UNIVERSITA' DEGLI STUDI DELLA TUSCIA

FACOLTA’ di SCIENZE MATEMATICHE, FISICHE e NATURALI

DIPARTIMENTO di SCIENZE AMBIENTALI

Dottorato di Ricerca in Genetica e Biologia Cellulare
XXI ciclo

Il *meta-cleavage pathway* di *Pseudomonas* sp. OX1: regolazione trascrizionale e studi di attività enzimatiche

settore scientifico-disciplinare: BIO11

Coordinatore: Prof. Giorgio Prantera

Tutor: Prof.ssa Carla Caruso

Dottoranda: Dr.ssa Valeria Stancarone

Ai miei genitori e

a mia sorella Laura

Ringraziamenti

Vorrei esprimere la mia gratitudine a tutti coloro che mi hanno accompagnata e sostenuta durante questa splendida esperienza perché grazie ai loro insegnamenti, consigli e, semplicemente, grazie alla loro amicizia tutto ciò è stato possibile!

In primo luogo desidero ringraziare la Prof.ssa Carla Caruso e il Prof. Carlo Caporale che in tutti questi anni mi hanno guidata lungo questo percorso professionale. I loro insegnamenti e la fiducia mostrata verso le mie capacità hanno fatto sì che questo lavoro si completasse in una tesi!

Un grazie di cuore va alla Dott.ssa Laura Bertini che mi ha insegnato a muovere i primi passi di questa ricerca e che, per tutto questo tempo, mi ha sempre seguito con grande competenza e disponibilità. La ringrazio per i suoi preziosi consigli e per la sua amicizia!

Un ringraziamento particolare va alla Dott.ssa Silvia Proietti e al Dott. Marco Testa, miei colleghi ma soprattutto amici. Con loro ho condiviso tutti i momenti belli e brutti di questa esperienza: abbiamo lavorato fianco a fianco, ci siamo divertiti, abbiamo discusso, mi hanno sempre sostenuta. È stato veramente bello lavorare con voi!

Un sincero ringraziamento va alla Dott.ssa Iris Di Berardino per l'aiuto che mi ha sempre dato, per i suoi consigli, per il suo affetto e la sua amicizia. La ringrazio per aver reso piacevole ed indimenticabile il lavoro svolto insieme!

Ringrazio tutte le persone che ho conosciuto in questi anni perché è anche grazie a molti di loro che questo lavoro è stato possibile: le Dott.sse Annunziata Cascone, Serena Bucossi e Valentina Cannucciari, Sara Cempella e Roberta Volante; i Dott. Fabrizio De Cesare e Tonino Del Re.

Vorrei ringraziare anche alcuni amici, Alessandra, Mirco, Maurizio, Benso, Paola e Federica, perché hanno sempre mostrato curiosità ed interesse verso la mia attività, aiutandomi nei momenti di difficoltà e condividendo i miei successi.

Infine il grazie più grande ed importante va alla mia famiglia: a mio padre e a mia madre che con grandi sacrifici mi hanno sempre sostenuto ed incoraggiato permettendomi di realizzare questo sogno e di diventare la persona che sono oggi; a mia sorella Laura che è stata la mia valvola di sfogo nei momenti più difficili e la mia più grande fan.

Sommario

Il rilascio nell'ambiente di composti di natura aromatica, che tendono ad accumularsi a causa della loro stabilità, rappresenta uno degli aspetti più importanti nell'ambito delle problematiche di biorisanamento. I principali inquinanti di natura aromatica sono componenti del petrolio e dei suoi derivati, che trovano ampio utilizzo come solventi o come precursori per la produzione di numerosi composti chimici. Poiché la distribuzione di questi inquinanti nell'ambiente è ubiquitaria e il loro effetto sull'uomo è estremamente nocivo, risulta chiaro il sempre maggiore interesse nello sviluppo di processi per la loro biodegradazione.

Tra gli idrocarburi aromatici si trovano semplici molecole come toluene e xileni, anelli sostituiti contenenti gruppi alo- e nitro-, ma anche molecole molto più complesse come gli idrocarburi aromatici policiclici. La degradazione biologica dei composti chimici tossici e recalcitranti come gli idrocarburi aromatici rappresenta un'alternativa attraente ai metodi convenzionalmente usati per lo smaltimento degli inquinanti. Molti microrganismi naturalmente presenti nel suolo e nelle acque hanno evoluto vie metaboliche per sopravvivere in presenza di composti chimici altrimenti tossici; nonostante ciò ancora un elevato numero di molecole aromatiche risulta essere recalcitrante alla biodegradazione.

La conoscenza sempre più approfondita della struttura e della funzione delle vie metaboliche coinvolte nella biodegradazione di inquinanti ambientali, insieme alle tecniche di ingegneria genetica, offrono la possibilità di creare enzimi con una aumentata attività catalitica o di accelerare l'evoluzione di una via metabolica capace di degradare uno o una famiglia di composti aromatici recalcitranti.

I batteri appartenenti al genere *Pseudomonas* rappresentano il gruppo più vasto di microrganismi in grado di utilizzare, in condizioni aerobiche, molti composti aromatici ed alifatici come unica fonte di carbonio ed energia.

Pseudomonas sp. OX1 mostra differenti funzioni rilevanti per la decontaminazione ambientale: ha la capacità di metabolizzare *o*-xilene, toluene, benzene, fenolo, 2,3- e 3,4-dimetilfenoli ed i cresoli, ma non è capace di utilizzare *m*- e *p*-xilene come fonte di carbonio ed energia. I geni codificanti gli enzimi per il catabolismo del toluene e di *o*-xilene sono organizzati, nel cromosoma di *P.* sp. OX1, in due operoni: uno, l'operone *tou* (***t****oluene* ***o****-xylene* ***u****tilization*) codifica un complesso multienzimatico chiamato ToMO (Toluene *o*-xilene MonoOssigenasi); l'altro, l'operone *phe*, comprende un *cluster* genico codificante le varie subunità di una Fenolo Ossidrilasi (PH) e, a valle, i geni codificanti gli enzimi del *lower-meta pathway*.

I complessi multienzimatici ToMO e PH catalizzano le reazioni dell'*upper pathway*: i prodotti finali delle attività di ToMO e PH (catecoli metil-sostituiti) vanno incontro ad una successiva degradazione mediante il *lower-meta pathway* con formazione di intermedi del ciclo degli acidi tricarbossilici.

Molte informazioni sono già disponibili relativamente ai loci codificanti ToMO e PH: i due complessi ricombinanti sono stati ricostituiti ed espressi *in vitro*, dimostrando la loro attività enzimatica, dal gruppo di ricerca del Prof. Di Donato dell'Università Federico II di Napoli. La caratterizzazione del *lower-meta pathway*, invece, non è stata ancora completata. È stato dimostrato che l'operone *phe* ha un'organizzazione genica omologa all'operone *dmp* (***d****i-****m****ethyl-****p****henol*) di *Pseudomonas* sp. CF600. Il gruppo di ricerca del Prof. Di Donato ha espresso, caratterizzato e purificato gli enzimi coinvolti nelle prime reazioni del *meta pathway*: la catecolo 2,3 diossigenasi (C2,3O), codificata dal gene *pheB*, la semialdeide 2-idrossimuconica deidrogenasi (HMSD), codificata dal gene *pheC*, e la semialdeide 2-idrossimuconica idrolasi (HMSH), codificata dal gene *pheD*. La C2,3O catalizza la reazione di apertura dell'anello aromatico dei catecoli derivati dall'*upper pathway*: l'apertura dell'anello del catecolo avviene sempre in posizione extradiolica con produzione di semialdeide 2-idrossimuconica (HMS). Gli enzimi HMSD e HMSH hanno come substrato i prodotti del taglio della C2,3O.

Il sequenziamento dei geni del *meta pathway*, per la completa caratterizzazione dell'operone *phe*, è stato portato a termine dal gruppo della Prof.ssa Carla Caruso dell'Università degli Studi della Tuscia di Viterbo: è stata delucidata la sequenza degli ultimi geni *pheG,F,H,I* codificanti la 4-idrossi-2-oxovalerato aldolasi (HOA) e l'aldeide deidrogenasi (acetilasi) (ADA) (geni *pheG* e *pheF)*, la 4-oxalocrotonato decarbossilasi (4OD) e la 4-oxalocrotonato isomerasi (4OI) (geni *pheH* e *pheI*).

L'esistenza di un elevato grado di identità tra le sequenze polipeptidiche dedotte delle proteine ADA e HOA *phe* di *P*. sp. OX1 e le sequenze polipeptidiche degli enzimi omologhi DmpF e DmpG di *P*. sp. CF600, di cui sono note le strutture cristallografiche disponibili in internet nella banca dati PDB, ha dato la possibilità di effettuare analisi di *homology modeling* procedendo nella caratterizzazione strutturale attraverso la realizzazione dei modelli tridimensionali delle due proteine.

Il lavoro descritto in questa tesi di dottorato ha come obiettivo la caratterizzazione biochimica degli enzimi ADA ed HOA del *lower-meta pathway* di *Pseudomonas* sp. OX1 e la delucidazione del meccanismo trascrizionale da cui dipende l'espressione dei geni *phe*.

Le proteine ADA e HOA si associano in un complesso enzimatico bifunzionale grazie al quale il prodotto dell'aldolasi HOA, l'acetaldeide, è incanalata direttamente verso il sito

attivo di ADA, proteggendo la cellula dalla sua tossicità. La deidrogenasi ADA richiede come cofattori NAD^+ e CoA per trasformare l'acetaldeide in acetil-CoA. Quest'ultimo e il piruvato, prodotto da HOA insieme all'acetaldeide, sono i prodotti finali del *pathway* che verranno incanalati nel ciclo degli acidi tricarbossilici.

La caratterizzazione funzionale degli enzimi ADA ed HOA coinvolti in questo evento di *channeling* enzimatico è iniziata con la costruzione di un sistema eterologo per la produzione delle proteine ricombinanti in *E. coli*. Successivamente è stata realizzata la loro purificazione e lo studio dei loro parametri cinetici. La caratterizzazione delle proteine ricombinanti e l'analisi delle proprietà catalitiche dell'enzima bifunzionale *phe*ADA-HOA è importante, insieme alla struttura 3D predetta, per realizzare una fine correlazione struttura-funzione.

Pseudomonas sp. OX1 è capace di crescere utilizzando *o*-xilene come unica fonte di carbonio ma non è capace di metabolizzare *m*- e *p*-xilene. A partire da questi due isomeri dello xilene ToMO e PH catalizzano la progressiva ossidazione dell'anello aromatico per dare 3,5- e 3,6-dimetilcatecoli che non vengono metabolizzati dalla C2,3O, risultando tossici per la cellula. Ciononostante, *Pseudomonas* sp. OX1 conserva nel suo cromosoma i geni per il catabolismo di *m*- e *p*-xilene omologhi ai geni *xyl* del plasmide TOL di *Pseudomonas putida* mt-2, un ceppo che normalmente utilizza questi composti come substrati di crescita.

In ambienti contaminati dai due isomeri dello xilene sono stati isolati mutanti spontanei di *Pseudomonas* sp. OX1 in grado di attaccare tali composti ma non l'*o*-xilene: il catabolismo procede mediante il TOL *pathway* attraverso la progressiva ossidazione del gruppo metilico che porta a metilcatecoli non letali. Si ritiene che i geni *xyl* siano stati acquisiti in seguito al trasferimento di un trasposone catabolico: nel ceppo *wild-type* tale operone è inattivato da una sequenza di inserzione impedendo la crescita su *m*- e *p*-xilene, mentre nel mutante la sequenza di inserzione traspone nel locus codificante ToMO bloccando l'utilizzo dell'*o*-xilene.

Nel corso di questo dottorato di ricerca è stato realizzato l'isolamento dei geni *xyl-likeQK* codificanti l'aldeide deidrogenasi (acetilasi) ADA e l'aldolasi HOA, omologhi ai geni *xyl* di *Pseudomonas putida* mt-2. In seguito è stata affrontata la caratterizzazione funzionale degli enzimi xyl-like ADA ed HOA a partire dalla costruzione di un sistema eterologo per la produzione delle proteine ricombinanti in *E. coli*. Dopo la loro purificazione e lo studio dei parametri cinetici, la caratterizzazione dell'enzima bifunzionale xyl-like ADA-HOA è proseguita in uno studio di *homology modeling* che ha portato alla realizzazione della struttura 3D del complesso enzimatico.

Nei microrganismi, la capacità di attivare o silenziare in maniera estremamente rapida l'espressione di vie metaboliche differenti è fondamentale per l'adattamento ad un ambiente mutevole, assicurando la *performance* non solo della singola cellula, ma anche della popolazione batterica e perfino della comunità microbica. I promotori batterici possono processare vari segnali fisico-chimici e metabolici per regolare la loro attività: in particolare tali segnali sono mediati da specifiche proteine di regolazione. Molti operoni per il catabolismo dei composti aromatici sono regolati attraverso un circuito σ^{54}dipendente. La RNA polimerasi contenente il fattore alternativo σ^{54} riconosce e lega una classe di promotori caratterizzata dalla presenza di motivi GG e GC nelle posizioni -24 e -12, rispettivamente. Elementi definiti *enhancer-like* o UASs (*Upstream Activating Sequences*), localizzati a circa 100 o 200 bp a monte delle sequenze -12/-24, sono le regioni a cui si legano le proteine di regolazione. La σ^{54}-RNAP forma complessi chiusi stabili con il promotore ma è incapace di catalizzare l'isomerizzazione verso il complesso aperto che avvia la trascrizione. L'isomerizzazione si realizza solo in seguito all'interazione con un attivatore trascrizionale appartenente alla classe NtrC-*like*. Questi attivatori presentano tre domini strutturali e funzionali: il dominio amino-terminale A, che riconosce e lega la molecola aromatica come effettore; il dominio carbossi-terminale D che lega il DNA, e il dominio centrale C con attività ATPasica. In assenza dell'effettore, il dominio A agisce come repressore intramolecolare bloccando il regolatore in una forma inattiva; l'interazione tra il dominio A e la specifica molecola effettrice rimuove questo blocco, permettendo il passaggio alla forma attiva capace di interagire con il DNA e la σ^{54}-RNAP, promuovendo così la trascrizione.

È noto il meccanismo che regola l'espressione dei geni *tou*: un regolatore trascrizionale appartenente alla famiglia degli attivatori NtrC-*like*, detto TouR, controlla positivamente l'espressione di ToMO. *Pseudomonas* sp. OX1 è il primo ceppo che degrada il toluene in cui un operone codificante una toluene-monoossigenasi (*tou operon)* è stato trovato associato ad un operone *dmp-like* (*phe operon*). La presenza dell'operone *phe* e di un regolatore responsivo a fenolo e metil-fenoli (TouR) nel genoma di *Pseudomonas* sp. OX1 suggerisce che, in questo ceppo, la via per il catabolismo di toluene e di *o*-xilene si sia evoluta in seguito ad un evento di espansione verticale che ha portato all'incorporazione del *cluster* genico *tou* in una via preesistente per il catabolismo del fenolo. Considerando valida l'ipotesi che il locus *tou* sia stato acquisito nel genoma di *Pseudomonas* sp. OX1 in seguito ad un evento di espansione di una via catabolica preesistente, si ritiene che anche l'espressione dell'operone *phe* sia sotto il controllo di un promotore σ^{54}-dipendente e che possa essere regolata positivamente da TouR o da un attivatore appartenente alla stessa famiglia.

Un ulteriore obiettivo della ricerca è l'isolamento e la caratterizzazione della regione promotrice P*phe*. La regione 5' non tradotta dell'operone *phe* di *Pseudomonas* sp. OX1 è stata isolata e caratterizzata. Successivamente sono stati realizzati un serie di esperimenti che hanno portato all'isolamento e all'identificazione di un putativo fattore di regolazione dell'espressione del *phe operon*.

La capacità mostrata da *Pseudomonas* sp. OX1 di crescere su diversi substrati aromatici, insieme alla possibilità di esprimere geni silenti in risposta a cambiamenti delle condizioni ambientali, conferisce a questo microrganismo una straordinaria versatilità metabolica che lo rende un candidato ottimale da impiegare nell'ambito del biorisanamento ambientale.

Abstract

The release of aromatic compounds in the environment, which accumulate due to their stability, is one of the most important issues in bioremediation. The main pollutants in nature are components of petroleum and its refined products, which find wide use as solvents or as precursors for the production of several chemical compounds. Since the distribution of these pollutants in the environment is ubiquitous and their effect on humans health is extremely harmful, it is clear the increasing interest in developing processes for their biodegradation.

Among the aromatic hydrocarbons are simple molecules such as toluene and xylenes, rings replaced alo- and nitro-containing groups, but also much more complex molecules as polycyclic aromatic hydrocarbons. The biodegradation of toxic and recalcitrant chemicals, such as the aromatic hydrocarbons, represents an attractive alternative to conventionally used methods for the disposal of pollutants. Many genera of microorganisms, naturally present in soil and water, evolved metabolic pathways to survive in the presence of otherwise toxic chemicals; nevertheless still a large number of aromatic molecules appear to be recalcitrant to biodegradation.

The thorough knowledge of the structure and function of metabolic pathways involved in the biodegradation of environmental pollutants, along with genetic engineering, offers the ability to create enzymes with an increased catalytic activity or to accelerate the evolution of a metabolic pathway that can degrade only one compound or a whole family of aromatic recalcitrant compounds.

The bacteria belonging to the genus *Pseudomonas* represent the largest group of microorganisms able to use, under aerobic conditions, many aromatic and aliphatic compounds as the sole carbon and energy source.

Pseudomonas sp. OX1 shows relevant functions to the environmental decontamination; it has the ability to metabolize *o*-xylene, toluene, benzene, phenol, 2,3- and 3,4-dimethylphenol and cresols, but it is not able to use *m*-and *p*-xylene as carbon and energy source.

The genes coding for toluene and *o*-xylene catabolism are localized in the chromosome of *P*. sp. OX1 and they are organized into two operons: the *tou* operon (**t**oluene ***o*-**xylene **u**tilization) encodes a multienzymatic complex called ToMO (Toluene *o*-xylene Monoxygenase); the *phe* operon includes a gene cluster coding the subunits of a Phenol Hydroxylase (PH) and the enzymes of the lower-meta pathway.

ToMO and PH catalyze upper pathway reactions: the final products of ToMO and PH activities (methyl-substituted catechols) undergo a further degradation through the lower-meta

pathway, leading to intermediate of the tricarboxylic acid cycle.

Many informations are available for ToMO and PH. The two recombinant complexes were reconstituted and expressed *in vitro*, demonstrating their enzymatic activity, by the Prof. Di Donato team from Federico II University in Naples.

The characterization of the lower-meta pathway has not yet been completed. It was shown that the *phe* operon has an homologous genetic organization to *dmp* operon (di-methyl-phenol operon) of *Pseudomonas* sp. CF600. The research group previously mentioned also expressed, purified and characterized the enzymes involved in the initial reactions of the meta pathway: the catechol 2,3 dioxygenase (C2,3O), encoded by the *pheB* gene, the 2-dehydrogenase (HMSD), encoded by the *pheC* gene, and the 2- hydroxymuconic semialdehyde hydrolase (HMSH), encoded by the *pheD* gene. The C2,3O catalyzes the extradiolic aromatic ring cleavage reaction of upper pathway catechol derivatives, with production of 2-hydroxymuconic semialdehyde (HMS). The meta cleavage products are metabolized by HMSD or by HMSH.

The sequencing of the meta pathway genes, for the *phe* operon complete characterization, was completed by the group of Prof. Carla Caruso of the University of Tuscia in Viterbo. The sequence of *pheGFHI* genes has been elucidated: they encode the 4-Hydroxy-2-oxovalerate Aldolase (HOA) and the Aldehyde dehydrogenase (acylating) (ADA) (*pheG* and *pheF* genes), the 4-Oxalocrotonate Decarboxylase (4OD) and the 4-Oxalocrotonate Isomerase (4OI) (*pheH* and *pheI* genes).

An high degree of identity is between the aminoacidic sequences of ADA and HOA enzymes from *P*. sp. OX1 and the corresponding DmpF and DmpG enzymes characterized in *P*. sp. CF600; moreover, the crystallographic structures of DmpF and DmpG are available on the PDB (Protein Data Bank) database. Therefore, was performed an homology modeling study to realize the three-dimensional models of the two proteins for their structural characterization.

The aims of this thesis are biochemical characterization of lower-meta pathway ADA and HOA enzymes from *Pseudomonas* sp. OX1 and the elucidation of the transcriptional mechanism by which the *phe* genes expression is regulated.

ADA and HOA are associated in a bifunctional enzyme complex by which the HOA product, acetaldehyde, is channeled directly into the ADA active site, protecting the cell from its toxicity. ADA requires NAD^+ and CoA as cofactors to turn acetaldehyde into acetyl-CoA.

Pyruvate and acetyl-CoA are the final products of the pathway and they will be channeled into tricarboxylic acid cycle.

The functional characterization of ADA and HOA enzymes involved in this channelling, begins with the construction of a heterologous system for the production of recombinant proteins in *E. coli* and it is continued with the purification and the study of their kinetic parameters. The characterization of recombinant proteins and the analysis of their catalytic properties, together with the predicted 3D structure, will to achieve a fine structure-function correlation.

Pseudomonas sp. OX1 is able to grow using *o*-xylene as the sole carbon source but it is not able to metabolize *m*-and *p*-xylene. From these two isomers of xylene, ToMO and PH catalyze the oxidation of the aromatic ring to give 3,5- and 3,6-dimethylcatechols, that are not metabolized by C2,3O, resulting toxic to the cell. However, *Pseudomonas* sp. OX1 retains genes for the catabolism of *m*- and *p*-xylene, omologs to *xyl* genes of the TOL plasmid of *Pseudomonas putida* mt-2, a strain that normally uses these compounds as growth substrates. In environments contaminated by the two isomers of xylene, spontaneous mutant of *Pseudomonas* sp. OX1 able to metabolized these compounds, but not the *o*-xylene, have been isolated: the catabolism proceeds through the TOL pathway, through the progressive oxidation of methyl group that leads to not lethal methylcatechols. It is believed that *xyl* genes have been acquired by a catabolic transposons: in wild-type strain that operon is inactivated by an insertion sequence, preventing the growth on *m*- and *p*-xylene; in the mutants, the insertion sequence transposes in the locus coding ToMO, blocking the use of *o*-xylene.

During this work, were isolated the genes coding xyl-like enzymes: the Aldehyde dehydrogenase (acylating) ADA and the Aldolase HOA, corresponding to the *xylQK* genes from *Pseudomonas putida* mt-2. We created an heterologous system for the production of recombinant proteins in *E. coli*. After their purification and the study of kinetic parameters, we characterized Xyl-like ADA-HOA bifunctional enzyme structure by an homology modeling study to create the 3D structure of the enzyme complex.

In microorganisms, the ability to readily activate or silence the expression of different metabolic pathways is essential for adapting to a changing environment, ensuring the performance not only of the single cell, but also of population and even of the microbial community. Promoters have to process different physicochemical and metabolic signals to regulate their activities: those signals are mediated by specific regulatory proteins. Many operons for the catabolism of aromatic compounds are regulated by means of σ^{54}-dependent circuit. The RNA polymerase (RNAP) containing the alternative sigma factor σ^{54} recognizes and binds a class of promoters, which are characterized by GG and GC motifs at positions -24 and -12, respectively. Enhancer-like elements or UASs (Upstream Activating Sequences), located about 100 or 200 bp upstream of -12/-24 regions, represent the binding site of

regulatory proteins. The σ^{54}-RNAP forms stable closed complexes with the promoter and is unable to catalyze the isomerization to the open complex initiating transcription. The isomerization takes place only upon interaction with an NtrC-like transcriptional activator. These activators have three structural and functional domains: the amino-terminal A domain, which recognizes and binds effector molecules; the carboxy-terminal D domain that binds the DNA, and the central C domain with ATPase activity. In the absence of effectors, the A domain acts as an intramolecular repressor, blocking the regulator in an inactive form; the interaction between the A domain and the specific effector removes this repression, leading to the active form, able to interact with DNA and σ^{54}-RNAP and promoting transcription.

We know the mechanism that regulates the expression of *tou* genes: a transcriptional regulator belonging to the family of activators NtrC-like, TouR, positively controls the expression of ToMO. *Pseudomonas* sp. OX1 is the first strain that degrades toluene in which the toluene-monooxygenase encoding operon (*tou* operon) has been found associated to a *dmp*-like operon (*phe* operon). The presence of a *dmp-like* operon (*phe* operon) together with a phenol responsive regulator (TouR) suggests that, in this strain, the toluene and *o*-xylene catabolic pathway evolved by vertical expansion which led to the incorporation of the *tou* gene cluster in a preexisting route for phenol catabolism. This observation suggest that the *phe* operon expression is under the control of a σ^{54}-dependent promoter and can be regulated positively by TouR or another activator belonging to the same family.

A further objective of this research is the isolation and characterization of the Pphe promoter region. The *phe* operon 5' non-translated region of *Pseudomonas* sp. OX1 was isolated and characterized. Were subsequently made a series of experiments that led to isolation and identification of a putative regulation factor of the *phe* operon.

The ability shown by *Pseudomonas* sp. OX1 to grow on different aromatic substrates with the ability to express otherwise silent genes in response to changes in environmental conditions, gives an extraordinary metabolic versatility that makes this strain an ideal candidate to be used in bioremediation.

INDICE

Capitolo 1

Introduzione 1

1.1 Degradazione anaerobica dei composti aromatici 6
1.2 Degradazione aerobica dei composti aromatici 12
1.3 Upper pathways per la degradazione di composti aromatici 18
1.4 Plasmidi catabolici: il plasmide pWW0 e il plasmide pVI150 22
1.5 *Pseudomonas* sp. OX1 29
1.6 Degradazione dei tre isomeri dello xilene in *P.* sp. OX1 54
1.7 Controllo trascrizionale 57
1.8 L'ingegneria metabolica per il biorisanamento 65
1.9 Biosensori 67
1.10 Scopo della tesi 71

Capitolo 2

Materiali e Metodi

2.1 Materiali 73
2.2 Strumentazione 74
2.3 Costrutti plasmidici e ceppi batterici 75
2.4 Terreni e condizioni di coltura
2.4.1 Terreno e condizioni di coltura per la crescita delle cellule batteriche di *Escherichia coli* 76
2.4.2 Terreno e condizioni di coltura per la crescita delle cellule batteriche di *Pseudomonas putida* PaW340 76
2.4.3 Terreno e condizioni di coltura per la crescita delle cellule batteriche di *Pseudomonas* sp. OX1 77
2.5 Preparazione di cellule competenti
2.5.1 Preparazione delle cellule competenti di *Escherichia coli* DH5α 77
2.5.2 Preparazione delle cellule competenti di *Escherichia coli* BL21(DE3) 78

2.6 Trasformazione batterica

2.6.1 Trasformazione delle cellule competenti di *E. coli* DH5α con DNA plasmidico 79

2.6.2 Trasformazione delle cellule competenti di *E. coli* BL21(DE3) con DNA plasmidico 80

2.7 Tecniche di purificazione degli acidi nucleici

2.7.1 Estrazione di DNA genomico da *Pseudomonas* sp. OX1 80

2.7.2 Estrazione di DNA cosmidico da *Pseudomonas putida* PaW340 81

2.7.3 Estrazione di DNA plasmidico 82

2.8 Analisi elettroforetiche

2.8.1 Gel di agarosio per DNA 82

2.8.2 SDS-PAGE per analisi di proteine 82

2.9 Reazione a catena della polimerasi (PCR) 83

2.10 Isolamento dei geni *pheFG*, subclonaggio nel vettore plasmidico pGEM-T Easy e sequenziamento 83

2.11 Clonaggio nel vettore di espressione pET-22b(+) del gene *pheG* codificante l'aldolasi HOA 85

2.12 Ingegnerizzazione del vettore pACYC184 per l'espressione del gene *pheF* codificante l'aldeide deidrogenasi acetilante ADA 86

2.13 Clonaggio nel pACET del gene *pheF* 88

2.14 Realizzazione dei costrutti pET-FG-Nde e pET-FG-Nco per l'espressione delle proteine ADA ed HOA 90

2.15 Isolamento dei geni *xyl-likeQK*, subclonaggio nel vettore plasmidico pGEM-T Easy e sequenziamento 92

2.16 Realizzazione dei costrutti pET-QK-Nde e pET-QK-Nco per l'espressione delle proteine ADA ed HOA xyl-like 93

2.17 Condizioni di coltura ed induzione dell'espressione delle proteine ADA e HOA Phe e Xyl-like 94

2.18 Frazionamento cellulare 95

2.19 Purificazione delle proteine dai corpi d'inclusione 95

2.20 Quantificazione delle proteine 96

2.21 Saggi di attività enzimatica

2.21.1 Saggio standard per la deidrogenasi ADA 96

2.21.2 Determinazione delle costanti cinetiche 97

2.22 "Modeling" molecolare **98**

2.23 Identificazione del promotore P*phe* **98**

2.24 Produzione di frammenti biotinilati del promotore P*phe* **100**

2.25 Preparazione di estratti proteici di *Pseudomonas* sp. OX1 **100**

2.26 South-Western **101**

2.27 Analisi mediante spettrometria di massa

2.27.1 Escissione delle bande dal gel di poliacrilammide e digestione triptica 102

2.27.2 Identificazione dei peptidi con RP-nHPLC-ESI-MS/MS 102

2.28 Isolamento del gene *tmbR-like*, subclonaggio nel vettore plasmidico pGEM-T Easy e sequenziamento **103**

Capitolo 3

Risultati e Discussione

PARTE I

Il lower pathway di *Pseudomonas* sp. OX1: gli enzimi ADA e HOA **104**

3.1 Isolamento dei geni *pheF* e *pheG*, subclonaggio nel vettore plasmidico pGEM-T Easy e sequenziamento **105**

3.2 Realizzazione del vettore di espressione pET-HOA **108**

3.3 Ingegnerizzazione del plasmide pACYC184 e realizzazione del costrutto pACET-ADA **109**

3.4 Cotrasformazione di cellule BL21(DE3) con i plasmidi ricombinanti pET-HOA e pACET-ADA e screening delle colonie positive **111**

3.5 Espressione delle proteine ricombinanti **113**

3.6 Realizzazione dei costrutti pET-FG-Nde/B e pET-FG-Nco/B per l'espressione delle proteine ADA ed HOA **116**

3.7 Espressione dell'enzima bi funzionale **118**

3.8 Purificazione dei corpi d'inclusione e rinaturazione delle proteine ricombinanti **120**

3.9 Saggi di attività enzimatica per testare l'attività della deidrogenasi ADA **122**

PARTE II

L'operone xyl-like di *Pseudomonas* sp. OX1 per il catabolismo di *m*- e *p*-xilene 126

3.10 Isolamento dei *geni xyl-likeQK*, subclonaggio nel vettore plasmidico pGEM-T Easy e sequenziamento 127

3.11 Studi di omologia 131

3.12 "Modeling" molecolare 135

3.13 Realizzazione del costrutto pET-QK-Nde per l'espressione delle proteine ADA ed HOA xyl-like 143

3.14 Saggi di attività enzimatica per testare l'attività della deidrogenasi ADA xyl-lke 146

PARTE III

Caratterizzazione del promotore P*phe* 149

3.15 Identificazione del promotore P*phe* 150

3.16 Produzione di frammenti biotinilati del promotore P*phe* 154

3.17 South-Western 155

3.18 Analisi mediante spettrometria di massa 158

3.19 Isolamento del gene codificante il regolatore TmbR-like 161

Capitolo 4

Conclusioni 170

Appendici 176

Bibliografia 179

CAPITOLO 1

Introduzione

La biomassa terrestre è costituita per il 25% da molecole che hanno un anello benzenico come principale elemento della loro struttura. Le piante verdi producono la quasi totalità di tali composti da cui sintetizzano la lignina che, pur essendo una sostanza naturale, risulta estremamente recalcitrante alla degradazione. Oltre alle fonti naturali, anche le attività umane contribuiscono al rilascio nell'ambiente di un grande numero di nuove molecole aromatiche. Tali composti si definiscono xenobiotici (dal greco *xenos*, "estraneo alla vita").

Ogni anno più di 6 milioni di tonnellate di rifiuti petroliferi entrano nell'ambiente. La fonte principale è rappresentata da fenomeni di "sversamento" da serbatoi di stoccaggio sotterranei. Anche molte sostanze di sintesi presenti in commercio sono derivati del petrolio. Tali composti vengono usati in grandi quantità, con conseguenze deleterie per la salute dell'uomo e dell'ambiente. I prodotti che causano i danni più gravi sono i policlorobifenili (PCB) ed i pesticidi, in particolare i composti organoclorurati usati come insetticidi ed erbicidi. Stabilità ed idrofobicità sono le caratteristiche che rendono estremamente pericolosi questi composti. Il legame carbonio-cloro, infatti, è molto stabile e la presenza del cloro riduce la reattività degli altri legami presenti nella molecola organica.

Le attività umane e la mancanza di controlli adeguati sono causa dell'inquinamento dei suoli e delle acque. Molti siti inquinati sono aree marine contaminate in seguito a disastri ambientali causati principalmente dalle cosiddette "carrette del mare" e da superpetroliere. L'incidente più recente risale al Dicembre 2007 quando la petroliera Hebei Sprint, da 146.000 tonnellate, venne speronata e furono dispersi nell'acqua del porto sudcoreano di Taenan 15.000 tonnellate di greggio. Le conseguenze di un evento simile possono essere gravissime, basti pensare all'incidente della Exxon Valdez accaduto il 24 marzo 1989: nelle acque al largo dell'Alaska si riversarono 38.800 tonnellate di greggio che contaminarono 2.000 chilometri di coste provocando la morte di 25.000 uccelli di mare, 2.800 lontre, 300 foche, 22 balene e 250 aquile.

Anche l'Italia, purtroppo, è stata scenario di eventi simili: a Livorno, nel Marzo 2007, una nave cisterna, la Chem Star Eagle, ha riversato in prossimità della costa 9 tonnellate di olio combustibile (stirene); nell'Aprile 1991 dalla Haven fuoriuscirono, al largo delle coste genovesi, 50.000 tonnellate di greggio.

A questi eventi si somma l’inquinamento dovuto alle attività agricole ed industriali. Secondo l’APAT (Agenzia per la Protezione dell'Ambiente e per i Servizi Tecnici), i siti potenzialmente inquinati sul territorio italiano sono circa 12.000 ma i dati raccolti in sede nazionale e regionale indicano che tale valore deve essere raddoppiato. I siti di interesse comprendono non solo le aree industriali ma anche le aree portuali, le aree marine antistanti le aree industriali, le zone lagunari, i corsi d'acqua, per un totale di 260.000 ettari di terra, 70.000 ettari di zone marine, 280 km di coste, pari ad un totale di circa 330.000 ettari (più dell'1% del territorio nazionale).

Il numero dei siti contaminati nei paesi più industrializzati è cresciuto esponenzialmente nell’ultimo decennio. Non ci si trova più di fronte a qualche grave caso isolato ma piuttosto bisogna affrontare un problema infrastrutturale e produttivo di notevole intensità ed importanza.

Il risanamento dei siti contaminati al fine di ridurre il livello di inquinamento viene spesso realizzato tramite trattamenti termici o chimico-fisici che però non consentono la completa eliminazione dell’agente inquinante e generano diverse tipologie di problemi. Ad esempio, i suoli inquinati possono essere sottoposti a trattamenti termici, come la termodistruzione, che prevedono l’impiego di elevate temperature (1.500°C-2.000°C) grazie alle quali viene garantita la totale distruzione delle sostanze organiche contaminanti, anche pesticidi e diossine, raggiungendo un’efficienza di rimozione del 99,99%. Si tratta però di processi molto costosi che provocano inoltre una modifica strutturale del terreno (vetrificazione) (U.S. EPA, 1990). I trattamenti fisici sono utilizzati allo scopo di separare, isolare o concentrare le sostanze inquinanti ma non consentono la loro distruzione. Per quanto riguarda i trattamenti chimici, infine, essi prevedono l’uso di agenti estrattivi che possono però reagire con le sostanze presenti nel terreno formando dei composti ancora più dannosi per l’ambiente.

A queste metodologie si è aggiunta un'ulteriore tecnica di smaltimento e trattamento dei rifiuti, quella biotecnologica.

Verso la metà degli anni ‘60 vennero scoperte alcune specie microbiche in grado di degradare i composti chimici tossici, anche xenobiotici. Si ipotizzò così che la degradazione microbica potesse in qualche modo provvedere a risolvere le problematiche ambientali (Glick and Pasternak, 1998). Da allora la ricerca scientifica si è concentrata proprio sulla caratterizzazione di quei microrganismi che sono in grado di utilizzare i composti inquinanti come fonte di energia e carbonio.

Sin dai primi studi è risultato evidente come tali microrganismi siano dotati della capacità di degradare un'ampissima gamma di sostanze chimiche inquinanti naturali e xenobiotiche, in condizioni sia aerobie che anaerobie. Questi studi hanno portato alla realizzazione di nuove tecniche per la decontaminazione di aree inquinate definite bioconversioni. Esse utilizzano sistemi biologici per degradare le sostanze organiche inquinanti presenti nel suolo, nell'acqua o nell'aria, fino a prodotti che entrano nel ciclo del carbonio e dell'azoto. I sistemi biologici impiegati sono microrganismi, quali batteri e funghi, piante e micorrize. I termini *bioremediation* e *phytoremediation* comprendono tutte queste metodologie e rappresentano quel settore delle biotecnologie ambientali destinato, in un futuro prossimo, a cambiare radicalmente i sistemi produttivi e le tecnologie di intervento per la risoluzione di problemi ambientali.

I processi di biorisanamento ambientale offrono molteplici vantaggi rispetto ai processi chimico-fisici:

- non sono inquinanti poiché sono in grado di convertire composti tossici in composti organici innocui;
- sono caratterizzati da bassi costi;
- offrono la possibilità di trattamenti *in situ* (bonifica di tutta la sezione verticale del terreno)
- sono viste con favore dalle popolazioni insediate nei pressi dei siti inquinati poiché l'impatto ambientale è minore rispetto alla costruzione di inceneritori, termovalorizzatori, depositi di stoccaggio o discariche (Timmis *et al*., 1994).

Esistono tuttavia numerose limitazioni proprie dei ceppi microbici naturali potenzialmente adatti al biorisanamento:

- la necessità di operare in determinati *range* di parametri chimico-fisici;
- nessun singolo microrganismo può degradare da solo tutti i rifiuti organici tossici;
- alte concentrazioni di alcuni composti organici tossici possono inibire l'attività o la crescita dei microrganismi degradativi;
- la maggior parte dei siti contaminati contiene miscele di prodotti chimici e un organismo che può degradare uno o più composti della miscela può essere inibito dagli altri componenti;
- molti composti non polari adsorbono sul materiale particolato nel suolo o in sedimenti e diventano sempre meno disponibili ai microrganismi degradativi;
- la biodegradazione microbica dei composti organici è in molti casi lenta (Glick and Pasternak, 1998).

I batteri sono le forme di vita che hanno avuto più successo su questo pianeta. Capaci di colonizzare ambienti con condizioni estreme di temperatura, di pH e di pressione, possono crescere sia in presenza che in assenza di ossigeno.

La maggior parte dei batteri ha solo l'1% del numero di geni che le cellule umane contengono all'interno del loro nucleo. Questa quantità limitata di informazione genetica è sfruttata in modo eccellente, codificando tutti i meccanismi che sono necessari a livello molecolare, fisiologico e cellulare, per sopravvivere e proliferare.

Molti batteri del suolo e delle acque sono particolarmente efficienti nel degradare sostanze organiche ed inorganiche, anche inquinanti, utilizzandole come fonte di carbonio ed energia. Poiché le comunità microbiche naturali non possiedono gli enzimi degradativi necessari per catabolizzare i composti xenobiotici, questi risultano recalcitranti alla degradazione e permangono nell'ambiente a lungo. In alcuni casi si osserva solo una parziale degradazione dei composti xenobiotici. Essi possono essere riconosciuti dai microrganismi come substrato ed essere metabolizzati soltanto quando presentano una struttura chimica simile a quella di un composto naturale. In questi casi, detti di co-metabolismo, l'azione delle vie metaboliche usate normalmente dai microrganismi per i loro rifornimenti energetici e per la crescita, comporta anche la demolizione delle molecole xenobiotiche da cui il microrganismo non trae però alcun beneficio diretto. Una biodegradazione incompleta porta, invece, alla produzione di molecole che possono essere più tossiche dell'inquinante di partenza; ad esempio, la biodegradazione incompleta di tri-cloroetilene o del tetra-cloroetilene produce cloruro di vinile che è più tossico e cancerogeno delle sostanze originarie. Una biodegradazione completa, infine, ha come effetto la detossificazione degli inquinanti per mineralizzazione, ovvero la loro conversione in anidride carbonica, acqua e sali inorganici innocui.

La capacità di degradare completamente o solo in parte uno o più inquinanti ambientali è il risultato dell'adattamento a situazioni ambientali mutevoli: nei 3 miliardi di anni in cui i batteri hanno colonizzato la terra, sono stati esposti a numerose classi di composti, anche tossici, che hanno dato luogo ad una pressione selettiva che ha portato all'evoluzione di nuovi enzimi in grado di modificare o degradare tali molecole. In questo modo si sono evoluti dei catalizzatori biologici dotati di estrema specificità ed efficienza, in alcuni casi in grado di degradare sostanze recalcitranti come gli idrocarburi aromatici (de Lorenzo, 2001).

