatalisi e le biotrasformazioni si avviano infatti a rappresentare il 30% dell'intera produzione dell'industria chimica mondiale a partire dall'anno 2050 [23].

E' importante sottolineare che i processi biocatalitici hanno in generale un impatto positivo sull'ambiente in quanto richiedono condizioni di reazione più blande rispetto ai processi chimici, riducono l'utilizzo di acidi e basi forti, potenzialmente pericolosi, richiedono generalmente basse concentrazioni di metalli, e non prevedono di solito l'utilizzo di solventi. Inoltre diminuiscono la formazione di prodotti indesiderati, riducono la domanda energetica e aumentano la sicurezza del processo [5].

Occorre infine ricordare che microrganismi, ed enzimi coinvolti nelle tappe degradative del metabolismo, possono portare anche allo sviluppo di biosensori per il rilevamento di comuni inquinanti ambientali. Un esempio è rappresentato dal ceppo geneticamente modificato *P. fluorescens* HK44 [24, 25]. Tale ceppo è in grado di rilevare la presenza di un contaminante ambientale mediante emissione di un segnale di bioluminescenza, e può essere pertanto fruttuosamente impiegato come strumento per il monitoraggio *in situ* di un processo di biorisanamento [25, 26].

E' evidente che l'effettiva applicazione di specifici enzimi o ceppi batterici sia per il biorisanamento di inquinanti ambientali che per la produzione di prodotti di chimica fine richiede come prerequisito essenziale la conoscenza della biochimica e della genetica dei *pathways* di degradazione microbici.

- **I *pathways* di degradazione microbici**

Sono conosciute più di 100 specie appartenenti a generi microbici differenti in grado di degradare idrocarburi [2]. Il numero più ampio e specializzato appartiene al genere *Pseudomonas* [27-29]. In misura inferiore posseggono analoghe capacità degradative i generi *Rhodococcus*, *Azotobacter*, *Rhizobium*, *Nitrosomonas*, *Nitrobacter* [30].

In particolare, con il termine *Pseudomonas* si è soliti indicare una collezione eterogenea di batteri non enterici Gram-negativi, che sono non fermentativi e mobili [31]. Alcuni ceppi di *Pseudomonas*, generalmente isolati da siti inquinati, sono capaci di metabolizzare o co-ossidare composti chimici altamente recalcitranti alla

degradazione, e pertanto mostrano un enorme potenziale d'applicazione nel risanamento ambientale e nelle biocatalisi [32].

Tali batteri mostrano un'estesa versatilità metabolica dovuta all'ampio spettro di substrati riconosciuti dagli enzimi catabolici. Questa bassa specificità di substrato permette ai microorganismi di degradare molecole strutturalmente correlate attraverso il medesimo *pathway* catabolico.

Sebbene questi microorganismi possiedono una varietà di enzimi per l'attacco iniziale dei substrati, i *pathway* catabolici generalmente convergono e i substrati confluiscono in un numero limitato di intermedi chiave, che sono successivamente metabolizzati da un unico *pathway* centrale. Ciò si traduce in una semplificazione dei circuiti di regolazione ed in una economicità dei processi metabolici [33].

Nei batteri il *pathway* catabolico che porta alla degradazione totale di composti aromatici può essere suddiviso in due stadi, denominati *upper* e *lower pathway* [34].

Le reazioni dell'*upper pathway* rappresentano lo stadio di attivazione dell'anello aromatico e consistono nell'aggiunta di due gruppi ossidrilici su due atomi di carbonio adiacenti [34, 35]. Tali aggiunte possono avvenire simultaneamente, se catalizzate da complessi diossigenasici come la toluene diossigenasi da *Pseudomonas putida* F1 [36], oppure in due tappe catalitiche successive se catalizzate da monoossigenasi, come la toluene *o*-xilene monoossigenasi e la fenolo ossidrilasi da *Pseudomonas stutzeri* OX1 [37, 38], e la toluene-2-monoossigenasi da *Pseudomonas cepacia* G4 [39].

I prodotti dell'*upper pathway* sono composti aromatici ossidrilati come protocatecuato e catecoli variamente sostituiti.

Nel *lower pathway* tali molecole aromatiche diossidrilate sono convertite in intermedi del ciclo degli acidi tricarbossilici (TCA), quest'ultimi facilmente metabolizzabili da qualsiasi tipo di organismo. I primi enzimi di tale *pathway* sono le catecolo diossigenasi (CDO) responsabili della reazione di apertura dell'anello aromatico, con modalità intradiolica o extradiolica a seconda del *pathway* metabolico.

I geni che codificano per gli enzimi dell'*upper* e del *lower pathway* possono essere contenuti in uno, due o più operoni regolati in modo indipendente ma coordinato [34]. Sono state inoltre individuate diverse proteine regolatrici della trascrizione sensibili alla presenza di composti aromatici.

Come si diceva nella parte iniziale di questa Introduzione i batteri si adeguano rapidamente ai cambiamenti ambientali e alle fonti energetiche momentaneamente disponibili. Questo adattamento è spesso ottenuto mediante il trasferimento di materiale genetico da un microrganismo all'altro. Infatti è noto che il trasferimento di materiale genico gioca un ruolo cruciale nell'evoluzione dei *pathway* di degradazione batterici [14, 40]. Dal momento che i geni che codificano per enzimi di molte vie cataboliche sono localizzati su plasmidi [41], il trasferimento plasmidico mediante coniugazione contribuisce alla diffusione dei geni catabolici spesso anche tra batteri appartenenti a generi diversi. Un grande contributo alla diffusione di tali proprietà metaboliche è dovuto anche ad elementi genici mobili quali trasposoni [42].

Gli eventi di ricombinazione portano alla creazione di mosaici di operoni catabolici che possono conferire al batterio in esame proprietà metaboliche completamente nuove, adatte al metabolismo di nuove molecole. La combinazione di differenti operoni *upper* e *lower* può aumentare non solo il numero di modi in cui una molecola può essere degradata ma anche lo spettro di substrati utilizzati per la crescita [43] e rappresenta un sistema per l'evoluzione di nuovi *pathways* catabolici [14, 44].

- **L'ingegneria metabolica per il biorisanamento**

A volte la persistenza di un inquinante nell'ambiente è conseguenza dell'inadeguato potenziale dei microrganismi che, a causa del relativamente breve tempo di esposizione al composto tossico, non sono stati in grado di evolvere e sviluppare rapidamente le opportune attività enzimatiche richieste per la degradazione dell'inquinante.

Un processo di "evoluzione accelerata" può essere realizzato producendo microrganismi ingegnerizzati geneticamente per aumentare la capacità e la velocità di smaltimento degli inquinanti. Vari approcci sono stati sviluppati per conferire loro le capacità biodegradative desiderate [45].

La progettazione e la realizzazione di microrganismi geneticamente ingegnerizzati per il recupero ambientale coinvolge differenti aspetti da ottimizzare, quali la creazione di nuove vie metaboliche e l'espansione del potenziale di azione di *pathways* esistenti, in modo tale da evitare l'ingresso del substrato in vie metaboliche non produttive o che potrebbero portare alla formazione di intermedi tossici [46, 47].

La razionale ottimizzazione della attività cataboliche conosciute e la creazione di nuove si basa sulla conoscenza dei *pathways* metabolici e delle relazioni biochimiche tra struttura e funzione degli enzimi che li compongono.

L'accesso e l'esplorazione di tali conoscenze è stato recentemente facilitato dalla realizzazione dell' "University of Minnesota Biocatalysis/Biodegradation Database" (<http://umbbd.ahc.umn.edu>) [48-50] e della " Biodegradative Strain Database" (<http://bsd.cme.msu.edu/bsd/index.html>) [51], che contengono informazioni su reazioni di biocatalisi microbiche e su *pathways* per la biodegradazione di composti naturali e xenobiotici. Le informazioni riguardanti le singole reazioni metaboliche possono essere combinate per la creazione di nuovi *network* di biodegradazioni [52].

Successivamente, una strategia adottata per incrementare le prestazioni di un microrganismo degradatore è quella di inserire nello stesso una nuova sequenza catabolica mediante utilizzo di appropriati vettori plasmidici o di vettori contenenti trasposoni [53]. Questi ultimi, in particolare, permettono l'introduzione di geni specifici nel cromosoma batterico [54, 55].

L'introduzione di frammenti di DNA utilizzando tali procedure ricorda i meccanismi di inserzione e delezione del DNA, precedentemente illustrati, che avvengono durante naturali processi di adattamento [56].

Tali meccanismi di ingegneria metabolica sono indispensabili laddove non esiste un *pathway* completo per la degradazione di un particolare substrato (p.e. PCB) in un singolo organismo.

Recentemente nel batterio degradatore *Pseudomonas putida* sono stati combinati i geni codificanti per enzimi provenienti da 5 differenti *pathways* catabolici di 3 distinti ceppi batterici per creare un *orto-patway* modificato. Il batterio ingegnerizzato è risultato essere in grado di degradare e crescere su una miscela di composti clorurati e metilati che erano invece tossici per il batterio d'origine [57].

Nella creazione di un microrganismo dotato di nuove capacità metaboliche non è richiesto alcun *marker* di selezione addizionale; è infatti il nuovo fenotipo acquisito, ovvero la capacità di crescere su un determinato composto, che lo rende facilmente isolabile.

In un altro studio è riportato che il ceppo ibrido *P.putida* TB105 è stato reso capace di mineralizzare miscele di benzene, toluene e *p*-xilene evitando l'accumulo di prodotti tossici, al seguito della combinazione razionale di *pathways* differenti [58].

Derivati di *Pseudomonas* spB13 hanno acquisito la capacità di utilizzare 4-cloro- e 3,5 dicloro-benzoato come conseguenza dell'introduzione di geni del plasmide TOL

da *Pseudomonas putida* mt2. L'utilizzazione di questi substrati, non osservata nel ceppo d'origine, è stata giustificata come combinazione delle attività dei due batteri in esame [59].

Studi recenti hanno dettato alcune linee guida per la realizzazione di ceppi microbici ingegnerizzati con aumentate proprietà cataboliche. In tali batteri la degradazione dei composti desiderati non deve risultare solo enzimaticamente possibile ma anche fisiologicamente favorita [60]. In altre parole non bisogna trascurare che per utilizzare un substrato come fonte di carbonio ed energia il batterio deve trarne in primo luogo un vantaggio metabolico.

Questo tipo di approccio non può però prescindere dalla valutazione dell'impatto antropico di specie batteriche ricombinanti, problematica del resto comune all'utilizzo degli OGM, gli organismi geneticamente modificati [61-63]. Pertanto per poter consentire l'impiego di batteri geneticamente modificati per fini di biorisanamento, si sta parallelamente procedendo a studiare e realizzare sistemi di "controllo", per associare a geni detossificanti opportuni geni di controllo del sistema. Si tratta in genere di *sistemi suicida*, basati sull'impiego di specifici geni *killer*, per evitare uno sviluppo batterico ed una proliferazione incontrollata nonché fenomeni di trasferimento genico orizzontale [64, 65].

Un sistema simile è stato recentemente sviluppato nel batterio *P. putida* EEZ30, ceppo degradatore che può essere applicato nel biorisanamento di alchilbenzoati [66].

Un approccio differente per incrementare le capacità cataboliche di un ceppo batterico è quello di impiegare tecniche di ingegneria proteica per aumentare la stabilità degli enzimi coinvolti nella degradazione o variarne la specificità di substrato e le proprietà cinetiche.

Ad esempio, è stata realizzata una forma mutata dell'enzima aloalcano dealogenasi da *Sphingomonas paucimobilis* UT26 in cui la sostituzione di alcuni amminoacidi nel sito catalitico ha consentito di osservare un aumento dell'attività catalitica rispetto all'enzima *wilde type* (*wt*) [67].

Un ulteriore esempio è rappresentato dalla realizzazione di alcune diossigenasi chimeriche costruite a partire da due bifenili diossigenasi, da *P. pseudoalcaligenes* KF707 e da *Burkholderia cepacia* LB400, enzimi simili strutturalmente ma funzionalmente differenti. La variante ottenuta combina i differenti spettri di substrati riconosciuti da entrambi gli enzimi [68, 69].

Esperimenti di mutagenesi sito-diretta eseguiti sull'enzima toluene-orto-monoossigenasi (TOM) da *Burkholderia cepacia* G4 hanno portato alla realizzazione della variante V106 della subunità α del centro ossidrilasico (variante TOM-Green), con aumentata attività sia nella degradazione del tricloroetilene sia nell'ossidazione del naftalene. La variante TOM-Green sintetizza 1-naftolo 6 volte più velocemente e degrada TCE 2 volte più velocemente rispetto all'enzima *wt* [70, 71].

Attualmente sono disponibili sistemi computazionali che, partendo dalle informazioni contenute nei *database* precedentemente indicati (UMBBDD), consentono la predizione delle attività enzimatiche che dovrebbero essere impiegate per ottenere la completa degradazione di uno specifico composto [72]. Tale analisi *in silico* costituisce uno strumento importante per la creazione in laboratorio del ceppo batterico avente le proprietà desiderate.

- ***Pseudomonas stutzeri* OX1: TOU e TOL pathways**

In tempi recenti è stato isolato da fanghi attivati di scarichi industriali un particolare ceppo di *Pseudomonas*, noto come *Pseudomonas stutzeri* OX1, in grado di utilizzare come unica fonte di carbonio e di energia l'*o*-xilene, il più recalcitrante alla degradazione tra gli isomeri dello xilene, il toluene, diversi cresoli ed alcuni dimetilfenoli [32]. Questo ceppo è un interessante sistema modello per lo studio del catabolismo degli idrocarburi aromatici vista la sua capacità di utilizzare un ampio spettro di queste molecole rispetto ad altri microrganismi simili.

In tale batterio, i geni per il catabolismo dei composti aromatici sono organizzati in due operoni, localizzati sul cromosoma, uno codificante per il complesso multienzimatico della toluene/*o*-xilene monoossigenasi (ToMO), ed un secondo organizzato come l'operone *dmp* per il catabolismo del fenolo del ceppo *Pseudomonas* CF600 [73, 74], in cui il complesso fenolo ossidrilasi (PH) è seguito dagli enzimi catecolo-2,3-diossigenasi (C2,3O), semialdeide 2-idrossimuconica deidrogenasi (HMSD) e semialdeide 2-idrossimuconica idrolasi (HMSH)[34].

Il cluster genico codificante per ToMO sembrerebbe essere stato acquisito e incorporato in una via catabolica del fenolo preesistente. Questa ipotesi è supportata dal contenuto di GC del cluster genico ToMO, che è approssimativamente del 50% rispetto al 60-66% di geni di specie pseudomonadali, dalla presenza di una cornice di lettura aperta putativamente codificante per una trasposasi, e dalla localizzazione di domini genici mobili a monte e a valle dei geni strutturali di ToMO [75].

L'acquisizione di un'attività enzimatica capace di convertire idrocarburi in composti fenolici inseritasi in una via metabolica preesistente può essere considerato un esempio di espansione verticale di un *pathway* metabolico. *Pseudomonas stutzeri* appare quindi un buon esempio di combinazione di attività cataboliche impiegabili per fini di detossificazione.

In *P. stutzeri* OX1 il primo passaggio del catabolismo di composti quali il toluene e l'*o*-xilene è rappresentato dall'ossidrilazione diretta dell'anello aromatico (TOU *pathway*, per toluene/*o*-xilene *utilization*) catalizzato dai due complessi monoossigenasici ToMO e PH. I catecoli che si ottengono al seguito della loro azione sono idrolizzati dall'enzima C2,3O e processati dai successivi enzimi del *lower pathway* del batterio in esame [34, 37, 38].

I due complessi multienzimatici sono potenzialmente in grado di catalizzare le medesime reazioni di ossidrilazione a carico dell'anello aromatico, con specificità simile, e pertanto la loro funzione appare essere ridondante [34].

Inoltre entrambe le monoossigenasi sono capaci di trasformare tutti gli isomeri dello xilene nei rispettivi dimetilcatecoli (DMC), ma solo l'isomero *orto* può essere produttivamente utilizzato dal microrganismo quale substrato di crescita. E' stato chiarito che questo dipende dal fatto che i DMC prodotti dall'azione di ToMO e PH su *m*- e *p*-xilene non sono riconosciuti dai successivi enzimi del *pathway*. Ne consegue che il *m*- ed il *p*-xilene non possono essere degradati attraverso il TOU *upper pathway* [75, 76].

D'altro canto questi due isomeri possono essere metabolizzati attraverso progressiva ossidazione del sostituente metilico dell'anello aromatico ad opera di un *pathway* differente denominato TOL *pathway* [76-78]. Il primo enzima del TOL *upper pathway* è la xilene monoossigenasi (XMO), enzima costituito da due subunità codificate dai geni *xylA* e *xylM*. *XylA* è la componente ossidrilasica del complesso ed è localizzata nella membrana plasmatica. Presenta un motivo strutturale di otto istidine all'interno del quale è alloggiato il *cluster* diferrico responsabile dell'attività catalitica [79]. *XylM*

è invece la componente reduttasica che media il trasferimento di elettroni dal NADH alla componente ossidrilasica XylA [80, 81].

Nel genoma di *P. stutzeri* OX1 sono presenti entrambi gli operoni *tou* e *tol* ma essi sono mutuamente inattivati a seconda dell'isomero dello xilene disponibile quale substrato di crescita [75].

L'inattivazione dei pathway è mediata in entrambi i casi da una sequenza di inserzione (IS) di 3Kb denominata ISPs1 [77].

L'espressione contemporanea dei due *upper pathway* catabolici sembra essere dannosa per il microorganismo a causa dell'accumulo di composti parzialmente ossidrilati generati dall'azione di ToMO e di PH a partire dal *m*- e dal *p*-xilene [75, 82].

- **Le monoossigenasi batteriche multicomponente (BMMs)**

Numerose ossigenasi sono state ritrovate in *pathway* metabolici batterici per la degradazione di idrocarburi aromatici. Tali enzimi catalizzano l'incorporazione di un gruppo ossidrilico nei substrati. Nel corso di tali reazioni due atomi di O₂ sono ridotti ad OH ed H₂O con concomitante ossidazione del NADH. Questi enzimi utilizzano metalli di transizione o il sistema flavina /pteridina per attivare l'ossigeno che nel suo stato nativo è non reattivo. Alcune ossigenasi utilizzano Fe(II) o Fe(III) non emico, mentre altre presentano gruppi emici. In alcuni casi sono utilizzati per legare l' O₂ anche altri metalli di transizione, quali il manganese, il rame ed il cobalto. Le ossigenasi che catalizzano l'incorporazione di un solo atomo di O₂ nel substrato sono indicate come monoossigenasi, o anche *ossigenasi a funzione mista* [83].

In particolare, le monoossigenasi multicomponente batteriche (BMMs) comprendono una famiglia di enzimi diferrici non emici capaci di ossidare un ampio range di idrocarburi e di composti aromatici. Tale famiglia di proteine può essere suddivisa in 6 sottoclassi differenti a seconda della composizione e della dimensione delle subunità [84].

La localizzazione dei geni che codificano tali proteine è cromosomica per il maggior numero di BMMs e plasmidica in almeno due casi (un plasmide circolare per PH da *Pseudomonas* CF600 e un plasmide lineare per l'eossidasi da *Nocardia corallina*).

Sebbene sia altamente probabile che tutte le BMMs utilizzino un meccanismo catalitico molto simile, la loro specificità di substrato varia considerevolmente e può essere dedotta dalla composizione delle subunità [84].

Per quanto concerne il meccanismo catalitico di tali monoossigenasi, tecniche spettroscopiche hanno consentito di identificare intermedi della reazione catalitica per sMMO da *Methylococcus capsulatus* [85].

La reazione di monoossigenazione avviene attraverso il legame dell'ossigeno molecolare al centro diferrico e la sua attivazione seguita dall'ossidrilazione del substrato. Il meccanismo di reazione proposto prevede che la forma ossidata della BMMO H (BMMO H_{ox}), con entrambi gli ioni Fe nello stato di ossidazione 3+, sia ridotta a BMMO H_{red}, con i due ioni nello stato di ossidazione 2+ (Figura1). Il centro dimetallico nella forma ridotta è in grado di legare l'ossigeno molecolare attivandolo, portando cioè alla formazione di una specie ad elevato potere ossidante denominata BMMO H_q (il centro dimetallico in questo intermedio è stato denominato "diamond core"). Quest'ultima è la specie che ossidrilata il substrato attraverso un meccanismo di tipo radicalico o la formazione di un intermedio epossido.

Generalmente in un ceppo batterico è presente una sola BMM, ma sono stati ritrovati casi (3 su 31) in cui il genoma codifica per più di una monoossigenasi. Nel genoma di *Ralstonia metallidurans* CH34 sono state trovate due BMM di gruppo 1 ed una di

gruppo 2 ; due BMM appartenenti ai gruppi 1 e 2 sono state invece riscontrate in *B. cepacia* JS150 [84, 86]. Recentemente è stata inoltre individuata una fenolo ossidrilasi in *Ralstonia pickettii* KO1 [87] in grado di catalizzare le medesime reazioni della Toluene *para*-monoossigenasi (TpMO) dallo stesso batterio [88, 89].

Anche nel genoma di *P. stutzeri* OX1, come è anticipato nel paragrafo precedente, sono state identificate due differenti monoossigenasi, una di gruppo 1 ovvero PH (Fenolo Ossidrilasi), e ToMO (Toluene *o*-xilene Monoossigenasi), una BMM di gruppo 2.

L'associazione tra BMMs di gruppo 1 e 2 potrebbe essere favorita a causa della loro differente specificità: mentre le BMMs di gruppo 1 sono prevalentemente fenolo ossidrilasi, le BMMs di gruppo 2 sono toluene–benzene monoossigenasi [84]. La presenza di *upper pathway* multipli sembra conferire al batterio nuove proprietà cataboliche, consentendogli di ossidrilare un ampio intervallo di composti aromatici.

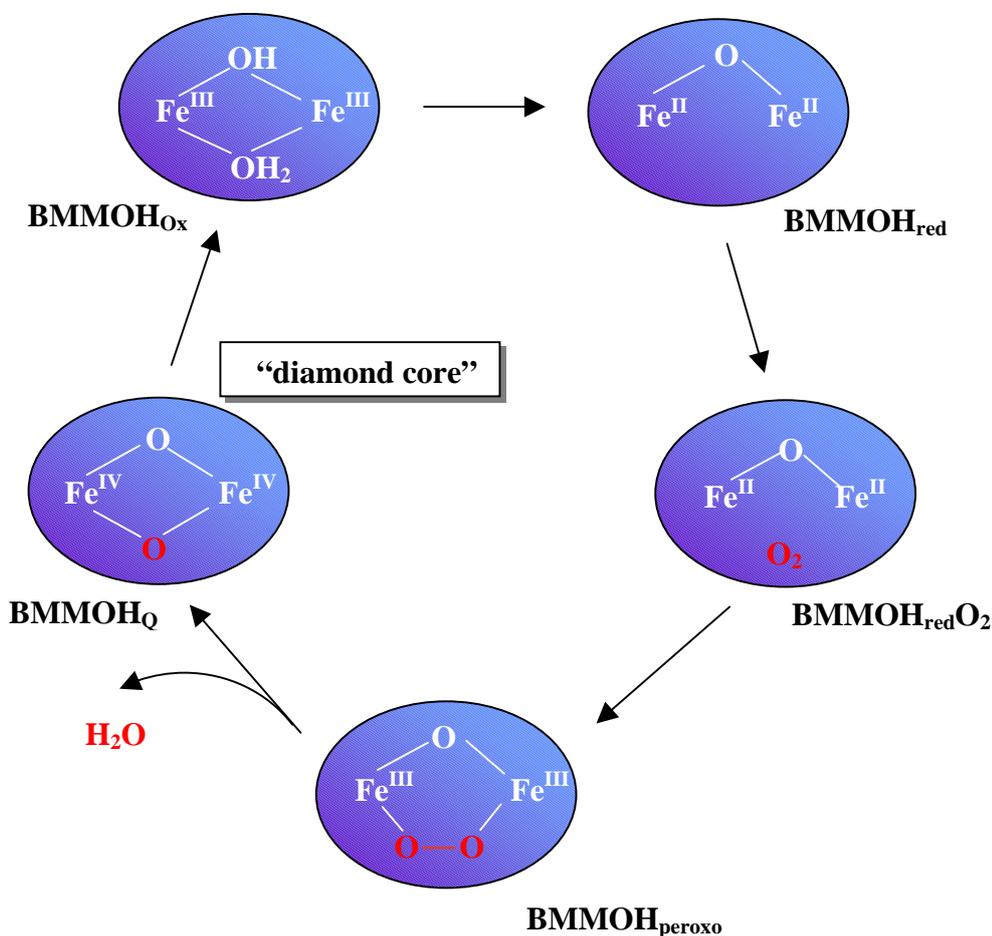


Figura 1. Rappresentazione schematica degli intermedi catalitici osservati per la reazione della BMMO H con l'O₂.

- **L'upper pathway di *P. stutzeri* OX1: gli enzimi ToMO e PH**

L'upper pathway di *P. stutzeri* OX1 è costituito dagli enzimi Toluene/*o*-xilene Monoossigenasi (ToMO) e Fenolo Ossidrilasi (PH). Tali monoossigenasi sono enzimi chiave dell'intero pathway metabolico e catalizzano l'ossidrilazione dell'anello aromatico in differenti posizioni.

Come precedentemente illustrato la Toluene/*o*-xilene Monoossigenasi da *Pseudomonas stutzeri* OX1 appartiene alla famiglia delle monossigenasi batteriche multicomponente (BMMs). In particolare ToMO appartiene alla sottoclasse di toluene/benzene monoossigenasi o gruppo 2.

Tale complesso in *P. stutzeri* OX1 è codificato cromosomicamente da 6 geni indicati come *tou A, B, C, D, E*, ed *F*, ognuno codificante per una subunità del complesso

I geni sono contenuti in un singolo operone che si trova sotto il controllo del regolatore trascrizionale TouR, proteina NtrC-like sensibile alla presenza di composti fenolici [38, 90].

Il complesso ToMO è un sistema multicomponente in cui le subunità interagiscono per formare una catena di trasporto di elettroni solubile che trasferisce gli elettroni dal donatore primario, il NADH, all'ossigeno molecolare da incorporare nel substrato aromatico [91].

La componente ToMO F è una flavodossina il cui ruolo è quello di mediare il trasferimento di elettroni dal donatore primario (il NADH) ad una ferrodossina Rieske type (la componente ToMO C). A sua volta ToMO C trasferisce gli elettroni al subcomplesso ossidrilasico ToMO H, dove è localizzato il sito catalitico dell'enzima.

La componente ossidrilasica ToMO H, è un subcomplesso costituito dalle subunità A, B, ed E organizzate in una struttura quaternaria del tipo (BEA)₂ e contiene ioni ferro in rapporto di circa 4 moli per mole di ToMO H [91].

La catalisi procede in maniera più efficiente in presenza di una piccola proteina effettrice, nota come componente ToMO D, di circa 12 KDa, che altera le proprietà spettroscopiche e redox del centro diferrico e cambia la regiospecificità della reazione. La subunità ToMO D non contiene gruppi prostetici, interagisce con il subcomplesso ToMO H ed ha un ruolo di tipo regolativo essenziale per il funzionamento dell'intero complesso [92].

Rispetto alle monoossigenasi omologhe ToMO presenta interessanti peculiarità. Come poche altre, infatti, è in grado di catalizzare due reazioni di monoossigenazione successive convertendo benzene e derivati nei corrispondenti fenoli e questi ultimi in catecoli.

ToMO è in grado di ossidare una considerevole varietà di substrati quali alcheni, areni e alcani alogeno-sostituiti e, pertanto, è giustificato l'interesse per il suo studio volto a possibili applicazioni nel biorisanamento ambientale e nelle sintesi chimiche. In particolare la sua capacità di ossidare anche *m*-, *p*-xilene, benzene, etilbenzene, stirene, naftalene, [37] tricloroetilene, cloroformio [93], diclorometano, fenolo, pentaclorofenolo, la rendono particolarmente interessante. E' inoltre da sottolineare che ToMO è l'unica ossigenasi conosciuta in grado di attaccare il tetracloroetilene, un pericoloso inquinante [94]. La considerevole varietà di substrati riconosciuti da tale enzima ne suggerisce applicazioni che vanno dalla bioremediation all'ossidazione regio- ed enantio-specifica di idrocarburi su scala industriale [95].

L'enzima ToMO presenta una regioselettività rilassata in quanto è in grado di ossidare più di una posizione dell'anello aromatico. Fornendo *o*-xilene come substrato vengono prodotti 2,3-dimetilfenolo e 3,4-dimetilfenolo a loro volta convertiti in 3,4- e 4,5-dimetilcatecolo. Se il substrato è toluene si ottiene una miscela di *o*-, *m*- e *p*-cresolo a loro volta convertiti in 3-metilcatecolo e 4-metilcatecolo. E' ancora da

notare che, mentre la prima reazione di ossigenazione non è regiospecifica, la seconda avviene sempre sul carbonio in *orto* rispetto a quello ossidrilato per formare catecolo.

Recentemente è stata determinata la struttura cristallografica della componente ToMO H [95]. E' stato ritrovato che il core catalitico diferrico (III) è molto simile a quello riscontrato nella metano monoossigenasi solubile da *Methylococcus capsulatus* (sMMO) [85, 96]. Tale cluster diferrico risiede all'interno di un *four-helix bundle* situato nella subunità ToMO A del subcomplesso ToMO H (Figura 2).

L'analisi della struttura cristallografica di ToMO H ha inoltre permesso di rilevare che i residui importanti per la formazione della struttura del centro diferrico e interessati nelle variazioni conformazionali che si hanno nel corso della catalisi sono posizionati tutti da un lato del centro metallico mentre dal lato opposto si trovano i residui che formano una tasca idrofobica per il legame del substrato.

Nella componente ToMO A di particolare interesse è la presenza di un canale di circa 6-10 Å di ampiezza e di circa 35 Å di lunghezza che si estende dal sito attivo alla superficie della proteina. Le dimensioni del canale sono tali da consentire l'ingresso dei substrati aromatici e la successiva fuoriuscita dei prodotti ossidrilati [95].

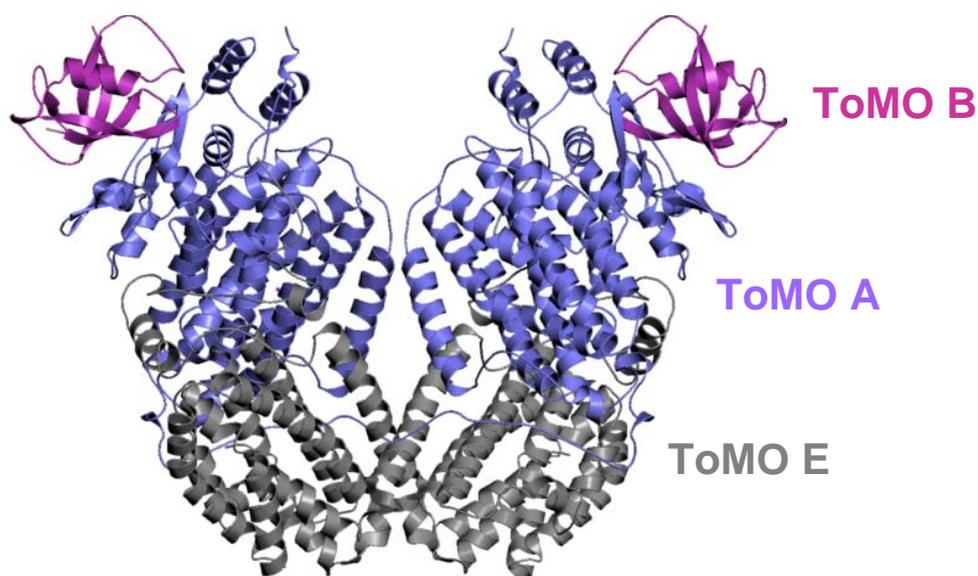


Figura 2. Diagramma a nastri della struttura del complesso ToMO H. Le subunità ToMO A, E, e B sono evidenziate rispettivamente in viola, grigio e rosa.

La regioselettività rilassata di ToMO indica che almeno tre differenti posizioni nel sito attivo possono accomodare i gruppi metilici del toluene e dell'*o*-xilene.

L'analisi della struttura cristallografica di ToMO H ed il confronto della sequenza amminoacidica con quella di altre BMMs ha consentito di individuare i residui amminoacidici che potrebbero essere responsabili della regioselettività della ToMO.

Sono stati confrontati i residui del sito catalitico di BMMs appartenenti a quattro famiglie differenti ed è stato osservato che, nelle immediate vicinanze della cavità a

cui si lega il substrato, i siti attivi delle BMMs analizzate differiscono solo per poche posizioni, tra cui la posizione 103 e 180 [95].

In particolare gli enzimi T4MO da *Pseudomonas mendocina* KR1[97] e T3MO [88] che presentano una glicina in posizione 103 ed un amminoacido idrofobico in posizione 180 sono enzimi fortemente *para*-orientanti, mentre membri del gruppo di toluene2-monoossigenasi/fenolo-ossidrilasi che, in posizioni omologhe presentano rispettivamente un residuo di leucina ed uno di alanina, sono enzimi fortemente *orto*-orientanti [95].

Esperimenti di mutagenesi sulla T4MO hanno portato a concludere che i residui del sito attivo in posizione 103 e 180 influenzano le proprietà di regioselettività dell'enzima[98, 99].

Poiché ToMO e altre BMM del gruppo 2, come la T4MO, solitamente sono i primi enzimi delle vie di utilizzo dei composti aromatici, la regioselettività e specificità di substrato di questi enzimi può costituire la base molecolare per spiegare la capacità di microorganismi a crescere su determinati substrati, o anche l'efficienza metabolica nell'impiegare tali substrati. Ad esempio, nel caso di *Pseudomonas mendocina* KR1 [97] la ristretta regioselettività sul toluene della Toluene 4-monoossigenasi (T4MO), che è un enzima *para*-orientante, è determinante nel metabolismo dell'utilizzo del toluene. Infatti il *p*-cresolo è l'unico isomero del cresolo che può essere ulteriormente metabolizzato attraverso la progressiva ossidazione del gruppo metilico in *para*.

Invece le BMMs da altri ceppi batterici, quali *Pseudomonas stutzeri* OX1 e *Burkholderia* sp. JS150, sono capaci di ossidilare ulteriormente i cresoli a 3-metilcatecolo (3-MC) e 4-metilcatecolo (4-MC), che sono metabolizzati attraverso *orto*- o *meta*-*pathway*. Nel caso del *meta*-*pathway* il 3-MC ed il 4-MC non sono metabolicamente equivalenti poiché vengono utilizzati attraverso due *lower pathway* distinti anche se simili.

Pertanto la velocità di utilizzo di un substrato quale il toluene è determinata dalla capacità degli enzimi coinvolti nella sua ossidilazione a produrre uno solo tra i due metilcatecoli, ovvero dalla loro regioselettività.

Quindi, riuscire a controllare la regioselettività e la specificità di substrato delle BMM consentirebbe la manipolazione mirata dei *pathway* degradativi dei composti aromatici allo scopo di ottenere ceppi con caratteristiche migliorate sia per l'impiego nelle strategie di biorisanamento che in quelle di biosintesi.

A due kb di distanza a valle del cluster codificante per ToMO, nel genoma di *P. stutzeri* OX1 è stato individuato il tratto genico *ph* (*phenol hydroxylase*), codificante per un'attività fenolo ossidrilasica (PH) [34]. Anche il complesso multienzimatico PH appartiene alla famiglia di monossigenasi batteriche multicomponente (BMMs), in particolare alla sottoclasse di fenolo ossidrilasi o gruppo 1.

L'analisi della sequenza nucleotidica del cluster genico *ph* ha permesso di individuare sei ORFs, codificanti rispettivamente per le sei subunità costituenti il complesso multienzimatico, denominate: PH K, L, M, N, O, P. Come per ToMO, il funzionamento della fenolo ossidrilasi da *P. stutzeri* OX1, coinvolge un trasferimento di elettroni, dal NADH all'ossigeno molecolare, attraverso le componenti del complesso. Il primo accettore di elettroni nella catena di trasporto è la subunità PH P, una NADH-ossidoreduttasi con un centro [2Fe-2S], che trasferisce gli elettroni dal NADH direttamente alla componente ossidrilasica. Quest'ultima è costituita dalle tre subunità PH O, L, ed N, che interagiscono tra loro a formare un subcomplesso dimerico di tipo (LNO)₂. La subunità PH N è sede dell'attività catalitica e presenta un

centro diferrico del tipo Fe-O-Fe. La subunità PH M, che non contiene cofattori, né metalli, sembrerebbe svolgere una funzione di tipo regolatorio [100].

Il complesso multienzimatico PH è in grado di ossidrilare non solo fenolo ma anche 2,4- e 2,5- dimetilfenolo [34].

Sia ToMO che PH sono enzimi potenzialmente in grado di catalizzare le medesime reazioni di ossidrilazione a carico dell'anello aromatico, e pertanto la loro funzione appare essere ridondante nel contesto metabolico del batterio in esame.

- **Studio di attività monoossigenasiche e loro potenziali applicazioni**

La reazione di ossidrilazione di composti di natura aromatica, catalizzata da enzimi ad attività ossigenasica, è stata indicata come "potenzialmente la più utile di tutte le biotrasformazioni" [22].

Le proprietà catalitiche uniche delle ossigenasi, quali la capacità di ossidrilare in modo regio e/o enantiospecifico carboni non attivati, conferiscono a tali enzimi un indiscutibile valore biosintetico [101, 102]. La loro abilità di ossidrilare un certo numero di idrocarburi in specifiche posizioni, spesso sfavorite in reazioni non enzimatiche, e di generare specifici enantiomeri li rende utilizzabili anche per le biotrasformazioni di composti di interesse farmaceutico [5, 21].

Infatti composti aromatici di- e tri-ossidrilati trovano importanti applicazioni in diversi ambiti, quali l'industria farmaceutica, cosmetica e agroalimentare, come ad esempio dimostrato dalla produzione mondiale di catecolo, resorcinolo, e idrochinone che raggiunge livelli stimabili intorno alle 110,00 tonnellate/anno [103].

D'altro canto i processi chimici che coinvolgono l'introduzione di un atomo di ossigeno sono spesso non specifici e talvolta richiedono reagenti tossici e costosi [104]. Al contrario i processi biocatalitici che prevedono l'utilizzo di monoossigenasi richiedono in generale condizioni di reazione più blande.

Nella produzione di prodotti di chimica fine è da tempo ben compreso il vantaggio di utilizzare enzimi purificati come catalizzatori eterogenei. In alcuni casi, comunque, l'utilizzo di proteine purificate per applicazioni bio-industriali, soffre, oltre che del problema dei costi connessi con la loro purificazione, anche del fatto che, trattandosi di molecole a struttura oligomerica, non sempre è possibile la purificazione di molecole funzionali. Questo è vero soprattutto per le ossigenasi. L'uso di cellule intere è invece più economico, sia in termini di costi che di tempo [5]. Gli enzimi sono protetti all'interno della cellula e pertanto mostrano un'emivita più lunga. Inoltre le reazioni catalizzate da ossigenasi richiedono solitamente un certo numero di cofattori che diviene complicato fornire *in vitro* ma che, al contrario, le cellule intere producono naturalmente. In generale è più semplice e meno costoso rigenerare cofattori in cellule metabolicamente attive [102].

Sia enzimi isolati che cellule intere trovano attualmente applicazione in processi di sintesi industriali, e rappresentano un' area di ricerca in continuo sviluppo [105].

Ad esempio, la styrene monoossigenasi da *P. fluorescens* è stata proposta come biocatalizzatore per la produzione di epossidi chirali, che rappresentano i composti di partenza per la sintesi di un gran numero di prodotti di chimica fine [106].

Recentemente sono stati eseguiti esperimenti di mutagenesi sito-diretta sulla ToMO di *P. stutzeri* OX1 per renderla utilizzabile nella sintesi di composti ad alto valore aggiunto quali 4-metilresorcinolo, metilidrochinone, e pirogallolo [107].

Un esempio invece di ceppo batterico degradatore attualmente utilizzato come biocatalizzatore è rappresentato da *Pseudomonas putida* ATCC 33015,

microorganismo in grado di crescere su *p*-xilene come unica fonte di carbonio e di energia [108].

Le capacità di tale batterio sono state studiate dettagliatamente sul composto 2,5-dimetilpirazina. Il prodotto di ossidazione corrispondente è un intermedio di importanti processi di sintesi farmaceutica. L'applicazione attuale è realizzata in fermentatori su larga scala[5].

In tale ambito, caratterizzare gli enzimi all'interno delle cellule non ne facilita unicamente lo studio, ma ha anche lo scopo di favorire un loro più semplice e vantaggioso impiego per un eventuale utilizzo biotecnologico.

- **Il *lower pathway* di *P. stutzeri* OX1: gli enzimi HMSD e HMSH**

Il *lower pathway* di *P. stutzeri* OX1 è costituito da una serie di enzimi che catalizzano successive reazioni di ossidazione per portare alla formazione di intermedi del ciclo degli acidi tricarbossilici (TCA). Gli enzimi che costituiscono il *pathway* in *P. stutzeri* OX1 sono la catecolo 2,3 diossigenasi, la semialdeide 2-idrossimuconica deidrogenasi (HMSD) e la semialdeide 2-idrossimuconica idrolasi (HMSH). L'ordine dei geni che codificano per tali enzimi è simile a quello ritrovato nell'operone *dmp* per il catabolismo del fenolo in *Pseudomonas* sp. CF600 [34].

Il primo enzima del *pathway* è la catecolo 2,3 diossigenasi (C2,3O), che catalizza la reazione di apertura dell'anello aromatico, mediante un taglio idrolitico extradiolico portando alla formazione di semialdeide muconica. La C2,3O contiene Fe²⁺ non emico nel sito attivo.

Gli enzimi HMSD e HMSH hanno come substrato i prodotti del taglio della C2,3O. In particolare i prodotti del taglio del catecolo e del 4-metilcatecolo sono aldeidi, substrato preferenziale della deidrogenasi, mentre il prodotto del taglio del 3-metilcatecolo è un chetone che è riconosciuto e processato unicamente dall'idrolasi. Pertanto il *pathway* metabolico tende a divergere dopo il taglio operato dalla C2,3O. I prodotti di fissione che si ottengono possono essere processati o attraverso la via idrolitica o attraverso la via deidrogenasica. Le due vie convergono nella formazione del composto 2-idrossipenta-2,4-dienoato [109].

Mentre la via idrolitica porta immediatamente alla formazione di 2-idrossipenta-2,4-dienoato al seguito dell'azione di HMSH, la via deidrogenasica converte in primo luogo i prodotti di fissione dell'anello aromatico nella forma enolica del 4-ossalocrotonato mediante azione dell'enzima HMSD. La forma enolica del 4-ossalocrotonato è successivamente convertita in 2-idrossipenta-2,4-dienoato dall'azione sequenziale di una isomerasi e di una decarbossilasi [109, 110].

Aldeidi deidrogenasi coinvolte nel metabolismo di composti aromatici sono state individuate in vari ceppi batterici che includono *P. putida* CF600 [111], *P. putida* mt-2 [112], *P. putida* NCIB9816 [113], *Pseudomonas* sp. IC [114], *Pseudomonas* spDJ77 [110] e i geni che codificano per questi enzimi isofunzionali sono stati indicati rispettivamente come *dmpC*, *xylG*, *nahl*, *bphG* e *phnG*. Tali deidrogenasi presentano grande similarità nella struttura primaria, soprattutto nella regione del sito catalitico e in quella di legame al NAD⁺. Questi enzimi presentano tuttavia una struttura quaternaria variabile, solitamente sono omodimeri o omotetrameri e le dimensioni delle subunità variano tra i 50 e i 70 KDa [115]. Solitamente il sito di legame al NAD⁺ è localizzato nella regione N-terminale.

Il meccanismo d'azione di aldeidi deidrogenasi coinvolte nel metabolismo di composti aromatici include la formazione di un intermedio enzima-substrato tioemiacetalico che trasferisce un equivalente di idruro all'anello piridinico del NAD⁺, che è poi successivamente idrolizzato dall'enzima. Un particolare residuo di serina,

altamente conservato nelle deidrogenasi batteriche, è coinvolto nella formazione di un intermedio acil-enzima .

La reazione è metabolicamente favorita in quanto porta alla formazione di NADH, ovvero di potere riducente che può essere impiegato dalla cellula batterica.

L'enzima HSMH da *P. stutzeri* OX1 appartiene ad una particolare famiglia di *foldings* di proteine, la famiglia delle idrolasi α/β , che comprende pochi rappresentanti (circa 10). Il core strutturale di queste proteine è costituito da 8 foglietti β collegati da α -eliche. Tale *foldings* è comune ad alcuni enzimi idrolitici che differiscono grandemente per l'origine filogenetica e per la funzione catalitica [116, 117].

Tale famiglia di proteine costituisce un esempio di evoluzione convergente: strutture simili che si sono evolute in modo indipendente per poter assolvere alla medesima funzione. Tali enzimi pertanto differiscono nella struttura tridimensionale globale, ma hanno un sito catalitico altamente conservato [116].

Membri di tale famiglia sono serin proteasi eucariote, proteasi a cisteina, subtilisine, lipasi, aloalcano dealogenasi e alcune idrolasi coinvolte nel metabolismo di composti aromatici [117]. Queste ultime possono suddividersi in due gruppi principali. Il primo gruppo include gli enzimi coinvolti nella degradazione di composti con sostituenti di grandi dimensioni in posizione 6, come bifenili, carbazolo e tetralina. Il secondo gruppo comprende enzimi coinvolti nella degradazione di composti monociclici con piccoli sostituenti alchilici, come toluene, xilene, etilbenzene e cumene. Sono state riportate le strutture cristallografiche di un membro del primo gruppo, l'idrolasi BphD da *Rhodococcus* sp.strain RHA1 [118] e di un membro del secondo gruppo, l'idrolasi CumD coinvolta nel metabolismo del cumene da *Pseudomonas fluorescens* IPO1 [119](Figura 3)

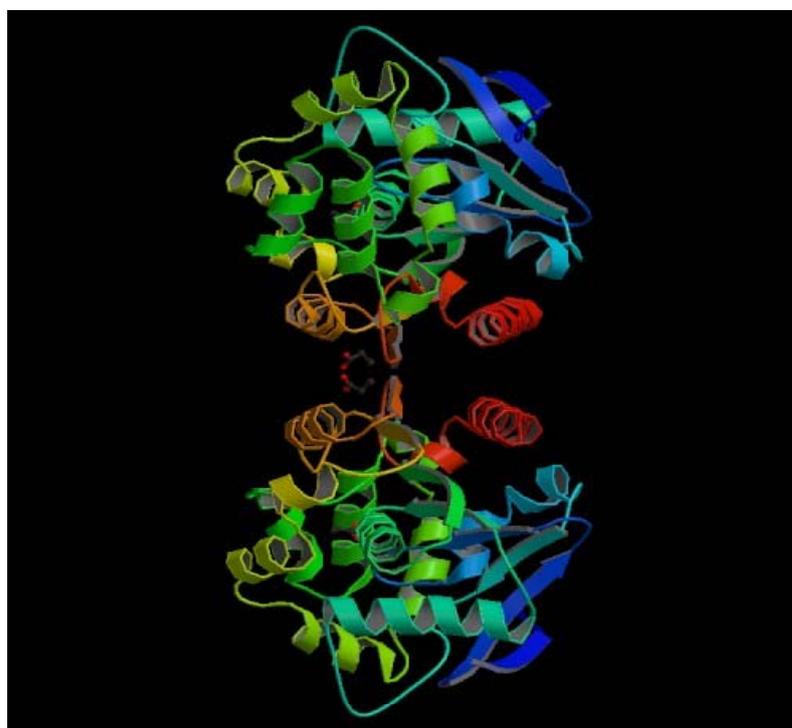


Figura 3. Diagramma a nastri della struttura dell'idrolasi CumD da *Pseudomonas fluorescens* IPO1

Tali proteine differiscono soprattutto nella regione centrale, che pertanto sembrerebbe essere coinvolta nel riconoscimento del substrato. Conservano una stringente similarità solo nel loro dominio catalitico centrale.

Le aldeide idrolasi sono solitamente omodimeri come MphC da *E. coli* o XylF da *Pseudomonas putida* [120], talvolta sono omotetrameri come BphD da *Bulkolderia cepacia* LB400 [121], raramente sono monometriche. Inoltre sono stati individuati alcuni ceppi batterici, quali *Rhodococcus* sp. Strain RHA1 [122] e *Burkholderia cepacia* LB400 [123], in cui sono presenti più idrolasi con specificità di substrato complementare.

Sono enzimi che catalizzano una delle reazioni enzimatiche più rare in natura, ovvero il taglio idrolitico di un legame C-C e per la loro attività non richiedono cofattori specifici [120].

All'interno del sito attivo vi è la presenza della ben nota triade catalitica, caratteristica delle serina-idrolasi, un residuo di serina, uno di istidina ed uno di glutammico, localizzati in posizioni altamente conservate in tutti i membri di tale famiglia.

Il residuo di istidina è il più conservato, talvolta invece come residuo amminoacidico acido si osserva acido aspartico invece di acido glutammico, e come nucleofilo in luogo della serina un residuo di cisteina o di acido aspartico.

Esperimenti di mutagenesi realizzati su XylF, l'idrolasi del *pathway* TOL [120], e su BphD da *Comamonas testosteroni* B-356 [124] hanno confermato che tali residui sono essenziali per la catalisi.

Anche le regioni dove sono collocati i residui della triade catalitica sono estremamente ben conservati strutturalmente. In particolare il residuo nucleofilo, solitamente una serina, si ritrova all'interno di un motivo altamente conservato noto come "*nucleophilic elbow*". Per tale regione è stato proposto un motivo *consensus* del tipo : Sm-X-Nu-X-Sm-Sm, dove Sm è un residuo piccolo, generalmente glicina, X è un amminoacido non conservato ed Nu è il residuo nucleofilo, solitamente serina [116, 125].

Nelle serina idrolasi i residui che immediatamente precedono o seguono il residuo nucleofilo non sono conservati, suggerendo che in generale non sono critici per la catalisi.

Tuttavia analisi di comparazione delle strutture primarie rivelano che mentre le idrolasi che scindono legami C-C dei prodotti di fissione di composti ad un solo anello hanno un residuo di fenilalanina che segue il residuo nucleofilo della triade, le idrolasi che riconoscono come substrato i prodotti di fissione derivanti da composti a due anelli hanno, nella medesima posizione, un residuo di metionina.

Il meccanismo di reazione di tali enzimi è stato investigato in dettaglio per l'idrolasi MphC da *E. coli* [126, 127], enzima responsabile del taglio idrolitico di un legame C-C nel *pathway* di degradazione del fenilpropionato.

A seguito del taglio idrolitico di composti catecolici operato dalla C2,3O, si ottiene la formazione di prodotti di fissione dell'anello contenenti gruppi funzionali ϵ -cheto dienolici.

In primo luogo l'idrolasi lega il substrato dienolico in una conformazione non planare, e promuove una rapida chetonizzazione del substrato in posizione 5 per dare un intermedio chetonico.

Il meccanismo proposto per i membri più studiati della famiglia di idrolasi α/β , ovvero le serina- proteasi, a questo punto prevede un attacco nucleofilo al carbonio carbonilico del substrato ad opera di un residuo di serina e la conseguente rottura di un legame C-C con formazione di un intermedio acil-enzima.

Al contrario in MphC l'attacco nucleofilo al carbonio carbonilico sembra avvenire ad opera di una molecola d'acqua, con formazione non di un intermedio acil-enzima ma di un intermedio *gem*-diolo. In quest'ultimo caso il residuo di serina presente nel sito attivo non agirebbe da nucleofilo, ma da base [127].

Le regioni genomiche codificanti per un'attività deidrogenasica ed un'attività idrolasica da *P. stutzeri* OX1 sono state identificate e subclonate in un vettore pUC19 per portare alla formazione del costrutto pVS1934 [34].

- **Scopo del lavoro di tesi**

L'obiettivo principale del presente progetto di tesi di dottorato è stata la comprensione delle proprietà cataboliche di alcuni enzimi responsabili delle peculiari capacità degradative del batterio *P. stutzeri* OX1. Tale progetto si è articolato in diversi punti:

In primo luogo gli studi svolti hanno riguardato la delucidazione delle ragioni metaboliche alla base della coesistenza delle attività enzimatiche ToMO e PH. A tal fine è stata condotta una caratterizzazione cinetica dei due enzimi impiegando cellule intere di *E. coli* esprimenti i due complessi. Il comportamento dei due enzimi è stato studiato con particolare riferimento al metabolismo di comuni inquinanti aromatici, quali benzene, toluene e *o*-xilene. Sono stati inoltre effettuati saggi eseguiti accoppiando l'enzima ToMO con PH in cellule di *E. coli*. Questi esperimenti hanno permesso di avanzare un'ipotesi sulle conseguenze metaboliche derivanti dalla combinazione delle loro attività.

Inoltre, con l'obiettivo ultimo di potenziare le capacità metaboliche di *Pseudomonas stutzeri* OX1 sono state prodotte mediante tecniche di ingegneria proteica forme mutate dell'enzima ToMO. In questo lavoro è riportata anche la loro caratterizzazione cinetica e sono illustrate le conseguenze metaboliche derivanti da un loro eventuale accoppiamento con l'enzima PH.

La seconda parte del progetto ha interessato lo studio delle ragioni metaboliche alla base dell'incompatibilità dell'*upper* TOU *pathway* e dell'*upper* TOL *pathway* in *P. stutzeri* OX1.

E' stato realizzato il clonaggio del gene, l'espressione e la parziale caratterizzazione del primo enzima del TOL *pathway*, la xilene monoossigenasi, ed è stata eseguita un'analisi dell'effetto derivante dalla coesistenza della sua attività con quella dell'enzima ToMO, il primo enzima del TOU *pathway*.

Nella terza parte, al fine di ottenere una visione più ampia sul destino metabolico di particolari molecole aromatiche, è riportata l'espressione, la purificazione e la parziale caratterizzazione biochimica degli enzimi HMSD e HMSH dal *lower pathway* di *P. stutzeri* OX1.

MATERIALI E METODI

1. Ceppi batterici

- ***E. coli* JM109.** Il ceppo è stato acquistato dalla Novagen ed utilizzato per l'espressione della toluene *o*-xilene monoossigenasi (ToMO) e della fenolo ossidrilasi (PH). Il suo genotipo è: *recA1 supE44 endA1 hdsR17 gyrA96 relA1 thi* (lac-proAB).
- ***E. coli* JM101.** Il ceppo è stato acquistato dalla Boehringer ed utilizzato per le manipolazioni genetiche. Il suo genotipo è: *supE thi* (lac – proAB) *F'*[*traD36 proAB*⁺ *lac*^q *lacZ* *M15*].
- ***E. coli* ceppo BL21(DE3).** Il ceppo è stato acquistato dalla Novagen ed utilizzato per effettuare le operazioni di espressione. Il suo genotipo è: *F*, *ompT*, *hdsS_b*, (*r_b*, *m_b*), *dcm*, *gal*, *λ* (*DE3*).
- ***Pseudomonas stutzeri* OX1 e *Pseudomonas putida* PaW1.** I ceppi di *Pseudomonas stutzeri* OX1, isolato da fanghi attivati di scarichi industriali [32], e di *Pseudomonas putida* PaW1 [128] sono stati forniti dalla Dr. Paola Barbieri (Dipartimento di Biologia Strutturale e Funzionale, Università dell'Insubria, Varese, Italia).

2. Mezzi di coltura

LB (Luria-Bertani) ed M9 . I mezzi di coltura liquidi e solidi, sono stati preparati come descritto da Sambrook *et al* [129].

3. Antibiotici

L'ampicillina (Amp) e il cloramfenicolo (CF) sono stati acquistati dalla Sigma e usati ad una concentrazione rispettivamente di 50 e 30 µg/ml

4. Substrati

Il benzene, il toluene, l'*o*-xilene, il *p*-xilene, il fenolo, l'*o*-, il *m*-, il *p*-cresolo, il 2,3- e il 3,4-dimetilfenolo, il 4-metil-benzil-alcool sono stati acquistati dalla Sigma; il 3- ed il 4-metilcatecolo, il 3,4- il 4,5-dimetilfenolo, il 3,5- ed il 3,6- dimetilcatecolo sono stati forniti dal Dott. A. Pezzella del Dipartimento di Chimica Organica e Biochimica dell'Università di Napoli Federico II.

5. Enzimi di restrizione e modificazione

Gli enzimi di restrizione, la fosfatasi alcalina (**C**alf **I**ntestinal **P**hosphatase, CIP) e la T4 DNA ligasi sono stati acquistati rispettivamente dalla New England Biolabs, dalla Roche e dalla Promega.

6. Vettori di espressione

- **pGEM-3Z.**

Per l'espressione dei complessi PH, ToMO *wt* e mutanti è stato usato il vettore pGEM-3Z acquistato dalla Promega. Tale vettore ad alto numero di copie consente l'espressione regolata in *E. coli* di proteine ricombinanti sotto il controllo del promotore *lac* inducibile mediante aggiunta di IPTG. Le caratteristiche del vettore sono descritte nella banca dati EMBL, numero di accesso X65304.