La biodegradazione degli idrocarburi è un aspetto delle biotecnologie ambientali di fondamentale importanza. Gli idrocarburi sono un gruppo di composti organici costituiti esclusivamente da atomi d'idrogeno e di carbonio. Essi rappresentano una delle classi di sostanze chimiche più utilizzate a causa della loro naturale abbondanza, della loro importanza industriale e del loro esteso uso come fonte primaria d'energia in tutto il mondo. L'interazione microbica con gli idrocarburi ha rappresentato un punto focale per la ricerca negli ultimi 60 anni. Nel 1945, Claude Zobell affermò che "gli effetti multipli dei batteri sulla formazione e trasformazione del petrolio sono una nuova frontiera della cultura" (Zobell, 1945). Da allora, significativi avanzamenti sono stati compiuti in questo campo. Dagli anni '80 molti organismi, sia batteri che funghi, sono stati identificati per la loro capacità di degradare una diversa gamma d'idrocarburi, includendo strutture molecolari alifatiche e aromatiche (Atlas, 1981 e 1995).

La biodegradabilità degli idrocarburi dipende dalla complessità della loro struttura chimica. Strutture più semplici sono più facilmente degradabili, strutture più ramificate, lo sono più lentamente: gli alcani sono degradati più velocemente dei composti aromatici; gli idrocarburi monoaromatici, quali i BTEX (benzene, toluene, etilbenzene e xilene) sono aperti più facilmente dei composti con più anelli (naftaleni).

I composti aromatici sono costituiti da un anello insaturo con la struttura generale C_6R_6, dove R rappresenta il gruppo funzionale. Il benzene (C_6H_6) è il capostipite di questa famiglia. I composti che contengono due o più anelli fusi insieme sono detti idrocarburi policiclici aromatici (IPA). Oltre che nel petrolio, gli IPA si trovano nella lignina e si formano con la combustione del materiale organico causata da un incendio. Alcuni composti aromatici sono cancerogeni per l'uomo e gli IPA possono essere tossici anche per i microrganismi.

La degradazione dei composti aromatici è molto studiata, vista la loro pericolosità nei confronti della salute umana. È stato osservato che una grande varietà di batteri e funghi è capace di degradare parzialmente o completamente alcuni di questi composti. Le insolite strutture chimiche dei composti xenobiotici rappresentano una sfida alle comunità microbiche, che sono i maggiori riciclatori dei prodotti naturali (Gibson and Harwood, 2002).

I microrganismi hanno la capacità di adattarsi abbastanza velocemente alle nuove condizioni ambientali grazie alla loro elevata velocità di crescita, utilizzando differenti meccanismi evolutivi quali: trasferimento genico tramite coniugazione, caratteristico dei batteri, mutazioni puntiformi, ricombinazione e trasposizione (van der Meer *et al.*, 1992). Ciononostante, occorreranno ancora centinaia di anni affinché l'evoluzione tramite selezione naturale favorisca lo sviluppo di vie cataboliche adeguate a degradare completamente le sostanze inquinanti moderne. Ciò ha portato allo sviluppo di due diverse categorie di

tecnologie per il biorisanamento. Una, quale la MNA (*Monitored Natural Attenuation*), utilizza microrganismi autoctoni per la degradazione dei contaminanti presenti in un sito; esperienze pratiche hanno mostrato che meccanismi quali la biodegradazione, la dispersione, la diluizione, l'adsorbimento, la volatilizzazione ed altre reazioni chimiche, in situazioni favorevoli, sono efficaci nell'indurre, in tempi accettabili e senza l'intervento umano, una riduzione della tossicità o mobilità delle sostanze inquinanti. L'altra categoria prevede un tipo di intervento volto a potenziare il processo di biorisanamento mediante l'aggiunta, nell'area inquinata, di microrganismi (*bioaugmentation*) o sostanze nutrienti (*biostimulation*). Inoltre, tramite tecniche di ingegneria genetica, è possibile accelerare il processo evolutivo naturale costruendo ceppi microbici ricombinanti dotati di attività degradative aumentate o nuove, permettendo la biodegradazione di inquinanti recalcitranti e/o xenobiotici (Jain and Sayler, 1987; Vogel, 1996).

1.1 Degradazione anaerobica dei composti aromatici

Per molti anni si è creduto che la degradazione aerobica degli idrocarburi aromatici fosse la sola via esistente per il catabolismo di tali composti da parte di microrganismi. In realtà la degradazione anaerobia degli idrocarburi è possibile sebbene sia un processo piuttosto lento. Essa avviene solo se i composti aromatici contengono almeno un atomo di ossigeno e consiste in una serie di reazioni di riduzione che si distinguono in un "*pathway periferico*" ed in un "*pathway centrale"*.

Le reazioni del "*pathway periferico*" portano alla formazione di un intermedio centrale, il più comune dei quali è il benzoil-CoA, il tioestere del coenzima A con l'acido benzoico (fig.1). Altri *pathways* periferici trasformano alcune molecole aromatiche in intermedi centrali meno frequenti come il resorcinolo.

La degradazione anaerobica di molti acidi aromatici inizia con la loro conversione nei corrispettivi tiosteri del CoA. La formazione dei tioesteri del CoA attiva chimicamente gli aromatici e quindi è un passo di essenziale importanza per l'ulteriore conversione di tali composti.

La degradazione anaerobica di fenolo, anilina, *p*-cresolo, osservata in batteri denitrificanti e solfato-riducenti, coinvolge la carbossilazione dell'anello aromatico che porta alla formazione del 4-idrossi- o 4-ammino-benzoato, poi attivato a tioestere del CoA. Quest'ultimo è, infine, deidrossilato (o deamminato) a benzoil-CoA (fig.1) (Gallert *et al.*,

1991; Gorny and Schink, 1994 a, b, c).

I composti aromatici alogenati sono gli inquinanti che destano particolare preoccupazione ambientale. Gli aromatici alogenati, quando sono degradati in assenza di ossigeno, vanno incontro ad una dealogenazione riduttiva (Fetzner and Lingens, 1994). Si tratta di una reazione in cui avviene il trasferimento di due elettroni che coinvolge il rilascio dell'alogeno come ione alogenuro e la sua sostituzione tramite l'idrogeno (Heider and Fuchs, 1997).

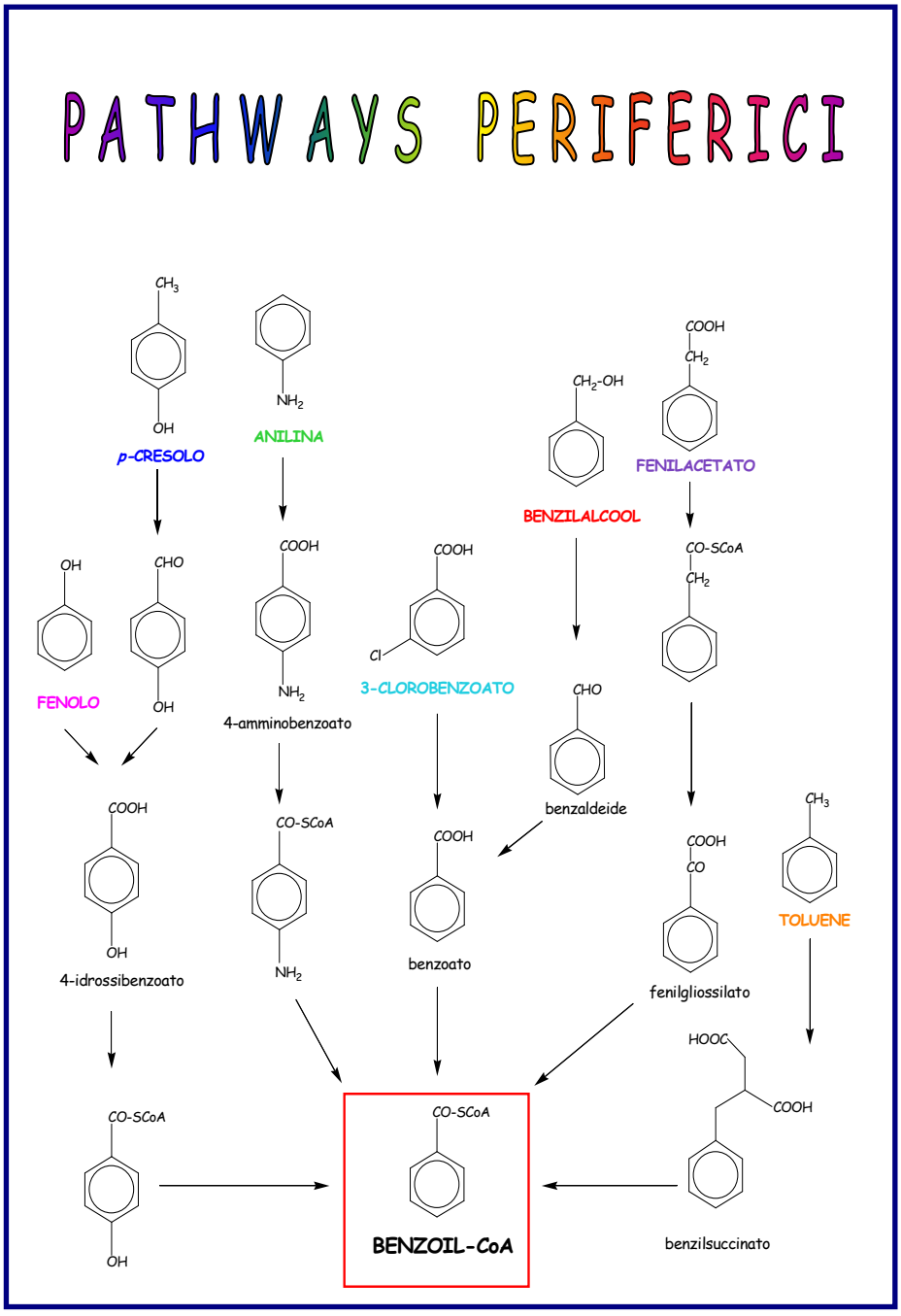


Figura 1. *Pathways periferici della degradazione anaerobica degli idrocarburi aromatici che trasformano alcuni composti aromatici nell'intermedio centrale benzoil-CoA.*

L’enzima chiave nel “*pathway* centrale” della degradazione anaerobica degli idrocarburi aromatici è il benzoil-CoA reduttasi (dearomatizzante) che permette la riduzione dell’anello benzenico. L’attività del benzoil-CoA reduttasi è stata rilevata in vari batteri denitrificanti come *Thauera aromatica* e nel batterio fototrofico *Rhodopseudomonas palustris* (Koch and Fuchs, 1992; Koch *et al*., 1993; Boll and Fuchs, 1995). Il prodotto della riduzione del benzoil-CoA, il cicloesano-1,5-diene-1-carbossil-CoA, viene ossidato così che da una molecola si producono tre molecole di acetil-CoA e una di CO_2, in una sequenza di reazioni che sono analoghe alla β-ossidazione.

La formazione di 6-idrossicicloesano-1-diene-1-carbossil-CoA, deriva dall’aggiunta di acqua. L’ulteriore aggiunta di acqua al doppio legame e l’ossidazione di uno dei gruppi ossidrilici genera un gruppo cheto nel C relativo. Così, il legame C1-C2 dell’anello aliciclico può essere facilmente idrolizzato a formare il prodotto 3-hydroxipimelyl-CoA (fig. 2). La β-ossidazione di quest’ultimo composto può produrre glutaril-CoA più acetil-CoA. La glutaril-CoA deidrogenasi (decarbossilante) produce crotonil-CoA e CO_2. Alla fine vengono prodotte altre due molecole di acetil-CoA. L’acetil-CoA è infine ossidato attraverso il ciclo dell’acido citrico (Heider and Fuchs, 1997).

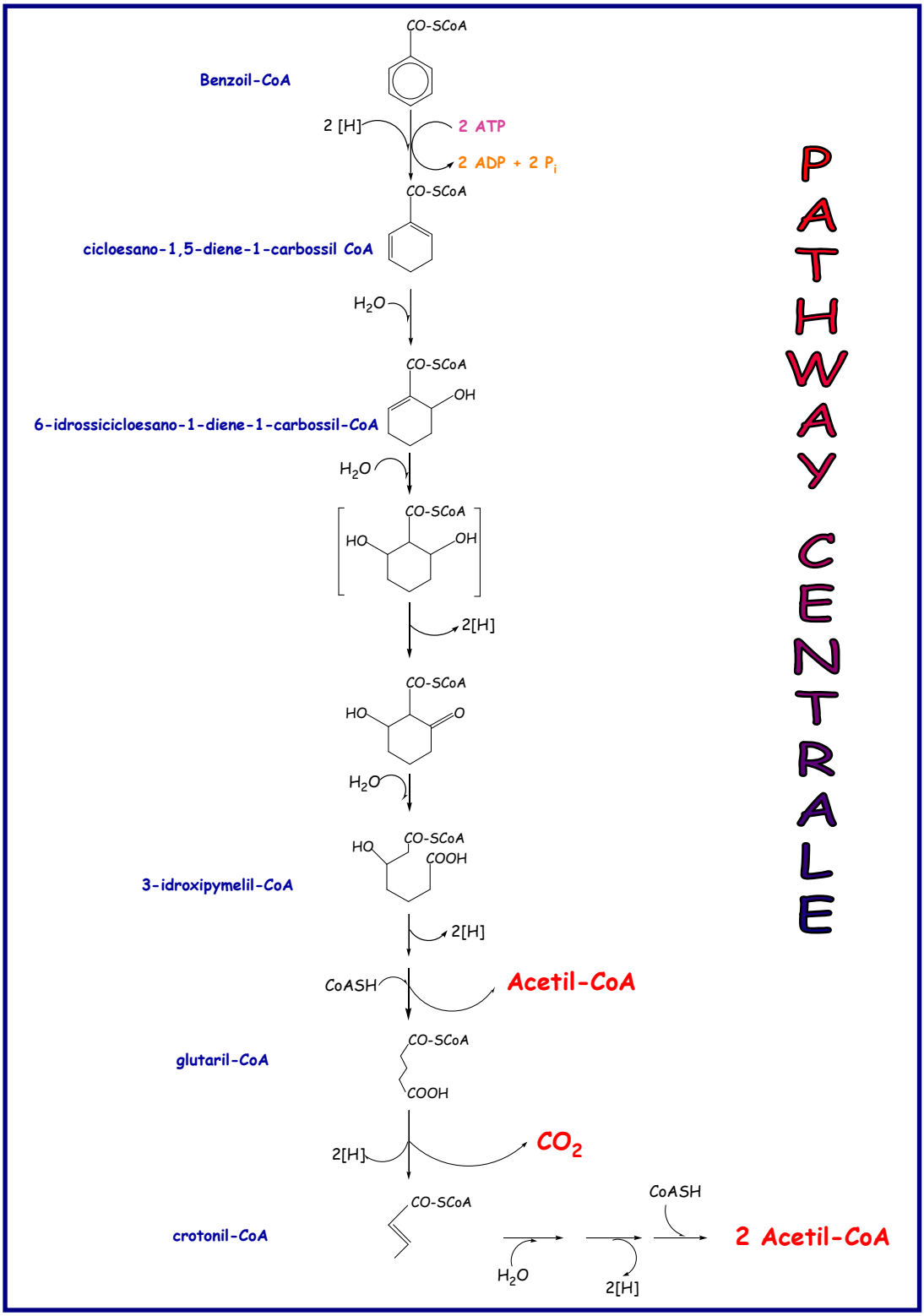


Figura 2. *Pathway centrale della degradazione anaerobica dei composti aromatici. Reazioni coinvolte nella trasformazione del benzoil-CoA in acetil-CoA e CO_2.*

Evidenze sperimentali indicano che benzene, toluene e xilene, composti in cui non è presente l'ossigeno, possono essere degradati in anaerobiosi. Questi diversi composti aromatici sono inizialmente attivati attraverso *pathways* satelliti che producono benzoato, o il corrispondente derivato del CoA, come intermedio comune centrale (Gibson and Harwood, 2002; Zengler *et al.*, 1999). Il benzoil-CoA subisce un'ulteriore riduzione dell'anello, catalizzata dal benzoil-CoA reduttasi, accoppiata all'idrolisi di ATP (Boll and Fuchs, 1995; Boll *et al.*, 1997, 2002), prima che avvenga l'apertura dell'anello e l'ossidazione (Gibson and Harwood, 2002).

Tra i BTEX (benzene, toluene, etilbenzene e xilene), la biodegradazione anaerobica del toluene è la più compresa (Chakraborty and Coates, 2004). Attualmente è riconosciuto che il toluene è biodegradato in presenza di nitrato, Mn (IV), Fe (III), solfato o CO_2, come accettori terminali di elettroni.

Sono noti molti organismi che accoppiano la degradazione anaerobica del toluene alla riduzione del nitrato, come le specie *Thauera* e *Azoarcus*. Tutti i nitrato-riduttori che ossidano il toluene sono anaerobi facoltativi e sono membri della sottoclasse dei Proteobatteri. Questi organismi sono comunemente isolati da fango anaerobico o sedimenti di torrente. Il primo passo nel catabolismo del toluene è l'aggiunta di fumarato al gruppo metilico del toluene (fig.3), mediata dalla benzilsuccinato sintasi (BBS) (Leuthner *et al.*, 1998).

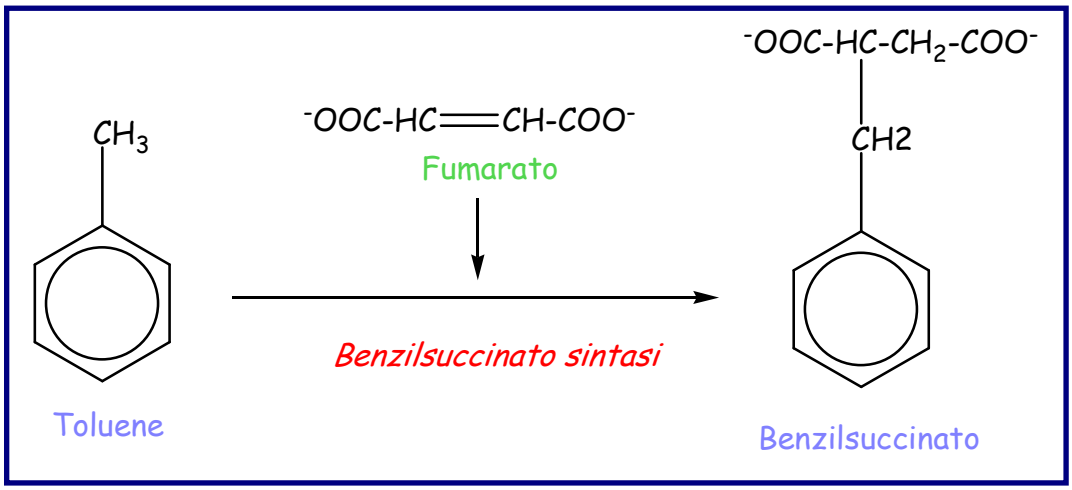


Figura 3. *Attivazione del toluene attraverso l'aggiunta del fumarato al gruppo metilico per formare benzilsuccinato. Questa attivazione sembra essere altamente conservata tra tutti gli organismi conosciuti che degradano il toluene anaerobicamente.*

Per quanto riguarda la degradazione anaerobica del benzene, sono stati identificati due organismi, capaci di realizzarla (Coates *et al.*, 2001). Essi sono membri del genere *Dechloromonas*, appartenente alla sottoclasse beta dei Proteobatteri (Achenbach *et al.*, 2001; Coates *et al.*, 2001). Entrambi i ceppi ossidano completamente il benzene fino a CO_2 in assenza di ossigeno (Coates *et al.*, 2001) ed entrambi accoppiano l'ossidazione del benzene alla riduzione di nitrato. Il *pathway* biochimico della degradazione anaerobica del benzene è sconosciuto ma sono state formulate diverse ipotesi che includono la carbossilazione iniziale, la metilazione, l'idrossilazione o la riduzione dell'anello benzenico con successiva trasformazione dell'intermedio centrale aromatico benzoil-CoA e apertura dell'anello (fig. 4) (Coates *et al.*, 2002).

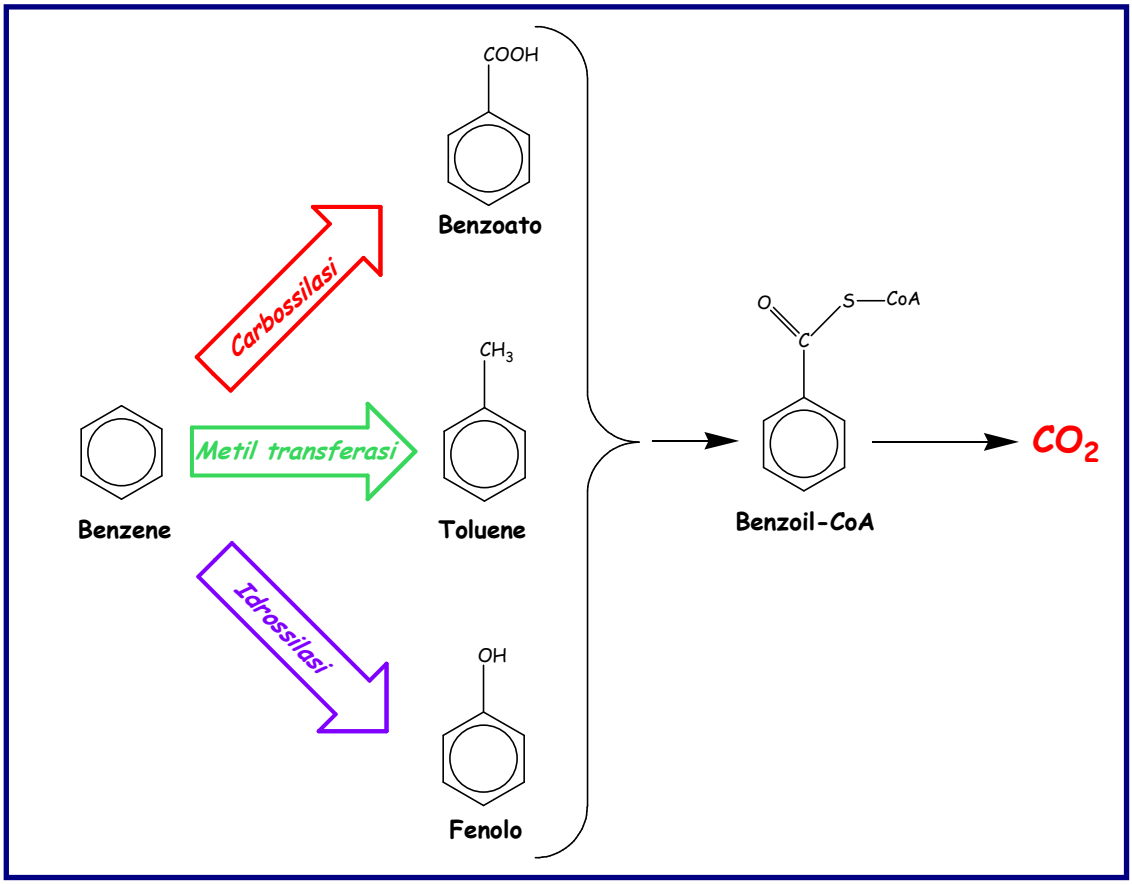


Figura 4. *Reazioni iniziali coinvolte nella degradazione anaerobica del benzene in cui il benzene subisce iniziale carbossilazione, metilazione, o idrossilazione con successiva trasformazione nell'intermedio aromatico centrale benzoil-CoA, apertura dell'anello e ossidazione ad anidride carbonica.*

La degradazione anaerobica dei tre isomeri dello xilene (*meta*-, *orto*- e *para*-xilene) è stata prevalentemente studiata in condizioni nitrato e solfato-riducenti. Anche se gli studi basati su sedimenti o culture di arricchimento hanno dimostrato la biodegradazione del *p*-xilene in assenza di ossigeno (Haner *et al*., 1995; Kuhn *et al*., 1998), non esiste nessuna cultura pura che possa mineralizzare completamente il *p*-xilene a CO_2. Al contrario, sono stati isolati molti organismi che possono realizzare la mineralizzazione completa del *m*- e dell'*o*-xilene accoppiata alla riduzione di nitrato (Hess *et al.*, 1997; Rabus and Widdel, 1995). Molti di questi organismi appartengono alla sottoclasse dei Proteobatteri. Si ipotizza che le reazioni iniziali coinvolte nell'ossidazione anaerobica di *m*-xilene coinvolgano l'aggiunta iniziale di fumarato, mediata dalla 3-metilbenzil-succinato sintasi, ad uno dei gruppi metilici per formare 3-metilbenzilsuccinato, che successivamente è ossidato a 3-metilbenzoato (Krieger, 1999).

1.2 Degradazione aerobica dei composti aromatici

La degradazione aerobica dei composti aromatici è realizzata in presenza di ossigeno e nella maggior parte dei casi gli idrocarburi aromatici sono ossidati a protocatecuato e catecolo (o catecoli sostituiti) che costituiscono gli intermedi centrali della degradazione. Questi intermedi sono poi sottoposti ad ulteriori reazioni di ossidazione che portano alla formazione di acetil-CoA, piruvato ed acetaldeide che saranno incanalati nella via degli acidi tricarbossilici (TCA).

Enzimi di fondamentale importanza per la degradazione aerobica sono le monoossigenasi e le diossigenasi che incorporano l'ossigeno molecolare in composti organici. Le monoossigenasi catalizzano l'incorporazione nella molecola organica di un solo atomo di ossigeno sotto forma di gruppo ossidrilico OH (per questo sono anche dette idrossilasi), mentre il secondo atomo di ossigeno viene ridotto ad acqua. Le diossigenasi invece catalizzano l'incorporazione di entrambi gli atomi di ossigeno nel substrato e si distinguono in diossigenasi di anelli aromatici e in diossigenasi che tagliano l'anello aromatico (Fig. 5 a,b). In tutti questi casi il NAD(P)H rappresenta il donatore primario di elettroni. Molte ossigenasi utilizzano come cofattori Fe (II) o Fe (III) non-emico o presente in cluster ferro-zolfo. In alternativa ai metalli di transizione, le pteridine o flavine possono agire da cofattori delle ossigenasi.

Le ossigenasi svolgono una funzione di fondamentale importanza nella parte iniziale della degradazione dei composti aromatici poiché catalizzano l'introduzione dei gruppi ossidrilici nell'anello aromatico permettendo la sua successiva scissione.

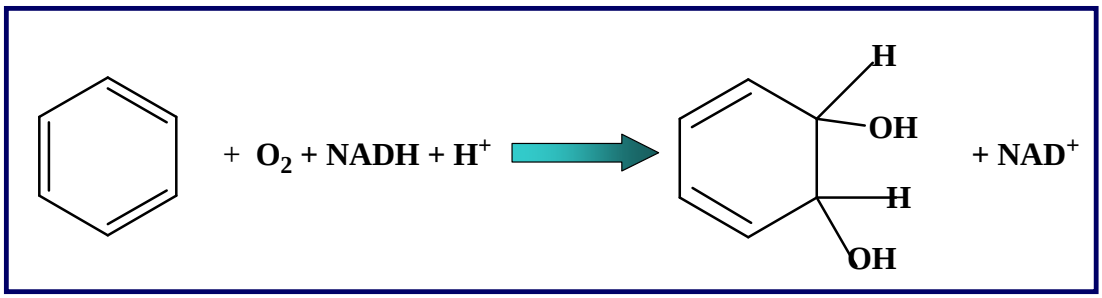


Figura 5 a. *Diossigenasi di anelli aromatici che incorporano due gruppi ossidrilici nell'anello aromatico a spese di ossigeno e NADH.*

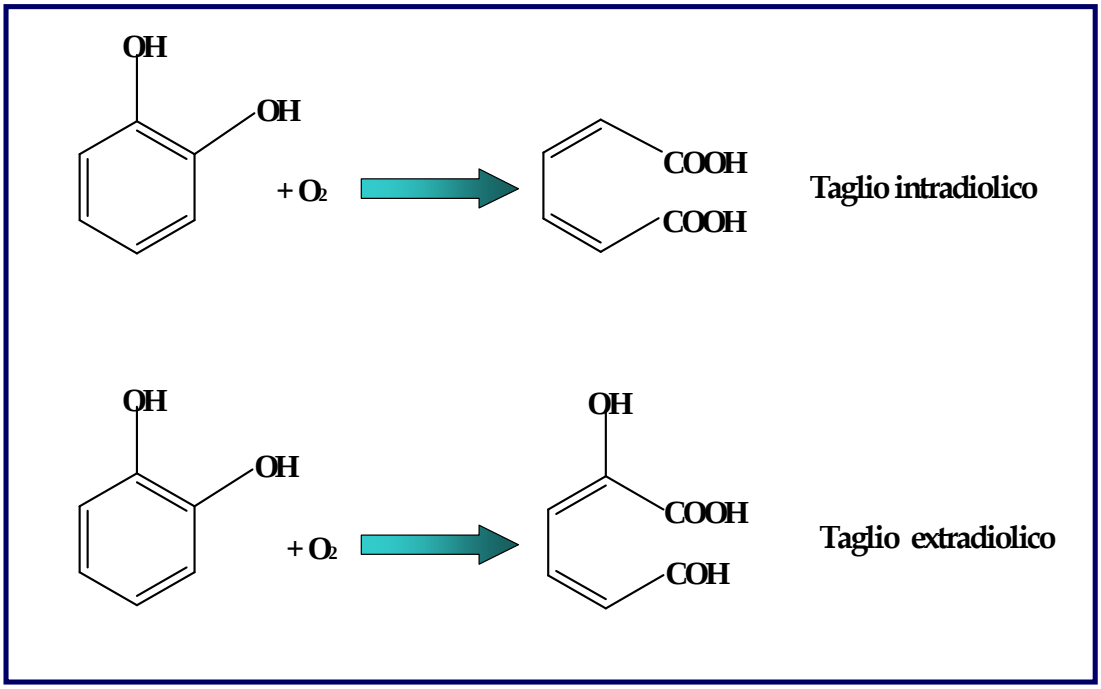


Figura 5 b. *Diossigenasi che tagliano gli anelli aromatici aprono l'anello incorporando due atomi di ossigeno nel substrato*

Nei batteri, le vie metaboliche della degradazione aerobica degli idrocarburi aromatici comprendono due distinti *pathway*s organizzati in operoni modulari, codificanti per un "*upper pathway*" ed un "*lower pathway*".

Gli enzimi dell'"*upper pathway*", monoossigenasi e dioossigenasi, catalizzano la conversione degli idrocarburi aromatici in intermedi diossidrilati, mentre attraverso il "*lower pathway*" si realizza il taglio dell'anello aromatico e la successiva trasformazione degli intermedi in composti alifatici che vengono incanalati nel TCA (fig. 6).

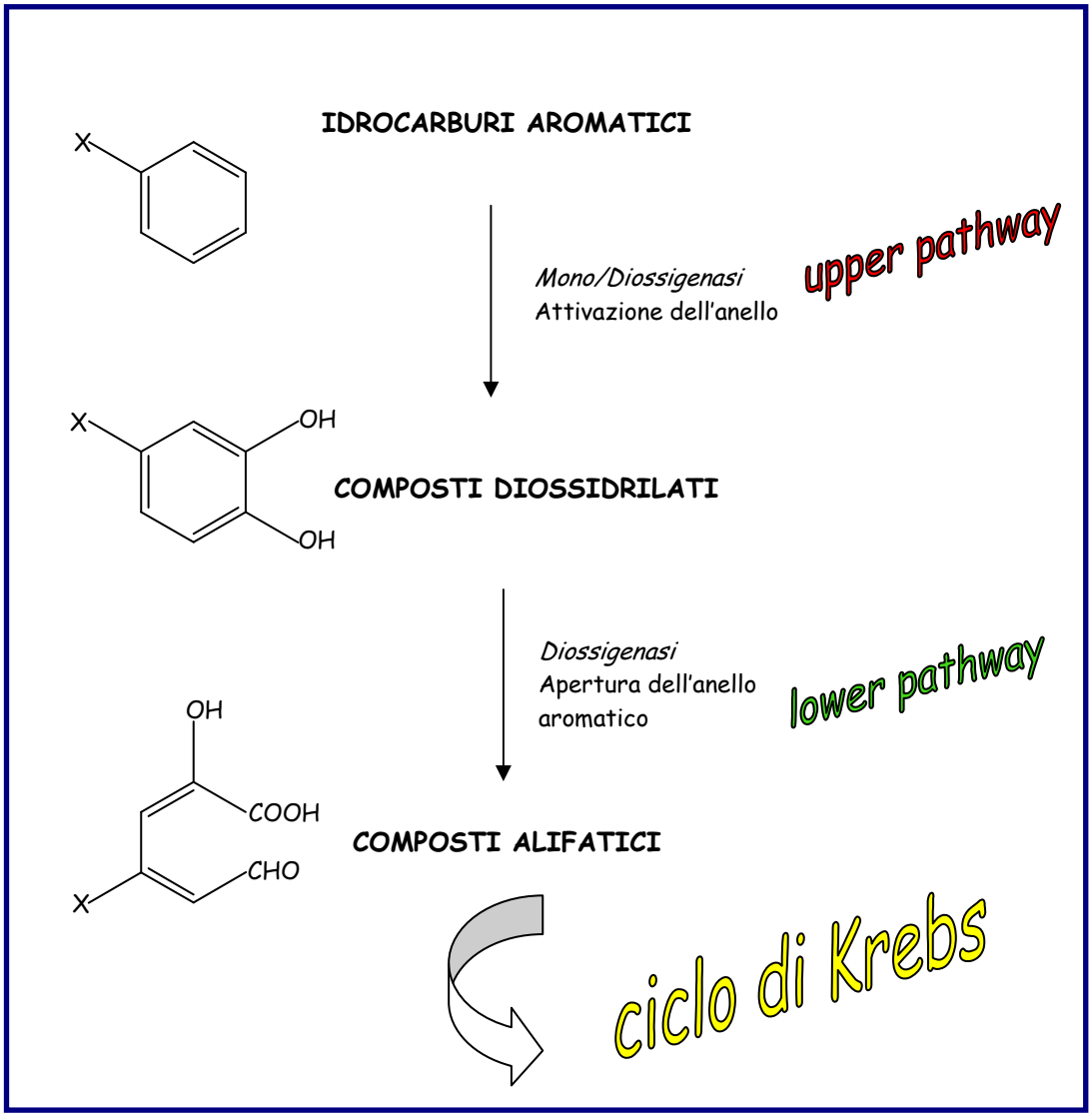


Figura 6. *Le due tappe del catabolismo aerobico degli idrocarburi aromatici.*

Due gruppi di microrganismi sono principalmente coinvolti nella biodegradazione aerobica dei composti aromatici: *Pseudomonas* e *Acinetobacter*. I batteri appartenenti al genere *Pseudomonas* rappresentano il gruppo più cospicuo di microrganismi in grado di metabolizzare, in condizioni aerobiche, molti composti aromatici ed alifatici come unica fonte di carbonio ed energia. Si tratta di batteri ubiquitari del suolo e delle acque, bastoncellari, Gram-negativi con flagelli polari che vivono in associazione con piante ed animali mostrando una vasta distribuzione ambientale. Questi batteri hanno la capacità di degradare una grande varietà di composti aromatici altamente inquinanti come i BTEX, fenoli e fenoli sostituiti, cloroaromatici, idrocarburi aromatici policiclici come il naftalene ed anche composti estremamente tossici per le cellule come i policlorobifenili (PCBs).

Nei batteri del genere *Pseudomonas* le vie cataboliche per i composti aromatici differiscono principalmente nella prima reazione di ossidazione dell'*upper pathway* che è catalizzata da monoossigenasi o diossigenasi, complessi multienzimatici che presentano una certa regioselettività ed un ampio spettro di substrati.

A partire dai più svariati composti aromatici, grazie alle differenti attività enzimatiche degli *upper pathways*, si producono un numero limitato di intermedi diidrossilati, che saranno soggetti a reazioni di apertura dell'anello e poi processati per entrare nel ciclo degli acidi tricarbossilici. Per questo motivo il numero dei *lower pathways* è limitato e gli enzimi di tali vie sono estremamente conservati.

Il primo enzima del *lower pathway* è una catecolo diossigenasi (CDO), responsabile dell'apertura dell'anello aromatico mediante inserzione di entrambi gli atomi di una molecola di ossigeno nel catecolo o nei suoi derivati. In base alla modalità di taglio dell'anello aromatico tali enzimi vengono classificati come catecolo diossigenasi intradioliche (CDI) e catecolo diossigenasi extradioliche (CDE): a queste due classi di CDO corrispondono due principali *lower pathways* indicati come *orto-pathway* e *meta-pathway* rispettivamente. Le CDI, come la catecolo-1,2-diossigenasi (C1,2O), sono considerati gli enzimi d'ingresso dell'*orto-pathway* perché catalizzano il taglio dell'anello aromatico all'interno del diolo con produzione di un acido *cis*-*cis*-muconico. Le CDE, come la catecolo-2,3-diossigenasi (C2,3O), iniziano il cosiddetto *meta-pathway* perché realizzano il taglio dell'anello aromatico all'esterno del diolo producendo una semialdeide idrossimuconica (Nozaki *et al.,* 1970) (fig. 7). La natura del prodotto di scissione dell'anello aromatico porta a due differenti gruppi di enzimi che continuano la via degradativa (Powlowski and Shingler, 1994). Gli enzimi dell'*orto-cleavage pathway* portano alla formazione di 3-oxoadipato, che è ulteriormente convertito a succinato e acetil-CoA; invece, gli enzimi del *meta-cleavage pathway* degradano l'intermedio centrale, il catecolo, a piruvato ed acetil-CoA (fig. 8).

I prodotti della degradazione del *lower pathway* entrano nel ciclo degli acidi tricarbossilici (TCA).

Una differenza importante tra i due diversi *lower pathways* è che gli operoni per il *meta-pathway* sono generalmente localizzati su plasmide, mentre quelli per l'*orto-pathway* sono sul cromosoma.

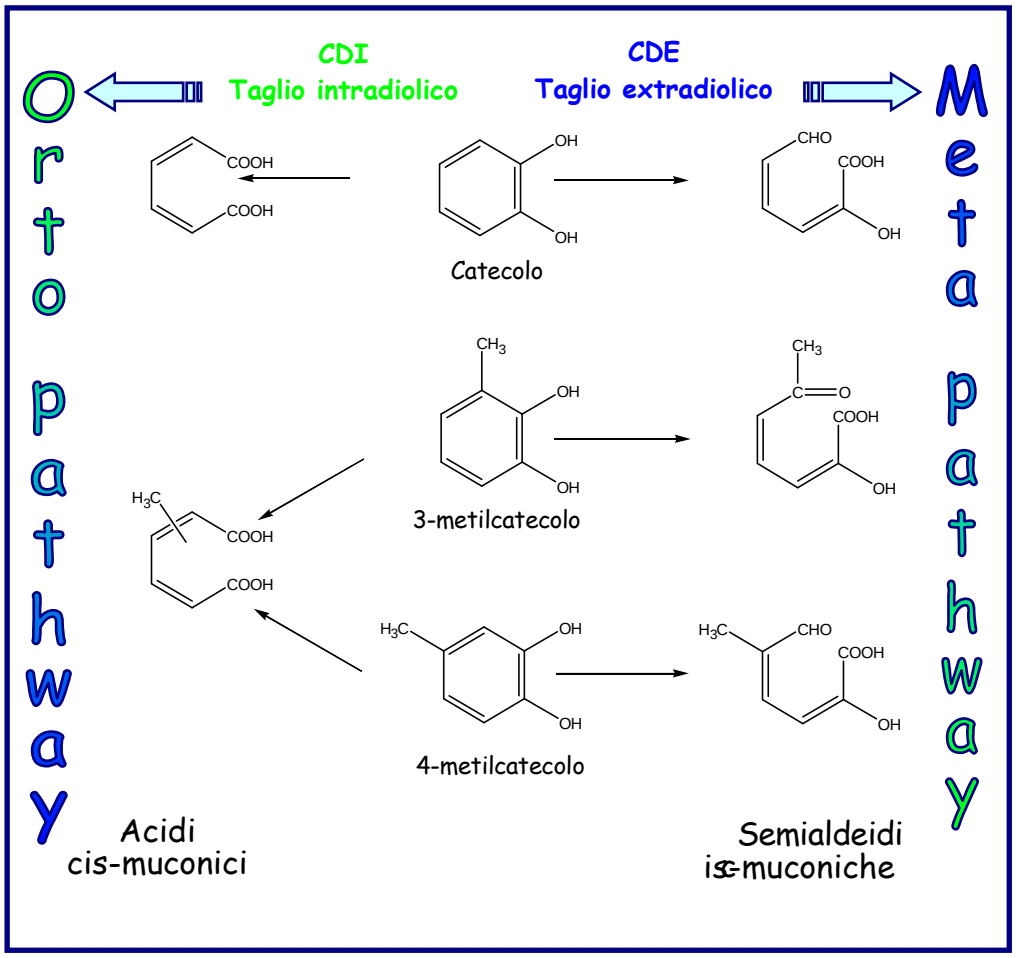


Figura 7. *In seguito ad un taglio extradiolico da parte di una CDE si produce una semialdeide cis-muconica la cui degradazione prosegue in un meta-pathway, mentre in seguito ad un taglio intradiolico da parte di una CDI si produce un acido cis-muconico la cui degradazione prosegue in un orto-pathway.*

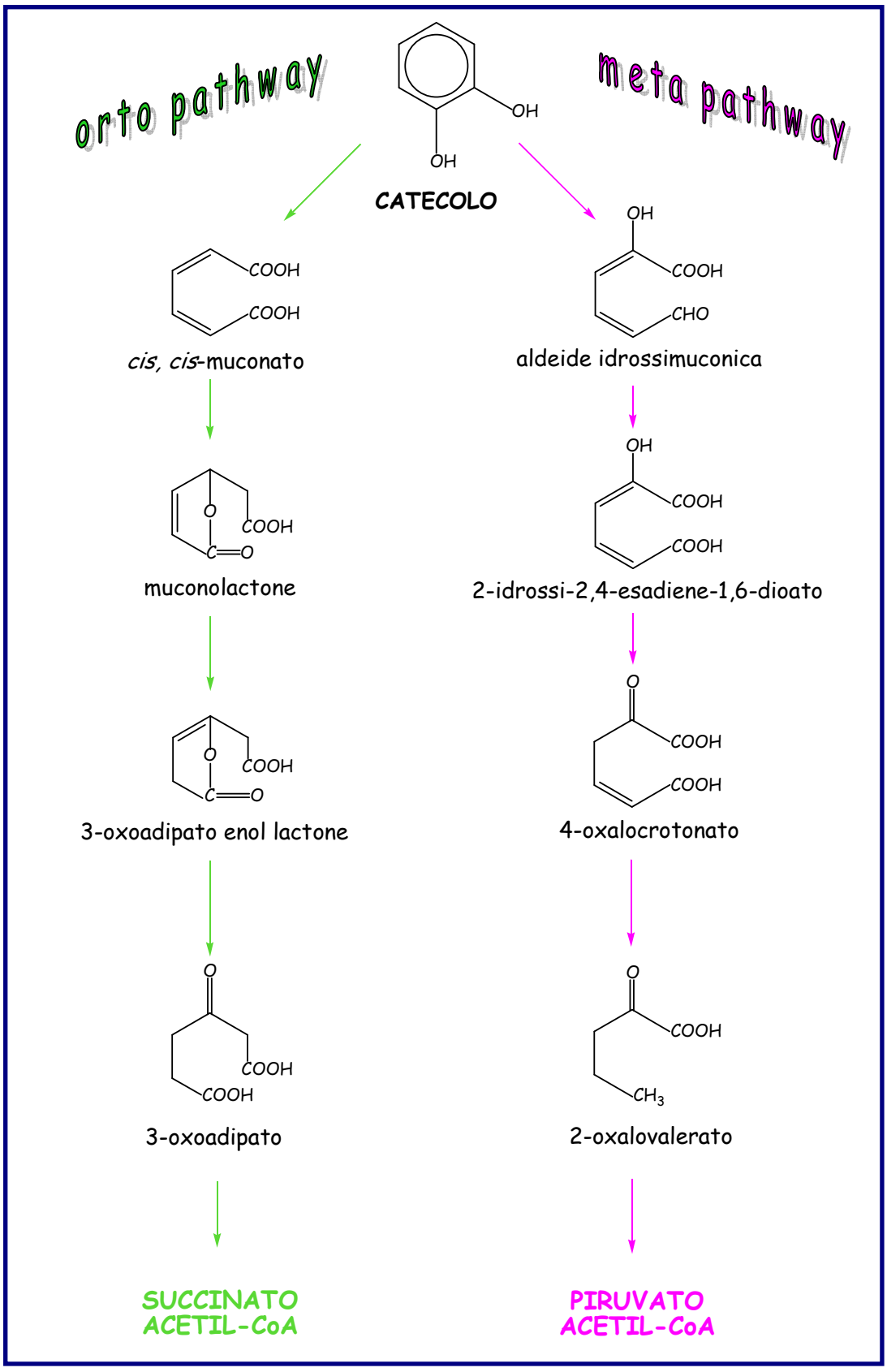


Figura 8. *Differenti prodotti di degradazione dell'orto pathway e del meta pathway.*

1.3 Upper pathways per la degradazione di composti aromatici

Benzene, toluene, etilbenzene e xilene (BTEX) sono idrocarburi aromatici semplici, volatili, comunemente presenti nel petrolio grezzo e nei suoi derivati quali la benzina. I BTEX sono inquinanti sia del suolo che delle acque a causa del loro uso molto esteso nell'industria del petrolio o come solventi. La contaminazione da BTEX è un evento molto preoccupante poiché questi composti sono relativamente insolubili in acqua e possono diffondere rapidamente una volta introdotti nelle falde acquifere (Jindrova *et al.*, 2002). Nonostante la loro tossicità e persistenza, molti microrganismi sono capaci di trasformare e mineralizzare questi composti ed usarli come unica fonte di carbonio ed energia (Damborsky *et al.*, 2000).