- **pACYcDuet**

Per l'espressione del complesso XMO è stato usato il vettore pACYcDuet-1 acquistato dalla Novagen. Tale vettore commerciale presenta due polilinker, indicati come MCS1 e MCS2 (*multiple cloning site*) a monte dei quali vi sono due promotori *T7lac* con siti operatori tipo *lac* e siti di legame al ribosoma (*rbs*). Il vettore consente

pertanto la trascrizione e la traduzione indipendente di due geni differenti clonati utilizzando i due polilinker.

7. Plasmidi

Per la realizzazione di questo lavoro di tesi sono stati utilizzati i seguenti costrutti, forniti dalla dott.ssa Paola Barbieri del Dipartimento di Biologia strutturale e funzionale dell'Università dell'Insubria (Varese):

- **pBZ1260** contenente il cluster genico *tou* (*tou A-B-C-D-E-F*) clonato nel vettore pGEM-3Z [37];
- **pJSX148** contenente il cluster genico *ph* (*ph L-M-N-O-P*) clonato nel vettore pJB3Km1 [34].
- **pVS1934** contenente un frammento genico di 3,4 Kb, codificante per una attività deidrogenasica ed un'attività idrolasica, isolato da *P. stutzeri* OX1, clonato nel vettore pUC19 [34].

I seguenti costrutti sono invece stati realizzati nel corso del presente lavoro:

- **pGEM-3Z/*ph*** contenente il cluster genico *ph* (*phL-M-N-O-P*) clonato nel vettore pGEM-3Z [130].
- **pGEM-3Z/*tou-ph*** contenenti entrambi i clusters genici *tou* (*tou A-B-C-D-E-F*) e *ph* (*ph L-M-N-O-P*) clonati nel vettore pGEM-3Z [130].
- **pACYcDuet/ *xyIM- xyIA*** contenente i geni *xyIM* e *xyIA* clonati nel vettore pACYcDuet-1

8. Sintesi degli oligonucleotidi

Tutti gli oligonucleotidi utilizzati sono stati sintetizzati dal Dott. Elio Biffali della Stazione Zoologica A. Dohrn di Napoli.

9. Analisi della sequenza nucleotidica

La determinazione delle sequenze nucleotidiche è stata effettuata presso la ditta MWG-Biotech (<http://ecom.mwgdna.com>).

10. Colorazione di DNA su gel di agarosio

Per la colorazione del DNA su gel di agarosio è stato utilizzato il colorante fluorescente Syber Green, acquistato dalla Sigma-Aldrich. Il colorante ha una sensibilità da 50 a 100 volte più alta rispetto al bromuro di etidio consentendo la rilevazione di una banda di 300 pg di DNA a doppio filamento utilizzando una radiazione ultravioletta di 254 nm di lunghezza d'onda.

11. Purificazione dei frammenti di DNA da gel d'agarosio

E' stato utilizzato il Kit Wizard PCR Preps DNA Purification System acquistato dalla Promega.

12. Preparazione del DNA plasmidico

La preparazione del DNA plasmidico è stata eseguita utilizzando il kit per mini preparazioni della Qiagen.

13. Costruzione del vettore pGEM3Z-*ph*

Il cluster genico *ph* è stato estratto dal costrutto pJSX148 mediante digestione con l'enzima di restrizione XbaI utilizzando le seguenti condizioni: 2.5 µg di pJSX148, 2 µl dell'enzima XbaI 40U/ µl, 6 µl di BSA 1 mg/ml, 6 µl di tampone 10X (Tris-HCl 100 mM pH 7.9, MgCl₂ 100 mM, NaCl 500 mM, DTT 10 mM), in un volume finale di 60 µl. Il

campione è stato incubato a 37°C per 2 h ed il frammento di 4930 bp (*ph*) ottenuto è stato purificato da gel di agarosio all'1% mediante impiego del Kit Wizard PCR Preps DNA Purification System.

Il vettore pGEM3Z è stato linearizzato mediante digestione con il medesimo enzima e purificato da gel di agarosio. Successivamente il vettore pGEM-3Z digerito XbaI è stato sottoposto a defosforilazione. La reazione è stata preparata nel seguente modo: 1.2 µg di pGEM-3Z, 1 µl di fosfatasi alcalina CIP 1 U/µl, 2 µl di tampone 10X (Tris-HCl 0.5 M pH 8.5, EDTA 1 mM) in un volume finale di 20 µl. La miscela è stata incubata a 37°C per 30 min al termine dei quali è stato aggiunto 1 µl di fosfatasi alcalina CIP, e l'incubazione è stata proseguita per ulteriori 10 min a 37°C e 20 min a 55°C. Per inattivare la fosfatasi alcalina 1 µl di EDTA 500 mM a pH 8.0 è stato aggiunto a 20 µl della miscela di reazione e il campione è stato incubato 10 min a 75°C.

Il vettore defosforilato è stato sottoposto ad un ulteriore passaggio di purificazione su gel di agarosio. La ligazione dei frammenti è stata effettuata utilizzando differenti rapporti vettore: inserto (1:1, 1:3), in presenza di 1 µl ATP 10 mM e di 1 µl di tampone per la ligasi 10X (Tris/HCl 300 mM pH 7.8, MgCl₂ 100 mM, DTT 100 mM, ATP 10 mM), in un volume finale di 9 µl. La miscela di ligazione è stata incubata per 10 min a 42°C, 10 min a temperatura ambiente (RT) ed infine è stato aggiunto 1 µl dell'enzima T4 DNA ligasi (3U/µl). La miscela di reazione è stata successivamente incubata per 16 h a 4°C.

La miscela di ligasi è stata utilizzata per trasformare il ceppo di *E. coli* JM101 e le cellule trasformate sono state piastrate su LB/agar contenente ampicillina 50 µg/ml. Preparazioni analitiche di DNA plasmidico dalle colonie trasformanti, e la successiva analisi di restrizione utilizzando singole e doppie digestioni, hanno consentito l'identificazione dei cloni ricombinanti. Il costrutto realizzato è stato denominato pGEM3Z-*ph*.

14. Costruzione del vettore pGEM-3Z/*tou-ph*

Anche per la realizzazione del costrutto pGEM-3Z/*tou-ph* si è proceduto all'isolamento del cluster *ph* dal pJSX148 utilizzando l'enzima di restrizione XbaI. Il vettore pBZ1260 è stato linearizzato mediante digestione con il medesimo enzima XbaI e successiva defosforilazione delle estremità.

Vettore e inserto sono stati ligati tra di loro utilizzando un rapporto vettore: inserto pari a 1:3 e la miscela di ligazione è stata impiegata per trasformare cellule di *E. coli* JM101. I cloni ricombinanti sono stati identificati mediante analisi di restrizione. Il plasmide risultante è stato indicato come pGEM-3Z/*tou-ph*.

15. Analisi della struttura di ToMO e docking di (di)metilfenoli

La struttura di ToMO H (codice PDB: 1T0Q) [95] è stata analizzata con Swiss PDB viewer e Pymol (DeLano Scientific LLC). I residui del sito attivo sono stati identificati usando il programma Pymol. Il docking manuale di fenolo, *o*-, *m*-, *p*-cresoli, 2,3- 2,4 e 3,4 dimetilfenoli è stato effettuato con Pymol. Si è assunto che i (di)metilfenoli si leghino al centro diferrico di ToMO nella forma anionica. L'ossigeno del fenolato è stato collocato a 2,19 Å da Fe(1) e 2,09 Å da Fe(2), nella posizione a ponte che è occupata dall'ossigeno della molecola di tioglicolato nel complesso cristallografico. L'anello aromatico è stato ruotato usando l'ossigeno del fenolato come centro di rotazione, cercando le conformazioni che minimizzavano le sovrapposizioni steriche fra gli atomi del substrato e le pareti della cavità del sito attivo. Le coordinate per i (di)metilfenoli sono state create utilizzando i programmi CS ChemDraw Pro e Chem3D Pro (Cambridge Soft Corporation).

16. Progettazione e realizzazione dei mutanti di ToMO A

La progettazione e la realizzazione, eseguita mediante mutagenesi sito-diretta, della subunità ToMO A dell'enzima ToMO non è descritta in questo lavoro di tesi. I mutanti ToMO-E103G, ToMO - E103L, ToMO - E103M, caratterizzati nel corso del presente lavoro, sono stati realizzati dal dott. Eugenio Notomista del Dipartimento di Biologia Strutturale e Funzionale dell'Università di Napoli Federico II utilizzando un protocollo descritto in un manoscritto pubblicato [131].

17. Preparazione delle cellule competenti e trasformazione

Una colonia del ceppo cellulare prescelto per la trasformazione è stata inoculata in 5 mL di LB e posta in agitazione a 37°C fino a 0.6 O.D._{600nm}. 1 mL di coltura è stato poi centrifugato per 2 min a 6000 rpm ed il pellet di cellule è stato risospeso in 100 µl di TSS (PEG 10%, DMSO 5%, MgCl₂ 50 mM in LB). Alle cellule rese competenti sono stati aggiunti circa 10 ng del plasmide contenente il DNA di interesse. Il campione è stato tenuto in ghiaccio per 30 min e, dopo l'aggiunta di 1 mL di LB, per 1 h a 37°C. A questo punto le cellule sono state allontanate per centrifugazione e, dopo aver eliminato 1 mL di supernatante, il pellet è stato risospeso nel volume restante e piastrato su terreno solido LB/Agar contenente gli opportuni antibiotici.

18. Espressione delle proteine ricombinanti : PH, ToMO wt e mutanti

100 µl di cellule competenti del ceppo JM109 sono state trasformate con 20 ng dei plasmidi pBZ1260, pGEM-3Z/ph e pGEM3-Z/tou-ph per l'espressione rispettivamente di ToMO, di PH e di ToMO e PH nel medesimo compartimento cellulare. Per l'espressione dei mutanti ToMO-E103, ToMO-L103, ToMO-M103 le cellule sono invece state trasformate con 20 ng dei plasmidi rispettivamente pTou-E103, -L103, -M103.

In tutti i casi le cellule trasformate sono state piastrate su LB/Agar contenente ampicillina (100 µg/ml) ed incubate a 37°C per 19 h.

Una colonia è stata prelevata dalla piastra di trasformazione ed inoculata in 10 ml di LB/Amp 50 µg/ml. La coltura è stata incubata a 37°C in forte agitazione fino ad una densità ottica pari a 0.6 O.D._{600 nm} /ml ed indotta mediante aggiunta di IPTG ad una concentrazione finale di 0.4 mM. Alla coltura è stato aggiunto inoltre Fe(NH₄)₂(SO₄)₂ ad una concentrazione finale di 50 µM per favorire la formazione dei centri metallici dei complessi. Le cellule sono state ulteriormente incubate a 37°C per 1 h e successivamente sono state raccolte mediante centrifugazione a 3,500 rpm per 10 minuti a 4°C. Il pellet cellulare è stato risospeso ad una densità ottica pari a 2 O.D._{600nm} /ml nel mezzo di coltura minimo M9 a pH 6.9 contenente glucosio 0.4% in peso (M9-G).

La sospensione cellulare così preparata è stata utilizzata per i saggi riportati nei paragrafi successivi.

19. Elettroforesi di proteine su gel di poliacrilammide in SDS (SDS-PAGE)

L'elettroforesi in condizioni denaturanti è stata effettuata con la modalità proposta da Leammli [132]. Sono stati usati gel di separazione al 18% di poliacrilammide e gel di impaccamento al 6%.

20. Determinazione dei livelli di espressione di PH, ToMO wt e mutanti

Per la determinazione dei livelli di espressione di di PH, ToMO wt e mutanti, 2 ml della sospensione cellulare in M9-G a 2.0 O.D._{600nm} /ml sono stati centrifugati a 6,000 rpm per 10 minuti. Le cellule sono state risospese in tampone contenente fosfato di

sodio 50 mM PH 7.0 e glicerolo 10%, e lisate mediante sonicazione (6 cicli di 1 min ad un'intensità pari a 332.5 Watts). La frazione solubile è stata separata da quella insolubile mediante centrifugazione a 12,000 rpm a 4°C per 10 min ed i campioni sono stati analizzati mediante SDS-PAGE. Si è così potuto osservare che i complessi ossidrilasici di ToMO ([ABE]₂) e di PH ([LNO]₂) sono espressi esclusivamente nella frazione solubile delle colture indotte. Come marker di peso molecolare sono stati usati il complesso H ([ABE]₂) e il complesso ([LNO]₂) purificati nel laboratorio in cui è stato svolto il presente lavoro di tesi.

I gel sono stati colorati con coomassie BlueR ed esaminati mediante densitometria per la determinazione quantitativa delle bande. Le concentrazioni dei complessi ossidrilasici nei lisati cellulari sono state ricavate confrontando l'intensità delle bande relative alle subunità ToMO A, ToMO E, PH L e PH N nei lisati con l'intensità delle corrispondenti bande dei marker a concentrazione nota.

21. Saggi di attività enzimatica su fenolo

L'attività enzimatica su fenolo è stata determinata spettrofotometricamente mediante un saggio colorimetrico accoppiato con la catecolo 2,3-diossigenasi (C2,3O) ricombinante da *P. stutzeri* OX1 [133], disponibile nel laboratorio in cui è stato svolto il presente lavoro di tesi. Tale enzima ossida il catecolo prodotto dall'ossidrilazione del fenolo producendo semialdeide 2-idrossimuconica che presenta un caratteristico spettro di assorbimento nel visibile. La catecolo 2,3-diossigenasi è stata usata in quantità tali da consentire una conversione quantitativa ed istantanea di catecolo in semialdeide, in modo che lo stadio lento del processo sia la conversione di fenolo in catecolo. In ogni saggio sono state usate 8 U/ml di catecolo 2,3-diossigenasi (1 U catalizza la formazione di 1 µmole di semialdeide 2-idrossimuconica per minuto nelle condizioni di saggio).

I saggi sono stati eseguiti in tampone M9-G in un volume di 500 µl ad una concentrazione di fenolo pari a 500 µM. La concentrazione di cellule impiegata variava tra 0.1 e 0.5 O.D._{600nm}/ml.

Le cellule risospese in M9-G sono state diluite alla concentrazione finale per il saggio direttamente in cuvetta ed incubate a 25°C in presenza di catecolo 2,3-diossigenasi. Dopo due minuti di incubazione è stato aggiunto fenolo al campione e la formazione del prodotto di apertura del catecolo è stata seguita registrando la variazione di assorbimento a 375 nm. Il coefficiente di estinzione molare della semialdeide 2-idrossimuconica a 375 nm nelle condizioni del saggio è pari a 29,100 M⁻¹ cm⁻¹. Una milliunità è definita come la quantità di cellule (misurata in O.D._{600nm}/ml.) che ossida una nanomole di fenolo per min a 25°C.

22. Determinazione della regioselettività su toluene, o-xilene, e derivati ossidrilati

Per la determinazione della regioselettività di PH, ToMO *wt* e mutanti sui substrati o-xilene, o-, m- e p-cresolo, 2,3- e 3,4-DMP sono stati condotti saggi *in discontinuo* e l'identificazione dei prodotti è avvenuta mediante analisi HPLC .

I complessi enzimatici PH, ToMO *wt* o mutanti sono stati espressi secondo le modalità precedentemente descritte (Paragrafo 18). Le cellule indotte sono state risospese in M9-G ed incubate ad una densità ottica compresa tra 0.1 e 0.5 O.D._{600nm}/ml in presenza di o-xilene, o-, m- o p-cresolo, 2,3- o 3,4-dimetilfenolo (DMP) ad una concentrazione finale 1 mM. A tempi successivi da ciascuno dei campioni sono stati prelevati 500 µl e le reazioni sono state bloccate aggiungendo 50 µl di HCl 1 M.

Successivamente i campioni sono stati centrifugati a 12,000 rpm per 20 minuti a 4°C ed i soprannatanti sono stati separati dalle frazioni insolubili e conservati a -20°C. Per l'identificazione dei prodotti è stata utilizzata una colonna C18 (Waters) con dimensioni 250 x 4.6 mm (pori di diametro 80 Å). A seconda del prodotto da rilevare sono stati impiegati differenti tamponi e modalità di eluizione, che sono illustrate in Tabella 1.

Il profilo cromatografico è stato registrato in continuo a 274 nm utilizzando un rivelatore Photodiode Array Detector 2996 della Waters.

I prodotti di ossidrilazione sono stati identificati confrontando i tempi di ritenzione e gli spettri UV- visibile ottenuti con quelli di opportuni standard esterni. La quantità di ogni prodotto è stata determinata confrontando l'area dei picchi con quelle ottenute utilizzando standard a concentrazione nota.

Prodotti	T _r (min)	Area (1μmolare)	Solvente A	Solvente B	Eluizione
Fenolo	24,0	19049	H ₂ O +Acido formico 0,1%	Metanolo +Acido formico 0,1%	Per 12 min al 10% di solvente B, in 10 min al 30% di B, per 20 min al 30% di B.
Catecolo	13,8	21868			
o-cresolo	23,1	18659	H ₂ O +Acido formico 0,1%	Acetonitrile +Acido formico 0,1%	Per 5 min al 15% di B, in 5 min al 25% di B, per 30 min al 25% di B.
m- + p-cresolo	22,0	17711			
3-MC	14,1	12082			
4-MC	13,1	20857			
2,3 DMP	26,7	13883	H ₂ O +Acido formico 0,1%	Metanolo +Acido formico 0,1%	Isocratica al 40% di solvente B
3,4 DMP	24,4	20454			
3,4DMC	14,0	17235			
4,5 DMC	11,5	–			

Tabella 1. Tamponi e modalità di eluizione per l'identificazione dei composti indicati in RP-HPLC

La regiospecificità dell'ossidrilazione del toluene è stata invece determinata mediante analisi HPLC utilizzando una colonna Cyclobond I 2000 acetilata (Advanced Separation Technologies Inc.) monitorando l'assorbimento dell'eluato a 274 nm.

La colonna di silice funzionalizzata con β-ciclodestrina acetilata utilizzata consente la separazione dei tre cresoli isomeri senza alcuna procedura di estrazione richiesta dalle usuali analisi gas cromatografiche. I solventi impiegati e le modalità con cui è stata condotta l'eluizione sono riportati in Tabella 2.

Il sistema ha consentito la completa separazione e quindi la determinazione delle percentuali relative di *o*-, *m*- e *p*-cresolo.

Prodotti	T _r (min)	Area (1μmolare)	Solvente A	Solvente B	Eluizione
o-cresolo	12.8	16023	Acetato d'ammonio 20 mM pH 5.0	Metanolo	Per 5 min al 20% di solvente B, in 20 min al 60% di B, per 20 min al 60% di B.
m-cresolo	14.5	16169			
p-cresolo	15.2	21093			

Tabella 2. Tamponi e modalità di eluizione per l'identificazione dei composti indicati

23. Determinazione dei parametri cinetici

23.1. Saggi di attività enzimatica *in continuo*

I parametri cinetici su fenolo, *o*-, *m*-, *p*-cresolo, e 2,3- DMP sono stati determinati impiegando un saggio colorimetrico accoppiato con l'enzima C2,3O. In questa tipologia di saggio, l'ossidazione del substrato, ad opera di cellule esprimenti il complesso multienzimatico PH, ToMO *wt* o mutanti, avviene in presenza di quantità saturanti di catecolo 2,3-diossigenasi, che converte tutto il prodotto formato nella corrispondente semialdeide, che ha un caratteristico spettro di assorbimento nel visibile. In tal modo misurando la velocità di formazione della semialdeide si ha una misura indiretta della velocità di formazione del prodotto.

Il saggio è stato effettuato in un volume di 500 μl, incubando le cellule risospese a 25°C direttamente in cuvetta, in presenza della catecolo 2,3-diossigenasi (3 U). Le cellule indotte sono state impiegate in un intervallo di concentrazione corrispondente a 0.25-0.5 mU/ml. Dopo 2 minuti di incubazione, è stato aggiunto substrato ad una concentrazione compresa tra 0.2 e 800 μM, ed è stata registrata la variazione di assorbimento. La quantità di semialdeide prodotta dal catecolo, dal 3-metilcatecolo, dal 4-metilcatecolo e dal 3,4-dimetilcatecolo è stata determinata misurando l'aumento dell'assorbimento rispettivamente a 375 nm ($\epsilon_{375\text{nm}} 33,000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ per la semialdeide 2-idrossimuconica prodotta dal catecolo), a 388nm ($\epsilon_{388\text{nm}} 13,400 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ per il prodotto del 3-metilcatecolo), a 382 nm, ($\epsilon_{382\text{nm}} 28,100 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ per la semialdeide da 4-metilcatecolo), e a 324 nm, ($\epsilon_{324\text{nm}} 15,310 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ per la semialdeide da 3,4-dimetilcatecolo)

23.2. Saggi di attività enzimatica *in discontinuo*

La determinazione dei parametri cinetici di PH, ToMO *w.t.* e mutanti su benzene, toluene, *o*-xilene e 3,4 dimetilfenolo è stata effettuata mediante saggi *in discontinuo* utilizzando cellule indotte esprimenti tali complessi in un intervallo di concentrazione compreso tra 0.5-1 mU/ml.

Alle cellule esprimenti o il complesso PH, o il complesso ToMO (*wt* o mutanti) sospese in M9-glucosio sono state aggiunte quantità variabili di substrati, fino ad un massimo di concentrazione di 1 mM, in N,N-dimetilformammide. Le diluizioni sono state effettuate in maniera tale che la concentrazione finale di dimetilformammide nel saggio fosse sempre pari all'1% in volume.

A tempi successivi da ciascuno dei campioni sono stati prelevati 500 μl e aggiunti a 10 μl di acido cloridrico (2% finale) in modo da bloccare la reazione. Successivamente i campioni sono stati centrifugati a 12000 rpm per 30 minuti a 4°C e il sopranatante è stato separato dal pellet cellulare.

I soprannatanti sono stati conservati a -20°C fino al momento dell'utilizzo. I campioni sono stati analizzati mediante HPLC secondo le modalità precedentemente descritte (Paragrafo 22) caricando 250 µl di ciascuna delle reazioni.

I parametri cinetici (k_{cat} e K_M), definiti *apparenti* in quanto determinati impiegando cellule intere e non enzimi purificati, sono stati calcolati utilizzando il programma GraphPad Prism (GraphPad software) reperibile al sito internet <http://www.graphpad.com>.

24. Analisi del metabolismo del benzene

La velocità di formazione dei prodotti a partire dal benzene catalizzata da cellule di *E.coli* JM109 esprimenti singolarmente i complessi ToMO o PH o da miscele dei due tipi cellulari è stata misurata mediante saggi *in discontinuo* monitorando la velocità di formazione di fenolo o catecolo, o mediante saggi *in continuo* monitorando solo la velocità di formazione del catecolo.

Quando sono impiegati saggi *in discontinuo*, le cellule sono utilizzate ad una densità ottica corrispondente ad 1 mU/ml ed incubate con benzene 30 µM.

Al contrario nei saggi *in continuo* le cellule sono incubate direttamente in cuvette di quarzo in un volume finale di 500 µl di M9-G, in presenza di 3 U di C2,3O e 30 µM benzene. La formazione di semialdeide 2-idrossimuconica è stata monitorata nel tempo con metodi spettrofotometrici.

25. Analisi del metabolismo del toluene e dell'*o*-xilene

La velocità di formazione dei prodotti ad opera di cellule di *E.coli* JM109 esprimenti PH, ToMO (l'enzima *wt* o mutanti) o miscele dei due è stata misurando impiegando saggi *in discontinuo* con successiva analisi HPLC. I saggi sono stati effettuati incubando le cellule in M9-G ad una densità ottica corrispondente a 1 mU/ml quando sono state incubate con toluene 30 µM, e ad una densità ottica corrispondente a 1.5 mU/ml quando sono state incubate con *o*-xilene 20 µM. Tutte le reazioni sono state condotte a 25°C. Ad intervalli di 5 minuti da ciascuno dei campioni sono stati prelevati 500 µl e le reazioni sono state bloccate aggiungendo 50 µl di HCl 1 M, per un tempo complessivo di reazione di 1.5 h.

26. Cinetica di ossidazione del toluene

Cellule JM109 esprimenti singolarmente i due complessi ToMO e PH sono state miscelate per monitorare, mediante saggi *in discontinuo* e successiva analisi HPLC, la velocità di produzione del 3-MC e del 4-MC a partire dal toluene, variando la concentrazione di ToMO.

I saggi sono stati effettuati in M9-G a 25°C utilizzando cellule esprimenti ToMO a concentrazioni variabili comprese tra 0.29 e 2.32 mU/ml, mantenendo costante la concentrazione di cellule esprimenti PH (0.29 mU/ml). Ad intervalli di 5 minuti da ciascuno dei campioni sono stati prelevati 500 µl e le reazioni sono state bloccate aggiungendo 50 µl di HCl 1 M. I campioni sono stati analizzati mediante HPLC secondo le modalità precedentemente descritte.

27. Cinetica di ossidazione dell'*o*-xilene

27.1. Mediante utilizzo di cellule esprimenti singolarmente i complessi ToMO e PH

Cellule JM109 esprimenti singolarmente i due complessi ToMO e PH sono state miscelate per monitorare la velocità di produzione di 3,4-DMC in presenza di *o*-xilene

40 μ M, mediante saggi in continuo accoppiati con la catecolo 2,3-diossigenasi (8 U/ml).

I saggi sono stati effettuati in M9-G a 25°C utilizzando cellule esprimenti ToMO a concentrazioni variabili comprese tra 0.3 e 6 mU/ml, mantenendo costante la concentrazione di cellule esprimenti PH (0.5 mU/ml). Inoltre sono stati eseguiti saggi a concentrazioni variabili di cellule esprimenti PH (in un intervallo da 0.36 a 1 mU/ml) mantenendo costante la concentrazione di cellule esprimenti ToMO (4.5 mU/ml). La velocità di formazione del 3,4-DMC è stata determinata monitorando la variazione di assorbimento a 324 nm come descritto nel paragrafo 23.1.

27.2. Mediante utilizzo di cellule esprimenti entrambi i complessi ToMO e PH

Cellule JM109 trasformate con il costrutto pGEM-3Z/*tou-ph* esprimenti entrambi i complessi enzimatici sono state incubate in presenza di *o*-xilene 40 μ M in M9-G a 25°C. La velocità di formazione del 3,4-DMC è stata determinata con un saggio in continuo accoppiato con l'enzima C2,3O come descritto nel paragrafo precedente.

E' stata utilizzata una concentrazione di cellule corrispondente a 1.17 mU/ml di ToMO e 0.5 mU/ml di PH.

Le mU/ml di ToMO e PH sono state calcolate sfruttando la diversa regioselettività che i due complessi hanno sul substrato 3,4-DMP. In primo luogo l'attività specifica totale delle cellule, attribuibile ad entrambe le monoossigenasi, è stata determinata mediante saggi continui accoppiati con la C2,3O su fenolo quale substrato. L'attività enzimatica di ToMO è stata misurata seguendo la conversione del 3,4-DMP in 4,5-DMC poiché questo prodotto è formato quasi esclusivamente da ToMO. A tal fine sono stati effettuati saggi discontinui e rivelazione HPLC dei prodotti con modalità descritte nel paragrafo 22. L'attività di PH su fenolo è stata calcolata per differenza tra l'attività specifica totale e l'attività di ToMO.

28. Crescita di *Pseudomonas* PAW1

Il batterio *Pseudomonas* PAW1 è stato cresciuto su terreno minimo solido M9 in presenza di malato 10 mM come fonte di carbonio e di 4-metil-benzil-alcool 2 mM come induttore del TOL *pahway*. La presenza di tale composto aveva lo scopo di mantenere una pressione selettiva ed evitare la perdita del plasmide pWW0 dal batterio in esame. La crescita è stata condotta per 48 h a 25°C.

29. Isolamento del plasmide pWW0

L'isolamento del plasmide pWW0 (116,580 bp) è stato eseguito impiegando un protocollo specifico per plasmidi di grandi dimensioni proposto da Kado e Liu [134].

10 colonie dalla piastra di mantenimento di PAW1 sono state risospese in 100 μ l di TE (Tris HCl 10 mM, EDTA 1mM pH 8.0) e incubate per 5 minuti a RT. Successivamente sono stati aggiunti 200 μ l di lysing solution (Tris 50 mM, SDS 3% pH:12.6) ed il campione è stato incubato per circa 60 minuti a 55°C. Non è stato effettuato alcun passaggio di precipitazione con sali o solventi organici, previsto dai classici protocolli di mini-preparazione, poiché in questo stadio plasmidi di grandi dimensioni tendono a co-precipitare con il DNA genomico. Successivamente al campione è stato aggiunto un ugual volume di una soluzione fenolo-cloroformio-alcol isoamilico nel rapporto 25 : 24 : 1 (estrazione con solventi organici), la miscela è stata quindi agitata per inversione e centrifugata per 3 min a 10,000 rpm a temperatura ambiente. La fase acquosa contenente il DNA plasmidico è stata caricata su gel di agarosio all'1%. La verifica dell'identità del plasmide pWW0 isolato è stata eseguita mediante analisi di restrizione.

30. Costruzione del vettore d'espressione pACYcDuet/ *xyIM*- *xyIA*

I geni codificanti per le due componenti della Xilene Monoossigenasi (la componente reductasica *XyIM* e la componente ossidrilasica *XyIA*) sono stati ottenuti a partire dal vettore pWW0 isolato dal batterio PAW1 mediante amplificazione per PCR.

L'amplificazione è stata condotta utilizzando due oligonucleotidi specifici per inserire a monte e a valle del frammento genico i siti di riconoscimento di opportuni enzimi di restrizione per un corretto clonaggio in pACYcDuet-1. Le sequenze degli oligo utilizzati per l'amplificazione del gene *xyIM* e del gene *xyIA* sono le seguenti:

5'-CATGCCATGGACACGCTTCGTTATT-3'	oligo <i>xyIM</i> <u>NcoI</u> monte
5'-CGCGGATCCTCAAATGCTAGCCACCCG-3'	oligo <i>xyIM</i> <u>BamHI</u> valle
5'-CGCGGATCCCTAATTAACGGGCGTCT-3'	oligo <i>xyIA</i> <u>BamHI</u> monte
5'-CGGGGTACCAAGCTTCTGCTACTGCT-3'	oligo <i>xyIA</i> <u>KpNI</u> valle

L'amplificazione dei frammenti è stata eseguita utilizzando le seguenti condizioni: 50 ng di plasmide pWW0 impiegato come DNA stampo, 2.5 U di pfu polimerasi (acquistata dalla Stratagene), 10 µl di tampone per pfu 10X (200 mM Tris/HCl pH 8.8, 1% TritonX-100, 20 mM MgCl₂, 100 µg/ml BSA nuclease free, 100 mM KCl e 60 mM (NH₄)₂SO₄), dNTP ad una concentrazione finale di 50 µM (per ogni dNTP) e i primers ad una concentrazione finale di 1 µM ciascuno per un volume finale di 100 µl. Sono stati fatti 20 cicli di amplificazione, ognuno dei quali prevede 1.5 min a 94°C, 1 min a 46°C, 1 min a 72°C più una estensione di 5 sec ad ogni ciclo. L'amplificazione è stata conclusa con un ciclo di 10 min a 72°C, e il campione è stato portato ad una temperatura di 4°C. 5 µl delle miscele di reazione sono stati analizzati su gel di agarosio all'1% per assicurarsi dell'avvenuta amplificazione. I frammenti amplificati sono stati purificati utilizzando il kit Wizard PCR Preps DNA Purification System acquistato dalla Promega.

I frammenti amplificati sono stati digeriti con opportuni enzimi di restrizione (doppia digestione con NcoI e BamHI per *xyIM*; doppia digestione BamHI e KpNI per *xyIA*) utilizzando le seguenti condizioni: 1.5 µg di frammento amplificato per PCR sono stati incubati a 37°C per 2 h con 20 U dell'opportuno enzima in presenza del tampone consigliato dalla casa produttrice. Il prodotto di digestione è stato interamente caricato su gel di agarosio all'1% e il frammento digerito è stato purificato utilizzando il kit Wizard PCR Preps DNA Purification System acquistato dalla Promega.

Il vettore di espressione pACYcDuet è stato linearizzato con gli enzimi di restrizione NcoI e KpNI ed è stato estratto e purificato da gel di agarosio mediante impiego del kit sopra menzionato.

Si è poi proceduto alla ligazione dei due frammenti nel vettore eseguendo una reazione di ligasi a tre componenti. Per tale reazione è stato usato un rapporto vettore: frammento *xyIM*: frammento *xyIA* di 1:3:3 in presenza di 1 µl ATP 10 mM e di 1 µl di tampone per la ligasi 10X in un volume finale di 9 µl. La miscela di ligazione è stata tenuta 10 min a 42°C, 10 min a temperatura ambiente ed infine è stata avviata la reazione aggiungendo 3 U di T4 DNA ligasi, incubando per 18 h a 4°C. Il prodotto di ligazione è stato quindi usato per trasformare il ceppo di *E. coli* JM101.

I cloni ricombinanti sono stati identificati mediante analisi di restrizione. Il plasmide risultante è stato indicato come pACYcDuet/*xyIM*-*xyIA*.

31. Espressione della xilene monoossigenasi ricombinante

100 μ l di cellule competenti del ceppo BL21(DE3) sono state trasformate con 20 ng dei plasmide pACYcDuet/ *xyIM-xyIA*. Le cellule trasformate sono state piastrate su LB/Agar contenente cloramfenicolo (30 μ g/ml) ed incubate a 37°C per 19 h.

Una colonia è stata prelevata dalla piastra di trasformazione ed inoculata in 200 ml di LB/CF (30 μ g/ml). La coltura è stata incubata a 37°C in forte agitazione fino ad una densità ottica pari a 0.6 O.D._{600 nm} /ml e quindi indotta mediante aggiunta di IPTG (0.4 mM). Alla coltura è stato aggiunto anche Fe(NH₄)₂(SO₄)₂ (100 μ M) per favorire la formazione del centro metallico della componente ossidrilasica XylA del complesso. L'espressione è stata fatta avvenire a 37°C per 2h. Le cellule sono state raccolte mediante centrifugazione a 3000 rpm per 10 minuti a 4°C.

Il pellet cellulare è stato risospeso in 100 μ l di tampone cracking 3x (Tris/HCl 100 mM, EDTA 4 mM, glicerolo 30%, SDS 2%, β -mercaptoetanol 28 mM) quindi le cellule sono state incubate a 100°C per 15 minuti. Successivamente i lisati cellulari sono stati esaminati per SDS-PAGE.

32. Saggi di attività della xilene monoossigenasi su *p*-xilene

Cellule BL21(DE3) sono state trasformate con il costrutto pACYcDuet/ *xyIM-xyIA* ed indotte come precedentemente descritto (Paragrafo 31). Le cellule sono state raccolte mediante centrifugazione a 3,500 rpm per 10 minuti a 4°C e di seguito sospese in M9-G in modo tale da avere una concentrazione cellulare finale pari a 4 O.D._{600 nm} /ml. L'attività enzimatica del complesso XMO su *p*-xilene è stata analizzata mediante saggi in discontinuo. Cellule indotte risospese in M9-G ad una concentrazione finale di 0.3 O.D._{600 nm} /ml sono state incubate con *p*-xilene, disciolto in N,N-dimetilformammide, ad una concentrazione finale pari ad 1 mM. A tempi successivi da ciascuno dei campioni sono stati prelevati 500 μ l e aggiunti a 10 μ l di acido cloridrico (2% finale) in modo da bloccare la reazione. Successivamente i campioni sono stati centrifugati a 12000 rpm per 30 minuti a 4°C e il soprannatante è stato separato dal pellet cellulare.

I soprannatanti sono stati esaminati mediante una cromatografia a fase inversa per HPLC. La cromatografia è stata effettuata su colonna C18 della Waters utilizzando come tamponi : H₂O/acido formico 0,1% (solvente A) e Metanolo/acido formico 0,1% (solvente B). L'eluizione è stata condotta in modalità isocratica al 40% di solvente B applicando un flusso 1 ml/min. Il profilo cromatografico è stato registrato in continuo a 274 nm utilizzando un rivelatore Photodiode Array Detector 2996 della Waters.

Nel tempo è stata monitorata la velocità di formazione del composto 4-metil-benzil-alcool, derivante dall'ossidrilazione del *p*-xilene ad opera della XMO

Il tempo di ritenzione di tale composto è stato ottenuto impiegando uno standard esterno (acquistato dalla SIGMA) ed è risultato pari a 18.8 min. La quantità di prodotto formato nel tempo è stata rivelata dal confronto con l'area di una soluzione standard a concentrazione nota.

Una milliunità è definita come la quantità di cellule (misurata in O.D._{600nm} /ml.) che ossida una nanomole di *p*-xilene per min a 25°C.

33. Saggi combinati ToMO-XMO su *o*- e *p*-xilene

I saggi sono stati eseguiti utilizzando singolarmente cellule JM109 esprimenti il complesso ToMO, cellule BL21(DE3) esprimenti il complesso XMO e miscele dei due tipi cellulari.

Le cellule sono state incubate in presenza di *o*-xilene, *p*-xilene e miscele dei due ad una concentrazione per entrambi pari a 1mM.

A tempi successivi sono state prelevate aliquote da 500 µl a cui sono stati aggiunti 10 µl di acido cloridrico (2% finale). I campioni sono stati centrifugati a 12,000 rpm per 30 minuti a 4°C ed i sopranatanti sono stati analizzati mediante HPLC. La colonna utilizzata e le modalità dell'eluizione sono le medesime di quelle riportate nel paragrafo 32.

Nel tempo è stata monitorata la velocità di formazione del 2,5-, 2,3-, 3,4- DMP, e del 4MBOH. I tempi di ritenzione di tali composti, ottenuti utilizzando standard esterni (acquistati dalla SIGMA) sono risultati i seguenti: 29,9; 26,7; 24,4; e 18,8 min.

La concentrazione de campioni di ciascun composto è stata ottenuta dal confronto della aree con quelle di standard a concentrazione nota.

34. Analisi di sequenze

La ricerca di sequenze per omologia è stata effettuata utilizzando i programmi **Blast** e **Psi-Blast** presso il sito internet dell'NCBI (indirizzo: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). Per entrambi i programmi sono stati impiegati i parametri standard del sito. La banca dati in cui è stata effettuata la ricerca è la banca dati "non redundant" che corrisponde alla somma di tutte le sequenze nelle banche dati SwissProt, PIR, PRF, PDB e GenBank (traduzioni delle *open reading frames* della banca di sequenze di DNA).

35. Espressione preparativa degli enzimi HMSD e HMSH

Il ceppo JM109 è stato trasformato con 20 ng del costrutto pVS1934 (pUC19/ *hmsd/ hmsH/ dmpl*). Le cellule trasformate sono state piastrate su LB/Agar contenente ampicillina, ed incubate ad una temperatura di 37°C per 19 h. Dalla piastra di trasformazione è stata prelevata una colonia ed inoculata in 200 ml di LB/Amp. La coltura è stata fatta crescere a 37°C in forte agitazione per 15 h. La coltura satura è stata diluita 1:100 in 1 L di LB/Amp e lasciata crescere a 37°C in forte agitazione fino ad una densità ottica di 0.6 O.D._{600nm}/ml. Alla coltura è stata poi aggiunto IPTG alla concentrazione di 0.4 mM. La coltura è stata lasciata crescere per altre 2 h a 37°C, le cellule sono state poi raccolte mediante centrifugazione a 6,000 rpm per 10 min a 4°C, sospese in tampone contenente Tris 50 mM pH 8,5, glicerolo 10%, EtOH 10%, DTT 1mM e lisate mediante sonicazione (6 cicli di 1 min ad un'intensità pari a 332.5 Watts). La frazione solubile è stata separata da quella insolubile mediante centrifugazione a 12,000 rpm per 45 min a 4°C e successivamente filtrata con l'utilizzo di filtri con pori di diametro pari a 0.45 µm.

36. Cromatografia a scambio ionico Q- Sepharose

Per purificare le proteine di interesse dalle altre presenti nella frazione citosolica, è stata utilizzata una resina a scambio anionico Q-Sepharose (F.F.) acquistata dalla Pharmacia Biotech in colonne di dimensioni 1 cm (diametro) x 18 cm (altezza), con un volume totale di resina di circa 12 mL.

La colonna è stata equilibrata in tampone A contenente Tris/HCl 50 mM, pH 8.5, etanolo 10%, glicerolo 10%, DTT 2mM, NaCl 0.08 M.

L'eluizione è stata eseguita a 4°C nello stesso tampone con un gradiente salino lineare da 0.08 M NaCl a 0.6 M NaCl al flusso di 17 mL/h con un aumento della forza ionica di 0.00162 M/mL. Il volume delle frazioni raccolte è stato circa 2.3 mL. Il cromatogramma è stato ottenuto misurando l'assorbimento dell'eluato a 280 nm. I saggi di attività eseguiti sulle frazioni raccolte sono descritti nel paragrafo 42. Le frazioni che esibivano attività idrolasica sono state eluite ad una concentrazione di

NaCl pari a 0.05 M, le frazioni con attività deidrogenasica invece ad una concentrazione 0.24 M di NaCl.

37. Cromatografia a esclusione molecolare S-300

Per le cromatografie ad esclusione molecolare è stata utilizzata una colonna di dimensioni 2.8 cm x 50 cm, l'eluizione è stata condotta a 4°C ad un flusso di circa 10 ml/h. E' stata impiegata sia per la purificazione di HMSD sia per quella di HMSH un resina Sephacryl S-300 (Pharmacia Biotech).

Per entrambi le cromatografie è stato impiegato il tampone NaP 20 mM pH 7.0, glicerolo 10%, NaCl 0.25 M, DTT 1 mM. Il volume delle frazioni raccolte è stato 1.77 mL per la purificazione di HMSH e 3 ml per la purificazione di HMSD. In entrambi i casi i cromatogrammi sono stati ottenuti misurando l'assorbimento dell'eluato a 280 nm. I saggi di attività eseguiti sulle frazioni raccolte sono descritti nel paragrafo 42. Le frazioni di interesse sono state riunite e conservate in atmosfera di azoto a -80°C.

38. Determinazione della concentrazione proteica

Tale analisi è stata realizzata spettrofotometricamente mediante l'uso di un saggio colorimetrico utilizzando il reattivo di Bradford acquistato dalla Sigma e seguendo le istruzioni fornite dalla casa produttrice.

39. Trasferimento di proteine su membrana PVDF

Per ottenere informazioni di sequenza su campioni separati mediante SDS-PAGE, dopo l'elettroforesi le proteine sono state trasferite su membrana PVDF.

Al termine della separazione elettroforetica è stato composto il supporto per l'elettroblotting, preincubando la membrana in metanolo per un minuto. Il trasferimento è stato effettuato per 1.5 h a 4°C utilizzando un'intensità di corrente pari a 100 V in tampone contenente CAPS 10 mM pH 11 e metanolo 10%. La membrana è stata colorata con rosso Ponceau, decolorata con acqua e asciugata all'aria. La banda corrispondente alla proteina d'interesse è stata tagliata con un bisturi e direttamente caricata al sequenziatore automatico.

40. Analisi di sequenza N-terminale

La determinazione della sequenza N-terminale è stata effettuata dal Dott. Antimo Di Maro, Dipartimento di Scienze della Vita, Seconda Università di Napoli, mediante degradazione di Edman usando un sequenziatore automatico della Applied Biosystems, modello 473 A,

41. Preparazione dei composti: semialdeide da catecolo, 4-MC e 3-MC.

I substrati degli enzimi HMSD e HMSH sono stati preparati incubando in reazioni separate catecolo, 4-MC e 3-MC ognuno ad una concentrazione finale 500 μ M con l'enzima C2,3O (3U totali per reazione) in tampone NaP 20 mM pH 7,5. La reazione è stata incubata per 10 minuti a RT. La totale conversione dei catecoli nei corrispondenti prodotti di idrolisi (semialdeidi o chetoni) è stata verificata spettrofotometricamente.

I coefficienti di estinzione molare impiegati sono i seguenti: $\epsilon_{375\text{nm}}$ 33,000 $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ per la semialdeide 2-idrossimuconica prodotta dal catecolo, $\epsilon_{388\text{nm}}$ 13,400 $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ per il prodotto del 3-metilcatecolo, $\epsilon_{382\text{nm}}$ 28,100 $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ per la semialdeide da 4-metilcatecolo.

42. Preparazione dei substrati: prodotto di apertura del 3,5 e 3,6 DMC

La preparazione di tali substrati è stata eseguita nelle medesime condizioni ma utilizzando una forma mutata dell'enzima C2,3O (C2,3O-T249S), realizzata dalla dott.ssa Viggiani nel laboratorio in cui è stato svolto il presente progetto di ricerca. Tale enzima esibisce un'aumentata efficienza catalitica sui substrati 3,5 DMC e 3,6 DMC, rispetto all'enzima C2,3O *wt*. I coefficienti di estinzione molare impiegati sono i seguenti: $\epsilon_{393\text{nm}} 13,000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ per il prodotto di fissione del 3,5-DMC, $\epsilon_{393\text{nm}} 24,000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ per il prodotto del 3,6-DMC.

43. Saggi di attività deidrogenasica e idrolasica

Per i saggi di attività deidrogenasica 10 μl della frazione da esaminare sono stati incubati in presenza di semialdeide 2-idrossimuconica 60 μM (preparata come riportato nel paragrafo 40) in tampone NaP 40 mM pH 7.5 in presenza di NAD^+ 0.5 mM ed è stata monitorata la diminuzione di assorbimento a 375 nm utilizzando un $\epsilon_{375\text{nm}} 33,000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

Per i saggi di attività idrolasica 10 μl della frazione da esaminare sono stati incubati in presenza del prodotto di apertura del 3-MC (vedi paragrafo 40) in tampone NaP 40 mM pH 7.5 ed è stata monitorata la diminuzione di assorbimento a 388 nm utilizzando un $\epsilon_{388\text{nm}} 13,400 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

44. Determinazione dei parametri cinetici su semialdeide da catecolo, 4-MC e 3-MC.

Per la determinazione dei parametri cinetici di HMSH e di HMSD è stata misurata la velocità di reazione in funzione della concentrazione di substrato usando una concentrazione fissa di enzima. Per i prodotti di fissione del catecolo, del 3-MC e del 4-MC è stata monitorata nel tempo la diminuzione di assorbimento rispettivamente a 375, 388 e 382 nm. I coefficienti di estinzione molare utilizzati sono stati precedentemente riportati (Paragrafo 40). I saggi sono stati condotti in tampone NaP 40 mM pH 7.5 incubando una concentrazione di enzima determinata con quantità variabili dei diversi substrati. Per i saggi condotti sul prodotto di fissione del catecolo la concentrazione di enzima HMSH è stata 0.0246 μM e l'intervallo di concentrazione scelto tra 25-500 μM , per il prodotto di fissione del 3-MC la concentrazione di HMSH è stata 0.0008 μM e il substrato tra 5-200 μM , per il prodotto di fissione del 4-MC la concentrazione di enzima 0.0185 μM e il substrato tra 10-100 μM .

Per la determinazione dei parametri cinetici di HMSD sul prodotto di fissione del catecolo è stata impiegata una concentrazione di enzima pari a 0.036 μM e l'intervallo di concentrazione scelto tra 0.5-60 μM , per i saggi sul prodotto di fissione del 4-MC l'enzima pari a 0.0118 μM e il substrato tra 1-60 μM . Il prodotto di fissione del 3-MC è un chetone che abbiamo verificato non essere un substrato riconosciuto da HMSD.

I parametri cinetici (k_{cat} e K_M) sono stati calcolati utilizzando il programma GraphPad Prism (GraphPad software) reperibile al sito internet <http://www.grafpad.com>.

45. Saggi di attività su semialdeide da 3,5 e 3,6 DMC

I saggi di attività di HMSD e HMSH su prodotti di apertura del 3,5 e del 3,6-DMC sono stati condotti incubando direttamente in cuvetta le proteine parzialmente purificate in tampone NaP 50 mM pH 7.5 in presenza dei prodotti di apertura del 3,5 e del 3,6-DMC preparati come precedentemente illustrato (paragrafo 41). Le due proteine sono state utilizzate in un intervallo di concentrazione compreso tra 0.2-0.8

μM in presenza dei substrati a due concentrazioni differenti: 1.25 e 25 μM . Sono stati registrati in tali condizioni gli spettri di assorbimento relativi ai due prodotti ed è stato monitorato il loro andamento in funzione del tempo.

Non è stata osservata in nessuna delle condizioni utilizzate alcuna variazione nello spettro di assorbimento dei substrati e ciò è stato imputato ad una mancanza di attività delle due proteine su tali composti.

RISULTATI SPERIMENTALI E DISCUSSIONE

I Parte

STUDIO DEGLI UPPER PATHWAYS DI *Pseudomonas stutzeri* OX1

In questa prima parte del lavoro di tesi è stato affrontato lo studio degli enzimi dell' *upper pathway* di *P. stutzeri* OX1, ToMO e PH, al fine di comprendere il ruolo metabolico della coesistenza di due attività enzimatiche simili nel batterio.

Prima di iniziare la descrizione degli esperimenti di questa linea di ricerca occorre però una premessa metodologica.

Quando, nel laboratorio dove è stato sviluppato questo lavoro, si sono incominciate a studiare le attività enzimatiche monoossigenasiche di *P. stutzeri* OX1, si è immediatamente verificato che la loro purificazione, trattandosi di proteine oligomeriche, portava alla purificazione delle subunità. Pertanto, la loro caratterizzazione biochimica e cinetica richiedeva la ricostituzione dell'oligomero *in vitro*. Inoltre, poiché le reazioni catalizzate da ossigenasi richiedono la presenza di cofattori, risultava difficile definire la loro quantità ottimale nell'allestimento di saggi funzionali. Questa problematica è stata riscontrata anche nello studio di altri complessi ossigenasici [135]. Per tali motivi lo studio delle proprietà catalitiche delle ossigenasi è stato spesso condotto caratterizzando gli enzimi non purificati, presenti all'interno delle cellule utilizzate per l'espressione dei complessi proteici [105, 136].

Pertanto nel laboratorio in cui è stato svolto il presente lavoro si è preventivamente verificato [100] che utilizzando cellule esprimenti i complessi multienzimatici della Toluene/*o*-xilene Monoossigenasi (ToMO) e quello della Fenolo Ossidrilasi (PH) si misuravano parametri dell'attività catalitica identici a quelli misurati utilizzando gli enzimi ottenuti per via ricombinante e ricostituiti *in vitro* a partire dalle subunità.

A partire da questa verifica sperimentale in questo lavoro di tesi la caratterizzazione dei parametri catalitici degli enzimi ToMO e PH è stata effettuata su cellule ricombinanti esprimenti i due complessi. Pertanto i cluster genici codificanti per ToMO e per PH sono stati espressi separatamente o insieme in cellule di *E.coli* JM109 e la loro attività enzimatica è stata saggiata *in vivo*.

- **Clonaggio del cluster genico *ph* nel vettore pGEM-3Z**

Per l'espressione del complesso ToMO e del complesso PH potevamo disporre rispettivamente dei costrutti pBZ1260 e pJSX148. In quest'ultimo costrutto il cluster genico *ph* è stato clonato nel vettore pJB3Km1 [137], a valle del promotore *lac*. Tuttavia, tale vettore presenta un controllo stringente della sua replicazione per cui è presente in un basso numero di copie nei ceppi cellulari in cui viene amplificato. Ciò conduce ad un basso livello di espressione del cluster genico *ph*, insufficiente per la realizzazione degli esperimenti descritti in questo lavoro di tesi.

Poiché l'impiego del costrutto pBZ1260 [37], in cui il cluster genico *tau* è stato clonato nel vettore pGEM-3Z, ha consentito di ottenere elevati livelli di espressione del complesso ToMO, si è ritenuto opportuno clonare anche il cluster *ph* nel vettore d'espressione pGEM-3Z. Quest'ultimo è un vettore di espressione IPTG inducibile ad alto numero di copie, che consente di ottenere maggiori livelli di espressione delle proteine di interesse.

Per la realizzazione del costrutto pGEM-3Z/*ph* il cluster genico *ph* è stato estratto dal costrutto pJSX148 mediante digestione con l'enzima di restrizione XbaI, essendo presenti due siti di restrizione per l'enzima a monte e a valle della regione genica in esame. La strategia utilizzata per il clonaggio del cluster *ph* nel vettore pGEM-3Z è

riportata nella sezione Materiali e Metodi. Il costrutto realizzato pGEM3Z-*ph* è mostrato in Figura 1.

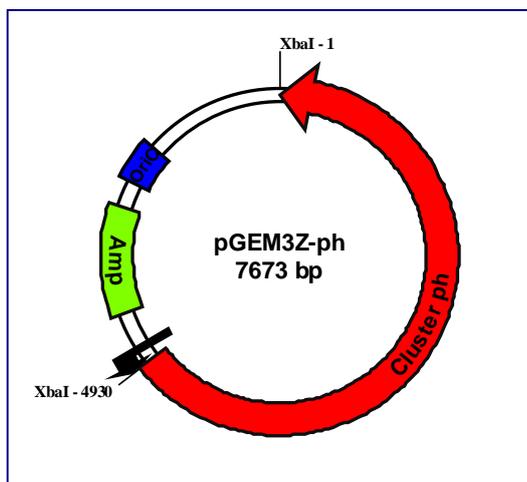


Figura 1. Costrutto pGEM3Z-*ph*

- **Clonaggio del cluster genico *ph* nel costrutto pBZ1260 (pGEM-3Z/*tou*)**

Come detto nel precedente paragrafo i saggi riportati in questo lavoro di tesi sono stati effettuati utilizzando cellule intere esprimenti singolarmente i complessi ToMO e PH, o miscele dei due tipi cellulari. Inoltre, allo scopo di verificare che le membrane cellulari batteriche non costituiscono un ostacolo al trasporto di substrati e prodotti, nel caso di utilizzo di miscele di ricombinanti, i risultati ottenuti utilizzando miscele di cellule esprimenti singolarmente ToMO e PH sono stati confrontati con quelli eseguiti impiegando cellule in grado di esprimere i due complessi nel medesimo compartimento.

Al fine di esprimere i due complessi monossigenasici all'interno delle medesime cellule si è proceduto alla realizzazione di un costrutto contenente entrambi i cluster genici.

Il cluster genico *ph* è stato estratto dal costrutto pJSX148 [34] mediante digestione con l'enzima di restrizione XbaI, e clonato nel plasmide pBZ1260, linearizzato con il medesimo enzima di restrizione, a monte del cluster genico *tou*. La strategia utilizzata per il clonaggio è stata descritta nella sezione Materiali e Metodi. Il plasmide risultante è stato denominato pGEM-3Z/*tou-ph* ed è illustrato in Figura 2.

E' importante notare che il plasmide così realizzato permette la trascrizione delle cornici aperte di lettura di TOMO e di PH in un singolo mRNA sotto il controllo del promotore *lac* del vettore pGEM-3Z.

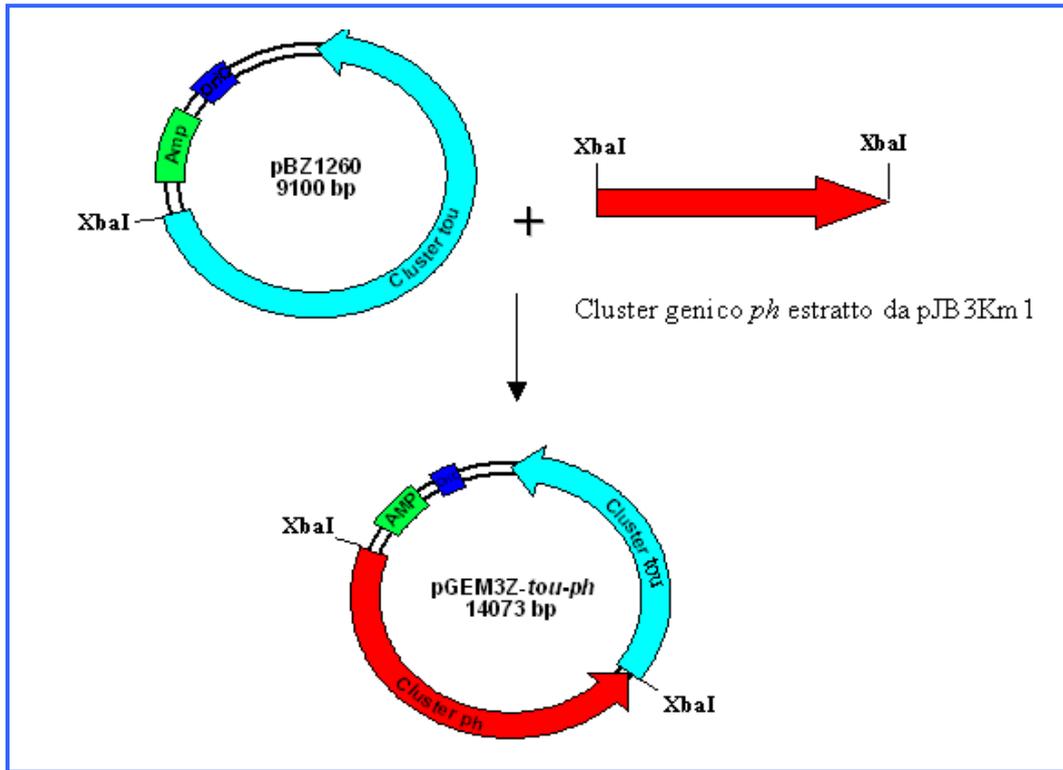


Figura 2. Clonaggio del cluster genico *ph* nel pBZ1260

- **Espressione di ToMO e PH in *E. coli* JM109**

I plasmidi pBZ1260, pGEM-3Z/*ph* e pGEM-3Z-*tou-ph* sono stati utilizzati per trasformare il ceppo di *E. coli* JM109. I ceppi ricombinanti sono poi serviti per l'espressione degli enzimi come descritto nella sezione Materiali e Metodi. L'analisi elettroforetica su SDS-PAGE delle frazioni solubili ed insolubili delle colture indotte ha consentito di evidenziare l'espressione del complessi ToMO e PH nelle frazioni solubili delle colture indotte come illustrato in Figura 3.