La diversità degli *upper pathways* per la degradazione dei composti aromatici è rappresentata dalla variabilità delle vie cataboliche per i BTEX, in particolare di quella del toluene. La degradazione del toluene può avvenire o attraverso reazioni di diossigenazione (TOD *pathway*) oppure attraverso la monoossigenazione dell'anello aromatico in posizioni differenti (Shields *et al.*, 1989; Yen *et al.*, 1991; Olsen *et al*., 1994) o ancora attraverso l'ossidazione progressiva del gruppo metilico (TOL *pathway*) (Burlage *et al.*, 1989).

In *Pseudomonas putida* F1, la degradazione del toluene inizia con l'ossidazione dell'anello benzenico ad opera di una toluene diossigenasi (TDO) con formazione di un intermedio *cis*-diidrodiolo, seguita da una deidrogenazione con produzione del 3-metilcatecolo che poi subisce il *meta*-cleavage (Gibson *et al.*, 1970; Gibson *et al.*, 1990) (fig. 9). I geni che codificano per questi enzimi fanno parte dell'operone *tod* che comprende i geni per la toluene diossigenasi (*tod*C1C2BA).

In *Burkholderia cepacia* G4 e in *Burkholderia pickettii* PKO1, la toluene 2-monoossigenasi e la toluene 3-monoossigenasi catalizzano la formazione del 3-metilcatecolo attraverso due successive reazioni di monoossigenazione, la prima delle quali produce gli intermedi fenolici, *o*-cresolo e *m*-cresolo, rispettivamente (Shields *et al.*, 1989; Olsen *et al.*, 1994) (fig. 9).

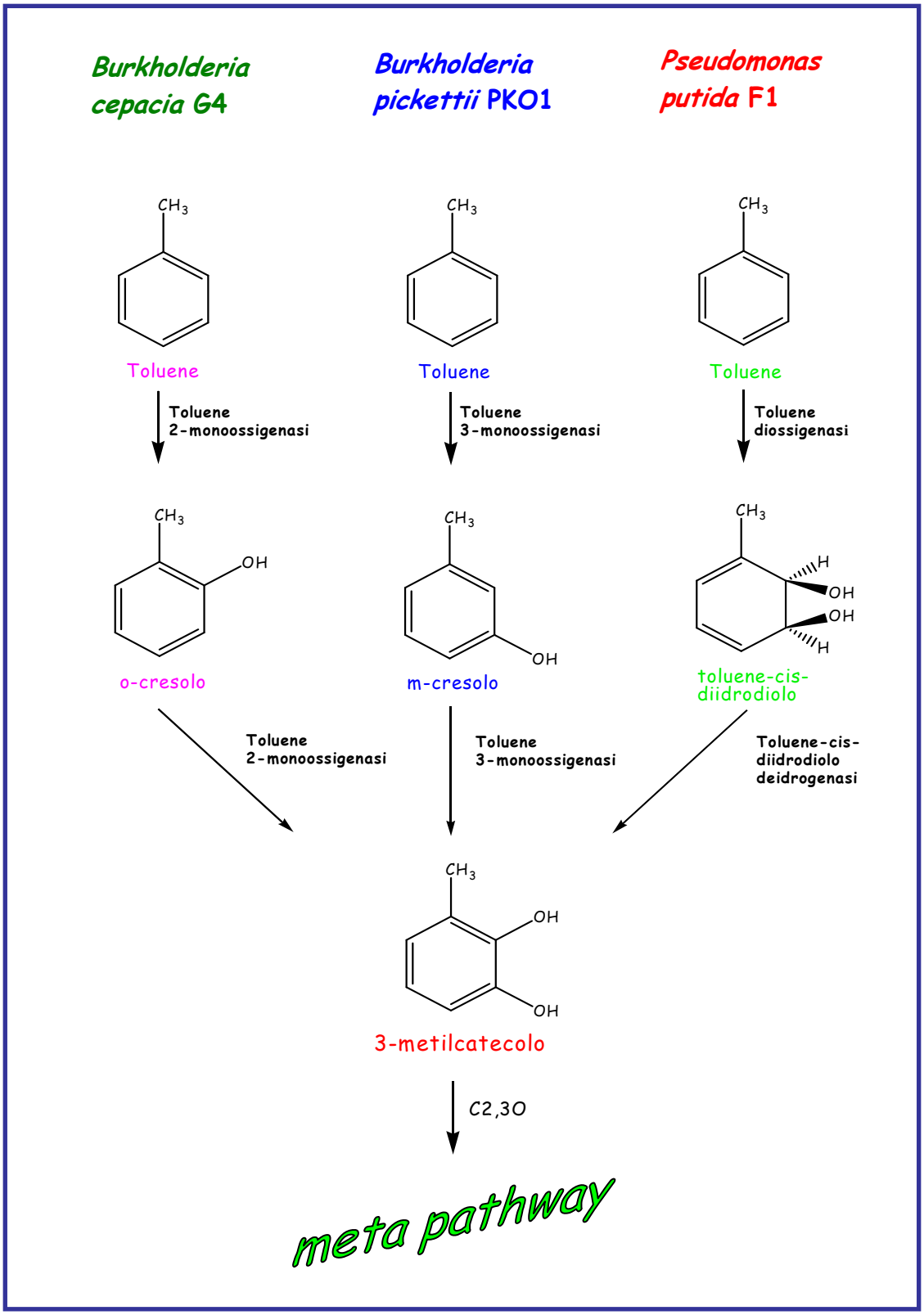


Figura 9. *Upper pathways per la degradazione del toluene in tre diverse specie di Pseudomonas.*

Un *upper pathway* per la degradazione del toluene che combina l'ossidrilazione dell'anello aromatico e l'ossidazione del gruppo metilico è stato descritto per *Pseudomonas mendocina* KR1 (Whited and Gibson, 1991). La toluene-4-monoossigenasi (T4MO), un complesso multienzimatico, trasforma il toluene a *p*-cresolo attraverso una reazione di monoossigenazione. Il *p*-cresolo è poi ossidato tramite successive trasformazioni del gruppo metilico ad acido protocatecuico (intermedio centrale della degradazione dei composti aromatici insieme al catecolo) che è ulteriormente mineralizzato attraverso l'*orto-pathway* (fig. 10). In questo caso specifico, dato che non si forma come intermedio centrale il catecolo, nell'apertura dell'anello aromatico è coinvolto un altro enzima della famiglia delle diossigenasi intradioliche, la protocatecuato 3,4-diossigenasi.

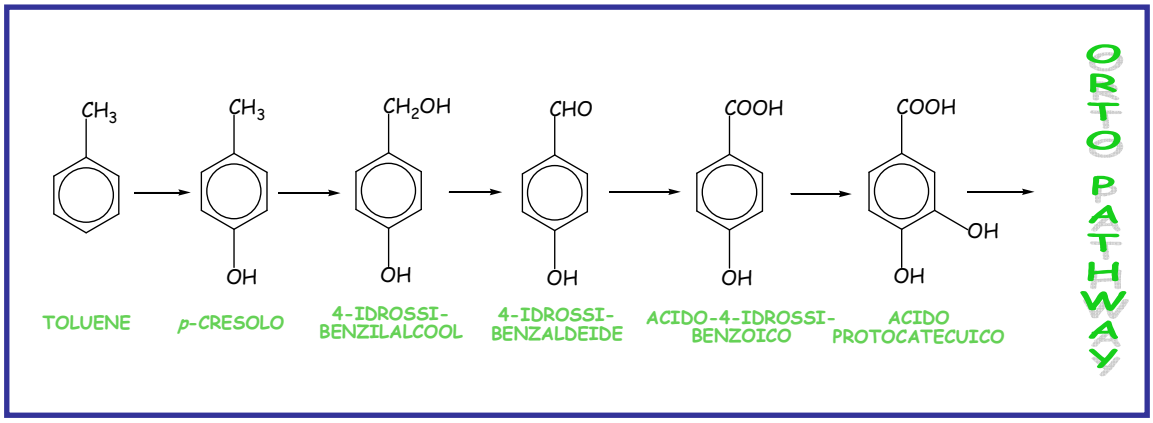


Figura 10. *Metabolismo del toluene in Pseudomonas mendocina KR1.*

Numerosi batteri del suolo sono in grado di crescere utilizzando il *m*-xilene e il *p*-xilene come unica fonte di carbonio ed energia. In alcuni ceppi le reazioni per la degradazione di *m*-xilene e di *p*-xilene prevedono l'ossidazione del gruppo metilico tramite gli enzimi dell'*upper pathway*. In queste reazioni, ad esempio, il gruppo metilico del *p*-xilene è ossidato al corrispondente alcool, aldeide ed acido carbossilico formando infine 4-metilcatecolo. Invece, dall'ossidazione del *m*-xilene si ottiene 3-metilcatecolo (fig. 11 A,B).

In altri ceppi di *Pseudomonas*, il *m*-xilene e il *p*-xilene vengono ossidati direttamente sull'anello aromatico con formazione degli intermedi *m*-xilene *cis*-diidrodiolo e *p*-xilene *cis*-diidrodiolo, che sono successivamente deidrogenati con produzione, rispettivamente, di 3,5-dimetilcatecolo e 3,6-dimetilcatecolo (Galli *et al.*, 1992) (fig. 11 C,D).

Mentre un grande numero di ceppi di *Pseudomonas* sono in grado di crescere su toluene, *m*- e *p*-xilene, solo pochi microrganismi noti sono in grado di degradare *o*-xilene. La degradazione di *o*-xilene non coinvolge l'ossidazione del gruppo metilico a gruppo carbossilico, ma procede attraverso la diretta ossigenazione dell'anello aromatico (fig. 11 E).

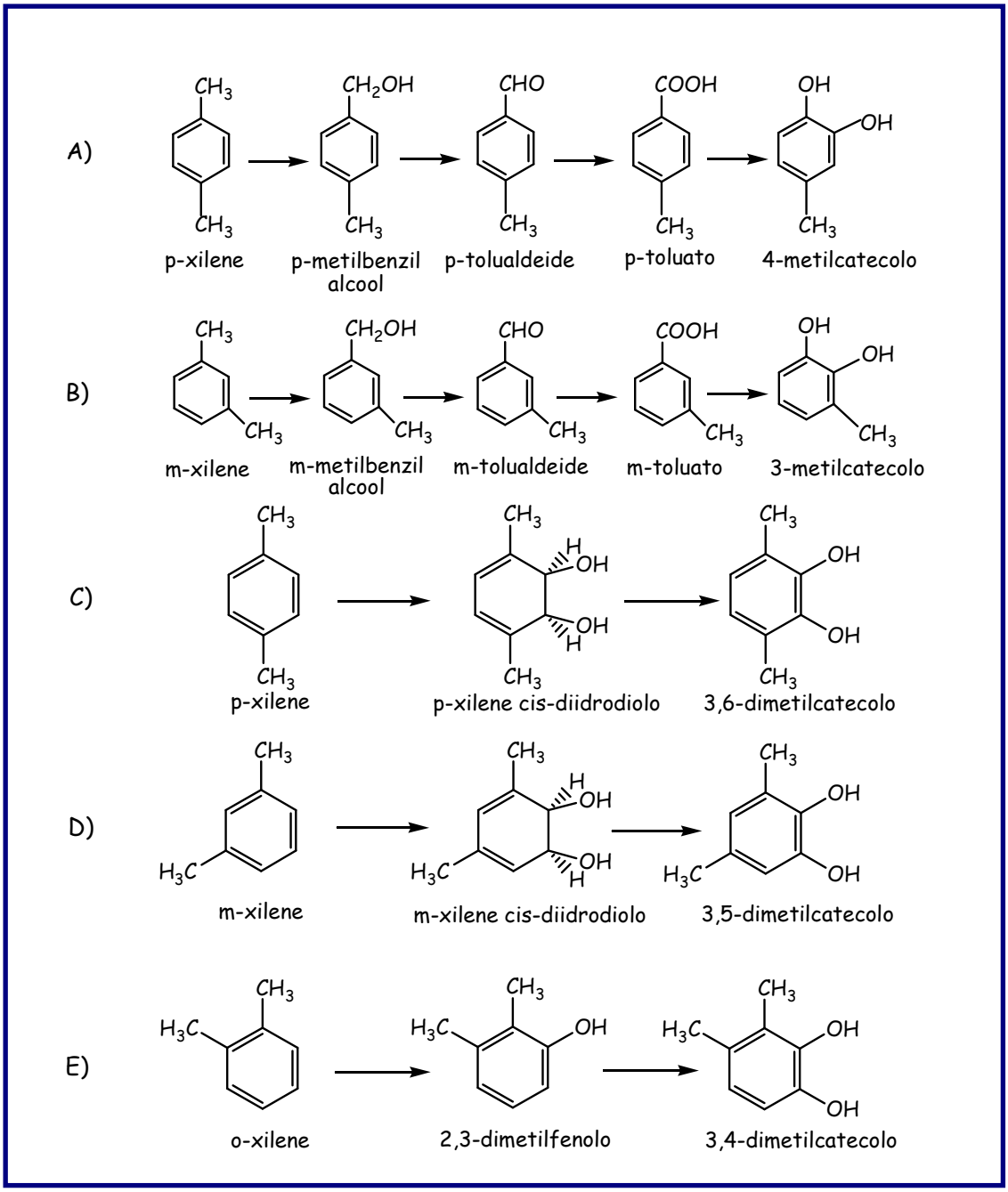


Figura 11. *Upper pathways per la degradazione di p-xilene e m-xilene attraverso la progressiva ossidazione del gruppo metilico (A-B) e attraverso la diretta ossidazione dell'anello aromatico (C-D); degradazione di o-xilene attraverso la diretta ossidazione dell'anello aromatico (E).*

1.4 Plasmidi catabolici: il plasmide pWW0 e il plasmide pVI150

Alcuni ceppi appartenenti al genere *Pseudomonas* e altri batteri Gram-negativi correlati sono in grado di usare come fonte di carbonio composti aromatici, tra cui anche composti xenobiotici, grazie ad attività enzimatiche espresse da uno o più operoni catabolici localizzati su grandi plasmidi a basso numero di copie.

Il plasmide TOL, pWW0, di *Pseudomonas putida* mt-2 e il plasmide pVI150 di *Pseudomonas* sp. strain CF600 sono due classici esempi. Nel plasmide pWW0 mappano due operoni: il primo (*upper pathway operon*) codifica gli enzimi coinvolti nella trasformazione ossidativa del toluene e del *m*- e *p*-xilene al corrispondente benzoato e toluato, rispettivamente; il secondo (*lower pathway operon*) codifica gli enzimi che decidono il destino metabolico degli acidi carbossilici formatesi, a partire dall'apertura in posizione *meta* dell'anello aromatico fino alla formazione dei composti alifatici che entreranno nel ciclo degli acidi tricarbossilici (Worsey and Williams, 1975; Engesser *et al*., 1988; Kunz and Chapman, 1981). Il plasmide catabolico pVI150 di *Pseudomonas* sp. strain CF600 presenta un solo *cluster* genico, noto come *dmp operon (**d**i-**m**ethyl-**p**henol)*, per il catabolismo di fenolo e cresoli attraverso l'idrossilazione seguita da un *meta-cleavage pathway* (Shingler *et al*., 1989; Powlowski and Shingler, 1994).

Il plasmide pWW0 isolato da *Pseudomonas putida* mt-2 è stato il primo plasmide TOL ad essere identificato (Williams and Murray, 1974). Successivamente è stato isolato anche da *Escherichia coli* e da *Erwinia chrysanthemi* (Benson and Shapiro, 1978; Ramos-Gonzalez *et al*., 1991). Il plasmide (circa 117 Kb) è *self*-trasmissibile ed appartiene al gruppo di incompatibilità IncP-9. I geni catabolici e regolatori sono contenuti in una regione di circa 40 Kb. L'*upper pathway*, *xylCMABN*, codifica gli enzimi per la degradazione del toluene a benzoato, oltre ad una proteina di membrana codificata dal gene *xylN* (Harayama *et al.*, 1986; Greated *et al.*, 2002); il *lower pathway* è composto da 11 geni, *xylXYZLTEGFJQKIH*, che codificano gli enzimi per la degradazione del benzoato ad acetaldeide e piruvato. Il gene *xyl*E codifica per la catecolo-2,3-diossigenasi che catalizza l'apertura dell'anello aromatico del catecolo Tale enzima appartiene alla classe delle catecolo diossigenasi extradioliche in quanto catalizza la conversione del catecolo a semialdeide 2-idrossimuconica, dando inizio ad un *lower-meta pathway* (Fig. 12).

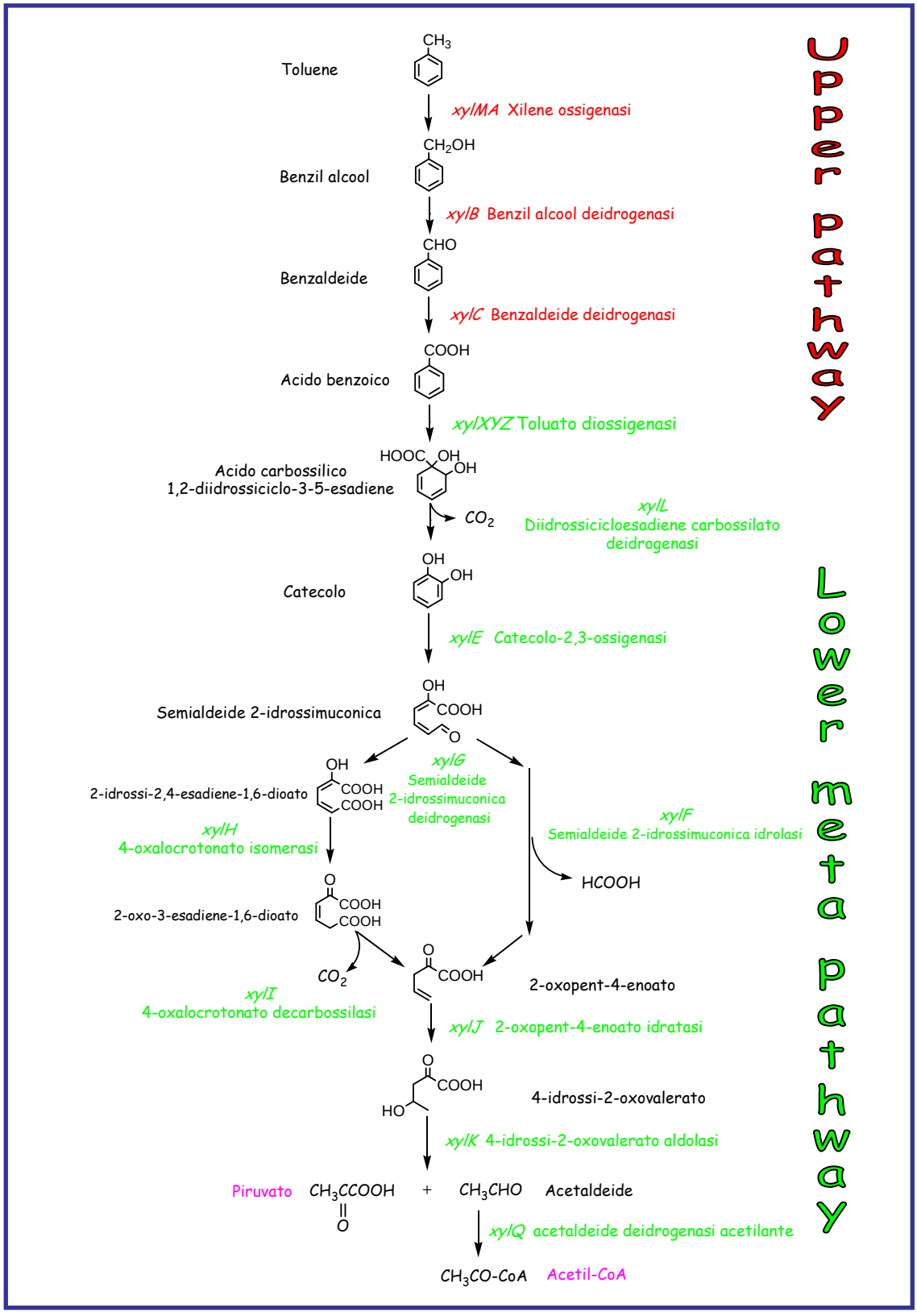


Figura 12. *Upper e lower pathway per la degradazione del toluene in Pseudomonas putida mt-2.*

A valle del *lower pathway* sono presenti due geni di regolazione, *xyl*S e *xyl*R, coinvolti nel controllo trascrizionale degli operoni catabolici (Harayama *et al.*, 1986; Greated *et al.*, 2002). Le proteine regolatrici XylR e XylS appartengono rispettivamente alle famiglie NtrC (nitrogen-regulatory protein C) e AraC di attivatori trascrizionali batterici (fig. 13).

La proteina XylR è il regolatore principale dell'espressione dei geni catabolici *xyl* del plasmide TOL di *P. putida* mt-2 (Holtel *et al.*, 1990). Il gene *xyl*R è espresso costitutivamente a partire da due promotori σ^{70}-dipendenti disposti in tandem: il promotore distale è detto *Pr1* e quello prossimale è detto *Pr2* (fig. 14). La proteina XylR è prodotta in forma inattiva: una volta che XylR ha interagito con molecole effettrici quali toluene, *m*- e *p*-xilene, substrati per l'*upper pathway*, passa dalla conformazione inattiva alla conformazione attiva e agisce come regolatore positivo attivando la trascrizione dal promotore *Pu* (σ^{54}-dipendente) dell'*upper pathway*. Inoltre la proteina XylR attiva innesca la trascrizione dal promotore *Ps1* (σ^{54}-dipendente), uno dei due promotori del gene *xyl*S. I due promotori del gene *xyl*S sono uno prossimale *Ps2* (σ^{70}-dipendente) e uno distale *Ps1* (σ^{54}-dipendente) (fig. 14). In assenza di idrocarburi aromatici, il gene *xyl*S è espresso ad un livello costitutivo basso a partire dal promotore *Ps2* σ^{70}-dipendente. In presenza di induttori aromatici, la proteina XylR attiva si lega alle sequenze attivatrici a monte (UASs) del promotore *Ps1* σ^{54}-dipendente aumentando il livello di espressione di *xyl*S, senza variare il suo livello di trascrizione dal promotore *Ps2* (fig. 13). Il risultato è un'espressione aumentata della proteina XylS che stimola la trascrizione dal promotore *Pm* dell'operon *meta* del plamide TOL (Gallegos *et al.*, 1996): l'azione regolatoria di XylS è dipendente dalla proteina regolatoria XylR.

La proteina XylR, oltre ad essere un attivatore trascrizionale, reprime la sua stessa espressione. Infatti, in presenza di induttori aromatici, l'autorepressione di XylR aumenta (Bertoni *et al.*, 1998b; Marqués *et al.*, 1998). Questa autorepressione sembra essere causata dal fatto che i promotori *Pr1* e *Pr2* di *xyl*R e le UASs, a cui si lega XylR a monte del promotore *Ps1* del gene *xyl*S (fig. 14), si sovrappongono e questo può impedire il legame della RNAP-σ^{70} ai promotori di *xyl*R (Tropel and van der Meer, 2004).

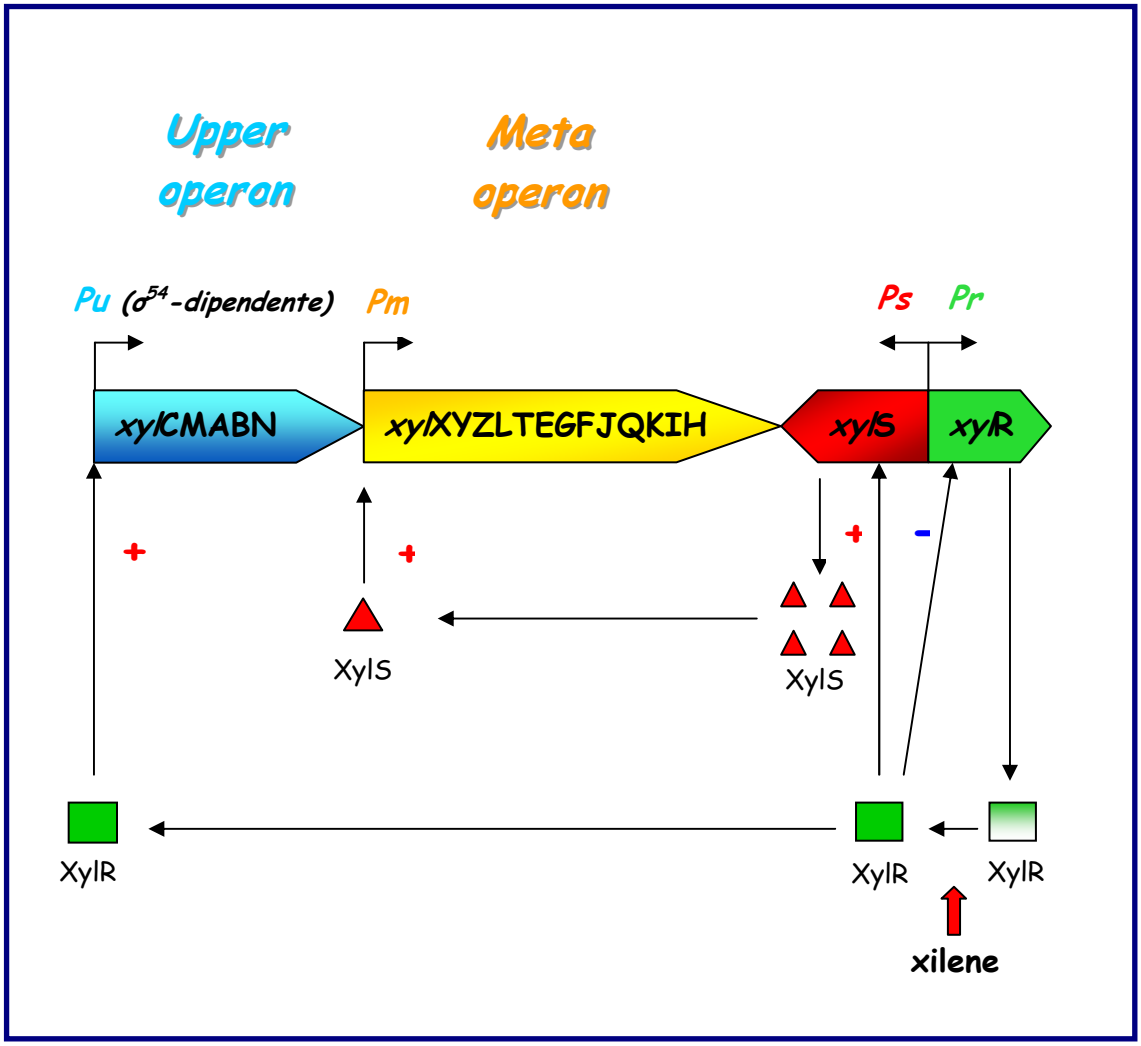


Figura 13. *I due geni regolatori xylR e xylS sono localizzati a valle dell'operon meta e regolano la trascrizione degli operoni catabolici del plasmide TOL di P. putida mt-2. Il gene xylS è trascritto divergentemente rispetto all'operon meta. La proteina XylR, in seguito all'interazione con un induttore chimico, come xilene, si attiva ed innesca la trascrizione da Pu, aumenta la trascrizione da Ps e autoreprime la sua stessa trascrizione. XylS promuove l'espressione dell'operone meta.*

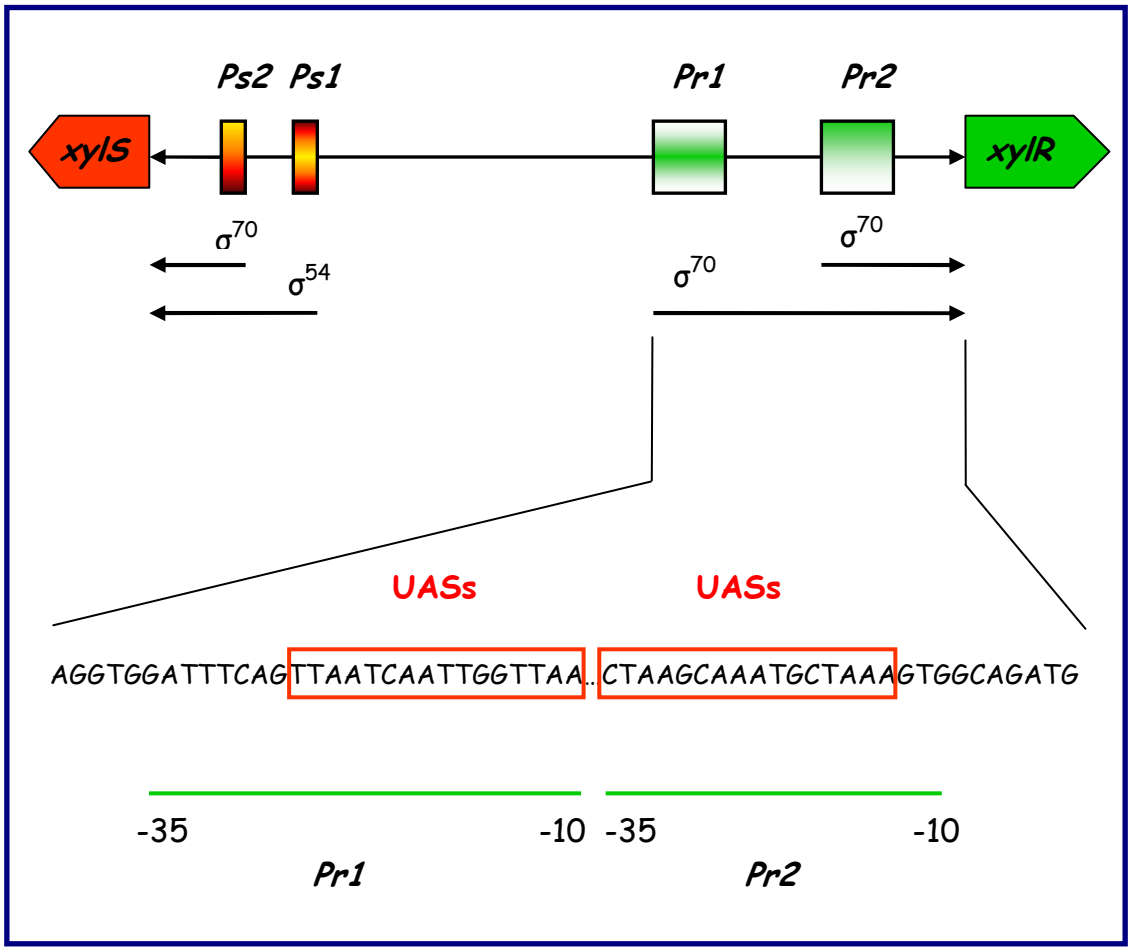


Figura 14. *Organizzazione della regione intergenica xylR-xylS. Il gene xylR ha due promotori disposti in tandem σ^{70}-dipendenti, uno distale Pr1 e uno prossimale Pr2. Il gene xylS è espresso da due promotori disposti in tandem, uno prossimale Ps2 (σ^{70}-dipendente) e uno distale Ps1 (σ^{54}-dipendente). Il promotore Ps1 include le UASs a cui si lega la principale proteina attivatrice del sistema: XylR. In basso si possono osservare le sequenze nucleotidiche dei promotori Pr con le caratteristiche sequenze consenso che si sovrappongono con le UASs del promotore Ps1.*

Risultati sperimentali (Marqués et al., 1998) mostrano che l'autoregolazione è più forte in presenza dell'effettore. Sono proposte due spiegazioni per questa scoperta:

1) il legame di un effettore a XylR può aumentare l'affinità del regolatore per le sue sequenze bersaglio, riducendo l'accesso della RNAP σ^{70}-dipendente ai promotori *Pr*;

2) il legame dell'effettore a XylR favorisce il legame di ATP e l'oligomerizzazione di XylR così che la formazione di un complesso sovramolecolare limita l'accesso della RNA polimerasi σ^{70}-dipendente ai promotori *Pr*.

Per spiegare come *Pr1*, *Pr2* e *Ps1* diventano tutti attivi in presenza di un effettore di XylR, si ipotizza che ad ogni ciclo di trascrizione dal promotore *Ps1*, il regolatore XylR sia transitoriamente rilasciato dalle UASs, così che un certo equilibrio è stabilito tra UASs occupate e non occupate. In questa situazione alcuni eventi di trascrizione dai promotori *Pr1* e *Pr2* sono permessi (Marqués *et al.*, 1998).

Il *pathway* catabolico in *Pseudomonas sp.* CF600 si estende per un tratto genico di circa 15 kb nel plasmide pVI150. E' un plasmide molto grande, circa 200kb, appartenente al gruppo di incompatibilità IncP-2. La dissezione genetica della regione di 15 kb codificante il sistema *dmp* ha portato alla localizzazione di 15 geni coinvolti in questa via catabolica (Powlowski and Shingler, 1994).

Il primo enzima del *pathway* è la fenolo idrossilasi PH, un complesso multienzimatico che catalizza la conversione del fenolo a catecolo. La regione codificante la fenolo idrossilasi comprende sei geni, indicati come *dmpKLMNOP*, ognuno dei quali ha un corrispondente prodotto polipeptidico, P0, P1, P2, P3, P4 e P5, essenziali per la completa funzionalità di PH e per la crescita su fenolo (Nordlund *et al.*, 1990).

Gli enzimi codificati dai rimanenti nove geni dell'operone catabolico di *P.* sp. CF600, *dmpQBCDEFGH*, sono quelli del *meta-cleavage pathway* per la conversione del catecolo a piruvato ed acetil-CoA, che entreranno poi nel ciclo degli acidi tricarbossilici (TCA). L'enzima che catalizza lo stadio più critico del *meta pathway*, ossia l'apertura dell'anello aromatico, è il prodotto del gene *dmp*B, la catecolo-2,3-ossigenasi (C2,3O), contenente Fe^{2+} non-emico nel sito attivo (Powlowski and Shingler, 1994).

A monte dell'operone *dmp* è localizzato un gene, *dmpR*, divergentemente trascritto rispetto al *dmp operon* (Fig. 15). La proteina DmpR appartiene alla classe degli attivatori trascrizionali NtrC. Come XylR, con cui mostra un'identità di sequenza molto elevata (>67%), in presenza dei substrati aromatici subisce un cambiamento conformazionale che produce la forma attiva ed agisce come regolatore positivo promuovendo la trascrizione dell'operone *dmp* dal promotore *Po* (σ^{54}-dipendente)

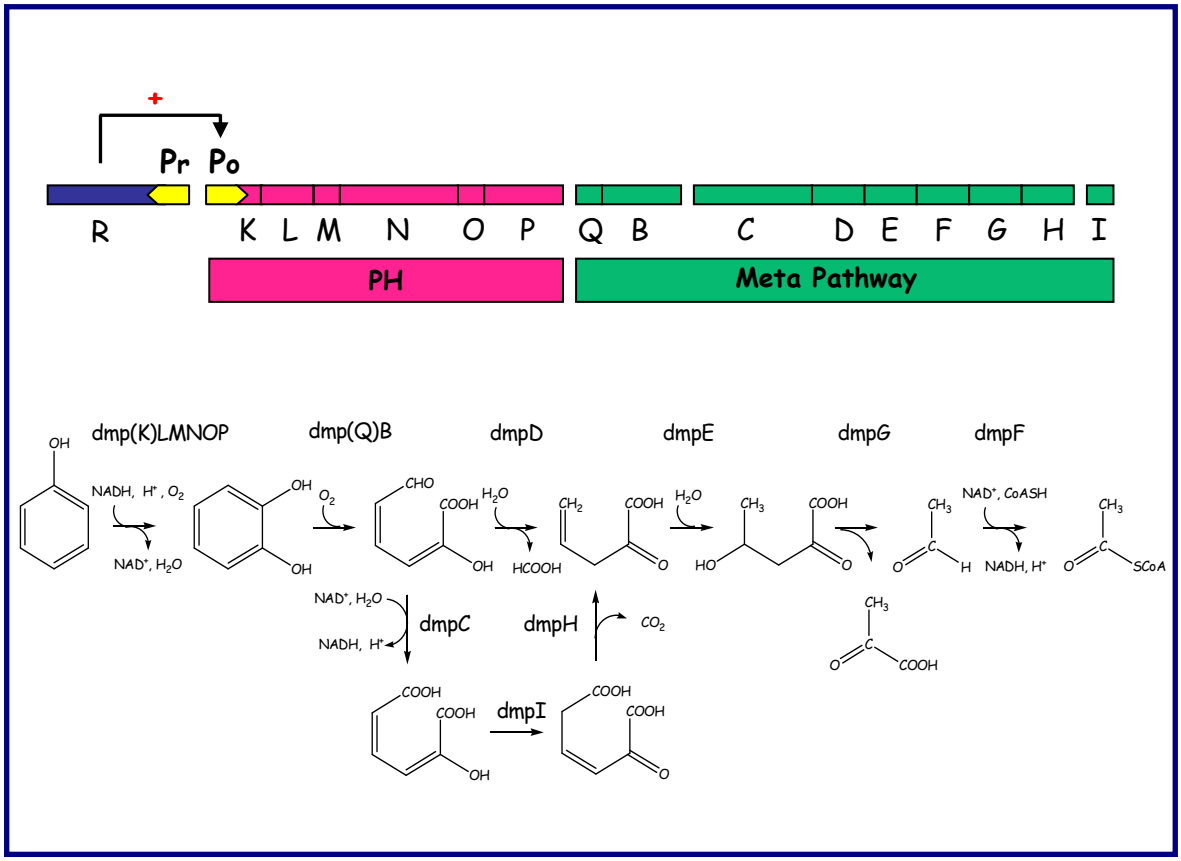


Figura 15*. Rappresentazione del dmp pathway codificato dal plasmide catabolico pVI150 di Pseudomonas sp. strain CF600.*

1.5 Pseudomonas sp. OX1

Pseudomonas sp. OX1 è un esempio di come i batteri possano adattarsi ad ambienti mutevoli e siano in grado di svolgere funzioni rilevanti per la decontaminazione ambientale. *Pseudomonas* sp. OX1 è stato isolato da fanghi attivi di scarichi industriali e civili. Ha la capacità di utilizzare *o*-xilene, il più recalcitrante degli isomeri dello xilene, come unica fonte di carbonio e di energia (Baggi *et al.,* 1987); può inoltre crescere su toluene, cresolo e su alcuni dimetilfenoli. Una ulteriore caratteristica di questo batterio, che contribuisce alle sue capacità di adattamento ad ambienti inquinati, è la sua resistenza a composti organici ed inorganici contenenti mercurio. La resistenza al mercurio è codificata da un plasmide mentre i geni coinvolti nel catabolismo degli idrocarburi sono localizzati sul cromosoma (Barbieri *et al.,* 1989).