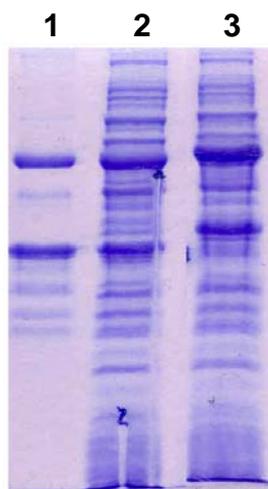


Figura 3. Analisi elettroforetica su gel SDS-PAGE

1. Complesso BEA purificato (2.4 μ g)
2. Frazione solubile di cellule JM109/pBZ1260 indotte
3. Frazione solubile di cellule JM109/pGEM-3Z/*ph* indotte

Per poter verificare la contemporanea espressione di ToMO e di PH nelle medesime cellule abbiamo confrontato la migrazione elettroforetica delle proteine presenti nei lisati cellulari con quella osservabile per cellule esprimenti singolarmente i complessi ToMO e PH (Figura 4). Le subunità dei due complessi hanno dimensioni e mobilità elettroforetica molto simili, fatta eccezione per le subunità ToMO E e PH L che presentano un peso molecolare simile, rispettivamente 38,203 Da e 38,282 Da, ma mobilità elettroforetica differente. L'analisi elettroforetica delle frazioni solubili di colture indotte ha consentito di osservare la presenza di bande con mobilità attesa per proteine di dimensioni pari alle subunità di ToMO e di PH. I livelli di espressione di ToMO e PH sono stati determinati mediante analisi densitometrica su SDS-PAGE.

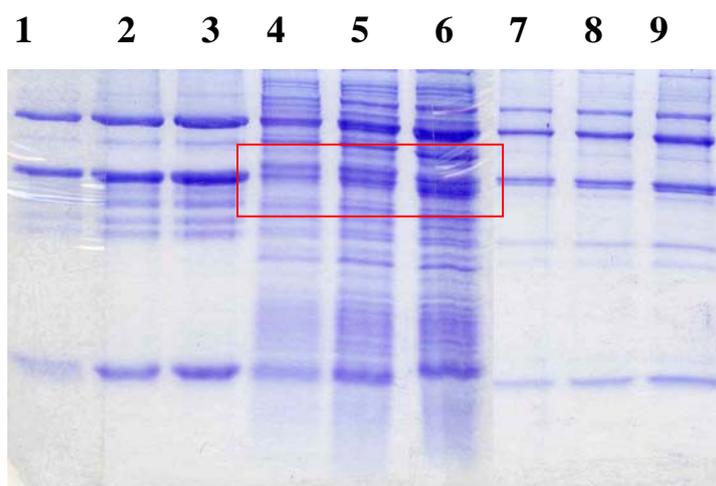


Figura 4. Analisi elettroforetica su SDS-PAGE.

- 1) Complesso BEA purificato (1.2 µg)
- 2) Complesso BEA purificato (2.4 µg)
- 3) Complesso BEA purificato (4.8 µg)
- 4) Frazione solubile di cellule JM109/pGEM-3Z/*tou-ph* (0.042 OD totali)
- 5) Frazione solubile di cellule JM109/pGEM-3Z/*tou-ph* (0.084 OD totali)
- 6) Frazione solubile di cellule JM109/pGEM-3Z/*tou-ph* (0.126 OD totali)
- 7) Complesso LNO purificato (1.2 µg)
- 8) Complesso LNO purificato (2.4 µg)
- 9) Complesso LNO purificato (4.8 µg)

- **Determinazione dell'attività specifica sul fenolo**

Gli esperimenti riportati in questo lavoro di tesi sono stati eseguiti utilizzando diverse preparazioni cellulari esprimenti i complessi ToMO e PH, insieme o separatamente, ed è stata misurata ogni volta l'attività specifica sul substrato fenolo di tutte le colture impiegate.

L'attività specifica su tale substrato è stata pertanto utilizzata come valore di riferimento allo scopo di rendere confrontabili saggi enzimatici effettuati utilizzando preparazioni differenti di ciascuna proteina

I plasmidi pGEM-3Z/*ph*, pBZ1260, pGEM-3Z/*tou-ph* sono stati utilizzati per trasformare il ceppo di *E. coli* JM109 ed esprimere rispettivamente i complessi PH e ToMO separatamente, o nello stesso compartimento cellulare. Le cellule indotte sono state risospese in mezzo di coltura minimo M9-G ed incubate con fenolo per la determinazione dell'attività specifica come descritto nei Materiali e Metodi.

Le cellule esprimenti ToMO, PH e ToMO-PH hanno mostrato attività specifiche su fenolo comprese nell'intervallo 10-16 mU/OD_{600nm}.

METABOLISMO DEL BENZENE

Per far luce sul significato della coesistenza dei due enzimi ToMO e PH abbiamo investigato la cinetica e la specificità di substrato di entrambi i complessi su differenti composti. Il primo substrato analizzato è stato il benzene. La prima ossidrilazione del benzene porta alla formazione di fenolo, a sua volta l'ossidrilazione del fenolo porta alla formazione di catecolo.

Occorre ricordare che una efficiente produzione di catecolo, substrato del successivo enzima del *pathway*, la catecolo 2,3 diossigenasi, è un requisito essenziale per l'efficienza complessiva della via metabolica.

Sono stati misurati i parametri cinetici dei due complessi su benzene e su fenolo, usando cellule intere di *E.coli* JM109 esprimenti i complessi ToMO e PH dai vettori pGEM-3Z/*ph* e pBZ1260 rispettivamente. E' stata inoltre monitorata la velocità di produzione di catecolo ad opera di cellule esprimenti singolarmente i due complessi e ad opera di miscele dei due tipi cellulari.

- **Determinazione dei parametri cinetici di ToMO e PH su benzene e su fenolo**

Per la determinazione dei parametri cinetici di ToMO e PH sui substrati benzene e fenolo sono state eseguite due differenti tipologie di saggio: saggi *in continuo* per il substrato fenolo ed *in discontinuo* per il substrato benzene con modalità per entrambi descritte nella sezione Materiali e Metodi. I saggi *in continuo* sono saggi accoppiati con l'enzima catecolo2,3diossigenasi che è capace di utilizzare come substrato le molecole prodotte da ToMO e PH con produzione di un composto con un caratteristico spettro di assorbimento nel visibile e pertanto facilmente rilevabile con metodi spettrofotometrici.

Nei saggi in discontinuo, invece, dopo l'aggiunta del substrato la reazione è bloccata a tempi successivi con HCl ed i campioni sono analizzati mediante reverse-phase HPLC (RP-HPLC).

I parametri cinetici sono stati determinati interpolando i punti sperimentali con la legge cinetica di Michaelis-Menten, utilizzando il programma GraphPad Prism e sono riassunti nella Tabella1.

TABELLA 1

Substrato	PH			ToMO		
	k_{cat} (sec ⁻¹)	K_M (μM)	$k_{cat}/K_M \times 10^3$ (sec ⁻¹ μM ⁻¹)	k_{cat} (sec ⁻¹)	K_M (μM)	$k_{cat}/K_M \times 10^3$ (sec ⁻¹ μM ⁻¹)
BENZENE	0.092	25	3.7	0.36	~0.2	1810
FENOLO	1.02	0.6	1696	1.00	2.18	460

Tabella 1. Parametri cinetici di ToMO e PH su benzene e fenolo

Come si può osservare dai valori riportati, sia ToMO che PH sono in grado di catalizzare entrambe le reazioni di ossidrilazione. E' d'altronde importante notare che ToMO mostra una costante di specificità nella prima reazione di ossidrilazione che è circa 4 volte più alta che nella seconda reazione. Questo è essenzialmente dovuto al suo valore di K_M su benzene che è di un ordine di grandezza più basso di quello su fenolo, mentre il valore della sua k_{cat} su fenolo è circa 2,5 volte più alto che su benzene. Al contrario l'efficienza catalitica di PH su fenolo è notevolmente più alta che su benzene. Infatti, il rapporto k_{cat} / K_M di PH su fenolo è circa 460 volte più alto che su benzene. Ciò è dovuto sia al valore di k_{cat} che di K_M . La K_M di PH per il benzene è 40 volte più alta che per il fenolo, contemporaneamente il suo valore di k_{cat} per il fenolo è circa 10 volte più alto che per il benzene.

I dati raccolti consentono di ipotizzare che la funzione di ToMO e PH nel batterio oggetto di studio non sia ridondante ma bensì complementare. ToMO appare infatti essersi *specializzata* nel catalizzare la prima reazione di ossidrilazione, da benzene a fenolo, ma è meno efficiente nel catalizzare la seconda. Al contrario PH catalizza con maggiore efficienza la conversione di fenolo in catecolo. Se si formula l'ipotesi che i due enzimi agiscano in sequenza, ToMO nel primo passaggio di ossidrilazione, PH nel secondo, ciò potrebbe tradursi in un più rapido e vantaggioso utilizzo del substrato benzene.

- **Cinetica di ossidazione del benzene**

Per verificare tale ipotesi abbiamo monitorato, in primo luogo, la quantità di fenolo e catecolo prodotta nel tempo, incubando cellule di *E. coli* JM109 esprimenti ToMO o cellule esprimenti PH con benzene alla concentrazione di 30 μM . Sono stati condotti saggi *in discontinuo* come descritto nella sezione Materiali e Metodi, ad una concentrazione di cellule corrispondente ad 1 mU/ml. La formazione dei prodotti ottenuti è stata monitorata mediante analisi RP-HPLC.

Come si può osservare dalla Figura 5A, quando cellule esprimenti unicamente il complesso ToMO sono incubate con benzene 30 μM , una concentrazione circa 100 volte più alta del suo valore di K_M , si osserva la formazione di fenolo ad una velocità lineare di circa 0.4 $\mu\text{M min}^{-1}$ ma non si osserva formazione di catecolo, se non dopo circa 60 minuti di reazione. Inoltre si osserva catecolo solo dopo che il 60-70% di benzene è stato convertito in fenolo.

Al contrario incubando cellule esprimenti unicamente il complesso PH con benzene 30 μM , si osserva che la concentrazione di fenolo raggiunge un valore costante ma basso dopo circa 30 minuti, mentre si osserva da subito la formazione di catecolo e la sua concentrazione aumenta nel tempo. Tuttavia in questo caso la formazione di catecolo sembra essere limitata dalla bassa quantità di benzene convertita in fenolo (Figura 5B).

Tali dati sembrano pertanto validare l'ipotesi che quando entrambi gli enzimi competono per il benzene come substrato, ToMO può produrre efficientemente fenolo che, a sua volta, può essere efficientemente ossidato a catecolo da PH.

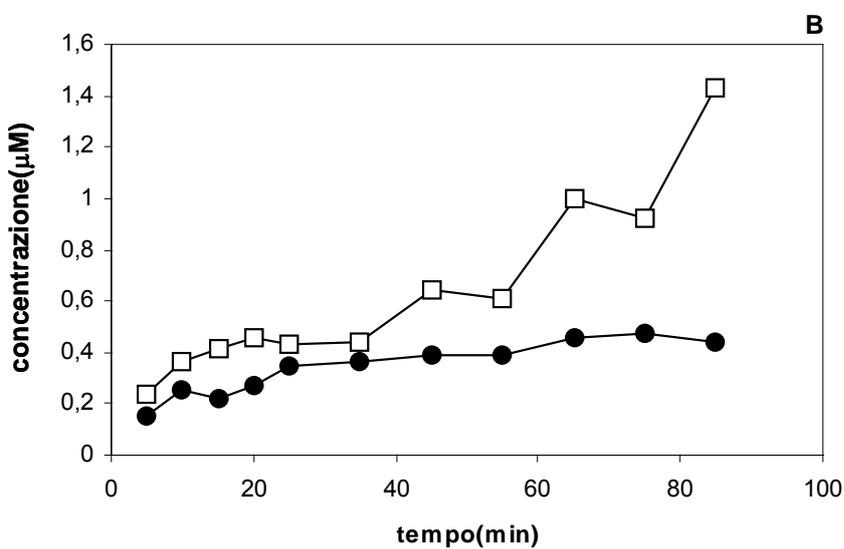
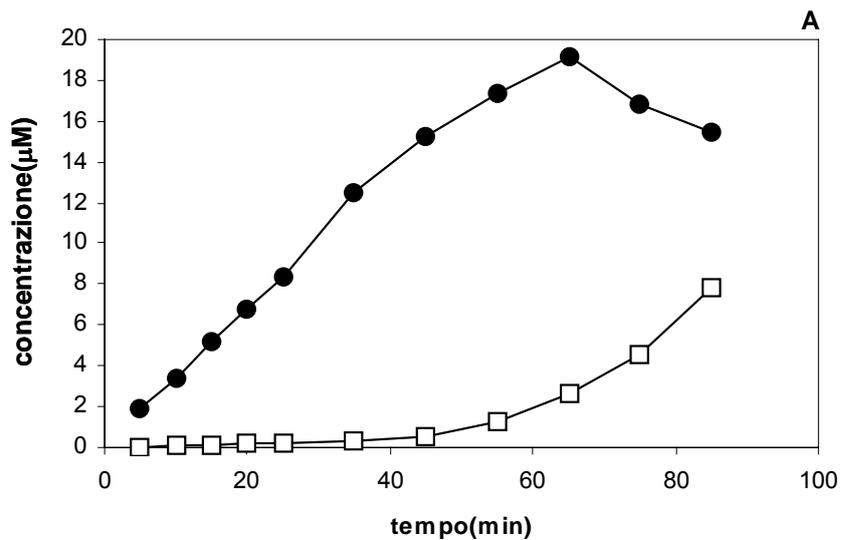


Figura 5. Cinetica di produzione di fenolo (quadrati chiari) e catecolo (cerchi scuri) ad opera di cellule esprimenti unicamente ToMO ad 1mU/mL (A) o PH a 1mU/mL (B), incubate con benzene 30 μM.

I risultati ottenuti osservando l'ossidazione del benzene da una miscela di cellule esprimenti entrambi i complessi ToMO e PH supportano ulteriormente tale ipotesi. Come si può osservare dal grafico in Figura 6, cellule esprimenti solo il complesso ToMO (impiegate a tre differenti concentrazioni corrispondenti a 0.27, 0.55 e 1.1 mU/ml) o solo il complesso PH (0.22 mU/OD) non producono efficientemente catecolo, sebbene piccole quantità siano state rilevate impiegando l'enzima PH da solo ad una velocità pari a $0.017 \mu\text{M min}^{-1}$.

Al contrario, quando miscele di entrambi i tipi cellulari sono incubate con benzene si osserva un'efficiente produzione di catecolo. Infatti, quando cellule esprimenti PH ad una concentrazione corrispondente a 0.22 mU/ml sono incubate con benzene in presenza di cellule esprimenti ToMO ad una concentrazione di 0.27 mU/ml, la velocità di formazione del catecolo è nove volte più alta di quella misurata quando le cellule sono utilizzate singolarmente. Inoltre, quando si aumenta la quantità di cellule esprimenti ToMO (da 0.55 a 1.1 mU/ml) mantenendo costante la quantità di cellule esprimenti PH (0.22 mU/ml), la velocità di formazione del catecolo è proporzionale alla concentrazione di cellule che esprimono ToMO ed è dalle 13 alle 19 volte più alta rispetto a quella misurata utilizzando cellule esprimenti unicamente il complesso PH.

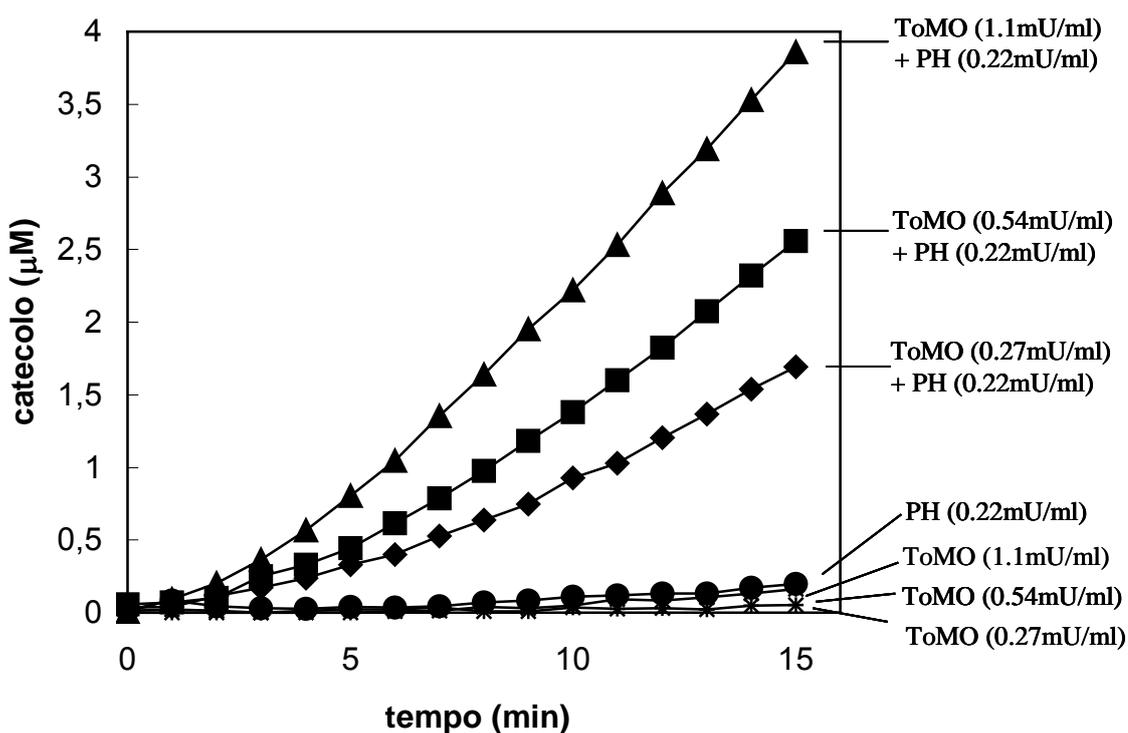


Figura 6. Cinetica di produzione di catecolo impiegando cellule esprimenti ToMO e PH a differenti concentrazioni incubate con benzene $30 \mu\text{M}$

Questi dati supportano quindi l'ipotesi che l'importanza metabolica della coesistenza dei due enzimi all'interno del medesimo organismo è quella di portare ad una più efficiente formazione di catecolo, substrato del successivo enzima del *pathway*, la catecolo 2,3 diossigenasi.

Le osservazioni sopra esposte suggeriscono quindi che ToMO e PH agiscano *in vivo* in sequenza costituendo una catena metabolica in cui ToMO catalizza la prima reazione di ossidrilazione, da benzene a fenolo, mentre PH è deputato a catalizzare la seconda reazione di ossidrilazione, da fenolo a catecolo.

METABOLISMO DEL TOLUENE

Allo scopo di raccogliere dati che possano confermare o smentire l'ipotesi che ToMO e PH costituiscono una catena metabolica, l'efficienza catalitica degli enzimi ToMO e PH è stata investigata anche su di un secondo substrato, il toluene. Questo esperimento ha lo scopo anche di esplorare la regioselettività degli enzimi per comprendere se il loro funzionamento sequenziale possa influenzare, sulla base della loro regioselettività, i prodotti che si possono ottenere.

- **Determinazione della regioselettività di ToMO e PH su toluene e su *o*-, *m*-, *p*- cresolo**

Il primo passo nello studio del metabolismo del toluene ad opera degli enzimi ToMO e PH è stata l'individuazione dei prodotti dei due passaggi di ossidrilazione a partire da tale substrato.

Sia ToMO che PH dal toluene formano una miscela di *o*-, *m*-, *p*-cresolo e sono inoltre in grado di ossidrilare tali cresoli a metilcatecoli (3- e 4-MC). La relativa abbondanza di ogni isomero è stata determinata incubando cellule di *E. coli* JM109 esprimenti singolarmente ToMO e PH con toluene o con uno dei tre isomeri del cresolo, in concentrazioni variabili tra 0.1 e 1 mM come descritto nella sezione Materiali e Metodi.

Come si può osservare dai dati riportati in Tabella 2, i due enzimi mostrano regioselettività differente sia nel primo che nel secondo passaggio di ossidrilazione. Infatti i prodotti principali dell'ossidazione del toluene operata da ToMO sono *p*- e *o*-cresolo, con un'abbondanza leggermente superiore dell'isomero *para* (45%). Anche l'utilizzo di cellule esprimenti PH porta alla formazione (a partire dal toluene) di una miscela dei tre cresoli, ma in questo caso si osserva una predominanza dell'isomero *orto* (70%).

Entrambi gli enzimi poi catalizzano la seconda reazione di ossidrilazione aggiungendo un gruppo ossidrilico in *orto* a quello preesistente portando pertanto all'esclusiva formazione di 3-MC da *o*-cresolo e di 4-MC dal *p*-cresolo. L'ossidazione del *m*-cresolo catalizzata da ToMO produce quasi esclusivamente 4-MC, mentre PH dallo stesso isomero forma essenzialmente 3MC.

I dati indicano quindi che ToMO presenta una inusuale regioselettività rilassata che è stata osservata per un solo altro membro della famiglia di BMMs a cui appartiene ToMO, ovvero per la benzene monoossigenasi da *Pseudomonas aeruginosa* J1104 [138]. Gli altri membri della famiglia solitamente esibiscono una regioselettività più ristretta. PH ha una regioselettività più ristretta di ToMO, ma più rilassata se confrontata con altri membri delle BMMs di gruppo 1 quali la T2MO che produce unicamente *o*-cresolo.

TABELLA 2

Substrato	Prodotti (%) ^a	PH	ToMO
		<i>o</i> -Cresolo	70
Toluene	<i>m</i> -Cresolo	7	19
	<i>p</i> -Cresolo	23	45
<i>m</i> -Cresolo	3-MC	96	5
	4-MC	4	95
<i>o</i> -Cresolo	3-MC	100	100
<i>p</i> -Cresolo	4-MC	100	100

Tabella 2. Regioselettività di ToMO e PH sui substrati indicati

- **Determinazione dei parametri cinetici di ToMO e PH su toluene e su *o*-, *m*-, *p*-cresolo**

I parametri cinetici degli enzimi ToMO e PH su toluene e su *o*-, *m*-, e *p*-cresolo sono stati determinati utilizzando cellule intere di *E. coli* JM109 esperimenti separatamente i due complessi come descritto nella sezione Materiali e Metodi. Anche in questo caso sono stati condotti saggi *in continuo* o *in discontinuo* a seconda del substrato analizzato. I risultati ottenuti sono riportati in Tabella 3. Dall'analisi dei parametri cinetici è possibile osservare che ToMO mostra un'efficienza maggiore nel convertire toluene in cresoli, PH è invece più attiva nel convertire cresoli in metilcatecoli.

Infatti, la costante di specificità di ToMO per il toluene è di un ordine di grandezza più alto rispetto a quella misurata per il medesimo substrato per PH. Al contrario quando sono impiegati substrati già ossidrilati (*o*-, *m*-, *p*-cresolo) la costante di specificità di ToMO è dalle 2 alle 30 volte più bassa rispetto a quella misurata per PH.

ToMO mostra una costante di specificità praticamente identica su *m*- e *p*-cresolo, che è tre volte più bassa di quella misurata per il toluene, e molto simile a quella misurata per l'*o*-cresolo.

Dal momento che questo composto rappresenta il 36% dei prodotti che si ottengono a partire dal toluene, si può concludere che ToMO mostra una maggiore efficienza nel catalizzare la prima reazione di ossidrilazione rispetto alla seconda; comportamento analogo, anche se meno evidente, rispetto a quello osservato nel metabolismo del benzene.

D'altro canto, le costanti di specificità di PH per l'*o*- ed il *m*- ed il *p*-cresolo sono molto superiori a quelle misurate per il toluene. E' inoltre possibile osservare che il miglior substrato di PH è il *p*-cresolo. Il valore di k_{cat}/K_M misurato per il *p*-cresolo è circa 4 volte superiore a quello misurato per l'*o* ed il *m*-cresolo e ben 190 volte più alto di quello misurato per il toluene.

TABELLA 3

SUBSTRATO	PH			ToMO		
	K_{cat} (sec^{-1})	K_M (μM)	K_{cat}/K_M ($\text{sec}^{-1} \mu\text{M}^{-1}$)	K_{cat} (sec^{-1})	K_M (μM)	K_{cat}/K_M ($\text{sec}^{-1} \mu\text{M}^{-1}$)
Toluene	0.148	22	0.007	0.42	3.93	0.11
o-cresolo	0.946	3.13	0.3	0.9027	6.0	0.15
m-cresolo	0.609	1.8	0.34	0.437	9.38	0.047
p-cresolo	0.77	0.6	1.29	0.63	13.26	0.047

TABELLA 3. Parametri cinetici di ToMO e PH sui substrati indicati

Pertanto i dati sopra esposti confermano l'ipotesi che per ottimizzare il consumo del substrato toluene ToMO si sia specializzato nel catalizzare la conversione di toluene in cresoli e PH la conversione di cresoli in metilcatecoli (3- e 4-MC).

- **Cinetica di ossidazione del toluene**

Un'ulteriore verifica dell'ipotesi è stata condotta monitorando la cinetica di ossidazione del toluene nel tempo ad opera degli enzimi ToMO e PH. La velocità di produzione del 3- e del 4-MC a partire dal toluene è stata misurata utilizzando cellule esprimenti singolarmente il complesso ToMO, il complesso PH, o miscele dei due tipi cellulari incubate in presenza di toluene 30 μM .

A tempi successivi sono state prelevate aliquote e la reazione è stata bloccata con HCl 1 M. Le cellule sono state allontanate mediante centrifugazione ed i soprannatanti sono stati esaminati mediante analisi RP-HPLC su colonna C18 per determinare l'abbondanza relativa dei prodotti di ossidazione del toluene, come descritto nella sezione Materiali e Metodi.

Quando sono state impiegate cellule esprimenti unicamente il complesso ToMO a partire dal toluene sono stati prodotti cresoli con velocità lineare, ma non metilcatecoli se non dopo un tempo di incubazione superiore ai 30 min, ovvero quando approssimativamente il 60-70% di toluene era stato convertito in cresoli (Figura 7A).

Quando cellule esprimenti PH sono state incubate con toluene 30 μM si è osservata, dopo una breve fase di latenza, produzione di metilcatecoli. Tuttavia la conversione del toluene in metilcatecoli operata da PH non può essere considerata molto efficiente dal momento che solo il 25% di toluene è convertito in metilcatecoli dopo 90 minuti di reazione (Figura 7B). Tale fenomeno può essere giustificato dalla limitata quantità di cresoli prodotti; la loro concentrazione infatti raggiunge un valore basso e costante dopo 20 minuti di reazione.

Quando miscele dei due tipi cellulari sono state incubate con toluene, non si è osservata alcuna fase di latenza nella produzione di metilcatecoli e la loro velocità di formazione è risultata essere 5 volte più alta di quella misurata utilizzando cellule esprimenti unicamente il complesso PH (Figura 7C).

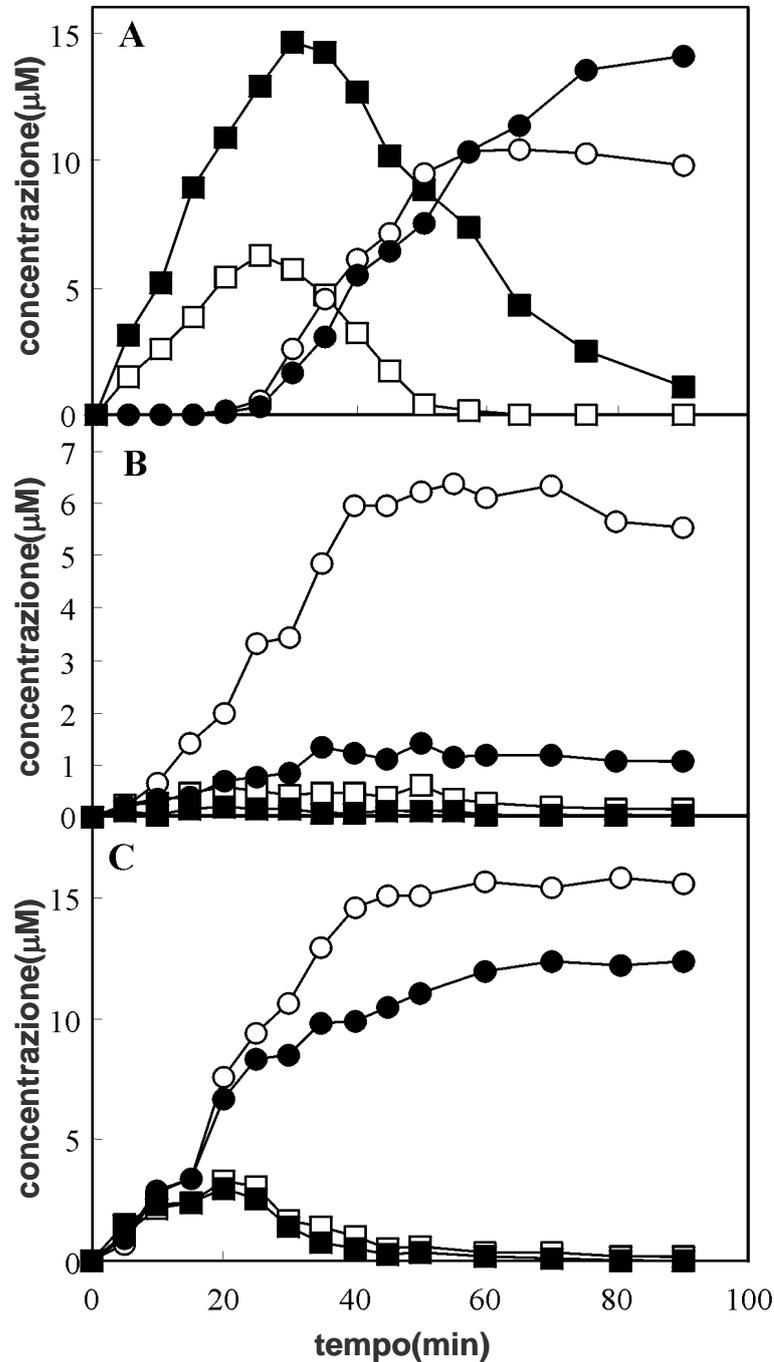


Figura 7. Cinetica di produzione di *o*-cresolo (quadrati chiari), *m*- and *p*-cresoli (quadrati scuri), 3-metilcatecolo (cerchi chiari) and 4-metilcatecolo (cerchi scuri) utilizzando **(A)** cellule esprimenti ToMO ad una concentrazione di 1 mU/ml, **(B)** PH ad una concentrazione di 1 mU/ml e **(C)** miscele di cellule esprimenti ToMO (1 mU/ml) e PH (1 mU/ml), incubate con toluene 30 μM.

In questo caso la concentrazione di cresoli presenti raggiunge un valore basso e costante ed il toluene è completamente convertito per il 55% in 3-MC e per il 45% in 4-MC dopo 50 min. Queste percentuali sono molto differenti da quelle ottenute utilizzando cellule esprimenti unicamente ToMO (62% 4MC e 38% 3MC) o unicamente PH (17% 4-MC e 83% 3-MC).

Un'ulteriore conferma dell'ipotesi dell'azione sequenziale di ToMO e PH viene dalla osservazione che i valori percentuali della quantità di dimetilcatecoli ottenuti utilizzando miscele di cellule esprimenti ToMO e PH sono in perfetto accordo con quelli attesi sulla base di un modello di reazione nel quale si ipotizza che ToMO catalizza il primo passaggio di ossidrilazione e PH il secondo.

La percentuale di 3-MC (3-MC%) attesa dalla trasformazione in due stadi del toluene (via cresoli) è data dall'equazione:

$$3\text{-MC}\% = o\text{-C}\% + f \times m\text{-C}\%$$

dove $o\text{-C}\%$ e $m\text{-C}\%$ sono rispettivamente le percentuali di o - e m -cresolo prodotti dall'enzima che catalizza il primo passaggio di ossidrilazione ed f è la frazione di m -cresolo convertita in 3-MC dall'enzima che catalizza la seconda ossidrilazione.

Se ipotizziamo che l'enzima ToMO sia deputato a catalizzare la prima reazione di ossidrilazione, i valori (misurati sperimentalmente utilizzando cellule esprimenti solo ToMO) di $o\text{-C}\%$ e $m\text{-C}\%$ sono rispettivamente 36% e 19%. Assumendo che PH catalizzi la seconda reazione di ossidrilazione, il valore di f è 0.96 (vedi Tabella 2). Sostituendo questi valori nell'equazione precedente, il valore di 3-MC% risulta essere 54.24%. Questo valore è praticamente identico al valore ottenuto sperimentalmente (55%, vedi sopra).

- **Ossidazione del toluene in funzione della concentrazione di ToMO e PH**

Per comprendere gli effetti della quantità relativa di cellule esprimenti i complessi ToMO e PH, la velocità iniziale di produzione dei metilcatecoli è stata monitorata variando la concentrazione di cellule esprimenti ToMO in un intervallo compreso tra 0.29 e 2.32 mU/ml, ad una concentrazione costante di cellule esprimenti PH (0.29 mU/ml), in presenza di 30 μM toluene.

In queste condizioni i metilcatecoli sono prodotti con una velocità che aumenta in modo iperbolico all'aumentare della concentrazione di cellule esprimenti ToMO (Figura 8).

Occorre ricordare che nelle medesime condizioni sperimentali cellule esprimenti unicamente il complesso ToMO non formano quantità significative di metilcatecoli a partire dal toluene a tutte le concentrazioni saggiate, mentre solo piccole quantità di metilcatecoli sono prodotte da cellule esprimenti unicamente il complesso PH.

Pertanto, anche in questo caso, come precedentemente osservato per il substrato benzene, la combinazione delle due monoossigenasi ToMO e PH porta in maniera più efficiente alla produzione di metilcatecoli rispetto all'utilizzo singolo dei due enzimi.

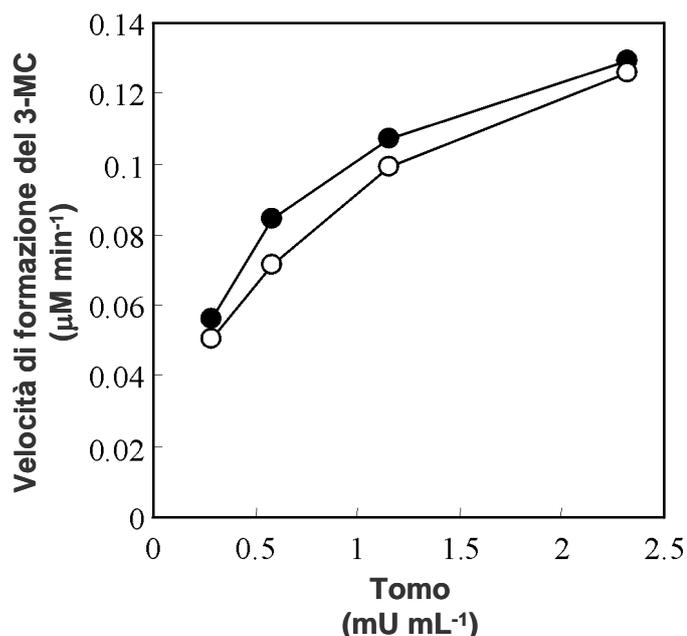


Figure 8. Velocità di formazione del 3-MC (cerchi scuri) e del 4-MC (cerchi chiari) impiegando miscele di cellule esprimenti PH (0.29 mU/ml) e ToMO (0.29 - 2.3 mU/ml) incubate con toluene 30 μM.

METABOLISMO DELL' O-XILENE

Abbiamo infine analizzato il comportamento degli enzimi ToMO e PH nel metabolismo di un'ulteriore inquinante di natura aromatica; l'*o*-xilene. Occorre ricordare che l'*o*-xilene è altamente recalcitrante alla degradazione e poche specie batteriche, tra cui *P. stutzeri* OX1, sono capaci di utilizzarlo come fonte di carbonio e di energia. Pertanto risulta di particolare interesse verificare se, anche in questo caso, l'utilizzo combinato di ToMO e PH presenta vantaggi metabolici nel processo degradativo.

Anche in questo caso i complessi ToMO e PH sono stati espressi in *E. coli* ed è stata effettuata una caratterizzazione cinetica sul substrato *o*-xilene e sui derivati monoossidrilati, utilizzando cellule intere esprimenti i due enzimi. È stato inoltre analizzato il comportamento concertato dei due enzimi nel metabolismo dell'*o*-xilene, impiegando cellule esprimenti i due complessi separatamente o nello stesso compartimento cellulare.

- **Determinazione della regioselettività di ToMO e PH su *o*-xilene, 3,4-DMP e 2,3-DMP**

Il primo passo nello studio del metabolismo dell'*o*-xilene ad opera degli enzimi ToMO e PH è stata l'individuazione dei prodotti dei due passaggi di ossidrilazione a partire da tale substrato.

A tal fine cellule di *E. coli* JM109 esprimenti i complessi ToMO e PH sono state incubate con *o*-xilene a concentrazioni comprese tra 0.25 e 1 mM. A tempi successivi sono state prelevate aliquote e la reazione è stata bloccata con HCl. Le cellule sono state allontanate mediante centrifugazione ed i soprannatanti sono stati esaminati mediante analisi RP-HPLC su colonna C18 per determinare l'abbondanza relativa dei prodotti di ossidazione dell'*o*-xilene, come descritto nella sezione Materiali e Metodi.

L'ossidazione dell'*o*-xilene conduce alla formazione del 2,3-dimetilfenolo (2,3-DMP) e del 3,4-dimetilfenolo (3,4-DMP). Le percentuali dei dimetilfenoli ottenuta è riportata in Tabella 4.

E' interessante notare che i due enzimi mostrano una regioselettività differente in questo primo passaggio di ossidrilazione in quanto ToMO a partire dall'*o*-xilene produce 20% di 2,3-DMP e 80% di 3,4-DMP , mentre PH produce 80% di 2,3-DMP e 20% di 3,4-DMP.

E' stata inoltre investigata la regioselettività dei due enzimi nel secondo stadio di ossidrilazione, mediante saggi discontinui su 2,3-DMP o 3,4-DMP quali substrati, e rivelazione mediante RP-HPLC dei prodotti di reazione. Pertanto le cellule sono state incubate con 2,3-DMP o 3,4-DMP ad una concentrazione variabile tra 0.25 e 1 mM. Come riportato in Tabella 4, l'ossidrilazione del 3,4-DMP catalizzata da ToMO produce una miscela costituita per il 10% da 3,4-dimetilcatecolo (3,4-DMC) e per il 90% da 4,5-dimetilcatecolo (4,5-DMC), mentre PH converte il 3,4-DMP quasi esclusivamente in 3,4-DMC (99%) con tracce di 4,5-DMC (1%). Il 2,3-DMP è convertito esclusivamente in 3,4-DMC da entrambi gli enzimi.

L'analisi dei dati evidenzia in primo luogo che le due monoossigenasi sono in grado di catalizzare entrambi gli stadi di ossidrilazione con regioselettività differente.

TABELLA 4

		Proteina	
		PH	ToMO
<i>o</i>-Xilene	2,3-DMP	80	20
	3,4-DMP	20	80
3,4-DMP	3,4-DMC	99	10
	4,5-DMC	1	90

Tabella 4. Dati sulla regioselettività di Tomo e PH sull'*o*-xilene e sul 3,4-DMP

E' inoltre interessante notare che ToMO converte il 3,4-DMP, il principale prodotto della prima ossidrilazione dell'*o*-xilene per opera di ToMO, prevalentemente in 4,5-DMC che non è substrato del successivo enzima del *pathway*, la C2,3O. Al contrario PH converte l'*o*-xilene esclusivamente in 3,4-DMC che può essere ossidato dagli enzimi del *lower pathway* in intermedi del ciclo degli acidi tricarbossilici, e sostenere dunque la crescita cellulare.

- **Parametri cinetici di ToMO e PH su *o*-xilene, 2,3-DMP e 3,4-DMP**

Al fine di comprendere il ruolo di ToMO e PH nel metabolismo dell'*o*-xilene, sono stati determinati i parametri cinetici sull'*o*-xilene e sui prodotti monoossidrilati derivati dalla sua ossidazione, il 2,3-DMP e il 3,4-DMP.

La caratterizzazione cinetica dei due enzimi ToMO e PH è stata effettuata utilizzando cellule intere JM109 esprimenti i due complessi singolarmente come descritto nella sezione Materiali e Metodi.

A seconda del substrato analizzato sono state condotte due differenti tipologie di saggio: saggi *in discontinuo* su *o*-xilene e 3,4-DMP con rivelazione dei prodotti di

reazione mediante analisi RP-HPLC, e saggi spettrofotometrici in *continuo* accoppiati con la C2,3O sul 2,3-DMP. In entrambi i casi i saggi sono stati effettuati in mezzo minimo M9-G in presenza di quantità variabili di substrato, in un intervallo di concentrazioni compreso tra 0.5 μM e 1 mM.

Per entrambi gli enzimi è stato possibile tracciare curve della velocità di reazione in funzione della concentrazione di substrato che presentano l'andamento tipico di una cinetica di Michaelis e Menten. I parametri cinetici apparenti (k_{cat} e K_M) su *o*-xilene, 2,3-DMP e su 3,4-DMP, sono riportati in Tabella 5.

E' possibile osservare che i due enzimi mostrano un comportamento cinetico differente sui substrati analizzati. In particolare ToMO mostra una maggiore affinità ($K_M = 3.7 \mu\text{M}$) per l'*o*-xilene rispetto ai suoi derivati ossidrilati (2,3-DMP $K_M = 25.7 \mu\text{M}$; 3,4-DMP $K_M = 7.7 \mu\text{M}$). Al contrario PH ha un'affinità per il substrato 3,4-DMP di 10 volte superiore ($K_M = 3.37 \mu\text{M}$) rispetto a quella per il 2,3-DMP e l'*o*-xilene ($K_M \sim 33 \mu\text{M}$ per entrambi i composti).

L'analisi delle costanti di specificità consente di formulare analoghe osservazioni. Infatti dai valori di k_{cat}/K_M si evince che il miglior substrato di ToMO è l'*o*-xilene, mentre il miglior substrato di PH è il 3,4-DMP.

Al fine di comprendere il significato metabolico dell'accoppiamento di ToMO e PH è opportuno confrontare i parametri cinetici ottenuti per l'uno e per l'altro enzima. È da notare che ToMO mostra una costante di specificità sull'*o*-xilene 17 volte più alta di PH, mentre PH è circa 4 volte più attivo di ToMO sia su 2,3-DMP che su 3,4-DMP. Nel secondo stadio di ossidrilazione entrambe le monoossigenasi mostrano valori di k_{cat}/K_M su 3,4-DMP circa dieci volte più alte di quella misurata su 2,3-DMP.

TABELLA 5

Substrato	k_{cat}^a (sec^{-1})	K_M^b (μM)	k_{cat}/K_M ($\text{sec}^{-1} \mu\text{M}^{-1}$)	k_{cat}^a (sec^{-1})	K_M^b (μM)	k_{cat}/K_M ($\text{sec}^{-1} \mu\text{M}^{-1}$)
2,3-DMP	0.9425	33.9	0.028	0.2	25.7	0.008
3,4-DMP	0.77	3.37	0.228	0.38	7.7	0.049
<i>o</i>-xilene	0.125	32.5	0.004	0.25	3.73	0.067

Tabella 5. Parametri cinetici di ToMO e PH su *o*-xilene ,2,3-DMP e 3,4-DMP

Pertanto l'analisi dei parametri cinetici consente di ipotizzare che anche in questo caso, come precedentemente riportato per il metabolismo del benzene e del toluene, ToMO e PH possono svolgere ruoli diversi e complementari nelle prime due tappe di ossidazione dell'*o*-xilene.

Tale osservazione, unitamente all'analisi della regioselettività di ToMO e PH sui substrati in studio, consente di formulare ulteriori ipotesi. I due enzimi sembrerebbero

essersi ottimizzati non solo in termini di efficienza catalitica ma anche in termini di regioselettività. Infatti ToMO nel primo passaggio della reazione forma una maggiore quantità di 3,4-DMP che è il miglior substrato di PH. Di contro il complesso PH, agendo quale catalizzatore del secondo passaggio di ossidrilazione porta alla formazione dell'unico dimetilcatecolo, il 3,4-DMC, che è riconosciuto e processato dal successivo enzima del *pathway*, la C2,3O. Al contrario, l'azione di ToMO nel secondo passaggio porterebbe alla quasi esclusiva produzione di 4,5-DMC, che non è riconosciuto dalla C2,3O. L'azione concertata di ToMO nel primo stadio e PH nel secondo stadio appare dunque essere l'unica via possibile in *P. stutzeri* OX1 per l'ossidazione dell'*o*-xilene in intermedi del ciclo degli acidi tricarbossilici impiegati dal batterio come fonte di carbonio e di energia.

- **Cinetica di ossidazione dell' *o*-xilene**

In base alle osservazioni precedentemente esposte, si è ritenuto opportuno verificare l'ipotesi che la coesistenza di ToMO e PH potesse consentire un più rapido e vantaggioso utilizzo del substrato *o*-xilene, evitando l'accumulo di intermedi indesiderati che non possono essere ulteriormente ossidati. A tale scopo è stata monitorata la quantità di dimetilfenoli e dimetilcatecoli prodotta nel tempo, incubando cellule JM109 esprimenti ToMO (1.5 mU/ml) e cellule JM109 esprimenti PH (1.5 mU/ml), o miscele dei due tipi cellulari (ciascuno a 1.5 mU/ml), in presenza di *o*-xilene 20 μ M. Come illustrato in Figura 9A, quando cellule esprimenti unicamente il complesso ToMO sono incubate con *o*-xilene, si è osservata la formazione di dimetilfenoli ma non quella di dimetilcatecoli, se non a tempi lunghi di incubazione (15 min).

Al contrario, incubando cellule esprimenti PH con *o*-xilene, si è osservata la formazione di 2,3-DMP e 3,4-DMC (Figura 9B). Il 2,3-DMP raggiunge un valore basso ma costante dopo circa 30 min, mentre non si è osservata la formazione di 3,4-DMP. Il 3,4-DMC si accumula a una velocità bassa ma costante dopo una breve fase di latenza di circa 5 min. Non si osserva formazione di 4,5-DMC. Queste osservazioni possono essere giustificate ipotizzando che la bassa velocità di formazione del 3,4-DMC sia dovuta essenzialmente alla bassa quantità di *o*-xilene convertita da PH in dimetilfenoli, poiché l'*o*-xilene non è un buon substrato per l'enzima PH.

I risultati ottenuti monitorando l'ossidazione dell'*o*-xilene da una miscela di cellule di *E. coli* esprimenti entrambi i complessi ToMO e PH confermano l'ipotesi che tali enzimi costituiscano una catena metabolica. Come illustrato in Figura 9C è possibile osservare unicamente la formazione di 2,3-DMP e 3,4-DMC. In particolare quest'ultimo si ottiene ad una velocità circa 13 volte superiore rispetto a quella registrata con cellule esprimenti unicamente il complesso PH.

Il fatto che il 4,5-DMC non è stato evidenziato nella miscela è in accordo con l'ipotesi che il secondo passaggio di ossidrilazione sia condotto da PH.

Tali risultati supportano quindi l'ipotesi che quando entrambi gli enzimi competono per l'*o*-xilene come substrato, ToMO può produrre efficientemente dimetilfenoli che, a loro volta, possono essere efficientemente ossidati a dimetilcatecoli da PH.

L'importanza metabolica della coesistenza dei due enzimi all'interno del medesimo organismo cellulare sembrerebbe, pertanto, essere quella di portare ad una più efficiente formazione dei dimetilcatecoli, substrati del successivo enzima del *pathway*, la catecolo 2,3-diossigenasi. Dunque ToMO e PH sembrerebbero agire *in vivo* in sequenza, costituendo una catena metabolica che ottimizza il consumo di substrati aromatici non ossidrilati quali l'*o*-xilene.

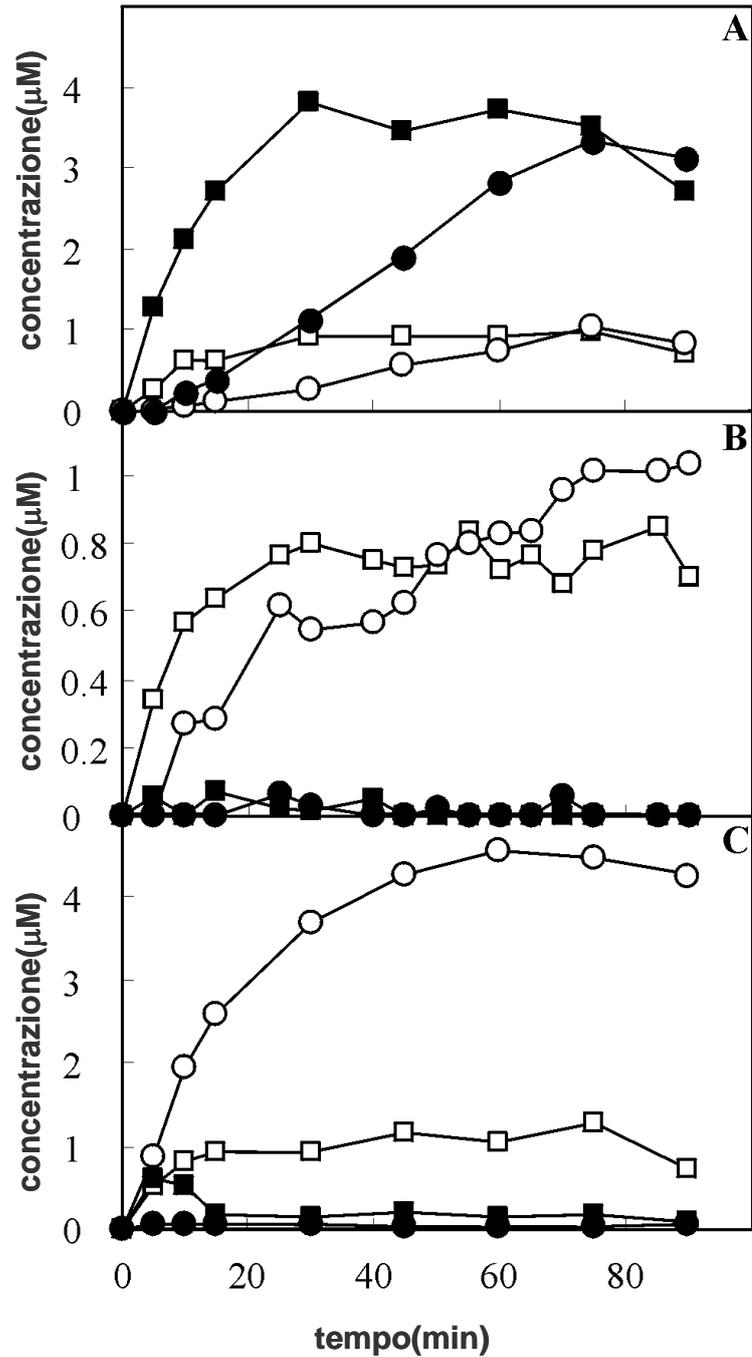


Figura 9. Cinetica di produzione del 2,3-DMP (quadrati chiari), 3,4-DMP (quadrati scuri), 3,4-DMC (cerchi chiari) and 4,5-DMC (cerchi scuri) impiegando **(A)** cellule esperimenti ToMO ad una concentrazione di 1.5 mU/ml, **(B)** PH ad una concentrazione di 1.5 mU/ml, **(C)** miscele di cellule esperimenti ToMO (1.5 mU/ml) e PH (1.5 mU/ml).

- **Ossidazione dell'*o*-xilene in funzione della concentrazione di ToMO e PH**

Saggi con cellule esprimenti i due complessi ToMO e PH singolarmente

L'ossidazione dell'*o*-xilene è stata ulteriormente studiata incubando miscele di cellule esprimenti ToMO o PH in presenza di *o*-xilene 40 μ M, valutando la velocità di formazione del 3,4-DMC mediante saggi colorimetrici accoppiati con la catecolo 2,3-diossigenasi.

I saggi sono stati effettuati con quantità variabili di cellule esprimenti ToMO (0.3-6 mU/ml) e quantità costanti di cellule esprimenti PH (0.5 mU/ml). Cellule esprimenti ToMO o PH da sole, a tutte le concentrazioni considerate, non formano quantità significative di 3,4-DMC (dati non mostrati). La velocità di formazione del 3,4-DMC determinata è proporzionale alla concentrazione di cellule esprimenti ToMO. Riportando in grafico la velocità di formazione del 3,4-DMC in funzione della concentrazione di ToMO si è osservata una curva con andamento iperbolico, come mostrato in Figura 10.

Quando l'esperimento è stato condotto utilizzando quantità variabili di cellule esprimenti PH (0.36-1 mU/ml) e quantità costanti di cellule esprimenti ToMO (4.5 mU/ml), si è osservato che la velocità di formazione del 3,4-DMC è direttamente proporzionale alla concentrazione di PH, come mostrato nel pannello di Figura 10.

I due andamenti osservati sono in accordo con l'ipotesi precedentemente formulata che ToMO agisca nel primo stadio di ossidazione e PH nel secondo. Infatti basse concentrazioni di ToMO sembrano essere limitanti per il sistema poiché la velocità di formazione del 3,4-DMC aumenta in modo proporzionale alla concentrazione di ToMO. D'altra parte, alte concentrazioni di ToMO portano alla produzione di quantità di dimetilfenoli così elevate da rendere la concentrazione di PH il fattore limitante per la velocità di formazione del catecolo sostituito.

Saggi con cellule esprimenti entrambi i complessi

I risultati fin qui riportati sono stati ottenuti utilizzando miscele di cellule esprimenti il complesso ToMO ed il complesso PH separatamente e presuppongono, nella loro analisi, la libera diffusione e permeazione dei prodotti intermedi nelle diverse cellule dove è prodotto lo specifico enzima che funge da catalizzatore. Dati di letteratura[139] riportano che le membrane plasmatiche non rappresentano un ostacolo alla libera diffusione dei composti aromatici portando a ritenere che non sono richieste proteine trasportatrici specifiche per la loro penetrazione all'interno della cellula batterica. Il raggiungimento dell'equilibrio tra concentrazione del composto all'esterno e all'interno della cellula dovrebbe pertanto avvenire in tempi talmente brevi da non influenzare l'esito degli esperimenti precedentemente illustrati. Tuttavia per verificare la validità dei risultati ottenuti, i saggi descritti nel paragrafo precedente sono stati ripetuti con cellule esprimenti entrambi i complessi ToMO e PH.

A tal fine il ceppo di *E. coli* JM109 è stato trasformato con il plasmide pGEM-3Z/*to-ph* per esprimere i complessi ToMO e PH nella stessa cellula. Le colture indotte sono state risospese in mezzo di coltura minimo M9-G ed è stata misurata l'attività specifica su fenolo mediante un saggio colorimetrico accoppiato con la C2,3O come descritto nei Materiali e Metodi.

Per misurare le mU di ToMO e PH espressi nello stesso compartimento cellulare si è sfruttata la diversa regioselettività dei due enzimi sul 3,4-DMP. A partire da tale composto ToMO forma il 90% di 4,5-DMC e il 10% di 3,4-DMC, mentre PH forma

quasi esclusivamente 3,4-DMC (99%) e una quantità trascurabile di 4,5-DMC (1%). Pertanto la determinazione della concentrazione del 4,5-DMC mediante RP-HPLC consente di calcolare le mU di ToMO. Il clone *E. coli* JM109/pGEM-3Z/*tou-ph* è stato trovato esprimere ToMO e PH in un rapporto di 2.3 mU di ToMO:1 mU di PH. Quando una quantità di cellule corrispondenti a 1.17 mU/ml di ToMO e 0.5 mU/ml di PH è stata incubata con *o*-xilene 40 μ M la velocità di formazione del 3,4-DMC è risultata la medesima, nell'ambito dell'errore sperimentale, di quella misurata utilizzando cellule esprimenti separatamente i due complessi, a parità di mU/ml di ToMO e di PH (Figura 10). Dunque l'espressione di ToMO e PH in differenti compartimenti cellulari non influenza la velocità di formazione del 3,4-DMC prodotto dall'*o*-xilene.