In uno studio iniziale era stato classificato fisiologicamente come *Pseudomonas stutzeri* ma recenti analisi genetiche e fisiologiche hanno dimostrato la sua appartenenza ad una branca filogenetica di *Pseudomonas corrugata*; genotipicamente, dunque, dovrebbe essere visto come un ceppo rappresentativo di una nuova specie, lontanamente correlata a *Pseudomonas stutzeri* (Cladera *et al.,* 2006).

Nel genoma di *Pseudomonas* sp. OX1 i geni che codificano per gli enzimi del catabolismo del toluene e di *o*-xilene sono organizzati in due operoni: uno, detto *tou operon*, codifica per un complesso multienzimatico chiamato ToMO (**T**oluene ***o***-xylene **M**ono**O**ssigenasi), l'altro, *phe operon*, comprende i geni che codificano per la ***P****henol* ***H****ydroxylas*e PH (fig. 16), coinvolta nel metabolismo del fenolo, ed i geni codificanti gli enzimi del *lower pathway.*

L'intero *upper pathway* comprende non solo l'attività di ToMO ma anche quella di PH. Il processo di degradazione inizia con la conversione degli idrocarburi in fenoli catalizzata da ToMO. Questo evento porta alla produzione di una miscela di *o*- *m*- e *p*-cresolo a partire dal toluene e di 2,3- e 3,4-dimetilfenolo a partire da *o*-xilene; successivamente tali intermedi vengono convertiti in 3,4-dimetilcatecolo e in 4,5-dimetilcatecolo da una seconda reazione di monoossigenazione catalizzata o da ToMO o da PH (fig. 17). La degradazione inizia quindi con due successive reazioni di monoossigenazione, di cui la prima catalizzata da ToMO non è regiospecifica, mentre la seconda, catalizzata o da ToMO o da PH, avviene sempre sul carbonio in posizione *orto* rispetto a quella ossidrilata (Bertoni *et al.,* 1996).

I catecoli prodotti dalle reazioni di monoossigenazione nell'*upper pathway* sono poi degradati in intermedi che entrano nel ciclo di Krebs attraverso il *lower pathway.*

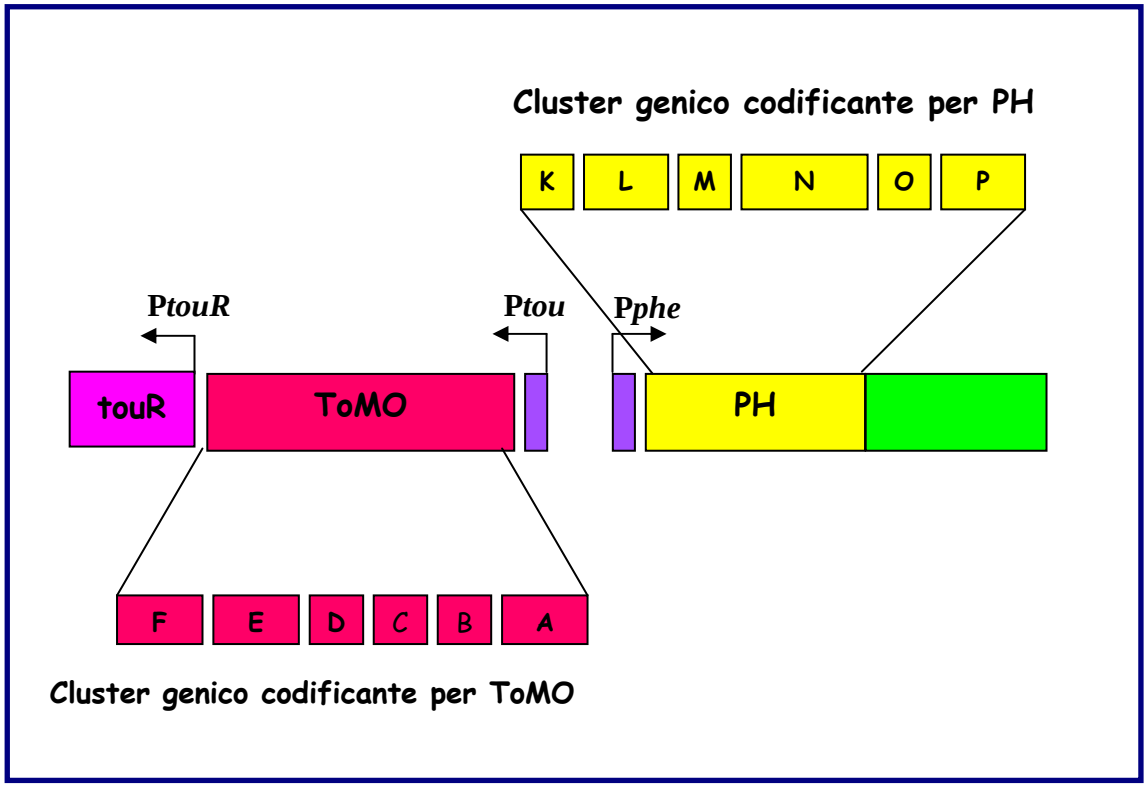


Figura 16. *Organizzazione genica degli operoni ToMO e PH in Pseudomonas sp. OX1.*

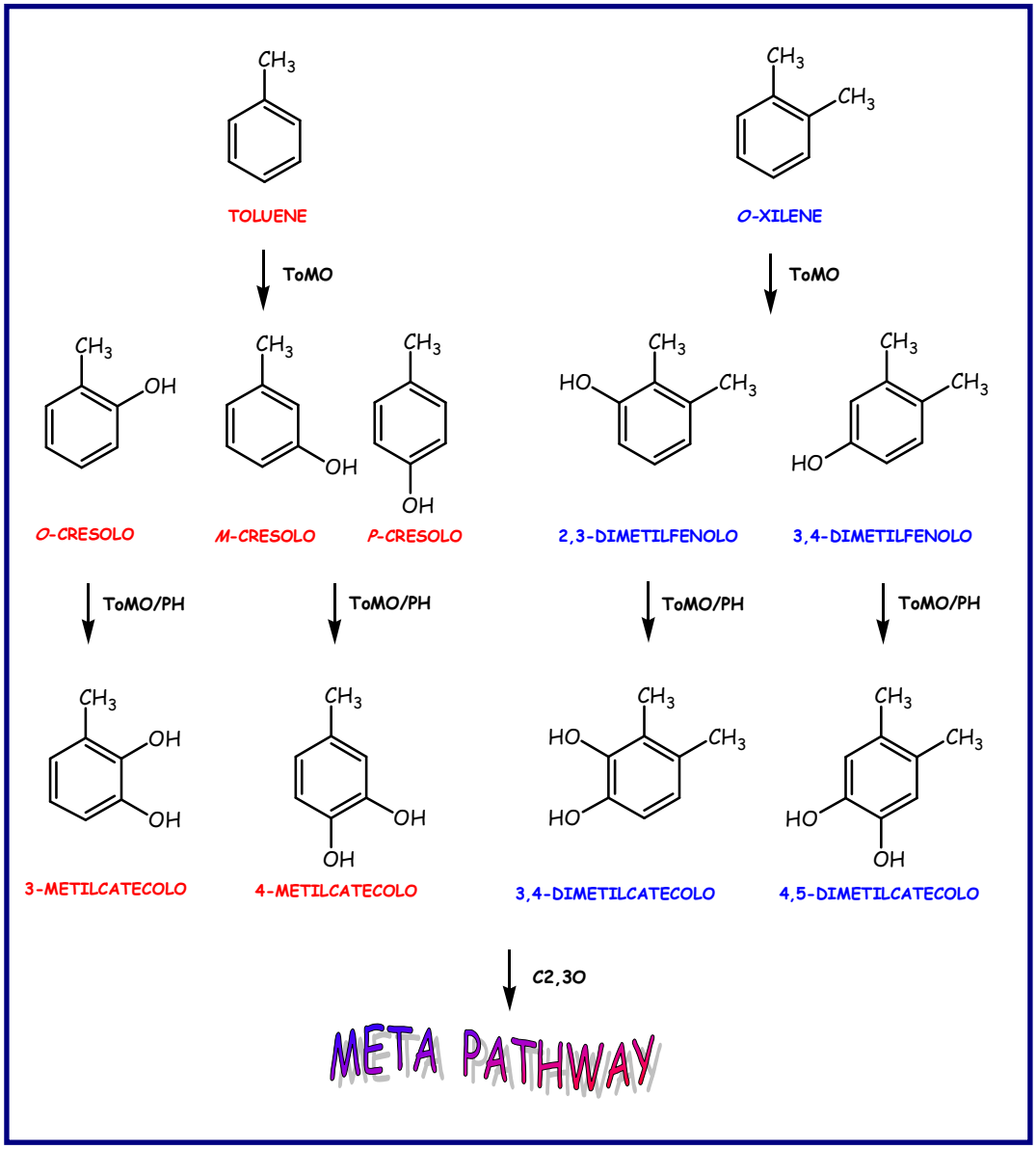


Figura 17. *Degradazione del toluene e o-xilene in P. sp. OX1.*

Il locus codificante ToMO mappa in una regione di 6 kb del cromosoma di *Pseudomonas* sp. OX1 indicata come locus *tou* (***t****oluene* ***o****-xylene* ***u****tilization*): l'analisi di sequenza ha rivelato la presenza di un *cluster* di sei ORFs (***o****pen* ***r****eading* ***f****rames*), chiamato *touABCDEF* (fig. 16). Ogni gene trovato nel locus è essenziale per la completa attività enzimatica. Ciò suggerisce che ToMO, l'enzima responsabile dell'inizio del catabolismo di toluene e di *o*-xilene di *P.* sp. OX1, sia un complesso multienzimatico (Bertoni *et al.,* 1998). In particolare ToMO appartiene alla famiglia delle Monossigenasi Batteriche Multicomponente (BMMs), sottoclasse della Toluene/Benzene Monossigenasi o gruppo 2 (Cafaro *et al.,* 2002).

Il complesso ToMO è costituito da una NADH-ferredossina-ossidoreduttasi (ToMO F) con un centro [2Fe-2S], una ferredossina *Rieske-type* (ToMO C), un centro ossidrilasico (subcomplesso ToMO H) costituito dalle subunità ToMO A, B ed E ciascuna presente in doppia copia a formare una struttura quaternaria del tipo $(\alpha\beta\gamma)_2$ ed, infine, una subunità regolatrice (ToMO D). Studi condotti sull'intero complesso ricostituito a partire dalle subunità ricombinanti hanno permesso di dimostrare che l'ossidrilazione del substrato aromatico è mediata da una catena di trasporto degli elettroni. Gli elettroni sono trasportati da un donatore primario (NADH o NADPH) attraverso l'ossidoreduttasi ToMO F alla ferredossina ToMO C ed infine alla subunità catalitica ToMO A (con un centro di ferro di tipo Fe-OH-Fe) del subcomplesso ToMO H. Per la subunità ToMO D è stata proposta una funzione di regolazione della catalisi. È stato ipotizzato che ToMO D svolga la sua funzione regolatoria interagendo direttamente con la subunità catalitica ToMO A, influenzando sia la velocità di reazione che la resa del prodotto (fig. 18) (Cafaro *et al.,* 2002).

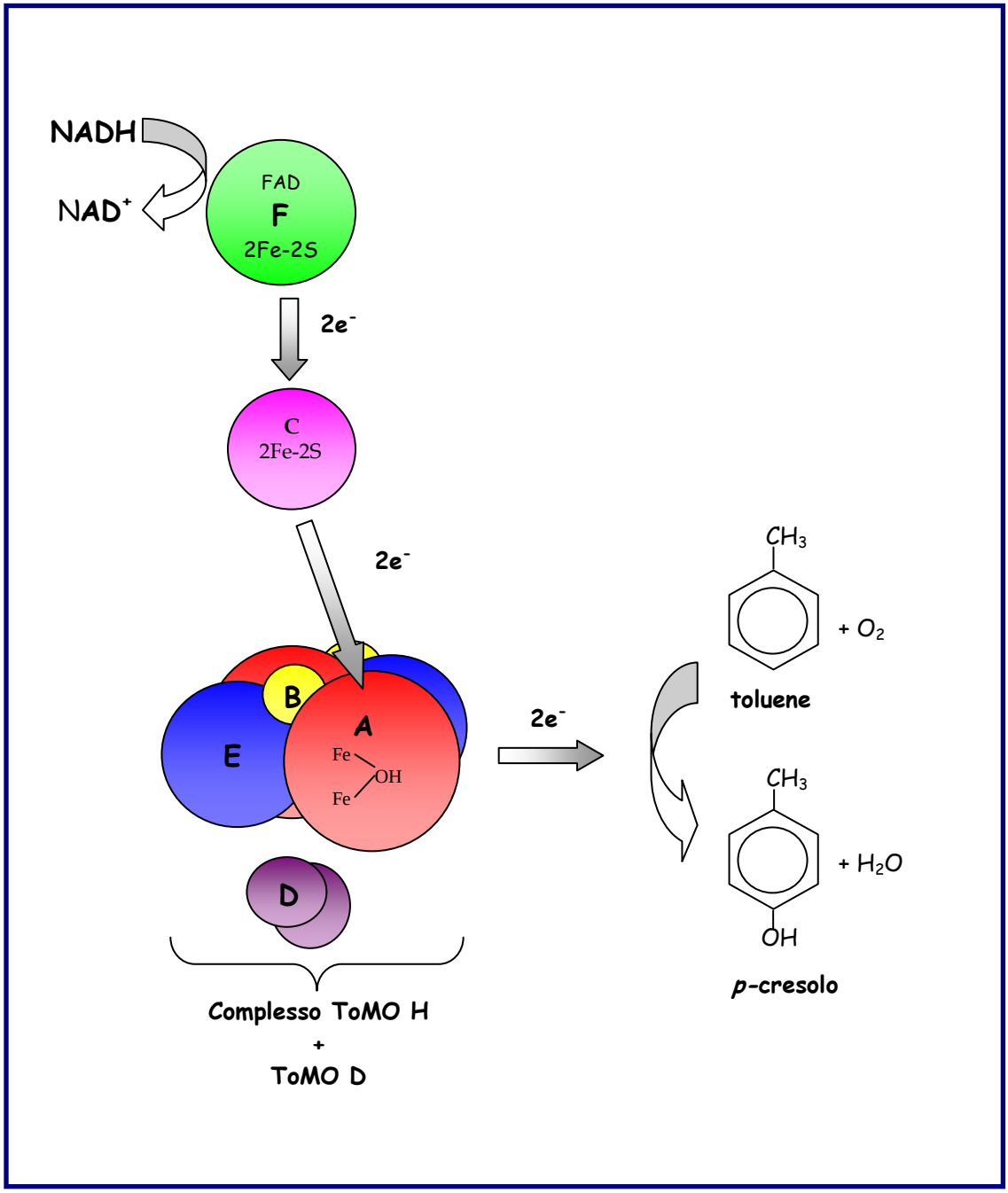


***Figura 18**. Catena di trasporto degli elettroni dal NADH al substrato aromatico attraverso ToMO.*

Il *cluster* genico per il *lower pathway* di *Pseudomonas* sp. OX1 è localizzato approssimativamente a 6 kb di distanza dall'operone codificante ToMO ed è trascritto nella direzione opposta rispetto al *cluster* genico ToMO (fig.16). La sua organizzazione è omologa all'operone *dmp* (***d****i*-***m****ethy*-***p****henol*) di *Pseudomonas* sp. CF600 (Arenghi *et al.*, 2001).

Al 5' dell'operone è localizzato un *cluster* genico codificante PH: comprende sei geni indicati come *pheKLMNOP*, ognuno dei quali ha un corrispondente prodotto polipeptidico: P0, P1, P2, P3, P4 e P5. Questo enzima multi-componente svolge la sua attività catalitica nell'*upper pathway*, con azione ridondante rispetto a ToMO. Il complesso PH, come ToMO, appartiene alla famiglia di Monossigenasi Batteriche Multicomponente (BMMs), in particolare alla sottoclasse delle Fenolo Idrossilasi o gruppo 1 (Cafaro *et al.,* 2004).

Varie specie di *Pseudomonas* che degradano il fenolo possiedono una fenolo idrossilasi simile alle flavoproteine idrossilasi batteriche usate per il catabolismo di *p*-idrossibenzoato e melilotato. Queste flavoproteine idrossilasi catalizzano una reazione di monoossigenazione dell'anello aromatico in posizione *orto* (o in alcuni casi *para*) rispetto ad un gruppo idrossilico preesistente. Il ruolo della flavina è quello di attivare l'ossigeno molecolare che normalmente non reagisce con i composti organici. L'attivazione iniziale coinvolge la reazione della flavina ridotta con O_2 per formare una flavina 4a-idroperossido, la quale è un agente ossigenativo elettrofilico relativamente debole (Entsch *et al.,* 1976). L'ossigenazione è favorita dalla delocalizzazione degli elettroni dal gruppo ossidrilico del substrato all'anello aromatico. Composti come il benzene, toluene o ftalati, sono meno suscettibili all'ossigenazione per la mancanza di un sostituente donatore di elettroni nell'anello aromatico. In questi casi le ossigenasi presentano nel loro sito attivo O_2 complessato con il ferro. Inoltre una o più proteine per il trasferimento di elettroni sono associate con la componente ossigenativa di questi enzimi per trasferire elettroni dal NAD(P)H, permettendo la completa riduzione dell'ossigeno.

La fenolo idrossilasi di *Pseudomonas* sp. OX1 ha poco in comune con i singoli componenti delle flavoproteine idrossilasi. Questo enzima multi-componente è risultato avere un elevato grado di identità con PH di *P.* sp. CF600, di cui è nota l'attività di ogni singolo elemento del complesso. Le subunità L, M, N, O, e P risultano essere per il 63, 68, 76, 53 e 77% identiche alle corrispondenti subunità di PH da *P.* sp. CF600 rispettivamente (Cafaro *et al.,* 2004).

Attraverso esperimenti *in vitro* è stato dimostrando che solo la subunità P0 è indispensabile per l'attività idrossilasica. La purificazione dei polipeptidi P1-P4 ha permesso di identificare due componenti, uno rappresentato da P2 e l'altro dal subcomplesso P1-P3-P4. Gli elettroni donati dal NADH sono accettati da P5, caratterizzata da un centro [2Fe-2S] e dal FAD, e da questa trasferiti alla componente idrossilica composta da P1-P3-P4, uniti in un complesso dimerico di tipo $(\alpha\beta\gamma)_2$ (Cadieux *et al.*, 2002; Powlowski and Shingler, 1990-1994). La subunità P3 svolge l'attività catalitica e presenta un centro binucleare contenente ferro, del tipo Fe-O-Fe. La subunità P2 ha una funzione regolatrice interagendo direttamente con la subunità P3 e non contiene alcun cofattore né metallo (Cafaro *et al.*, 2004).

È stata già descritta la capacità di ToMO di ossidare una grande varietà di substrati aromatici come toluene, benzene, fenolo, *o*-, *m*- e *p*-cresolo e naftalene (Bertoni *et al.*, 1996). Anche PH è capace di ossidare la miscela isomerica di fenoli derivata da toluene e da *o*-xilene (*o*-, *m*- e *p*-cresolo; 2,3- e 3,4-dimetilfenolo) convertendoli nei corrispondenti metil- e dimetil-catecoli (Arenghi *et al.*, 2001). È stato osservato che ToMO e PH catalizzano la conversione del benzene in catecolo attraverso due successive reazioni, producendo fenolo come intermedio. ToMO presenta una maggiore specificità per il benzene; al contrario PH mostra una specificità più spiccata per il fenolo. La coesistenza di due attività enzimatiche ridondanti nell'*upper pathway* è fondamentale per rendere più efficiente la degradazione degli idrocarburi aromatici: in particolare è ottimizzato l'uso del benzene grazie all'effetto di esaurimento dei prodotti dell'ossidazione catalizzata da ToMO da parte di PH, escludendo così la possibilità che il fenolo si accumuli (Cafaro *et al.*, 2004).

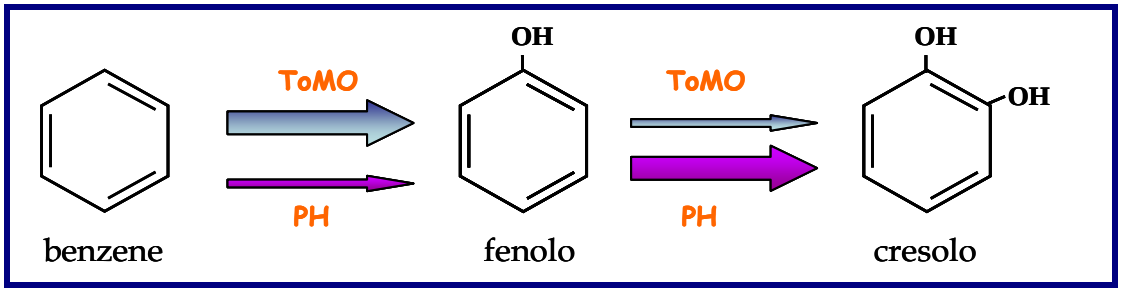


Figura 19. *Le attività di ToMO e PH nell'upper pathway sono ridondanti.*

Gli enzimi codificati dai rimanenti nove geni dell'operone l*ower* di *Pseudomonas* sp. OX1, *pheQBCDEFGH*, sono quelli del *meta-cleavage pathway* per la conversione del catecolo a piruvato ed acetil-CoA, che entreranno poi nel ciclo degli acidi tricarbossilici (TCA).

L'enzima che catalizza lo stadio più critico del *meta pathway*, ossia l'apertura dell'anello aromatico, è il prodotto del gene *phe*B, la catecolo-2,3-ossigenasi (C2,3O), contenente Fe^{2+} non-emico nel sito attivo (Arenghi *et al.*, 2001) (fig. 20). Tale enzima appartiene alla classe delle catecolo diossigenasi extradioliche, in quanto catalizza la conversione del catecolo a semialdeide 2-idrossimuconica. La catecolo-2,3-ossigenasi di *P*. sp. OX1 è in grado di catalizzare la scissione dell'anello di molti intermedi (catecolo, 3-, 4-metilcatecolo, 3,4- e 4,5-dimetilcatecolo) derivati dal toluene e da *o*-xilene mediante le due monoossigenazioni dirette da ToMO e da PH nell'*upper pathway* (Arenghi *et al.*, 2001). Recentemente è stata determinata la sequenza nucleotidica del gene *phe*B di *Pseudomonas* sp. OX1. Il gene *pheB* è costituito da 921 nucleotidi che codificano un polipeptide di 307 residui aminoacidici. Allineamenti multipli con altre diossigenasi extradioliche, hanno evidenziato che la sequenza amminoacidica dedotta della C2,3O da *P*. sp. OX1 presenta circa il 95% di identità con la diossigenasi cristallizzata da *P. putida* mt-2 (Nozaki *et al.*, 1970; Kita *et al.*, 1999) e l'85% di identità con l'omologo DmpB di *Pseudomonas* sp. CF600 (Viggiani *et al.*, 2004). La C2,3O da *P*. sp. OX1 appartiene alla famiglia delle diossigenasi che effettuano il taglio extradiolico dell'anello aromatico, in particolare è un membro della sottofamiglia che comprende le proteine che catalizzano l'apertura delle molecole aromatiche ad anello singolo. Come la diossigenasi da *Pseudomonas putida* mt-2, l'enzima è un omotetramero costituito da quattro monomeri, ciascuno con un peso di circa 35 kDa. Ogni monomero è formato da due domini simili, uno all'estremità N-terminale, l'altro all'estremità C-terminale, dove è localizzato il sito catalitico caratterizzato dalla presenza di uno ione metallico Fe^{2+}. Nel sito catalitico sono stati identificati tre residui amminoacidici, His-153, His-214 e Glu-265, che sono fondamentali sia per il legame con il ferro che per l'attività catalitica (Senda *et al.*, 2000). Studi di spettroscopia di Raman (Vaillancourt *et al.*, 2002) condotti sulla C2,3O da *P. putida* mt-2 hanno evidenziato che il substrato, il catecolo, lega il ferro del sito attivo come monoanione. Oltre ai tre ligandi endogeni del ferro sopra elencati, altri tre residui, His-246, His-199 e Tyr-255, sono estremamente conservati: ciò fa ipotizzare che tali residui possano avere un ruolo nel legame del substrato e/o nel meccanismo catalitico. In *Pseudomonas* sp. KKs102 il residuo Tyr-249 della diossigenasi, corrispondente al residuo Tyr-255 nella C2,3O di *P. putida* mt-2, agisce come donatore di protoni, formando un legame idrogeno con l'ossigeno anionico dell'anello del catecolo, mentre l'His-194 (His-199 in *P. putida*), agendo

da accettore di protoni, può formare un legame a idrogeno con l'ossidrile del substrato (Sato *et al.*, 2002). È stato proposto un meccanismo catalitico per le diossigenasi extradioliche (Sato *et al.*, 2002; Vaillancourt *et al.*, 2002; Kita *et al.*, 1999; Quel, 1983) nel quale i residui conservati His-246 e Tyr-255 sono coinvolti nell'estrazione del primo protone dal catecolo, mentre l'His-199, comportandosi da catalizzatore acido-base, accetta il secondo protone. Infine si realizza l'attacco nucleofilo sul carbonio 3 del substrato con conseguente incorporazione dell'ossigeno nell'anello aromatico (Deeth and Bugg, 2003).

Il gene *pheQ*, localizzato tra i geni codificanti la fenolo idrossilasi e la C2,3O, codifica un polipeptide che mostra il 41% di identità di sequenza con ferredossine *Fdx plant-type.* La sequenza nucleotidica del gene codificante la ferredossina *Fdx* da *Pseudomonas sp.* OX1 è stata determinata (Viggiani *et al.*, 2004): allineamenti di sequenza indicano il 61.6% di identità con il gene *dmpQ* di *P.* sp. CF600 e il 61.9% di identità con il gene *xylT* dal plasmide TOL pWW0 di *P. putida* mt-2, ipotizzando, quindi, un'analoga funzione ed evoluzione.

Studi condotti su ceppi in cui il gene *dmpQ* di *Pseudomonas* sp. CF600 è stato deleto dall'operone pVI150 e su ceppi di *Pseudomonas putida* mt-2 in cui l'omologo *xylT* è stato mutato, indicano che l'espressione di questa proteina è necessaria per permettere la crescita batterica alle spese di 4-metilfenolo o di 3,4-dimetilfenolo. Esperimenti *in vivo* hanno mostrato che la ferredossina è necessaria per la riattivazione della catecolo-2,3-ossigenasi (Powlowski and Shingler, 1994). Questo enzima, infatti, è particolarmente sensibile all'inattivazione durante il processamento di catecoli 4-metil sostituiti, probabilmente a causa dell'ossidazione dello ione ferro nel sito attivo. Si ritiene che in *Pseudomonas putida* mt-2 la sua riattivazione proceda attraverso un trasferimento di elettroni da un donatore non ancora identificato, attraverso XylT, al ferro ossidato. Considerando l'alto grado di similarità tra gli operoni *dmp* e *xyl*, si può ipotizzare per DmpQ la stessa funzione di XylT, anche se tra i due enzimi esiste solo il 64% di identità. La divergenza tra le due proteine fa ritenere possibile che queste ferredossine si siano evolute per adattarsi a differenti donatori di elettroni anziché rispondere a differenze strutturali tra le corrispondenti catecolo-2,3-ossigenasi con cui interagiscono (Powlowski and Shingler, 1994).

La presenza di proteine ferredossina–simili negli operoni *dmp* e *xyl*, sostiene l'ipotesi che queste proteine redox possano rappresentare una strategia adottata dai batteri per espandere la specificità di substrato del *meta-cleavage pathway*, in modo tale da includere composti altrimenti trasformati nei letali 4-metilcatecoli. A tale ipotesi si può aggiungere l'osservazione che né l'operone *tod* (*P. putida* F1) né l'operone *bph* (catabolismo di cloro-bifenili) (*Pseudomonas* sp. IC) codificano per una proteina simile (Powlowski and Shingler,

1994). In entrambi i sistemi enzimatici, infatti, non sono stati identificati substrati metabolizzati in intermedi para-sostituiti.

Il *meta-cleavage pathway* mostra una grande versatilità permettendo la degradazione di molti catecoli sostituiti. La sua versatilità metabolica si manifesta principalmente nell'attività della C2,3O che riconosce come substrati tutti i prodotti metil-sostituiti e non derivati dall'*upper pathway* e, successivamente, nei due possibili destini che la semialdeide idrossimuconica, derivata dalla reazione di scissione dell'anello del catecolo, può avere (Kim *et al.*, 1997).

I prodotti del *meta-cleavage* sono processati attraverso una via idrolitica o attraverso una via deidrogenasica, che producono entrambe il 2-oxopenta-4-dienoato (fig. 20).

La via idrolitica converte direttamente la semialdeide 2-idrossimuconica in 2-oxopenta-4-dienoato mediante l'attività della semialdeide idrossimuconica idrolasi (HMSH) codificata dal gene *pheD*. Attraverso la via deidrogenasica, invece, tali prodotti sono trasformati a 4-oxalocrotonato dalla semialdeide idrossimuconica deidrogenasi (HMSD) NAD^+-dipendente, codificata dal gene *pheC*. Il 4-oxalocrotonato è poi convertito a 2-oxopenta-4-dienoato attraverso le successive attività della 4-oxalocrotonato isomerasi (4OI) e della 4-oxalocrotonato decarbossilasi (4OD), codificate rispettivamente dagli ultimi due geni dell'operone, *pheI* e *pheH*. Questa seconda via è anche nota come *4-oxalocrotonato branch* (Arenghi *et al.*, 2001).

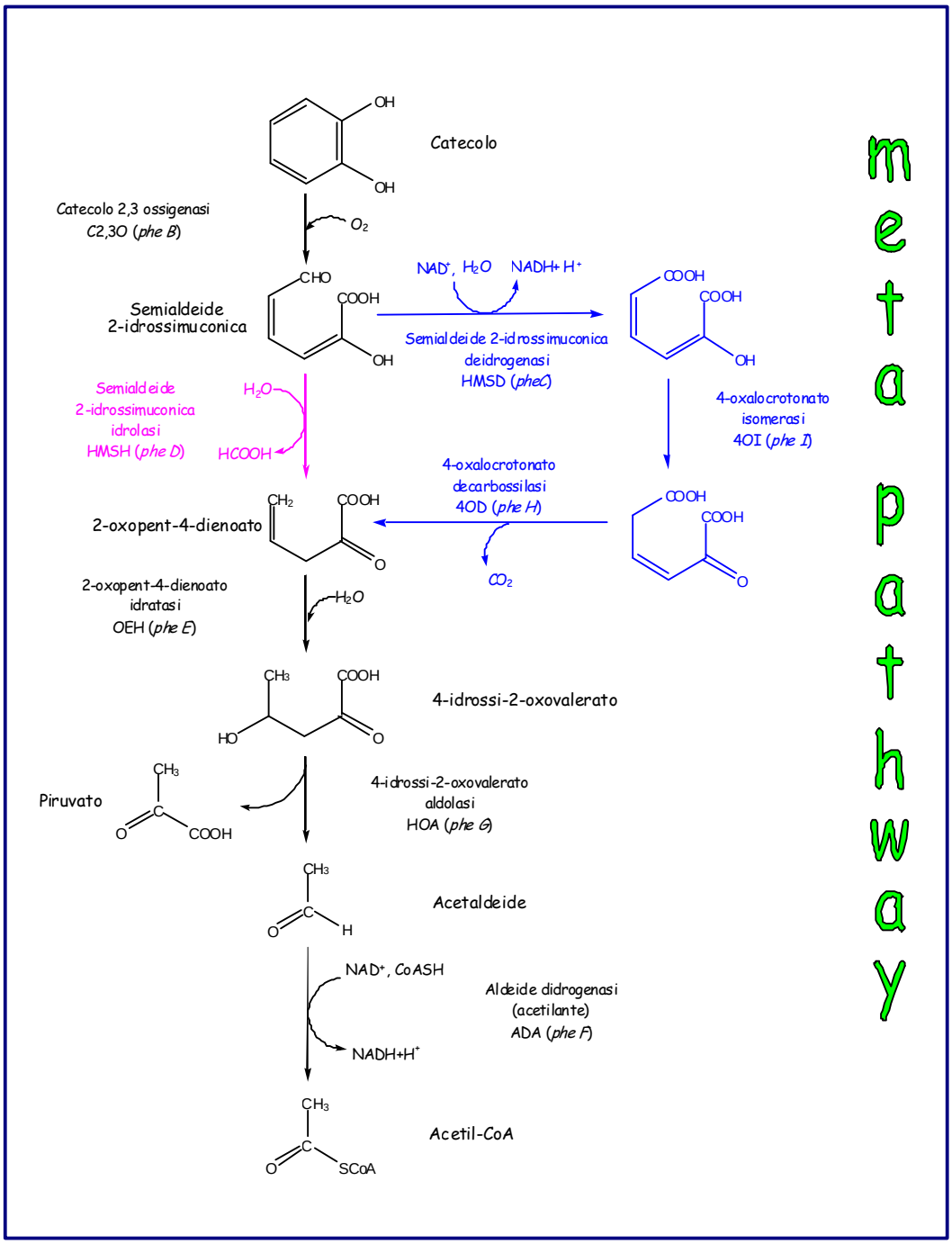


Figura 20. *Meta pathway in P.* sp. *OX1. In blu è rappresentata la via deidrogenasica o oxalocrotonato branch, in rosa la via idrolitica.*

I prodotti derivati dal *meta-cleavage* del catecolo e del 4-metilcatecolo sono metabolizzati attraverso la via deidrogenasica, in quanto la deidrogenasi HMSD mostra un'affinità verso composti contenenti un gruppo aldeidico ossidabile maggiore rispetto a quella mostrata dalla idrolasi HMSH. La via idrolitica, invece, è responsabile della degradazione del prodotto del *meta-cleavage* del 3-metilcatecolo, un chetone.

Il gene *pheC*, codificante la deidrogenasi HMSD, mostra l'85% di omologia con il gene *dmpC* di *Pseudomonas* sp. CF600 e il 98% con il gene *xylG* di *Pseudomonas putida* mt-2*;* il gene *pheD*, codificante la idrolasi HMSH, mostra l'82% di omologia con il gene *dmpD* di *Pseudomonas* sp. CF600 e l'80% con il gene *xylF* di *Pseudomonas putida* mt-2 (Di Donato *et al.*, non pubblicato).

La sequenza amminoacidica della deidrogenasi HMSD da *P*. sp. CF600 mostra circa il 40% di identità con varie aldeidi deidrogenasi eucariotiche e l'84% di identità con la HMSD codificata da *xylG* del plasmide TOL pWW0 di *P. putida* mt-2 (Powlowski and Shingler, 1994). Le aldeidi deidrogenasi eucariotiche, per analogia con la gliceraldeide-3-fosfato deidrogenasi, presentano un meccanismo di azione che coinvolge la formazione di un intermedio tioemiacetalico, che trasferisce uno ione idruro al NAD^+, per essere poi idrolizzato dall'enzima. Gli isozimi delle aldeidi deidrogenasi presentano, nel loro sito attivo, un residuo di serina conservato che si ritiene sia coinvolto nella formazione di un acil-enzima intermedio (Powlowski and Shingler, 1994): questo residuo non è conservato nella sequenza della deidrogenasi HMSD.

La sequenza amminoacidica della idrolasi HMSH da *P*. sp. CF600 è omologa al prodotto enzimatico del gene *xylF* da *P. putida* mt-2. In base alla identità di sequenza (20% circa) tra la idrolasi HMSH codificata da *xylF* e l'atropina esterasi, una serina idrolasi, è stata ipotizzata la partecipazione di un residuo di serina (Ser-107) del sito attivo nella catalisi della HMSH di *P*. sp. CF600 (Powlowski and Shingler, 1994). Si può credere che il meccanismo con cui l'idrolasi HMSH scinde un legame carbonio-carbonio sia analogo al meccanismo con cui agisce l'esterasi nel rompere un legame carbonio-ossigeno.

La via deidrogenasica che segue al *meta-cleavage* del catecolo o del 4-metilcatecolo comprende, oltre alla deidrogenasi HMSD, l'attività della isomerasi 4OI e della decarbossilasi 4OD per trasformare il 4-oxalocrotonato, prodotto dall'azione di HMSD, in 2-oxopenta-4-dienoato, che prosegue nella degradazione (fig. 20).

La 4-oxalocrotonato isomerasi (4OI) è codificata dal gene *phe*I, l'ultimo gene dell'operone *phe* di *P*. sp. OX1 (Caruso *et al.*, non pubblicato). Questo enzima catalizza l'isomerizzazione del 4-oxalocrotonato a 2-cheto-3-esenedioato. Studi condotti su mutanti di

P. putida U mancanti dell'attività di 4OI hanno mostrato che questo enzima è necessario alla crescita su substrati fenolici che vengono convertiti in catecolo o in 4-metilcatecolo e successivamente metabolizzati attraverso la via deidrogenasica (Powlowski and Shingler, 1994).

La 4-oxalocrotonato decarbossilasi (4OD), codificata dal gene *pheH*, catalizza la reazione finale della via deidrogenasica, portando alla formazione di 2-oxopenta-4-dienoato, che diventa il substrato del successivo enzima del *meta-pathway*, la 2-oxopenta-4-dienoato idratasi (OEH) (Caruso *et al.*, non pubblicato).

L'idratasi OEH è codificata dal gene *pheE*: la sua sequenza nucleotidica mostra l'85% di omologia con il gene *dmpE* di *Pseudomonas* sp. CF600 e il 98% con il gene *xylJ* di *Pseudomonas putida* mt-2 (Di Donato *et al.*, non pubblicato). La sua azione è necessaria per trasformare il 2-oxopenta-4-dienoato in 4-idrossi-2-oxovalerato. Il confronto tra gli enzimi Dmp di *Pseudomonas* sp. CF600 e Xyl di *Pseudomonas putida* mt-2 omologhi, ha suggerito una possibile associazione fisica tra i polipeptidi 4OD e OEH, partendo dall'osservazione che il prodotto instabile di 4OD è il substrato di OEH. L'associazione tra i due enzimi permetterebbe di incanalare l'intermedio instabile nella via degradativa (Powlowski and Shingler, 1994). Le sequenze amminoacidiche dedotte per tali enzimi, mostrano tra loro il 37% di identità, indicando un'origine comune. È possibile che questi enzimi si siano evoluti a partire da una proteina ancestrale, originariamente multimerica, spiegando così la loro stretta associazione, anche se rimane da dimostrare che questo arrangiamento abbia un ruolo nell'incanalare l'intermedio nel *pathway* catabolico (Powlowski and Shingler, 1994). Una prova a favore dell'evoluzione comune dei due enzimi deriva dal paragone della sequenza nucleotidica del gene *dmpE,* codificante l'idratasi OEH, con quelle dei corrispondenti geni *bph* e *tod* del *meta-pathway* di *P.* sp. IC e *P. putida* F1, rispettivamente. Entrambi i *pathways* sono caratterizzati dalla mancanza del *4-oxalocrotonato branch*, quindi nessuno dei due operoni comprende i geni corrispondenti (Powlowski and Shingler, 1994). A causa della bassa omologia di sequenza, si può pensare che le idratasi Bph e Tod, sebbene abbiano entrambe come substrato il 2-oxopenta-4-dienoato utilizzato anche dalla idratasi DmpE, si siano evolute in condizioni differenti, in particolare in assenza della decarbossilasi come partner metabolico (Powlowski and Shingler, 1994).

Una stretta associazione fisica è stata ipotizzata anche per gli ultimi due enzimi del *meta-pathway* di *P.* sp. OX1, la 4-idrossi-2-oxovalerato aldolasi (HOA), codificata dal gene *pheG*, e l'aldeide deidrogenasi (acetilante) (ADA), codificata dal gene *pheF*. Questa ipotesi è stata formulata sulla base della elevata percentuale di identità nucleotidica esistente tra le sequenze dei geni *pheF* e *pheG* e gli omologhi *dmpF* e *dmpG* di *Pseudomonas* sp. CF600 (Caruso *et al.*, non pubblicato). Le attività catalitiche dell'aldolasi HOA e della deidrogenasi ADA producono piruvato ed acetil-CoA, i prodotti finali della via degradativa che entreranno nel ciclo di Krebs. Si ritiene che l'associazione tra i due enzimi sia necessaria ad incanalare l'intermedio reattivo prodotto da HOA, l'acetaldeide, verso il sito attivo di ADA, in modo tale da evitare la sua libera diffusione, proteggendo la cellula dalla sua tossicità, assicurando che venga metabolizzato da ADA (Powlowski and Shingler, 1994) (fig.21).

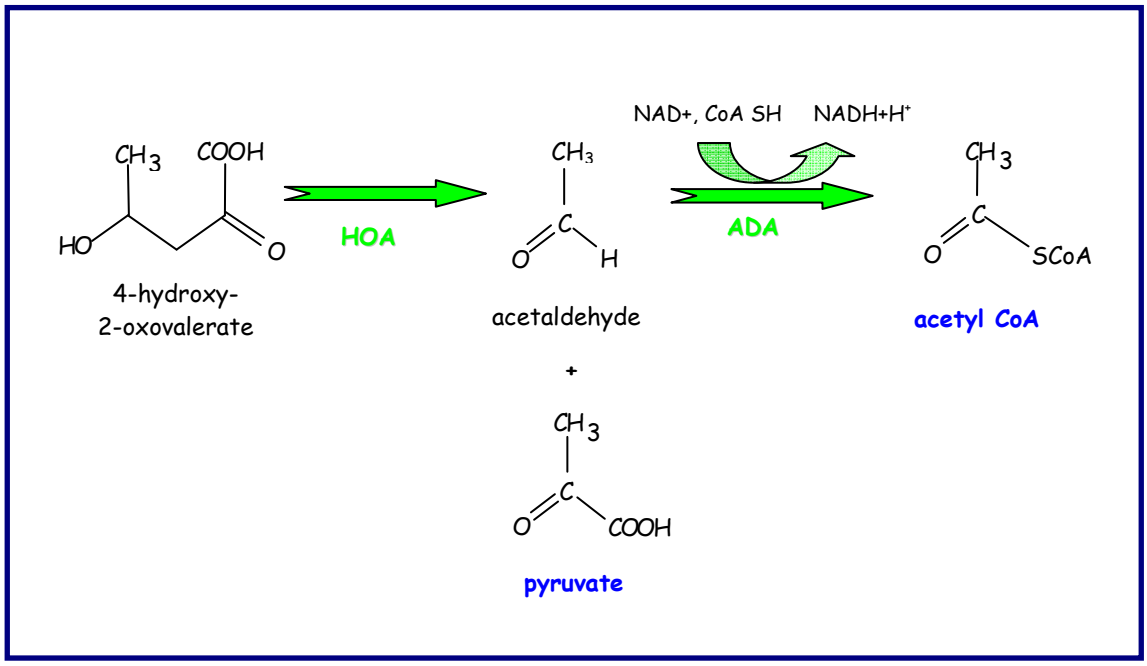


Figura 21. *Le ultime due reazioni del meta pathway di Pseudomonas sp. OX1.*

La struttura cristallografica dell'enzima bifunzionale aldolasi-deidrogenasi DmpFG da *P.* sp. CF600, complessata con il cofattore NAD^+, è stata determinata (Manjasetty *et al.*, 2003). I risultati strutturali hanno permesso di capire l'organizzazione dei due siti attivi, la possibile esistenza di un meccanismo di canalizzazione del substrato tra di loro e come le interazioni proteina-proteina possano facilitare il trasferimento dell'acetaldeide tra due siti distanti.

L’unità biologica attiva dell’enzima DmpFG è un tetramero di 140 kDa costituito da due eterodimeri DmpFG (DmpF di 32.5 kDa e DmpG di 37.5 kDa). Il cristallo contiene una unità asimmetrica *orto*rombica costituita da due tetrameri di eterodimeri DmpFG. Le subunità DmpG formano il *core* della struttura tetramerica, mentre le subunità DmpF sono localizzate alla periferia (Manjasetty *et al.,* 2003) (fig. 22).

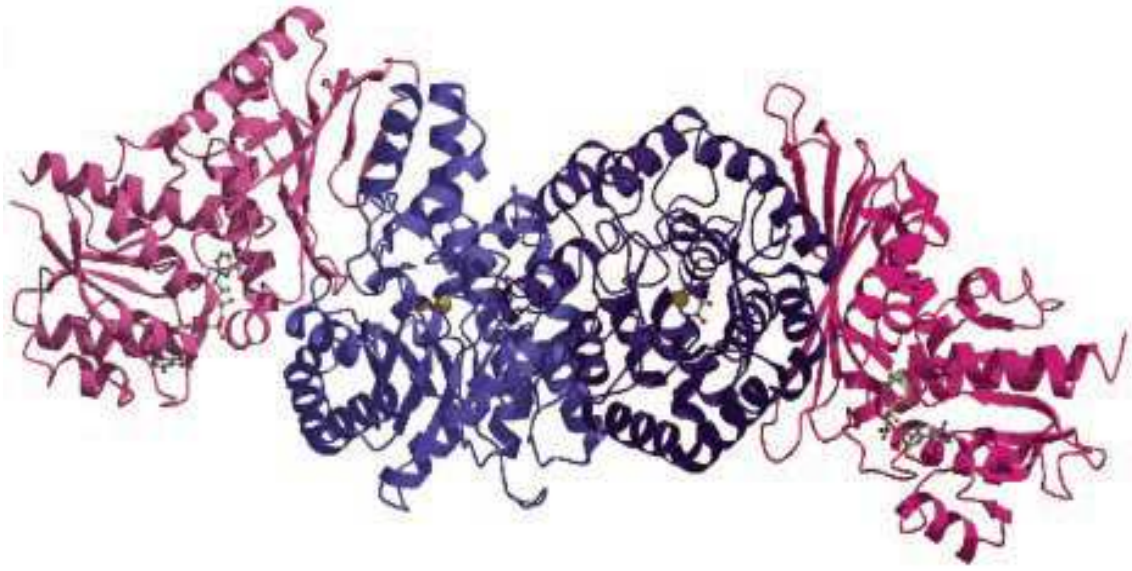


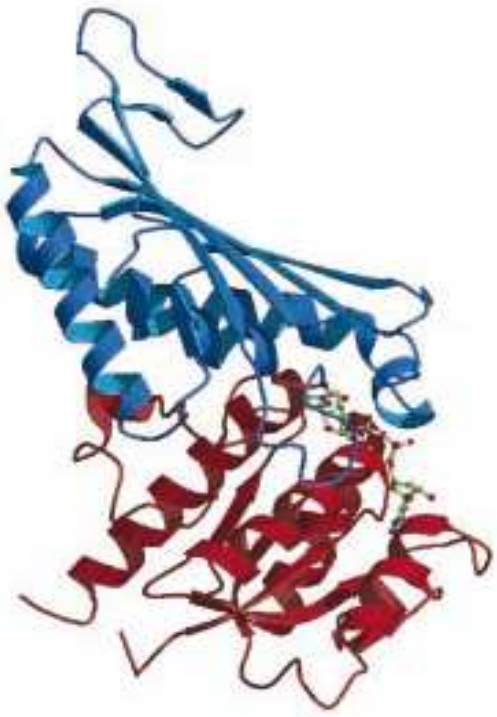
Figura 22: *Assemblaggio tetramerico dell’enzima bifunzionale DmpFG. Le due molecole di DmpG sono mostrate in differente gradazione di blu ed i due protomeri DmpF, localizzati alla periferia dell’oligomero, sono rappresentati in differente gradazione di rosso. L’oxalato ed il* NAD^+ *legati ai siti attivi di DmpG e DmpF, rispettivamente, sono mostrati nella rappresentazione a sfere e bastoncini.*

Studi di attività enzimatica hanno dimostrato che HOA è inattiva se espressa in assenza di ADA, mentre quest'ultima mantiene la sua attività quando è espressa da sola; questo suggerisce che i siti attivi dei due enzimi siano separati sebbene in diretta comunicazione (Powlowski *et al.,* 1993).

DmpG (HOA) è composto da due domini: un dominio N-terminale con struttura a botte TIM $(\alpha/\beta)_8$ (residui 1-250) e un dominio C-terminale di comunicazione costituito da cinque α-eliche (residui 251-345) (fig. 23 a). Quest'ultimo provvede alla formazione di un numero significativo di contatti intersubunità con DmpF e perciò sembra avere un ruolo chiave nella formazione dell'eterodimero (Manjasetty *et al.,* 2003). Il sito attivo di DmpG è localizzato al C-terminale della botte TIM $(\alpha/\beta)_8$. In esso è presente uno ione Mn^{2+} coordinato dai residui Asp-18, His-200, His-202 e da una molecola di acqua in posizione 403. Una seconda molecola di acqua è legata mediante un legame H ad residuo di His-21 (Manjasetty *et al.,* 2003). Per la presenza di uno ione Mn^{2+} nel sito attivo di HOA, si ritiene che l'aldolasi non appartenga a nessuna delle due classi in cui tali enzimi sono in genere suddivisi: la prima classe comprende quelle aldolasi la cui attività catalitica richiede la presenza di un residuo di lisina nel sito attivo, mentre nella seconda classe sono presenti quegli enzimi che richiedono uno ione metallico, generalmente Mg^{2+} o Zn^{2+}, per l'interazione con il gruppo chetonico del substrato (Powlowski and Shingler, 1994). Si può dire che DmpG appartenga ad una sottoclasse delle aldolasi di classe II.

DmpF (ADA) ha una struttura organizzata in due domini: un dominio di legame al NAD^+ (residui 1-30 e 286-312) e un dominio di dimerizzazione (residui 131-312) (Manjasetty et al., 2003) (fig. 23 b). La deidrogenasi richiede NAD^+ per la sua attività catalitica. I protomeri DmpF esistono sia come *olo*enzimi che nella forma *apo*. Nella forma *olo* di DmpF, il dominio di legame al cofattore è ruotato verso il dominio di dimerizzazione, dando luogo ad una conformazione chiusa rispetto a quella assunta dall'enzima nella forma *apo*. Comparazioni strutturali tra le due forme dell'enzima rivelano che l'attività catalitica della deidrogenasi si basa sia su movimenti dei domini che su movimenti delle catene laterali di specifici residui amminoacidici (Manjasetty *et al.,* 2003). Il sito attivo di DmpF è localizzato all'interfaccia tra il dominio legante il cofattore NAD^+ e il dominio di dimerizzazione, dove una Cys-132, responsabile dell'attività catalitica, è adiacente all'anello nicotinammidico del NAD^+ (Manjasetty *et al.,* 2003).

a)



b)

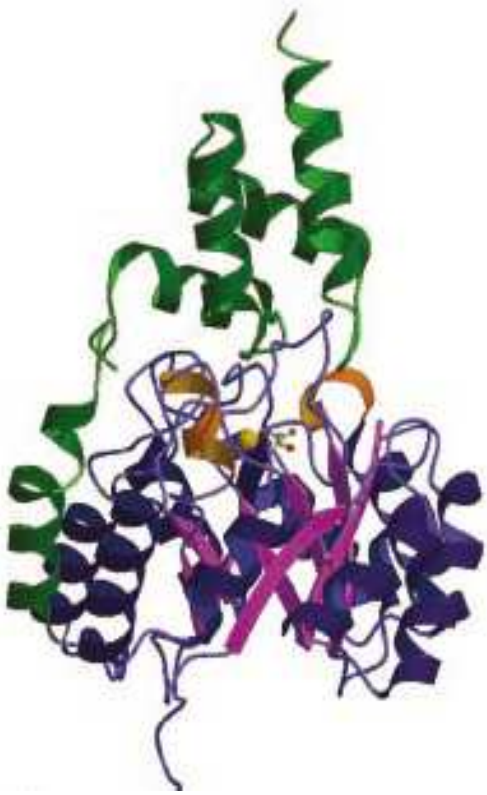


Figura 23: *Rappresentazione strutturale degli enzimi DmpG e DmpF.*

a) Rappresentazione del protomero DmpF. Il dominio di legame per il NAD^+ è raffigurato in rosso ed il dominio di dimerizzazione in blu.

b) Rappresentazione del protomero DmpG. Il dominio a barile TIM è color magenta ed il dominio di comunicazione è in grigio.

Sono stati proposti due possibili meccanismi cinetici per spiegare l'attività catalitica dell'aldeide deidrogenasi acetilasi di *P.* sp. CF600. In una reazione a 3 componenti, il meccanismo cinetico può essere "sequenziale", in cui acetaldeide, NAD^+ e CoA legano l'enzima prima del rilascio dei prodotti, o a "ping-pong", in cui il NAD^+ si lega all'enzima, seguito dall'acetaldeide; subito dopo viene rilasciato il NADH, quindi si lega il CoA formando, infine, l'acetil-CoA. Studi di attività enzimatica condotti sull'aldeide deidrogenasi DmpF e sul complesso DmpFG hanno escluso il meccanismo a "ping-pong" e proposto due meccanismi cinetici per il legame sequenziale all'enzima. In entrambi i casi si ipotizza la formazione di un complesso intermedio costituito da enzima, acetaldeide e NAD^+, a cui si lega poi il CoA. A questo punto viene rilasciato il prodotto, l'acetil-CoA, ed il NADH (www.collectionscanada.gc.ca/obj/s4/f2/dsk2/ftp01/MQ39458.pdf).

Gli studi cristallografici hanno confermato il *channeling* dell'acetaldeide tra i siti attivi dell'eterodimero DmpFG. Il *channeling* enzimatico è un processo attraverso il quale gli intermedi metabolici, come l'acetaldeide, sono trasferiti direttamente tra i siti attivi dei due enzimi senza essere rilasciati nel mezzo cellulare; ciò costituisce un vantaggio perché protegge gli intermedi chimicamente labili dalla degradazione, previene la diffusione degli intermedi non polari attraverso la membrana cellulare e protegge la cellula dai prodotti tossici dei *pathways* catabolici, come nel caso dell'acetaldeide.

Tra il dominio a barile TIM e quello di comunicazione di DmpG si forma un canale che si estende verso il sito attivo di DmpF. In presenza di NAD^+ tale canale ha una lunghezza di 29Å. I residui amminoacidici che delimitano il canale sono principalmente idrofobici, in modo da creare un ambiente non reattivo in cui può passare l'acetaldeide. Nella struttura dell'oloenzima le estremità del canale sono bloccate a livello di entrambi i siti attivi. La catena laterale della Tyr-291 chiude l'entrata al tunnel dal sito dell'aldolasi, mentre i residui Ile-172, Ile-196 e Met-198 bloccano l'accesso al sito attivo di ADA (fig. 24) (Manjasetty *et al.*, 2003).

Il substrato di HOA, il 4-idrossi-2-oxovalerato, ha accesso al sito attivo di DmpG passando attraverso un canale che si estende dall'ambiente acquoso esterno verso il sito attivo. Il residuo di His-21 controlla l'accesso al sito attivo mediante movimenti torsionali della sua catena laterale che vanno ad aprire/chiudere il canale. Una volta che il substrato è all'interno del sito attivo, la catena laterale dell' His-21 va ad assumere la posizione che le permette di estrarre il protone 4-idrossi dal substrato, liberando così l'acetaldeide ed enolato, che rimane legato all'enzima nel sito attivo. La catena laterale della Tyr-291 lega il substrato e blocca l'accesso al tunnel: un successivo movimento torsionale della catena laterale permette alla Tyr-291 di accettare il protone dall'His-21 ed aprire l'accesso al tunnel,

incanalando l'acetaldeide verso il sito attivo di ADA. La Tyr-291 è poi riposizionata nell'orientamento "tunnel chiuso", in cui può protonare l'enolato legato al sito attivo per dare piruvato. L'acetaldeide raggiunge il sito attivo di ADA: grazie all'interazione con il NAD^+ e con il Coenzima A, ADA può catalizzare una reazione di deidrogenazione dell'acetaldeide ad acetato, seguita dalla sua conversione ad acetil-CoA in modo ATP-indipendente (Manjasetty *et al.*, 2003).

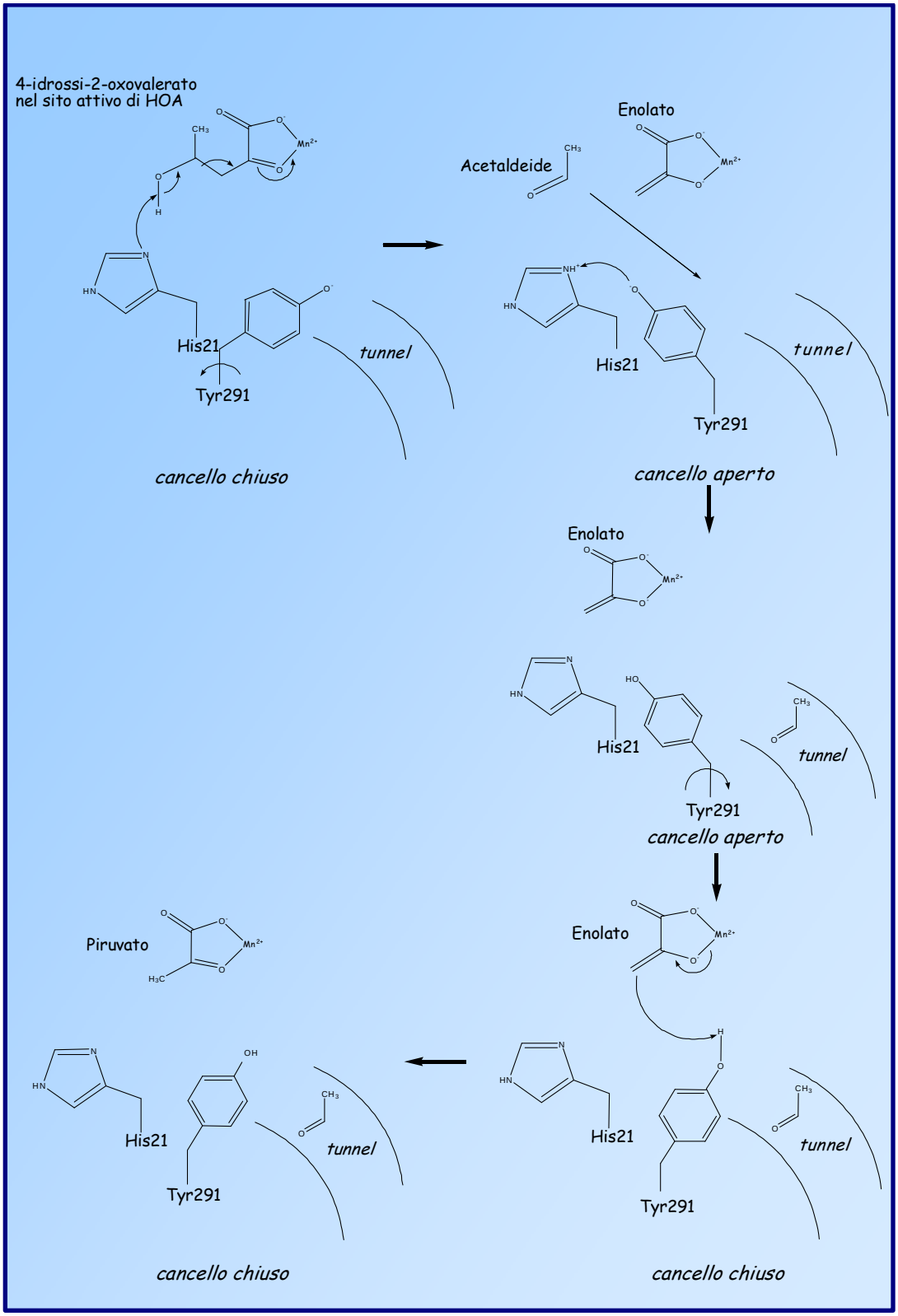


***Figura 24**. Rappresentazione schematica delle reazioni mediate da HOA, con il trasferimento dell'acetaldeide al sito attivo di ADA.*

La caratterizzazione genetica e biochimica dei *pathways* catabolici di *Pseudomonas* sp. OX1 è il risultato della collaborazione tra diversi gruppi di ricerca.

Nel laboratorio della Prof. Carla Caruso, presso l'Università della Tuscia di Viterbo, dove ho svolto il mio dottorato di ricerca, è stato portato a termine il sequenziamento dell'operone *phe* di *Pseudomonas* sp. OX1, omologo all'operone *dmp* di *Pseudomonas* sp. CF600. Le sequenze determinate sono relative agli ultimi quattro geni codificanti rispettivamente l'aldeide deidrogenasi (acetilante) (ADA), codificata dal gene *phe*F (66% di identità con *dmp*F e 64% con *xyl*Q), la 4-idrossi-2-oxovalerato aldolasi (HOA), codificata dal gene *phe*G (64% di identità con *dmp*G e 62% con *xyl*K), la 4-oxalocrotonato decarbossilasi (4OD), codificata dal gene *phe*H (83% di identità con *dmp*I e 93% con *xyl*I) e la 4-oxalocrotonato isomerasi (4OI), codificata dal gene *phe*I (68% di identità con *dmp*I e 82% con *xyl*H) (Caruso *et al.*, non pubblicato).

L'operone *phe*, codificante gli enzimi del *lower meta pathway*, è stato isolato dal genoma di *Pseudomonas* sp. OX1 e clonato in un vettore cosmidico noto come pFB3411 (Bertoni *et al.*, 1996). La sequenza degli ultimi quattro geni dell'operone *phe* di *Pseudomonas* sp. OX1 è stata determinata mediante la tecnica del "*primer walking*", usando il DNA cosmidico come stampo. La sequenza dell'operone *phe* era stata delucidata dal gruppo del Prof. Di Donato, Università degli studi Federico II di Napoli, fino al gene *pheE*, codificante per l'enzima OEH (2-oxopenta-4-dienoato idratasi). In base alla sequenza nota nella regione 3' del gene *phe*E (85% di identità con *dmp*E e 98% con *xyl*J), è stato progettato un *primer* che ha permesso di estendere la sequenza all'interno del gene successivo *pheF*. Dalle sequenze ottenute ogni volta, sono stati progettati *primers* più interni che hanno permesso di estendere la lettura della sequenza nucleotidica dell'operone *phe* in direzione 5'→ 3', delucidando così la sequenza dei geni *pheFGHI* (Caruso *et al.*, non pubblicato).

Parte del lavoro presentato in questa tesi è incentrato sulla caratterizzazione funzionale dell'aldolasi HOA e della deidrogenasi ADA di *Pseudomonas* sp. OX1.

I geni *pheF* e *pheG*, codificanti rispettivamente la deidrogenasi ADA e l'aldolasi HOA, sono stati sottoposti a studi di similarità utilizzando il programma EXPASY disponibile in rete all'indirizzo http://www.expasy.org/tools/. Le sequenze nucleotidiche dei due geni sono state allineate a quelle di geni omologhi di batteri appartenenti al genere *Pseudomonas*, in particolare *P*. sp. CF600 (operone *dmp* per il catabolismo dei (metil)fenoli. Numero di accessione M33263), *P*. *putida* mt-2 (plasmide TOL pWWO per il catabolismo del toluene e xilene. Numero di accessione M64747), *P*. *putida* HS1 (plasmide TOL pDK1 per il catabolismo di toluene e xilene. Numero di accessione AF134348), *P*. sp. S-47 (*meta cleavage pathway* per la degradazione del 4-clorobenzoato. Numero di accessione AF20981)

e *P. stutzeri* AN10 (*meta cleavage pathway* per la degradazione del naftalene. Numero di accessione AF039534). L'allineamento delle sequenze nucleotidiche è stato realizzato in maniera da ottimizzare i risultati facendo ricorso all'inserimento di alcuni "gaps". Nelle tabelle sono riportate le percentuali di identità di sequenza nucleotidica (Tab. 1).

pheG	CF600	mt-2	HS1	S-47	OX1
AN10	65	62	63	96	98
OX1	64	62	63	96	
S-47	64	63	63		
HS1	80	92			
mt-2	81				

pheF	CF600	mt-2	HS1	S-47	OX1
AN10	66	64	66	99	97
OX1	66	64	66	97	
S-47	66	64	66		
HS1	86	91			
mt-2	85				

Tabella 1. *Identità di sequenza nucleotidica (%) dei geni pheF e pheG.*

I geni *pheF* e *pheG* di *P.* sp. OX1 mostrano un elevata identità di sequenza con i geni omologhi per il metabolismo del naftalene e del 4-clorobenzoato rispettivamente in *P. stutzeri* AN10 (97% e 98% rispettivamente) e *P.* sp. S-47 (97% e 96%). Una minore identità di sequenza è presente tra i geni *pheF* e *pheG* di *P.* sp. OX1 ed i geni omologhi di *P.* sp. CF600 (66% e 64%), *P. putida* HS1 (66% e 63%) e *P. putida* mt-2 (64% e 62%).

Successivamente è stata realizzata la caratterizzazione strutturale delle proteine ADA e HOA da *P.* sp. OX1. La traduzione della sequenza nucleotidica è stata effettuata utilizzando il programma EXPASY. L'analisi della sequenza nucleotidica del gene *pheF*, codificante ADA, rivela una ORF che codifica per una putativa proteina di 307 amminoacidici, mentre quella effettuata sul gene *pheG*, codificante HOA, rivela una ORF di 346 residui amminoacidici (fig. 25).

Figura 25. *Putativa sequenza amminoacidica delle proteine ADA e HOA da P. sp.* OX1.

Una bassa ma significativa identità di sequenza è presente tra le proteine ADA e HOA di *P.* sp. OX1 e *P.* sp. CF600, di cui è nota la struttura tridimensionale determinata mediante cristallografia ai raggi X (Manjasetty *et al*. 2003) (Tab. 2).

HOA	CF600	mt-2	HS1	S-47	OX1
AN10	53	55	52	99	99
OX1	53	55	52	99	
S-47	53	55	52		
HS1	83	92			
mt-2	87				

ADA	CF600	mt-2	HS1	S-47	OX1
AN10	58	58	58	99	99
OX1	58	58	58	99	
S-47	58	58	58		
HS1	89	95			
mt-2	89				

Tabella 2. *Identità di sequenza amminoacidica (%) delle proteine ADA e HOA. In rosso le percentuali di identità delle proteine ADA e HOA di P. sp.* OX1 *e P. sp.* CF600.

La struttura tridimensionale dell'enzima bifunzionale deidrogenasi/aldolasi (DmpFG) di *P.* sp. CF600, disponibile in internet nella banca dati PDB (Code n. 1NVM), è stata utilizzata come stampo per costruire un modello tridimensionale del complesso enzimatico ADA-HOA di *P.* sp. OX1. L'allineamento delle sequenze amminoacidiche delle proteine ADA e HOA con le proteine omologhe cristallizzate da *P.* sp. CF600, ha messo in evidenza rispettivamente un'identità del 58% e del 53% (Tab. 2). Questo valore di identità di sequenza proteica assicura l'omologia ed una similarità tridimensionale tra le proteine in esame, permettendo la fattibilità di uno studio di *homology modeling*. A questo punto, testata sia la stabilità termodinamica che la qualità stereochimica mediante il grafico di Ramachandran, il modello tridimensionale ricavato è risultato praticamente sovrapponibile allo stampo (fig. 26) (Caruso *et al.*, non pubblicato).

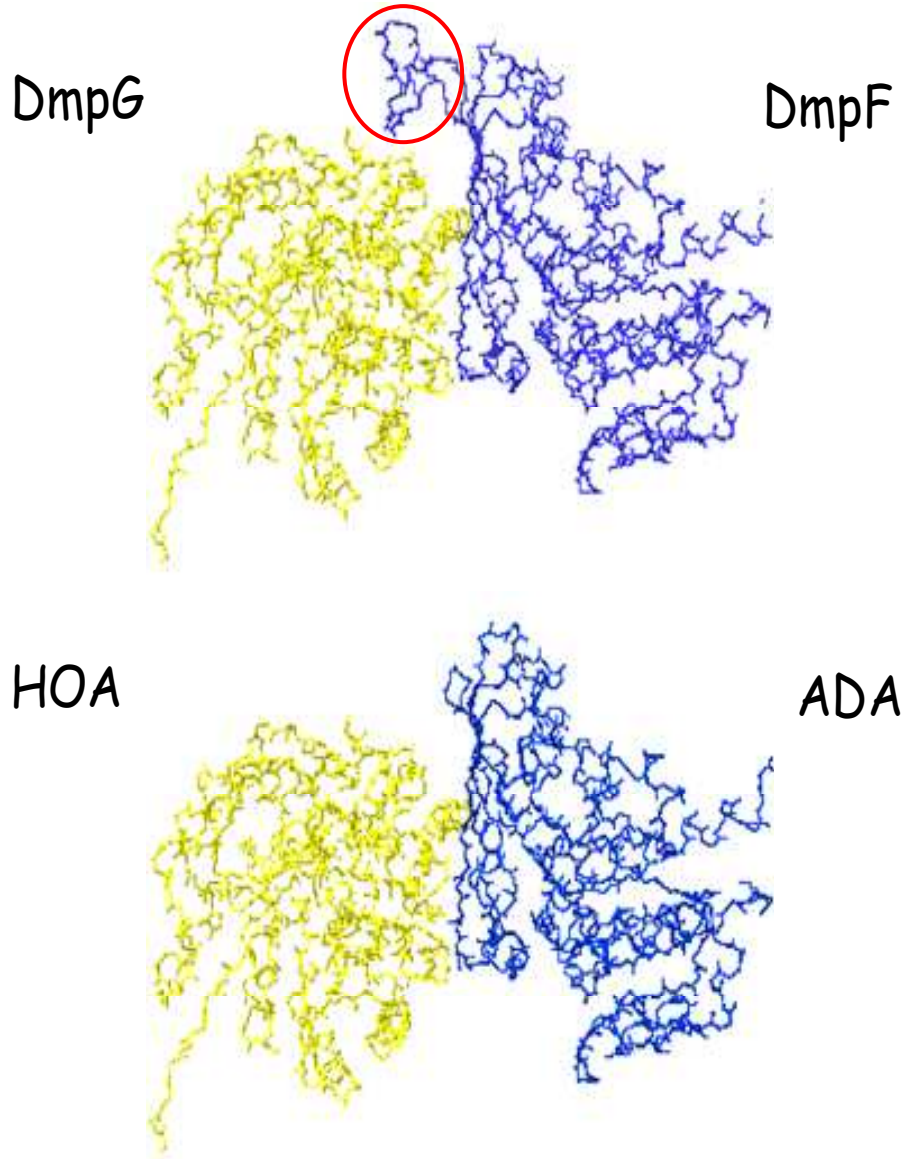


Figura 26. *Rappresentazione dei modelli tridimensionali dell'enzima bifunzionale DmpFG da P. sp.* CF600 *e dell'enzima bifunzionale ADA-HOA da P. sp.* OX1.

L'allineamento della sequenza aminoacidica della proteina ADA da *P.* sp. OX1 con DmpF ha evidenziato una delezione di 17 residui amminoacidici (residui 252-269) nella proteina ADA. Come si nota in figura 26, i 17 residui amminoacidici mancanti corrispondono ad un tratto che si ripiega a loop nella struttura tridimensionale dell'enzima DmpF di *P.* CF600. Dal momento che è stato ipotizzato un funzionamento analogo dei due complessi enzimatici questa delezione risulterebbe ininfluente ai fini dell'attività catalitica.

1.6 Degradazione dei tre isomeri dello xilene in Pseudomonas sp. OX1

I ceppi batterici che degradano composti aromatici mostrano una rimarchevole versatilità metabolica dovuta ad un ampio *range* di substrati riconosciuti dagli enzimi catabolici. Questa bassa specificità di substrato porta alla degradazione di molecole tra loro correlate attraverso lo stesso *pathway* catabolico. Ne sono un esempio toluene, *m*- e *p*-xilene che vengono metabolizzati normalmente mediante la progressiva ossidazione del gruppo metilico che porta alla formazione di un acido metilbenzoico poi convertito a (metil)catecolo (TOL *upper pathway*) (Burlage *et al.,* 1989). L'*o*-xilene, invece, non può essere degradato attraverso il TOL *upper pathway* poiché i derivati del toluene *orto*-sostituiti non sono substrati per la xilene monoossigenasi, il primo enzima di questa via catabolica.

Un'ulteriore versatilità metabolica può essere raggiunta mediante l'acquisizione di trasposoni catabolici che portano le informazioni genetiche per nuovi *pathways*. Inoltre, sequenze di inserzione ISs, possono contribuire alla versatilità metabolica dei batteri, in quanto determinano riarrangiamenti genomici che possono portare all'espressione di geni altrimenti silenti.

Pseudomonas sp. OX1 è in grado di crescere in presenza di toluene ed *o*-xilene, ma non può utilizzare *m*- e *p*-xilene come substrati di crescita. Infatti, quando il ceppo è esposto a questi composti, le cellule batteriche muoiono per l'accumulo di composti parzialmente ossidati: alcuni fenoli e catecoli prodotti attraverso le attività di ToMO e PH possono essere degradati solo molto lentamente o non venire affatto catabolizzati (Barbieri *et al.,* 1993). È stato osservato che le attività di ToMO e della fenolo idrossilasi PH sono in grado di convertire *m*- e *p*-xilene in 3,5-dimetilcatecolo e in 3,6-dimetilcatecolo, rispettivamente. La C2,3O di *Pseudomonas* sp. OX1 rappresenta la "strettoia" per la successiva degradazione di questi intermedi: tale enzima è in grado di catalizzare la scissione dell'anello di molti intermedi (catecolo, 3- e 4-metilcatecolo, 3,4- e 4,5-dimetilcatecolo) derivati da toluene e *o*-*x*ilene attraverso le due monoossigenazioni dirette da ToMO e da PH, per dare semialdeide 2-idrossimuconica, ma sembra incapace di catalizzare il taglio dei catecoli con due gruppi metilici nelle posizioni 3,5 e 3,6.

Il 3,5-dimetilcatecolo e il 3,6-dimetilcatecolo sono prodotti attraverso la progressiva ossidazione dell'anello aromatico che porta a *m*- e *p*-xilene cis-diidrodioli, poi deidrogenati nei rispettivi dimetilcatecoli, che si accumulano poiché non vengono metabolizzati dalla C2,3O, risultando tossici per la cellula (Arenghi *et al.,* 2001; Barbieri *et al.,* 1993 e 2000; Bertoni *et al.,* 1996). Ciononostante, da colture di *P.* sp. OX1, sono stati isolati mutanti spontanei che avevano acquisito la capacità di crescere su *m*- e *p*-xilene, ma incapaci di

utilizzare l'*orto*-isomero (Barbieri *et al.*, 1993). Successivamente sono stati isolati dei revertanti in grado di crescere su tutti i tre isomeri dello xilene (Di Lecce *et al.*, 1997).

È stato dimostrato che la degradazione dei due isomeri dello xilene procede attraverso il TOL *pathway*. Il processo consiste nella progressiva ossidazione del gruppo metilico, per arrivare alla formazione di monometilcatecoli non letali, superando la limitazione imposta dalla C2,3O (Barbieri *et al.*, 1993; Bolognese *et al.*, 1999).

Pseudomonas sp. OX1, a livello fenotipico, non mostra alcuna analogia con i ceppi TOL, ma porta tutte le informazioni genetiche richieste per il catabolismo di *m*- e *p*-xilene (fig. 27). Il mutante spontaneo *Pseudomonas* M1, infatti, porta i geni codificanti gli enzimi coinvolti nella degradazione dei due isomeri dello xilene, altamente omologhi ai geni *xyl* dell'*upper pathway* in pWW0 di *P. putida* mt-2. Questo mutante non è più in grado di utilizzare *o*-xilene come fonte di carbonio ed energia ma degrada *m*- e *p*-xilene catalizzando la progressiva ossidazione del gruppo metilico (fig. 27) (Barbieri *et al.*, 1993).

Negli ambienti inquinati, i tre isomeri dello xilene sono solitamente presenti in miscela, perciò, la capacità di degradare i metilbenzeni può rappresentare un vantaggio per i batteri che colonizzano tali aree. È noto un solo esempio di batteri con tali caratteristiche. Il revertante *Pseudomonas* R1 mostra la capacità di degradare i tre isomeri dello xilene: presenta sia il TOL *pathway* per *m*- e *p*-xilene, che il TOU *pathway* per il catabolismo di *o*-xilene (fig. 27). Il catabolismo di *m*- e *p*-xilene, mediante il TOL *pathway*, procede attraverso la progressiva ossidazione del gruppo metilico per dare, rispettivamente, il 3- e il 4- metilbenzoato mentre, attraverso il TOU *pathway*, una piccola quantità dei due isomeri dello xilene viene trasformata nei corrispondenti dimetilfenoli (2,3- e 2,5-dimetilfenolo, rispettivamente), che non sono usati per la crescita e sono tossici per la cellula. È stato osservato, infatti, che i due dimetilfenoli intermedi sono successivamente convertiti da ToMO e PH in 3,5- e 3,6-dimetilcatecolo, non metabolizzati dalla C2,3O. Si ritiene che la produzione degli intermedi tossici sia la causa della rara presenza di tali revertanti negli ambienti contaminati dai metilbenzeni (Di Lecce *et al.*, 1997). Il cometabolismo rappresenta, quindi, uno svantaggio evolutivo per il batterio che si trova in ambienti inquinati dai tre isomeri dello xilene e può essere aggirato mediante il silenziamento di uno dei due *pathway* catabolici. In *Pseudomonas* sp. OX1, infatti, i geni codificanti il TOL *pathway* sono inattivati dalla presenza di una sequenza di inserzione di 3kb, indicata come ISPs1. Questo elemento trasponibile è assente, invece, nella corrispondente regione nel DNA del mutante M1. L'incapacità di M1 di crescere su *o*-xilene è dovuta all'inattivazione del TOU *pathway* mediata dall'inserzione di una ISPs. Nessuna IS è stata trovata, invece, nei *cluster* genici *tou* e *xyl* del revertante R1 (Bolognese *et al.*, 1999).

Sebbene il TOL *pathway* sia silente nel ceppo selvatico di *Pseudomonas* sp. OX1, la conservazione dei geni *xyl* nel genoma può conferire un vantaggio selettivo alla popolazione batterica. Tali geni rappresentano, infatti, una riserva di informazione genetica che, in seguito a cambiamenti delle condizioni ambientali, può assicurare la sopravvivenza di quei membri della popolazione che li esprimono. Tutto ciò si realizza attraverso un riarrangiamento genetico mediato dalla trasposizione e stimolato da condizioni di stress ambientale, generando, così, una grande variabilità genetica e contribuendo alla plasticità genomica di *Pseudomonas* sp. OX1.

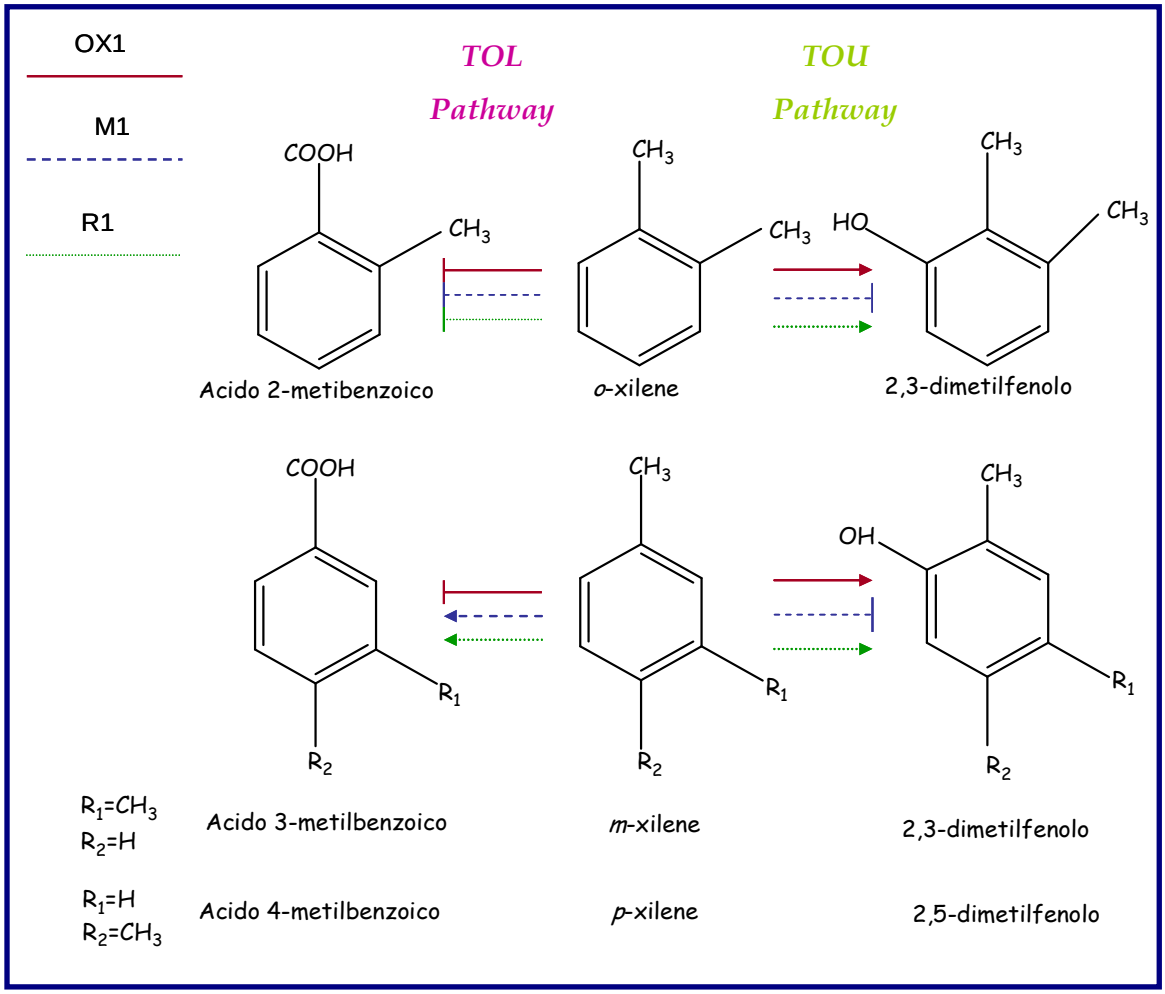


Figura 27. *Catabolismo di o-, m- e p-xilene in Pseudomonas sp. OX1, M1 e R1 attraverso il TOL ed il TOU pathway.*

1.7 Controllo trascrizionale

Gli elementi coinvolti nella regolazione dell'espressione di ToMO sono il regolatore positivo TouR e il promotore P_{ToMO} (fig. 28).

P_{ToMO}, il promotore cognato di *touR*, è localizzato 2kb a monte del codone di inizio ATG del primo gene codificante il complesso multienzimatico *tou*. Si tratta di un promotore σ^{54}-dipendente con le caratteristiche sequenze consenso –24 TGGC e –12 TTGC. A monte della sequenza consenso –24 sono state localizzate due ripetizioni di 15 bp altamente omologhe alle UASs (***u****pstream* ***a****ctivating* ***s****equences*) riconosciute da vari attivatori della trascrizione dei *pathways* catabolici di composti aromatici appartenenti alla famiglia NtrC (*Nitrogen-regulatory protein C family*) (Arenghi *et al.*, 1999).