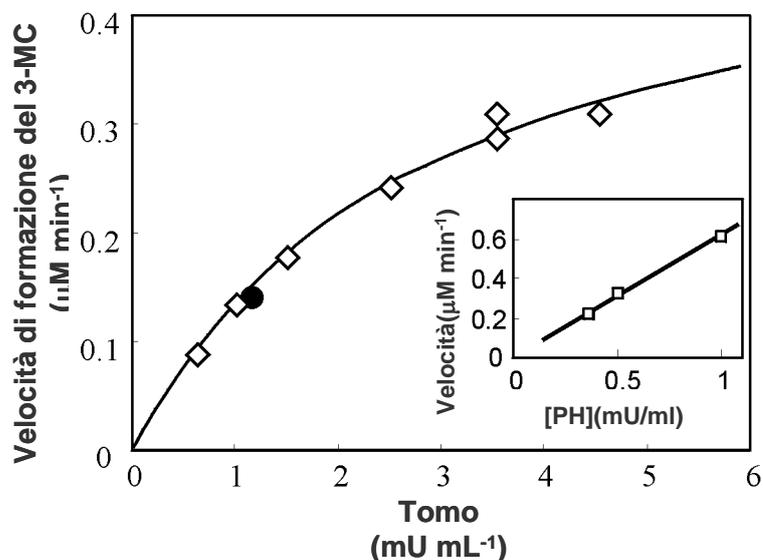


Figura 10. Cinetica di formazione del 3,4 DMC. Cellule esprimenti PH sono utilizzate ad una concentrazione costante (0.5 mU/ml) e la velocità di formazione del 3,4DMC è stata misurata in funzione dell'aumento della concentrazione di cellule esprimenti ToMO (rombi chiari) in presenza di *o*-xilene 40 μ M. Il cerchio scuro indica la velocità di produzione del 3,4 DMC impiegando cellule che esprimono contemporaneamente ToMO (1.17 mU/ml) e PH (0.5 mU/ml). Il riquadro inserito mostra la velocità di formazione del 3,4-DMC (μ M min⁻¹) in funzione della concentrazione di PH (mU ml⁻¹) ad un valore di concentrazione costante di ToMO (4.5 mU/ml).

INGEGNERIA METABOLICA DELL' *UPPER PATHWAY* DI *P. stutzeri* OX1

In conclusione lo studio del ruolo metabolico di ToMO e PH nel batterio *P. stutzeri* OX1 ha evidenziato come i due enzimi si siano ottimizzati non solo in termini di efficienza catalitica ma anche in termini di regioselettività. In letteratura sono d'altronde noti diversi esempi in cui la regioselettività degli enzimi dell'*upper pathway* è cruciale per il catabolismo di determinati composti aromatici [88, 140].

Da tali osservazioni deriva la sostenibilità di un progetto di ricerca volto ad alterare l'efficienza di un *pathway* metabolico modificando in modo opportuno la regioselettività degli enzimi che lo compongono. E' ovvio che la progettazione di una modifica "razionale" delle funzioni catalitiche di un enzima, compresa la sua regioselettività, deve basarsi sull'individuazione dei residui amminoacidici responsabili della regioselettività dell'enzima stesso. Solo su questa base si potrà procedere alla realizzazione di forme dell'enzima in cui tali residui siano stati razionalmente mutati.

Di seguito è riportata l'analisi del sito catalitico di ToMO, che ha consentito l'individuazione dei residui potenzialmente responsabili della rilassata regioselettività dell'enzima, tra cui in particolare è stato individuato il residuo E103, e la caratterizzazione di alcune forme di ToMO in cui quest'ultimo residuo è stato mutato (ToMO-E103G, ToMO-E103L, ToMO-E103M).

Nel presente progetto di tesi tali mutanti sono stati analizzati per individuare eventuali cambiamenti avvenuti in termini di efficienza catalitica o regioselettività rispetto all'enzima *wt*.

E' stato inoltre analizzato l'effetto derivante dall'accoppiamento di forme mutate dell'enzima ToMO con l'enzima PH *wt* nel metabolismo del toluene e dell'*o*-xilene. Ciò è stato effettuato avendo verificato che, per la degradazione di tali composti, sono rilevanti le proprietà di regioselettività sia dell'enzima ToMO che di PH.

- **Docking di prodotti ossidrilati nel sito attivo di ToMO**

L'analisi della struttura cristallografica del complesso ToMO H ed il docking dei composti aromatici ossidrilati all'interno della cavità del sito attivo sono stati condotti dal dottor Eugenio Notomista del Dipartimento di Biologia Strutturale e Funzionale dell'Università di Napoli Federico II. La procedura seguita è qui riportata solo al fine di poter meglio valutare i risultati ottenuti.

La struttura ai raggi X (codice PDB 1T0Q) della componente ossidrilasica di ToMO (ToMO H), determinata recentemente, è stata analizzata allo scopo di individuare i determinanti molecolari della regioselettività su substrati metilati quali benzene e xileni.

Il docking manuale, dei prodotti del primo stadio di ossidrilazione come fenolo, cresoli e dimetilfenoli è stato effettuato allo scopo di verificare quale orientazione assumano le molecole aromatiche dopo la reazione di ossidrilazione e quindi quale orientazione potrebbero assumere i corrispondenti substrati all'interno della tasca del sito attivo (vedi Figura 11).

Il docking dei (metil)fenoli è stato effettuato collocando l'ossigeno del gruppo ossidrilico a circa 2 Å da ciascuno ione Fe in una "posizione a ponte" che nella struttura cristallografica è occupata da uno degli atomi di ossigeno di uno ione tioglicolato legato nel sito attivo.

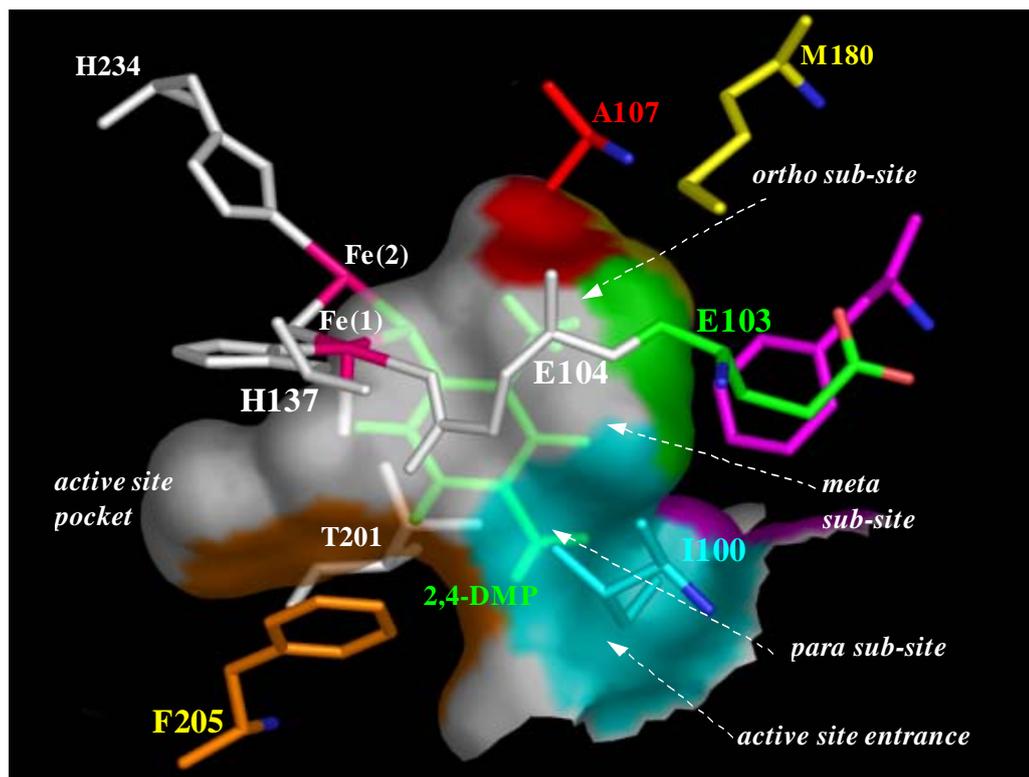


Figura 11. Docking del substrato 2,4 DMP(in verde) nel sito attivo di ToMO A.

L'atomo di ossigeno dei fenoli è stato quindi usato come centro di rotazione e sono state cercate quelle conformazioni che ottimizzavano i contatti di van der Waals fra il substrato e la tasca dell'enzima. Con tutti i (metil)fenoli utilizzati si è osservato che le sovrapposizioni steriche erano minimizzate quando l'anello aromatico veniva disposto in posizione ortogonale al piano definito dagli ioni Fe del centro catalitico. Quando sono stati inseriti nella cavità (dimetil)fenoli con un gruppo metilico in posizione *orto* al gruppo ossidrilico si è osservato che tale sostituito poteva essere alloggiato in un ipotetico sub-sito collocato tra il gruppo metilico del residuo A107, il gruppo metilico terminale del residuo M180 ed i due gruppi metilenici del residuo E103 il cui gruppo carbossilico è invece orientato in direzione opposta alla tasca di legame e quindi non interagisce con i substrati. I gruppi metilici in posizione *meta* possono invece essere collocati in un ipotetico sub-sito tra i gruppi metilenici del residuo E103, l'anello aromatico del residuo F176 e parte della catena laterale del residuo I100. Infine i gruppi metilici in posizione *para* possono essere collocati in un ipotetico sub-sito tra le catene laterali dei residui F205 e I100. Questi due residui sono posizionati nel punto in cui il lungo canale che collega la superficie della proteina al centro diferrico si slarga per formare la cavità del sito attivo.

Studi condotti nel laboratorio in cui è stato sviluppato il presente progetto di tesi, precedenti alla determinazione della struttura di ToMO H e basati sull'analisi di un modello per omologia costruito usando la struttura di MMO H come stampo, avevano già mostrato che il residuo E103 poteva svolgere un ruolo importante nella determinazione della regioselettività sui composti metilati, ruolo confermato dall'analisi della struttura cristallografica.

Un interessante confronto è inoltre possibile con la T4MO, enzima con regioselettività più ristretta rispetto a ToMO. A differenza di quest'ultimo, che a partire dal toluene forma miscele di *o*-, *m*-, e *p*-cresolo, la T4MO forma infatti a partire dal

medesimo substrato quasi unicamente *p*-cresolo. Nelle immediate vicinanze della cavità a cui si lega il substrato i siti attivi di ToMO e della T4MO differiscono solo per le posizioni 103 e 180 che nella T4MO sono occupate rispettivamente da glicina, condivisa dalla maggior parte delle altre proteine di gruppo 2, e isoleucina.

Nel laboratorio in cui è stato svolto il presente progetto di tesi erano già stati progettati e realizzati, mediante esperimenti di mutagenesi sito-diretta, mutanti dell'enzima ToMO in cui il residuo E103 è stato sostituito con gli amminoacidi presenti nella T4MO (glicina), e nelle PH (leucina o metionina). I mutanti ottenuti sono stati indicati come ToMO-E103G, ToMO - E103L, ToMO - E103M.

Caratterizzazione dei mutanti ToMO-E103G, ToMO - E103L, ToMO - E103M

• Espressione e caratterizzazione enzimatica dei mutanti ToMO

Il plasmide pBZ1260 ed i plasmidi pTou-ToMOA(E103G), -ToMOA(E103M) e -ToMOA(E103L) sono stati utilizzati per trasformare il ceppo di *E. coli* JM109 ed esprimere i complessi ToMO *wt* e mutanti come descritto nei Materiali e Metodi. Le cellule indotte sono state risospese in mezzo di coltura minimo M9 contenente glucosio 0.4% (M9-G) e utilizzate per saggiare le proprietà catalitiche del complesso ToMO *wt* e dei complessi ToMO-E103G, ToMO - E103L, ToMO - E103M.

Le cellule risospese in M9-G sono sempre state saggiate su fenolo e l'attività specifica su tale substrato è stata utilizzata come valore di riferimento allo scopo di rendere confrontabili saggi enzimatici effettuati utilizzando preparazioni differenti di ciascuna proteina mutante. Le cellule esprimenti ToMO *wt* e tutti i mutanti hanno mostrato attività specifiche nell'intervallo 10-20 mU/ml

• Determinazione dei parametri cinetici dei mutanti ToMO.

Cellule di *E. coli* JM109 esprimenti i mutanti (E103G)-ToMO, (E103M)-ToMO e (E103L)-ToMO, sono state impiegate per la determinazione dei parametri cinetici di tali enzimi. I saggi sono stati condotti secondo le modalità descritte nella sezione Materiali e Metodi e le costanti cinetiche sono state determinate mediante utilizzo del programma GraphPad Prism.

In Tabella 6 sono mostrate le costanti cinetiche apparenti dei tre mutanti per il fenolo, e unicamente per il mutante E103G per i cresoli. Inoltre in Tabella 7 sono riportati i valori di k_{cat} dei tre mutanti per il benzene, il toluene e l'*o*-xilene. La prima importante osservazione è che nessuna delle mutazioni sembra aver compromesso l'attività catalitica dell'enzima.

Paragonando i valori di K_M ottenuti per i mutanti e per l'enzima ToMO *wt* appare evidente che l'affinità per il fenolo della proteina *wt* e dei mutanti E103G ed E103M risulta praticamente identica nell'ambito dell'errore sperimentale. Quest'osservazione consente di affermare che pertanto la presenza di un carbossilato, o comunque di un gruppo polare, in posizione 103 non è indispensabile per il legame del fenolo al sito attivo. Al contrario il mutante E103L mostra una K_M circa 5 volte più alta, e pertanto tale mutazione riduce l'affinità per il fenolo.

Inoltre è possibile osservare che unicamente le mutazioni E103M and E103L causano una diminuzione di tre volte del valore di k_{cat} sul fenolo, mentre tutti le altre k_{cat} apparenti determinate sono identiche o molto simili a quelle misurate per l'enzima ToMO *wt*. Le costanti cinetiche apparenti sui cresoli sono state determinate solo per il mutante E103G e sono state ritrovate identiche a quelle misurate per ToMO *wt* (Tabella 6).

TABELLA 6

		ToMO	E103G	E103L	E103M
Fenolo	K_M (μM) ^a	2.18	2.7	15	2.5
	k_{cat} (sec^{-1}) ^b	1.0	1.0	0.89	0.29
	k_{cat}/K_M ($\text{sec}^{-1} \mu\text{M}^{-1}$)	0.46	0.37	0.064	0.1
<i>o</i>-cresolo	K_M (μM) ^a	6	11.2		
	k_{cat} (sec^{-1}) ^b	0.9	1.5		
	k_{cat}/K_M ($\text{sec}^{-1} \mu\text{M}^{-1}$)	0.15	0.13		
<i>m</i>-cresolo	K_M (μM) ^a	9.38	13.2		
	k_{cat} (sec^{-1}) ^b	0.44	1		
	k_{cat}/K_M ($\text{sec}^{-1} \mu\text{M}^{-1}$)	0.047	0.076		
<i>p</i>-cresolo	K_M (μM) ^a	13.3	11		
	k_{cat} (sec^{-1}) ^b	0.63	0.59		
	k_{cat}/K_M ($\text{sec}^{-1} \mu\text{M}^{-1}$)	0.047	0.054		

Tabella 6. Parametri cinetici apparenti di ToMO e suoi mutanti su fenolo e cresoli

TABELLA 7

	Benzene	Toluene	<i>o</i> -Xilene
Mutante	k_{cat} (sec^{-1})	k_{cat} (sec^{-1})	k_{cat} (sec^{-1})
ToMO	0.36	0.42	0.25
E103G	0.43	0.42	0.42
E103L	0.29	0.32	0.36
E103M	0.26	0.30	0.2

Tabella 7. Valori di K_{cat} dei mutanti di ToMO su benzene, toluene e *o*-xilene

- **Determinazione della regioselettività su toluene ed *o*-xilene**

Toluene ed *o*-xilene sono stati impiegati come composti modello per lo studio dell'effetto delle mutazioni in posizione 103 sulla regioselettività di ToMO. ToMO *wt* e i mutanti ToMO-E103G, ToMO-E103L, ToMO-E103M sono stati espressi in cellule di *E. coli* del ceppo JM109 come descritto precedentemente e saggiate su fenolo per determinare l'attività specifica di ciascun clone impiegato. Quindi le cellule sono state incubate con concentrazioni di toluene o di *o*-xilene pari a 1 mM. Ai tempi opportuni sono state prelevate aliquote e la reazione è stata bloccata mediante aggiunta di HCl 1 M. I sopranatanti sono stati esaminati mediante successiva analisi HPLC per determinare l'abbondanza relativa degli isomeri prodotti. Nel caso del toluene i tre possibili prodotti, *o*-, *m*-, e *p*-cresolo, sono stati separati mediante cromatografia liquida utilizzando una resina cromatografica funzionalizzata con β -ciclodestrina come descritto nella sezione Materiali e Metodi. Nel caso dell'*o*-xilene i due possibili

prodotti, ovvero il 2,3-DMP ed il 3,4-DMP, sono stati separati utilizzando una colonna C18 eluita in fase inversa. La distribuzione degli isomeri di cresoli e dimetilfenoli è riportata in Tabella 8.

Sebbene i parametri cinetici relativi ai mutanti, precedentemente illustrati, sono risultati molto simili a quelli misurati per ToMO *wt*, sono state invece osservate grandi variazioni nella loro proprietà di regioselettività.

ToMO *wt* produce a partire al toluene quantità simili di *o*- e *p*-cresolo (36% e 45% rispettivamente) ed una quantità relativamente piccola di *m*-cresolo (19%) mentre l'*o*-xilene viene convertito all'80% in 3,4-dimetilfenolo e al 20% di 2,3-dimetilfenolo.

Come si può osservare dai dati riportati in Tabella 8, la mutazione E103G aumenta l'ossidrilazione in posizione *para* rispetto al gruppo metilico. Infatti la percentuale di *p*-cresolo ottenuta a partire dal toluene è praticamente raddoppiata, mentre la percentuale di 3,4-DMP aumenta fino al 99%.

TABELLA 8

Substrato	toluene			o-xilene	
	o-cresolo	m-cresolo	p-cresolo	2,3-DMP	3,4-DMP
wt	36	19	45	20	80
E103G	9	6	85	1	99
E103L	20	11	69	6	94
E103M	47	19	34	18	82

Tabella 8. Regioselettività di ToMO e suoi mutanti su toluene e *o*-xilene.

La regioselettività di questo mutante ricorda quella della monoossigenasi T4MO di *Pseudomonas mendocina* KR1, che è un enzima fortemente *para*-orientante [141]. Quanto osservato non è inatteso dal momento che il residuo E103 è uno dei due residui del sito attivo che sono differenti nelle sequenze di ToMO, della T4MO e della T3MO. L'altro residuo differente si ritrova in posizione 180 ed è, rispettivamente nei tre enzimi, un residuo di metionina, un residuo di isoleucina ed uno di fenilalanina.

Anche la mutazione E103L causa un simile, anche se più limitato, incremento della frequenza di ossidrilazione in posizione *para* del toluene e dell'*o*-xilene. Infine la mutazione E103M causa l'inversione delle percentuali di *o*- e *p*-cresolo ottenute a partire dal toluene, ma non cambia la distribuzione dei dimetilfenoli ottenuti a partire dall'*o*-xilene.

I cambiamenti nella regioselettività dell'ossidrilazione del toluene, avvenuti al seguito della mutazione della posizione 103 di ToMO A, possono essere giustificati considerando il docking dei (di)metilfenoli nel sito attivo di ToMO.

La regiospecificità rilassata di ToMO indica che almeno tre differenti posizioni nel sito attivo possono accomodare il gruppo metilico del toluene. I risultati del docking suggeriscono infatti l'esistenza di tre sub-siti che possono orientare i gruppi metilici dei differenti substrati in modo tale che il carbonio in *orto*, in *meta* o quello in *para* siano presentati al centro diferrico.

Pertanto è ragionevole ipotizzare che è la differenza nell'affinità di legame di ogni sub-sito con un gruppo metilico che determina la relativa abbondanza di ben tre complessi enzima-substrato, da cui deriva la distribuzione di cresoli prodotta da ToMO *wt*. Di conseguenza, la bassa percentuale di *m*-cresolo prodotta da ToMO a

partire dal toluene suggerisce che il sub-sito *meta* abbia una bassa affinità per i gruppi metilici, rispetto ai sub-siti *orto* e *para*.

Pertanto, la ridotta ossidrilazione delle posizioni *orto* e *meta* sull'anello aromatico del toluene, osservata dopo impiego del mutante E103G (Tabella 8), potrebbe essere giustificata sulla base di una destabilizzazione dell'interazione tra il gruppo metilico del substrato e i sub-siti *orto* e *meta* dovuta alla ridotta porzione non polare della catena laterale del residuo 103.

D'altro canto si osservano solo piccoli cambiamenti nella regioselettività quando il residuo E103 è mutato in metionina, ovvero solo un piccolo incremento nella produzione di *o*-cresolo.

Questo potrebbe essere facilmente attribuito ad una stabilizzazione delle interazioni con il sub-sito *orto*, dovuta alla presenza di un residuo avente quasi le medesime dimensioni, ma più idrofobico.

Anche per la mutazione E103L, la riduzione delle percentuali di *o*- e *m*-cresolo potrebbe essere giustificata da una destabilizzazione dei legami in corrispondenza dei sub-siti *orto* e *meta*.

Quanto osservato è abbastanza sorprendente del momento che la leucina presenta un volume di van der Waals ed una idrofobicità simili alla metionina ed è d'altronde il residuo che più frequentemente si ritrova in posizioni omologhe in membri della sottofamiglia delle T2MO (in 14 di 15 sequenze).

Al contrario, è stato riportato che la mutazione G103L nell'enzima T4MO causa un aumento della percentuale di *o*-cresolo ottenuta a partire dal toluene [98]. Le mutazioni G103L ed E103L, pertanto, producono effetti opposti nella ToMO ed in T4MO, nonostante le subunità A dei due enzimi mostrino circa il 67% di identità e che i residui in posizione 103 ed in posizione 180 siano gli unici residui amminoacidici differenti presenti nel sito catalitico dei due enzimi. La sostituzione della metionina con l'isoleucina in posizione 180 potrebbe giustificare le differenze osservate tra (G103L)-T4MO e (E103L)-ToMO poiché anche la catena laterale di questo residuo contribuisce al sub-sito *orto*.

Nel metabolismo del toluene e dell'*o*-xilene abbiamo dimostrato che le proprietà di regioselettività degli enzimi coinvolti svolgono un ruolo notevolmente importante, portando alla formazione di isomeri che sono maggiormente riconosciuti dall'enzima successivo del *pathway* o che talvolta sono gli unici composti che possono essere ulteriormente degradati.

Da tali osservazioni deriva la possibilità di modificare l'efficienza di un *pathway* metabolico alterando la regioselettività degli enzimi in esame.

Per tale ragione abbiamo monitorato l'effetto derivante dall'accoppiamento dell'enzima PH *wt* con forme mutate dell'enzima ToMO aventi, come precedentemente illustrato, differenti proprietà di regioselettività rispetto all'enzima *wt*.

Particolare attenzione è stata rivolta all'enzima E103G per le sue peculiari caratteristiche: l'utilizzo di tale forma mutata porta infatti ad un incremento delle percentuali di *p*-cresolo e di 3,4-DMP rispetto all'impiego dell'enzima *wt*. Come precedentemente illustrato il *p*-cresolo ed il 3,4-DMP sono i migliori substrati di PH nel secondo passaggio di ossidrilazione del metabolismo rispettivamente del toluene e dell'*o*-xilene.

- **Metabolismo del toluene e dell'*o*-xilene ad opera di miscele di cellule esprimenti PH e mutanti di ToMO.**

Miscele di cellule esprimenti singolarmente forme mutate dell'enzima ToMO (1mU/ml) e l'enzima PH *wt* (1mU/ml) sono state incubate con toluene 30 μ M e la formazione dei metilcatecoli è stata monitorata mediante HPLC come descritto nella sezione Materiali e Metodi

I risultati riportati in Tabella 9 , indicano che l'impiego del mutante E103M aumenta leggermente la produzione di 3-MC, al contrario l'impiego di E103L ed E103G la riduce rispettivamente di 1.8 e 4 volte. E' importante notare che l'accoppiamento (E103G)-ToMO/PH produce essenzialmente 4-MC.

TABELLA 9

		wt ToMO/PH	(E103G)- ToMO/PH	(E103L)- ToMO/PH	(E103M)- ToMO/PH
Prodotti (%)	3-MC	55	14	29	67
	4-MC	45	86	71	33

Tabella 9. Regioselettività di miscele di cellule PH/ Tomo *wt* e mutanti sul toluene

I cambiamenti nella regioselettività di mutanti di ToMO, pertanto, hanno considerevoli effetti nel metabolismo del toluene quando questi mutanti sono usati in combinazione con l'enzima PH *wt*.

Ovvero, la sola regolazione della regioselettività di ToMO consente di variare la relativa abbondanza di 3-MC e 4-MC.

E' stato inoltre investigato l'effetto derivante dall'utilizzo concertato di PH con il mutante (E103G)-ToMO nel metabolismo dell'*o*-xilene.

Miscele di cellule esprimenti (E103G)-ToMO (1.5 mU/ml) e cellule esprimenti PH (1.5 mU/ml) sono state incubate con *o*-xilene 20 μ M. La concentrazione di 2,3- e 3,4-DMP, 3,4- e 4,5-DMC è stata misurata mediante HPLC in funzione del tempo (Figura 12 B).

In contrasto con quanto osservato impiegando miscele di ToMo *wt* e PH (Figura 12 A) non si è avuto alcun accumulo di 2,3-DMP, e la velocità di formazione del 3,4-DMC è praticamente raddoppiata.

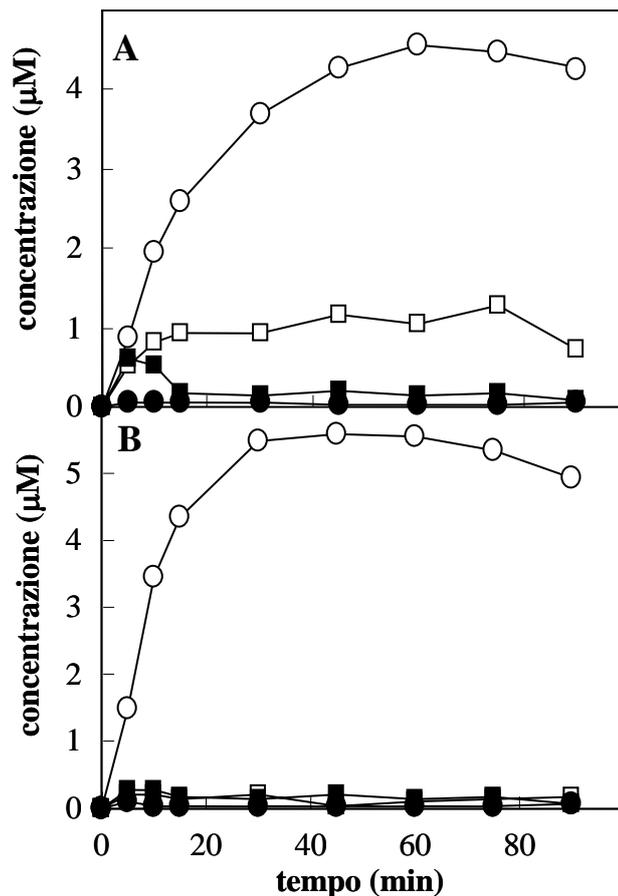


Figura 12. Cinetica di formazione del 2,3-DMP (quadrati chiari), 3,4-DMP (quadrati scuri), 3,4-DMC (cerchi chiari) and 4,5-DMC (cerchi scuri) impiegando (A) miscele di cellule esperimenti ToMO (1.5 mU/ml) e PH (1.5 mU/ml), e (B) miscele di cellule esperimenti (E103G)-ToMO (1.5 mU/ml) e PH (1.5 mU/ml), in presenza di *o*-xilene 20 µM.

Il cambiamento della regioselettività nella trasformazione dell'*o*-xilene operata dal mutante E103G è metabolicamente rilevante perché porta ad un incremento nella produzione di 3,4-DMP, che è efficientemente convertito da PH nel secondo passaggio d'ossidrilazione in 3,4-DMC, il solo dimetilcatecolo che può essere ulteriormente metabolizzato dalla C2,3O.

Per confermare tali risultati una quantità costante di cellule esperimenti PH (0.5 mU/ml) sono state incubate in presenza di 40 µM *o*-xilene con differenti concentrazioni di cellule esperimenti (E103G)-ToMO o ToMO *wild type* (0.3-6 mU/ml). La velocità di formazione del 3,4-DMC è stata monitorata con un saggio spettrofotometrico accoppiato con l'enzima C2,3O. Anche in questo caso è stato possibile osservare un andamento di tipo iperbolico. La velocità massima raggiunta è stata la medesima in entrambi i casi ma è stata raggiunta ad un livello di concentrazione più bassa quando è stato utilizzato il mutante (E103G)-ToMO. Grandi differenze nella velocità di reazione misurata utilizzando (E103G)-ToMO o ToMO

sono state osservate a basse concentrazioni. La differenza diminuisce all'aumentare della concentrazione di ToMO poiché, ad alte concentrazioni di ToMO, la concentrazione di PH diviene il fattore che limita la velocità (Figura 13).

I risultati presentati chiaramente mostrano che l'uso del mutante (E103G)-ToMO accoppiato con PH aumenta l'efficienza della conversione dell' *o*-xilene in 3,4-DMC. È importante notare che la concentrazione di *o*-xilene utilizzate (20-40 μM) sono saturanti sia per ToMO che per il mutante (E103G)-ToMO. I risultati osservati non possono inoltre essere attribuiti ad una variazione del valore di K_M di (E103G)-ToMO per l' *o*-xilene. Tuttavia, anche se il mutante (E103G)-ToMO mostra un valore di k_{cat} per l'*o*-xilene leggermente più alta di quella di ToMO, l'incremento osservato nella conversione dell' *o*-xilene in 3,4-DMC può essere almeno in parte attribuito al fatto che il principale prodotto di (E103G)-ToMO è il 3,4-DMP (99%), ovvero il miglior substrato di PH, che lo converte in 3,4 DMC.

Possiamo pertanto concludere che l'accoppiamento (E103G)-ToMO e PH aumenta la produzione di 4-metilcatecolo dal toluene e di 3,4-DMC dall' *o*-xilene.

In conclusione i dati raccolti supportano fortemente l'idea che l'efficienza di un *pathway* metabolico possa essere controllata non soltanto aumentando l'efficienza degli enzimi coinvolti ma anche controllando la loro specificità di substrato e la loro regioselettività. Le osservazioni esposte sono importanti per eventuali futuri sviluppi nell'ambito dell'ingegneria metabolica.

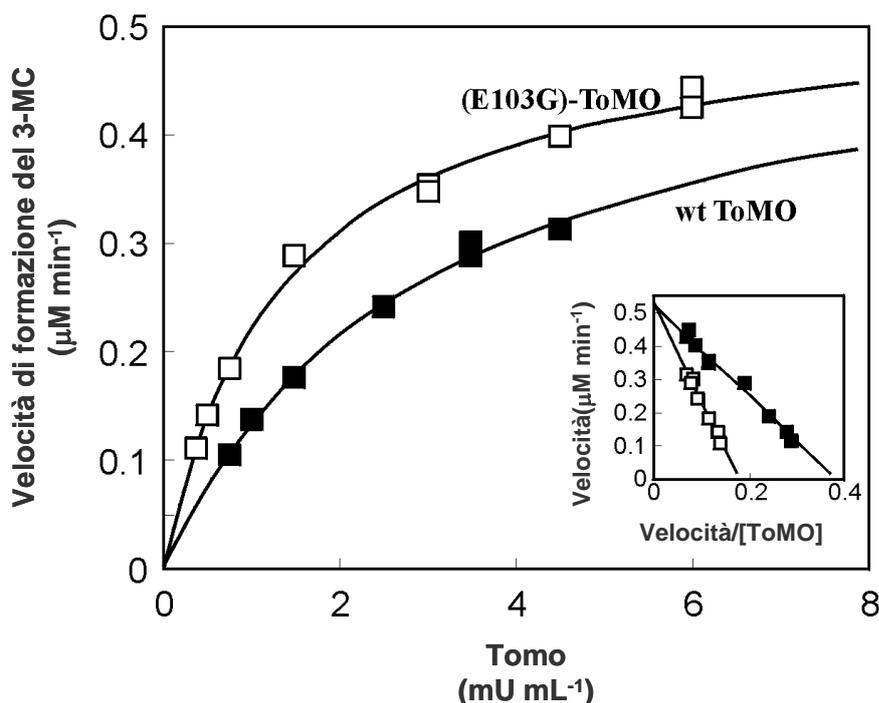


Figura 13. Cinetica di formazione del 3,4-DMC. Cellule esponenti PH sono utilizzate ad una concentrazione costante (0.5 mU/ml) e la velocità di formazione del 3,4 DMC è stata misurata in funzione dell'aumento di concentrazione di cellule esponenti ToMO (quadrati scuri) o (E103G)-ToMO (quadrati chiari), in presenza di *o*-xilene 40 μM . Il riquadro mostra la linearizzazione ottenuta riportando la velocità ($\mu\text{M min}^{-1}$) in funzione del rapporto velocità/[ToMO] ($\mu\text{M min}^{-1}/\text{mU mL}^{-1}$).

II Parte

STUDIO DEGLI UPPER PATHWAYS DA *Pseudomonas stutzeri* OX1 E DA *Pseudomonas* PaW1 NEL METABOLISMO DELL'*o*- E DEL *p*-XILENE

Lo xilene, composto xenobiotico tossico e dannoso per l'ambiente, si presenta solitamente in miscele costituite dai suoi tre isomeri *o*-, *m*-, *p*- xilene.

Per tale motivo l'abilità di degradare tutti e tre gli isomeri dello xilene potrebbe rappresentare un vantaggio per batteri che colonizzano ambienti inquinati.

Studi condotti sulla degradazione degli xileni hanno mostrato che i tre isomeri non possono essere degradati attraverso un unico *pathway*, a causa delle proprietà biochimiche degli enzimi coinvolti [76].

Nei batteri i primi passaggi della degradazione del *m*- e del *p*-xilene avvengono ad opera delle attività enzimatiche di quello che è noto come TOL *upper pathway* [78]. Il primo enzima di tale *pathway* è il complesso monoossigenasico della xilene monoossigenasi (XMO) che catalizza una reazione di ossidazione del gruppo metilico dell'anello aromatico portando alla formazione di alcool benzilico. L'azione degli enzimi successivi del *pathway* porta alla formazione di catecoli che possono essere ulteriormente processati.

La degradazione dell'*o*-xilene avviene invece mediante diretta ossidrilazione dell'anello aromatico ad opera di enzimi del TOU *upper pathway*, quali ToMO e PH da *P. stutzeri* OX1, portando alla formazione di un dimetilcatecolo, riconosciuto e processato dalla C2,3O. ToMO e PH sono in grado di ossidrilare anche l'anello aromatico del *m*- e del *p*- xilene, ma l'ossidrilazione di tali composti porta alla formazione di dimetilcatecoli (il 3,5 ed il 3,6 DMC) che non sono substrato della C2,3O[37, 76].

La XMO d'altro canto non riconosce come substrato l'*o*-xilene, [142] e pertanto miscele di xileni non sono degradabili mediante impiego esclusivo di uno dei due *pathway* illustrati.

In *P. stutzeri* OX1 sono stati ritrovati sia l'operone catabolico per la degradazione dell'*o*-xilene sia quello per la degradazione del *m*- e del *p*-xilene, che sono mutuamente inattivati a seconda dell'isomero dello xilene disponibile [75].

E' stato d'altronde isolato un particolare ceppo di *P. stutzeri* OX1, indicato come ceppo revertante R1, in grado di crescere su miscele di xileni, che presentava entrambi i *pathway* catabolici attivi. Le cellule di R1 che crescevano su *m*- e su *p*-xilene esibivano un colore bruno suggerendo l'accumulo di composti parzialmente ossidrilati dovuti all'azione di ToMO su tali composti.[77, 82]. Nel ceppo revertante R1, probabilmente al seguito dell'accumulo di tali composti, è stata riscontrata un'elevata letalità cellulare[82].

La contemporanea espressione dei due *upper pathway* TOU e TOL non sembra pertanto essere una strategia metabolicamente vantaggiosa per il batterio, anche se la combinazione delle attività enzimatiche di ToMO e di XMO potrebbe consentire la degradazione di miscele di xileni.

Nell'ambito di un progetto più ampio volto a potenziare le capacità metaboliche del batterio *P. stutzeri* OX1, è di seguito riportata una parziale caratterizzazione del primo enzima dell'*upper* TOL *pathway*, la XMO, rivolgendo particolare attenzione al comportamento dell'enzima in combinazione con ToMO su miscele di xileni.

Gli enzimi del TOL *pathway* di *P. stutzeri* OX1 presentano un'elevatissima similarità di sequenza amminoacidica con quelli del medesimo *pathway* dal batterio *Pseudomonas* PAW1 [128, 143]. I geni catabolici in esame in PAW1 sono localizzati su un particolare plasmide, il pWW0 [78], e non sul cromosoma del batterio, come in *P. stutzeri* OX1. Per tale ragione, essendo disponibile nel laboratorio in cui è stato svolto il presente progetto di tesi il ceppo batterico *Pseudomonas* PAW1, si è preferito utilizzare quest'ultimo per l'isolamento dei geni catabolici di interesse.

Gli esperimenti di seguito riportati illustrano il clonaggio del gene, l'espressione e la parziale caratterizzazione della xilene monoossigenasi, il primo enzima del TOL *pathway* da *Pseudomonas* PaW1 e l'esecuzione di saggi combinati con l'enzima ToMO, primo enzima del TOU *pathway* da *P. stutzeri* OX1.

- **Clonaggio del gene della xilene monoossigenasi nel vettore pACYCDuet**

La crescita del batterio *Pseudomonas* PaW1 è stata condotta in terreno minimo contenente come fonte di carbonio malato alla concentrazione di 10 mM e come induttore il composto 4-metil-benzil-alcool alla concentrazione di 2 mM, un intermedio della via degradativa codificata dai geni del *tol* *pathway*, al fine di mantenere una pressione selettiva ed evitare la perdita del plasmide dalle cellule in coltura.

Successivamente l'isolamento del plasmide pWWO dal batterio PAW1 è stato eseguito impiegando un protocollo sperimentale adeguato alle notevoli dimensioni del plasmide (116580 bp), come descritto nella sezione Materiali e Metodi.

A partire dal DNA stampo pWWO i geni *xyIM* e *xyIA* sono stati amplificati in due differenti reazioni di PCR impiegando oligonucleotidi specifici e digeriti con gli opportuni enzimi di restrizione. Il vettore pACycDuet è stato linearizzato e ligato con entrambi i geni contemporaneamente in un esperimento di ligasi a tre componenti, secondo le modalità descritte nella sezione Materiali e Metodi. Sebbene il vettore impiegato consentisse di clonare due geni distinti disponendo di due differenti polilinker e quindi per entrambi utilizzare le forti *rbs* del vettore, si è preferito adottare una strategia differente. E' stato infatti realizzato un costrutto in cui il gene codificante per la componente ossidrilasica XylA si ritrova sotto il controllo dei forti segnali della traduzione del vettore utilizzato, mentre la traduzione della componente reduttasica XylA è regolata delle *rbs* proprie del gene. E' noto da dati di letteratura che quantità elevate della componente reduttasica possono essere svantaggiose per il sistema per il numero di cicli non produttivi di trasferimento di elettroni a cui possono dare origine danneggiando la cellula ospite. Pertanto nel sistema impiegato si è cercato di evitare la sovraespressione di XylM, ma di ottenere un livello di espressione che consentisse unicamente la corretta funzionalità del complesso.

Il costrutto ottenuto è stato denominato pACYcDuet/ *xyIM*- *xyIA* ed è illustrato in Figura 14.

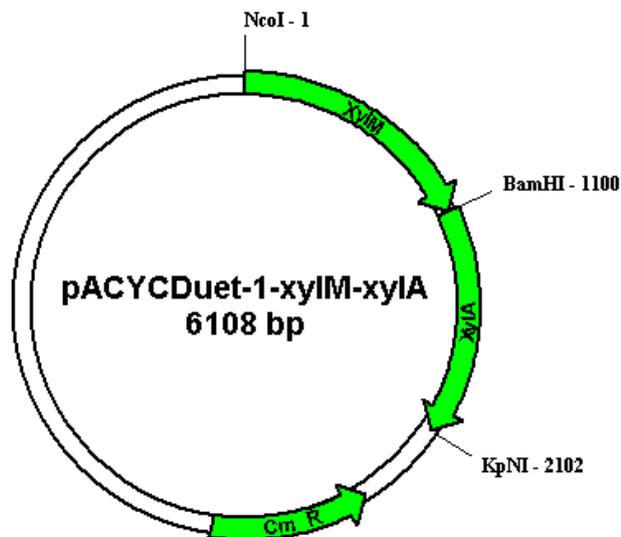


Figura 14. Costrutto pACYcDuet/ *xyIM- xyIA*

- **Espressione della xilene monoossigenasi ricombinante**

Il costrutto realizzato pACYcDuet/ *xyIM- xyIA* è stato impiegato per trasformare il ceppo di *E.coli* BL21(DE3) per l'espressione del complesso della xilene monoossigenasi come descritto nella sezione Materiali e Metodi. E' stata eseguita un'analisi elettroforetica su SDS-PAGE dei lisati cellulari indotti e non indotti. Tale analisi ha consentito di evidenziare, nel lisato di cellule indotte, l'espressione di una proteina del peso molecolare di 41,000 Da, come atteso per la componente ossidrilasica XylM del complesso XylMA (Figura 15). Dall'analisi elettroforetica non siamo riusciti ad identificare alcuna proteina di mobilità elettroforetica simile alla componente reduttasica *xyIA*, come d'altronde atteso non avendo predisposto la sovraespressione della proteina in esame.

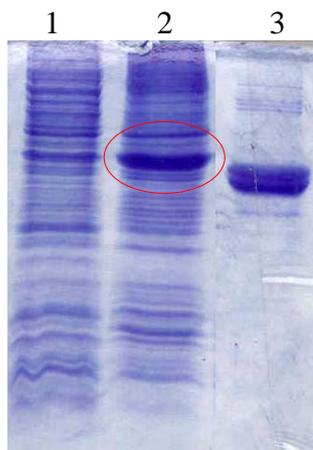


Figura 15. Analisi elettroforetica su SDS-PAGE.

- 1) Lisato cellulare non indotto
- 2) Lisato cellulare indotto
- 3) C2,30 purificata 5 µg P.M.38,000 Da

L'esperimento successivo è stato allestito per verificare la corretta funzionalità del complesso XMO. Il corretto funzionamento del complesso, d'altronde, avrebbe fornito una prova indiretta dell'espressione della componente reduttasica, essendo quest'ultima essenziale per la catalisi.

- **Caratterizzazione funzionale della xilene monoossigenasi : saggi di attività su *p*-xilene**

La componente ossidrilasica della xilene monoossigenasi è una proteina di membrana e pertanto è molto complicato purificarla ed ottenerla in forma cataliticamente attiva. I dati riguardanti la sua caratterizzazione disponibili in letteratura si riferiscono esclusivamente a saggi eseguiti su cellule intere. Pertanto anche in questa linea di ricerca la caratterizzazione della monoossigenasi XMO è stata eseguita impiegando le medesime cellule utilizzate per l'espressione della proteina ricombinante, e l'attività enzimatica è stata espressa come mU/ OD_{600nm}.

Cellule BL21(DE3) sono state trasformate con il costrutto *pACYcDuet/ xyIM- xyIA* e indotte come descritto nella sezione Materiali e Metodi. Le cellule sono state risospese in mezzo di coltura minimo M9-G ed incubate ad una concentrazione di 0.3 OD_{600nm}/ml con *p*-xilene 1 mM per la determinazione dell'attività della XMO su tale composto. A tempi successivi sono state prelevate aliquote da 500 µl e la reazione è stata bloccata con HCl 1M. Le cellule sono state allontanate mediante centrifugazione ed i soprannatanti sono stati esaminati mediante analisi RP-HPLC su colonna C18 con modalità descritte nella sezione Materiali e Metodi. In questo modo è stata monitorata la formazione del prodotto 4-metil-benzil-alcool (4-MBOH) nel tempo.

L'attività specifica su *p*-xilene di XMO è stata ritrovata sempre in un intervallo compreso tra 2.0-2.8 mU/ OD_{600nm}.

- **Saggi combinati ToMO e XMO su *o*- e *p*-xilene**

Da dati di letteratura l'incapacità di *P. stutzeri* OX1 di crescere su miscele di isomeri di xilene sembra essere legata essenzialmente alle proprietà biochimiche dei primi enzimi coinvolti nei due differenti *pathway* responsabili della degradazione di tali molecole. Infatti mentre la xilene monoossigenasi è attiva esclusivamente su *m*- e *p*-xilene e non riconosce l'*o*-xilene come substrato, ToMO e PH mostrano una specificità di substrato più ampia ossidrilando non solo l'*o*-xilene, composto che viene poi totalmente degradato mediante azione dei successivi enzimi del *pathway*, ma anche il *m*- ed il *p*- che vengono convertiti in intermedi non ulteriormente metabolizzabili.

In particolare l'azione di ToMO sul *p*-xilene porta alla formazione di 2,5-DMP, che nel secondo passaggio di ossidrilazione può essere convertito esclusivamente da ToMO e PH in 3,6-DMC, che non è un substrato riconosciuto dalla C2,3O.

Andava comunque verificato che l'associazione dei due enzimi portasse effettivamente alla formazione di tali composti non ulteriormente degradabili.

A tal fine abbiamo eseguito saggi impiegando miscele di cellule esperimenti ToMO (JM109/pBZ1260) e XMO (BL21DE3/ *pACYcDuet/ xyIM- xyIA*) incubandole in presenza di *o*- o di *p*-xilene 1 mM e di miscele dei due. Abbiamo utilizzato in questa prima fase esplorativa unicamente questi due isomeri per semplificare l'esecuzione dei saggi e l'interpretazione dei dati raccolti.

Nel tempo è stata monitorata la velocità di formazione del 2,3- e del 3,4-DMP (ottenuti per azione di ToMO a partire dall'*o*-xilene), del 2,5-DMP e del 4-MBOH

(ottenuti rispettivamente per azione di ToMO e di XMO a partire dal *p*-xilene) mediante analisi HPLC.

I risultati degli esperimenti sono che ToMO mostra un'attività sull'*o*-xilene pari a 0.466 mU/OD_{600nm}. Le medesime cellule incubate in presenza di *p*-xilene 1 mM mostrano un'attività su quest'ultimo composto leggermente più alta rispetto a quella misurata sull'*o*-xilene, e pari a 0.632 mU/OD_{600nm}. Quando cellule esprimenti il complesso ToMO sono state incubate con miscele di *o*- e *p*-xilene, ognuno ad una concentrazione di 1 mM, il valore di attività specifica di ToMO sull'*o*-xilene è rimasto praticamente invariato nell'ambito dell'errore sperimentale, al contrario il valore di attività specifica sul *p*-xilene si è ridotta di circa 20 volte (0.030 mU/ OD_{600nm}).

Tali osservazioni sono giustificabili dal momento che ToMO ha valori di k_{cat} molto simili per i substrati *o*- e *p*-xilene ma valori di K_M differenti. Pertanto, quando i due composti sono presenti in miscele ToMO converte preferenzialmente l'*o*-xilene in 2,3- e 3,4-DMP. La quantità di 2,5-DMP osservata è notevolmente bassa ma comunque rilevabile.

La XMO nei saggi realizzati ha mostrato un'attività specifica sul substrato *p*-xilene pari a 2.5 mU/ OD_{600nm}. Tale valore non è influenzato né dalla presenza dell'*o*-xilene, che non è riconosciuto come substrato, né dalla presenza di cellule esprimenti il complesso ToMO.

Utilizzando miscele di cellule esprimenti ToMO e XMO è stato possibile determinare le medesime attività specifiche su *o*- e *p*- xilene ottenute impiegando gli enzimi singolarmente.

I dati raccolti sembrano pertanto indicare che i due enzimi sono totalmente indipendenti. Infatti i nostri dati mostrano che l'attività dell'uno non è in alcun modo influenzata dalla presenza dell'altro.

E' però da rilevare che ToMO a partire da *o*-xilene forma, anche se in piccole quantità, 2,5 DMP, composto che, nel secondo passaggio di ossidrilazione, può essere convertito unicamente in 3,6 DMC, un dimetilcatecolo non ulteriormente metabolizzabile in quanto non riconosciuto dalla C2,3O.

Pertanto la contemporanea espressione dei due *pathway* in presenza dell'*o*-xilene porterebbe alla formazione di prodotti non ulteriormente metabolizzabili prodotti da ToMO. Questo porterebbe a una perdita di efficienza metabolica. Nulla può essere detto sulla eventuale tossicità degli intermedi accumulati e quindi sulla letalità dei revertanti in cui entrambi i *pathway* sono attivi.

III Parte

STUDIO DEL LOWER PATHWAY DI *Pseudomonas stutzeri* OX1

Nell'ultima parte del presente lavoro di tesi di dottorato sono stati condotti studi volti alla caratterizzazione di due enzimi del *lower pathway* di *P. stutzeri* OX1: la semialdeide 2-idrossimuconica deidrogenasi (HMSD) e la semialdeide 2-idrossimuconica idrolasi (HMSH).

Il lavoro è stato realizzato al fine di poter disporre di una visione più ampia dell'intero *pathway* analizzato e comprendere il destino metabolico di determinate molecole aromatiche.

Nei paragrafi seguenti è riportata l'espressione, la purificazione ed una parziale caratterizzazione biochimica e cinetica degli enzimi HMSD e HMSH.

- **Analisi del tratto genico codificante per HMSD e HMSH**

Il frammento di 3.4 kb, del genoma di *P. stutzeri* OXI contenuto nel costrutto pVS1934 [34], fornito dalla prof.ssa P. Barbieri dell'Università dell'Insubria, Varese-Italia, è stato completamente sequenziato come descritto nella sezione Materiali e Metodi.

La sequenza nucleotidica ottenuta è stata inserita nella banca dati dell'EMBL ed adoperata per ricerche di omologia in banche dati quali Swissprot, Trembl, Tremblnew, utilizzando il programma Blastx. Anche la sequenza amminoacidica dedotta da quella nucleotidica è stata usata per lo stesso scopo utilizzando i programmi Blast e FastA. Queste analisi hanno permesso l'identificazione di tre cornici di lettura: una *orf* codificante per una semialdeide idrossimuconica deidrogenasi (HMSD), una *orf* codificante per una semialdeide idrossimuconica idrolasi (HMSH) ed una *orf* codificante per un 2-ossopenta-4-dienoato idratasi (OEH). Il nostro interesse è stato rivolto verso le regioni codificanti per gli enzimi HMSD e HMSH, che catalizzano due reazioni enzimatiche differenti a carico dei prodotti ottenuti al seguito del taglio idrolitico dell'enzima C2,3O. OEH è invece un enzima coinvolto in una reazione successiva del *lower pathway*.

La cornice di lettura per la semialdeide idrossimuconica deidrogenasi è composta da 1458 coppie di basi che codificano per un polipeptide di 485 residui amminoacidici, di peso molecolare teorico pari a 51,443 Da. La cornice di lettura per la semialdeide idrossimuconica idrolasi è composta da 849 coppie di basi che codificano per un polipeptide di 282 residui amminoacidici, di peso molecolare teorico pari a 31,337 Da.

In Tabella 10 sono riportati i risultati degli allineamenti di sequenza con proteine disponibili in banca dati, eseguiti utilizzando la sequenza amminoacidica ottenuta per la deidrogenasi HMSD e quella ottenuta per l'idrolasi HMSH. L'enzima HMSD mostra un'elevatissima percentuale di identità di sequenza amminoacidica con alcune deidrogenasi coinvolte nei *pathway* di degradazione di diversi composti aromatici, come BPHG da *Achromobacter xylosoxidans* KF701[Kang , 1998 #1084], enzima coinvolto nella degradazione di composti bifenilici o NAHI da *Pseudomonas stutzeri* AN10 [144] dal *pathway* di degradazione del naftalene.

TABELLA 10

Proteina	BPHG	NAHI	NAHI	XYLG	DMPC
% d'identità	99,17	96,7	96,5	94	89
Organismo	<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	<i>Pseudomonas stutzeri</i> AN10	<i>Pseudomonas putida</i>	<i>Pseudomonas putida</i> mt-2	<i>Pseudomonas</i> CF600

Tabella 10: Percentuali di identità di sequenza tra HMSD da *P. stutzeri* e deidrogenasi di altri pathway metabolici

Come illustrato in Tabella 11 la sequenza amminoacidica di HMSH mostra invece una rilevante percentuale d'identità con membri di una particolare famiglia di proteine, le idrolasi α/β ed in particolar modo con membri del sottogruppo che agisce sui prodotti derivati da substrati aromatici a singolo anello. Elevate percentuali di identità si riscontrano con l'idrolasi XylF localizzata sul plasmide pDK1[145] da *Pseudomonas putida* (93.26 %), con NahN da *Pseudomonas stutzeri* AN10 (83,15 %) [144] e con DmpD da *Pseudomonas* CF600 [74] (83.15%). In particolare in quest'ultimo ceppo batterico l'intero operone per il catabolismo del fenolo è simile a quello ritrovato in *P. stutzeri* OX1.

E' nota la struttura cristallografica di alcuni membri della famiglia di idrolasi α/β quali CumD da *Pseudomonas fluorescens* [119], enzima dimerico coinvolto nel metabolismo del cumene che mostra il 66,2 % di identità di sequenza amminoacidica con l'idrolasi HMSH.

TABELLA 11

Proteina	XYLF	NAHN	DMPD	XYLF	CUMD
% di identità	93,26	87,58	83,15	81	66,2
Organismo	<i>Pseudomonas putida</i> (pDK1)	<i>Pseudomonas stutzeri</i> AN10	<i>Pseudomonas</i> CF600	<i>Pseudomonas putida</i> mt-2	<i>Pseudomonas fluorescens</i>

Tabella 11: Percentuali di identità di sequenza tra HMSH da *P. stutzeri* ed idrolasi di altri pathway metabolici

Le idrolasi α/β sono una famiglia di proteine di notevole diversità strutturale ma caratterizzate dalla presenza, nel loro sito attivo, della triade catalitica costituita da un residuo di serina, un residuo di istidina ed un residuo di acido aspartico. Mediante esperimenti di mutagenesi sito-diretta sono stati identificati i residui amminoacidici coinvolti nella trade catalitica nell'idrolasi Xyl F da *Pseudomonas putida* mt-2 [120]. In Figura 16 sono riportati i residui potenzialmente coinvolti nella triade catalitica dell'idrolasi HMSH di *P. stutzeri* OX1 ottenuti dall'analisi dell' allineamento della sequenza amminoacidica con quella di Xyl F. E' stato inoltre possibile localizzare anche la regione situata in prossimità del residuo nucleofilo, altamente conservata in tutti i membri della famiglia di idrolasi α/β nota come "nucleophilic elbow". I risultati delle analisi eseguite sulla sequenza amminoacidica di HMSH sono mostrati in Figura16.

	10	20	30	40	50	
HMSH	MNAPQQSPEIGREILAAGYRTNLHDQEGGFVLLIHGSG----	PGVTAWANWRLVMPQLA				
XYLF	MNAPQQSPEIGREILAAGYRTNLHDQEGGFALLIHGSGPASPPGPTGAGSFRS-----S					
	10	20	30	40	50	
HMSH	60	70	80	90	100	110
	QNRVVIAPDMLGFGYSDRPADGRYHQQRWVEHAIGVLDALGIQQADIV	GN	S	FGGGLALAL		
XYLF	QTRRVIAPDMLGFGYSERPADGKYSQARWVEHAIGVLDALGIQQGDIV	GN	S	FGGGLALAL		
	60	70	80	90	100	110
HMSH	120	130	140	150	160	170
	AIRHPERVRLVLMGSVGVSFPITPGLDAVWGVEPSFASMRRLMDVFAFYDRSLVTNELAE					
XYLF	AIRHPERVRLVLMGSVGVSFPITAGLETAWGYTPSLANMRRLLDLFAHDRTLVNDLAE					
	120	130	140	150	160	170
HMSH	180	190	200	210	220	230
	LRYQASIRPGFQESFAQMFPAPRQRWVDGLASDEADIRALPHETLVIHGRED	QVIPLAAS				
XYLF	LRYQASIRPGFQESFAAMFPPRQNGVDDLASNETDIRALPNETLVIHGRED	RIIPLQAS				
	180	190	200	210	220	230
HMSH	240	250	260	270	280	
	LTLAEWIARAQLHVFHCGH	WTQIEHAERFARLVENFLAEADALHS				
XYLF	LTLAQWIPNAQLHVFHCGH	WTQIEHAERFARLVENFLAEADALHS				
	240	250	260	270	280	

Figura 16. Sequenza amminoacidica di HMSH. In giallo sono evidenziati i residui della triade catalitica. In rosso il *nucleophilic elbow*

- **Espressione degli enzimi HMSD e HMSH ricombinanti**

Il costrutto pVS1934 (pUC19/ *hmsd/ hmsH/ dmpI*) è stato impiegato per trasformare il ceppo di *E.coli* JM109 per l'espressione delle proteine HMSD e HMSH con modalità descritte nella sezione Materiali e Metodi.

Le proteine sono state espresse contemporaneamente impiegando il costrutto pVS1934 dal momento che, quando sono stati eseguiti gli esperimenti di seguito riportati, non era ancora stato completato il sequenziamento dei geni *hmsd* e *hmsH*, che avrebbe consentito il sottoclonaggio dei geni in vettori differenti e l'espressione separata delle due proteine.

L'analisi elettroforetica della frazione solubile e insolubile dopo sonicazione ha mostrato solo una lieve differenza tra il *pattern* proteico delle frazioni solubile del campione indotto e di quello non indotto (dati non mostrati). Quindi questa analisi

non ha consentito di valutare né il numero di prodotti proteici né il loro livello di espressione.

Sono stati condotti saggi sull'estratto grezzo al fine di individuare un'attività enzimatica imputabile alla presenza degli enzimi HMSD e HMSH sui prodotti di fissione del catecolo, del 4-MC e del 3-MC, preparati utilizzando l'enzima C2,3O, come descritto nella sezione Materiali e Metodi.

In Tabella 12 sono riportati i valori di attività specifica misurati sull'estratto grezzo relativi ai tre substrati analizzati. Avendo ritrovato un'attività enzimatica attribuibile alla presenza degli enzimi HMSD e HMSH, abbiamo deciso di condurre un esperimento di espressione preparativa e di realizzare la purificazione dei due enzimi sulla frazione solubile.

TABELLA 12

SUBSTRATO	ATTIVITA' SPECIFICA (mU/OD_{600nm})
Prodotto di fissione del CATECOLO	13.7
Prodotto di fissione del 3MC	181.0
Prodotto di fissione del 4MC	7.47

Tabella 12. Attività specifica dell'estratto JM109/pVS1934 sui prodotti di fissione de catecolo, del 3MC e del 4MC

Purificazione degli enzimi HMSD e HMSH

- **Cromatografia a scambio ionico**

Il primo passaggio cromatografico per la purificazione degli enzimi HMSD e HMSH è stata una cromatografia a scambio anionico Q-Sepharose (FF). L'eluizione è stata condotta applicando un gradiente salino lineare come descritto nella sezione Materiali e Metodi. Il cromatogramma riportato in Figura17 è stato ottenuto riportando l'assorbimento di ciascuna frazione a 280 nm in funzione del numero della frazione.

E' stata valutata l'attività di ogni frazione sul prodotto di fissione del catecolo, del 3-MC e del 4-MC, in presenza e in assenza di NAD⁺, al fine di individuare un'attività imputabile agli enzimi HMSD e HMSH. Le attività dei due enzimi sono distinguibili poiché mostrano una gamma di substrati riconosciuti differente. Inoltre l'attività della deidrogenasi è NAD⁺ dipendente.

In tale modo sono stati isolati *pool* di frazioni che mostravano attività deidrogenasica, ovvero un'attività enzimatica NAD⁺ dipendente sul prodotto di fissione del catecolo e del 4-MC e che non esibivano invece attività sul prodotto di fissione del 3-MC, e *pool* di frazioni che mostravano un'attività idrolasica, ovvero un'attività enzimatica NAD⁺ indipendente su tutti e tre i substrati.

In Figura 17 è riportato il profilo dell'attività enzimatica ritrovata nelle frazioni sul prodotto di fissione del catecolo eseguiti in presenza di NAD⁺.

Esclusivamente le frazioni corrispondenti al secondo picco osservato in tale profilo di attività hanno mostrato attività anche sul prodotto di fissione del 3-MC e l'attività ritrovata è risultata NAD⁺ indipendente.

Tali osservazioni integrate con l'analisi su gel SDS-PAGE dei *pool* di frazioni isolati (Figura 18) hanno consentito di individuare la presenza di HMSD nelle frazioni corrispondenti al primo picco nel profilo di attività e di HMSH nel secondo. Le frazioni in esame sono state riunite e, sia quelle che mostravano attività deidrogenasica sia quelle che mostravano attività idrolasica sono state separatamente sottoposte ad un ulteriore passaggio di purificazione.

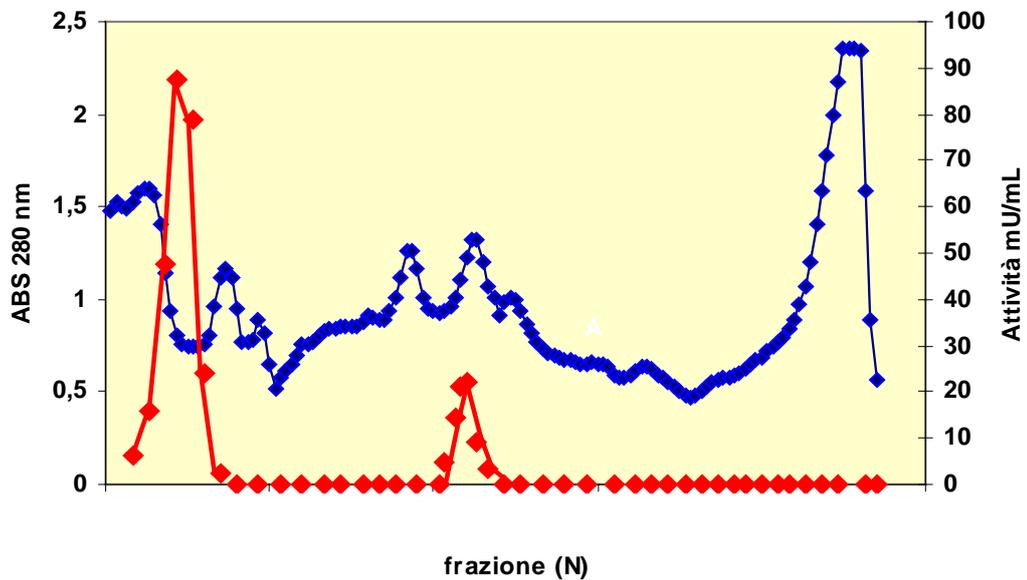


Figura 17. Purificazione degli enzimi HMSD e HMSH: cromatografia a scambio anionico Q-Sepharose e profilo di attività su semialdeide da catecolo (in rosso).

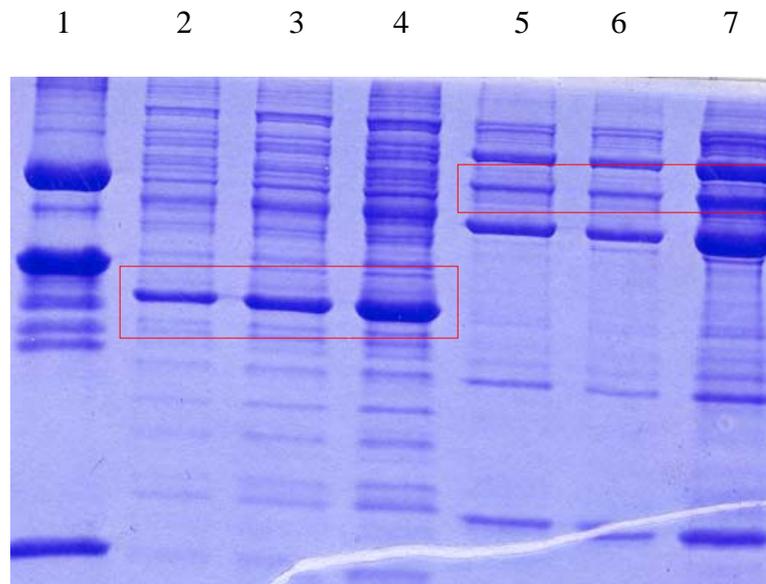


Figura 18. Analisi SDS-PAGE delle frazioni da Q-Sepharose
 1. Complesso BEA purificato (2.4 µg)
 2.3.4. Frazioni del picco cromatografico relativo ad HMSH
 5.6.7. Frazioni del picco cromatografico relativo ad HMSD

Purificazione di HMSD

• Cromatografia a esclusione molecolare

Le frazioni che mostravano un'attività deidrogenasica NAD^+ dipendente sono state riunite e caricate su resina a esclusione molecolare Sephacryl S-300 (Pharmacia Biotech) e l'eluizione è stata condotta come descritto nella sezione Materiali e Metodi. Il cromatogramma ha rivelato la presenza di due picchi principali dei quali solo uno mostrava attività deidrogenasica (Figura 19).

L'analisi elettroforetica (Figura 20) delle frazioni del cromatogramma consente l'individuazione nel picco in esame di una proteina del peso molecolare atteso per le subunità di HMSD (60 KDa). La proteina si presenta comunque in forma non omogenea causa la presenza di proteine contaminanti di peso molecolare superiore. Il picco riunito è stato conservato suddividendolo in piccole aliquote conservate in atmosfera di azoto a -80°C e la determinazione della concentrazione proteica è stata eseguita spettrofotometricamente mediante l'uso di un saggio colorimetrico come descritto nella sezione dei Materiali e Metodi.

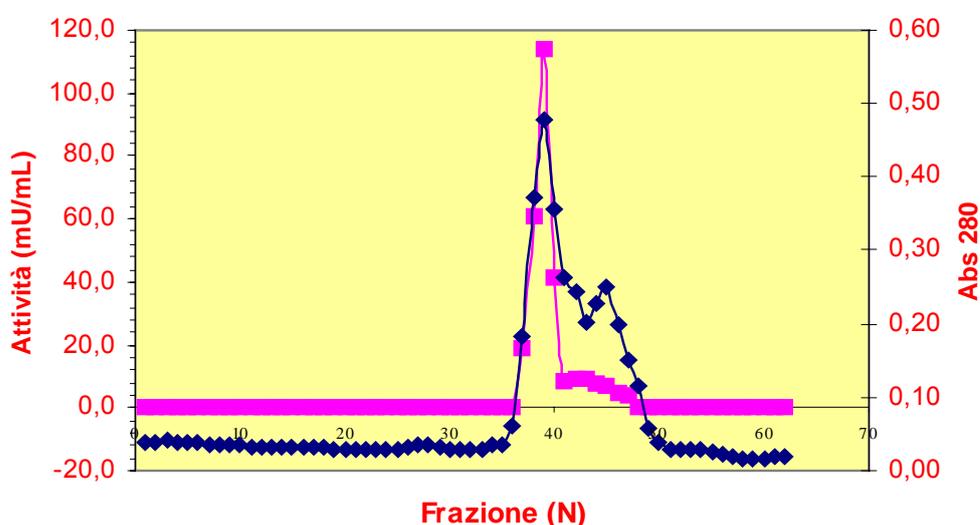


Figura 19. Purificazione di HMSH: cromatografia a esclusione molecolare e profilo di attività (in fucsia)

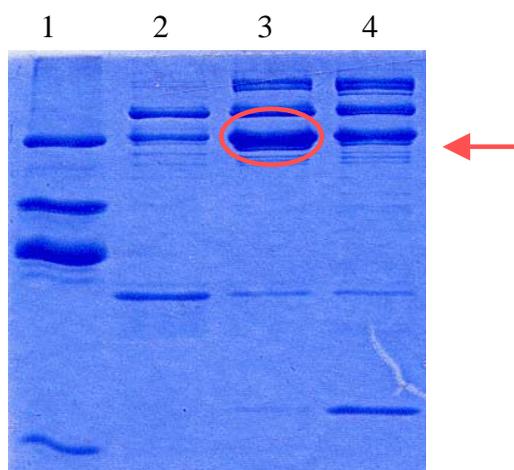


Figura 20. Analisi SDS- PAGE delle frazioni HMSD da S-300
1. Complesso BEA purificato (2.4 μg)
2.3.4. Frazioni del picco cromatografico

Purificazione di HMSH

- **Cromatografia a esclusione molecolare**

Anche nel caso di HMSH il secondo passaggio di purificazione è stata una cromatografia a esclusione molecolare. Le frazioni derivate dalla cromatografia a scambio anionico Q-Sepharose che mostravano attività idrolasica sono state riunite e caricate su resina a esclusione molecolare Sephacryl S-300 (Pharmacia Biotech) e anche in questo caso le modalità dell'eluizione sono descritte nella sezione Materiali e Metodi.

Il cromatogramma riportato in Figura 21 è stato ottenuto riportando l'assorbimento di ciascuna frazione a 280 nm in funzione del numero della frazione. E' possibile osservare un unico picco prioritario che ha mostrato attività NAD^+ indipendente sul prodotto di fissione del catecolo, del 3-MC e del 4-MC.

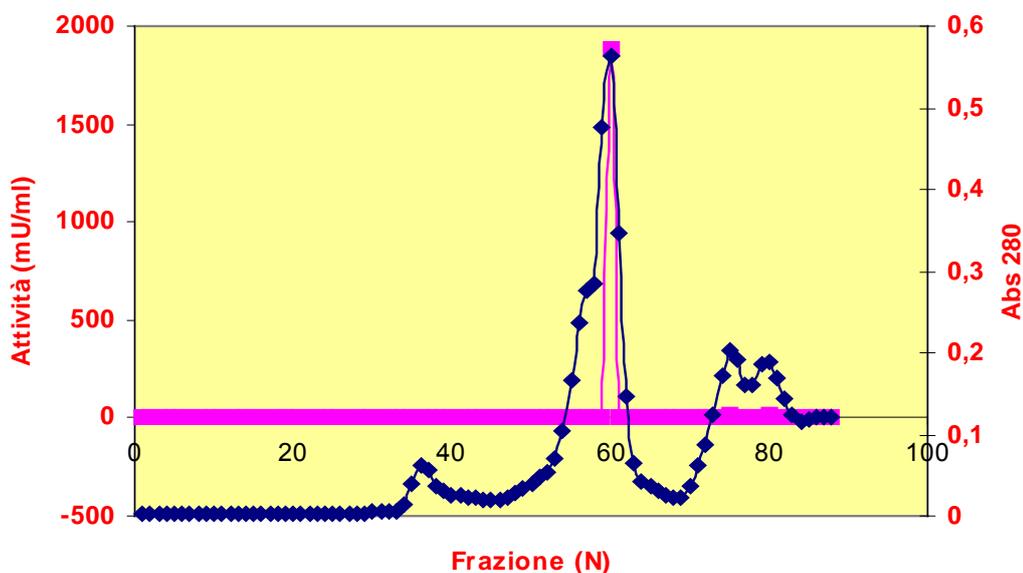


Figura 21. Purificazione di HMSH: cromatografia a esclusione molecolare e profilo di attività (in fucsia).

L'analisi SDS-PAGE (Figura22) delle frazioni relative a tale picco ha messo in evidenza la predominante presenza di una proteina di circa 30 kDa, ovvero del peso molecolare atteso per le subunità di HMSH.

D'altronde, come appare evidente dall'analisi elettroforetica sia del campione relativo ad HMSH, ma in misura maggiore per quello relativo ad HMSD, dopo i due diversi passaggi di purificazione nessuna delle due proteine si ritrova in forma totalmente omogenea. I contaminanti presenti nel campione HMSH sono stati stimati rappresentare il 15% del contenuto proteico totale, nel campione HMSD approssimativamente il 35%. Le proteine contaminanti esibiscono un peso molecolare superiore sia rispetto ad HMSH sia ad HMSD.

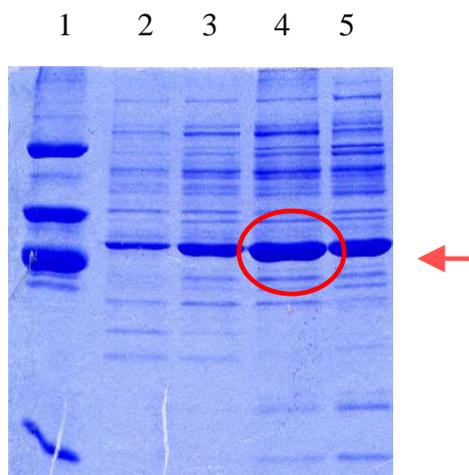


Figura 22. Analisi SDS-PAGE delle frazioni HMSH da S-300

1 Complesso BEA purificato (2.4 µg)
2.3.4.5. Frazioni del picco cromatografico

- **Determinazione delle sequenze N-terminali di HMSD e HMSH**

Le proteine HMSD e HMSH parzialmente purificate come precedentemente descritto sono state separate dalle proteine contaminanti presenti mediante elettroforesi in condizioni denaturanti ed elettrotrasferite su membrana di PVDF (polivinildene fluoruro). Sono state isolate le bande relative alle proteina ricombinanti e verificata la loro sequenza N-terminale impiegando un sequenziatore automatico di proteine come descritto nella sezione Materiali e Metodi.

La sequenza amminoacidica N-terminale relativa alla deidrogenasi è risultata essere: M-K-E-I-K-H, sequenza identica a quella prevista dall'analisi della sua sequenza genica. La sequenza amminoacidica N-terminale relativa all'idrolasi è risultata invece: M-N-A-P-Q-Q-S, anche in questo caso identica a quelle attese. Tale risultato ha pertanto consentito di identificare le proteine purificate come i prodotti della traduzione dei geni *hmsd* e *hmsH*.

- **Caratterizzazione funzionale di HMSD e HMSH**

Determinazione dei parametri cinetici sui prodotti di fissione del catecolo, del 3-MC e del 4-MC

Per caratterizzare da un punto di vista funzionale gli enzimi parzialmente purificati HMSD e HMSH sono stati determinati i parametri cinetici di tali enzimi sui prodotti di fissione del catecolo, del 3-MC e del 4-MC. Quest'ultimi sono stati ottenuti incubando l'enzima C2,3O rispettivamente con catecolo, 3 MC e 4MC. Per la determinazione dei parametri cinetici, è stata misurata la velocità di reazione in funzione della concentrazione di substrato usando una concentrazione fissa dell'enzima.

La preparazione dei substrati e le modalità con cui sono state determinate le costanti cinetiche sono descritte nella sezione Materiali e Metodi. I parametri cinetici sono stati determinati interpolando i punti sperimentali con la legge cinetica di Michaelis-Menten, utilizzando il programma GraphPad Prism e sono riassunti in Tabella 13.

Le costanti cinetiche ottenute per i enzimi sono in perfetto accordo con quanto riportato per deidrogenasi ed idrolasi di *pathway* metabolici simili. Infatti l'enzima HMSD mostra un'elevata affinità per il prodotto di fissione del catecolo e del 4-

metilcatecolo ($K_M = 1,6 \mu\text{M}$), e non riconosce come substrato il prodotto di fissione del 3-metilcatecolo che essendo un chetone non presenta il gruppo aldeidico riconosciuto dalla deidrogenasi. Al contrario HMSH esibisce una bassa affinità per prodotti derivati dal taglio idrolitico del catecolo e del 4MC ($K_M = 250 \mu\text{M}$) ed una buona affinità per il prodotto di fissione del 3-metilcatecolo ($K_M = 16,5 \mu\text{M}$).

I prodotti di fissione derivati dal catecolo e dal 4-MC risultano perfettamente equivalenti per la deidrogenasi HMSD anche analizzando i valori di k_{cat} e di K_S .

Al contrario HMSH mostra un'efficienza catalitica notevolmente superiore sul prodotto di fissione del 3-MC rispetto agli altri due substrati. Ciò è dovuto sia al suo valore di K_M sul 3-MC (circa 14 volte più basso se confrontato con il valore ottenuto per il catecolo ed il 4-MC) sia al suo valore di k_{cat} (dalle 2.5 alle 32 volte superiore).

Dal confronto dei valori di K_S ottenuti per i due enzimi HMSH e HMSD sui diversi substrati analizzati,

la via idrolitica sembra essere notevolmente più efficiente della via deidrogenasica su tutti i substrati analizzati. Il prodotto di fissione del 3-MC può d'altronde essere metabolizzato unicamente mediante la via idrolitica dal momento che tale composto non presenta un gruppo aldeidico riconosciuto da HMSD. I prodotti di fissione del catecolo e del 4-MC possono, al contrario essere metabolizzati da entrambi gli enzimi, ma a basse concentrazioni sono preferenzialmente processati da HMSD. L'azione di questo enzima è d'altronde metabolicamente vantaggiosa in quanto porta alla formazione di NADH ovvero di potere riducente per la cellula in esame.

TABELLA 13

SUBSTRATO	$K_M (\mu\text{M})$	$k_{\text{cat}} (\text{sec}^{-1})$	$k_{\text{cat}} / K_M \times 10^3 (\text{sec}^{-1}\mu\text{M}^{-1})$
Prodotto di fissione del catecolo	232	15.3	65.9
Prodotto di fissione del 4 m-catecolo	232	1.15	4.9
Prodotto di fissione del 3 m-catecolo	16.34	36.53	2235.6

Tabella 13. Parametri cinetici dell'idrolasi HMSH sui prodotti di fissione indicati

TABELLA 14

SUBSTRATO	$K_M (\mu\text{M})$	$k_{\text{cat}} (\text{sec}^{-1})$	$k_{\text{cat}} / K_M \times 10^3 (\text{sec}^{-1}\mu\text{M}^{-1})$
Prodotto di fissione del catecolo	1.6	0.32	0.2
Prodotto di fissione del 4 m-catecolo	1.7	0.393	0.23
Prodotto di fissione del 3 m-catecolo	---	---	---

Tabella 14. Parametri cinetici della deidrogenasi HMSD sui prodotti di fissione indicati

- **Un tentativo di espansione del *pathway* catabolico: saggi di attività di HMSD e HMSH su semialdeide da 3,5- e da 3,6- DMC**

P. stutzeri OX1 non è in grado di crescere su *m*- e *p*-xilene in quanto tali composti sono ossidrilati rispettivamente a 3,5 e a 3,6 DMC dagli enzimi ToMO e PH ma tali prodotti non sono substrato del successivo enzima del *pathway*, la C2,3O. Nell'ambito degli studi volti ad incrementare le capacità metaboliche del batterio in esame, nel laboratorio in cui è stato svolto il presente progetto di tesi, sono stati realizzati dei mutanti dell'enzima C2,3O in grado di idrolizzare il 3,5-DMC ed il 3,6-DMC .

Per validare l'applicabilità di tali tecniche di ingegneria metabolica andava comunque verificato che i prodotti ottenuti al seguito del taglio operato da tali forme mutate dell'enzima C2,3O fossero riconosciute e degradate dai successivi enzimi del *pathway* ovvero dalla deidrogenasi HMSD e dall'idrolasi HMSH. A tal fine sono stati eseguiti saggi di attività enzimatica di HMSD e HMSH sui prodotti di fissione che si ottengono dal 3,5- e dal 3,6-DMC. La preparazione dei substrati e le modalità dei saggi eseguiti sono descritte nella sezione Materiali e Metodi.

Il risultato ottenuto è stato che nessuno dei due composti è riconosciuto dalla deidrogenasi o dall'idrolasi come substrato, indicando che non solo le proprietà cinetiche e di regioselettività di ToMO, PH e C2,3O sono state evolutivamente ottimizzate in *P.stutzeri*, ma, probabilmente, anche quelle di altri enzimi del *pathway*. Pertanto questi esperimenti costituiscono solo il punto di partenza per la creazione di interi *lower pathway* modificati mediante tecniche di ingegneria proteica. Bisognerà infatti alterare in modo razionale le proprietà di molti enzimi del *pathway*, innanzitutto HMSD e HMSH, per accordare le loro proprietà di specificità di substrato e di efficienza catalitica con quelle di forme di C2,3O mutate.

CONCLUSIONI

L'obiettivo principale di questo lavoro di tesi di dottorato è stata la comprensione delle proprietà biochimiche e cinetiche di alcuni enzimi dei *pathway* catabolici coinvolti nella degradazione di composti aromatici in *P. stutzeri* OX1.

In tale batterio i primi passaggi della reazione di degradazione di composti aromatici avvengono ad opera delle attività dei complessi monoossigenasici della toluene *o*-xilene monoossigenasi (ToMO) e della fenolo ossidrilasi (PH) [37]

Sia ToMO che PH catalizzano l'aggiunta in posizioni adiacenti di due gruppi ossidrilici a composti aromatici, in due passaggi successivi di monoossigenazione. Dal momento che lo spettro di substrati utilizzati dai due enzimi è molto simile, la loro contemporanea presenza in *P. stutzeri* appare essere ridondante [34].

In questo lavoro di tesi sono state investigate in primo luogo le ragioni metaboliche dell'apparente ridondanza di funzioni di ToMO e PH.

Il comportamento dei due enzimi è stato analizzato con particolare riferimento alle vie di degradazione di comuni inquinanti di natura aromatica, scegliendo come composti modello molecole aromatiche non ossidrilate quali benzene, toluene e *o*-xilene.

Sono stati determinati i parametri cinetici e le proprietà di regioselettività di ToMO e di PH su tali composti e sui loro derivati ossidrilati. L'analisi dei parametri cinetici e delle proprietà di regioselettività dei due enzimi hanno permesso di ipotizzare che l'azione di ToMO e PH non è ridondante ma bensì complementare e che i due sistemi monoossigenasici costituiscono una catena metabolica ottimizzata sia in termini di efficienza catalitica sia di regioselettività.

ToMO sembra infatti essersi specializzato nel catalizzare la prima reazione di ossidrilazione, PH la seconda. Questa specializzazione è accompagnata da una notevole regioselettività della reazione catalizzata: ToMO nel primo passaggio tende sempre a formare una maggiore quantità dell'isomero (il *p*-cresolo dal toluene; il 3,4 DMP dall'*o*-xilene) che è il miglior substrato di PH nel secondo. D'altro canto PH dal 3,4 DMP, forma esclusivamente 3,4 DMC, l'unico DMC che il successivo enzima del *pathway*, la catecolo 2,3 diossigenasi, è in grado di ossidare.

Saggi combinati eseguiti utilizzando cellule di *E. coli* esprimenti i complessi ToMO e PH hanno permesso di confermare l'ipotesi formulata per tutti i substrati analizzati.

In definitiva i risultati ottenuti hanno permesso di concludere che è l'accoppiamento tra i due sistemi enzimatici che consente la crescita ottimale del batterio su molecole aromatiche non ossidrilate [130].

La conoscenza delle proprietà degli enzimi dell'*upper pathway* ha costituito il punto di partenza per lo sviluppo di strategie volte ad incrementare le proprietà del batterio.

L'analisi della struttura a raggi X della ToMO ed il docking manuale dei prodotti del primo stadio di ossidrilazione hanno permesso di ipotizzare che il residuo in posizione 103 svolgesse un ruolo importante nella determinazione della regioselettività sui composti metilati.

Sono stati realizzati mutanti della posizione 103 (ToMO-E103G, ToMO-L103G ToMO-M103G), che sono stati caratterizzati. Le mutazioni non hanno influenzato significativamente i parametri catalitici dell'enzima, ma hanno provocano notevoli modifiche in termini di regioselettività

L'analisi delle proprietà di regioselettività dei mutanti hanno permesso di concludere che il residuo in posizione 103 svolge effettivamente un ruolo importante nel determinare la regioselettività dell'enzima delimitando il sub-sito di legame del gruppo metilico collocato in orto e meta alla posizione che viene ossidrilata.

Inoltre i cambiamenti nella regioselettività del mutante E103G sembravano essere metabolicamente rilevanti poiché a partire dall'*o*-xilene portavano ad un aumento nella produzione del DMP (il 3,4 DMP), che è efficientemente trasformato da PH nel secondo passaggio di reazione nell'unico DMC (il 3,4 DMC) che può essere ulteriormente metabolizzato dalla C2,3O.

L'uso combinato del mutante (E103G)-ToMO con l'enzima PH ha effettivamente permesso di ottenere una velocità di formazione del 3,4-DMC superiore a quella ottenuta con l'enzima wild type.

I risultati ottenuti hanno pertanto permesso di concludere che l'efficienza di un *pathway* metabolico può essere effettivamente incrementata non solo aumentando l'efficienza catalitica degli enzimi coinvolti ma anche accordando la loro specificità di substrato e la loro regioselettività [131].

La seconda parte del progetto di ricerca ha riguardato uno studio preliminare del primo enzima dell'*upper* TOL *pathway*, la xilene monoossigenasi (XMO) ed è stata eseguita un'analisi del comportamento di tale enzima in combinazione con l'enzima ToMO su miscele di xileni. È stato realizzato il clonaggio del gene, l'espressione ed una parziale caratterizzazione funzionale di XMO e sono stati condotti saggi combinati di XMO con ToMO, utilizzando cellule intere esprimenti i due complessi incubate in presenza di *o*- e *p*-xilene.

Gli esperimenti hanno permesso di concludere che i due enzimi sono totalmente indipendenti nella loro azione catalitica. L'attività di un enzima non è in alcun modo influenzata dalla presenza dell'altro.

È tuttavia importante sottolineare che in presenza di *o*- e *p*-xilene XMO riconosce come substrato unicamente il *p*-xilene. Al contrario ToMO pur riconoscendo *preferenzialmente* come substrato l'*o*-xilene, converte piccole quantità di *p*-xilene in composti non produttivi per la crescita. Questi dati indicano quindi che la contemporanea azione dei due enzimi porta a una perdita, sia pur piccola, di potere metabolico. Se l'accumulo di intermedi non ulteriormente metabolizzabili possa essere dannoso per la crescita cellulare (ricordiamo la lenta crescita del revertante R1 nel quale entrambi i *pathway* sono attivi[82]) è un argomento che non è risolto dai nostri risultati e che deve essere ulteriormente indagato.

L'ultimo argomento del presente progetto ha riguardato uno studio di due enzimi del *lower pathway* di *Pseudomonas stutzeri* OX1: la semialdeide 2-idrossimuconica deidrogenasi (HMSD) e la semialdeide 2-idrossimuconica idrolasi (HMSH)

Gli enzimi HMSD e HMSH sono stati espressi per via ricombinante, purificati e parzialmente caratterizzati e sono stati determinati i parametri cinetici dei due enzimi, utilizzando come substrati i prodotti che derivano dal parziale catabolismo del benzene, del toluene e dell'*o*-xilene.

Dal confronto dei valori di K_s ottenuti per i due enzimi, è possibile affermare che la via idrolitica è notevolmente più efficiente della via deidrogenasica con riferimento a tutti i substrati analizzati.

Inoltre, come atteso da quanto riportato in letteratura[74], il prodotto di fissione del 3-MC può essere metabolizzato unicamente mediante la via idrolitica dal momento che tale composto non presenta un gruppo aldeidico riconosciuto da HMSD.

I prodotti di fissione del catecolo e del 4-MC possono, al contrario, essere metabolizzati da entrambi gli enzimi, ma a basse concentrazioni sono preferenzialmente processati da HMSD. L'azione di questo enzima è d'altronde

metabolicamente vantaggiosa in quanto porta alla formazione di NADH ovvero di potere riducente per la cellula in esame.

Abbiamo infine analizzato il comportamento degli enzimi HMSD e HMSH sui prodotti di fissione del 3,5 DMC e del 3,6 DMC ottenuti con una particolare forma mutata dell'enzima C2,3O. Il risultato ottenuto è stato che né il prodotto di fissione del 3,5-DMC né quello del 3,6-DMC sono riconosciuti da HMSD o da HMSH come substrati.

Questi dati costituiscono un importante elemento di riflessione che può fornire interessanti linee guida nello sviluppo di strategie volte ad incrementare le capacità metaboliche del batterio *P. stutzeri* OX1.

In tale batterio, come d'altronde in tutti i ceppi batterici finora studiati, i *pathway* metabolici tendono a convergere. Sono solitamente i primi enzimi del *pathway*, nel caso in studio ToMO e PH, ad avere una bassa specificità di substrato e quindi ad ossidilare un gran numero di composti aromatici. Al contrario gli enzimi successivi divengono progressivamente più specifici consentendo l'introduzione di poche molecole in *pathway* metabolici centrali. Alterare la specificità di substrato di un enzima localizzato in punti chiave del *pathway* implica che le caratteristiche degli enzimi che seguono devono necessariamente accordarsi con le nuove proprietà cataboliche acquisite.

Nel caso in esame questo si tradurrebbe nella creazione di un *lower pathway* modificato in grado di degradare i nuovi prodotti ottenuti al seguito del taglio della C2,3O.

Oppure, con riferimento agli studi riportati nella prima parte del presente progetto di tesi, la strategia vincente per incrementare la capacità metaboliche del batterio in esame è la razionale alterazione delle proprietà, quali la specificità di substrato, l'efficienza catalitica o la regioselettività, del primo enzima del *pathway*, il complesso monoossigenasico ToMO.

BIBLIOGRAFIA

1. Diaz, E., *Bacterial degradation of aromatic pollutants: a paradigm of metabolic versatility*. Int. Microbiol., 2004. **7**(3): p. 173-80.
2. Atlas, R.M., *Microbial degradation of petroleum hydrocarbons: an environmental perspective*. Microbiol. Rev., 1981. **45**: p. 180-209.
3. Parales, R.E., et al., *Biodegradation, biotransformation, and biocatalysis(b3)*. Applied and Environmental Microbiology, 2002. **68**: p. 4699-4709.
4. Dua, M., et al., *Biotechnology and bioremediation: successes and limitations*. Appl. Microbiol. Biotechnol., 2002. **59**: p. 143-159.
5. Schimid, A., et al., *Industrial biocatalysis today and tomorrow*. Nature, 2001. **409**: p. 258-268.
6. Witholt, B., et al., *Bioconversions of aliphatic compounds by Pseudomonas oleovorans in multiphase bioreactors: background and economic potential*. Trends Biotechnol., 1990. **8**: p. 46-52.
7. Sangodkar, U.M.X., et al., *Molecular basis of biodegradation of chloroaromatic compounds*. Acta Biotechnol, 1989. **9**: p. 301-316.
8. Faison, B.D., *Hazardous waste treatment*. SIM News, 2001. **51**: p. 193-208.
9. Environment Canada, *Canadian environmental protection act: priority substances list assessment report-benzene*. Ministry of Public Works and Government Services, Ottawa, Canada, 1995.
10. Habe, H. and T. Omori, *Genetics of Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Metabolism in Diverse Aerobic Bacteria*. Biosci.Biotechnol. Biochem., 2003. **67**(2): p. 225-243.
11. Collins, L.D. and A.J. Daugulis, *Benzene/toluene/p-xylene degradation. Part I. Solvent selection and toluen degradation in a two-phase partitioning bioreactor*. Appl Microbiol Biotechnol, 1999. **52**: p. 354-359.
12. Glazer, A.N. and H. Nikaido, *Microbial biotechnology: fundamentals of applied microbiology*, ed. Freeman. 1995, New York.
13. Galli, E., *Biotechnologie Ambientali*. Le scienze, 1999. **106**: p. 47-53.
14. van der Meer, J.R., et al., *Molecular mechanisms of genetic adaptation to xenobiotic compounds*. Microbio. Rev., 1992. **56**: p. 677-694.
15. Debarati, P., G. Pandey, and R.K. Jain, *Suicidal genetically engineered microorganism for bioremediation: need and perspectives*. BioEssays, 2005. **27**: p. 563-573.
16. Holliger, C. and A. Zehnder JB, *Anaerobic biodegradation of hydrocarbons*. Curr. Opinion in Biotechnology, 1996. **7**: p. 326-330.
17. Jain, R.K. and G.S. Saylor, *Prolems and potential for in situ tratment of environmental pollutants by engineered microorganism*. Microbiol. Sci., 1987. **4**: p. 59-63.
18. Vogel, T.M., *Bioaugmentation as a soil bioremediation approach*. Curr Opin Biotechnol, 1996. **7**: p. 311-317.
19. Schimid, A., et al., *Developments toward large-scale bacterial bioprocesses in the presence of buk amounts of organic solvents*. Extremophiles, 1998. **2**: p. 249-256.
20. de Panke, S., et al., *Engineering of a stable whole-cell biocatalyst capable of (S)-styrene oxide formation for continous two-liquid-phase applications*. Appl Environ Microbiol, 1999. **65**: p. 5619-5623.
21. Faber, K., *Biotranformations in Organic Chemistry: A Textbook*, ed. Springer. 1997, Berlin.
22. van Beilen, J.B., et al., *Pratical issue in the application of oxygenases*. TRENDS in Biotechnology, 2003. **21**(4): p. 170;176.
23. OECD, *Biotechnology for clean industrial products and processes*, OECD, Paris, France. 1998.

24. Sayler, G.S., et al., *Field application of a genetically engineered microorganism for polycyclic aromatic hydrocarbon bioremediation process monitoring and control*, in *Novels approache for bioremediation of organic pollution*, F.Y. Fass R, Reunevy S, Editor. 1999: Kluwer, New York. p. 241-254.
25. Ripp, S., et al., *Controlled field release of a bioluminescent genetically engineered microorganism for bioremediation process monitoring and control*. *Environ Sci Technol*, 2000. **34**: p. 846-853.
26. Sayler, G.S. and S. Ripp, *Field application of genetically engineered microorganisms for bioremediation processes*. *Curr Opin Biotechnol*, 2000. **11**: p. 286-289.
27. Chakrabarty, A.M., *Gentic basis of the biodegradation of salicylate in Pseudomonas*. *J. Bacteriol.*, 1972. **112**: p. 815-823.
28. Chakrabarty, A.M., G. Chou, and I.C. and Gunsalus, *Genetic regulation of octane dissimilation plasmid in Pseudomonas*. *Proc. Natl.Acad.Sci. U.S.A.*, 1973. **70**: p. 1137-1140.
29. Dunn, N.W. and I.C. Gunsalus, *Transmissible plasmid coding early enzymes of naphthalene oxidation in Pseudomonas putida*. *J. Bacteriol.*, 1973. **114**: p. 974-979.
30. Harayama, S. and K.N. Timmis, *Catabolism of aromatic hydrocarons by Pseudomonas*, in *Genetics of Bacterial Diversity*, D.A. Hopwood and K. Charter, Editors. 1989, New York Academic. p. 151-174.
31. de Lorenzo, V., *Pseudomonas entering the post-genomic era*. *Environmental Microbiology*, 2000. **2**(3): p. 349-354.
32. Baggi, G., et al., *Isolation of a Pseudomonas stutzeri strain that degrades o-xylene*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1987. **53**: p. 2129-2131.
33. Harayama, S., et al., *Gene order of the TOL catabolic plasmid upper pathway operon and oxidation of both toluene and benzyl alcohol by the xylA product*. *J Bacteriol*, 1986. **167**(2): p. 455-61.
34. Arengi, F.L., et al., *Organization and regulation of meta cleavage pathway gene for toluene and o-xylene derivative degradation in Pseudomonas stutzeri OX1*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2001. **67**: p. 3304-3308.
35. Harayama, S. and M. Rejik, *Bacterial aromatic ring-cleavage enzymes are classified into two different gene families*. *J Biol Chem.*, 1989. **264**: p. 15328-15333.
36. Zylstra, G.J., et al., *Toluene degradation by Pseudomonas putida F1: genetic organization of the tod operon*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1988. **54**: p. 1498-1503.
37. Bertoni, G., et al., *Cloning of the genes for and characterization of the early stages of toluene catabolism in Pseudomonas stutzeri OX1*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1996. **62**(10): p. 3704-3711.
38. Bertoni, G., et al., *Analysis of the gene cluster encoding toluene/o-xylene monooxygenase from Pseudomonas stutzeri OX1*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1998. **64**(10): p. 3626-3632.
39. Shields, M.S., et al., *Novel pathway of toluene catabolism in the trichloroethylene-degrading bacterium G4*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1989. **55**: p. 1624-1629.
40. Leahy, J.G. and R.R. Colwell, *Microbial degradation of hydrocarbons in the environment*. *Microbiological Reviews*, 1990. **54**: p. 305-315.
41. Sayler, G.S., et al., *Catabolic plasmids of environmental and ecological significance*. *Microb. Ecol.*, 1990. **19**: p. 1-20.
42. Wyndham, R.C., et al., *Catabolic transposons*. *Biodegradation*, 1994. **5**: p. 323-342.
43. Haigler, B.E., C.A. Pettigrew, and J.C. Spain, *Biodegradation of mixtures of substituted benzenes by Pseudomonas sp. strain JS150*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1992. **58**: p. 2237-2244.

44. Williams, P.A. and J.R. Sayers, *The evolution of pathways for aromatic hydrocarbon oxidation in Pseudomonas*. Biodegradation, 1994. **5**: p. 195-217.
45. Timmis, K.N. and D.H. Pieper, *Bacteria designed for bioremediation*. Trends Biotechnol., 1999. **17**: p. 201-204.
46. Pieper, D.H. and W. Reineke, *Engineering bacteria for bioremediation*. Curr Opin Biotechnol, 2000. **11**: p. 262-270.
47. Lau, P.C.K. and V.D.E. Lorenzo, *Genetic engineering: the frontier of bioremediation*. Environ Sci Technol, 1999. **4**: p. 124A-128A.
48. Ellis, L.B., Hershberger C.D., and L.P. Wackett, *The University of Minnesota Biocatalysis/Biodegradation Database: specialized metabolism for functional genomics*. Nucleic Acid Res, 1999. **27**: p. 373-376.
49. Ellis, L.B., Hershberger C.D., and L.P. Wackett, *The University of Minnesota Biocatalysis/Biodegradation Database: microorganism, genomics and prediction*. Nucleic Acid Res, 2000. **28**: p. 377-379.
50. Ellis, L.B., et al., *The University of Minnesota Biocatalysis/Biodegradation Database: post-genomic data mining*. Nucleic Acid Res, 2003. **31**: p. 262-265.
51. Urbance, J.W., et al., *BSD: the Biodegradative Strain Database*. Nucleic Acid Res, 2003. **31**: p. 152-155.
52. Pazos, F., A. Valencia, and V. de Lorenzo, *The organization of the microbial biodegradation network from a systems-biology perspective*. EMBO reports, 2003. **4**(10): p. 994-999.
53. Herrero, M., V. de Lorenzo, and K.N. Timmis, *Transposon vectors containing non-antibiotic resistance selection markers for cloning stable chromosomal insertion of foreign genes in gram-negative bacteria*. J Bacteriol, 1990. **172**: p. 6557-6567.
54. de Lorenzo, V., et al., *Engineering of alkyl- and haloaromatic-responsive gene expression with mini-transposons containing regulated promoters of biodegradative pathway of Pseudomonas*. Gene, 1993. **130**: p. 41-46.
55. de Lorenzo, V. and K.N. Timmis, *Analysis and construction of stable phenotypes in gram-negative bacteria with Tn5- and Tn10-derived minitransposons*. Methods Enzymol., 1994. **235**: p. 386-405.
56. Panke, S., J.M. Sanchez-Romero, and V. de Lorenzo, *Engineering of quasi-natural Pseudomonas putida strains for toluene metabolism through an ortho-cleavage degradation pathway*. Applied and Environmental Microbiology, 1998. **64**(2): p. 748-751.
57. Ramos, J.L., et al., *Redesigning metabolic routes: manipulation of TOL plasmid pathway for catabolism of alkybenzoates*. Science, 1987. **235**: p. 593-596.
58. Lee, J.Y., et al., *Combination of the tod and tol pathways in redesigning a metabolic route of Pseudomonas putida for the mineralisation of a benzene, toluene, and p-xylene mixture*. Appl Environ Microbiol, 1995. **61**: p. 2211-2217.
59. Reineke, W. and H.J. Knackmuss, *Hybrid Pathway for Chlorobenzoate Metabolism in Pseudomonas sp. B13 Derivatives*. Journal of Bacteriology, 1980. **142**(2): p. 467-473.
60. Haro, M.A. and V. de Lorenzo, *Metabolic engineering of bacteria for environmental applications: construction of Pseudomonas strain for biodegradation of 2-chlorotoluene*. Journal of Biotechnology, 2001. **85**(2001): p. 103-113.
61. Kolata, G., *How safe are engineered organism?* Science, 1985. **229**: p. 34-35.
62. Diamand, E., *Genetically modified organism and monitoring*. J Environ Monit, 1999. **1**: p. 108-110.
63. Drobnik, J., *Genetically modified organisms (GMO) in bioremediation and legislation*. International Biodeterioration & Biodegradation, 1999. **44**: p. 3-6.

64. Molin, S., *Environmental potential of suicide genes*. Curr Opin Biotechnol, 1993. **4**: p. 299-305.
65. Molin, S., et al., *Suicidal genetic elements and their use in biological containment of bacteria*. Annu Rev Microbiol, 1993. **47**: p. 139-166.
66. Ronchel, M.C., et al., *Construction and behavior of biologically contained bacteria for environmental applications in bioremediation*. Appl Environ Microbiol, 1995. **61**: p. 2990-2994.
67. Chaloupkova, R., et al., *Modification of activity and specificity of haloalkane dehalogenase from Sphingomonas paucimobilis UT26 by engineering of its entrance tunnel*. J Biol Chem, 2003. **278**: p. 52622-52628.
68. Kimura, N., et al., *Functional analyses of a variety of chimeric dioxygenases constructed from two biphenyl dioxygenases that are similar structurally but different functionally*. J Bacteriol, 1997. **179**: p. 3936-3943.
69. Kumumaru, T., et al., *Enhanced degradation of polychlorinated biphenyls by directed evolution of biphenyl dioxygenase*. Nat Biotechnol., 1998. **16**: p. 663-666.
70. Canada, K., et al., *Directed evolution of toluene ortho-monooxygenase for enhanced 1-naphthol synthesis and chlorinated ethene degradation*. J.Bacteriol., 2002. **184**: p. 344-349.
71. Rui, L., et al., *Saturation Mutagenesis of Toluene ortho-Monooxygenase of Burkholderia cepacia G4 for Enhanced 1-Naphthol Synthesis and Chloroform Degradation*. Applied and Environmental Microbiology, 2004. **7**(6): p. 3246-3252.
72. Hou, B.K., L.P. Wackett, and L.B. Ellis, *Microbial pathway prediction: a functional group approach*. J Chem Inf Comput Sci, 2003. **43**: p. 1051-1057.
73. Nordlund, I., J. Powlowski, and V. Shingler, *Complete nucleotide sequence and polypeptide analysis of multicomponent phenol hydroxylase from Pseudomonas sp. strain CF600*. J. Bacteriol., 1990. **172**: p. 6826-6833.
74. Powlowski, J. and V. Shingler, *Genetics and biochemistry of phenol degradation by Pseudomonas sp. CF600*. Biodegradation, 1994. **5**: p. 219-36.
75. Barbieri, P., et al., *Evolution of catabolic pathways and metabolic versatility in Pseudomonas stutzeri OX1*. Antonie Van Leeuwenhoek, 2001. **79**(2): p. 135-40.
76. Barbieri, P., et al., *Alternative pathways for o-xylene or m-xylene and p-xylene degradation in a Pseudomonas stutzeri strain*. Biodegradation, 1993. **4**: p. 71-80.
77. Bolognese, F., et al., *Activation and Inactivation of Pseudomonas stutzeri Methylbenzene Catabolism Pathways Mediated by a Transposable Element*. Applied and Environmental Microbiology, 1999. **65**(5): p. 1876-1882.
78. Burlage, R.S., S.W. Hooper, and G.S. Sayler, *The TOL (pWW0) catabolic plasmid*. Appl. Environ. Microbiol., 1989. **55**: p. 1323-1328.
79. Shanklin, J., E. Whittle, and B.G. Fox, *Eight histidine residues are catalytically essential in a membrane-associated iron enzyme, stearyl-CoA desaturase, and are conserved in alkane hydroxylase and xylene monooxygenase*. Biochemistry, 1994. **33**: p. 12787-12794.
80. Shaw, J.P. and S. Harayama, *Characterization in vitro of the hydroxylase component of xylene monooxygenase, the first enzyme of the TOL-plasmid-encoded pathway for the mineralization of toluene and xylenes*. Journal of Fermentation and bioengineering, 1995. **79**, pp.(3): p. 195-199.
81. Shaw, J.P. and S. Harayama, *Purification and characterisation of the NADH:acceptor reductase component of xylene monooxygenase encoded by the TOL plasmid pWW0 of Pseudomonas putida mt-2*. Eur. J. Biochem., 1992. **209**: p. 51-61.

82. Di Lecce, C., et al., *Isolation and Metabolic Characterization of a Pseudomonas stutzeri Mutant Able To Grow on the Three Isomers of Xylene*. Applied and Environmental Microbiology, 1997. **6**(8): p. 3279-3281.
83. Harayama, S., M. Kok, and E.L. Neidle, *Functional and evolutionary relationships among diverse oxygenase*. Ann. Rev. Microbiol., 1992. **46**: p. 565-601.
84. Notomista, E., et al., *Evolution of bacterial and archaeal multicomponent monooxygenases*. J. Mol. Evol., 2003. **56**(4): p. 435-45.
85. Merkx, M., et al., *Dioxygen activation and methane hydroxylation by soluble methane monooxygenase: a tale of two irons and three proteins*. Angew.Chem.Int.Ed., 2001. **40**: p. 2782-2807.
86. Johnson, G.R. and R.H. Olsen, *Multiple pathways for toluene degradation in Burkholderia sp. strain JS150*. Appl. Environ. Microbiol., 1997. **63**(10): p. 4047-52.
87. Olsen, R.H., J.J. Kukor, and B. Kaphammer, *A novel toluene-3-monooxygenase pathway cloned from Pseudomonas pickettii PKO1*. J. Bacteriol., 1994. **176**: p. 3748-3756.
88. Fishman, A., Y. Tao, and T.K. Wood, *Toluene 3-monooxygenase of Ralstonia pickettii PKO1 is a para-hydroxylating enzyme*. J Bacteriol, 2004. **186**(10): p. 3117-23.
89. Fishman, A., Y. Tao, and T. and Wood, *Physiological Relevance of Successive Hydroxylations of Toluene by Toluenepara-Monooxygenase of Ralstonia pickettii PKO1*. Biocatalysis and Biotransformation, 2004. **22**(4): p. 1-7.
90. Arengi, F.L., et al., *Identification of the pseudomonas stutzeri OX1 toluene-o-xylene monooxygenase regulatory gene (touR) and of its cognate promoter*. Appl. Environ. Microbiol., 1999. **65**(9): p. 4057-63.
91. Cafaro, V., et al., *Expression and purification of the recombinant subunits of toluene/o-xylene monooxygenase and reconstitution of the active complex*. Eur. J. Biochem., 2002. **269**: p. 5689-5699.
92. Scognamiglio, R., et al., *Conformational analysis of putative regulatory subunit D of the toluene/o-xylene-monooxygenase complex from Pseudomonas stutzeri OX1*. Protein Science, 2001. **10**: p. 482-490.
93. Chauhan, S., P. Barbieri, and T. and Wood, *Oxidation of trichloroethylene, 1,1-dichloroethylene, and chloroform by toluene/o-xylene monooxygenase from Pseudomonas stutzeri OX1*. Appl. Environ. Microbiol., 1998. **64**: p. 3023-3024.
94. Ryoo, D., et al., *Aerobic degradation of tetrachloroethylene by toluene-o-xylene monooxygenase of Pseudomonas stutzeri OX1*. Nat Biotechnol., 2000. **18**: p. 775-778.
95. Sazinsky, M.H., et al., *Crystal structure of the toluene/o-xylene monooxygenase hydroxylase from Pseudomonas stutzeri OX1. Insight into the substrate specificity, substrate channeling, and active site tuning of multicomponent monooxygenases*. J Biol Chem, 2004. **279**(29): p. 30600-10.
96. Rosenzweig, A.C., et al., *Crystal structures of the methane monooxygenase hydroxylase from Methylococcus capsulatus (Bath): implications for substrate gating and component interactions*. Proteins, 1997. **29**: p. 141-152.
97. Yen, K.M., et al., *Cloning and characterization of a Pseudomonas mendocina KRI gene cluster encoding toluene-4-monooxygenase*. J Bacteriol., 1991. **173**: p. 5315-5327.
98. Mitchell, K.H., J.M. Studts, and B.G. Fox, *Combined participation of hydroxylase active site residues and effector protein binding in a para to ortho modulation of toluene 4-monooxygenase regiospecificity*. Biochemistry, 2002. **41**(9): p. 3176-88.
99. Pikus, J.D., et al., *Changes in the regiospecificity of aromatic hydroxylation produced by active site engineering in the diiron toluene 4-monooxygenase*. Biochemistry, 1997. **36**: p. 9283-9289.

100. Cafaro, V., et al., *Phenol Hydroxylase and Toluene/o-Xylene Monooxygenase from Pseudomonas stutzeri OX1: Interplay between Two Enzymes*. Appl Environ Microbiol, 2004. **70**(4): p. 2211-9.
101. Burton, S.G., *Oxidizing enzymes as biocatalysts*. Trends Biotech., 2003. **21**: p. 543-549.
102. Duetz, W., van Beilen, J., Witholt, B., *Using proteins in their natural environment: potential and limitations of microbial whole-cell hydroxylations in applied biocatalysis*. Curr. Opinion in Biotechnology, 2001. **12**: p. 419-425.
103. Othmer, K., *Kirk-Othmer encyclopedia of chemical technology*. 4th ed, ed. W.-I. Publishers. 1991, New York, N.Y.
104. Robinson, J.K., et al., *The production of catechols from benzene and toluene by Pseudomonas putida in glucose fed-batch culture*. Biocatalysis, 1992. **6**: p. 81-100.
105. Buhler, B., et al., *Xylene Monooxygenase Catalyzes the Multistep Oxygenation of Toluene and Pseudocumene to Corresponding Alcohols, Aldehydes, and Acids in Escherichia coli JM101*. The Journal of Biological Chemistry, 2000. **275**(14): p. 10085-10092.
106. Di Gennaro, P., et al., *Production of substituted naphthalene dihydrodiols by engineered Escherichia coli containing the cloned naphthalene 1,2-dioxygenase gene from Pseudomonas fluorescens N3*. Res. Microbiol., 1997. **148**: p. 355-363.
107. Vardar, G. and T.K. Wood, *Protein engineering of toluene-o-xylene monooxygenase from Pseudomonas stutzeri OX1 for synthesizing 4-methylresorcinol, methylhydroquinone, and pyrogallol*. Appl Environ Microbiol, 2004. **70**(6): p. 3253-62.
108. Kiener, A., *Enzymatic oxidation of methyl groups on aromatic heterocycles: a versatile method for the preparation of heteroaromatic carboxylic acids*. Angew.Chem.Int.Ed., 1992. **31**: p. 774-775.
109. Harayama, S., et al., *Roles of the Divergent Branches of the meta-Cleavage Pathway in the Degradation of Benzoate and Substituted Benzoates*. Journal of Bacteriology, 1987. **169**(2): p. 558-564.
110. Kim, S., et al., *Nucleotide Sequence of the Pseudomonas sp.DJ77 phnG Gene Encoding 2-Hydroxymuconic Semialdehyde Dehydrogenase*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 1997. **240**: p. 41-45.
111. Nordlund, I., Shingler V., *Nucleotide sequences of the meta-cleavage pathway enzymes 2-hydroxymuconic semialdehyde dehydrogenase and 2-hydroxymuconic semialdehyde hydrolase from Pseudomonas CF600*. Biochim Biophys Acta, 1990. **1049**(2): p. 227-30.
112. Horn, J., Harayama S, Timmis KN., *DNA sequence determination of the TOL plasmid (pWWO) xylGFJ genes of Pseudomonas putida: implications for the evolution of aromatic catabolism*. Mol Microbiol, 1991. **5**(10): p. 2459-2474.
113. Schell, M., *Cloning and expression in Escherichia coli of the naphthalene degradation genes from plasmid NAH7*. J Bacteriol, 1983. **153**(2): p. 822-829.
114. Carrington, B., Lowe A, Shaw LE, Williams PA., *The lower pathway operon for benzoate catabolism in biphenyl-utilizing Pseudomonas sp. strain IC and the nucleotide sequence of the bphE gene for catechol 2,3-dioxygenase*. Microbiology, 1994. **140**: p. 499-508.
115. Shaw, J., Harayama, S., *Purification and characterisation of TOL plasmid-encoded benzyl alcohol dehydrogenase and benzaldehyde dehydrogenase of Pseudomonas putida*. Eur J Biochem, 1990. **191**: p. 705-714.