Due putative ORFs (*orf1* e *orf2*) di funzione sconosciuta, sono state identificate tra il promotore e il primo gene strutturale di ToMO, *touA*. Sembra che le due ORFs non siano essenziali per l'attività enzimatica di ToMO, ma non è ancora stata chiarita la loro possibile funzione, vista la mancanza di omologia con altre sequenze note (Arenghi *et al.*, 1999).

Il locus *touR* mappa a valle dei geni strutturali *tou* ed è identificato da una ORF avente lo stesso orientamento del *cluster tou*. Essa codifica un polipeptide di circa 569 aa con una massa molecolare di 67 kDa: tale polipeptide è il regolatore TouR, il quale controlla positivamente l'espressione di ToMO. L'elevato grado di similarità (83%) con il regolatore DmpR che controlla il catabolismo del fenolo in *Pseudomonas* sp. CF600, ha suggerito l'appartenenza di TouR alla famiglia degli attivatori NtrC-*like* (Arenghi *et al.*, 1999; Shingler *et al.*, 1993). Tali regolatori appartengono alla famiglia degli attivatori trascrizionali procariotici che agiscono come *enhancer-binding proteins*, attivando la trascrizione a distanza attraverso un fattore sigma alternativo: σ^{54}.

Il fattore alternativo σ^{54} conferisce all'*olo*enzima RNA polimerasi la capacità di riconoscere ed iniziare la trascrizione da un promotore con le caratteristiche sequenze consenso -12(GC)/-24(GG). Il legame della RNA polimerasi σ^{54}-dipendente al promotore porta alla formazione di un complesso chiuso stabile incapace, però, di procedere verso la formazione della forma aperta del complesso trascrizionale e quindi di attivare la trascrizione in assenza di un regolatore positivo.

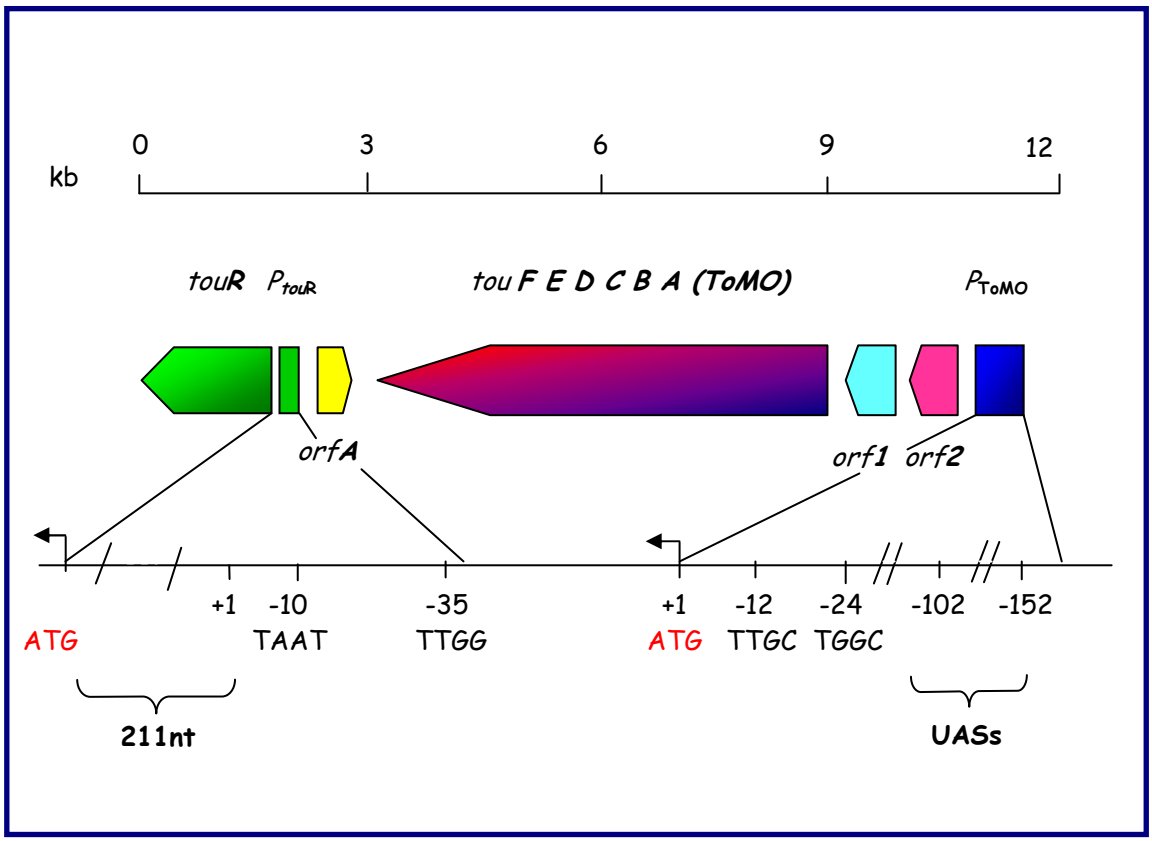


Figura 28. *Organizzazione della regione comprendente il cluster tou e il gene touR nel cromosoma di P. sp. OX1.*

Tutti i regolatori σ^{54}-dipendenti presentano un sito conservato per il legame al DNA ed un'attività ATPasica grazie alla quale viene prodotta l'energia necessaria per indurre il processo di isomerizzazione del complesso RNAP-σ^{54}/promotore richiesto per l'attivazione della trascrizione. Un'altra caratteristica dei regolatori σ^{54}-dipendenti è che essi esercitano solitamente la loro funzione regolatoria a distanza, legando specifiche sequenze localizzate a 100-200 bp a monte del promotore che regolano (Kustu *et al.*, 1991; Morett and Segovia, 1993). Queste regioni sono rappresentate da sequenze ripetute invertite, chiamate UASs (***u****pstream* ***a****ctivating* ***s****equences*). L'attivatore trascrizionale si lega alle sequenze UASs, mentre l'RNAP-σ^{54} forma un complesso chiuso a livello del promotore. Affinché la trascrizione venga attivata è necessaria l'interazione del regolatore con il complesso trascrizionale chiuso: ciò si realizza attraverso il ripiegamento del DNA in un *loop* mediato da fattori di curvatura, quali la proteina IHF (*integration host factor*), permettendo così la corretta interazione tra l'attivatore e il complesso RNAP-σ^{54}/promotore (Kustu *et al.*, 1991; Pérez-Martin *et al.*, 1994).

I membri della famiglia dei regolatori σ^{54}-dipendenti hanno un'organizzazione comune, con quattro domini strutturali i quali mostrano altrettante distinte funzioni (North *et al.,* 1993; Morett and Segovia, 1993).

I regolatori DmpR di *Pseudomonas* sp. CF600 e XylR di *Pseudomonas putida* mt-2 possono essere considerati i rappresentanti di questa famiglia di attivatori.

Il dominio ammino-terminale o dominio A riconosce direttamente gli effettori aromatici che portano all'attivazione del regolatore (Shingler and Moore, 1994; Cases and De Lorenzo, 2005). Ciò conferisce specificità alla proteina regolatrice e rende A il dominio più variabile tra i regolatori appartenenti alla famiglia NtrC (fig. 29).

Il dominio C centrale è altamente conservato: ha un attività ATPasica ed è responsabile dell'attivazione del complesso RNAP-σ^{54} coinvolto nell'attivazione trascrizionale (Shingler and Pavel, 1995). L'idrolisi di ATP porta all'interazione con il DNA ed a un rimodellamento della RNAP-σ^{54} per promuovere l'inizio della trascrizione, facilitando la transizione fra i complessi chiuso/aperto della RNA polimerasi (Zhang *et al.,* 2002). Una breve sequenza aminoacidica, nota come dominio B, collega i domini A e C. Sebbene la sua funzione non sia ancora nota, sembra che tale dominio sia coinvolto nella derepressione intramolecolare della proteina regolatrice dopo il legame dell'effettore al dominio A (O'Neill *et al*., 2001).

Il dominio D carbossi-terminale contiene un motivo elica-giro-elica che è necessario per il legame al DNA a livello di siti specifici localizzati nei promotori degli operoni catabolici (Ng *et al.,* 1996; Pérez-Martin *et al.,* 1996 a-b). Il ruolo del legame al DNA mediato dal dominio D sembra essere duplice: da un lato provvede alla specificità, incrementando la concentrazione locale del regolatore vicino al suo promotore, dall'altro facilita l'auto-oligomerizzazione richiesta per l'attivazione trascrizionale (fig. 29) (North *et al.,* 1993; Porter *et al.,* 1993 e 1995).

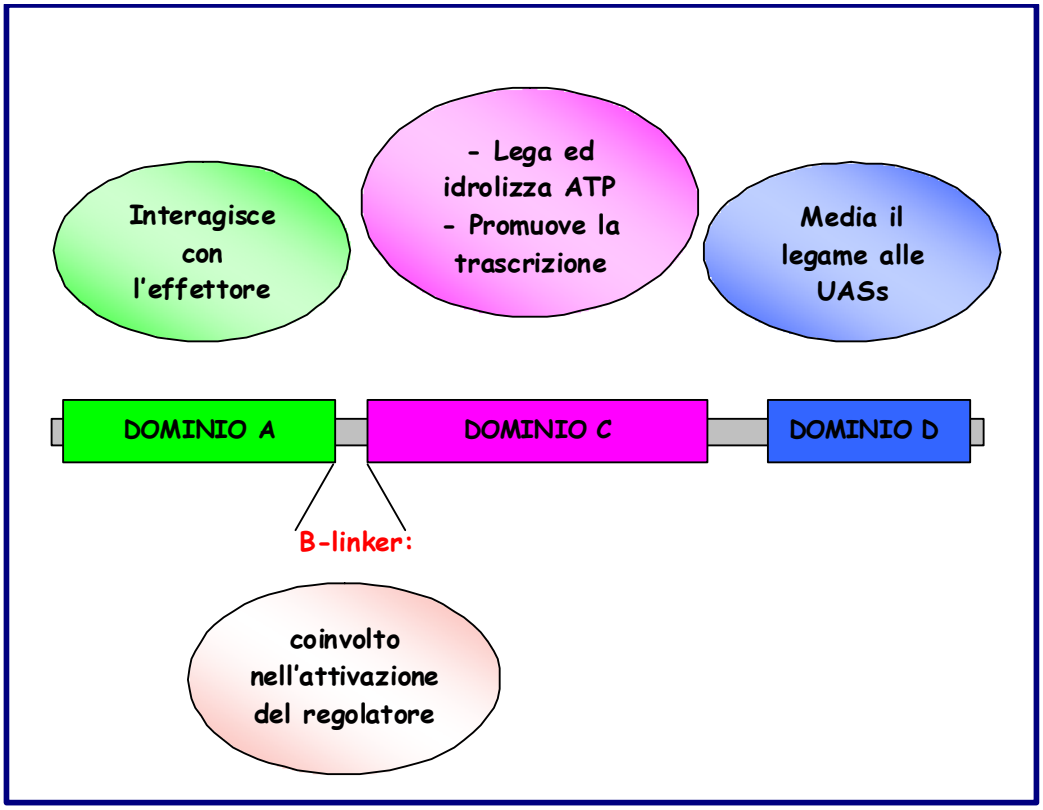


Figura 29. *Rappresentazione schematica dei domini strutturali dei regolatori trascrizionali NtrC-like e loro fuzione.*

Molti regolatori appartenenti alla famiglia NtrC sono espressi costitutivamente in forma inattiva. La forma attiva, capace di promuovere la trascrizione, è determinata dalla fosforilazione di un residuo conservato di Asp-54 nella sequenza amminoacidica del dominio A. La fosforilazione è catalizzata una proteina chinasi che agisce in risposta al segnale di attivazione dato da una istidina autochinasi, solitamente localizzata sulla membrana plasmatica, in presenza del composto aromatico riconosciuto come effettore (Weiss *et al.*, 1991; Stock *et al.*, 1989 e 1990). DmpR, invece, non richiede la presenza di proteine ausiliarie per rispondere al segnale di attivazione: il riconoscimento dell'effettore si realizza tramite il suo legame al dominio A, inducendo la transizione verso la forma attiva del regolatore, caratterizzata dalla capacità di legare ed idrolizzare ATP (Delgado and Ramos, 1994; Pavel *et al.*, 1994; Shingler and Pavel, 1995).

È stato proposto un modello per la regolazione dell'attività di DmpR, secondo il quale il dominio A, in assenza dell'effettore, va ad interagire strettamente con il dominio C, bloccando il sito di legame e di idrolisi dell'ATP ed impedendo l'interazione con l'RNAP-σ^{54} (fig. 30). L'associazione tra il dominio A e il dominio C rappresenta la forma inattiva del regolatore, incapace di promuovere la trascrizione. La presenza del composto aromatico riconosciuto come effettore (fenolo) e il suo legame al dominio A, rimuove la repressione, attivando il regolatore (Shingler, 1996). Nella forma attiva il regolatore va incontro ad oligomerizzazione e all'interazione con l'apparato trascrizionale (Fernandez *et al.*, 1995; Shingler and Pavel, 1995).

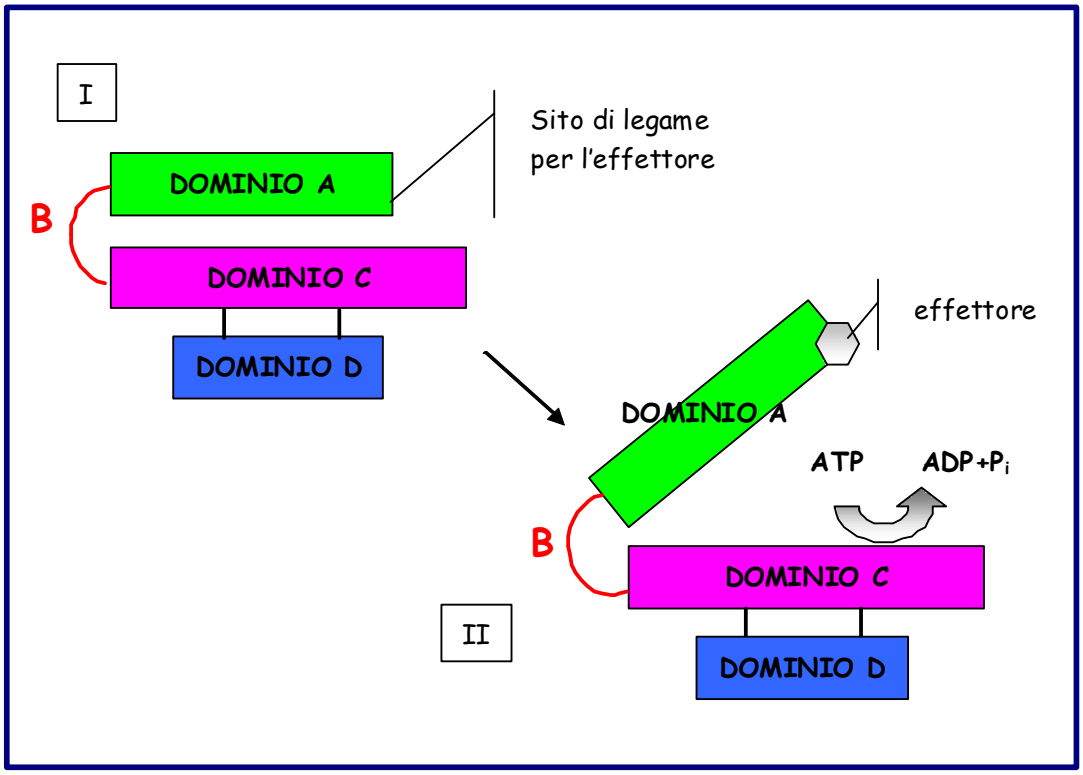


Figura 30. *Modello schematico per l'attivazione del regolatore DmpR.*
I) In assenza dell'effettore il dominio A blocca il sito di legame e di idrolisi dell'ATP sul dominio C.
II) In presenza dell'effettore la repressione esercitata da A viene rimossa.

L'omologia di sequenza tra DmpR e TouR, permette di ipotizzare per quest'ultimo una conformazione ed un meccanismo di azione analoghi. Il gene *touR* è trascritto a partire da un promotore σ^{70}-dipendente caratterizzato dalle regioni –35 TTGG e –10 TAAT e localizzato 223 bp a monte del codone di inizio ATG di *touR* (Arenghi *et al.,* 1999).

Mediante esperimenti condotti *in vitro* è stato proposto il meccanismo di regolazione dell'operone *tou* (Arenghi *et al.,* 2001). L'evento principale della regolazione è rappresentato dal legame dell'effettore (*o*-cresolo) al dominio A di TouR. In assenza di *o*-cresolo, TouR non è in grado di attivare la trascrizione essendo incapace di interagire con P_{ToMO}, che rimane completamente silente. Si ritiene che, in assenza dell'effettore, il dominio A di TouR interagisca con il dominio C dando luogo ad una repressione che impedisce la multimerizzazione del regolatore a livello delle sequenze UASs sul promotore cognato e la formazione del complesso aperto della RNA polimerasi-σ^{54}/promotore.

Come per DmpR, il legame dell'effettore al dominio A induce la rimozione della repressione e la conversione del regolatore nella forma attiva. Per TouR, inoltre, è stata osservata una notevole attività ATPasica costitutiva, che l'aggiunta di *o*-cresolo va solo in piccola parte ad incrementare. L'attività ATPasica è fondamentale per indurre la trascrizione da $P_{ToMO,}$ come avviene in tutti i regolatori σ^{54}-dipendenti, ma per TouR risulta essere sempre presente: tutto ciò si traduce in un'espressione dei geni catabolici a livelli basali, che aumenta in presenza dell'effettore in quanto viene favorita l'oligomerizzazione necessaria all'attivazione trascrizionale (Arenghi *et al.,* 2001).

L'attività di ToMO è indotta dalla responsività di TouR a toluene ed *o*-xilene, che sono i substrati primari del *pathway* catabolico. Tuttavia, lo studio *in vitro* dell'attività di TouR ha permesso di osservare che tali composti inducono solo bassi livelli di attività di ToMO, mentre gli intermedi catabolici (*o*-, *m*-, *p*-cresolo, 2,3-, 3,4-dimetilfenolo) promuovono un risposta molto più elevata (Arenghi *et al.,* 1999).

Sebbene molti regolatori responsivi a σ^{54}, come DmpR, riconoscano di solito i substrati primari, TouR risulta essere attivato in maniera più spiccata dai metil-fenoli intermedi anziché da toluene e *o*-xilene: in particolare l'*o*-cresolo sembra essere l'effettore più efficiente nell'indurre l'attività di ToMO (Arenghi *et al.,* 1999).

Nella sua capacità di riconoscere gli intermedi della via catabolica, ma non i substrati primari come effettori, TouR può essere paragonato ad alcuni regolatori appartenenti alla famiglia degli attivatori trascrizionali LysR, come NahR. Il regolatore NahR (*P. putida* G7, plasmide NAH7) attiva la trascrizione dell'operone *nah* per la degradazione del naftalene e dell'operone *sal* per la degradazione del salicilato, in presenza del salicilato, un intermedio del catabolismo del naftalene (Schell, 1985 e 1993). Bassi livelli di trascrizione dell'operone *nah*

danno luogo ad una lenta conversione del naftalene a salicilato, che poi porterà alla trascrizione NahR-mediata di entrambi gli operoni (Schell, 1985). Un simile modello può essere proposto per la regolazione dell'operone *tou* di *Pseudomonas* sp. OX1(fig. 31): bassi livelli dell'attività di ToMO, dovuti all'attività ATPasica costitutiva di TouR, convertono lentamente gli idrocarburi nei corrispondenti metil- e dimetil-fenoli. I fenoli intermedi interagiscono con TouR attivandolo, incrementando, così, il livello della trascrizione di ToMO. In questo modo si stabilisce una cascata di effetti che porta ad aumentare la sintesi della monoossigenasi (Arenghi *et al.*, 1999). Questo enzima converte toluene e *o*-xilene nei corrispondenti metil- e dimetil-catecoli che sono poi incanalati verso il ciclo di Krebs attraverso una seconda via catabolica che si basa sul *meta*-cleavage dell'anello del catecolo (Bertoni *et al.*, 1998).

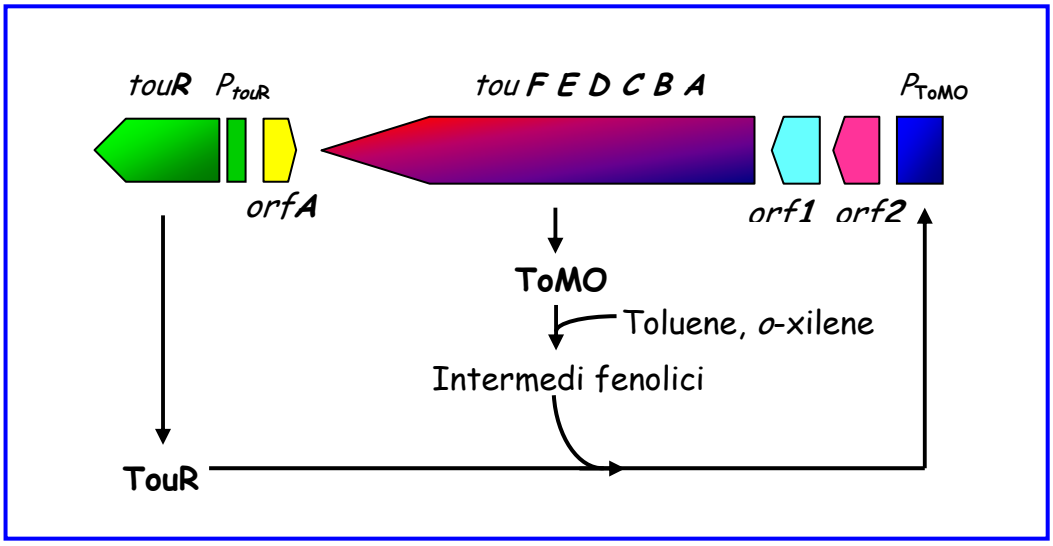


Figura 31: *TouR attiva la trascrizione dal promotore* P_{ToMO} *in risposta agli effettori fenolici con un meccanismo a feedback positivo. L'espressione basale dell'operone tou assicura un livello di attività di ToMO sufficiente a convertire i substrati nei fenoli intermedi che sono riconosciuti da TouR, aumentando il livello di espressione di ToMO.*

Pseudomonas sp. OX1 è il primo ceppo che degrada il toluene in cui un operone codificante una toluene-monoossigenasi è stato trovato associato ad un operone *dmp-like* (*phe operon*). La presenza dell'operone *phe* e di un regolatore responsivo a fenolo e metil-fenoli (TouR) nel genoma di *Pseudomonas* sp. OX1 suggerisce che, in questo ceppo, la via per il catabolismo di toluene e di *o*-xilene si sia evoluta in seguito ad un evento di espansione verticale che ha portato all'incorporazione del *cluster* genico *tou* in una via preesistente per il catabolismo del fenolo (fig. 32) (Arenghi *et al.*, 2001). L'incorporazione e il riarrangiamento di geni catabolici da fonti diverse sono dei mezzi che permettono ai microrganismi di sopravvivere e prosperare in un ambiente mutevole. In questo modo si evolvono caratteristiche metaboliche nuove che portano all'uso di fonti di carbonio alternative. *Pseudomonas* sp. OX1 è un esempio di come i batteri possono adattarsi rapidamente ad un ambiente ostile. Il trasferimento genico e il riarrangiamento mediato da *ISPs1* hanno aumentato il numero dei composti riconosciuti come substrati di crescita, conferendo a questo ceppo un vantaggio selettivo in un ambiente inquinato, ed hanno contribuito ad aumentare la sua *fitness*. Infatti, attivando o silenziando specifici *pathway* catabolici, il riarrangiamento è l'arma che permette l'adattamento a condizioni ambientali mutevoli (Barbieri *et al.*, 2001).

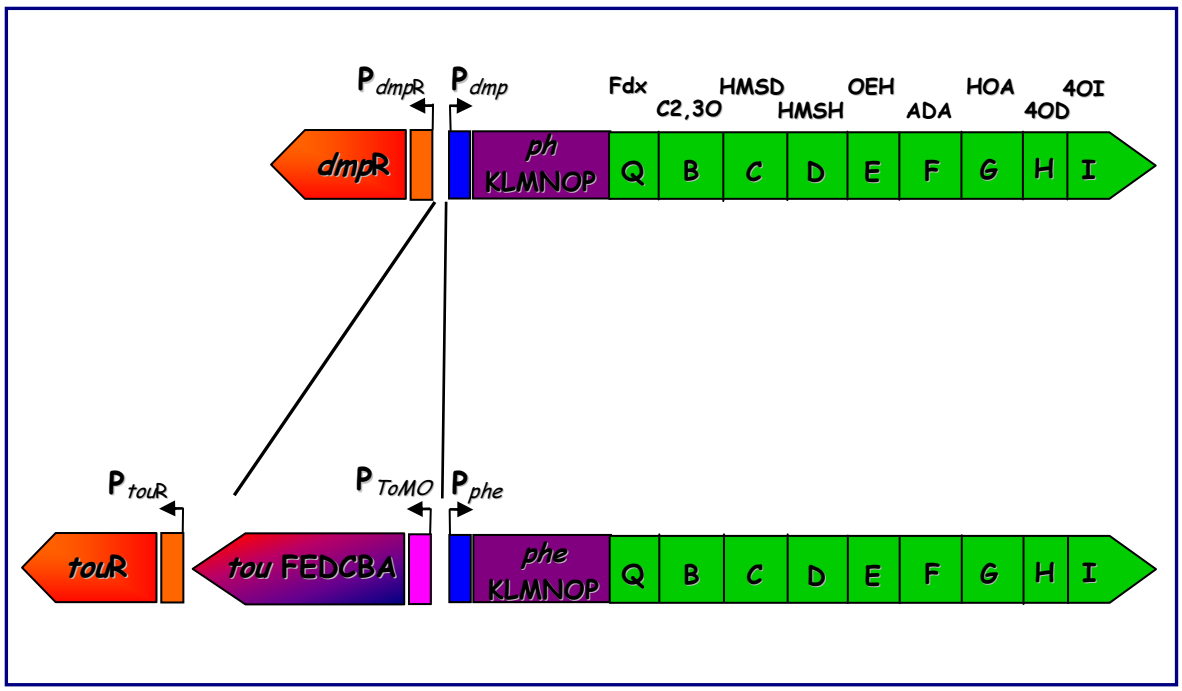


***Figura 32**. Il pathway per il catabolismo di toluene e o-xilene si è evoluto da una via preesistente per il catabolismo dei dimetilfenoli.*

1.8 L'ingegneria metabolica per il biorisanamento

La persistenza di un inquinante nell'ambiente è conseguenza dell'inadeguato potenziale dei microrganismi che, a causa del 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 geneticamente ingegnerizzati per aumentare la capacità e la velocità di smaltimento degli inquinanti (Timmis and Pieper, 1999).

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 (Lau and De Lorenzo, 1999; Pieper and Reineke, 2000).

La razionale ottimizzazione della attività cataboliche conosciute e la creazione di nuove si basa sulla conoscenze 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 del "University of Minnesota Biocatalysis/Biodegradation Database" (http://umbbd.ahc.umn.edu) (Ellis *et al*., 1999 e 2003) e della "Biodegradative Strain Database" (http://bsd.cme.msu.edu/bsd/index.html) (Urbance *et al.*, 2003), 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 (Pazos *et al*., 2003).

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 (Herrero *et al.*, 1990). Questi ultimi, in particolare, permettono l'introduzione di geni specifici nel cromosoma batterico (De Lorenzo *et al*., 1993; De Lorenzo and Timmis, 1994). Tali meccanismi di ingegneria metabolica sono indispensabili laddove non esiste un *pathway* completo per la degradazione di un particolare substrato (es. 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-pathway* modificato. Il batterio ingegnerizzato è risultato essere in grado di crescere su una miscela di composti clorurati e metilati che erano invece tossici per il

ceppo d'origine (Ramos *et al*., 1987).

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 (Lee *et al*., 1995). Derivati di *Pseudomonas* sp. B13 hanno acquisito la capacità di utilizzare 4-cloro- e 3,5 di-cloro-benzoato come conseguenza dell'introduzione di geni del plasmide TOL da *Pseudomonas putida* mt-2. L'utilizzazione di questi substrati, non osservata nel ceppo d'origine, è stata giustificata come combinazione delle attività dei due batteri in esame (Reineke and Knackmuss, 1980).

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.

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 (Haro and De Lorenzo, 2001). 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 (Kolata, 1985; Drobnik, 1999). 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 (Molin, 1993; Molin *et al*., 1993). Un sistema simile è stato recentemente sviluppato nel batterio *P. putida* EEZ30, ceppo degradatore che può essere applicato nel biorisanamento di alchilbenzoati (Ronchel *et al*., 1995).

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*) (Chaloupkova *et al*., 2003). 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 (Kimura *et al*., 1997; Kumumaro *et al*., 1998).

Esperimenti di mutagenesi sito-diretta eseguiti sull'enzima toluene-ortomonoossigenasi (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* (Canada et al., 2002; Rui *et al*., 2004).

Attualmente sono disponibili sistemi computazionali che, partendo dalle informazioni contenute nei database precedentemente indicati (UMBBD), consentono la predizione delle attività enzimatiche che dovrebbero essere impiegate per ottenere la completa degradazione di uno specifico composto (Hou *et al*., 2003). Tale analisi *in silico* costituisce uno strumento importante per la creazione in laboratorio del ceppo batterico avente le proprietà desiderate.

1.9 Biosensori

Negli ultimi decenni l'inquinamento ambientale è diventato un serio problema a causa del rilascio incontrollato di sostanze dannose per l'ambiente, derivanti da attività industriali, agricole, lavorazione del petrolio e dalla produzione di molecole di sintesi. Per la protezione dell'ambiente, l'emissione di sostanze chimiche non biodegradabili, come i composti aromatici, deve essere severamente proibita o mantenuta il più bassa possibile. In questo contesto, sono urgentemente richiesti sia metodi di risanamento che metodi di rilevazione, sensibili e convenienti, per gli inquinanti ambientali.

I metodi di rilevazione cromatografici attualmente usati per l'analisi dei campioni da siti contaminati sono costosi e tecnicamente complessi (Martinez *et al.*, 1996). Un modo semplice per ridurre il costo della rilevazione del contaminante è di usare biosensori, derivati da sistemi genetici di batteri che impiegano contaminanti organici come substrati per la crescita (Wise and Kuske, 2000). I biosensori batterici sono microrganismi ingegnerizzati allo scopo di esprimere un segnale, come la bioluminescenza, in risposta all'esposizione ad uno specifico agente inquinante. La sostanza inquinante induce l'espressione del segnale specificatamente ed analiticamente utile e solo in presenza di uno o di un set limitato di composti

strutturalmente correlati (Applegate *et al.,* 1998; King *et al.,* 1990; Sticher *et al.,* 1997). I biosensori costituiscono un metodo molto agevole di rilevazione in quanto consentono l'analisi in campo o il monitoraggio *in situ*. Ad esempio, i campioni di acqua di scarico provenienti da stabilimenti chimici possono essere analizzati senza alcun trattamento ulteriore, poiché i microrganismi possono essere coltivati direttamente nell'acqua e nel suolo contaminati.

I biosensori batterici (o *bioreporter* viventi costituiti da cellule intere, come sono spesso chiamati) (Burlage, 1997), sono generalmente costruiti tramite tecniche di ingegneria genetica grazie alle quali il gene reporter che codifica per una proteina facilmente rilevabile, come la luciferasi, privo del suo promotore, viene fuso al promotore di un circuito regolatore. Inoltre, la cellula sensore deve contenere anche il gene che codifica per la proteina di regolazione capace di attivare la trascrizione dal promotore che è stato fuso con il gene reporter. In questo modo, la proteina di regolazione innescherà o aumenterà la trascrizione del gene reporter ogni volta che la molecola effettrice specifica è presente all'interno della cellula (Werlen *et al.,* 2004) (fig. 33).

Il livello di espressione del gene reporter è riflesso nell'attività della proteina reporter, che può essere misurata di continuo o dopo un periodo determinato di calibrazione. Il risultato finale è che si stabilisce una correlazione diretta tra la presenza della specifica sostanza inquinante nel campione e l'attività dell'enzima reporter: in corrispondenza di concentrazioni crescenti dell'inquinante si registrerà un aumento dell'attività della proteina reporter, ad esempio nel caso della luciferasi si osserverà un aumento della bioluminescenza. Le concentrazioni del composto in esame nei campioni sconosciuti possono essere così determinate dall'attività della proteina reporter e interpolate su una curva di calibrazione (Sticher *et al.,* 1997). Poiché altre sostanze chimiche presenti nel campione possono inibire la risposta fisiologica dell'organismo bioreporter (Heitzer et al., 1998), è spesso utile valutare che non ci sia alcuna inibizione nei campioni sconosciuti munendoli con concentrazioni note di certe sostanze chimiche (Sticher *et al.,* 1997) o usando una seconda proteina reporter espressa costitutivamente (Wood and Gruber, 1996).

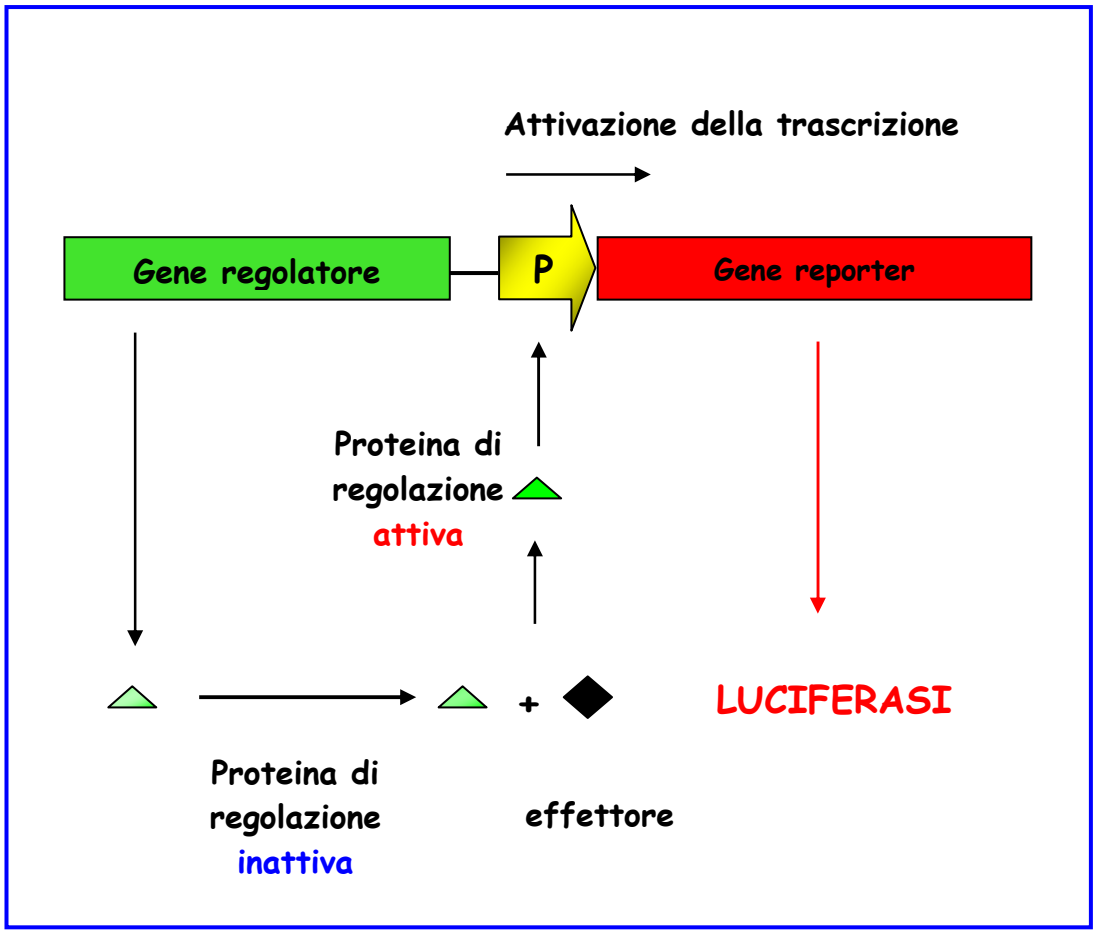


Figura 33. *La costruzione di un biosensore consiste nella fusione di un gene reporter promotore-meno, come il gene per la luciferasi, con il promotore di un circuito di regolazione in presenza del gene che codifica per la specifica proteina di regolazione.*

I geni reporter utilizzati per la costruzione del biosensore possono essere di diverso tipo e comprendono: gene che codifica per la β-galattosidasi (*lac*Z), fosfatasi alcalina (AP, *pho*A), luciferasi batterica o di lucciola (*lux* o *luc*) o la proteina fluorescente verde (GFP). Il gene reporter *lac*Z, che produce un prodotto colorato quando reagisce con appropriati substrati (ad esempio X-Gal), è usato per la costruzione di diversi sensori per metalli pesanti e composti organici (Köhler *et al.*, 2000; Klein *et al.*, 1997; Scott *et al.*, 1997).

Anche se l'utilizzazione dei GEMs e quindi dei biosensori in campo è stata limitata a causa dei possibili rischi connessi al trasferimento orizzontale di materiale genetico, i risultati che sono stati ottenuti nell'ambito della ricerca sono tuttavia molto importanti.

Pseudomonas fluorescens HK44, che è capace di degradare PAHs, è il primo batterio geneticamente modificato che è stato approvato dall'Environmental Protection Agency degli U.S.A. per l'uso nel biorisanamento di suoli in campo (Ripp *et al.*, 2000). Questo ceppo HK44 porta il plasmide per il naftalene (pUTK21) che contiene il gene *lux*, in un costrutto in cui *lux* è attivato in risposta all'esposizione a PAH. La formazione conseguente della proteina luciferasi, che produce bioluminescenza, permette un rilevamento real-time dei livelli di PAH nello stesso suolo. In pratica un biosensore può svolgere una duplice funzione, può sia degradare l'agente inquinante, se dotato dei pathways catabolici necessari, che rilevare la presenza della sostanza inquinante, consentendo anche un monitoraggio del processo di biorisanamento. *P. fluorescens* HK44 si presta molto bene al processo di *bioremediation*, in quanto riesce a sopravvivere in campo per un periodo di circa due anni durante il quale è capace di degradare PAH (Urgun-Demirtas *et al.*, 2006).

1.10 Scopo della tesi

L'obiettivo del presente progetto di tesi di dottorato è la comprensione delle proprietà cataboliche di alcuni enzimi del *meta cleavage pathway*, responsabili delle peculiari capacità degradative del batterio *Pseudomonas* sp. OX1; inoltre sarà effettuata un'analisi strutturale e funzionale del promotore dell'operone *phe* per arrivare alla comprensione dei meccanismi coinvolti nella regolazione dell'espressione di questo *pathway*.

Tale progetto è articolato in diversi punti.

In primo luogo il lavoro di ricerca sarà concentrato sulla caratterizzazione biochimica degli enzimi Phe ADA e HOA del *lower-meta pathway* di *P.* sp. OX1. L'operone *phe* di *Pseudomonas* sp. OX1 presenta la stessa organizzazione genica dell'operone *dmp* per il catabolismo dei dimetilfenoli di *Pseudomonas* sp. CF600. Le proteine ADA e HOA, codificate dai geni *pheF* e *pheG*, rispettivamente, si associano in un complesso enzimatico bifunzionale grazie al quale il prodotto dell'aldolasi HOA, l'acetaldeide, è incanalata direttamente verso il sito attivo di ADA, proteggendo la cellula dalla sua tossicità. La deidrogenasi ADA trasforma l'acetaldeide in acetil-CoA. Quest'ultimo e il piruvato, prodotto da HOA insieme all'acetaldeide, sono i prodotti finali del *pathway* che verranno incanalati nel ciclo degli acidi tricarbossilici. Questo studio inizierà con il clonaggio dei geni, l'espressione e la purificazione delle proteine ricombinanti. Successivamente sarà condotta una caratterizzazione cinetica dei due enzimi impiegando estratti cellulari da *E. coli* esprimenti le due proteine.

La seconda parte del progetto ha come obiettivo lo studio del complesso enzimatico Xyl-like ADA-HOA. *Pseudomonas* sp. OX1 è capace di utilizzare *o*-xilene, il più recalcitrante alla degradazione tra gli isomeri dello xilene, come substrato di crescita, ma non può utilizzare *m*- e *p*-xilene come fonte di carbonio ed energia. È stato dimostrato che i due isomeri dello xilene sono parzialmente degradati in composti estremamente tossici, che risultano essere letali per le cellule. Ciò è dovuto non alla mancanza di informazione genetica ma piuttosto al fatto che in questo ceppo *m*- e *p*-xilene sono metabolizzati attraverso il *pathway* degradativo specifico per l'*o*-xilene con la produzione degli intermedi tossici. L'isolamento di rari mutanti in grado di degradare *m*- e *p*-xilene e non più capaci di crescere in presenza di *o*-xilene ha suggerito che in *P.* sp. OX1 gli enzimi coinvolti nel catabolismo dei composti aromatici fossero codificati da geni cromosomici. Successivamente è stato dimostrato che *P.* sp. OX1 conserva nel proprio genoma un *pathway* catabolico omologo al TOL *pathway* di *Pseudomonas putida* mt-2, un ceppo che naturalmente degrada *m*- e *p*-xilene.