116. Ollis, D.L., Cheah, E., Cygler, M., Dijkstra, B., Frolow, F., Franken, S.M., Harel, M., Remington, S. J., Silman, I., Schrag, J., Sussman, J.L., Verschueren, K. H. G., Goldman, A., *The α/β hydrolase fold*. Protein Engineering, 1992. **5**: p. 197-211.
117. Nardini, M. and B.W. Dijkstra, *a/b-Hydrolase fold enzymes: The family keeps growing*. Curr. Opin. Struct. Biol, 1999. **9**: p. 732-733.
118. Nandhagopal, N., et al., *Crystal structure of 2-hydroxy-6-oxo-6-phenylhexa-2,4-dienoic acid (HPDA) hydrolase (BphD enzyme) from the Rhodococcus sp. strain RHA1 of the PCB degradation pathway*. J. Mol. Biol., 2001. **309**: p. 1139-1151.
119. Fushinobu, S., et al., *Crystal structures of a meta-cleavage product hydrolase from Pseudomonas fluorescens IPO1 (CumD) complexed with cleavage products*. Protein Science, 2002. **11**: p. 2184-2195.
120. Diaz, E. and K.N. Timmis, *Identification of functional residues in a 2-hydroxymuconic semialdehyde hydrolase*. J. Biol. Chem., 1995. **270**: p. 6403-6411.
121. Seah, S.Y.K., Terracina, G., Bolin, J. T., Riebel, P., Snieckus, V., Eltis, L. D., *Purification and Preliminary characterization of a serine hydrolase involved in the microbial degradation of polychlorinated biphenyls*. The Journal of Biological Chemistry, 1998. **273**: p. 22943-22949.
122. Yamada, A., et al., *Two Nearly Identical Aromatic Compound Hydrolase Genes in a Strong Polychlorinated Biphenyl Degradator, Rhodococcus sp. Strain RHA1*. Applied and Environmental Microbiology, 1998. **64**(6): p. 2006-2012.
123. Seah, S., et al., *Comparative Specificities of Two Evolutionarily Divergent Hydrolases Involved in Microbial Degradation of Polychlorinated Biphenyls*. Journal of Bacteriology, 2001. **183**(5): p. 1511-1516.
124. Ahmad, D., Fraser J, Sylvestre M, Larose A, Khan A, Bergeron J, Juteau JM, and S. M., *Sequence of the bphD gene encoding 2-hydroxy-6-oxo-(phenyl/chlorophenyl)hexa-2,4-dienoic acid (HOP/cPDA) hydrolase involved in the biphenyl/polychlorinated biphenyl degradation pathway in Comamonas testosteroni: evidence suggesting involvement of Ser112 in catalytic activity*. Gene, 1995. **156**(1): p. 69-74.
125. Riddle, R., et al., *Purification and properties of 2-hydroxy-6-oxo-6-(2'-aminophenyl)hexa-2,4-dienoic acid hydrolase involved in microbial degradation of carbazole*. Protein Expression and Purification, 2003. **28**: p. 182-189.
126. Lam, W. and T. Bugg, *Purification, Characterization, and Stereochemical Analysis of a C-C Hydrolase: 2-Hydroxy-6keto-nona-2,4-diene-1,9-dioic Acid 5,6-Hydrolase*. Biochemistry, 1997. **36**: p. 12242-12251.
127. Fleming, S.M., et al., *Catalytic Mechanism of a C-C Hydrolase Enzyme: Evidence for a Gem-Diol Intermediate, Not an Acyl Enzyme*. Biochemistry, 2000. **39**: p. 1522-1531.
128. Worsey, M.J. and P.A. Williams, *Metabolism of toluene and xylenes by Pseudomonas (putida (arvilla) mt-2: evidence for a new function of the TOL plasmid*. J. Bacteriol., 1975. **124**: p. 7-13.
129. Sambrook, J., E.F. Fritsch, and T. Maniatis, *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. 2nd ed. 1989, Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
130. Cafaro, V., et al., *Catabolic adaptation of Pseudomonas stutzeri OX1 to methylated aromatic compounds by use of two regiospecific multicomponent monooxygenases*. Appl Environ Microbiol, 2005.
131. Cafaro, V., Notomista, E., Capasso, P., Di Donato, A., *Mutation of glutamic acid 103 of toluene o-xylene monooxygenase as a means to control the catabolic efficiency of a recombinant upper pathway for degradation of methylated aromatic compounds*. Applied and Environmental Microbiology, 2005. **71**(8): p. 4744-50.

132. Laemmli, U., *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. Nature, 1970. **227**: p. 680-685.
133. Viggiani, A., et al., *The role of conserved residues H246, H199 and Y255 in the catalysis of catechol 2,3-dioxygenase from Pseudomonas stutzeri OX1*. J. Biol. Chem., 2004. **279**(47): p. 48630-9.
134. Kado, C.I. and S.T. Liu, *Rapid Procedure for Detection and Isolation of Large and Small Plasmids*. Journal of Bacteriology, 1981. **145**(3): p. 1365-1373.
135. Austin, R.N., et al., *Xylene monooxygenase, a membrane-spanning non-heme diiron enzyme that hydroxylates hydrocarbons via a substrate radical intermediate*. J Biol Inorg Chem, 2003. **8**: p. 733-740.
136. Buhler, B., et al., *Characterization and Application of Xylene Monooxygenase for Multistep Biocatalysis*. Applied and Environmental Microbiology, 2002. **68**(2): p. 560-568.
137. Blatny, J.M., et al., *Construction and use of a versatile set of broad-host-range cloning and expression vectors based on the RK2 replicon*. Appl Environ Microbiol., 1997. **63**: p. 370-379.
138. Kitayama, A., et al., *Gene organization and low regioselectivity in aromatic-ring hydroxylation of a benzene monooxygenase of Pseudomonas aeruginosa J1104*. Ferment. Bioeng., 1996. **82**: p. 421-425.
139. Sikkema, J., J.A. de Bont, and B. Poolman, *Interactions of cyclic hydrocarbons with biological membranes*. J Biol Chem, 1994. **269**(11): p. 8022-8.
140. Whited, G.M. and D.T. Gibson, *Separation and partial characterization of the enzymes of the toluene-4-monooxygenase catabolic pathway in Pseudomonas mendocina KR1*. J. Bacteriol., 1991. **173**: p. 3017-3020.
141. Whited, G.M. and D.T. Gibson, *Toluene-4-monooxygenase, a three component enzyme system that catalyzes the oxidation of toluene to p-cresol in Pseudomonas mendocina KR1*. J. Bacteriol., 1991. **173**: p. 3010-3016.
142. Wubbolts, M.G., P. Reuvekamp, and W. B., *TOL plasmid specified xylene oxygenase is a wide substrate range monooxygenase capable of oleofin epoxidation*. Enzyme Microb. Technol., 1994. **16**: p. 608-615.
143. Bestetti, G. and E. Galli, *Characterization of a Novel TOL-Like Plasmid from Pseudomonas putida Involved in 1,2,4-Trimethylbenzene Degradation*. Journal of Bacteriology, 1987. **169**(4): p. 1780-1783.
144. Bosch, R., Garcia-Valdes, E., Moore, ER., *Complete nucleotide sequence and evolutionary significance of a chromosomally encoded naphthalene-degradation lower pathway from Pseudomonas stutzeri AN10*. Gene, 2000. **245**(1): p. 65-74.
145. Benjamin, R., Voss, JA., Kunz, DA., *Nucleotide sequence of xylE from the TOL pDK1 plasmid and structural comparison with isofunctional catechol-2,3-dioxygenase genes from TOL, pWW0 and NAH7*. J Bacteriol, 1991. **173**(8): p. 2724-8.

RINGRAZIAMENTI

I miei ringraziamenti al prof. Alberto Di Donato e alla dott. ssa Valeria Cafaro per avermi guidata e assistita con pazienza e competenza nel corso di questo lavoro di tesi. Un ringraziamento particolare a tutti coloro che hanno collaborato a questo progetto e a tutto il gruppo ADD per avermi sempre sostenuta con affetto.

- **Pubblicazioni Scientifiche**

P1) Cafaro V., Izzo V., Scognamiglio R., Notomista E., **Capasso P.**, Casbarra A., Pucci P. & Di Donato A.

Title: Phenol hydroxylase and toluene/o-xylene monooxygenase from *Pseudomonas stutzeri* OX1: interplay between two enzymes

-Appl. Environ. Microbiol. 2004 Apr;70(4):2211-9.

P2) Cafaro V., Notomista E., **Capasso P.**, & Di Donato A.

-Title: The regiospecificity of two multicomponent monooxygenases from *Pseudomonas stutzeri* OX1: molecular basis for the catabolic adaptation of the microorganism to methylated aromatic compounds

-Appl. Environ. Microbiol. 2005 Aug;71(8):4736-43.

P3) Cafaro V., Notomista E., **Capasso P.**, & Di Donato A.

-Title: Mutation of glutamic-103 of toluene o-xylene monooxygenase as a control of the catabolic efficiency of a recombinant upper pathway for the degradation of methylated aromatic compounds

-Appl. Environ. Microbiol. 2005 Aug;71(8):4744-50.

- **Comunicazioni a Congressi nazionali e internazionali**

C1) Valeria Cafaro, Fabiana Alfieri, **Paola Capasso**, Viviana Izzo, Eugenio Notomista, Roberta Scognamiglio, Loredana Siani, Ambra Viggiani & Alberto Di Donato

-Title: Mono- and dioxygenases from *P. stutzeri* OX1 and from the hyperthermophile *S. solfataricus*

- Italy- Japan Symposium "New Trends in Enzyme Science and Technology", Naples (2003).

C2) Valeria Cafaro, Roberta Scognamiglio, Viviana Izzo, **Paola Capasso**, Eugenio Notomista & Alberto Di Donato

-Title: Metabolic engineering using recombinant proteins

-Convegno Nazionale "Proteine 2004", Viterbo (2004).

C3) Valeria Cafaro, Roberta Scognamiglio, Viviana Izzo, **Paola Capasso**, Fabiana Alfieri, & Alberto Di Donato

-Title: Molecular mechanisms of adaptation to xenobiotic compounds in *Pseudomonas stutzeri* OX1

- Oxyzimes 2004, Naples (2004)

C4) **Paola Capasso**, Valeria Cafaro, Eugenio Notomista & Alberto Di Donato

-Title: *Pathway* metabolici per la degradazione di composti aromatici in *Pseudomonas stutzeri* OX1

-Giornate Scientifiche Interpolo 2005, Napoli (2005)

Phenol Hydroxylase and Toluene/*o*-Xylene Monooxygenase from *Pseudomonas stutzeri* OX1: Interplay between Two Enzymes

Valeria Cafaro,¹† Viviana Izzo,¹† Roberta Scognamiglio,¹† Eugenio Notomista,¹
Paola Capasso,¹ Annarita Casbarra,² Piero Pucci,² and Alberto Di Donato^{1*}

Dipartimento di Chimica Biologica, Università di Napoli Federico II, 16-80134 Naples,¹ and Dipartimento di
Chimica Organica e Biochimica, Università di Napoli Federico II, 45-80126 Naples,² Italy

Received 26 August 2003/Accepted 9 January 2004

Degradation of aromatic hydrocarbons by aerobic bacteria is generally divided into an upper pathway, which produces dihydroxylated aromatic intermediates by the action of monooxygenases, and a lower pathway, which processes these intermediates down to molecules that enter the citric acid cycle. Bacterial multicomponent monooxygenases (BMMs) are a family of enzymes divided into six distinct groups. Most bacterial genomes code for only one BMM, but a few cases (3 out of 31) of genomes coding for more than a single monooxygenase have been found. One such case is the genome of *Pseudomonas stutzeri* OX1, in which two different monooxygenases have been found, phenol hydroxylase (PH) and toluene/*o*-xylene monooxygenase (ToMO). We have already demonstrated that ToMO is an oligomeric protein whose subunits transfer electrons from NADH to oxygen, which is eventually incorporated into the aromatic substrate. However, no molecular data are available on the structure and on the mechanism of action of PH. To understand the metabolic significance of the association of two similar enzymatic activities in the same microorganism, we expressed and characterized this novel phenol hydroxylase. Our data indicate that the PH P component of PH transfers electrons from NADH to a subcomplex endowed with hydroxylase activity. Moreover, a regulatory function can be suggested for subunit PH M. Data on the specificity and the kinetic constants of ToMO and PH strongly support the hypothesis that coupling between the two enzymatic systems optimizes the use of nonhydroxylated aromatic molecules by the draining effect of PH on the product(s) of oxidation catalyzed by ToMO, thus avoiding phenol accumulation.

Aerobic bacterial degradation of aromatic hydrocarbons is generally divided into two major routes (1, 13), the so-called upper pathway, which leads to the formation of partially oxidized aromatic intermediates, and a lower pathway, which uses dihydroxylated aromatic molecules. These activated aromatic compounds undergo ring cleavage reactions and are further processed to give molecules that can eventually enter the citric acid cycle.

Monooxygenases are key enzymes in the upper pathway and catalyze hydroxylation of the aromatic ring at different positions (22, 33, 37). Recently (21), it has been recognized that bacterial multicomponent monooxygenases (BMMs) constitute a family of enzymes which can be divided into six distinct groups, each with a characteristic subunit composition. BMMs are transcribed from single operons that code for four to six polypeptides. Analysis of the sequences from nucleotide and protein databases indicates that most bacterial strains possess only one BMM, but a few cases (3 out of 31) of bacterial genomes coding for more than one monooxygenase have been found (21). Two group 1 (phenol hydroxylases) and one group 2 (toluene-benzene monooxygenases) BMMs have been found in the genome of *Ralstonia metallidurans* CH34 (21), and three

BMMs belonging to groups 1 and 2 were detected in *Burkholderia cepacia* (formerly *Pseudomonas cepacia*) JS150 (16, 21). *B. cepacia* JS150 instead is endowed with the ability to use different pathways for the metabolism of substituted aromatic compounds (16). This led to the suggestion that in *B. cepacia* JS150, toluene metabolism is initiated by one dioxygenase and two distinct BMMs with different specificities (a toluene 4-monooxygenase [T4MO] belonging to group 2 and a toluene 2-monooxygenase [T2MO] belonging to group 1), whereas a third BMM acts downstream of the other two monooxygenases (16).

Pseudomonas stutzeri OX1 is able to grow on a wide spectrum of aromatics, including phenol, cresols, and dimethylphenols, but also on nonhydroxylated molecules such as toluene, *o*-xylene (2, 3), and benzene (P. Barbieri, personal communication). Two different monooxygenases have been found in the genome of *P. stutzeri* OX1, phenol hydroxylase (PH) (1) and toluene *o*-xylene monooxygenase (ToMO) (3, 4).

ToMO is endowed with a broad spectrum of substrate specificity and with the ability to hydroxylate more than a single position of the aromatic ring in two consecutive monooxygenation reactions (3). Thus, ToMO is able to oxidize *o*-, *m*-, and *p*-xylene, 2,3- and 3,4-dimethylphenol, toluene, cresols, benzene, naphthalene, and styrene (3). Moreover, ethylbenzene (3), trichloroethylene, 1,1-dichloroethylene, chloroform (7), and tetrachloroethylene (29) can also be oxidized by the enzyme.

Recombinant ToMO has recently been expressed and reconstituted *in vitro* (6). It has been shown that ToMO is an

* Corresponding author. Mailing address: Dipartimento di Chimica Biologica, Università di Napoli Federico II, Via Mezzocannone, 16-80134 Naples, Italy. Phone: 39 81 674171. Fax: 39 81 676710. E-mail: didonato@unina.it.

† Valeria Cafaro, Viviana Izzo, and Roberta Scognamiglio contributed equally to this work.

oligomeric protein whose subunits are part of an electron transfer chain in which ToMO F, an NADH-oxidoreductase, transfers electrons from NADH to ToMO C, which is a Rieske-type ferredoxin that shifts electrons to the oxygenase ToMO H component, made up of the ToMO A, B, and E subunits. Another subunit of the complex is ToMO D, for which a regulatory function has been suggested (4, 31).

Two kilobases downstream of the gene cluster coding for ToMO, another cluster coding for a phenol hydroxylase was found (1). Southern hybridization analyses with the *dmp* genes, coding for the subunits of the *Pseudomonas* sp. strain CF600 multicomponent phenol hydroxylase, gave evidence that the *P. stutzeri* cluster is homologous to that of *Pseudomonas* sp. strain CF600 (1). This suggests that the *P. stutzeri* OX1 phenol hydroxylase is a multicomponent enzyme. Moreover, activity assays carried out on recombinant *Escherichia coli* cells harboring cloned phenol hydroxylase showed that the cells express an enzymatic activity that is able to hydroxylate not only phenol but also 2,4-dimethylphenol and 2,5-dimethylphenol (1). Thus, it seems that in the case of *P. stutzeri* OX1, an association of BMMs is also present and that the two BMMs have similar substrate specificities.

To shed light on the metabolic significance of the copresence of two similar enzymatic activities in the same microorganism, we expressed and characterized the novel phenol hydroxylase from *P. stutzeri* and collected data on the specificity and the kinetic constants of the two different monooxygenases. Our data support the hypothesis that coupling between the two enzymatic systems optimizes the use of nonhydroxylated aromatic molecules by the draining effect of PH on the product(s) of oxidation catalyzed by ToMO, thus avoiding phenol accumulation.

MATERIALS AND METHODS

Materials. Bacterial cultures, plasmid purifications and transformations were performed according to Sambrook et al. (30). The pET22b(+) expression vector and *E. coli* strains BL21(DE3) and JM109 were from Novagen, whereas *E. coli* strain JM101 was purchased from Boehringer. The thermostable recombinant DNA polymerase used for PCR amplification was Platinum *Pfx* from Life Technologies, and deoxynucleotide triphosphates were purchased from Perkin-Elmer Cetus. The Wizard PCR Preps DNA purification system for elution of DNA fragments from agarose gels was obtained from Promega. Enzymes and other reagents for DNA manipulation were from New England Biolabs. The oligonucleotides were synthesized at the Stazione Zoologica A. Dohrn (Naples, Italy). Polyvinylidene difluoride membranes were from Perkin Elmer Cetus. Protease inhibitor cocktail EDTA-free tablets were purchased from Boehringer. Superose 12 PC 3.2/30, Q-Sepharose Fast Flow, Sephacryl S300 High Resolution, Sephadex G75 Superfine, and disposable PD10 desalting columns were from Pharmacia. CNBr was from Pierce, and cytochrome *c* from horse heart, trypsin, endoproteinase LysC, and bovine insulin were from Sigma. All other chemicals were from Sigma. The expression and purification of catechol 2,3-dioxygenase from *P. stutzeri* OX1 will be described in another paper (A. Viggiani, unpublished data).

Nucleotide sequencing. DNA fragments were directly sequenced by the walking-primer method with an automated sequencer (ABI 3100, Applied Biosystems, Foster City, Calif.) with the ABI Prism Big-Dye terminator cycle sequencing ready reaction kit (Applied Biosystems).

Construction of expression vectors. Plasmids pBZ1260 (3) and pJSX148 (1), containing ToMO and PH gene clusters, respectively, were kindly supplied by P. Barbieri (Dipartimento di Biologia Strutturale e Funzionale, Università dell'Insubria, Varese, Italy). The DNA sequences coding for subunits PH P and PH M from plasmid pJSX148 were subcloned into vector pET22b(+) with a PCR procedure to insert the appropriate endonuclease restriction sites at the 5' and 3' ends of each gene to allow their polar cloning into the expression vector, with synthetic oligonucleotides specific for each gene. Primers *PHPup* (5'-CCG

GAATTCATATGAGTTACACCGTC-3') and *PHPdown* (5'-CCCAAGCTTCT ATATCTTCTTGAACA-3') were used for the amplification of a 1,062-bp fragment containing the *ph p* gene, coding for PH P. Primers *PHMup* (5'-CCGGA ATTCATATGAGCCAGCTTGTAT-3') and *PHMdown* (5'-CCCAAGCTTAA TTCCATTCAAGAATG-3') were used for the amplification of a 267-bp fragment containing the *ph m* gene, coding for PH M. Primers *PHPup* and *PHMup* introduced a NdeI restriction site at the *ph p* and *ph m* ATG start codons, whereas primers *PHPdown* and *PHMdown* inserted a HindIII restriction site downstream of the stop codons of both genes. The DNA fragments coding for PH P and PH M from the PCR amplifications were isolated by agarose gel electrophoresis, eluted, and digested with NdeI and HindIII restriction endonucleases. The digestion products were purified by electrophoresis, ligated with pET22b(+) previously cut with NdeI and HindIII, and used to transform JM101 competent cells. The resulting recombinant plasmids, named pET22b(+)/pP and pET22b(+)/pM, respectively, were verified by DNA sequencing.

Expression and purification of the PH complex and of subunits PH P and PH M. Plasmid pJSX148 and plasmid pBZ1260, containing the *ph* and *tou* (genetic locus for the ToMO complex) gene clusters, respectively, were expressed in *E. coli* JM109 cells. Plasmids pET22b(+)/pP and pET22b(+)/pM were expressed in *E. coli* BL21(DE3) cells.

All recombinant strains were routinely grown in Luria-Bertani (LB) medium (30) supplemented with 50 µg of ampicillin per ml. Fresh transformed cells were inoculated into 10 ml of LB-ampicillin medium at 37°C, up to an optical density at 600 nm (OD₆₀₀) of 0.7. These cultures were used to inoculate 1 liter of LB supplemented with 50 µg of ampicillin per ml and grown at 37°C until the *A*₆₀₀ ranged from 0.7 to 0.8.

Expression of recombinant proteins was induced by adding isopropylthiogalactopyranoside (IPTG) at a final concentration of 70 µM for pET22b(+)/pP, 0.4 mM for pET22b(+)/pM, and 0.4 mM for the expression of the *ph* gene cluster from plasmid pJSX148. At the time of induction, Fe(NH₄)₂(SO₄)₂ was added at a final concentration of 100 µM except in the case of PH M. Growth was continued for 3 h at 37°C for expression of the PH complex and at 25°C in the case of pET22b(+)/pP and pET22b(+)/pM. Cells were collected by centrifugation, washed in 25 mM MOPS (morpholinopropanesulfonic acid, pH 6.9) containing 10% ethanol, 10% glycerol, and 1 mM dithiothreitol (buffer A) or in 20 mM sodium phosphate (pH 7.0)–10% glycerol (buffer B). The cell paste was stored at –80°C until needed.

An sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) analysis of an aliquot of induced and noninduced cells, after sonication and separation of the soluble and insoluble fractions, revealed that, based on the expected molecular sizes of the polypeptides, all the proteins of interest were present only in the soluble fraction of the induced cells. Typical yields, on the basis of densitometric scanning of the electrophoresis profiles obtained after cell lysis, were approximately 40 mg/liter for PH P, 28 mg/liter for PH M, and 10 mg/liter for PH LNO. The paste from 1 liter of culture of induced cells was suspended in 40 ml of the appropriate buffer containing an EDTA-free protease inhibitor cocktail. Cells were disrupted by sonication (10 times for a 1-min cycle, on ice). Cell debris was removed by centrifugation at 18,000 × *g* for 60 min at 4°C. The supernatant was immediately fractionated as described below. Unless otherwise stated, all chromatographic steps were performed at 4°C. Buffers were made anaerobic by repeated cycles of flushing with nitrogen. Column operations were not strictly anoxic.

Purification of the expression products of pJSX148. The soluble fraction from a 1-liter culture of JM109 cells expressing plasmid pJSX148 was loaded onto a Q-Sepharose Fast Flow column (1 by 18 cm) equilibrated in buffer A at a flow rate of 10 ml/h. The column was further washed with 30 ml of the same buffer. Elution was performed with a 200-ml linear salt gradient from 0.08 to 1 M NaCl in buffer A, at a flow rate of 10 ml/h. SDS gel electrophoresis of the fractions eluted from the column (data not shown) indicated that fractions eluting at about 0.4 M NaCl contained three polypeptides with apparent molecular masses of about 10, 38, and 60 kDa, the expected molecular sizes of recombinant subunits O, L, and N, respectively. The identity of the proteins was further checked by N-terminal sequencing of the electrophoresis bands electroblotted onto polyvinylidene difluoride membranes (17). Relevant fractions were pooled, concentrated by ultrafiltration on an XM50 membrane, and loaded onto a Sephacryl S300 High Resolution column (2.5 by 50 cm) equilibrated in buffer A containing 0.2 M NaCl, at a flow rate of 8 ml/h. SDS-PAGE analysis of the fractions (Fig. 1) showed that PH O, N, and L coeluted in a single peak. Fractions were pooled, concentrated by ultrafiltration on XM50, and stored under nitrogen at –80°C.

Purification of PH P. The soluble fraction from a 1-liter culture of cells expressing plasmid pET22b(+)/pP was loaded onto a Q-Sepharose Fast Flow column (1 by 18 cm) equilibrated in buffer B containing 0.08 M NaCl and 1 mM dithiothreitol, at a flow rate of 10 ml/h, and further washed with 30 ml of the

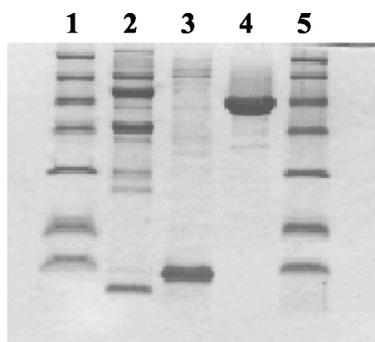


FIG. 1. SDS-PAGE analysis of purified PH subunits. Lanes 1 and 5, molecular mass standards (β -galactosidase, 116.0 kDa; bovine serum albumin, 66.2 kDa; ovalbumin, 45.0 kDa; lactate dehydrogenase, 35.0 kDa; restriction endonuclease Bsp981, 25.0 kDa; β -lactoglobulin, 18.4 kDa; lysozyme, 14.4 kDa). Lane 2, PH (LNO) (2.58 μ g); lane 3, PH M (2.22 μ g); lane 4, PH P (4.34 μ g).

same buffer. Proteins were eluted with a 200-ml linear salt gradient from 0.15 to 0.55 M NaCl, at a flow rate of 10 ml/h. Fractions eluting at about 0.37 M NaCl were found to contain PH P, based on their UV/visible light absorption at 280 and 460 nm, SDS-PAGE analysis, and N-terminal sequencing of the electrophoresis band electroblotted onto polyvinylidene difluoride membranes (17). Relevant fractions were pooled, concentrated by ultrafiltration on YM30 membranes, and loaded onto a Sephadex G75 Superfine column (2.5 by 50 cm) equilibrated in buffer B containing 0.2 M NaCl and 1 mM dithiothreitol, at a flow rate of 8 ml/h. Fractions containing electrophoretically pure PH P (Fig. 1) were pooled, purged with N_2 , concentrated by ultrafiltration on YM30 membranes, and stored at -80°C .

Purification of PH M. The soluble fraction from a 1-liter culture of cells expressing plasmid pET22b(+)-phM was loaded onto a Q-Sepharose Fast Flow column (1 by 18 cm) equilibrated in buffer B at a flow rate of 10 ml/h, and the column was further washed with 30 ml of the same buffer. Proteins were eluted with a 200-ml linear salt gradient from 0 to 0.5 M NaCl in buffer B, at a flow rate of 10 ml/h. Fractions eluting at about 0.3 M NaCl were found to contain PH M, based on SDS-PAGE analysis and N-terminal sequencing of the electrophoresis band electroblotted onto polyvinylidene difluoride membranes (17). Relevant fractions were pooled, concentrated by ultrafiltration on YM10 membrane, and loaded onto a Sephadex G75 Superfine column (2.5 by 50 cm) equilibrated in buffer B containing 0.2 M NaCl, at a flow rate of 8 ml/h. Fractions containing electrophoretically pure PH M (Fig. 1) were pooled, purged with N_2 , concentrated by ultrafiltration on YM10 membranes, and stored at -80°C .

Primary structure determinations. The primary structure of recombinant subunits was verified by the peptide mapping strategy (6). Aliquots of the high-pressure liquid chromatography (HPLC) product of each purified protein were digested with trypsin and/or endoproteinase LysC and BrCN, and the resulting peptide mixtures were analyzed by matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight (MALDI-TOF)/mass spectrometry (MS). The mass signals recorded in the spectra were mapped onto the anticipated sequence of the subunit on the basis of their mass values and the specificity of the enzyme used, leading to verification of the amino acid sequence.

Catalytic assays of reconstituted PH and PH subunits. The enzymatic activity of the reconstituted PH complex was measured on phenol as a substrate by monitoring the production of catechol in continuous coupled assays with recombinant catechol 2,3-dioxygenase from *P. stutzeri* OX1 as already described (6). Protein concentrations were 0.143, 0.201, and 0.849 μM for PH LNO, PH P, and PH M, respectively. Semialdehyde amounts produced from catechol were determined by measuring the absorbance at 410 nm, with an extinction coefficient of 17,300 $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$. Specific activity was defined as nanomoles of substrate converted per minute per milligram of subcomplex (LNO) at 25°C .

Single-turnover assays of purified components of the PH complex [5.35 nmol of (LNO)₂, 14 nmol of PH M, and 12.25 nmol of PH P] and of all of their possible combinations were also performed as already described (6).

The reductase activity of PH P was assayed spectrophotometrically at 25°C by monitoring the reduction of cytochrome *c* at 550 nm with a Cary 100 WinUV Varian spectrophotometer. Assays were carried out as described (32), 1 U of enzymatic activity being defined as the amount of enzyme catalyzing the reduction of 1 μmol of cytochrome *c* per min under the assay conditions. Kinetic

parameters for NADH and NADPH were determined with 1.5 nM PH P and 30 μM horse heart cytochrome *c* in the presence of various concentrations of the cofactors.

Enzymatic assays on cells. (i) **Enzymatic assays on phenol.** Assays were performed with *E. coli* JM109 cells transformed with plasmid pJSX148 or pBZ1260, expressing PH and ToMO, respectively. Cells were grown in LB containing 50 μg of ampicillin per ml at 37°C , up to an OD_{600} of 0.5. Expression of recombinant complexes was induced with 0.4 mM IPTG at 37°C in the presence of 100 μM $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2$. One hour after induction, cells were collected by centrifugation and suspended in M9 minimal medium containing 0.4% glucose (M9-G). The specific activity of cells on phenol was determined by their incubation at an OD_{600} of 0.1 to 0.5 in a quartz cuvette in a final volume of 500 μl of M9-G, 400 μM phenol, and saturating amounts of catechol 2,3-dioxygenase (C2,3O) (3 U). The rate of formation of catechol ($\epsilon_{375} = 29,100 \text{ M}^{-1} \text{cm}^{-1}$) was measured at 375 nm and 25°C . The specific activity of cells ranged between 4 and 6 $\text{mU}/\text{OD}_{600}$ for cells expressing the PH complex and 15 to 20 $\text{mU}/\text{OD}_{600}$ for cells expressing the ToMO complex, 1 mU representing 1 nmol of phenol oxidized per min at 25°C .

For determination of the kinetic parameters on phenol, cells were used at an optical density corresponding to 0.3 mU/ml.

(ii) **Enzymatic assays on benzene.** Activity assays were carried out by a discontinuous assay with cells suspended in M9-G in a final volume of 500 μl at 25°C . For determination of the kinetic parameters for the conversion of benzene to phenol, cells were used at an optical density corresponding to 0.5 mU/ml for cells expressing ToMO and 1 mU/ml for cells expressing the PH complex. Reactions were started by the addition of various amounts of benzene in *N,N*-dimethylformamide to cell suspensions and stopped at different times by the addition of 50 μl of 1 M HCl. Samples were centrifuged at 12,000 rpm for 20 min at 4°C . Soluble fractions were stored at -20°C until analysis. Phenol and catechol, the products of benzene oxidation, were separated by HPLC on an Ultrasphere C₁₈ reverse-phase column (4.6 by 250 mm, 80- \AA pore size), monitoring the absorbance of the eluate at 274 nm. Separation was carried out at a flow rate of 1 ml/min with a linear gradient of a two-solvent system made up of water containing 0.1% formic acid (solvent A) and methanol containing 0.1% formic acid (solvent B). Phenol and catechol were separated by a 12-min isocratic elution at 10% solvent B, followed by a linear gradient ranging from 10 to 30% solvent B over 10 min and an isocratic step at 30% solvent B. The amount of each product was determined by comparing the area of each peak with that obtained by the same chromatography procedure on standard solutions.

Time course of benzene oxidation. The rate of formation of products from benzene catalyzed by *E. coli* cells expressing PH or ToMO or a mixture of both types of cells was measured (i) by the discontinuous assay for monitoring the rate of formation of phenol and catechol or (ii) by the continuous assay for monitoring only the rate of formation of catechol. When the discontinuous assay was used, cells were used at an optical density corresponding to 1 mU/ml, with 30 μM benzene.

When the continuous assay was used, cells were incubated in a closed quartz cuvette in a final volume of 500 μl of M9-G, 3 U of C2,3O, and 30 μM benzene. Cells were suspended at the appropriate concentration, as described in the Results section.

Kinetic parameter determination. Kinetic parameters were calculated with the program GraphPad Prism (GraphPad Software). For the assays carried out with cells, the protein concentration was determined by densitometric scanning of SDS-PAGE assays of cell extracts.

Other methods. Homology studies were performed by searching the public nucleotide and protein databases with BLAST. ClustalW was used to obtain multiple alignments for each subunit. Identification of the cofactor flavin adenine dinucleotide (FAD) from PH P was performed as already described (24). Iron, labile sulfide, and FAD contents were determined as already described (6). SDS-PAGE analysis, N-terminal protein sequence determinations, electrospray mass spectrometric measurements, MALDI/mass spectrometry (MALDI/MS) analysis of peptide mixtures, and determination of the molecular weights by gel filtration were performed as already described (31). Subunits L, N, and O from the PH (LNO) subcomplex were separated by HPLC with a Phenomenex Jupiter narrow-bore C₄ column (2.1 by 250 mm, 300- \AA pore size), at a flow rate of 0.2 ml/min with a linear gradient of a two-solvent system. Solvent A was 0.1% trifluoroacetic acid in water, and solvent B was acetonitrile containing 0.07% trifluoroacetic acid. Proteins were separated by a linear gradient ranging from 10 to 65% solvent B over 60 min. In the case of the liquid chromatography (LC)/MS analysis of subunits PH P and PH M, the same column was used with a linear gradient ranging from 10 to 95% solvent B over 20 min.

Nucleotide sequence accession number. The nucleotide sequence of the *ph* locus was submitted to GenBank and given accession number AY205602.

RESULTS

Nucleotide sequence of the phenol hydroxylase locus. The locus coding for phenol hydroxylase (*ph*) has already been mapped on a 4.8-kb *SacI*-*XbaI* fragment of the *P. stutzeri* OX1 chromosome cloned in pJSX148 (1). The nucleotide sequence of the *ph* locus was determined as described in Materials and Methods. Translation of the sequence in all possible reading frames revealed the presence of five open reading frames, named *ph l*, *m*, *n*, *o*, and *p*.

Comparison of the five predicted polypeptide sequences with the nonredundant peptide sequence database at the European Biology Institute revealed homology with the subunits of several multicomponent phenol hydroxylases and T2MOs, most notably with the phenol hydroxylase from *Pseudomonas* sp. strain CF600 (20). The degree of identity of subunits L, M, N, O, and P with the homologous subunits from *Pseudomonas* sp. strain CF600 PH was found to be 63, 68, 76, 53, and 77%, respectively, whereas the degree of identity with the homologous subunits of T2MO from *B. cepacia* G4 (19) was significantly lower, 43, 43, 62, 39, and 56%, respectively. It is noteworthy that the three enzymes have the same number and type of subunits, and the corresponding open reading frames were found in the same order in the operons. It should also be noted that the degree of identity of *P. stutzeri* PH with other toluene monooxygenases such as ToMO and T4MO was found to be lower. In fact, only subunits L, M, N, and P of PH found counterparts in subunits E, D, A, and F of ToMO, respectively, with identities of 20, 27, 21, and 24%, respectively.

As *Pseudomonas* sp. strain CF600 PH and T2MO from *B. cepacia* G4 belong to the group 1 BMMs (21), it may be concluded that the phenol hydroxylase from *P. stutzeri* OX1 is a multicomponent enzyme belonging to the same group.

Characterization of the recombinant subunits of the PH complex. (i) PH (LNO) subcomplex. Subunits PH O, L, and N, expressed from the *ph* cluster cloned into vector pJSX148 and purified, coeluted in a single peak in all the chromatographic systems used (data not shown).

When the sample containing the three proteins derived from the final gel filtration step of the purification procedure was subjected to molecular weight determination by gel filtration on Superose 12 PC 3.2/30, a single peak was obtained, with an apparent molecular mass of 220 kDa.

Samples of the purified LNO subcomplex were also analyzed by LC/MS after their separation by HPLC. Components O, L, and N showed molecular masses of $13,103.4 \pm 0.2$, $38,280.4 \pm 1.9$, and $60,010 \pm 4$ Da, respectively. These values are in agreement with the expected molecular masses calculated on the basis of the deduced amino acid sequence of the mature forms of the subunits, as reported in GenBank at accession number AY205602.

The primary structure of each of the recombinant subunits of the LNO subcomplex was verified by peptide mapping, as reported in Materials and Methods. The results led to complete verification of the amino acid sequences of subunits O, L, and N. Finally, the iron content of the complex was determined and found to be 1.44 mol/mol of (LNO).

(ii) PH P and PH M. Attempts to purify adequate amounts of subunits PH P and PH M from the expression of the entire *ph* cluster in pJSX148 were unsuccessful. We thus subcloned

the sequences coding for the two subunits into the expression vector pET22b(+), equipped with a strong ribosome-binding site located 9 bp upstream of the start codon. This strategy proved to be fruitful, as we were able to purify about 14 and 3 mg of pure PH P and PH M, respectively, per liter of culture.

Samples of purified PH P were analyzed by LC/MS. The recombinant protein showed a molecular mass of $38,439.4 \pm 1.5$ Da. This value is in agreement with the expected molecular mass calculated on the basis of the deduced amino acid sequence of the mature form of the subunit, as reported in GenBank at accession number AY205602. The primary structure of recombinant PH P was verified by peptide mapping, and the results led to complete verification of the amino acid sequence.

The spectrum of purified PH P showed typical maxima at 273, 340, 392, and 460 nm, like other reductase components of various bacterial oxygenases (24, 27), and consistent with the presence of a [2Fe-2S] iron-sulfur cluster and a flavin cofactor. The cofactor was identified to be FAD by thin-layer chromatography experiments. Moreover, the amount of bound FAD was calculated to be 0.8 to 0.9 mol/mol of protein, which indicates that 1 mol of PH P binds 1 mol of FAD. The presence of iron and sulfur was verified by colorimetric analyses. The molar ratio of iron to protein was found to be 2 ± 0.1 , whereas the sulfide content was 2.7 ± 0.3 mol/mol of protein. These results are in agreement with a presence of a [2Fe-2S] cluster. Moreover, a molar extinction coefficient at 460 nm was calculated on several preparations and found to be $21,000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

PH P was found to reduce several artificial electron acceptors such as horse heart cytochrome *c*, 2,6-dichlorophenolindophenol, and potassium ferricyanide, with either NADH or NADPH as the electron donor. The specific activity on cytochrome *c* calculated on several purifications was 178.13 ± 11.02 U per mg of purified PH P. NADH and NADPH oxidation was found to follow Michaelis-Menten kinetics, with an apparent K_m of $37.79 \mu\text{M}$ for NADH and $900 \mu\text{M}$ for NADPH. Hence, the replacement of NADPH for NADH produces a 23.8-fold increase in the K_m , which indicates that PH P preferentially uses NADH as an electron donor.

Samples of purified PH M were analyzed by LC/MS. The recombinant protein showed a molecular mass of $10,347.9 \pm 0.46$. This value is in good agreement with that expected on the basis of the deduced amino acid sequence of the mature form of the subunit, as reported in GenBank at accession number AY205602. Also, the primary structure of PH M was verified by the peptide-mapping strategy. The results led to complete verification of its amino acid sequence.

Single-turnover assays. To positively identify the hydroxylase component of the complex, we performed single-turnover assays by measuring the ability of PH (LNO), PH P, and PH M, and their combinations to oxidize phenol to catechol. The results of the experiments, with sodium dithionite as a reductant and methyl viologen as a redox mediator, are reported in Table 1. They indicate that PH (LNO) alone, in the absence of any other protein expressed by the *ph* cluster, is able to convert phenol into catechol, whereas PH P alone and PH M alone are not able to convert phenol into catechol.

The data reported in Table 1 also show that the addition of PH P to PH (LNO) increases the amount of the product

TABLE 1. Single-turnover assays catalyzed by the components of the phenol hydroxylase complex^a

Component(s)	Catechol produced (nmol)	Yield (%)
PH (LNO)	0.132	1.2
PH P	0	
PH M	0	
PH (LNO) + PH M	0.169	1.5
PH (LNO) + PH P	0.328	3.1
PH (LNO) + PH M + PH P	1.58	14.7

^a The experiments were performed as described in Materials and Methods with 10.7 nmol of PH (LNO), 14 nmol of PH M, and 12.25 nmol of PH P. PH P and PH (LNO) were added in the oxidized form and reduced by the addition of dithionite. The amounts of catechol produced are averages ($\pm 10\%$) of values obtained by various determinations carried out with different preparations of the subunits. Yield was calculated as the ratio of the amount of catechol produced with respect to the amount of the hydroxylase component in the assay.

2.48-fold, whereas the addition of PH M to PH (LNO) is almost ineffective. On the other hand, when all three components, PH M, PH P, and PH (LNO) are present, a 12-fold increase in the amount of product with respect to that produced in the presence of PH (LNO) alone is observed.

In vitro reconstitution of the PH complex. Preliminary multiple-turnover activity assays indicated that mixtures of equimolar amounts of the purified PH components, PH (LNO), PH P, and PH M, were able to transform phenol into catechol.

To determine the optimal relative concentration of each subunit for obtaining maximum hydroxylase activity, we carried out kinetic measurements with mixtures of PH (LNO), P, and M in which the concentration of each single component was changed with respect to the other components.

Figure 2 shows the effects on the rate of reaction of increasing ratios of PH M (Fig. 2A) and PH P (Fig. 2B) with respect to PH (LNO) in the presence of constant amounts of the other components.

Figure 2A shows that a linear relationship is obtained at low ratios of PH M, followed by a sharp break at about 0.8 mol of PH M/mol of PH (LNO). Ratios of PH M/mol of PH (LNO) higher than 2 inhibited the phenol hydroxylase activity.

PH P showed instead a different behavior (Fig. 2B), as no titration break was detectable, and the rate of reaction increased with the concentration of PH P, although the increase was less pronounced at high concentration of the reductase component and saturation was reached at molar ratios higher than 6.

Based on the titration experiments described above, we measured the kinetic parameters of the reconstituted complex, with the ratios LNO:M:P = 1:1.4:6. The specific activity was 185.55 ± 12.26 nmol of phenol converted per min per mg of (LNO), whereas k_{cat} and K_m values were 0.286 ± 0.009 s⁻¹ and 0.61 ± 0.09 μ M, respectively.

Moreover, we also measured the rates of phenol hydroxylation and NADH oxidation at different PH P concentrations in the presence of fixed amounts of PH (LNO) and PH M (data not shown). We found a stoichiometric ratio between the amount of NADH oxidized and the amount of catechol produced up to a molar ratio of PH P to PH (LNO) of less than 0.5. At higher PH P:PH (LNO) ratios, the rate of NADH oxidation is higher than that of catechol formation.

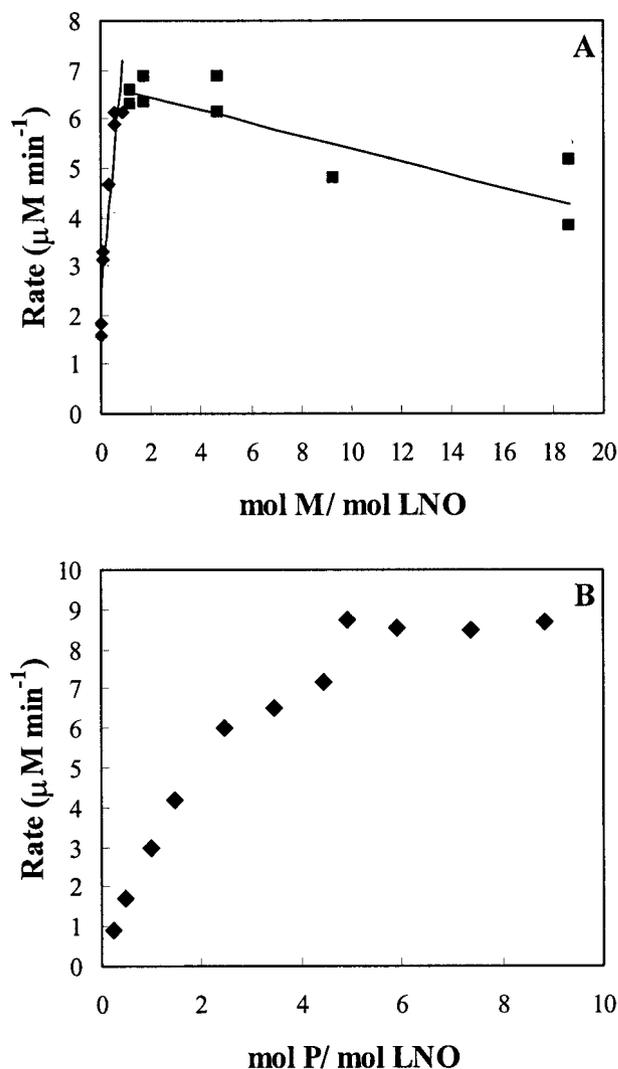


FIG. 2. Effect of different concentrations of PH P (A) and PH M (B) with respect to the hydroxylase component on the rate of catechol production. Activity was measured as described in Materials and Methods. Curve A represents PH LNO at 0.288 μ M and PH P at 0.990 μ M. Curve B represents PH LNO at 0.288 μ M and PH M at 0.503 μ M.

Substrate specificity of ToMO and PH complexes. We investigated the substrate specificity of ToMO and PH complexes by measuring the kinetic parameters of the two enzymes on benzene and phenol as substrates, with *E. coli* cells expressing the PH or ToMO complex. The assays were carried out as described in Materials and Methods and yielded the kinetic parameters reported in Table 2.

The time course of phenol and catechol production by *E. coli* cells expressing ToMO or PH was determined by their incubation with 30 μ M benzene in the discontinuous assay described in Materials and Methods, at an optical density corresponding to 1 mU/ml.

As shown in Fig. 3A, when cells expressing ToMO were used, phenol was produced at a linear rate of about 0.4 μ M min⁻¹, whereas catechol was not detected up to 35 to 40 min, and its formation started after about 60 min.

On the other hand, when cells expressing PH were used, the

TABLE 2. Kinetic constants of PH and ToMO on benzene and phenol^a

Substrate	PH			ToMO		
	k_{cat} (s ⁻¹)	K_m (μM)	k_{cat}/K_m (10 ³ s ⁻¹ μM^{-1})	k_{cat} (s ⁻¹)	K_m (μM)	k_{cat}/K_m (10 ³ s ⁻¹ μM^{-1})
Benzene (cells)	0.092	25	3.7	0.36	~0.2	1,810
Phenol (cells)	1.02	0.6	1,696	1.00	2.18	460
Phenol (complex)	0.286	0.61	469			

^a Constants were measured on cells (benzene and phenol) or on the reconstituted complex (phenol). Errors were always lower than 6% except those for K_m on benzene, which was about 25%.

phenol concentration reached a constant but low value after 25 to 30 min, whereas catechol could be detected even at short times, and its concentration increased with time (Fig. 3B).

A different picture emerged when the same experiment was carried out by monitoring only catechol formation for 15 min by the C2,3O-coupled continuous assay.

The data tabulated in Fig. 4 indicate that, as shown in the experiment monitored by the discontinuous assay, neither cells expressing ToMO (tested at three different optical densities

corresponding to 0.27, 0.55, and 1.1 mU/ml) nor cells expressing PH (0.22 mU/ml) efficiently produced catechol, although a small amount was formed in the latter case, at a rate of 0.017 $\mu\text{M min}^{-1}$.

Surprisingly, instead, a mixture of the two types of cells efficiently produced catechol. When cells expressing PH at an optical density corresponding to 0.22 mU/ml were mixed with ToMO-expressing cells at 0.27 mU/ml, the rate of formation of catechol was nine times higher than that measured when the cells were used separately. Moreover, when increasing amounts of cells expressing ToMO (0.55 and 1.1 mU/ml) were mixed with a constant amount of cells expressing PH (0.22 mU/ml), the rate of formation of catechol was found to be 13 and 19 times higher, respectively, than that observed with PH-expressing cells alone.

DISCUSSION

Characterization of the PH complex. The homology studies of the *P. stutzeri* OX1 PH subunits have shown that PH is a multicomponent protein belonging to group 1 BMMs that includes well-characterized enzymes such as PH from *Pseudo-*

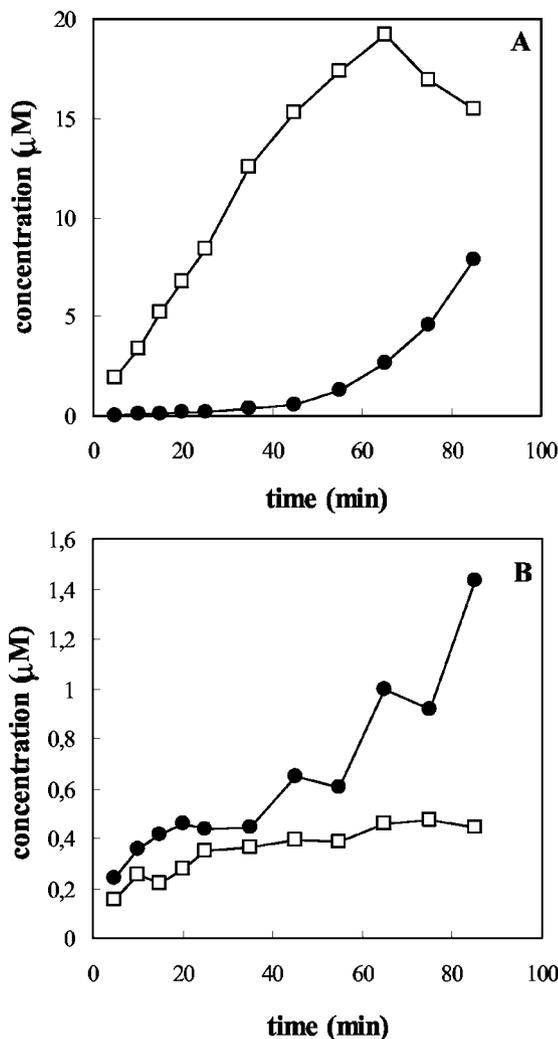


FIG. 3. Kinetics of phenol (open squares) and catechol (solid circles) production by (A) cells expressing ToMO at 1 mU/ml and (B) PH at 1 mU/ml, incubated with 30 μM benzene.

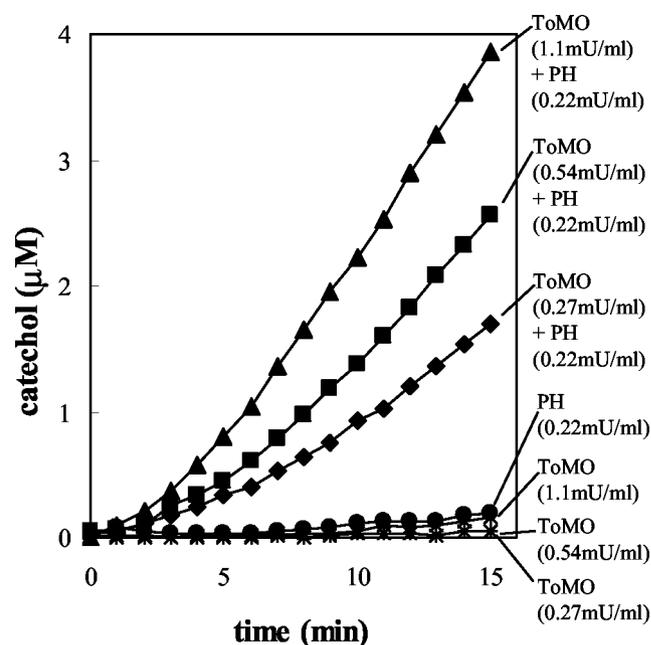


FIG. 4. Kinetics of catechol production by cells expressing ToMO or PH incubated with 30 μM benzene. Catechol was measured by the C2,3O-coupled colorimetric assay described in Materials and Methods.

monas sp. strain CF600 and T2MO from *B. cepacia* G4 (19, 20) and is more closely related to the *Pseudomonas* sp. strain CF600 enzyme. Subunits L, N, and O find their counterparts in polypeptides that are part of the hydroxylase components of monooxygenase systems (15, 19, 28, 34, 36). It is noteworthy that the general structure of these hydroxylase complexes is dimeric, and each single monomeric unit is made up of two or three protomers. The findings that subunits L, N, and O coelute in a single peak in all chromatographic systems used and that the apparent molecular mass of the complex is 220 kDa strongly support the hypothesis that subunits L, N, and O of *P. stutzeri* OX1 PH also constitute a dimeric (LNO)₂ subcomplex (whose expected molecular mass is 222,786 Da). Moreover, its iron content is about 1.5 mol/mol of (LNO). This result is in agreement with the presence of a diiron center in each of the N subunits, as suggested by its homology with other monooxygenase "large" subunits (25, 28, 38).

Finally, single-turnover assays have shown that PH (LNO)₂ alone, in the absence of any other PH component, is able to convert phenol into catechol, confirming its identification with the hydroxylase component of the complex, in agreement with homology studies (1).

As for PH P, homology studies have shown that this subunit is homologous to the reductase components of other BMMs. The spectrum of purified PH P is consistent with the presence of a [2Fe-2S] iron-sulfur cluster and a flavin cofactor, and 1 mol of FAD and a single [2Fe-2S] cluster are found per mol of PH P. Moreover, PH P can reduce several artificial electron acceptors with either NADH or, less efficiently, NADPH as the electron donor. Thus, all of the data lead to the identification of subunit PH P with the NAD(P)H-oxidoreductase component of the PH complex. PH P is not able to convert phenol into catechol in single-turnover experiments, but its addition to the hydroxylase subcomplex (LNO)₂ increased the amount of the product produced 2.48-fold (Table 1). This increase may well be attributed to the ability of artificially reduced PH P to transfer additional electrons to PH (LNO), thus promoting more than one reaction cycle in the single-turnover assay.

As for PH M, homology studies have indicated that it is homologous to the small regulatory proteins of BMMs. These proteins are required for catalysis (14) but contain neither organic cofactor nor metal ions, and it is unlikely that they participate directly in the electron transfer (14). Thus, given the identification of PH P with the NADH-oxidoreductase component of the PH complex, it may be hypothesized that PH M is the effector protein of the complex. PH M alone is not able to convert phenol into catechol in single-turnover experiments, and unlike PH P, its addition to the hydroxylase subcomplex (LNO)₂ was almost ineffective. On the other hand, when PH M was added to mixtures of PH P and PH (LNO)₂, the amount of the product increased 4.8-fold with respect to that produced in the presence of PH (LNO)₂ plus PH P and 12-fold with respect to that produced in the presence of the hydroxylase subcomplex alone. This may indicate that cooperative interactions between the three components occur, suggestive of the formation of a ternary complex, as has been demonstrated for other homologous monooxygenases (9, 10), and that PH M may enhance coupling in the system, as has been recently reported for methane monooxygenase B (MMO B) from *Methylosinus trichosporium* OB3b (35).

Finally, the yield of product formation by the reconstituted complex measured in single-turnover assays (Table 1), although low, is similar to yields determined for other monooxygenase complexes (5, 19, 25). This might be an indication of uncoupling and/or of the presence of inactive protein species.

In vitro reconstitution of the PH complex. To test the ability of the individually purified components PH (LNO)₂, PH P, and PH M to reconstitute a functional complex, we carried out in vitro experiments to measure the ability of mixtures of the components to catalyze the conversion of a substrate into a product mediated by electrons coming from the donor.

Increasing ratios of PH M with respect to PH (LNO) in the presence of constant amounts of PH P increased the rate of product formation (Fig. 2A), until a sharp break was observed. The nearly linear titration and the break are indications of a high affinity of this component for the LNO subcomplex, as already observed for the regulatory component of methane monooxygenase (9). At higher concentrations, PH M inhibited the reaction (Fig. 2A), as reported for other regulatory components (9). This might be due to a reduction in coupling efficiency, as recently demonstrated for T4MO (18).

On the contrary, no titration break was present when PH M was held constant and PH P was increased (Fig. 2B). This result suggests that the association of PH P in the complex is weaker than that of PH M. It should also be noted that the ratio of moles of PH P to moles of PH (LNO) at which we observed the maximum velocity is similar to the values determined for the homologous phenol hydroxylase from *Pseudomonas* sp. strain CF600 (5) and for the phenol hydroxylase from *Acinetobacter radioresistens* S13 (12).

Moreover, we have observed that NADH is consumed at a stoichiometric ratio with respect to catechol produced, with PH P:PH (LNO) ratios lower than 0.5. This indicates that, at least under these conditions, NADH oxidation is completely coupled to substrate oxidation. The fact that at PH P:PH (LNO) ratios higher than 0.5 the rate of NADH oxidation is higher than that of catechol formation could indicate some uncoupling, as already observed in other monooxygenase systems (10, 11, 18, 23).

As for the kinetic parameters determined for the reconstituted complex (Table 2), it should be noted that the K_m of the PH from *P. stutzeri* for benzene is similar to that reported for T4MO for the same substrate (26). In contrast, the k_{cat} value of PH on benzene is one order of magnitude lower than that reported for T4MO (26) and four times lower than that of ToMO (Table 2). This might be an indication that ToMO and T4MO are better catalysts for the transformation of nonhydroxylated substrates than PH. This hypothesis is reinforced by the observation that the k_{cat} values on phenol of two different phenol hydroxylases, one from *P. stutzeri* and one from *Acinetobacter radioresistens* (8), are of the same order of magnitude.

Finally, the kinetic parameters determined for the reconstituted complex with saturating ratios of each component are similar to those measured with *E. coli* cells expressing the entire PH complex from vector pJSX148 (Table 2). This leads us to conclude that the purified recombinant components are able to reconstitute an active PH complex in which all individual subunits are functional.