Eventi di riarrangiamento genetico sono alla base della comparsa di questi mutanti: *P.* sp. OX1 è potenzialmente capace di metabolizzare i tre isomeri dello xilene ma questa capacità metabolica non è espressa simultaneamente. La caratterizzazione degli enzimi Xyl-like ADA e HOA permetterà la comparazione con le attività enzimatiche Phe omologhe. Tale paragone sarà esteso anche alle proteine DmpF e DmpG di *Pseudomonas* sp. CF600.

I geni *xyl-likeQK*, codificanti le proteine ADA e HOA, saranno isolati dal DNA genomico di *P.* sp. OX1 quindi saranno realizzati sistemi per la loro espressione in *E. coli*. Estratti cellulari contenenti gli enzimi ricombinanti verranno utilizzati per realizzare una loro parziale caratterizzazione cinetica. Successivamente, utilizzando le coordinate spaziali di DmpF e DmpG depositate nella banca dati PDB, verrà realizzato uno studio di *homolgy modeling* per costruire i modelli 3D delle proteine ricombinanti.

La terza parte della ricerca riguarda l'isolamento del promotore dell'operone *phe*. La putativa regione promotrice verrà isolata mediante la produzione di frammenti di restrizione del cosmide pFB3411 che comprendono l'intera regione, tuttora sconosciuta, che separa il *cluster phe* da quello *tou*. L'analisi di sequenza nucleotidica verrà iniziata a partire dalla sequenza nota della prima subunità del complesso PH e proseguirà fino a coprire l'intera regione promotrice dell'operone *phe*. Tale regione sarà quindi caratterizzata mediante analisi *in silico*. Inoltre, utilizzando estratti proteici di *P.* sp. OX1 cresciuto in presenza di fenolo, verranno identificati nuovi fattori di regolazione della trascrizione dei geni *phe*.

La scoperta di nuovi regolatori trascrizionali e dei relativi promotori renderà possibile lo sviluppo di biosensori batterici in grado di rilevare inquinanti organici.

CAPITOLO 2

Materiali e metodi

2.1 Materiali

Le estrazioni di DNA plasmidico, le purificazioni delle bande di DNA da gel di agarosio e dei prodotti di PCR sono state eseguite con il kit PROMEGA Wizard Plus® SV Minipreps DNA Purification System e con il kit PROMEGA Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System.

Le estrazioni di DNA cosmidico sono state eseguite con il QIAGEN® Plasmid Midi Kit (25) della QIAGEN (Hilden, Germania).

I λDNA markers sono stati acquistati alla Promega (Madison, WI, USA).

I markers GENE RULER 1 Kb e 100 bp DNA Ladder ed i markers PageRuler Prestained Protein Ladder sono della Fermentas Life Sciences.

I primers utilizzati per il sequenziamento del DNA plasmidico e nelle reazioni di PCR sono stati sintetizzati nei laboratori della MWG Biotech (Francia).

Le endonucleasi di restrizione ed i primers universali T7 e SP6 sono della Invitrogen Life Technologies (Carlsbad, CA, USA).

Gli enzimi RNase A e DNase I, il tris(idrossimetil)-amminometano (Tris), l'ossido di magnesio (MgO), il carbonato di calcio ($CaCO_3$), il solfato ferroso ($FeSO_4$), il solfato di zinco ($ZnSO_4$), il solfato di manganese ($MnSO_4$), il solfato rameoso ($CuSO_4$), il solfato di cobalto ($CoSO_4$), l'acido borico (H_3BO_3), il cloruro di sodio (NaCl), il solfato di magnesio ($MgSO_4$), il potassio-diidrogeno fosfato (KH_2PO_4), il cloruro di ammonio (NH_4Cl), il sodio dodecil solfato (SDS), il sodio citrato, il glicerolo, il blu di bromofenolo, l'agarosio, il bromuro d'etidio, il 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galattoside (X-Gal), l'isopropil-β-tiogalattoside (IPTG), il malato, l'ampicillina, la tetraciclina, DTT, inibitori di proteasi, Lisozima, Urea, CoA e βNAD sono stati acquistati alla Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA).

L'acido acetico glaciale è della BDH ANALAR.

Il sodio diidrogeno fosfato ($NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$) e il disodio idrogeno fosfato ($Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$), l'etilendiammino tetraacetato disodico (EDTA), il cloruro di magnesio ($MgCl_2$), il cloruro di calcio ($CaCl_2$), l'acido 3-morfolinopropansulfonico (MOPS), il perossido di idrogeno (H_2O_2) e l'idrossido di sodio (NaOH) sono stati acquistati alla Fluka BioChemica (Buchs, Svizzera).

Il triptone, l'agar e l'estratto di lievito sono della Difco (Detroit, MI, USA).

L'etanolo e l'acido cloridrico sono della Carlo Erba (Milano, Italia).

L'isopropanolo, l'acetato di sodio (NaAc), l'acetato di potassio (KAc), il fenolo e il cloroformio sono dell'Amresco (Solon, Ohio, USA).

Tutti i reagenti utilizzati hanno un grado di purezza adatto per esperimenti di biologia molecolare.

2.2 Strumentazione

Gli apparati per l'elettroforesi su gel di agarosio (mod. Mini-Sub Cell GT e Sub Cell GT) e per l'elettroforesi su gel di poliacrilammide (mod. Mini protean II) sono stati acquistati alla BIO-RAD (Hercules, CA, USA).

La centrifuga Sorvall®RC-5B è della Du Pont Instruments (Newtown, CT, USA).

Il termociclatore utilizzato per le reazioni di PCR (mod. Progene) è stato acquistato alla Techne (Princeton, NJ, USA).

L'UV crosslinker SpectrolinkerTM XL-1000 è della Spectronics Corporation (Westbury, NY, USA).

I campioni vengono concentrati nello SpeedVac Concentrator (Savant instruments Inc., Holbrook, NY, USA).

Il sequenziamento nucleotidico è stato effettuato con ABI PRISMA™ 310 *Genetic Analyzer*.

Lo spettrofotometro utilizzato è il modello UV/VIS Spectrometer Lambda 20 della Perkin Helmer.

Il sonicatore è un apparato 20 KHz/400 W della Sonics and Materials, mod. Vibra Cell VCX 400 (Connecticut, USA).

Per l'analisi di spettrometria di massa è stato utilizzato il sistema cromatografico nano HPLC Ultimate (LC-Packing, Dionex, Italia) interfacciato ad uno spettrometro di massa dotato di una sorgente nano-ESI e di un analizzatore a trappola ionica (HTC Plus, Bruker-Daltonik, Germany).

2.3 Costrutti plasmidici e ceppi batterici

Cellule e plasmidi	***Proprietà / Geni***
E. coli DH5α	F^-, φ80d/lacZ, ΔMIS, ΔU169, deoR, recA1, endA1, hsdR17, phoA, supE44, λ^-, thi-1, gyrA96, relA1 (Takara Bio Inc.). Il ceppo è usato per la replicazione e la stabilizzazione di plasmidi.
E. coli JM109	endA1, recA1, gyrA96, thi, hsdR17(r_k^-, m_k^+), relA1, supE44, Δ(lac-proAB), [F' traD36, proAB, $laqI^qZ\Delta M15$] (Promega). Il ceppo è usato per la replicazione e la stabilizzazione di plasmidi.
E. coli BL21(DE3)	F^-, ompT, $hsdS_b$ (r_{b-}, m_{b-}), dcm, gal, λ(DE3) (Novagen). Il ceppo è usato nelle operazioni di espressione genica.
P. putida PaW340	Tol^-, *o*-Xyl^-, Dmp^-, Cre^- , Trp^-, Sm^r
pGEM-T Easy	3000 bp; Amp^r; vettore di clonazione (Promega)
pGEM-7Zf(+)	2997 bp; Amp^r; vettore di clonazione (Promega)
pET 22b(+)	5493 bp; Amp^r; vettore di espressione (Novagen)
pACYC184	4245 bp; Tc^r/Cm^r; vettore di clonazione (New England Biolabs)
pFB3411	Tcr; frammento EcoRI-EcoRI di 22,4 Kb dal DNA genomico di P. sp. OX1

Il ceppo batterico di *Pseudomonas* sp. OX1 è stato fornito dalla Dr.ssa Paola Barbieri, Dipartimento di Biologia Strutturale e Funzionale, Università dell'Insubria, Varese.

Il ceppo batterico *Pseudomonas putida* PaW340 è stato fornito dal prof. Di Donato, Dipartimento di Chimica Biologica, Università degli Studi di Napoli Federico II.

2.4 Terreni e condizioni di coltura

2.4.1 Terreno e condizioni di coltura per la crescita delle cellule batteriche di *Escherichia coli*

Le cellule di *E. coli* appartenenti al ceppo DH5α e al ceppo BL21(DE3), crescono su terreno di coltura Luria-Bertani (LB) costituito, come indicato da Sambrook *et al*., 1989, da triptone 1% (w/v), estratto di lievito 0,5% (w/v), NaCl 1% (w/v), pH 7,2 e Agar 1,5% qualora si voglia preparare il terreno in forma solida.

Le cellule di *E. coli* trasformate con i vettori pGEM-T Easy e pET-22b(+) crescono su terreno LB a cui è stato aggiunto, dopo la sterilizzazione, l'antibiotico ampicillina in concentrazione 100 μg/ml.

Le cellule di *E. coli* trasformate con il vettore pACYC184 crescono su terreno LB contenente tetraciclina (10 μg/ml).

Le colture liquide sono fatte crescere a 37°C in agitazione a 250 rpm; la stessa temperatura viene mantenuta nel caso delle colture realizzate in piastre Petri in LB-agar.

2.4.2 Terreno e condizioni di coltura per la crescita delle cellule batteriche di *Pseudomonas putida* PaW340

Le cellule di *Pseudomonas putida* PaW340 sono trasformate con il vettore cosmidico pFB3411 in cui è stato clonato un frammento di 22,4 kb ottenuto da una digestione parziale del genoma di *P*. sp. OX1 con l'endonucleasi di restrizione *Eco*RI (Bertoni *et al.*, 1996). Tale frammento comprende l'operone *phe* codificante gli enzimi del *lower (meta) pathway*. Queste cellule crescono nel brodo di coltura LB, o nel corrispondente terreno solido, a 30°C in presenza dell'antibiotico tetraciclina, aggiunto al terreno dopo sterilizzazione, in concentrazione pari a 25 μg/ml.

2.4.3 Terreno e condizioni di coltura per la crescita delle cellule batteriche di *Pseudomonas* sp. OX1

Pseudomonas sp. OX1 cresce in un brodo di coltura costituito da terreno minerale M9 *salts* o nel corrispondente terreno solido a 30°C.

Tale terreno è stato preparato secondo la procedura descritta da Sambrook *et al*., 1989, apportando delle modifiche al protocollo. E' costituito da una soluzione M9 *salts* 5X preparata sciogliendo in acqua deionizzata i seguenti sali: $Na_2HPO_4 \cdot 7\ H_2O$ (64 g/L), KH_2PO_4 (15 g/L), NaCl (2,5 g/L) e NH_4Cl (5,0 g/L); la soluzione deve essere poi sterilizzata in autoclave a 121°C per 20 minuti.

La soluzione M9 *salts* descritta si diluisce in H_2O deionizzata sterile alla concentrazione finale 1X, quindi si aggiungono ad essa 2,5 μl/ml di "*Goodies"* e malato, in concentrazione 20 mM finale, come unica fonte di carbonio.

La miscela definita "*Goodies*" è costituita da una soluzione salina stock a cui si aggiungono $MgSO_4$ 1 M e $FeSO_4$ 36 mM; la miscela viene sterilizzata per filtrazione attraverso una membrana con pori di diametro pari a 0.22 μm e conservata a 4°C.

La soluzione salina stock è costituita da: MgO (10,75 g/L), $CaCO_3$ (2 g/L), $FeSO_4 \cdot 7\ H_2O$ (4,5 g/L), $ZnSO_4 \cdot 7\ H_2O$ (1,44 g/L), $MnSO_4 \cdot H_2O$ (1,12 g/L), $CuSO_4 \cdot 5\ H_2O$ (0,25 g/L), $CoSO_4 \cdot 7\ H_2O$ (0,28 g/L), H_3BO_3 (0,06 g/L), HCl (51,3 ml).

Il malato, usato come fonte di carbonio nel terreno di coltura, si prepara sciogliendo il corrispondente acido malico in H_2O deionizzata sterile quindi la soluzione viene filtrosterilizzata attraverso una membrana con pori di diametro pari a 0.22 μm e si conserva a 4°C.

2.5 Preparazione di cellule competenti

2.5.1 Preparazione delle cellule competenti di *Escherichia coli* DH5α

Per la preparazione delle cellule competenti di *E. coli* appartenenti al ceppo DH5**α** è stato seguito un protocollo basato sul metodo PEG (Chung and Miller, 1988) a cui sono state apportate alcune modifiche.

Una colonia batterica è stata prelevata da una piastra di nuova preparazione ed inoculata in 10 o 20 ml di brodo di coltura LB, in beuta da 150 ml con tappo di garza e senza

antibiotici. Le cellule sono state cresciute a 37°C, sotto agitazione (200 rpm) per tutta la notte. Si realizza poi una diluizione 1 : 100 dell'inoculo in 100 o 200 ml di LB, in beuta sterile preriscaldata a 37°C: la coltura così diluita viene poi fatta crescere a 37°C, a 200 rpm, fino al raggiungimento di un valore di assorbanza a 600 nm (OD600) compreso tra 0,5–0,6.

Le cellule sono state quindi lasciate in una miscela di acqua/ghiaccio per 10-15 minuti e successivamente raccolte per centrifugazione a 1500 rpm, 4°C per 10 minuti. Il pellet cellulare è stato risospeso in un volume di TSB (***T****ransformation and* ***S****torange* ***B****uffer*) freddo, composto da: LB pH 6.1, PEG 4000 9%, $MgCl_2$ 11 mM, $MgSO_4$ 11 mM e DMSO 1M, in quantità pari a 1/10 del volume di coltura ed incubate in acqua/ghiaccio per 10 minuti.

Dopo essere state divise in aliquote di 200 µl, le cellule sono state congelate in azoto liquido e conservate a -80°C.

2.5.2 Preparazione delle cellule competenti di *Escherichia* coli BL21(DE3)

Per la preparazione delle cellule competenti di *E. coli* appartenenti al ceppo BL21(DE3) è stato seguito un protocollo che utilizza sali di magnesio e di calcio per permeabilizzare le membrane cellulari (Sambrook *et al.*, 1989).

Una colonia batterica è stata prelevata da una piastra di nuova preparazione ed inoculata in 100 ml di brodo di coltura LB. Le cellule sono state cresciute a 37°C per 16 ore, sotto agitazione (250 rpm). Due ml di tale coltura sono stati inoculati in 100 ml di brodo LB e le cellule sono state cresciute a 37°C, sotto agitazione (250 rpm) fino al raggiungimento di un valore di assorbanza a 600 nm (OD_{600}) compreso fra 0,5-0,6. Le cellule sono state quindi lasciate in ghiaccio per 10 minuti e successivamente raccolte per centrifugazione a 4000 rpm, 4°C per 10 minuti. Il pellet cellulare è stato risospeso in 25 ml di $MgCl_2$ 0,1 M preraffreddato e poi incubato per 10 minuti in ghiaccio. Le cellule sono state nuovamente raccolte per centrifugazione e risospese in 25 ml di $CaCl_2$ 0,1 M preraffreddato e lasciate in ghiaccio per 10 minuti. Dopo essere state ancora raccolte per centrifugazione, le cellule sono state definitivamente risospese in una soluzione sterile composta da 4,5 ml di $CaCl_2$ 100 mM ed 1 ml di glicerolo puro sterile.

Le cellule sono state quindi aliquotate, congelate in azoto liquido e conservate a – 80°C.

2.6 Trasformazione batterica

2.6.1 Trasformazione delle cellule competenti di *E. coli* DH5α con DNA plasmidico

Per la trasformazione batterica con DNA plasmidico è stato seguito un protocollo correlato al metodo PEG (Chung and Miller, 1988) usato per rendere competente il ceppo batterico.

Le cellule competenti vengono fatte scongelare lentamente in ghiaccio quindi aliquote da 100 µl ciascuna si trasferiscono in tubi Falcon in polipropilene da 15 ml.

Le cellule competenti sono incubate in ghiaccio per 20 minuti dopo aver aggiunto ad esse:

- 10 ng o 0,1 ng di plasmide, rispettivamente se proveniente da *ligation* o se plasmide intero;
- 20 µl di un *buffer* KCM 5X composto da KCl 0,5 M, $CaCl_2$ 0,15 M e $MgCl_2$ 0,25 M;
- 5 µl di $MnCl_2$ 0,45 M;
- H_2O mQ sterile fino ad un volume di 100 µl.

Dopo il raffreddamento in ghiaccio le cellule sono state incubate a temperatura ambiente per 10 minuti; ad esse è stato poi aggiunto 1 ml di LB senza antibiotici preriscaldato a 37°C e sono state fatte crescere a 37°C, sotto agitazione (200 rpm), per 50 minuti. Le cellule infine sono state piastrate su terreno selettivo LB contenete antibiotico e quindi incubate a 37°C per una notte.

Il terreno selettivo su cui sono state piastrate le cellule batteriche trasformate con il plasmide pGEM-T Easy contiene, oltre all'ampicillina, 100 µl di IPTG 100 mM (induttore del gene *lacZ*) e 20 µl di X-Gal 5% (w/v) (substrato dell'enzima codificato dal gene *lacZ*); questo ha consentito di distinguere le colonie che avevano incorporato il plasmide con l'inserto da quelle che avevano incorporato solo il plasmide in base al loro differente colore: bianco per le prime e blu per le seconde (*screening* blu/bianco).

In questo vettore plasmidico, infatti, la ligazione dell'inserto determina l'interruzione del gene *lacZ* che codifica per la β-galattosidasi, un enzima che degrada il substrato incolore X-Gal trasformandolo in un prodotto dalla colorazione blu. Di conseguenza le cellule che contengono i plasmidi senza inserto formano colonie di colore blu avendo il gene *lacZ* integro, mentre le cellule che contengono i plasmidi con l'inserto formano colonie bianche non potendo sintetizzare la β-galattosidasi.

2.6.2 Trasformazione delle cellule competenti di *E. coli* BL21(DE3) con DNA plasmidico

Per la trasformazione delle cellule competenti di *E. coli* BL21(DE3) è stato seguito un metodo descritto da Sambrook *et al*., 1989. Il protocollo prevede che un'aliquota di 50 µl di cellule competenti sia incubata in ghiaccio per 20 minuti con 10 ng di DNA plasmidico. Le cellule sono state sottoposte a shock termico a 42°C per 50 minuti ed immediatamente raffreddate in ghiaccio per 2 minuti; ad esse è stato poi aggiunto LB fino ad 1 ml totale di coltura ed lasciate crescere a 37°C per 30 minuti, sotto agitazione (250 rpm). Le cellule sono state allora piastrate su terreno selettivo, contenete ampicillina, ed incubate a 37 °C per una notte.

Essendo le cellule di *E. coli* BL21(DE3) trasformate con il plasmide pET 22b(+), che non porta il gene *lacZ*, lo *screening* blu/bianco per la selezione dei trasformanti non può essere utilizzato: si procederà all'analisi delle colonie positive alla trasformazione mediante Colony PCR.

2.7. Tecniche di purificazione degli acidi nucleici

2.7.1 Estrazione di DNA genomico da *Pseudomonas* sp. OX1

Il DNA genomico è stato estratto e purificato secondo la procedura descritta da Polaina ed Adam nel 1991. Il protocollo usato per la purificazione del DNA è il seguente. Una colonia batterica di *Pseudomonas* sp. OX1 è stata prelevata da una piastra di nuova preparazione ed inoculata in 10 ml del brodo di coltura LB lasciando in incubazione per 16 ore a 30°C sotto vigorosa agitazione a 250 rpm. Le cellule sono state raccolte per centrifugazione a 9000 rpm per 5 minuti a 4°C, quindi il pellet cellulare è stato risospeso in 1 ml di buffer TE (10 mM TRIS, 1mM EDTA, pH 7,6) aggiungendo poi SDS 3% per avviare la lisi. Alla sospensione sono stati aggiunti 20 µl di RNasi A (10 mg/ml) ed è stata lasciata a temperatura ambiente per 15 minuti agitando delicatamente ad intervalli. Le cellule lisate sono state quindi diluite aggiungendo 5 ml di buffer TE: il buffer permette la separazione della fase organica dalla fase acquosa contenente gli acidi nucleici dopo il trattamento con fenolo-cloroformio. Questo trattamento si realizza successivamente all'aggiunta di TE: alla soluzione si aggiunge un uguale volume di fenolo-cloroformio (pH 8,0) per permettere la deproteinizzazione. In seguito

a centrifugazione a 9000 rpm per 5 minuti a 4°C si ottengono due fasi distinte in cui il campione risulta suddiviso: la fase inferiore corrisponde ad una fase organica contenente materiale cellulare e l'RNA degradato precedentemente per azione della RNasi A, mentre la fase acquosa superiore contiene il DNA e deve perciò essere recuperata. Le due fasi sono separate da un'interfaccia costituita da proteine non precipitate: il trattamento con fenolo-cloroformio deve essere ripetuto sulla fase acquosa recuperata per allontanare ulteriormente proteine, RNA e materiale cellulare contaminante, fin quando l'interfaccia non risulta completamente pulita.

Il campione è stato poi trattato con uguale volume di cloroformio per allontanare il fenolo, quindi sono stati aggiunti 0,7 volumi di isopropanolo conservato a temperatura ambiente per indurre la precipitazione del DNA. Il pellet è stato raccolto mediante centrifugazione in un rotore Sorvall a 11000 rpm per 30 minuti a 4°C. Il supernatante recuperato è stato anch'esso sottoposto a trattamento con 2,5 volumi di etanolo freddo per indurre l'ulteriore precipitazione del DNA. La precipitazione è stata condotta per tutta la notte lasciando il campione a –20°C, quindi il DNA è stato raccolto mediante centrifugazione a 9000 rpm per 30 minuti a 4°C. Il pellet contenente il DNA è stato lavato con 5 ml di etanolo 70% e centrifugato a 9000 rpm per 10 minuti a 4°C. Il supernatante è stato eliminato senza disturbare il pellet, che è stato lasciato asciugare sotto il flusso d'aria di una cappa sterile a flusso verticale per favorire l'allontanamento dell'etanolo ed infine risospeso il 100 μl di acqua deionizzata sterile.

La concentrazione del DNA genomico purificato è stata determinata mediante analisi quantitativa su gel di agarosio allo 0,8%, confrontando l'intensità della banda relativa al campione con quella delle bande di una soluzione di λDNA a concentrazione nota. La corsa elettroforetica è stata condotta in TAE a 70 V costanti per 40 minuti.

Tutte le soluzioni ed i materiali utilizzati durante l'estrazione del DNA genomico sono stati sterilizzati mediante trattamento in autoclave per 20 minuti alla temperatura di 121 °C.

2.7.2 Estrazione di DNA cosmidico da *Pseudomonas putida* PaW340

Il DNA cosmidico è stato purificato utilizzando il QIAGEN® Plasmid Midi Kit (25), secondo il protocollo suggerito dal produttore.

La concentrazione del DNA cosmidico purificato è stata determinata mediante analisi quantitativa su gel di agarosio allo 0,8%, confrontando l'intensità delle bande relative al campione con quella delle bande di una soluzione di λDNA a concentrazione nota.

2.7.3 Estrazione di DNA plasmidico

Il DNA plasmidico è stato estratto da cellule di *E. coli* ricombinanti utilizzando il kit Wizard Plus® SV Minipreps DNA Purification System della Promega, seguendo il protocollo fornito dalla casa produttrice.

2.8 Analisi elettroforetiche

2.8.1 Gel di agarosio per DNA

Il gel d'agarosio per l'analisi del DNA è stato preparato secondo il seguente protocollo. L'agarosio, allo 0,8 % o allo 1,5 % (w/v), è stato sciolto in una soluzione tampone contenente Tris-acetato 40 mM ed EDTA 1 mM (TAE) a cui è stato aggiunto bromuro d'etidio in concentrazione finale pari a 0,5 μg/ml per rendere visibili le molecole di DNA mediante raggi UV. Ai campioni di DNA è stato aggiunto glicerolo sterile in quantità tale da averlo ad una concentrazione finale del 6%. La dimensione apparente dei campioni di DNA è stata stimata confrontando la loro mobilità elettroforetica con quella di markers di peso molecolare noto, mentre la quantità di DNA caricata su gel è stata stimata confrontando l'intensità delle bande dei campioni con quelle dei markers GENE RULER DNA Ladder. La corsa elettroforetica è stata condotta in TAE 1X a 70 V costanti per circa 50 minuti.

2.8.2 SDS-PAGE per analisi di proteine

L'elettroforesi su gel di poliacrilammide in presenza di SDS è stata eseguita secondo il sistema discontinuo descritto da Leammli su lastrine di 10.2 x 8.3 cm. Per la preparazione del gel è stata utilizzata una soluzione stock di acrilammide 30 % (w/v) e bis-acrilammide 0.8 % (w/v) che è stata opportunamente diluita in modo da ottenere una concentrazione acrilammidica finale pari al 15%, 12%, 8%. I campioni proteici sono stati risospesi in una soluzione tampone contenente SDS 2 % (w/v), glicerolo 10 % (v/v), DTT 50 mM e blu di bromofenolo 0.003 % (w/v) in Tris-HCl 50 mM, pH 6.8 e sono stati bolliti per 3 minuti. La corsa elettroforetica è stata effettuata a voltaggio costante (200 V) per circa 1 ora in un tampone contenente Tris 0.025 M, glicina 0.192 M ed SDS 0.1 % (w/v).

Le bande proteiche sono state evidenziate con Coomassie Brilliant Blue R-250 0.05 % (w/v) sciolto in acido tricloroacetico 12 % (v/v); la decolorazione è stata effettuata utilizzando una miscela acquosa di metanolo al 5 % (v/v) ed acido acetico al 7.5 % (v/v).

2.9 Reazione a catena della polimerasi (PCR)

Le reazioni di PCR e di Colony PCR, quest'ultima usata per lo *screening* delle colonie batteriche positive dopo trasformazione, sono state eseguite utilizzando 1.75U della BIOTAQ TM DNA Polimerasi, acquistata alla BIOLINE. Le condizioni di reazione prevedono che a 2,5 µl del tampone 10X si aggiungano: $MgCl_2$ in concentrazione 2,5 mM finale, i dNTPs, ciascuno in concentrazione 200 µM finale, i primers forward e reverse ad una concentrazione 0,5 µM finale ciascuno, l'enzima e lo stampo, in quantità opportuna a seconda del tipo di DNA da analizzare (5 ng di DNA plasmidico, 5 ng di DNA cosmidico o 2 µl della colonia batterica prelevata ed inoculata in 10 µl di H_2O mQ sterile per la Colony PCR), in un volume totale di 25 µl.

Le reazioni di amplificazione sono state condotte con il seguente programma:

- 1 ciclo: 2 minuti a 95°C (denaturazione iniziale)
- 25/30 cicli: -1 minuto a 95°C (denaturazione iniziale)
  -1 minuto alla temperatura prevista per l'*annealing* dei primers
  -15-30 secondi/Kb a 72°C (estensione)
- 1 ciclo: 5 minuti a 72°C (estensione finale)

2.10 Isolamento dei geni pheFG, subclonaggio nel vettore plasmidico pGEM-T Easy e sequenziamento

I geni *pheF* e *pheG* codificanti, rispettivamente, l'Aldeide Deidrogenasi (Acetilante) ADA e l'Aldolasi HOA, sono stati isolati dal cosmide pFB3411 mediante amplificazione per PCR. I prodotti di amplificazione sono stati successivamente subclonati nel vettore plasmidico pGEM-T Easy usando il pGEM-T Easy Vector System.

I primers utilizzati per l'amplificazione dei singoli geni sono stati progettati in base della sequenza nota dell'operone *phe* clonato nel cosmide pFB3411, ad eccezione del primer HOA1 progettato facendo riferimento all'omologia con le sequenze della regione corrispondente da specie diverse di *Pseudomonas:*

- OEH1 5'-CCG GTC AAG GCC GGT GAT TT-3'
- HOA1 5'-CCG TCG CGC AGG ($^{G}_{C}$)TC A($^{C}_{T}$)G TC-3'

per l'amplificazione del gene *pheF* codificante l'enzima ADA.

- HOA3 5'-GAG ATG TTG GCC GAG GAA AT-3'
- HOArev 5'-CAT CTC CGG ATA ATC ATT GG-3'

per l'amplificazione del gene *pheG* codificante l'enzima HOA.

La procedura di subclonaggio prevede che a 50 ng di vettore si aggiungano: il prodotto di PCR, secondo il rapporto molare Inserto:Vettore = 3:1**,** l'opportuno tampone (100 mM $MgCl_2$, 100 mM DTT, 10 mM ATP in Tris-HCl 300 mM, pH 7,8) e 3 unità dell'enzima T4 DNA ligasi, in un volume finale di 10 μl. La miscela è stata incubata a 4°C per 16 ore e 2 μl del prodotto di reazione sono stati utilizzati per trasformare 100 μl di cellule competenti *E. coli* DH5α secondo il protocollo descritto nel paragrafo 2.6.1.

Le cellule sono state piastrate su terreno selettivo e le colonie positive alla trasformazione sono state individuate mediante lo *screening* blu/bianco.

Le colonie positive, contenenti il plasmide ricombinante d'interesse, sono state inoculate in 5 ml di brodo LB contenente 100 μg/ml di ampicillina e cresciute a 37°C, sotto agitazione (250 rpm) per 16 ore. Queste colture cellulari sono state utilizzate per l'estrazione del DNA plasmidico con il kit PROMEGA Wizard Plus® SV Minipreps DNA Purification System. Il DNA estratto è stato, infine, caratterizzato e quantificato mediante elettroforesi su gel di agarosio allo 0,8%.

I plasmidi ricombinanti selezionati sono stati denominati pADA e pHOA e sottoposti ad analisi di sequenza.

Le sequenze dei geni *phe* subclonati sono state realizzate utilizzando i seguenti primers:

- T7 5'-TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG-3'
- SP6 5'-GCT AGT TAT TGC TCA GCG G-3'
- OEH1 5'-CCG GTC AAG GCC GGT GAT TT-3'
- HOA1 5'-CCG TCG CGC AGG ($^{G}_{C}$)TC A($^{C}_{T}$)G TC-3'

- HOAfor 5’-CTG CAC GAC ATG AGC CTG CGC GA-3’
- HOAfor2 5’-TGG CAT GTC GCG CAA GCT GG-3’

Tutte le analisi di sequenza sono state eseguite utilizzando un sequenziatore automatico di acidi nucleici che sfrutta il metodo di terminazione della catena per mezzo dei dideossinucleotidi (Sanger *et al.*, 1977).

2.11 Clonaggio nel vettore di espressione pET-22b(+) del gene pheG codificante l’aldolasi HOA

Il plasmide ricombinante pHOA è stato sottoposto a digestione con le endonucleasi di restrizione *Nde*I e *Nco*I al fine di escindere il gene *pheG* clonato nel plasmide. La reazione è stata realizzata utilizzando le seguenti condizioni: 1,5 μg di pHOA, 10U dell’enzima *Nco*I, 5 μl di tampone 10X (50 mM Tris-HCl pH 7.4, 6mM $MgCl_2$, 50 mM NaCl e 50 mM KCl), in un volume finale di 50 μl. Verificata la completa linearizzazione del plasmide, mediante analisi su gel d’agarosio di una piccola aliquota del campione, pari ad 1/20 della reazione totale, alla miscela di reazione è sono state aggiunte 10 U dell’enzima *Nde*I. La digestione è stata condotta a 37°C per altre 3 ore, sufficienti a consentire l’escissione del gene *pheG* dal plasmide. Il frammento ottenuto, pheGΔNde/Nco di circa 1,3 Kb, è stato purificato da gel di agarosio allo 0,8% mediante l’impiego del kit PROMEGA Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System.

Il vettore plasmidico d’espressione pET-22b(+) è stato digerito con gli stessi enzimi di restrizione e purificato da gel d’agarosio.

La reazione di ligazione tra il frammento pheGΔNde/Nco ed il vettore d’espressione linearizzato è stata condotta a 4°C per 16 ore utilizzando un rapporto inserto:vettore = 5:1**,** in presenza di 5 μl del buffer 2X (100 mM $MgCl_2$, 100 mM DTT, 10 mM ATP in Tris-HCl 300 mM, pH 7,8) e 3 U dell’enzima T4 DNA ligasi, in un volume finale di 10 μl.

La miscela di ligasi è stata utilizzata per trasformare cellule di *E. coli* DH5α competenti e le cellule trasformate sono state piastrate su LB/agar contenente ampicillina 100 μg/ml. I cloni positivi sono stati identificati tramite uno *screening* per Colony PCR utilizzando i primers universali:

- T7 promoter 5’- TAATACGACTCACTATAGCGG - 3’
- T7 terminator 5’- GCTAGTTATTGCTCAGCGG - 3’

La temperatura di *annealing* usata è pari a 62°C.

Le colonie positive allo *screening* sono state prelevate dalla piastra ed inoculate in 10 ml di terreno LB contenente ampicillina in concentrazione finale 100 µg/ml e fatte crescere a 37°C, sotto agitazione (250 rpm) per 16 ore. Le colture cellulari sono state utilizzate per l’estrazione del DNA plasmidico con il kit Promega. La bontà del processo di purificazione e la concentrazione del DNA plasmidico estratto sono state valutate mediante analisi quali/quantitativa su gel d’agarosio.

Il costrutto realizzato è stato denominato pET-HOA.

2.12 Ingegnerizzazione del vettore pACYC184 per l’espressione del gene pheF codificante l’aldeide deidrogenasi acetilante ADA

Al fine di eseguire una caratterizzazione biochimica degli enzimi ADA ed HOA di *P.* sp. OX1 è necessario che i geni che li codificano, *pheG* e *pheF*, siano espressi nella stessa cellula di *E. coli* BL21 (DE3) e che siano clonati in vettori di espressione appartenenti a gruppi di incompatibilità diversi. *PheG*, codificante l’Aldolasi HOA, come descritto precedentemente, è stato clonato nel vettore d’espressione pET-22b(+), che contiene l’origine di replicazione di pMB1 (un plasmide appartenente al gruppo di incompatibilità ColE1). Il vettore di clonaggio pACYC184, contenente l’origine di replicazione p15A, è stato selezionato tra i plasmidi commercialmente disponibili appartenenti ad un gruppo d’incompatibilità che permette la coesistenza in cellule trasformate con plasmidi del gruppo ColE1. Tale vettore, di 4.245 bp, è a basso numero di copie, circa 15 copie per cellula, ed è stato ingegnerizzato per trasformarlo in un vettore d’espressione in cui è stato poi clonato il gene *pheF*.

La strategia adottata per modificare il plasmide pACYC184 prevede che la regione promotrice del vettore d’espressione pET-22b(+) venga subclonata in corrispondenza dei siti di clonaggio *Nco*I e *Sac*II del vettore pACYC184.

Per realizzare il subclonaggio la sequenza del promotore del pET-22b(+) è stata modificata al fine di introdurre alle estremità 5' e 3' i siti di restrizione per *Nco*I (5'-CCATGG-3') e *Sac*II (5'-CCGCGG-3'), rispettivamente. L'inserimento dei siti di restrizione è stato realizzato mediante una reazione di PCR ed i primers utilizzati sono stati progettati in modo da ottenere un prodotto di amplificazione che comprendesse il *T7 promoter*, il *Lac operator*, la regione *RBS*, con l'esclusione della regione codificante il peptide segnale.

Come primer per l'estremità 5' è stato utilizzato l'oligonucleotide *Nco*I 5'-pET (5'-CATG**CCATGG**AGATCTCGATCCCGCGAAAT-3') che include il sito di restrizione per *Nco*I (in evidenza) e la regione a monte del T7 promoter.

Per l'estremità 3' è stato utilizzato l'oligonucleotide *Sac*II 3'-pET (5'-TCC**CCGCGG**ACCAGCAGCAGCGGTCGGCAG-3') che include il sito di restrizione per *Sac*II (in evidenza) e le prime basi della sequenza codificante il peptide segnale. Le basi presenti a monte dei siti di restrizione in entrambi i primers sono state introdotte per aumentare l'efficienza di digestione da parte delle endonucleasi di restrizione. La reazione di PCR è stata realizzata usando come stampo 5 ng del vettore pET-22b(+) e le condizioni indicate nel paragrafo 2.9: la temperatura di *annealing* usata per questa coppia di primers è di 68°C.

Il prodotto di amplificazione è stato analizzato su gel d'agarosio 1,5% e la banda corrispondente al frammento genico d'interesse di 160 bp è stata escissa e purificata dal gel utilizzando il kit della PROMEGA Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System ed è stata poi sottoposta ad analisi di sequenza per verificare che non siano state introdotte mutazioni durante la PCR.

Il frammento di 160 bp comprendente la regione promotrice del pET22b(+) è stato denominato pETΔN/S. Esso è stato digerito con gli enzimi di restrizione *Nco*I e *Sac*II, secondo le seguenti condizioni: 800 ng di frammento sono stati sottoposti ad una doppia digestione utilizzando 10 U dell'enzima *Nco*I e 10 U dell'enzima *Sac*II, 5 µl del tampone 10X (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 10 mM $MgCl_2$ e 50 mM NaCl), in un volume finale di 50 µl; la reazione di digestione è stata condotta a 37°C per 3 ore. Il frammento è stato purificato da gel di agarosio allo 1,5% mediante l'impiego del kit PROMEGA Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System.

Questo frammento pETΔN/S è stato subclonato nel vettore pACYC184 precedentemente digerito con le stesse endonucleasi di restrizione. La reazione di digestione è stata condotta utilizzando 1,5 µg di pACYC184, 10 U di *Nco*I, 10 U di *Sac*II, 6 µl del tampone 10X (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 10 mM $MgCl_2$ e 50 mM NaCl), in un volume finale di 60 µl; la reazione di digestione è stata condotta a 37°C per 3 ore. I prodotti di digestione

sono stati analizzati su gel d'agarosio allo 0,8%: come atteso sono stati ottenuti due frammenti rispettivamente del peso molecolare di 1,2 e 3 Kb. Il frammento di 3 Kb di nostro interesse, contenente l'origine di replicazione ed il gene che conferisce la resistenza alla tetraciclina, è stato escisso e purificato dal gel utilizzando il kit Promega. Esso è stato denominato pACΔN/S

La regione pACΔN/S di 3 Kb è stata ligata alla regione promotrice isolata dal pET ed indicata come pETΔN/S. La reazione di ligazione è stata realizzata aggiungendo 15 ng della regione promotrice a 100 ng di vettore (rapporto molare inserto:vettore = 3:1) in presenza di 3 U dell'enzima T4 DNA ligasi. La miscela è stata incubata a 4°C per 16 h e con 2 µl del prodotto di reazione sono state trasformate 100 µl di cellule competenti di *E. coli* DH5α, secondo il protocollo descritto nel paragrafo 2.6.1. Le cellule sono state piastrate su terreno LB contenente 10µg/ml di tetraciclina (Tc) e cresciute a 37°C per 16 ore. Alcune delle colonie sviluppatesi sono state prelevate dalla piastra di riferimento ed ognuna è stata in parte trasferita su una nuova piastra contenente terreno LB e Tc 10µg/ml ed in parte inoculata in 10 µl di H_2O sterile: 2 µl di tale sospensione sono stati utilizzati come stampo per realizzare la Colony PCR con i primers *Nco*I 5'-pET e *Sac*II 3'-pET secondo le condizioni già descritte. Le colonie positive a questo *screening* sono state prelevate dalla piastra ed inoculate in 10 ml di brodo LB contenente 10µg/ml di Tc e fatte crescere a 37°C, sotto agitazione (250 rpm), per 16 ore. Le colture cellulari sono state utilizzate per l'estrazione di questo nuovo vettore utilizzando il kit della Promega. Il costrutto così realizzato è stato denominato pACET.

2.13 Clonaggio nel pACET del gene pheF

Il plasmide ricombinante pADA è stato linearizzato mediante digestione con l'endonucleasi di restrizione *Nde*I: 3 µg di plasmide sono stati digeriti con 15 U dell'enzima *Nde*I, in presenza di 4 µl di tampone 10X (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 10 mM $MgCl_2$ e 50 mM NaCl), in un volume finale di 40 µl; la reazione di digestione è stata condotta a 37°C per 3 ore. Il plasmide linearizzato è stato purificato da gel di agarosio allo 0,8% usando il kit Promega quindi è stato sottoposto a digestione parziale con l'endonucleasi di restrizione *Sac*II: 1,5 µg di pADA linearizzato da *Nde*I sono stati digeriti con 1,5 U dell'enzima *Sac*II, in presenza di 2,5 µl di tampone 10X (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 10 mM $MgCl_2$ e 50 mM NaCl), in un volume finale di 25 µl; la reazione di digestione è stata condotta a 37°C per un'ora. E'

stato necessario condurre una digestione parziale del plasmide pADA linearizzato da *Nde*I poiché un sito di restrizione per *Sac*II è presente all'interno della sequenza del gene *phe*F, oltre che nel *polycloning site* del vettore pGEM-T. La digestione in condizioni parziali, oltre a lasciare il plasmide prevalentemente in forma non digerita, produce una banda di circa 600 bp, corrispondente al gene *pheF* parziale, ed una di circa 1100 bp, corrispondente al gene *pheF* completo. Questa banda più grande è stata purificata dal gel di agarosio utilizzando il kit Promega ed il gene *pheF* è stato clonato nel vettore pACET digerito con gli stessi enzimi di restrizione: 1,5 μg di pACET sono stati digeriti con 10 U di *Nde*I e 10 U di *Sac*II, aggiungendo 6 μl di tampone 10X (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 10 mM $MgCl_2$ e 50 mM NaCl), in un volume finale di 60 μl; la reazione di digestione è stata condotta a 37°C per 3 ore. Il frammento di interesse misura circa 3,3 kb: esso è stato purificato da gel di agarosio con il kit Promega.