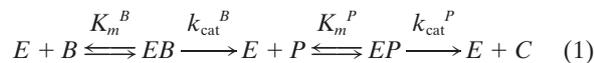
Metabolic roles of ToMO and PH. Genes for ToMO and PH are both present in the genome of *P. stutzeri* OX1. The exper-

iments described in this paper indicate that the expression of the gene cluster coding for PH leads to a functional complex, as has already been demonstrated in the case of the ToMO complex (6).

It has already been shown that ToMO is able to oxidize a variety of aromatic substrates, including *o*-, *m*-, and *p*-cresol, phenol, toluene, benzene, and naphthalene (3). PH is also able to oxidize phenol and *o*-, *m*-, and *p*-cresol (1). Moreover, as shown in Table 2, it oxidizes benzene as well. Thus, it would appear that two apparently similar functions, i.e., two enzymes involved in the catalysis of identical or similar reactions, are present in the same microorganism.

To shed light on the apparent redundancy of hydroxylase functions in the same microorganism, we investigated the kinetics and the substrate specificity of both complexes by measuring the kinetic parameters of the two enzymes on benzene and phenol with *E. coli* cells expressing PH and ToMO complexes from vectors pJSX148 and pBZ1260, respectively.

Both ToMO and PH (E, enzyme) catalyze the conversion of benzene (B) into catechol (C) in a two-step process, involving phenol (P) as an intermediate, according to the equation



where k_{cat}^B and k_{cat}^P are the catalytic constants for benzene and phenol, respectively, and K_m^B and K_m^P are the Michaelis constants for the two reactions.

However, the kinetic characterization of the two enzymes, although restricted to few substrates, would indicate that their behavior is quite different. ToMO shows a specificity constant in the first step which is about fourfold higher than in the second step (Table 2). On the other hand, the catalytic parameters of PH on the same substrates allow us to draw a different picture. In contrast to the values determined for ToMO, the k_{cat}/K_m of PH for phenol is about 460-fold higher than that for benzene (Table 2). This difference depends on both the K_m and k_{cat} values. In fact, the K_m for benzene is about 40-fold higher than that for phenol, whereas its k_{cat} value for phenol is almost 10-fold higher than that for benzene.

These data lead to the conclusion that PH hydroxylates phenol much more efficiently than benzene, which, in turn, is preferentially transformed by ToMO, as indicated by its high specificity constant for this substrate compared with that of PH.

What can be the reason for the presence of these two enzymes in the same microorganism? It should be remembered that both enzymes are part of the upper pathway, which is responsible for the degradation of aromatic hydrocarbons. It can be reasonably hypothesized that both enzymes serve the purpose of effectively channeling aromatic substrates to the lower pathway, which is initiated by C2,3O. Thus, the metabolic importance of the two enzymes can be evaluated on the basis of their ability to produce catechol, i.e., the substrate of C2,3O.

To this purpose, we experimentally determined the amounts of phenol and catechol which are produced from benzene as a function of time (Fig. 3A and B). When *E. coli* cells expressing ToMO were incubated with 30 μ M benzene (a concentration

100-fold higher than the K_m), phenol was produced at a linear rate, whereas catechol could not be detected for 35 to 40 min, and it began to be produced only after about 60 to 70% of the benzene had been converted to phenol (Fig. 3A). This behavior is consistent with the sequential action of the enzyme on benzene and phenol, as described by equation 1, and with its kinetic parameters (Table 2).

According to the Michaelis-Menten model, the rates of the two steps in equation 1 are:

$$v_1 = (k_{cat}^B/K_m^B) [E] [B] \quad (2)$$

$$v_2 = (k_{cat}^P/K_m^P) [E] [P] \quad (3)$$

Hence, the ratio v_1/v_2 , which gives a measure of the relative efficiency of the enzyme in the two steps, is given by

$$v_1/v_2 = k_{cat}^B K_m^P [B]/k_{cat}^P K_m^B [P] \quad (4)$$

Substituting the experimentally determined catalytic constants, equation 4 gives $v_1/v_2 = 3.93 [B]/[P]$. Therefore when $[B] = 10 [P]$, then $v_1/v_2 = 39.3$. Thus, under these conditions, the first step of the reaction is about 40-fold faster than the second. When $[B] = [P]$, then $v_1/v_2 = 3.93$, and only when $[P] = 3.93 [B]$ does $v_1 = v_2$. Thus, the simple application of the Michaelis-Menten model to the conversion of benzene into catechol catalyzed by ToMO indicates that a saturating benzene concentration acts as an inhibitor of the second hydroxylation step and that catechol is not produced until the phenol concentration is higher than the benzene concentration. This result is in perfect agreement with the experimentally determined data.

When *E. coli* cells expressing PH were incubated with 30 μ M benzene, in contrast to what was observed in the case of ToMO, no lag in the production of catechol was observed. However, this is not a very efficient process because the reaction is limited by the amount of phenol produced in the first step, which soon reaches a low and constant value (Fig. 3B). When equation 4 is solved with the kinetic constants experimentally determined for PH, the ratio v_1/v_2 is 0.0022 $[B]/[P]$. Hence, even when $[B] = 10[P]$, the second step is 45-fold faster than the first, and it becomes 450-fold faster when $[B] = [P]$. Therefore, equation 4 allows us to predict that when benzene is used as a substrate by PH, it is slowly converted to phenol, which in turn is very efficiently oxidized to catechol. This conclusion is in line with the experimentally observed behavior.

Finally, comparison of the specificity constants of ToMO and PH on benzene shows that the k_{cat}/K_m of ToMO is about 500-fold higher than that of PH, whereas the specificity constant of PH on phenol is only 4-fold higher than that of ToMO. Thus, we can predict that when both enzymes compete for benzene as a substrate, ToMO will efficiently produce phenol, which in turn will be very efficiently oxidized to catechol by PH. The results obtained by observing benzene oxidation by a mixture of cells expressing ToMO and PH support this hypothesis. In fact, as shown in Fig. 4, ToMO alone did not form any significant amount of catechol from benzene, whereas only small amounts were produced by PH alone. When mixtures of both types of cells were used, catechol was produced at a rate that was proportional to the concentration of ToMO-expressing cells and more than one order of magnitude higher than that measured with PH alone.

Thus, we can confidently conclude that the concerted use of

ToMO and PH optimizes the use of benzene in *P. stutzeri* OX1 by the draining effect of PH on the products of oxidation catalyzed by ToMO, which in turn excludes the possibility that phenols will accumulate.

ACKNOWLEDGMENTS

We are indebted to Giuseppe D'Alessio, Department of Biological Chemistry, University of Naples Federico II, for critically reading the manuscript. We also thank P. Barbieri (Dipartimento di Biologia Strutturale e Funzionale, Università dell'Insubria, Varese, Italy) for kindly providing the cDNA coding for the *ph* cluster.

This work was supported by grants from the Ministry of University and Research (PRIN/2000 and PRIN/2002).

REFERENCES

1. Arenghi, F. L., D. Berlanda, E. Galli, G. Sello, and P. Barbieri. 2001. Organization and regulation of meta cleavage pathway gene for toluene and *o*-xylene derivative degradation in *Pseudomonas stutzeri* OX1. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**:3304–3308.
2. Baggi, G., P. Barbieri, E. Galli, and S. Tollari. 1987. Isolation of a *Pseudomonas stutzeri* strain that degrades *o*-xylene. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**: 2129–2131.
3. Bertoni, G., F. Bolognesi, E. Galli, and P. Barbieri. 1996. Cloning of the genes for and characterization of the early stages of toluene catabolism in *Pseudomonas stutzeri* OX1. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**:3704–3711.
4. Bertoni, G., M. Martino, E. Galli, and P. Barbieri. 1998. Analysis of the gene cluster encoding toluene/*o*-xylene monooxygenase from *Pseudomonas stutzeri* OX1. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**:3626–3632.
5. Cadieux, E., V. Vrajmasu, C. Achim, J. Powlowski, and E. Munck. 2002. Biochemical, Mossbauer, and EPR studies of the diiron cluster of phenol hydroxylase from *Pseudomonas* sp. strain CF 600. *Biochemistry* **41**:10680–10691.
6. Cafaro, V., R. Scognamiglio, A. Viggiani, V. Izzo, I. Passaro, E. Notomista, F. Dal Piaz, A. Amoresano, A. Casbarra, P. Pucci, and A. Di Donato. 2002. Expression and purification of the recombinant subunits of toluene/*o*-xylene monooxygenase and reconstitution of the active complex. *Eur. J. Biochem.* **269**:5689–5699.
7. Chauhan, S., P. Barbieri, and T. Wood. 1998. Oxidation of trichloroethylene, 1,1-dichloroethylene, and chloroform by toluene/*o*-xylene monooxygenase from *Pseudomonas stutzeri* OX1. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**:3023–3024.
8. Divari, S., F. Valetti, P. Caposio, E. Pessione, M. Cavaletto, E. Griva, G. Gribaudo, G. Gilardi, and C. Giunta. 2003. The oxygenase component of phenol hydroxylase from *Acinetobacter radioresistens* S13. *Eur. J. Biochem.* **270**:2244–2253.
9. Fox, B. G., Y. Liu, J. E. Dege, and J. D. Lipscomb. 1991. Complex formation between the protein components of methane monooxygenase from *Methylosinus trichosporium* OB3b. Identification of sites of component interaction. *J. Biol. Chem.* **266**:540–550.
10. Fox, G. B., W. A. Froland, J. E. Dege, and J. D. Lipscomb. 1989. Methane monooxygenase from *Methylosinus trichosporium* OB3b. *J. Biol. Chem.* **264**: 10023–10033.
11. Green, J., and H. Dalton. 1985. Protein B of soluble methane monooxygenase from *Methylococcus capsulatus* (Bath). A novel regulatory protein of enzyme activity. *J. Biol. Chem.* **260**:15795–15801.
12. Griva E., P. E., Divari S., Valetti F., Cavaletto M., Rossi G.L., Giunta C. 2003. Phenol hydroxylase from *Acinetobacter radioresistens* S13. *Eur. J. Biochem* **270**:1434–1440.
13. Harayama, S., and M. Rejik. 1989. Bacterial aromatic ring-cleavage enzymes are classified into two different gene families. *J. Biol. Chem.* **264**: 15328–15333.
14. Hemmi, H., J. M. Studts, Y. K. Chae, J. Song, J. L. Markley, and B. G. Fox. 2001. Solution structure of the toluene 4-monooxygenase effector protein (T4moD). *Biochemistry* **40**:3512–3524.
15. Johnson, G. R., and R. H. Olsen. 1995. Nucleotide sequence analysis of genes encoding a toluene/benzene-2-monooxygenase from *Pseudomonas* sp. strain JS150. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**:3336–3346.
16. Kahng, H. Y., J. C. Malinvern, M. M. Majko, and J. J. Kukor. 2001. Genetic and functional analysis of the *tbc* operons for catabolism of alkyl- and chloroaromatic compounds in *Burkholderia* sp. strain JS150. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**:4805–4816.
17. Matsudaira, P. 1987. Sequence from picomole quantities of proteins electroblooded onto polyvinylidene difluoride membranes. *J. Biol. Chem.* **262**: 10035–10038.
18. Mitchell, K. H., J. M. Studts, and B. G. Fox. 2002. Combined participation of hydroxylase active site residues and effector protein binding in a para to ortho modulation of toluene 4-monooxygenase regioselectivity. *Biochemistry* **41**:3176–3188.
19. Newman, L. M., and L. P. Wackett. 1995. Purification and characterization of toluene 2-monooxygenase from *Burkholderia cepacia* G4. *Biochemistry* **34**: 14066–14076.
20. Nordlund, I., J. Powlowski, and V. Shingler. 1990. Complete nucleotide sequence and polypeptide analysis of multicomponent phenol hydroxylase from *Pseudomonas* sp. strain CF600. *J. Bacteriol.* **172**:6826–6833.
21. Notomista, E., A. Lahm, A. Di Donato, and A. Tramontano. 2003. Evolution of bacterial and archaeal multicomponent monooxygenases. *J. Mol. Evol.* **56**:435–445.
22. Olsen, R. H., J. J. Kukor, and B. Kaphammer. 1994. A novel toluene-3-monooxygenase pathway cloned from *Pseudomonas pickettii* PKO1. *J. Bacteriol.* **176**:3748–3756.
23. Oppenheim, S. F., J. M. Studts, B. G. Fox, and J. S. Dordick. 2001. Aromatic hydroxylation catalyzed by toluene 4-monooxygenase in organic solvent/ aqueous buffer mixtures. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **90**:187–197.
24. Pessione, E., S. Divari, E. Griva, M. Cavaletto, G. L. Rossi, G. Gilardi, and C. Giunta. 1999. Phenol hydroxylase from *Acinetobacter radioresistens* is a multicomponent enzyme. *Eur. J. Biochem.* **265**:549–555.
25. Pikus, J. D., J. M. Studts, C. Achim, K. E. Kauffmann, E. Munck, R. J. Steffan, K. McClay, and B. G. Fox. 1996. Recombinant toluene-4-monooxygenase: catalytic and Mossbauer studies of the purified diiron and rieske components of a four-protein complex. *Biochemistry* **35**:9106–9119.
26. Pikus, J. D., J. M. Studts, K. McClay, R. J. Steffan, and B. G. Fox. 1997. Changes in the regioselectivity of aromatic hydroxylation produced by active site engineering in the diiron toluene 4-monooxygenase. *Biochemistry* **36**: 9283–9289.
27. Powlowski, J., and V. Shingler. 1990. In vitro analysis of polypeptide requirements of multicomponent phenol hydroxylase from *Pseudomonas* sp. strain CF600. *J. Bacteriol.* **172**:6834–6840.
28. Rosenzweig, A. C., C. A. Frederick, S. J. Lippard, and P. Nordlund. 1993. Crystal structure of a bacterial non-heme iron hydroxylase that catalyses the biological oxidation of methane. *Nature* **366**:537–543.
29. Ryoo, D., H. Shim, K. Canada, P. Barbieri, and T. K. Wood. 2000. Aerobic degradation of tetrachloroethylene by toluene-*o*-xylene monooxygenase of *Pseudomonas stutzeri* OX1. *Nat. Biotechnol.* **18**:775–778.
30. Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
31. Scognamiglio, R., E. Notomista, P. Barbieri, P. Pucci, F. Dal Piaz, A. Tramontano, and A. Di Donato. 2001. Conformational analysis of putative regulatory subunit D of the toluene/*o*-xylene-monooxygenase complex from *Pseudomonas stutzeri* OX1. *Protein Sci.* **10**:482–490.
32. Shaw, J. P., and S. Harayama. 1992. Purification and characterisation of the NADH:acceptor reductase component of xylene monooxygenase encoded by the TOL plasmid pWW0 of *Pseudomonas putida* mt-2. *Eur. J. Biochem.* **209**:51–61.
33. Shields, M. S., S. O. Montgomery, P. J. Chapman, S. M. Cuskey, and P. H. Pritchard. 1989. Novel pathway of toluene catabolism in the trichloroethylene-degrading bacterium G4. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**:1624–1629.
34. Small, F. J., and S. A. Ensign. 1997. Alkene monooxygenase from *Xanthobacter strain* Py2. Purification and characterization of a four-component system central to the bacterial metabolism of aliphatic alkenes. *J. Biol. Chem.* **272**:24913–24920.
35. Wallar, B. J., and J. D. Lipscomb. 2001. Methane monooxygenase component b mutants alter the kinetics of steps throughout the catalytic cycle. *Biochemistry* **40**:2220–2233.
36. Whited, G. M., and D. T. Gibson. 1991. Toluene-4-monooxygenase, a three-component enzyme system that catalyzes the oxidation of toluene to *p*-cresol in *Pseudomonas mendocina* KR1. *J. Bacteriol.* **173**:3010–3016.
37. Yen, K. M., M. R. Karl, L. M. Blatt, M. J. Simon, R. B. Winter, P. R. Fausset, H. S. Lu, A. A. Harcourt, and K. K. Chen. 1991. Cloning and characterization of a *Pseudomonas mendocina* KR1 gene cluster encoding toluene-4-monooxygenase. *J. Bacteriol.* **173**:5315–5327.
38. Zhou, N. Y., A. Jenkins, C. K. Chan Kwo Chion, and D. J. Leak. 1998. The alkene monooxygenase from *Xanthobacter* Py2 is a binuclear non-haem iron protein closely related to toluene 4-monooxygenase. *FEBS Lett.* **430**:181–185.

Regiospecificity of Two Multicomponent Monooxygenases from *Pseudomonas stutzeri* OX1: Molecular Basis for Catabolic Adaptation of This Microorganism to Methylated Aromatic Compounds

Valeria Cafaro,[†] Eugenio Notomista,[†] Paola Capasso, and Alberto Di Donato*

Dipartimento di Biologia Strutturale e Funzionale, Università di Napoli Federico II, Complesso Universitario di Monte S. Angelo, Via Cinthia, 80126 Napoli, and CEINGE-Biotecnologie Avanzate S.c.ar.l., Napoli, Italy

Received 7 October 2004/Accepted 25 February 2005

The pathways for degradation of aromatic hydrocarbons are constantly modified by a variety of genetic mechanisms. Genetic studies carried out with *Pseudomonas stutzeri* OX1 suggested that the *tou* operon coding for toluene *o*-xylene monooxygenase (ToMO) was recently recruited into a preexisting pathway that already possessed the *ph* operon coding for phenol hydroxylase (PH). This apparently resulted in a redundancy of enzymatic activities, because both enzymes are able to hydroxylate (methyl)benzenes to (methyl)catechols via the intermediate production of (methyl)phenols. We investigated the kinetics and regioselectivity of toluene and *o*-xylene oxidation using *Escherichia coli* cells expressing ToMO and PH complexes. Our data indicate that in the recombinant system the enzymes act sequentially and that their catalytic efficiency and regioselectivity optimize the degradation of toluene and *o*-xylene, both of which are growth substrates. The main product of toluene oxidation by ToMO is *p*-cresol, the best substrate for PH, which catalyzes its transformation to 4-methylcatechol. The sequential action of the two enzymes on *o*-xylene leads, via the intermediate 3,4-dimethylphenol, to the exclusive production of 3,4-dimethylcatechol, the only dimethylcatechol isomer that can serve as a carbon and energy source after further metabolic processing. Moreover, our data strongly support a metabolic explanation for the acquisition of the ToMO operon by *P. stutzeri* OX1. It is possible that using the two enzymes in a concerted fashion confers on the strain a selective advantage based on the ability of the microorganism to optimize the efficiency of the use of nonhydroxylated aromatic hydrocarbons, such as benzene, toluene, and *o*-xylene.

Several bacterial strains use specific hydrocarbon substrates as their primary sources of carbon and energy, and the number of such strains is continuously increasing (13, 28, 30, 34). The wide range of substrates that can be transformed by these microorganisms make them a powerful tool for the bioremediation of environmentally harmful substances. Degradation of aromatic hydrocarbons by aerobic bacteria is generally carried out through catabolic routes usually divided into an upper pathway, which produces dihydroxylated aromatic intermediates by the action of monooxygenases, and a lower pathway, which transforms these intermediates into molecules that enter the citric acid cycle (26). Molecular elucidation of these catabolic pathways has indicated that new pathways are continually generated by a variety of genetic mechanisms, such as gene transfer, mutational drift, genetic recombination, and transposition (30, 31, 35, 37). *Pseudomonas stutzeri* OX1 is one microorganism that is capable of growth on highly toxic aromatic compounds, such as benzene, toluene, *o*-xylene, and dimethylphenols, each of which can serve as a sole source of carbon and energy (3). This strain is an interesting model system for study-

ing hydrocarbon catabolism because of its peculiar ability to transform a wide range of these molecules compared with other similar microorganisms.

In *P. stutzeri*, (methyl)benzenes are initially activated by sequential introduction of two adjacent hydroxyl groups to form (methyl)phenols and, eventually, (methyl)catechols (Fig. 1) (5). These metabolites are subsequently cleaved into 2-hydroxy-muconic semialdehyde derivatives, which, upon further processing, are transformed into citric acid cycle intermediates (1). We have recently demonstrated (8, 9) that the initial hydroxylation steps are carried out by two evolutionarily distinct bacterial multicomponent monooxygenases (BMMs), toluene *o*-xylene monooxygenase (ToMO), belonging to the family consisting of four-component aromatic/alkene monooxygenases (group 2 BMMs) (6, 9), and phenol hydroxylase (PH), belonging to the group consisting of toluene 2-monooxygenases (T2MO)/phenol hydroxylases (group 1 BMMs) (8). The ring cleavage step that allows aromatic hydrocarbons access to the lower metabolic pathway is catalyzed by a catechol 2,3-dioxygenase (C2,3O) (1).

Genetic studies carried out with *P. stutzeri* OX1 have suggested that the genes coding for ToMO were recently acquired by horizontal gene transfer and incorporated into a preexisting catabolic route (4). Thus, the acquisition of ToMO by *P. stutzeri* OX1 is an example of expansion of a catabolic pathway. The result of this expansion is an apparent redundancy in

* Corresponding author. Mailing address: Dipartimento di Biologia strutturale e funzionale, Università di Napoli Federico II, Complesso Universitario di Monte S. Angelo, Via Cinthia, 80126 Napoli, Italy. Phone: 39-081-674426. Fax: 39-081-674414. E-mail: didonato@unina.it.

[†] V.C. and E.N. contributed equally to this paper.

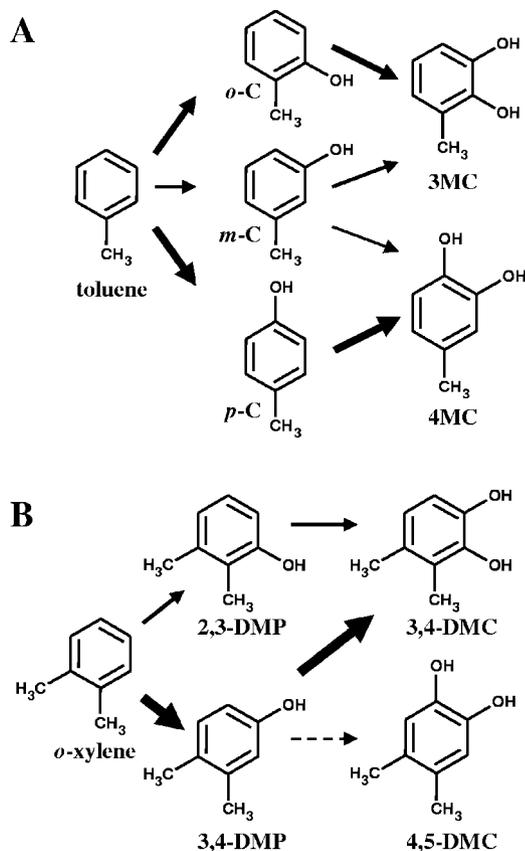


FIG. 1. Proposed pathways for the conversion of toluene to methylcatechols (A) and for the conversion of *o*-xylene to dimethylphenols (B) catalyzed by ToMO and PH mixtures. The thickness of the arrows is roughly proportional to the relative abundance of each species. *o*-C, *o*-cresol; *m*-C, *m*-cresol; *p*-C, *p*-cresol.

enzymatic activity, since ToMO and PH hydroxylate both benzene and phenol (1, 5, 8). To elucidate the metabolic significance of the coexpression of two multicomponent enzymes with very similar catalytic activities, we recently investigated the kinetics of benzene oxidation catalyzed by ToMO and PH (8). The data obtained strongly supported the hypothesis that ToMO and PH form a metabolic chain in which the depletion of phenol by PH enhances the use of benzene in *P. stutzeri*. However, this hypothesis needs to be extended to other substrates in order to establish, in general, whether the concerted use of the two different monooxygenases controls the metabolic flow of aromatic molecules that can be used by the microorganism as growth substrates which enter the lower pathway.

In the present work we investigated toluene and *o*-xylene oxidation using recombinant *Escherichia coli* cells expressing ToMO and PH complexes to collect data on how the biochemical properties of the two complexes could influence the efficiency of methylated aromatic utilization. Our results confirmed the general hypothesis that the two monooxygenases of *P. stutzeri* OX1 form a metabolic chain, thus expanding the catabolic potential of the microorganism by optimizing the degradation of benzene, toluene, and *o*-xylene.

MATERIALS AND METHODS

Materials. Bacterial culturing, plasmid purification, and transformation were performed as described by Sambrook et al. (27). *E. coli* strain JM109 was obtained from Novagen. *E. coli* strain JM101 was purchased from Boehringer. The pGEM-3Z expression vector and Wizard SV gel and PCR clean-up system for elution of DNA fragments from the agarose gel were obtained from Promega. Enzymes and other reagents used for DNA manipulation were obtained from New England Biolabs. All other chemicals were obtained from Sigma. The methods used for expression and purification of recombinant C2,3O from *P. stutzeri* OX1 are described elsewhere (33).

Expression vectors. Plasmids pBZ1260 (5) and pJSX148 (1) containing the ToMO and PH gene clusters, respectively, were kindly supplied by P. Barbieri (Dipartimento di Biologia Strutturale e Funzionale, Università dell'Insubria, Varese, Italy). Plasmid pBZ1260 containing the *tou* gene cluster cloned in the pGEM-3Z vector was used to express ToMO. For expression of PH, the DNA sequence coding for the PH complex from plasmid pJSX148 was subcloned into the vectors pGEM-3Z and pBZ1260. To do this, the DNA fragment coding for the PH cluster was excised from the pJSX148 vector using XbaI restriction endonuclease, purified by agarose gel electrophoresis, ligated with the pGEM-3Z and pBZ1260 vectors previously cut with the same enzyme, and used to transform JM101 competent cells. The resulting recombinant plasmids were designated pGEM-3Z/PH and pGEM-3Z/ToMO-PH, respectively. It should be noted that vector pGEM-3Z/ToMO-PH allows transcription of ToMO and PH open reading frames into a single mRNA under control of the *lac* promoter of the pGEM-3Z vector. Plasmids pGEM-3Z/PH and pGEM-3Z/ToMO-PH were used to express the PH complex alone and to coexpress the ToMO and PH complexes, respectively.

Whole-cell assays. The assays were performed as described previously (8) using *E. coli* JM109 cells transformed with plasmids pGEM-3Z/PH, pBZ1260, and pGEM-3Z/ToMO-PH, which expressed PH, ToMO, and PH/ToMO complexes, respectively. The recombinant strains were routinely grown in Luria-Bertani medium (27) supplemented with 50 μ g/ml ampicillin at 37°C to an optical density at 600 nm (OD_{600}) of ~ 0.5 . Expression of the recombinant protein was induced with 0.4 mM isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside at 37°C in the presence of 100 μ M $Fe(NH_4)_2(SO_4)_2$. One hour after induction, cells were collected by centrifugation and suspended in M9 minimal medium containing 0.4% glucose. The enzymatic activity of cells was measured with phenol as the substrate by monitoring the production of catechol in continuous coupled assays with recombinant C2,3O from *P. stutzeri* OX1, as described previously (8). The specific activities of the cells ranged from 10 to 14 mU/ OD_{600} for cells expressing PH and from 14 to 16 mU/ OD_{600} for cells expressing ToMO. One milliunit was defined as the amount of catalyst that oxidized 1 nmol of phenol per min at 25°C.

Determination of apparent kinetic parameters. All the kinetic parameters were determined using whole cells. The apparent kinetic parameters for phenol, *o*-, *m*-, and *p*-cresol, and 2,3-dimethylphenol (2,3-DMP) hydroxylation were determined by a continuous colorimetric assay coupled with C2,3O as described elsewhere (8). Induced cells were used at a concentration of 0.25 to 0.5 mU/ml. Substrates were added from stock solutions in water at a maximum concentration of 1 mM. The amounts of semialdehyde produced from catechol, 3-methylcatechol (3-MC), 4-MC, and 3,4-dimethylcatechol (3,4-DMC) were determined by measuring the increase in absorbance at 375 nm ($\epsilon_{375} = 29,100 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), at 388 nm ($\epsilon_{388} = 6,100 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), at 382 nm ($\epsilon_{382} = 21,550 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), and at 324 nm ($\epsilon_{324} = 15,310 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), respectively, for the different semialdehyde products.

The apparent kinetic parameters for benzene, toluene, *o*-xylene, and 3,4-DMP were determined by a discontinuous assay with cells suspended at a concentration of 0.5 to 1 mU/ml in 500 μ l (final volume) of M9 minimal medium containing 0.4% glucose at 25°C. Reactions were started by addition to cell suspensions of different amounts of substrates (final concentration, up to 1 mM) in *N,N*-dimethylformamide. The reactions were stopped at different times by addition of 50 μ l of 1 M HCl. Samples were centrifuged at 12,000 rpm for 20 min at 4°C. The soluble fractions were stored at -20°C until further analysis by high-pressure liquid chromatography (HPLC) as described below.

Maximum rates (V_{max}) for all substrates were always normalized to the maximum rate measured for phenol in a parallel assay. This was done for each sample of induced cells, and the experiment was repeated for each substrate with at least three independent samples of cells. For each sample of induced cells, the levels of expression of ToMO or PH were measured as described below and used to calculate the apparent k_{cat} for phenol. The amounts of ToMO and PH complexes were determined by densitometric scanning of Coomassie blue-stained sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels (22) containing cell extracts. Five different amounts of samples of lysed cells were run on a single gel together

with five different amounts of purified monooxygenases used as standards. ToMO and PH were expressed at similar levels.

Apparent k_{cat} values for each substrate were calculated by determining the products of the apparent k_{cat} for phenol and the individual substrate $V_{\text{max}}/\text{phenol}$ V_{max} ratios determined as described above. Relative errors for the apparent k_{cat} values were calculated by adding the relative error for the apparent k_{cat} for phenol and the relative errors for the substrate $V_{\text{max}}/\text{phenol}$ V_{max} ratios.

Apparent kinetic parameters were calculated with the program GraphPad Prism (GraphPad Software).

Identification of products. Reaction products were identified with a HPLC system equipped with a Waters 1525 binary pump coupled to a Waters 2996 photodiode array detector. Mono- and dihydroxylated products were separated using an Ultrasphere C₁₈ reverse-phase column (4.6 by 250 mm; pore size, 80 Å), and the absorbance of the eluate at 274 nm was monitored. Separation was carried out at a flow rate of 1 ml/min by using a two-solvent system comprising a 0.1% formic acid solution in water (solvent A) and a 0.1% formic acid solution in methanol (solvent B). Phenol and catechol were separated using 12 min of isocratic elution with 10% of solvent B, followed elution with a linear 10 to 30% solvent B gradient in 10 min and an isocratic 30% solvent B step. The retention times of phenol and catechol were 25.2 and 14 min, respectively. 2,3-DMP, 3,4-DMP, 3,4-DMC, and 4,5-DMC were separated by isocratic elution with 40% solvent B; the retention times for these compounds were 26.7, 24.4, 14, and 11.4 min, respectively.

Oxidation products obtained from toluene were separated using a two-solvent system comprising a 0.1% formic acid solution in water (solvent A) and a 0.1% formic acid solution in acetonitrile (solvent B). 4-Methylcatechol, 3-methylcatechol, and *m*-, *p*-, and *o*-cresols were separated using 5 min of isocratic elution with 15% solvent B, followed by elution with a linear 15 to 25% solvent B gradient in 5 min and then an isocratic 25% solvent B step. Under these conditions *m*- and *p*-cresols were not separated, and they eluted in a single peak at 22 min. The retention times of 4-methylcatechol, 3-methylcatechol, and *o*-cresol were 13.1, 14.1, and 23.3 min, respectively. The products were identified by comparing their HPLC retention times and UV-visible spectra with those of standard solutions. The amount of each product was determined by comparing the area of the peak with the areas obtained using known concentrations of standards.

The regiospecificity of toluene hydroxylation was determined by HPLC using an acetylated Cyclobond I 2000 column (Advanced Separation Technologies Inc.) and monitoring the absorbance of the eluate at 274 nm. The acetylated β -cyclodextrin-silica column allowed separation of the three cresol isomers without extraction, which is required by the usual gas chromatography analysis (23, 32). Separation was carried out at a flow rate of 1 ml/min using a two-solvent system comprising 20 mM ammonium acetate in water (pH 5.0) (solvent A) and methanol (solvent B). *o*-, *m*- and *p*-cresols were separated using 5 min of isocratic elution with 20% solvent B, followed by elution with a linear gradient from 20 to 60% solvent B in 20 min. The retention times of *o*-, *m*-, and *p*-cresols were 12.8, 14.5, and 15.2 min, respectively.

Time course of toluene and *o*-xylene oxidation. The rate of product formation by *E. coli* cells expressing PH, ToMO, or a mixture of the two proteins was measured by the HPLC discontinuous assay. Each assay mixture contained either 30 μ M toluene or 20 μ M *o*-xylene. All cells were used at a concentration of 1 mU/ml when toluene was used as substrate and at a concentration of 1.5 mU/ml when *o*-xylene was used.

Rate of (di)methylcatechol production as a function of ToMO concentration. The rate of 3- and 4-MC production from toluene was measured as a function of the ToMO concentration at ToMO concentrations ranging from 0.29 to 2.32 mU/ml with a constant concentration of cells expressing PH (0.29 mU/ml) in the presence of 30 μ M toluene. The reactions in aliquots (500 μ l) were stopped at 5, 10, and 15 min by adding 50 μ l of 1 M HCl, and the products were analyzed by the HPLC system as described above.

The rate of 3,4-DMC production from 40 μ M *o*-xylene was measured as a function of the ToMO concentration at ToMO concentrations ranging from 0.3 to 6 mU/ml with a constant concentration of cells expressing PH (range, 0.36 to 1 mU/ml). 3,4-DMC was measured by the continuous coupled assay with C2,3O (3 U/ml). Experimental data were fitted to the following equation: rate = $(V_{\text{max}} \times [\text{ToMO}]) / (K + [\text{ToMO}])$ where V_{max} is the maximum rate and K is a constant corresponding to the ToMO concentration which gives a rate of $V_{\text{max}}/2$.

The rate of 3,4-DMC production from 40 μ M *o*-xylene was also measured by using *E. coli* cells harboring vector pGEM-3Z/ToMO-PH. The cell concentration corresponded to 1.17 mU/ml of ToMO and 0.5 mU/ml of PH. An assay with phenol was used to determine the total monooxygenase activity of cells. The enzymatic activity of ToMO was measured by assaying the conversion of 3,4-DMP to 4,5-DMC because this product is exclusively formed by ToMO (see

TABLE 1. Regioselectivity of PH and ToMO with toluene, *m*-cresol, *o*-xylene, and 3,4-DMP

Substrate	Product	% with ^a :	
		PH	ToMO
Toluene	<i>o</i> -Cresol	70	36
	<i>m</i> -Cresol	7	19
	<i>p</i> -Cresol	23	45
<i>o</i> -Xylene	2,3-DMP	80	20
	3,4-DMP	20	80
<i>m</i> -Cresol	3-MC	96	5
	4-MC	4	95
3,4-DMC	3,4-DMC	99	10
	4,5-DMC	1	90

^a The error was ~1%.

below and Fig. 1). The activity of PH was calculated by determining the difference between the total activity and the ToMO activity.

RESULTS

Regioselectivity of ToMO and PH with toluene. It has been demonstrated previously that ToMO is able to hydroxylate toluene, forming a mixture of *o*-, *m*-, and *p*-cresols (4–6). In addition, both ToMO and PH are able to further hydroxylate the three cresol isomers to catechols (Fig. 1A) (1). Data for the relative amounts of products are available only for the hydroxylation of toluene by ToMO (32).

The relative abundance of each isomer was determined by incubating *E. coli* cells expressing ToMO or PH with toluene or the three cresol isomers at concentrations ranging from 0.1 to 1 mM as described in Materials and Methods. The data in Table 1 indicate that *p*-cresol and *o*-cresol are the main products of toluene oxidation by ToMO and that there is slightly more of the *para* isomer. The hydroxylation of toluene by PH-expressing cells also resulted in a mixture of products, but in this case the *ortho* isomer accounted for about two-thirds of the cresol produced. Both enzymes were found to add the second hydroxyl group *ortho* to the hydroxyl group already present on the aromatic ring, thus producing only 3-MC from *o*-cresol and only 4-MC from *p*-cresol (data not shown). The oxidation of *m*-cresol catalyzed by ToMO produced almost exclusively 4-MC, whereas PH produced predominantly 3-MC (Table 1).

Kinetic parameters of ToMO and PH with toluene. The kinetic parameters of ToMO and PH activities with toluene and cresols, as determined by whole-cell assays, are shown in Table 2. The specificity constants of ToMO for benzene and toluene are at least 1 order of magnitude higher than those measured for the same substrates when PH was used. In contrast, when hydroxylated substrates were used, the specificity constants for ToMO with phenols were found to be 2 to 30 times lower than those measured for PH.

We also determined by using HPLC the production of cresols and methylcatechols from toluene as a function of time (Fig. 2). When *E. coli* cells expressing ToMO were incubated with 30 μ M toluene, a concentration 7.5-fold higher than the ToMO K_m value, cresols were produced at a linear rate, whereas methylcatechols were not detected for 30 min. Production of methylcatechols started only after about 60 to 70%

TABLE 2. Apparent kinetic constants of PH and ToMO

Substrate	PH			ToMO		
	k_{cat} (s^{-1}) ^a	K_m (μM) ^b	k_{cat}/K_m ($\text{s}^{-1} \mu\text{M}^{-1}$)	k_{cat} (s^{-1}) ^a	K_m (μM) ^b	k_{cat}/K_m ($\text{s}^{-1} \mu\text{M}^{-1}$)
Phenol	1.02	0.6	1.69	1	2.18	0.46
<i>p</i> -Cresol	0.77	0.6	1.29	0.63	13.26	0.047
<i>o</i> -Cresol	0.946	3.13	0.3	0.9	6.0	0.15
<i>m</i> -Cresol	0.609	1.8	0.34	0.44	9.38	0.047
2,3-DMP	0.9425	33.87	0.028	0.2	25.7	0.008
3,4-DMP	0.771	3.37	0.228	0.38	7.7	0.049
Benzene	0.092	25	0.004	0.36	0.2	1.81
Toluene	0.148	22	0.007	0.42	3.93	0.11
<i>o</i> -Xylene	0.125	32.5	0.004	0.25	3.73	0.067

^a The errors for k_{cat} values were about 26%. The errors for the k_{cat} values for phenol were about 20%.

^b The errors for K_m values were less than 10%. The error for the K_m of ToMO for benzene was about 25%.

of the toluene had been converted to cresols (Fig. 2A). When *E. coli* cells expressing PH were incubated with 30 μM toluene (Fig. 2B), a short lag period for production of catechols was observed. Moreover, toluene transformation by PH was not very efficient since only 25% of the toluene was converted into methylcatechols after 90 min. Most likely, this depended on the limited amount of cresols produced, which reached a constant, low value after 20 min of incubation. When a mixture of *E. coli* cells expressing PH and ToMO was incubated with 30 μM toluene, no lag phase for production of methylcatechols was observed, and the formation rates, as determined by the slopes

of the plots shown in Fig. 2C, were fivefold higher than those recorded with cells expressing PH alone (Fig. 2B). The concentrations of cresols quickly reached constant, low values, and toluene was completely converted into 55% 3-MC and 45% 4-MC after 50 min. These percentages are very different from those obtained with cells expressing ToMO alone (62% 4-MC and 38% 3-MC) (Fig. 2A) or cells expressing PH alone (17% 4-MC and 83% 3-MC) (Fig. 2B). Interestingly, the values measured under these conditions are the values expected based on the hypothesis that ToMO catalyzes the first hydroxylation reaction and PH catalyzes the second hydroxylation reaction. In fact, according to the reaction scheme in Fig. 1A, after complete conversion of cresols to methylcatechols, the expected percentage of 3-MC based on the total amount of methylcatechols (3-MC%) is given by the following equation: $3\text{-MC}\% = o\text{-C}\% + f \times m\text{-C}\%$, where $o\text{-C}\%$ and $m\text{-C}\%$ are the percentages of *o*- and *m*-cresols, respectively, produced by the enzyme that catalyzes the first hydroxylation step and f is the fraction of *m*-cresol converted to 3-MC by the enzyme that catalyzes the second hydroxylation reaction. If ToMO is the catalyst of the first reaction, then the $o\text{-C}\%$ and $m\text{-C}\%$ values are 36 and 19%, respectively (Table 1). Assuming that PH catalyzes the second reaction, the f value is 0.96 (Table 1). Substituting these values in the equation above, 3-MC% is 54.24%, a value which is identical, within the experimental error, to the experimentally measured value.

In order to investigate the effects of the relative amounts of ToMO- and PH-expressing cells, the initial rates of methylcatechol production were monitored by incubating toluene with different amounts of cells expressing ToMO (0.29 to 2.3 mU/ml) and/or a constant amount of cells expressing PH (0.29 mU/ml). Under these conditions, methylcatechols were produced at a rate that increased with a hyperbolic dependence on the concentration of ToMO-expressing cells (Fig. 3). Under the same experimental conditions, ToMO-expressing cells alone did not form a significant amount of methylcatechol from toluene at the concentrations tested, whereas only small amounts of methylcatechol were produced by cells expressing PH alone (data not shown).

Regioselectivity of ToMO and PH with *o*-xylene. The relative abundance of dimethylphenol and dimethylcatechol isomers was determined by incubating *E. coli* cells expressing ToMO (1 mU/ml) or PH (1 mU/ml) with *o*-xylene, 2,3-DMP, or 3,4-DMP at concentrations ranging from 0.25 to 1 mM. The results

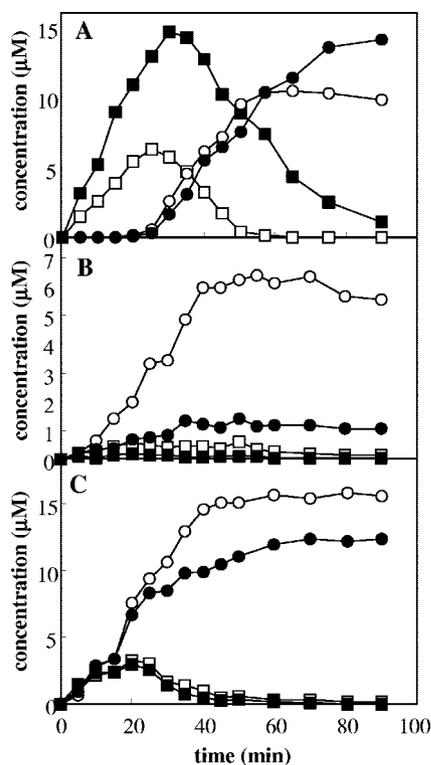


FIG. 2. Kinetics of production of *o*-cresol (□), *m*- and *p*-cresols (■), 3-methylcatechol (○), and 4-methylcatechol (●) by cells expressing ToMO at a concentration of 1 mU/ml (A), cells expressing PH at a concentration of 1 mU/ml (B), and a mixture of cells expressing ToMO (1 mU/ml) and cells expressing PH (1 mU/ml) (C) incubated with 30 μM toluene.

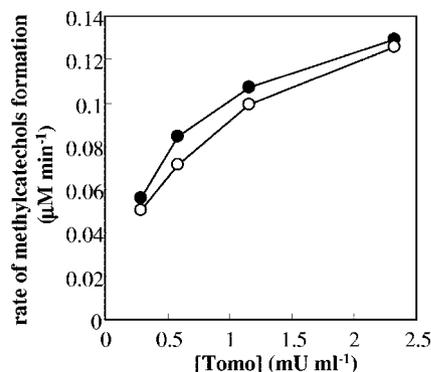


FIG. 3. Rates of formation of 3-MC (●) and 4-MC (○) by mixtures of cells expressing PH (0.29 mU/ml) and cells expressing ToMO (0.29 to 2.3 mU/ml) incubated with 30 μ M toluene. The concentrations of 3-MC and 4-MC were measured by HPLC as described in Materials and Methods.

(Table 1) indicate that the two monooxygenases are able to catalyze both hydroxylation steps, but with very different regioselectivities. ToMO produces 20% 2,3-DMP and 80% 3,4-DMP from *o*-xylene, whereas PH produces 80% 2,3-DMP and 20% 3,4-DMP (Fig. 1B). The different regioselectivities of the two enzymes are even more evident in the second hydroxylation step. The hydroxylation of 3,4-DMP by ToMO yields a mixture of 3,4-DMC (10%) and 4,5-DMC (90%) (Table 1 and Fig. 1B), whereas the same substrate is transformed exclusively into 3,4-DMC by PH. 2,3-DMP is converted solely to 3,4-DMC by both enzymes.

Kinetic parameters of ToMO and PH with *o*-xylene. The kinetic parameters of ToMO and PH with *o*-xylene for the first and second reaction steps were determined by whole-cell assays and are shown in Table 2. ToMO had a specificity constant for *o*-xylene that was 17 times higher than that of PH, whereas PH was about four times more active than ToMO with both 2,3-DMP and 3,4-DMP. In the second hydroxylation step both monooxygenases exhibited k_{cat}/K_m values for 3,4-DMP that were about 10 times higher than those measured for 2,3-DMP.

We also determined by HPLC the production of dimethylphenols and dimethylcatechols as a function of time (Fig. 4). When *E. coli* cells expressing ToMO (1.5 mU/ml) were incubated with 20 μ M *o*-xylene, dimethylphenols were produced at a linear rate, whereas dimethylcatechols were detected only after about 15 min (Fig. 4A). In contrast, when *E. coli* cells expressing PH (1.5 mU/ml) were incubated with 20 μ M *o*-xylene, only 2,3-DMP and 3,4-DMC were detected (Fig. 4B). The concentration of 2,3-DMP reached a low but constant value after about 30 min, whereas no 3,4-DMP was detected. 3,4-DMC accumulated at a low but constant rate after a short lag period (about 5 min). No 4,5-DMC was detected. When a mixture of *E. coli* cells expressing PH and ToMO (both at a concentration of 1.5 mU/ml) was incubated with 20 μ M *o*-xylene, only 2,3-DMP and 3,4-DMC were detected (Fig. 4C), as was the case for cells expressing only PH, but 3,4-DMC was produced at a rate that was about 13 times higher.

The interplay between the ToMO and PH complexes in *o*-xylene oxidation was investigated further by incubating different amounts of cells expressing ToMO (0.3 to 6 mU/ml) and a constant amount of cells expressing PH (0.36 mU/ml) with 40

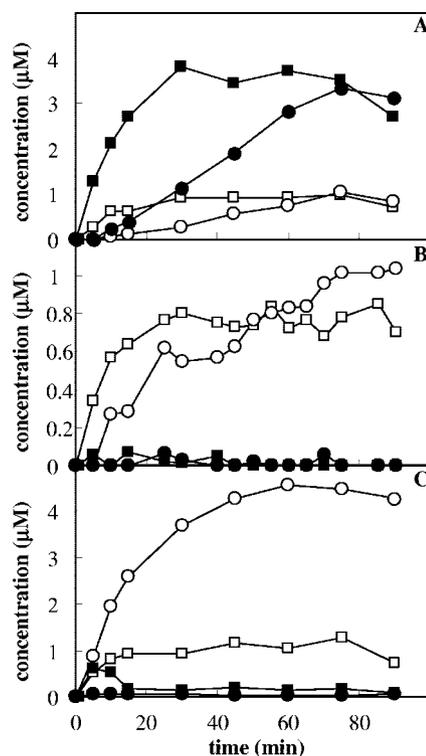


FIG. 4. Kinetics of production of 2,3-DMP (□), 3,4-DMP (■), 3,4-DMC (○), and 4,5-DMC (●) by cells expressing ToMO at a concentration of 1.5 mU/ml (A), cells expressing PH at a concentration of 1.5 mU/ml (B), and a mixture of cells expressing ToMO (1.5 mU/ml) and cells expressing PH (1.5 mU/ml) (C).

μ M *o*-xylene and measuring the rate of 3,4-DMC formation by a coupled assay with C2,3O. The assay was repeated at PH concentrations up to 1 mU/ml. Cells expressing ToMO or PH alone at the concentrations indicated above did not form significant quantities of 3,4-DMC (data not shown). When a mixture of the two types of recombinant cells was used, however, 3,4-DMC was produced at a rate that was proportional to the concentration of ToMO (Fig. 5). When the rate of 3,4-DMC formation at a constant PH concentration was plotted as a function of the ToMO concentration, a hyperbolic function was obtained (Fig. 5). Moreover, when constant amounts of ToMO were used, the rate of 3,4-DMC formation was found to be directly proportional to the PH concentration (Fig. 5, inset).

In order to verify that the expression of ToMO and PH in different cells could influence the degradation of *o*-xylene carried out under the experimental conditions described above, *o*-xylene oxidation was also studied using *E. coli* cells coexpressing the two complexes. The clone *E. coli* JM109/pGEM-3Z/ToMO-PH was found to express ToMO and PH with a ratio of specific activities of 2.3:1. When 40 μ M *o*-xylene was incubated with an amount of cells corresponding to 1.17 mU/ml of ToMO and 0.5 mU/ml of PH, the rate of 3,4-DMC formation was found to be identical, within the experimental error, to the rate measured using cells expressing the two complexes separately but corresponding to the same ToMO and PH activity (Fig. 5).

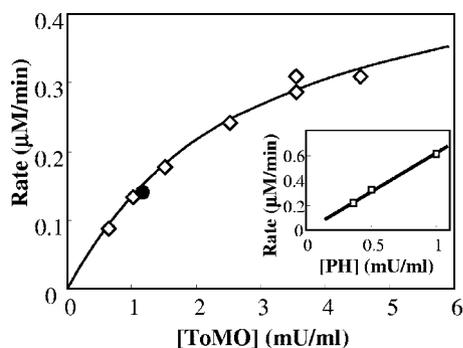


FIG. 5. Kinetics of 3,4-DMC formation. Cells expressing PH were used at constant concentration (0.5 mU/ml), and the rate of 3,4-DMC formation was measured as a function of the concentration of cells expressing ToMO (\diamond) in the presence of 40 μ M *o*-xylene. The solid circle indicates the rate of 3,4-DMC production by cells coexpressing ToMO (1.17 mU/ml) and PH (0.5 mU/ml). The rate of 3,4-DMC production was measured by the continuous coupled assay with C2,3O as described in Materials and Methods. The inset shows the rate of 3,4-DMC formation as a function of the PH concentration at a constant concentration of ToMO (4.5 mU/ml).

DISCUSSION

The throughput of a metabolic route depends upon several factors. Some of these factors are the specificity and regioselectivity of the enzymes in the pathway and their catalytic efficiencies. For degradation of aromatic molecules by *P. stutzeri* OX1, two different enzymes, ToMO and PH, catalyze the obligatory hydroxylation of the substrate (1, 5, 8). The existence of these two seemingly similar enzymes in *P. stutzeri* suggests either that they act independently with different substrates or that they comprise a metabolic chain. We have suggested previously (8) that the latter possibility is supported by recent experimental data for benzene hydroxylation by these enzymes which suggest that the different catalytic efficiencies of ToMO and PH appear to be finely tuned to optimize the use of benzene as a growth substrate. In order to establish whether the concerted use of ToMO and PH is a general control system in *P. stutzeri* for optimal use of aromatic molecules as growth substrates, the kinetic parameters and the regioselectivity of the two enzymes for the transformation of toluene and *o*-xylene were determined.

Toluene metabolism. ToMO and PH are able to hydroxylate both toluene and cresols, confirming that the conversion of toluene into methylcatechol is a two-step process that requires cresol intermediates (Fig. 1A) (1). This is also true for the conversion of benzene to catechol by these enzymes (8, 9). The regioselectivities of ToMO and PH, however, are different. Cresols are produced by ToMO with a relaxed regioselectivity, preferentially yielding the *ortho* and *para* isomers. Such an unusual relaxed regioselectivity has been reported previously only for benzene monooxygenase from *Pseudomonas aeruginosa* JI104 (19), whereas most of the other characterized monooxygenases belonging to the family of four-component aromatic/alkene monooxygenases exhibit more restricted regioselectivity (15–17, 24, 34).

PH, which belongs to the large family of three-component T2MO/PHs (8), yields the three cresol isomers, but there is a preference for the *ortho* isomer, which accounts for 70% of the

product. Thus, PH is more restricted in its regioselectivity than ToMO, but it is more relaxed than other group 1 BMMs, like T2MO, which produce only *o*-cresol (16, 17, 24).

It should also be noted that PH and ToMO still have opposite regioselectivities when they act on a hydroxylated substrate. For example, 4-MC is the major product of ToMO reactivity with *m*-cresol, whereas 3-MC is the predominant product of PH catalysis with the same substrate.

The catalytic constants of the two monooxygenases provide insight into their substrate specificities (Table 2). The specificity constant of ToMO for toluene is about 16-fold lower than that for benzene. This considerable difference is essentially due to the K_m with toluene, which is about 20-fold higher than that with benzene, whereas the k_{cat} values are very similar for these two substrates. Thus, ToMO is a more efficient catalyst for benzene oxidation. The K_m of ToMO with toluene is very similar to that of toluene 4-monooxygenase (T4MO) (23); however, its k_{cat} and k_{cat}/K_m values are sevenfold lower. These data imply that T4MO is a better catalyst for toluene transformation than ToMO. On the other hand, a different picture emerges when the data for benzene transformation are compared. T4MO has a specificity constant for benzene (25) that is lower than that previously reported for ToMO for the same substrate (8). Thus, benzene is an optimal substrate for ToMO, whereas toluene is transformed better by T4MO. This conclusion agrees with the metabolic features of *Pseudomonas mendocina* KR1 and *P. stutzeri* OX1. *P. mendocina* KR1 is highly specialized for growth on toluene (34), while *P. stutzeri* OX1, which is more versatile, can grow efficiently on both benzene and toluene (3, 5; P. Barbieri, personal communication).

When the values of the kinetic constants of PH with toluene are compared to those measured with benzene, a different picture emerges than the picture obtained for ToMO. All the kinetic constants for PH are very similar for both substrates (Table 2), suggesting that PH does not discriminate between benzene and toluene. Moreover, the specificity constant for toluene is 16-fold lower than that of ToMO, and this indicates that PH is a less efficient catalyst than ToMO with both of these hydrophobic substrates.

The specificity constants of ToMO for *p*- and *m*-cresols are identical to each other and are threefold lower than that for toluene, whereas the specificity constant for *o*-cresol is very similar to that for toluene. Since *o*-cresol accounts for only 36% of the products of the first hydroxylation reaction, we concluded that ToMO has a higher catalytic efficiency in the first step of toluene hydroxylation than in the second step, even if the difference is less pronounced than that observed in the case of benzene hydroxylation (Table 2). On the other hand, the specificity constants of PH for *o*- and *m*-cresols are similar and are about 4–5 fold higher than those for toluene. The k_{cat}/K_m value with *p*-cresol is about 190 times higher than that with toluene and is very similar to that with phenol. Therefore, PH shows greater catalytic efficiency in the second step of hydroxylation, and *p*-cresol and phenol are the preferred substrates. Taken together, these results suggest that in *P. stutzeri* ToMO could act as a toluene-oxidizing enzyme and PH could act as a cresol-oxidizing enzyme. The time-dependent conversion of toluene to methylcatechol reinforces this hypothesis (Fig. 2) because in the recombinant system that we used the combination of the two monooxygenases converted toluene to

methylcatechol much more efficiently than ToMO or PH alone. Moreover, the percentages of 3- and 4-MC that we measured are almost identical to the values that can be calculated by assuming that ToMO catalyzes the first hydroxylation step and PH catalyzes the second hydroxylation step (see above).

***o*-Xylene metabolism.** A large number of bacteria are able to use *m*- and *p*-xylenes as growth substrates (2, 10, 20, 21, 36), but few of these bacteria are known to grow on *o*-xylene; the bacteria that can grow on *o*-xylene include *P. stutzeri* OX1 (1, 3, 5), *Corynebacterium* sp. strain C125 (29), and some *Rhodococcus* strains (7, 11, 18). Catabolism of *m*- and *p*-xylenes usually occurs through the progressive oxidation of a methyl group (2, 10), whereas *o*-xylene catabolism occurs by direct hydroxylation of the aromatic ring (12, 14), as is the case in *P. stutzeri* (1, 5).

o-Xylene hydroxylation by ToMO and PH produces 3,4- and 4,5-DMC via the intermediate formation of 2,3- and 3,4-DMP (Fig. 1B). Only 3,4-DMP, however, can be oxidized by C2,3O, the enzyme that opens the gate to the lower pathway. 4,5-DMC is not a substrate for this enzyme (1) and is therefore a dead-end product of *o*-xylene metabolism that results in the loss of carbon atoms from the growth substrate and in the useless depletion of NADH used by ToMO and PH in the hydroxylation reactions.

Several studies have shown that only 2,3-DMP and 3,4-DMC can be detected in the culture medium of *o*-xylene-oxidizing bacteria (7, 11, 18, 29), including *P. stutzeri* (3), for which monooxygenase-mediated *o*-xylene catabolism has been reported. Thus, the absence of other dimethylphenol or dimethylcatechol isomers suggests that a restricted regioselectivity of the monooxygenases acting on *o*-xylene would channel this substrate to the exclusive formation of 2,3-DMP in the first hydroxylation step and to 3,4-DMC in the second hydroxylation step (7, 11, 18, 29).

The data that we have collected indicate that both ToMO and PH alone are able to transform *o*-xylene into dimethylcatechols through a two-step process (Table 2), in which dimethylphenol intermediates are further hydroxylated to dimethylcatechols (Fig. 1A) (4). However the regioselectivities of the two enzymes are different in both reaction steps. ToMO converts *o*-xylene predominantly to 3,4-DMP, whereas PH produces predominantly 2,3-DMP (Table 1). Both monooxygenases convert 2,3-DMP to 3,4-DMC, but they exhibit different regioselectivities with 3,4-DMP. ToMO oxidizes 3,4-DMP mainly to 4,5-DMC, which cannot be further metabolized (5). PH converts 3,4-DMP exclusively to 3,4-DMC. Thus, our data indicate that only PH can produce a dimethylcatechol which can be further metabolized through the lower pathway.

The catalytic constants of the two enzymes reported in Table 2 clearly indicate that ToMO is a more efficient catalyst than PH in the first hydroxylation step and has a 17.7-fold-higher specificity constant. On the other hand, PH is more efficient than ToMO in the second hydroxylation step and has specificity constants for 2,3- and 3,4-DMP that are about three- and fourfold higher, respectively, than those determined for ToMO. Our kinetic data indicate that 3,4-DMP is transformed into products more efficiently than 2,3-DMP, especially by PH, which has a k_{cat}/K_m that is fivefold higher than that of ToMO. The regioselectivity and the kinetic constants of ToMO are in

agreement with the finding that when *E. coli* cells expressing ToMO are incubated with *o*-xylene, only 4,5-DMC is produced after a long lag phase (Fig. 4A). On the other hand, *E. coli* cells expressing PH produce 3,4-DMC, but at a very low rate, likely because of the poor conversion of *o*-xylene to dimethylphenol in the first step (Fig. 4B).

A mixture of *E. coli* cells expressing PH and ToMO produced only 2,3-DMP and 3,4-DMC (Fig. 4C). However, in this case, no lag phase was observed in the production of 3,4-DMC, and the rate of 3,4-DMC formation was 13-fold greater than the rate recorded with cells expressing PH alone. 2,3-DMP, on the other hand, was produced at a low and constant level (Fig. 4C). The fact that 4,5-DMC was not detected in this mixture is consistent with the conclusion that the second hydroxylation step is performed by PH. 2,3-DMP accumulated in these reactions because it is not a good substrate either for PH or for ToMO, whereas 3,4-DMP was not detected likely because it is the preferred substrate for PH.

The rate of 3,4-DMC formation catalyzed by mixtures of different amounts of cells expressing ToMO and a constant amount of cells expressing PH was found to be proportional to the concentration of ToMO (Fig. 5), and there was a hyperbolic dependence on the ToMO concentration. According to the conclusion described above that ToMO catalyzes the first step of the reaction by producing dimethylphenols, which in turn are hydroxylated to 3,4-DMC by PH, low concentrations of ToMO would be limiting for the system; hence, the rate of 3,4-DMC formation would increase when the ToMO concentration increased. On the other hand, higher ToMO concentrations would provide PH with a saturating amount of DMP isomers. Under these conditions, the PH concentration would be the rate-limiting factor for production of 3,4-DMC, whose rate of formation should be independent of the ToMO concentration. This behavior is exactly what was experimentally observed (Fig. 5). Moreover, when ToMO was used at a constant concentration, the maximum rate of 3,4-dimethylcatechol formation increased linearly with increasing PH concentrations (Fig. 5, inset).

The rate of 3,4-DMC formation was also measured using *E. coli* cells coexpressing ToMO and PH and was found to be almost identical to the rate measured using the same amounts of ToMO and PH expressed in different cells (Fig. 5). Therefore, the presence of ToMO and PH in different cellular compartments does not influence either the percentages of the products of the conversion of *o*-xylene to dimethylcatechols or their rate of formation.

In conclusion, the data for the oxidation of toluene and *o*-xylene, together with the data reported previously for the transformation of benzene (8), strongly support a general hypothesis concerning the metabolism of aromatic compounds in *P. stutzeri* OX1. ToMO and PH act sequentially and allow efficient conversion of nonhydroxylated aromatic hydrocarbons to substituted catechols. Moreover, this coupling is particularly important in the case of *o*-xylene degradation because the sequential action leads to production of 3,4-DMC, the sole dimethylcatechol that can enter the lower pathway and lead to the production of precursors for biosynthetic reactions. This hypothesis also provides a metabolic explanation for the acquisition of the ToMO operon by *P. stutzeri* OX1 (4). The use of the two enzymes in a concerted fashion confers on the strain

a selective advantage based on the ability to maximize the efficiency of exploitation of nonhydroxylated aromatic hydrocarbons, such as benzene, toluene, and *o*-xylene.

ACKNOWLEDGMENTS

We are indebted to Giuseppe D'Alessio, Department of Structural and Functional Biology, University of Naples Federico II, and to Gennaro Marino, Department of Organic Chemistry and Biochemistry, University of Naples Federico II, for critically reading the manuscript.

This work was supported by grants PRIN/2000 and PRIN/2002 from the Ministry of University and Research.

REFERENCES

1. Arengi, F. L., D. Berlanda, E. Galli, G. Sello, and P. Barbieri. 2001. Organization and regulation of meta cleavage pathway gene for toluene and *o*-xylene derivative degradation in *Pseudomonas stutzeri* OX1. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**:3304–3308.
2. Assinder, S. J., and P. A. Williams. 1990. The TOL plasmids: determinants of the catabolism of toluene and xylenes. *Adv. Microb. Physiol.* **31**:1–69.
3. Baggi, G., P. Barbieri, E. Galli, and S. Tollari. 1987. Isolation of a *Pseudomonas stutzeri* strain that degrades *o*-xylene. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**: 2129–2131.
4. Barbieri, P., F. L. Arengi, G. Bertoni, F. Bolognese, and E. Galli. 2001. Evolution of catabolic pathways and metabolic versatility in *Pseudomonas stutzeri* OX1. *Antonie Leeuwenhoek* **79**:135–140.
5. Bertoni, G., F. Bolognesi, E. Galli, and P. Barbieri. 1996. Cloning of the genes for and characterization of the early stages of toluene catabolism in *Pseudomonas stutzeri* OX1. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**:3704–3711.
6. Bertoni, G., M. Martino, E. Galli, and P. Barbieri. 1998. Analysis of the gene cluster encoding toluene/*o*-xylene monooxygenase from *Pseudomonas stutzeri* OX1. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**:3626–3632.
7. Bickerdike, S. R., R. A. Holt, and G. M. Stephens. 1997. Evidence for metabolism of *o*-xylene by simultaneous ring and methyl group oxidation in a new soil isolate. *Microbiology* **143**:2321–2329.
8. Cafaro, V., V. Izzo, R. Scognamiglio, E. Notomista, P. Capasso, A. Casbarra, P. Pucci, and A. Di Donato. 2004. Phenol hydroxylase and toluene/*o*-xylene monooxygenase from *Pseudomonas stutzeri* OX1: interplay between two enzymes. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**:2211–2219.
9. Cafaro, V., R. Scognamiglio, A. Viggiani, V. Izzo, I. Passaro, E. Notomista, F. Dal Piaz, A. Amoresano, A. Casbarra, P. Pucci, and A. Di Donato. 2002. Expression and purification of the recombinant subunits of toluene/*o*-xylene monooxygenase and reconstitution of the active complex. *Eur. J. Biochem.* **269**:5689–5699.
10. Davey, J. F., and D. T. Gibson. 1974. Bacterial metabolism of para- and meta-xylene: oxidation of a methyl substituent. *J. Bacteriol.* **119**:923–929.
11. Di Gennaro, P., E. Rescalli, E. Galli, G. Sello, and G. Bestetti. 2001. Characterization of *Rhodococcus opacus* R7, a strain able to degrade naphthalene and *o*-xylene isolated from a polycyclic aromatic hydrocarbon-contaminated soil. *Res. Microbiol.* **152**:641–651.
12. Favaro, R., C. Bernasconi, N. Passini, G. Bertoni, G. Bestetti, E. Galli, and G. Deho. 1996. Organisation of the *tmh* catabolic operons of *Pseudomonas putida* TMB and evolutionary relationship with the *xyl* operons of the TOL plasmid pWWO. *Gene* **182**:189–193.
13. Fetzner, S., and J. R. van der Meer. 2000. Enzymes involved in the aerobic bacterial degradation of N-heteroaromatic compounds: molybdenum hydroxylases and ring-opening 2,4-dioxygenases. *Naturwissenschaften* **87**:59–69.
14. Franklin, F. C., M. Bagdasarian, M. M. Bagdasarian, and 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. USA* **78**:7458–7462.
15. Johnson, G. R., and R. H. Olsen. 1997. Multiple pathways for toluene degradation in *Burkholderia* sp. strain JS150. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**: 4047–4052.
16. Johnson, G. R., and R. H. Olsen. 1995. Nucleotide sequence analysis of genes encoding a toluene/benzene-2-monooxygenase from *Pseudomonas* sp. strain JS150. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**:3336–3346.
17. Kahng, H. Y., J. C. Malinverni, M. M. Majko, and J. J. Kukor. 2001. Genetic and functional analysis of the *tlc* operons for catabolism of alkyl- and chloroaromatic compounds in *Burkholderia* sp. strain JS150. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**:4805–4816.
18. Kim, D., Y. S. Kim, S. K. Kim, S. W. Kim, G. J. Zylstra, Y. M. Kim, and E. Kim. 2002. Monocyclic aromatic hydrocarbon degradation by *Rhodococcus* sp. strain DK17. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**:3270–3278.
19. Kitayama, A., E. Suzuki, Y. Kawakami, and T. Nagamune. 1996. Gene organization and low regioselectivity in aromatic-ring hydroxylation of a benzene monooxygenase of *Pseudomonas aeruginosa* J1104. *Ferment. Biogeng.* **82**:421–425.
20. Kunz, D. A., and P. Chapman. 1981. Catabolism of pseudocumene and 3-ethyltoluene by *Pseudomonas putida* (*arvilla*) mt-2: evidence for new functions of the TOL (pWWO) plasmid. *J. Bacteriol.* **146**:179–191.
21. Kunz, D. A., and P. J. Chapman. 1981. Isolation and characterization of spontaneously occurring TOL plasmid mutants of *Pseudomonas putida* HSI. *J. Bacteriol.* **146**:952–964.
22. Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**:680–685.
23. Mitchell, K. H., J. M. Studts, and B. G. Fox. 2002. Combined participation of hydroxylase active site residues and effector protein binding in a para toluene modulation of toluene 4-monooxygenase regioselectivity. *Biochemistry* **41**:3176–3188.
24. Newman, L. M., and L. P. Wackett. 1995. Purification and characterization of toluene 2-monooxygenase from *Burkholderia cepacia* G4. *Biochemistry* **34**: 14066–14076.
25. Pikus, J. D., J. M. Studts, K. McClay, R. J. Steffan, and B. G. Fox. 1997. Changes in the regioselectivity of aromatic hydroxylation produced by active site engineering in the diiron toluene 4-monooxygenase. *Biochemistry* **36**: 9283–9289.
26. Powlowski, J., and V. Shingler. 1994. Genetics and biochemistry of phenol degradation by *Pseudomonas* sp. CF600. *Biodegradation* **5**:219–236.
27. Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
28. Sanseverino, J., B. M. Applegate, J. M. King, and G. S. Saylor. 1993. Plasmid-mediated mineralization of naphthalene, phenanthrene, and anthracene. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**:1931–1937.
29. Schraa, G., B. M. Bethe, A. R. van Neerven, W. J. Van den Tweel, E. Van der Wende, and A. J. Zehnder. 1987. Degradation 1,2-dimethylbenzene by *Corynebacterium* strain C125. *Antonie Leeuwenhoek* **53**:159–170.
30. van der Meer, J. R. 1997. Evolution of novel metabolic pathways for the degradation of chloroaromatic compounds. *Antonie Leeuwenhoek* **71**:159–178.
31. van der Meer, J. R., W. M. de Vos, S. Harayama, and A. J. B. Zehnder. 1992. Molecular mechanisms of genetic adaptation to xenobiotic compounds. *Microbiol. Rev.* **56**:677–694.
32. Vardar, A., and T. K. Wood. 2004. Protein engineering of toluene-*o*-xylene monooxygenase from *Pseudomonas stutzeri* OX1 for synthesizing 4-methylresorcinol, methylhydroquinone, and pyrogallol. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**:3253–3262.
33. Viggiani, A., L. Siani, E. Notomista, L. Birolo, P. Pucci, and A. Di Donato. 2004. The role of conserved residues H246, H199 and Y255 in the catalysis of catechol 2,3-dioxygenase from *Pseudomonas stutzeri* OX1. *J. Biol. Chem.* **279**:48630–48639.
34. Whited, G. M., and D. T. Gibson. 1991. Toluene-4-monooxygenase, a three component enzyme system that catalyzes the oxidation of toluene to *p*-cresol in *Pseudomonas mendocina* KR1. *J. Bacteriol.* **173**:3010–3016.
35. Williams, P. A., and J. R. Sayers. 1994. The evolution of pathways for aromatic hydrocarbon oxidation in *Pseudomonas*. *Biodegradation* **5**:195–217.
36. Williams, P. A., and M. J. Worsey. 1976. Ubiquity of plasmids in coding for toluene and xylene metabolism in soil bacteria: evidence for the existence of new TOL plasmids. *J. Bacteriol.* **125**:818–828.
37. Wyndham, R. C., A. E. Cashore, C. H. Nakatsu, and M. C. Peel. 1994. Catabolic transposons. *Biodegradation* **5**:323–342.

Mutation of Glutamic Acid 103 of Toluene *o*-Xylene Monooxygenase as a Means To Control the Catabolic Efficiency of a Recombinant Upper Pathway for Degradation of Methylated Aromatic Compounds

Valeria Cafaro,[†] Eugenio Notomista,[†] Paola Capasso, and Alberto Di Donato*

Dipartimento di Biologia Strutturale e Funzionale, Università di Napoli Federico II, Complesso Universitario di Monte S. Angelo, Via Cinthia, 80126 Napoli, and CEINGE-Biotecnologie Avanzate S.c.ar.l., Napoli, Italy

Received 7 January 2005/Accepted 25 February 2005

Toluene *o*-xylene monooxygenase (ToMO) and phenol hydroxylase (PH) of *Pseudomonas stutzeri* OX1 act sequentially in a recombinant upper pathway for the degradation of aromatic hydrocarbons. The catalytic efficiency and regioselectivity of these enzymes optimize the degradation of growth substrates like toluene and *o*-xylene. For example, the sequential monooxygenation of *o*-xylene by ToMO and PH leads to almost exclusive production of 3,4-dimethylcatechol (3,4-DMC), the only isomer that can be further metabolized by the *P. stutzeri meta* pathway. We investigated the possibility of producing ToMO mutants with modified regioselectivity compared with the regioselectivity of the wild-type protein in order to alter the ability of the recombinant upper pathway to produce methylcatechol isomers from toluene and to produce 3,4-DMC from *o*-xylene. The combination of mutant (E103G)-ToMO and PH increased the production of 4-methylcatechol from toluene and increased the formation of 3,4-DMC from *o*-xylene. These data strongly support the idea that the products and efficiency of the metabolic pathway can be controlled not only through mutations that increase the catalytic efficiency of the enzymes involved but also through tuning the substrate specificity and regioselectivity of the enzymes. These findings are crucial for the development of future metabolic engineering strategies.

Bacterial multicomponent monooxygenases (BMMs) catalyze the chemically difficult hydroxylation of aliphatic and aromatic hydrocarbons, which is crucial for the ability of several bacterial strains to grow on aliphatic and aromatic hydrocarbons (5, 14, 17, 21).

The regioselectivity of these enzymes may be the molecular basis for explaining (i) the ability of microorganisms to grow on selected substrates or (ii) the metabolic efficiency of the use of growth substrates (12, 20, 21). For example, in the case of *Pseudomonas mendocina* KR1, the restricted regioselectivity (10) on toluene of toluene 4-monooxygenase (T4MO), which is a *para* directing enzyme, is essential because only *p*-cresol can be further metabolized through progressive oxidation of the *p*-methyl group (20, 21). Moreover, BMMs from other organisms, such as *Pseudomonas stutzeri* and *Burkholderia* sp. strain JS150, are able to further hydroxylate cresols to 3-methylcatechol (3-MC) and/or 4-methylcatechol (4-MC) (Fig. 1A), which are metabolized through the *ortho* or *meta* pathway (1, 2, 6). At least in the case of the *meta* pathway, 3-MC and 4-MC are not metabolically equivalent because they are metabolized through different branches of the pathway (Fig. 1A) (12). Thus, the metabolic fate of a growth substrate like toluene is determined by the ability of the enzymes involved in toluene hy-

droxylation to produce one of the two methylcatechol isomers and hence by their regioselectivity.

P. stutzeri OX1, like a few other bacteria that are able to grow on aromatic molecules, possesses two BMMs, toluene *o*-xylene monooxygenase (ToMO) and phenol hydroxylase (PH). Both of these enzymes are capable of oxidizing substituted benzenes to catechols, which are subsequently metabolized through the *meta* pathway (1, 2). In the accompanying paper (4) we show that ToMO and PH act sequentially on toluene, catalyzing its oxidation to an equimolar mixture of 3-MC and 4-MC (Fig. 1A). This is mainly due to the ability of ToMO to produce similar amounts of *o*- and *p*-cresols, which are converted by PH to 3-MC and 4-MC, respectively (4). Both methylcatechols can be cleaved by *P. stutzeri* catechol 2,3-dioxygenase (C2,3O) and enter the two branches of the *meta* pathway (1). Moreover, we also show in the accompanying paper (4) that the combined action of ToMO and PH converts *o*-xylene almost exclusively to 3,4-dimethylcatechol (3,4-DMC) (Fig. 1B), the sole dimethylcatechol that can be cleaved by *P. stutzeri* C2,3O, thus allowing *P. stutzeri* OX1 to grow on the most recalcitrant xylene isomer (1). This depends on the regioselectivity of ToMO, which converts *o*-xylene predominantly into 3,4-dimethylphenol (3,4-DMP), the optimal substrate for PH, and on the regioselectivity of PH, which transforms 3,4-DMP mainly into 3,4-DMC (Fig. 1B).

In this paper we report the use of protein engineering techniques to produce ToMO variants with altered regioselectivity compared with the regioselectivity of the wild-type protein. This was done by searching for ToMO mutants which could alter the ability of the metabolic chain consisting of ToMO and PH to produce methylcatechol isomers from toluene and to

* Corresponding author. Mailing address: Dipartimento di Biologia strutturale e funzionale, Università di Napoli Federico II, Complesso Universitario di Monte S. Angelo, Via Cinthia, 80126 Napoli, Italy. Phone: 39-081-674426. Fax: 39-081-674414. E-mail: didonato@unina.it.

[†] V.C. and E.N. contributed equally to this paper.

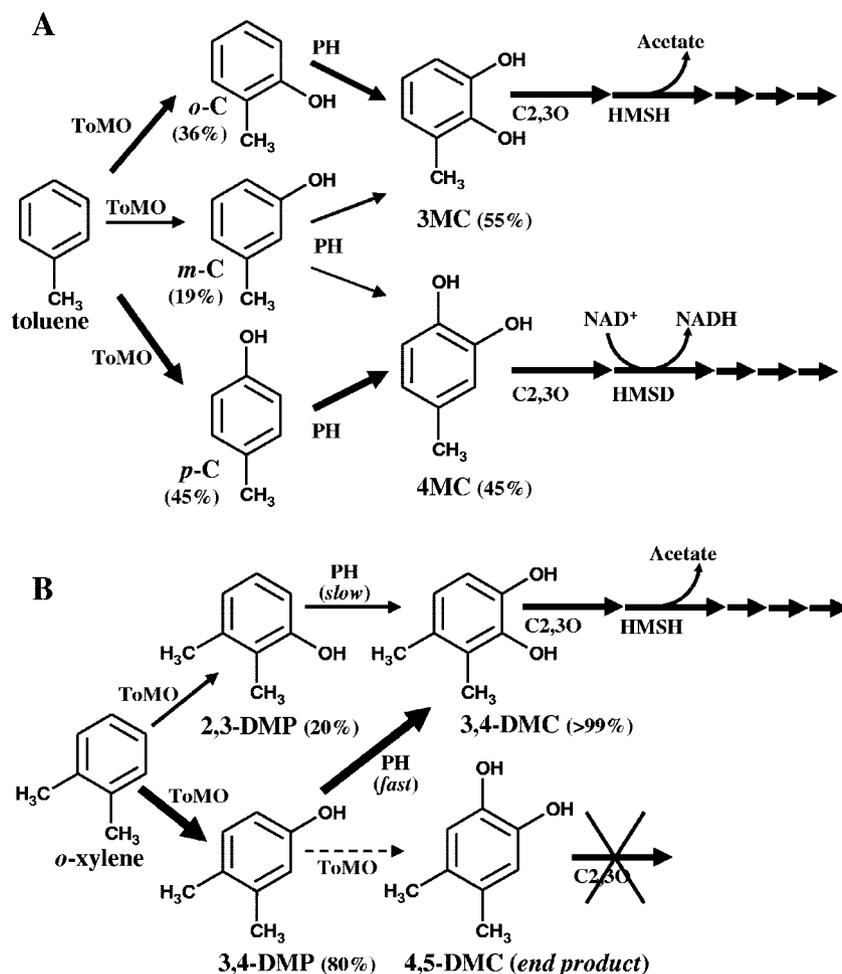


FIG. 1. Proposed transformations of toluene (A) and *o*-xylene (B) catalyzed by ToMO and PH. The thickness of the arrows is roughly proportional to the relative abundance of each species. The possible catabolic fate of the hydroxylation products through the *meta* pathway is also shown. HMSD, 2-hydroxyomuconic semialdehyde dehydrogenase which produces NADH; HMSH, 2-hydroxyomuconic semialdehyde hydrolase which produces acetate (12); *o*-C, *o*-cresol; *m*-C, *m*-cresol; *p*-C, *p*-cresol.

produce 3,4-DMC from *o*-xylene. We discovered that the use of mutant (E103G)-ToMO and PH together increased the production of 4-MC from toluene and, more interestingly, improved the conversion of *o*-xylene to 3,4-DMC, the only dimethylcatechol which can be metabolized further by the *meta* pathway of *P. stutzeri*. Thus, our data indicate that rational design of ToMO mutants with altered regioselectivity can be used to tune the relative abundance of the products of toluene and *o*-xylene hydroxylation. These findings are crucial for the development of future metabolic engineering strategies.

MATERIALS AND METHODS

Materials. Bacterial culturing, plasmid purification, and transformation were performed as described by Sambrook et al. (13). *Escherichia coli* strains JM109 and CJ236 and vector pET22b(+) were obtained from Novagen. Plasmid pBZ1260 (2), which was used to express the ToMO cluster, was kindly supplied by P. Barbieri (Dipartimento di Biologia Strutturale e Funzionale, Università dell'Insubria, Varese, Italy). Plasmid pGEM-3Z/PH, which was used to express the PH complex, was prepared as described in the accompanying paper (4). *E. coli* strain JM101 was purchased from Boehringer. The pGEM-3Z expression vector and Wizard SV gel and PCR clean-up system for elution of DNA fragments from the agarose gel were obtained from Promega. Enzymes and other reagents used for DNA manipulation were obtained from New England Biolabs.

The oligonucleotides were synthesized at the Stazione Zoologica 'A. Dohrn' (Naples, Italy). All other chemicals were obtained from Sigma. The methods used for expression and purification of recombinant C2,3O from *P. stutzeri* OX1 are described elsewhere (19).

Analysis of ToMO structure and docking of (di)methylphenols. The ToMO H structure (PDB code 1T0Q) (15) was analyzed by using Swiss PDB viewer (<http://www.expasy.org/spdbv/>) and Pymol (DeLano Scientific LLC). Residues of the active site pocket were identified using the program Pymol. Phenol, *o*-, *m*-, and *p*-cresols, and 2,3-, 2,4-, and 3,4-DMPs were manually docked using Pymol. (Di)methylphenols were assumed to bind to ToMO in the anionic form. The phenolate oxygen was placed at 2.19 Å from Fe(1) and at 2.09 Å from Fe(2) (see Fig. 2) in the position that is occupied by the bridging oxygen of the thioglycolate molecule in the crystallographic complex. The aromatic ring was rotated using the phenolate oxygen as the rotation center in order to search for conformations which fit the van der Waals volume of the substrate in the active site cavity.

Coordinates for the (di)methylphenols were generated by using the programs CS ChemDraw Pro and Chem3D Pro (Cambridge Soft Corporation) and energy minimized before docking of the compounds in the active site.

Sequence alignments of the multicomponent monooxygenase α -subunits. A multiple-sequence alignment was prepared and analyzed as described previously using the same set of 33 α -subunit sequences reported by Notomista et al. (9). The pairwise alignment of ToMO A and T4MO A was extracted from the multiple alignment of α -subunits and was used to identify active site residues which are different in the two proteins.

ToMO A mutagenesis. ToMO A mutants were produced by site-directed mutagenesis by the method of Kunkel (7). Initially, a pGEM-3Z derivative

lacking the unique SalI site (pGEM-3Z-Sal⁻) which would have interfered with the subsequent cloning procedures described below was prepared. The commercial vector pGEM-3Z was digested with the SalI restriction endonuclease. The protruding ends were filled in with Klenow DNA polymerase, and the linearized plasmid was ligated with DNA ligase. The ToMO coding sequence was excised from plasmid pBZ1260 by digestion with XbaI and KpnI. The resulting fragment was ligated to plasmid pGEM3Z-Sal⁻ digested with the same enzymes. The resulting vector, designated pTou, contains a single SalI site located 138 bp upstream of the stop codon of the open reading frame coding for the ToMO A subunit (*touA*).

pTou was digested with MluI and SalI to extract a 1,200-bp internal fragment from the *touA* open reading frame. This fragment lacked the first 36 bp and the last 138 bp of the coding sequence and coded for amino acids 14 to 451 of the ToMO A subunit. The MluI/SalI fragment was cloned into the pET22b(+) commercial vector, and the resulting plasmid was designated pET22b(+)/*touA*. This plasmid was used to obtain mutants (E103G)-, (E103L)-, and (E103M)-ToMO A. The following mutagenic oligonucleotides were used: 5'-TGCGGGC GTATTCTCCAAGTGCATCGC-3' for the E103G mutation, 5'-TGCGGGC GTATTCAAGAAGTGCATCGC-3' for the E103L mutation, and 5'-TGCGGGC GTATTCCATAAGTGCATCGC-3' for the E103M mutation. The MluI/SalI fragments of the three mutants were completely sequenced (MWG-Biotech), digested with MluI and SalI, and cloned back into the pTou plasmid previously digested with the same enzymes. The resulting plasmids were designated pTou/*touA*-(E103G), -(E103L), and -(E103M).

Identification of reaction products and determination of the apparent kinetic parameters. All the assays were performed using whole *E. coli* JM109 cells transformed with plasmids pGEM-3Z/PH, pBZ1260, pTou/*touA*-(E103G), pTou/*touA*-(E103L), and pTou/*touA*-(E103 M), which expressed PH, ToMO, (E103G)-ToMO, (E103L)-ToMO, and (E103M)-ToMO, respectively. Details are described in the accompanying paper (4). The specific activities of the cells ranged from 10 to 14 mU/optical density at 600 nm for cells expressing PH and from 10 to 20 mU/optical density at 600 nm for cells expressing wild-type ToMO and ToMO mutants. One milliunit was defined as the amount of catalyst that oxidized one nmol of phenol per min at 25°C. The levels of expression of ToMO mutants, determined as described in the accompanying paper (4), were similar to the levels of expression of wild-type ToMO. The reaction products and the apparent kinetic parameters of the ToMO mutants were determined as reported for wild-type ToMO in the accompanying paper (4).

Time course of toluene and *o*-xylene oxidation. The rate of product formation by *E. coli* cells expressing ToMO mutants or a mixture of ToMO (either wild-type or mutant enzyme) and wild-type PH was measured by the high-performance liquid chromatography (HPLC) discontinuous assay described in the accompanying paper (4). Each assay mixture contained either 30 μ M toluene or 20 μ M *o*-xylene. All cells were used at a concentration of 1 mU/ml when toluene was used as the substrate and at a concentration of 1.5 mU/ml when *o*-xylene was used.

Rate of (di)methylcatechol production as a function of ToMO concentration. The rate of 3,4-DMC production from 40 μ M *o*-xylene was measured as a function of the ToMO or (E103G)-ToMO concentration at concentrations ranging from 0.3 to 6 mU/ml with a constant concentration of cells expressing PH (0.5 mU/ml). 3,4-DMC was measured by the continuous coupled assay with C2,3O (3 U/ml) described in the accompanying paper (4). Experimental data were fitted to the following equation: rate = ($V_{\max} \times [\text{ToMO}]$)/($K + [\text{ToMO}]$), where V_{\max} is the maximum rate and K is a constant equal to the concentration of ToMO which gives a rate of $V_{\max}/2$. Data were linearized by plotting rates as a function of the rate/[ToMO] ratio.

RESULTS

Design of ToMO mutants. The recently determined X-ray crystal structure of the hydroxylase component of ToMO (ToMO H) (15) allows analysis of the active site pocket, which may provide a better understanding of the substrate regio-specificity and assist in the design of mutants that improve the catalytic efficiency with aromatic substrates. The active site cavity, which is in the A subunit of ToMO H, has an irregular, round, flat shape with a radius greater than that of a single benzene ring, and it is in close proximity to the catalytic diiron center (Fig. 2). Manual docking of alcohol products like phenol, cresols, and dimethylphenols into the active site such that

the aromatic hydroxyl group was positioned at the bridging position ~ 2.0 Å from each of the iron atoms provided insight into how the toluene and *o*-xylene substrates may be oriented before hydroxylation. In all cases, van der Waals contacts were minimized when the aromatic ring was positioned orthogonal to the plane defined by the iron atoms and the bridging hydroxide.

When cresols are docked in this cavity, the methyl group of *o*-cresol can be accommodated in a putative subsite between the methylene groups of the E103 side chain and the side chains of A107 and M180. The methyl group of *m*-cresol is accommodated in a subsite between the methylene groups of the E103 side chain and the side chain of F176 (Fig. 2). When *p*-cresol is docked in the same cavity, its methyl group is accommodated in a subsite between the side chains of F205 and I100, which are positioned at the interface between the active site pocket and the long channel that provides access to the diiron center from the surface of the protein (15). The positions of the methyl groups from the docked 2,3-, 2,4-, and 3,4-DMP products are also in agreement with the defined *ortho*, *meta*, and *para* subsites described above. Previous mutation studies of position 103 of T4MO A (8, 16) and of position 100 of ToMO A (18) indicated that changes at these positions alter the distribution of cresol isomers produced from toluene. In the case of the A subunit of T4MO, the G103L mutation increases the percentage of *o*-cresol from less than 1 to 55%, whereas in the case of the A subunit of ToMO the I100Q mutation increases the percentage of *m*-cresol from 19 to 44%.

To experimentally check whether changes in these subsites affect the regioselectivity of the enzyme, we changed residue E103 of ToMO A to glycine, the residue present at the homologous position of T4MO A, and to leucine and methionine, which are the only two residues found at homologous positions in 15 monooxygenases belonging to the subfamily containing the toluene 2-monooxygenases/phenol hydroxylases (9). Three ToMO variants, (E103G)-ToMO, (E103M)-ToMO, and (E103L)-ToMO, were produced by site-directed mutagenesis and expressed.

Apparent kinetic parameters and regioselectivity of ToMO mutants. Tables 1 and 2 show the apparent kinetic constants of the three mutants for phenol, cresols, benzene, toluene, and *o*-xylene. Mutations E103M and E103L caused a threefold decrease in the k_{cat} for phenol and a fivefold increase in the K_m for phenol, respectively. All the other apparent kinetic parameters are identical or very similar to those measured for wild-type ToMO. Apparent kinetic constants for cresols were measured only for the E103G mutant (Table 2), and they were found to be identical to those measured for wild-type ToMO.

In contrast, large variations were observed in the regioselectivity of the three mutants on toluene, *o*-xylene, *m*-cresol, and 3,4-DMP (Table 3). Mutation E103G increased the frequency of hydroxylation at positions *para* to methyl groups. The percentage of *p*-cresol obtained from toluene was about doubled, whereas the percentage of 3,4-DMP increased up to 99%. The same increase could be measured, although it was less evident, when hydroxylated substrates such as *m*-cresol and 3,4-DMP were used. Also, mutation E103L caused a similar, more limited increase in the frequency of *para* hydroxylation of toluene and *o*-xylene. Finally, mutation E103M caused inversion of the

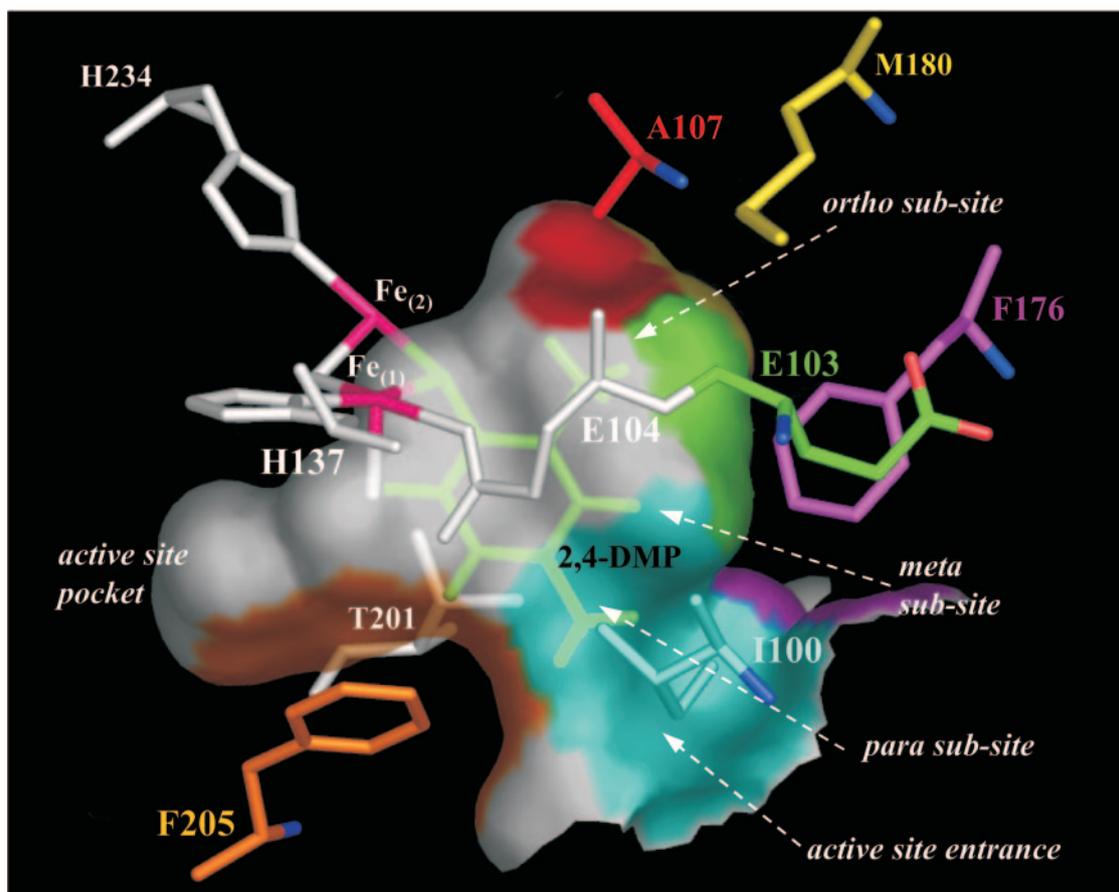


FIG. 2. Active site of ToMO A with a docked 2,4-DMP molecule (green). The carbon atoms of the residues that take part in the formation of the hypothetical subsites for methyl groups are red, yellow, green, magenta, orange, and cyan, whereas nitrogen and oxygen atoms of these residues are blue and light red, respectively. Iron ions are purple. All other atoms are white. The numbers of the residues are also shown. The color of the surface of each active site pocket corresponds to the color of the residues that form the cavity. Hydrogen atoms are shown only on the 2,4-DMP molecule.

percentages of *o*- and *p*-cresols produced from toluene but no change in the distribution of dimethylphenols produced from *o*-xylene.

Toluene and *o*-xylene metabolism by ToMO mutant/PH mixtures. Mixtures of *E. coli* cells expressing each ToMO mutant and cells expressing wild-type PH were incubated with toluene, and the formation of methylcatechols was monitored by HPLC as described above for wild-type ToMO and PH. The results shown in Table 4 indicate that the E103M mutation slightly increased 3-MC production, whereas the E103L and

E103G mutations reduced the relative production of 3-MC 1.8- and 4-fold, respectively.

For *o*-xylene, the substrate at a concentration of 20 μ M was incubated with a mixture of *E. coli* cells expressing (E103G)-ToMO (1.5 mU/ml) and cells expressing PH (1.5 mU/ml). The concentrations of 2,3- and 3,4-DMPs and 3,4- and 4,5-DMCs were measured by HPLC at different times (Fig. 3B). In contrast to the results obtained with wild-type ToMO and PH (Fig. 3A) (4), no 2,3-DMP accumulation was detected, and the rate of formation of 3,4-DMC was doubled.

To confirm these results, mixtures of a constant amount of *E. coli* cells expressing PH (0.5 mU/ml) and different concentrations of *E. coli* cells expressing (E103G)-ToMO or wild-type ToMO (0.3 to 6 mU/ml) were incubated with 40 μ M *o*-xylene. The rate of 3,4-dimethylcatechol formation was measured spectrophotometrically using the coupled assay with C2,3O. In both cases a hyperbolic dependence of the rate of 3,4-DMC formation was observed (Fig. 4). However, the rate of 3,4-DMC formation was higher when (E103G)-ToMO and PH were used than when wild-type ToMO and PH were used. The same maximum rate (Fig. 4, inset) was obtained in both cases, but the maximum rate was reached with lower concentrations of

TABLE 1. Apparent catalytic parameters of ToMO and ToMO mutants with benzene, toluene, and *o*-xylene

Enzyme	$k_{\text{cat}}(\text{s}^{-1})$ with ^a :		
	Benzene	Toluene	<i>o</i> -Xylene
ToMO	0.36	0.42	0.25
(E103G)-ToMO	0.43	0.42	0.42
(E103L)-ToMO	0.29	0.32	0.36
(E103M)-ToMO	0.26	0.30	0.2

^a The errors for k_{cat} values were about 26%.

TABLE 2. Apparent kinetic constants of ToMO and ToMO mutants for phenol and cresols

Compound	Parameter	ToMO	(E103G)-ToMO	(E103L)-ToMO	(E103M)-ToMO
Phenol	K_m (μM) ^a	2.18	2.7	15	2.5
	k_{cat} (s^{-1}) ^b	1.0	1.0	0.89	0.29
	k_{cat}/K_m ($\text{s}^{-1}\mu\text{M}^{-1}$)	0.46	0.37	0.064	0.1
<i>o</i> -Cresol	K_m (μM) ^a	6	11.2		
	k_{cat} (s^{-1}) ^b	0.9	1.5		
	k_{cat}/K_m ($\text{s}^{-1}\mu\text{M}^{-1}$)	0.15	0.13		
<i>m</i> -Cresol	K_m (μM) ^a	9.38	13.2		
	k_{cat} (s^{-1}) ^b	0.44	1		
	k_{cat}/K_m ($\text{s}^{-1}\mu\text{M}^{-1}$)	0.047	0.076		
<i>p</i> -Cresol	K_m (μM) ^a	13.3	11		
	k_{cat} (s^{-1}) ^b	0.63	0.59		
	k_{cat}/K_m ($\text{s}^{-1}\mu\text{M}^{-1}$)	0.047	0.054		

^a The errors for K_m values were less than 10%.

^b The errors for k_{cat} values were about 26%. The errors for the k_{cat} values for phenol were about 20%.

(E103G)-ToMO. Larger differences in the reaction rates with (E103G)-ToMO and ToMO were observed at low (E103G)-ToMO concentrations. The difference decreased as the ToMO concentration increased, likely because at higher ToMO concentrations the concentration of PH becomes the rate-limiting factor (4).

DISCUSSION

In the accompanying paper we show that ToMO and PH act sequentially to convert (di)methylbenzenes to (di)methylcatechols. In the case of toluene, ToMO produces similar amounts of *o*- and *p*-cresols and a smaller amount of *m*-cresol. On the other hand, PH converts *p*-cresol to 4-MC and *o*- and *m*-cresols to 3-MC. Thus, the combined action of the two enzymes yields an equimolar mixture of 3-MC and 4-MC from toluene. For the hydroxylation of *o*-xylene, the sequential action of the two enzymes mainly produces 3,4-DMC, which is the only dimethylcatechol isomer which can be further transformed by C2,3O. However, hydroxylation of *o*-xylene by ToMO yields 3,4-DMP, the optimal substrate for PH, and also small amounts of 2,3-DMP, which transiently accumulates during *o*-xylene degradation.

Protein engineering was performed to explore the possibility of obtaining ToMO mutants capable of producing only 3-MC or 4-MC from toluene and of more efficiently producing 3,4-DMC from *o*-xylene when the enzyme was coupled to wild-type PH. ToMO was chosen as the target for protein engineering

studies because it is more efficient with nonhydroxylated molecules and is the primary agent in the channeling of aromatic molecules into the lower pathway of *P. stutzeri*. The E103G, E103M, and E103L mutations in the ToMO A subunit did not significantly change the efficiency of the enzyme in the first hydroxylation step; the k_{cat} values for benzene, toluene, and *o*-xylene were very similar to those measured for wild-type ToMO (Table 1). The apparent kinetic constants for cresols were measured only for the E103G mutant (Table 2), and they are identical to those measured for wild-type ToMO.

Although the mutations in the ToMO A subunit did not significantly influence the catalytic parameters, they caused major alterations in ToMO regioselectivity (Table 3). The E103G mutation caused the greatest change compared with wild-type ToMO. The regioselectivity of this mutant resembled that of T4MO, which is highly *para* directing (11). This finding was not unexpected since residue 103 is one of the two active site residues that are different in the sequences of ToMO, T4MO, and toluene *para*-monooxygenase (formerly toluene 3-monooxygenase); the other different residue is at position 180 and is methionine, isoleucine, and phenylalanine, respectively (15). The regioselectivity of the (E103L)-ToMO mutant was intermediate between those of (E103G)-ToMO and wild-type ToMO. In contrast, the similar mutation E103M caused a slight increase in the *o*-cresol relative abundance compared with the amount obtained with ToMO.

The regiospecific effects of the ToMO A mutations at posi-

TABLE 3. Regioselectivities of PH and ToMO (wild type and mutants) for toluene, *m*-cresol, *o*-xylene, and 3,4-DMP

Substrate	Product	% with ^a :			
		ToMO	(E103G)-ToMO	(E103L)-ToMO	(E103M)-ToMO
Toluene	<i>o</i> -Cresol	36	9	20	47
	<i>m</i> -Cresol	19	6	11	19
	<i>p</i> -Cresol	45	85	69	34
<i>o</i> -Xylene	2,3-DMP	20	1	6	18
	3,4-DMP	80	99	94	82
<i>m</i> -Cresol	3-MC	5	2	ND ^b	ND
	4-MC	95	98	ND	ND
3,4-DMP	3,4-DMC	10	1	ND	ND
	4,5-DMC	90	99	ND	ND

^a The errors were ~1%.

^b ND, not determined.

TABLE 4. Regioselectivities of PH/ToMO (wild type and mutant) mixtures on toluene

Product	% with ^a :			
	Wild-type ToMO/PH	(E103G)-ToMO/PH	(E103L)-ToMO/PH	(E103M)-ToMO/PH
3-MC	55 (54) ^b	14 (14)	29 (30)	67 (65)
4-MC	45 (46)	86 (86)	71 (70)	33 (35)

^a The errors were ~1.5%.

^b The values in parentheses are theoretical percentages of 3- and 4-MC calculated by assuming that ToMO (wild type and mutants) converts toluene to cresols and PH converts cresol isomers to MC. Theoretical values were calculated with the following equation: $3\text{-MC}\% = o\text{-C}\% + 0.96 \times m\text{-C}\%$, where 3-MC% is the percentage of 3-MC compared with the total amount of methylcatechols produced and *o*-C% and *m*-C% are the percentages of *o*-cresol and *m*-cresol, respectively, compared with the total amount of cresols produced by ToMO. For details see the accompanying paper (4).

tion 103 on toluene hydroxylation (Table 3) may be explained by the docking of (di)methylphenols in the active site pocket of ToMO. The relaxed regioselectivity of ToMO indicates that at least three different positions in the active site pocket can accommodate the methyl group of toluene. Our docking results suggest that there are three subsites that could orient the methyl groups of the different substrates such that the *ortho*, *meta*, or *para* carbon is presented to the diiron center (Fig. 2). Thus, it may be hypothesized that it is the difference in the affinity of each subsite for the binding of the methyl groups that determines the relative abundance of the three enzyme-substrate complexes and hence the observed distribution of cresols produced by wild-type ToMO. Consequently, the low percentage of *m*-cresol produced by ToMO may suggest that the *meta* subsite has a lower affinity for methyl groups than the *ortho* and *para* subsites.

Thus, the reduced hydroxylation at the *ortho* and *meta* positions of toluene that we observed with mutant E103G (Table

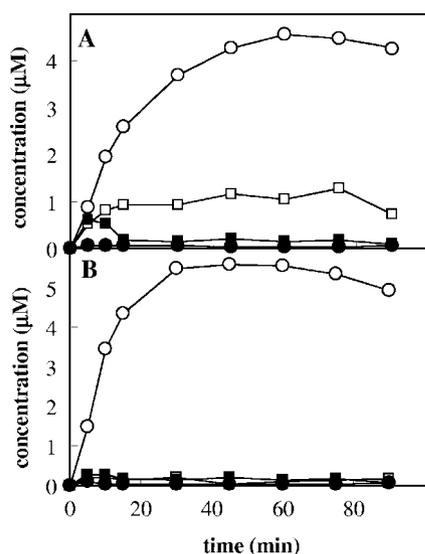


FIG. 3. Kinetics of 2,3-DMP (□), 3,4-DMP (■), 3,4-DMC (○), and 4,5-DMC (●) production by a mixture of cells expressing ToMO (1.5 mU/ml) and PH (1.5 mU/ml) (A) and a mixture of cells expressing (E103G)-ToMO (1.5 mU/ml) and PH (1.5 mU/ml) (B) in the presence of 20 µM *o*-xylene.

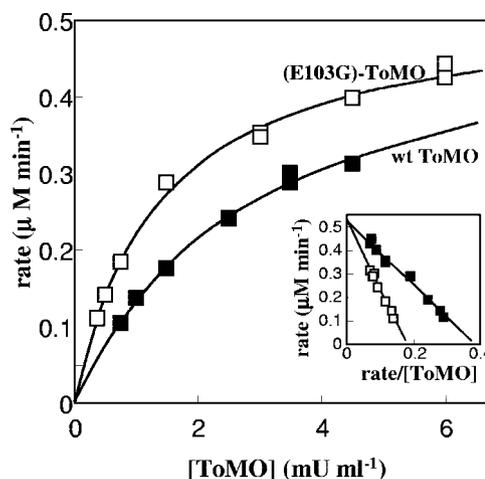


FIG. 4. Kinetics of 3,4-DMC formation. Cells expressing PH were used at a constant concentration (0.5 mU/ml), and the rate of 3,4-DMC formation was measured as a function of the concentration of cells expressing ToMO (■) or (E103G)-ToMO (□) in the presence of 40 µM *o*-xylene. The rate of 3,4-DMC production was measured by the continuous coupled assay with C2,3O as described in Materials and Methods. The inset shows linearization of the data obtained by plotting rates (µM min⁻¹) as a function of the rate/[ToMO] ratio (µM min⁻¹/mU ml⁻¹). wt, wild type.

3) may be explained on the basis of destabilization of the interaction between the methyl group of the substrate and the *ortho* and *meta* subsites given the reduced nonpolar portion of the residue 103 side chain (Fig. 2).

On the other hand, only minor changes in regioselectivity, such as a small increase in *o*-cresol production, were observed when E103 was changed to methionine (Table 3). This may be attributed to stabilization of the interaction at the *ortho* subsite, given the presence of a quasi-isosteric but more hydrophobic residue at position 103. For mutation E103L, the reduction of *o*- and *m*-cresols suggests that there is destabilization of the binding at the *ortho* and *meta* subsites. This finding is surprising because leucine has a van der Waals volume and hydrophobicity similar to those of methionine and is the residue that is most frequently found at homologous positions in the members of the toluene 2-monooxygenase subfamily (14 of 15 sequences). Moreover, it has been reported that the T4MO G103L mutation causes an increase in the percentage of *o*-cresol produced from toluene (8). Therefore, the G103L and E103L mutations cause opposite effects in T4MO and ToMO in spite of the fact that the A subunits of the two enzymes exhibit about 67% identity (3) and the fact that the residues at positions 103 and 180 are the only different active site residues in the two enzymes. The substitution of methionine for isoleucine at position 180 could explain the observed differences between (G103L)-T4MO and (E103L)-ToMO because the side chain of this residue also contributes to the *ortho* subsite (Fig. 2).

The changes in the regioselectivity of ToMO mutants have remarkable effects on toluene metabolism when these mutants are used in conjunction with wild-type PH. We found that mutation E103M results in a slight increase in 3-MC production, whereas mutations E103L and E103G reduce the forma-

tion of 3-MC. It is worth noting that the (E103G)-ToMO/PH combination produces essentially 4-MC.

Thus, the regulation of ToMO regioselectivity alone allows fine-tuning of the relative abundance of 3-MC and 4-MC. This understanding is crucial for the development of future metabolic engineering strategies.

The production of 2,3-DMP by the E103L and E103G mutants from *o*-xylene was 3.3- and 20-fold less, respectively, than the production of 2,3-DMP by the wild-type enzyme (Table 3). Formation of 2,3-DMP requires the binding of *o*-xylene methyl groups to the *ortho* and *meta* subsites of ToMO A. However, as shown above, mutations E103L and E103G destabilize the interactions of methyl substituents with these two subsites.

The changes in regioselectivity in *o*-xylene transformations by the E103L and E103G mutants are metabolically relevant because they lead to an increase in the production of 3,4-DMP (Table 3), which is efficiently transformed by PH in the second step of the reaction into 3,4-DMC, the only dimethylcatechol which can be further transformed by C2,3O, as described in the accompanying paper (4). The results in Fig. 3 and 4 clearly show that use of the (E103G)-ToMO mutant coupled with PH improved the efficiency of conversion of *o*-xylene to 3,4-DMC. It is worth noting that the concentrations of *o*-xylene used (20 to 40 μ M) are saturating for both ToMO and (E103G)-ToMO (data not shown). Therefore, the results that we obtained cannot be attributed to variation in the K_m of (E103G)-ToMO for *o*-xylene. Moreover, as (E103G)-ToMO has a k_{cat} for *o*-xylene that is slightly higher than that of ToMO, the improvement in the conversion of *o*-xylene to 3,4-DMC can be at least in part attributed to the fact that the main product of (E103G)-ToMO is 3,4-DMP (99%), the best substrate for PH, which converts it to 3,4-DMC. Therefore, the efficiency of the metabolic pathway can be controlled not only through mutations that increase the catalytic efficiency of the enzymes involved but also through fine-tuning their substrate specificity and their regioselectivity.

In conclusion, the data that we collected strongly support the idea that the spectrum of products that can be obtained from substituted aromatic compound by the combined action of ToMO and PH can be predicted with reasonable confidence based on knowledge of the structure of the enzymes. Such predictability may be useful for future industrial biocatalysis applications.

ACKNOWLEDGMENTS

We are indebted to Giuseppe D'Alessio, Department of Biological Chemistry, University of Naples Federico II, and to Gennaro Marino, Department of Organic Chemistry and Biochemistry, University of Naples Federico II, for critically reading the manuscript.

This work was supported by grants PRIN/2000 and PRIN/2002 from the Ministry of University and Research.

REFERENCES

1. Arengi, F. L., D. Berlanda, E. Galli, G. Sello, and P. Barbieri. 2001. Organization and regulation of meta cleavage pathway gene for toluene and

- o*-xylene derivative degradation in *Pseudomonas stutzeri* OX1. Appl. Environ. Microbiol. **67**:3304–3308.
2. Bertoni, G., F. Bolognesi, E. Galli, and P. Barbieri. 1996. Cloning of the genes for and characterization of the early stages of toluene catabolism in *Pseudomonas stutzeri* OX1. Appl. Environ. Microbiol. **62**:3704–3711.
3. Bertoni, G., M. Martino, E. Galli, and P. Barbieri. 1998. Analysis of the gene cluster encoding toluene/*o*-xylene monooxygenase from *Pseudomonas stutzeri* OX1. Appl. Environ. Microbiol. **64**:3626–3632.
4. Cafaro, V., E. Notomista, P. Capasso, and A. Di Donato. 2005. Regiospecificity of two multicomponent monooxygenases from *Pseudomonas stutzeri* OX1: molecular basis for catabolic adaptation of this microorganism to methylated aromatic compounds. Appl. Environ. Microbiol. **71**:4736–4743.
5. Fetzner, S., and J. R. van der Meer. 2000. Enzymes involved in the aerobic bacterial degradation of N-heteroaromatic compounds: molybdenum hydroxylases and ring-opening 2,4-dioxygenases. Naturwissenschaften **87**:59–69.
6. Johnson, G. R., and R. H. Olsen. 1997. Multiple pathways for toluene degradation in *Burkholderia* sp. strain JS150. Appl. Environ. Microbiol. **63**:4047–4052.
7. Kunkel, T. A. 1987. Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **82**:488–492.
8. Mitchell, K. H., J. M. Studts, and B. G. Fox. 2002. Combined participation of hydroxylase active site residues and effector protein binding in a para to ortho modulation of toluene 4-monooxygenase regioselectivity. Biochemistry **41**:3176–3188.
9. Notomista, E., A. Lahm, A. Di Donato, and A. Tramontano. 2003. Evolution of bacterial and archaeal multicomponent monooxygenases. J. Mol. Evol. **56**:435–445.
10. Pikus, J. D., J. M. Studts, C. Achim, K. E. Kauffmann, E. Munck, R. J. Steffan, K. McClay, and B. G. Fox. 1996. Recombinant toluene-4-monooxygenase: catalytic and Mossbauer studies of the purified diiron and Rieske components of a four-protein complex. Biochemistry **35**:9106–9119.
11. Pikus, J. D., J. M. Studts, K. McClay, R. J. Steffan, and B. G. Fox. 1997. Changes in the regioselectivity of aromatic hydroxylation produced by active site engineering in the diiron toluene 4-monooxygenase. Biochemistry **36**:9283–9289.
12. Powlowski, J., and V. Shingler. 1994. Genetics and biochemistry of phenol degradation by *Pseudomonas* sp. CF600. Biodegradation **5**:219–236.
13. Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
14. Sanseverino, J., B. M. Applegate, J. M. King, and G. S. Saylor. 1993. Plasmid-mediated mineralization of naphthalene, phenanthrene, and anthracene. Appl. Environ. Microbiol. **59**:1931–1937.
15. Sazinsky, M. H., J. Bard, A. Di Donato, and S. J. Lippard. 2004. Crystal structure of the toluene/*o*-xylene monooxygenase hydroxylase from *Pseudomonas stutzeri* OX1. Insight into the substrate specificity, substrate channeling, and active site tuning of multicomponent monooxygenases. J. Biol. Chem. **279**:30600–30610.
16. Tao, Y., A. Fishman, W. E. Bentley, and T. K. Wood. 2004. Altering toluene 4-monooxygenase by active-site engineering for the synthesis of 3-methoxycatechol, methoxyhydroquinone, and methylhydroquinone. J. Bacteriol. **186**:4705–4713.
17. van der Meer, J. R. 1997. Evolution of novel metabolic pathways for the degradation of chloroaromatic compounds. Antonie Leeuwenhoek **71**:159–178.
18. Vardar, G., and T. K. Wood. 2004. Protein engineering of toluene-*o*-xylene monooxygenase from *Pseudomonas stutzeri* OX1 for synthesizing 4-methylresorcinol, methylhydroquinone, and pyrogallol. Appl. Environ. Microbiol. **70**:3253–3262.
19. Viggiani, A., L. Siani, E. Notomista, L. Birolo, P. Pucci, and A. Di Donato. 2004. The role of conserved residues H246, H199 and Y255 in the catalysis of catechol 2,3-dioxygenase from *Pseudomonas stutzeri* OX1. J. Biol. Chem. **279**:48630–48639.
20. Whited, G. M., and D. T. Gibson. 1991. Separation and partial characterization of the enzymes of the toluene-4-monooxygenase catabolic pathway in *Pseudomonas mendocina* KR1. J. Bacteriol. **173**:3017–3020.
21. Whited, G. M., and D. T. Gibson. 1991. Toluene-4-monooxygenase, a three component enzyme system that catalyzes the oxidation of toluene to *p*-cresol in *Pseudomonas mendocina* KR1. J. Bacteriol. **173**:3010–3016.