La reazione di ligazione tra il gene *phe*F NdeI/SacII ed il vettore d'espressione pACET NdeI/SacII è stata condotta a 4°C per 16 ore: a 100 ng di plasmide sono stati aggiunti: l'inserto, secondo un rapporto molare inserto:vettore = 3:1, 5 μl del buffer 2X (100 mM $MgCl_2$, 100 mM DTT, 10 mM ATP in Tris-HCl 300 mM, pH 7,8) e 3 U dell'enzima T4 DNA ligasi, in un volume finale di 10 μl.

Con tale costrutto sono state trasformate cellule di *E. coli* appartenenti al ceppo DH5α ed i cloni positivi sono stati identificati tramite uno *screening* per Colony PCR. I primers utilizzati per questa reazione sono i seguenti:

- OEH1 5'- CCGGTCAAGGCCGGTGATTT- 3'
- HOA1 5'- CCGTCGCGCAGG(GC)TCA(CT)GTC- 3'

Il primer HOA1 è un primer degenerato progettato sulla base di sequenze omologhe. Le condizioni di PCR utilizzate sono quelle descritte nel paragrafo 2.9 e la temperatura di *annealing* usata è pari a 64°C.

Tutte le colonie selezionate risultano positive allo *screening*. Una delle colonie contenente il plasmide ricombinante è stata prelevata dalla piastra ed inoculata in 10 ml di terreno LB contenente Tc 10 μg/ml e fatta crescere a 37°C, sotto agitazione (250 rpm) per 16 ore. La coltura cellulare è stata utilizzata per l'estrazione del DNA plasmidico con il kit Promega. Il vettore è stato denominato pACET-ADA.

2.14 Realizzazione dei costrutti pET-FG-Nde e pET-FG-Nco per l'espressione delle proteine ADA ed HOA

Per l'espressione delle proteine ADA e HOA di *P*. sp. OX1 in *E. coli* sono stati realizzati due costrutti plasmidici, uno clonando la coppia genica *pheFG* in corrispondenza dei siti di restrizione *Nde-Bam* del vettore d'espressione pET-22b(+) ed uno clonando i geni in corrispondenza dei siti *Nco-Bam* dello stesso vettore. Questo secondo costrutto porta a monte dei geni clonati una sequenza codificante per un peptide segnale coinvolto nella traslocazione delle proteine nello spazio periplasmatico. La scelta di realizzare tale costrutto è nata dalla possibilità di aumentare la porzione solubile delle proteine espresse facilitando così la loro purificazione; la maggior parte di esse infatti tende a formare aggregati insolubili noti come corpi di inclusione.

L'intero operone *phe*, codificante gli enzimi del *lower (meta) pathway di P*. sp. OX1, è contenuto nel vettore cosmidico pFB3411 isolato da cellule di *P. putida* PaW340.

La regione del cosmide che comprende i geni *pheF* e *pheG* è stata modificata al fine di introdurre alle estremità 5' di *pheF* e 3' di *pheG* i siti di restrizione per le endonucleasi *Nde*I e *BamH*I, per la realizzazione del primo costrutto, e i siti per *Nco*I e *BamH*I per il secondo costrutto. L'inserimento dei siti di restrizione è stato realizzato mediante una reazione di PCR. Come primer per l'estremità 5' è stato utilizzato, nel primo caso, l'oligonucleotide NdeADAfor (5'-AATT**CCATATG**AACAAGAAACTGAAAGCG-3') che include il sito di restrizione per *Nde*I (in evidenza) e, nel secondo caso, l'oligonucleotide NcoADAfor (5'-AT**GCCATGG**GAAACAAGAAACTGAAAGCG-3') che include il sito di restrizione per *Nco*I (in evidenza) e la sequenza codificante il peptide segnale.

Per l'estremità 3' è stato utilizzato in entrambi i casi l'oligonucleotide BamHOArev (5'-CG**GGATCC**CGCGGCTGAGGGTACGGT-3') che include il sito di restrizione per la endonucleasi *BamH*I (in evidenza).

Le basi presenti nella sequenza dei primers, a monte dei siti di restrizione, sono state introdotte per aumentare l'efficienza di digestione da parte delle endonucleasi di restrizione.

Le due reazioni di PCR sono state realizzate usando come stampo 5 ng del cosmide pFB3411 ed utilizzando il programma indicato nel paragrafo 2.9.

La temperatura di *annealing* usata per la coppia di primers NdeADAfor/BamHOArev è di 65°C, mentre per la coppia NcoADAfor/BamHOArev e di 68°C.

I prodotti di amplificazione sono stati analizzati su gel di agarosio allo 0,8% e le bande corrispondenti ai frammenti genici di interesse (circa 2 Kb) sono state escisse e purificate dal gel utilizzando il kit della Promega, secondo le istruzioni della casa produttrice.

I frammenti pheFGΔNde/B e pheFGΔNco/B purificati sono stati subclonati nel vettore pGEM-T Easy. Le reazioni di ligazione sono state eseguite aggiungendo 100 ng di inserto, in entrambi i casi, e 50 ng di vettore pGEM-T (rapporto molare inserto:vettore = 3:1) in presenza di 3 U di T4 DNA Ligasi. Le due miscele di reazione sono state incubate a 4°C per 16 h e con 2 µl di ciascuna miscela sono state trasformate 100 µl di cellule *E. coli* DH5α, secondo il protocollo descritto nel paragrafo 2.6.1. Le cellule sono state piastrate su terreno LB contenente 100 µg/ml di ampicillina e cresciute per 16 ore a 37°C. Alcune delle colonie sviluppatesi sono state prelevate dalle rispettive piastre ed ognuna è stata in parte trasferita su terreno fresco LB-agar contenente 100 µg/ml di ampicillina per realizzare una replica, ed in parte inoculata in 10 µl di H_2O sterile: 2 µl di tale sospensione sono stati usati come stampo per la Colony PCR con i primers T7 ed SP6 secondo le condizioni descritte nel paragrafo 2.9. Le colonie positive a questo *screening*, contenenti i plasmidi d'interesse, sono state prelevate dalle rispettive piastre ed inoculate in 5 ml di terreno LB contenente 100 µg/ml di ampicillina e fatte crescere a 37°C, sotto agitazione (250 rpm) per 16 ore. Le colture cellulari sono state utilizzate per l'estrazione dei vettori pFG-Nde/B e pFG-Nco/B con il kit della Promega. I plasmidi ottenuti sono stati sottoposti ad analisi di sequenza per verificare i geni in essi clonati non contengano mutazioni introdotte durante la PCR.

I geni *pheFG* sono stati escissi dai plasmidi di clonaggio pGEM-T attraverso reazioni di digestione con gli enzimi di restrizione appropriati a 37°C per 3 ore. I prodotti di digestione sono stati controllati su gel di agarosio allo 0,8%. Successivamente i frammenti sono stati subclonati nel vettore d'espressione pET-22b(+), precedentemente digerito con gli stessi enzimi. Le razioni di ligazione per realizzare il subclonaggio sono state eseguite con 120 ng di inserto, in entrambi i casi, e 100 ng di vettore (rapporto molare inserto:vettore = 3:1) in presenza di 3 U di T4 DNA Ligasi. Le due miscele di reazione sono state incubate a 4°C per 16 h e con 2 µl di ciascuna sono state trasformate 100 µl di cellule *E. coli* DH5α, secondo il protocollo descritto nel paragrafo 2.6.1. Le cellule sono state piastrate su terreno LB contenente 100 µg/ml di ampicillina e la selezione delle colonie positive è stata realizzata mediante Colony PCR come indicato precedentemente ma usando i primers NdeADAfor/NcoADAfor e BamHOArev seguendo le condizioni descritte nel paragrafo 2.9. Le colonie positive a questo *screening* sono state prelevate dalle rispettive piastre ed inoculate in 10 ml di terreno LB contenente 100 µg/ml di ampicillina e fatte crescere a 37°C, sotto agitazione (250 rpm) per 16 ore. Le colture cellulari sono state utilizzate per l'estrazione dei vettori pET-FG-Nde/B e pET-FG-Nco/B con il kit della Promega. I costrutti così ottenuti sono stati usati per trasformare cellule di *E. coli* BL21(DE3), adatte per l'espressione delle proteine, secondo il protocollo descritto nel paragrafo 2.6.2.

2.15 Isolamento dei geni xyl-likeQK, subclonaggio nel vettore plasmidico pGEM-T Easy e sequenziamento

I geni *xyl-likeQK*, codificanti l'Aldeide Deidrogenasi (Acetilante) ADA e l'Aldolasi HOA omologhi ai geni *xyl* di *Pseudomonas putida* mt-2 per il catabolismo di *m*- e *p*-xilene, sono stati amplificati con primers specifici utilizzando come stampo il DNA genomico di *Pseudomonas* sp. OX1.

I primers utilizzati per l'amplificazione sono i seguenti:

- OEH1 5'-CCG GTC AAG GCC GGT GAT TT-3'
- g4ODrev 5'-GGA TGT CAT GGG CCT GCA G-3'

Il prodotto di amplificazione è stato subclonato nel vettore plasmidico pGEM-T Easy con le modalità già descritte nel paragrafo 2.10 per il clonaggio dei geni *pheFG*.

La bontà del processo di amplificazione è stata verificata sottoponendo il plasmide ricombinante, denominato pQK, ad analisi di sequenza utilizzando i seguenti primers:

- T7 5'-TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG-3'
- SP6 5'-GCT AGT TAT TGC TCA GCG G-3'
- ADA1 5'-CTG ATG GTC GAC CTG ACC CC-3'
- ADA2 5'-ATC CAC TGT CTG ACC GAA AC-3'
- HOAfor 5'-CTG CAC GAC ATG AGC CTG CGC GA-3'
- HOAfor2 5'-TGG CAT GTC GCG CAA GCT GG-3'

2.16 Realizzazione dei costrutti pET-QK-Nde e pET-QK-Nco per l'espressione delle proteine ADA ed HOA xyl-like

Per l'espressione delle proteine ADA e HOA xyl-like di *P*. sp. OX1 in *E. coli* sono stati realizzati due costrutti plasmidici, uno clonando la coppia genica *xyl-likeQK* in corrispondenza dei siti di restrizione *Nde-Bam* del vettore d'espressione pET-22b(+) ed uno clonando i geni in corrispondenza dei siti *Nco-Bam* dello stesso vettore. Le proteine espresse da questo secondo costrutto presentano a monte della loro sequenza un peptide segnale coinvolto nella traslocazione delle proteine stesse nello spazio periplasmatico.

Il protocollo seguito è analogo a quello descritto nel paragrafo 2.14.

La coppia genica *xyl-lkeQK* è stata isolata dal vettore pQK mediante PCR usando primers specifici modificati al fine di introdurre alle estremità 5' e 3' della sequenza i siti di restrizione per le endonucleasi *Nde*I e *BamH*I, per la realizzazione del primo costrutto, e *Nco*I e *BamH*I per il secondo.

Come primer per l'estremità 5' è stato utilizzato, nel primo caso, l'oligonucleotide NdeADA (5'- GGAATTC**CATATG**AGCAAGAAACTGAAA -3') che include il sito di restrizione per *Nde*I (in evidenza) e, nel secondo caso, l'oligonucleotide NcoADA (5'-CAT**GCCATGG**GTAGCAAGAAACTGAAA-3') che include il sito di restrizione per *Nco*I (in evidenza) e la sequenza codificante il peptide segnale.

Per l'estremità 3' è stato utilizzato in entrambi i casi l'oligonucleotide BamHOA (5'-CG**GGATCC**CGCGGCTGAGGGTACGGT-3') che include il sito di restrizione per la endonucleasi *BamH*I (in evidenza).

Le basi presenti nella sequenza dei primers, a monte dei siti di restrizione, sono state introdotte per aumentare l'efficienza di digestione da parte delle endonucleasi di restrizione.

Le due reazioni di PCR sono state realizzate usando come stampo 5 ng del plasmide p*QK*, secondo il protocollo descritto nel paragrafo 2.9.

La temperatura di *annealing* usata per entrambe le coppie di primers, NdeADA/BamHOA e NcoADA/BamHOA, è di 64°C.

I prodotti di amplificazione sono stati analizzati su gel di agarosio allo 0,8% e le bande corrispondenti ai frammenti genici di interesse (circa 2 Kb) sono state escisse e purificate dal gel utilizzando il kit della Promega, secondo le istruzioni della casa produttrice.

I frammenti xyl-likeQKΔNde/B e xyl-likeQKΔNco/B purificati sono stati subclonati nel vettore pGEM-T Easy.

I costrutti ottenuti sono stati denominati pQK-Nde/B e pQK-Nco/B, rispettivamente: essi sono stati sottoposti ad analisi di sequenza per verificare che la Taq utilizzata non avesse

introdotto mutazioni, quindi sono stati usati per trasformare cellule di *E. coli* DH5α competenti. Il vettore pQK-Nco/B presentava mutazioni nella sequenza dei geni clonati quindi si è proceduto utilizzando soltanto con il costrutto pQK-Nde/B.

Successivamente i geni *xyl-likeQK* sono stati escissi dal plasmide di clonaggio pGEM-T mediante digestione con gli enzimi di restrizione *Nde*I/*BamH*I a 37°C per 3 ore. Il frammento ottenuto è stato subclonato nel vettore d'espressione pET-22b(+), precedentemente digerito con gli stessi enzimi. La reazione di ligazione è stata eseguita come già descritto nel paragrafo 2.14.

Il nuovo costrutto così ottenuto, chiamato pET-QK-Nde/B, è stato usato per trasformare cellule di *E. coli* BL21(DE3), adatte per l'espressione delle proteine ricombinanti, secondo il protocollo descritto nel paragrafo 2.6.2.

2.17 Condizioni di coltura ed induzione dell'espressione delle proteine ADA e HOA Phe e Xyl-like

Una colonia relativa ai ceppi di E. *coli* BL21(DE3) trasformati con i vettori:

- pET-FG-Nde/B
- pET-FG-Nco/B
- pET-QK-Nde/B

è stata prelevata da una piastra di fresca preparazione ed inoculata in 10 ml di brodo di coltura LB contenete ampicillina 100 µg/ml e fatta crescere a 37°C, sotto agitazione (200 rpm), per 16-18 ore. Una colonia di E. *coli* BL21(DE3) cotrasformata con i plasmidi pET-pheG e pACET-pheF è stata prelevata da una piastra ed inoculata in 10 ml di brodo di coltura LB contenente 10 µg/ml di Tc e 100 µg/ml di Amp e fatta crescere a 37°C, in agitazione (200 rpm) per 16 ore.

Il mattino successivo è stata fatta una diluizione 1:100 dei preinoculi in 300 ml di brodo LB contenente l'antibiotico opportuno ed incubata a 37°C, 200 rpm fino al raggiungimento di un valore di OD600 compreso fra 0,6-0,7.

Allo scopo di indurre l'espressione delle proteine è stato aggiunto alle colture IPTG 0,5 mM e le cellule sono state fatte crescere a 37°C, 200 rpm per 3 ore. Al termine dell'incubazione le cellule sono state raccolte per centrifugazione a 8500 rpm, 4°C per 15 minuti e risospese in un appropriato tampone per il successivo frazionamento.

2.18 Frazionamento cellulare

Gli estratti proteici totali di *E. coli* BL21(DE3) trasformate con i plasmidi precedentemente indicati sono stati ottenuti attraverso sonicazione delle cellule.

Il pellet cellulare ottenuto dopo l'induzione con IPTG è stato risospeso in 5 ml di tampone di sonicazione composto da: 50 mM sodio fosfato a pH 7.5, 0.1 M NaCl, 1mM EDTA, 0.2 mg/ml Lisozima e 30 µl di un cocktail di inibitori di proteasi, ed incubato in ghiaccio per 30 minuti. Le cellule sono state sonicate in ghiaccio per evitare il surriscaldamento e la denaturazione delle proteine. È stato utilizzato un programma che prevede due cicli di sonicazione ognuno della durata di 100 secondi. Ogni ciclo è composto da 20 impulsi di 5 secondi ciascuno, alla potenza di 80 W, con un intervallo tra un impulso ed il successivo di 5 secondi. Tra il primo e il secondo ciclo di sonicazione è previsto un raffreddamento del campione in ghiaccio per 5 minuti.

Il campione è stato successivamente trattato con 100 µg DN*asi* I a 37°C per un'ora. Attraverso centrifugazione a 8500 rpm, 4°C per 30 minuti pellet e supernatante sono stati separati e sottoposti in seguito ad elettroforesi su gel di poliacrilammide.

2.19 Purificazione delle proteine dai corpi d'inclusione

Le proteine ADA ed HOA, a causa delle condizioni di espressione, si accumulano principalmente nei corpi d'inclusione. Al fine di rinaturare le proteine incluse nel pellet cellulare, i corpi d'inclusione sono stati prima purificati e poi solubilizzati in urea. Dopo il frazionamento cellulare ottenuto per sonicazione e dopo la separazione della frazione insolubile da quella solubile mediante centrifugazione, il pellet è stato risospeso in 5 ml di tampone composto da sodio fosfato 50 mM a pH 7.5, EDTA 1 mM, Lisozima 0,2 mg/ml e sodio deossicolato 1 mg/ml. Questa sospensione è stata incubata in ghiaccio per 20 minuti e poi centrifugata a 11400 g, 4°C per 15 minuti. Il supernatante è stato rimosso ed il pellet è stato risospeso in 5 ml H_2O fredda e successivamente centrifugato a 15300 g, 4°C per 30 minuti. Il pellet recuperato è stato solubilizzato in urea 8 M ed il campione è stato sottoposto ancora a centrifugazione a 15300 g, 4°C per 10 minuti per rimuovere il materiale insolubile rimanente ed il supernatante, contenente le proteine solubilizzate, è stato sottoposto a 3 passaggi di dialisi contro 500 ml di tampone di rinaturazione composto da MOPS 100 mM a pH 7,5, $MgCl_2$ 0,5 mM, $MnCl_2$ 0,5 mM, DTT 1 mM e glicerolo 10% (v/v) a 4°C sotto

agitazione. Al termine dei 3 passaggi di dialisi il campione è stato nuovamente dializzato per 3 volte contro 500 ml di sodio fosfato 50 mM a pH 7,5 e glicerolo 10% (v/v) a 4°C sotto agitazione.

Il campione dializzato è stato centrifugato a 8500 rpm, 4°C per 10 minuti in modo da rimuovere il precipitato formatosi durante i vari passaggi di dialisi, quindi ne è stata stimata la concentrazione proteica tramite saggio Bradford.

2.20 Quantificazione delle proteine

Per la determinazione della concentrazione proteica è stato usato il Bio-rad Protein Assay Kit. Il kit si basa sul metodo Bradford per la stima della concentrazione proteica ed usa la BSA come standard. Il metodo sfrutta la capacità del colorante Coomasse Brillant Blu G-250 di legare specifici residui amminoacidici producendo un cromoforo con un massimo di assorbanza a 595 nm.

2.21 Saggi di attività enzimatica

2.21.1 Saggio standard per la deidrogenasi ADA

Il saggio per determinare l'attività della Acetaldeide Deidrogenasi (Acetilante), codificata dal gene *pheF*, è stato eseguito a temperatura ambiente in cuvette di quarzo in un volume totale di 1 ml, aggiungendo a 50 mM di tampone sodio fosfato a pH 7.5, 1.425 mM di βNAD^+, 0.5 mM di Coenzima A (CoA), 1.25 µg di estratto proteico totale e, come substrato, l'Acetaldeide a concentrazione crescente compresa tra 5 mM e 350 mM.

Il saggio per determinare l'attività della Acetaldeide Deidrogenasi (Acetilante), codificata dal gene *xyl-likeQ*, è stato eseguito a temperatura ambiente in cuvette di quarzo in un volume totale di 1 ml, aggiungendo a 50 mM di tampone sodio fosfato a pH 7.5, 210 µM di βNAD^+, 75 µM di CoA, 37,5 µg di estratto proteico totale e, come substrato, l'Acetaldeide a concentrazione crescente compresa tra 5 mM e 50 mM.

La reazione inizia in seguito all'aggiunta del CoA e l'attività della Deidrogenasi è stata monitorata a 340 nm.

Una unità di attività enzimatica è definita come la quantità di enzima richiesto per catalizzare la riduzione di 1 µmol di βNAD$^+$ per minuto.

2.21.2 Determinazione delle costanti cinetiche

La velocità enzimatica iniziale (v_o) è stata calcolata convertendo la variazione di assorbanza/minuto (ΔA_{340}/minuto) in µM/minuto usando il coefficiente di estinzione molare (ε^M_{340}) per il NADH di 6220 $M^{-1}cm^{-1}$ ed applicando la seguente relazione:

$$\frac{\Delta A_{340}/\text{minuto}}{\varepsilon^M_{340}} = \mu M/\text{minuto}$$

Cioè la variazione di concentrazione del prodotto in un minuto espressa in µM (micromoli/ml).

Poiché la quantità di NADH che si forma corrisponde stechiometricamente alla quantità di substrato che si consuma, questo è anche il numero di micromoli di substrato consumate in un minuto, cioè le U/ml di saggio. Per la determinazione delle costanti cinetiche di ADA, K_M e V_{max}, sono stati realizzati dei saggi di attività enzimatica utilizzando concentrazioni crescenti del substrato Acetaldeide mantenendo costanti le concentrazioni di CoA e βNAD. I dati ottenuti sono stati riportati in un grafico che descrive un'iperbole equilatera secondo l'equazione di Michaelis-Menten. Poiché la medesima equazione per il calcolo delle costanti cinetiche, K_M e V_{max} non fornisce valori precisi per alte concentrazioni di substrato, si è fatto uso di una trasformazione lineare dell'equazione di Michaelis-Menten definita dall'equazione di Hanes. I grafici corrispondenti alle due equazioni sono stati creati utilizzando il programma *GraphPad Prism* disponibile in rete al sito internet www.graphpad.com.

2.22 "Modeling" molecolare

La predizione della struttura dell'enzima bifunzionale ADA-HOA Xyl-like si è basata sulla disponibilità delle coordinate tridimensionali delle proteine omologhe di *P*. CF600, conservate nella banca dati PDB (Code n. 1NVM), di cui è stata determinata la struttura terziaria mediante cristallografia ai raggi X. Per l'elaborazione del modello molecolare sono stati utilizzati i programmi MODELLER e QUANTA (Molecular Similation Inc.). La qualità stereochimica dei modelli ottenuti è stata verificata con il programma PROCHECK. La struttura secondaria è stata assegnata con il programma DSSP. Le figure sono state realizzate con Insight II package (Molecular Simulation, Inc.). Per la visualizzazione dei modelli sono stati impiegati i programmi RasMol e Swiss PDB Viewer.

2.23 Identificazione del promotore Pphe

Per identificare la regione promotrice della trascrizione dei geni *phe*, codificanti gli enzimi del *lower pathway* di *Pseudomonas* sp. OX1, un frammento di 6 Kb, che si estende dalla *orf1* a monte del locus *tou* fino al gene *pheK*, è stato isolato dal cosmide pFB3411 mediante digestione con l'endonucleasi di restrizione *Bgl*II: 10 μg di pFB3411 sono stati digeriti con 25 U dell'enzima *Bgl*II, in presenza di 8 μl di tampone 10X (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 10 mM $MgCl_2$ e 50 mM NaCl), in un volume finale di 80 μl; la reazione di digestione è stata condotta a 37°C per 4 ore.

Tale frammento è stato clonato nel vettore plasmidico pGEM-7Zf(+) precedentemente linearizzato con l'endonucleasi di restrizione *BamH*I. Gli enzimi di restrizione utilizzati creano, in seguito alla digestione, "*protruding* termini" complementari consentendo di inserire il frammento di 6 Kb *Bgl*II/*Bgl*II all'interno del pGEM-7Zf(+) linearizzato con *BamH*I. La reazione di ligazione è stata condotta a 4°C per 16 ore utilizzando un rapporto inserto:vettore = 3:1**,** in presenza di 5 μl del buffer 2X (100 mM $MgCl_2$, 100 mM DTT, 10 mM ATP in Tris-HCl 300 mM, pH 7,8) e 3 U dell'enzima T4 DNA ligasi, in un volume finale di 10 μl.

La miscela di ligasi è stata utilizzata per trasformare cellule di *E. coli* DH5α competenti e le cellule trasformate sono state piastrate su LB/agar contenente ampicillina 100 μg/ml. I cloni positivi sono stati identificati tramite uno *screening* per Colony PCR utilizzando i primers universali T7 e SP6.

Il plasmide ricombinante pGEM7Z-6B/B è stato sottoposto ad analisi di sequenza utilizzando i seguenti primers:

- PHK rev 5’-TGCTCTCCGAACCGCCACTTGA-3’
- Phe1 rev 5’-ACCGATCTAACCAAATGCTC-3’
- Phe2 rev 5’-GGTCGCGTTTCTACCGATG-3’

Allineamenti di sequenza hanno consentito di individuare all’interno di questa regione il putativo promotore dell’operone *phe*.

L’isolamento della sequenza del promotore è stata realizzata mediante una reazione di PCR utilizzando una coppia di primers progettata sulla base della sequenza precedentemente delucidata. I primers consentono inoltre di introdurre alle estremità 5’ e 3’ i siti di restrizione per *Xho*I (5’-CTCGAG-3’) e *BamH*I (5’-GGATCC-3’), rispettivamente.

Come primer per l’estremità 5’ è stato utilizzato l’oligonucleotide PheXho for (5’-CCG**CTCGAG**GCGATCACTTCTCTTTGC-3’), che include il sito di restrizione per *Xho*I (in evidenza).

Per l’estremità 3’ è stato utilizzato l’oligonucleotide PheBam rev (5’-CGC**GGATCC**CCCTTTATGTTTGTGATCGG-3’), che include il sito di restrizione per *BamH*I (in evidenza). Le basi presenti a monte dei siti di restrizione in entrambi i primers sono state introdotte per aumentare l’efficienza di digestione da parte delle endonucleasi di restrizione. La reazione di PCR è stata realizzata usando come stampo 5 ng del vettore e le condizioni indicate nel paragrafo 2.9: la temperatura di *annealing* usata per questa coppia di primers è di 65°C.

Il frammento di 370 bp ottenuto è stato digerito con gli enzimi di restrizione *Xho*I e *BamH*I, secondo le seguenti condizioni: 2.5 μg di frammento sono stati sottoposti ad una doppia digestione utilizzando 5 U dell’enzima *Xho*I e 5 U dell’enzima *BamH*I, 5 μl del tampone 10X (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 10 mM $MgCl_2$ e 50 mM NaCl), in un volume finale di 50 μl; la reazione di digestione è stata condotta a 37°C per 3 ore. Il frammento è stato purificato da gel allo 1,5% di agarosio mediante l’impiego del kit PROMEGA Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System.

Questo frammento, denominato Δ370X/B, è stato subclonato nel vettore pGEM7Zf(+) precedentemente digerito con le stesse endonucleasi di restrizione e con tale costrutto sono state trasformate cellule competenti di *E. coli* JM109.

Il vettore realizzato è stato denominato pGEM7Z-Δ370X/B.

2.24 Produzione di frammenti biotinilati del promotore Pphe

Due frammenti del promotore Pphe, denominati Δ1 e Δ3, sono stati realizzati mediante PCR secondo la reazione già descritta nel paragrafo 2.9.

Il plasmide pGEM7Z-Δ370X/B è stato utilizzato come stampo ed i primers specifici usati per amplificare tali frammenti sono stati progettati sulla base della sequenza nota della regione Δ370X/B clonata nel vettore. I primers senso usati sono coniugati con la biotina: in questo modo si producono frammenti con il loro 5' biotinilato.

I primers utilizzati per l'amplificazione del frammento Δ1 sono:

Phe Δ1 Bio 5'-CTATATCCCTTCCTCTGG-3'

Phe Δ1 rev 5'-CCCTTTATGTTTGTGATCGG-3'

I primers utilizzati per l'amplificazione del frammento Δ3 sono:

Phe Δ3 Bio 5'-AATCGGCCGTTGTCAGTG-3'

Phe Δ3 rev 5'-CCCGGAGCGTTTTTTACC-3'

La temperatura di *annealing* dei primers utilizzata è di 52°C.

2.25 Preparazione di estratti proteici di Pseudomonas sp. OX1

Pseudomonas sp. OX1 viene cresciuto a 30°C in terreno liquido M9 arricchito con Malato alla concentrazione finale 20 mM. Come induttore dell'espressione dei geni catabolici viene usato il fenolo che si aggiunge direttamente alla coltura alla concentrazione finale pari a 4 mM quando l'OD_{600} è all'incirca 0,2. La crescita viene monitorata misurando l'assorbimento a 600 nm. Quando l'OD_{600} è all'incirca 1,2 le cellule vengono raccolte mediante centrifugazione a 8000 rpm per 30' a 4°C. Il pellet cellulare viene lavato in Tris-HCl 50 mM, pH 7,5 ed ancora raccolto per centrifugazione a 8000 rpm per 10' a 4°C. A questo punto il pellet viene risospeso nel seguente buffer di lisi: 50 mM Tris-HCl pH 7,5 - 150 mM NaCl - 2 mM EDTA. Il buffer di lisi è usato in quantità di 3 ml/gr di pellet. Alla sospensione si aggiunge lisozima alla concentrazione finale 0,2 mg/ml ed 10 μl/gr di pellet di un cocktail di inibitori di proteasi. Segue un'incubazione in ghiaccio per 30'. Le cellule sono

state quindi sonicate in ghiaccio, per evitare il surriscaldamento e la denaturazione delle proteine. È stato utilizzato un programma che prevede tre cicli di sonicazione ognuno della durata di 200 secondi. Ogni ciclo è composto da 20 impulsi, di 10 secondi ciascuno, alla potenza di 80 W, con un intervallo tra un impulso ed il successivo di 10 secondi. Tra i vari cicli di sonicazione è previsto un raffreddamento del campione in ghiaccio per 5 minuti.

Il campione è stato successivamente trattato con 100 μg/ml DN*asi* I a 37°C per un'ora e centrifugato a 8500 rpm, 4°C per 30 minuti. Il supernatante è stato recuperato e la concentrazione proteica è stata determinata utilizzando il metodo Bradford precedentemente descritto (par. 2.20).

2.26 South-Western

Questa metodica è stata utilizzata per identificare proteine di regolazione della trascrizione dei geni *phe*: l'obiettivo è quello di isolare fattori trascrizionali, presenti nell'estratto proteico totale ottenuto da *Pseudomonas* sp. OX1 cresciuto in presenza di fenolo, in grado di interagire con i frammenti Δ1 e Δ3 del promotore Pphe.

Blotting su nitrocellulosa e rinaturazione delle proteine: dopo l'SDS-PAGE le proteine sono state trasferite su nitrocellulosa (PROTRAN, Schleicher & Schuell BioScience) utilizzando il Mini Transblot System (Bio-Rad). Il trasferimento è stato realizzato a 150 mA costanti per 2 ore in un tampone composto da glicina 0,192 M, Tri-HCl 0,025 M e Metanolo 20% (v/v). Al termine della corsa la nitrocellulosa è stata incubata in un tampone di rinaturazione costituito da 20 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 2.5 mM DTT, 2.5% (v/v) Nonidet P-40, 10% (v/v) glicerolo e 3% (p/v) BSA, per tutta la notte in agitazione a 4°C.

Ibridazione con sonde marcate con biotina: la membrana con le proteine rinaturate è stata trasferita in una soluzione di legame costituita da 10 mM Tris-HCl pH 8, 50 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 5% (v/v) glicerolo e 0.125% (p/v) BSA.

A questa soluzione si aggiungono 500 ng del frammento marcato con biotina, preparato come descritto nel paragrafo precedente. L'ibridazione è stata condotta per 6 ore in agitazione a 4°C.

Lavaggi, interazione con Ab Avidin-HRP e sviluppo: terminata l'incubazione, la nitrocellulosa è stata lavata due volte in 10 ml della soluzione di legame, per 10 minuti, in agitazione, a temperatura ambiente. Quindi è stato realizzato un lavaggio in 20 ml di PBS 1X per 10 minuti, in agitazione, a temperatura ambiente. A questo punto la nitrocellulosa è stata

incubata in 7 ml di PBT contenente l'anticorpo Avidin-HRP diluito 1:700, per 1h : 30' in agitazione, a temperatura ambiente.

Eseguiti quattro lavaggi in 20 ml di PBS 1X. La visualizzazione delle proteine trasferite su filtro che hanno interagito con la sonda marcata con biotina è stata realizzata immergendo la nitrocellulosa in una soluzione costituita da 0.5 M Tris-HCl pH 6.8, 0,025% H_2O_2 e 0,06% 4-Cl-naftolo in metanolo.

2.27 Analisi mediante spettrometria di massa

2.27.1 Escissione delle bande dal gel di poliacrilammide e digestione triptica

Il protocollo utilizzato segue la procedura descritta da Shevchenko *et al.* (1996) a cui sono state apportate alcune modifiche. Le bande d'interesse, evidenziate su SDS-PAGE dopo colorazione con Coomassie, sono state tagliate dal gel e ridotte in frammenti di 1 mm^2. Tali frammenti sono stati decolorati mediante trattamenti successivi con acetonitrile. Successivamente i campioni proteici sono stati sottoposti a riduzione *in situ* dei ponti disolfuro con DTT 10 mM per 45' a 56°C. È seguita l'alchilazione dei gruppi tiolici delle cisteine sostituendo il DTT con iodoacetammide in NH_4HCO_3. La reazione è stata condotta a temperatura ambiente, al buio per 30'. Sono stati ripetuti i lavaggi in CH_3CN ed i frammenti di gel sono stati reidratati in una soluzione di NH_4HCO_3 a cui è stata aggiunta tripsina 10 ng/μl: la reazione è stata condotta per un'ora a 4°C quindi il campione è stato incubato tutta la notte a 37°C, dopo aver aggiunto un ulteriore volume di NH_4HCO_3, fino alla totale copertura dei pezzetti di gel. I peptidi ottenuti dalla digestione con tripsina sono stati acidificati con 5% (v/v) di acido formico prima dell'analisi di spettrometria di massa.

2.27.2 Identificazione dei peptidi con RP-nHPLC-ESI-MS/MS

Le miscele peptidiche sono state separate con cromatografia liquida a fase inversa mediante l'utilizzo di un Nano HPLC (RP-HPLC) Ultimate (LC-Packings, Dionex, Italia) provvisto di autocampionatore SWITCHOS e FAMOS. Il sistema cromatografico è direttamente interfacciato ad uno spettrometro di massa dotato di sorgente nano-ESI (electrospray ionization) e di un analizzatore a trappola ionica (HTC Plus, Bruker-Daltonik, Germany). Il sistema cromatografico e lo spettrometro di massa, operante come massa tandem

(MS/MS), sono gestiti da un software che permette l'accoppiamento e la gestione della cromatografia con la spettrometria di massa.

La separazione dei peptidi avviene attraverso una colonna capillare in silice (C-18) ad un flusso di circa 200 nl/min. I peptidi vengono eluiti direttamente nella trappola ionica dello spettrofotometro. Gli spettri di frammentazione ottenuti permettono di ricostruire la sequenza amminoacidica dei peptidi e da questi è possibile identificare le proteine d'interesse mediante ricerca nel database NCBI utilizzando il programma MASCOT (http://www.matrixscience.com).

2.28 Isolamento del gene tmbR-like, subclonaggio nel vettore plasmidico pGEM-T Easy e sequenziamento

Il gene *tmbR-like,* identificato mediante spettrometria di massa e codificante il putativo regolatore dell'espressione dei geni *phe*, è stato isolato dal DNA genomico di *P*. sp. OX1 mediante una reazione di PCR.

I primers utilizzati per l'amplificazione sono i seguenti:

- Nde-Tmb for 5'-GGAATTC**CATATG**TGCTGCGGGGCGGATCATCCC-3'
- Bam-Tmb rev 5'-CGC**GGATCC**CTATCGGCCCGTTGCTTTCACAGA-3'

I primers consentono inoltre di introdurre alle estremità 5' e 3' i siti di restrizione per *Nde*I (5'-CATATG-3') e *BamH*I (5'-GGATCC-3'), rispettivamente. Le basi presenti a monte dei siti di restrizione in entrambi i primers sono state introdotte per aumentare l'efficienza di digestione da parte delle endonucleasi di restrizione. La reazione di PCR è stata realizzata usando come stampo 75 ng del DNA genomico e le condizioni indicate nel paragrafo 2.9: la temperatura di *annealing* usata per questa coppia di primers è di 69°C.

Il prodotto di amplificazione è stato subclonato nel vettore plasmidico pGEM-T Easy con le modalità già descritte nel paragrafo 2.10. Il plasmide ricombinante, denominato pGEM-TmbRlike, è stato sottoposto ad analisi di sequenza utilizzando i primers universali T7 e SP6.

CAPITOLO 3

Risultati e discussione

PARTE I

Il lower pathway di Pseudomonas sp. OX1: gli enzimi ADA e HOA

In questa prima parte del lavoro di tesi è stata affrontata la caratterizzazione biochimica degli enzimi che catalizzano le ultime due reazioni del *lower pathway* di *Pseudomonas* sp. OX1. Sono l'Aldeide Deidrogenasi (Acetilante) ADA e l'Aldolasi HOA. L'elevato grado di omologia esistente tra le proteine ADA ed HOA di *Pseudomonas* sp. OX1 e quelle di *Pseudomonas* sp. CF600, la cui struttura e funzione sono note (Manjasetty *et al.*, 2003; Powlowski *et al*. 1993), permette di ipotizzare che anche gli omologhi in *Pseudomonas* sp. OX1 siano associati a formare un complesso bifunzionale la cui attività genera i prodotti finali del *pathway* catabolico, Piruvato ed Acetil-CoA. Come descritto in *P*. CF600, la loro stretta associazione è necessaria per incanalare l'intermedio reattivo prodotto da HOA, l'acetaldeide, verso il sito attivo di ADA dove viene metabolizzato ad Acetil-CoA.

3.1 Isolamento dei geni pheF e pheG, subclonaggio nel vettore plasmidico pGEM-T Easy e sequenziamento

La conoscenza dell'intera sequenza nucleotidica dell'operone *phe*, clonato nel vettore cosmidico pFB3411, ha permesso di progettare primers specifici per l'amplificazione dei geni *pheF* e *pheG* codificanti, rispettivamente, ADA e HOA.

I primers utilizzati nelle amplificazioni, la procedura di PCR e il protocollo di subclonaggio sono descritti nelle sezioni 2.10 di Materiali e Metodi.

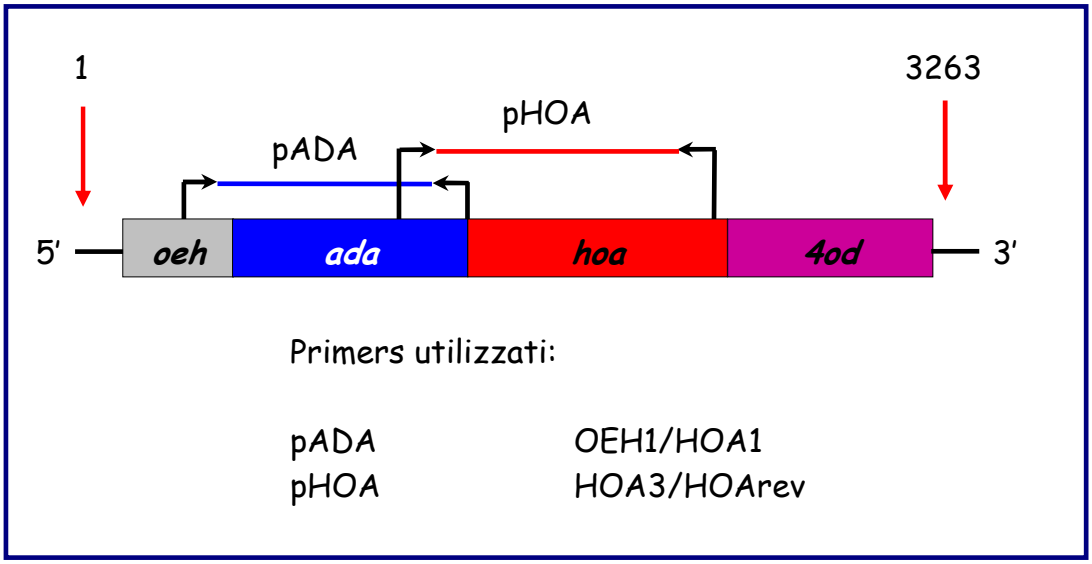


Figura 34: *Rappresentazione schematica della procedura di subclonaggio in pGEM-T dei geni phe amplificati con coppie di primers specifici.*

I plasmidi ricombinanti pADA e pHOA sono stati successivamente sottoposti a sequenziamento, come descritto nella sezione 2.10 di Materiali e Metodi.

```
1                                                                   60
ATGAACAAGAAACTGAAAGCGGCGATTATCGGCCCGGGCAACATCGGCACGGACCTGGTG
61                                                                  120
ATGAAGATGCTGCGCTCCGAATGGATCGAGCCGGTCTGGATGGTCGGCATCGACCCTGAA
121                                                                 180
TCCGACGGCCTCAAACGTGCCCGCGAGTTCGGCCTGAAGACCACCGCCGAGGGCGTCGAC
181                                                                 240
GGCCTGCTGCCGCACGTGCTCGACGACGACATCCGCATCGCCTTCGATGCCACCTCCGCC
241                                                                 300
TATGTACATGCCGAGAACAGCCGCAAGCTCAACGAGCTGGGCGTGCTGATGGTCGACCTG
301                                                                 360
ACCCCGGCCGCCATCGGCCCGTACTGCGTGCCGCCGGTAAACCTCAAGCAGCACGTCGGC
361                                                                 420
ACGCTGGAAATGAACGTCAACATGGTCACCTGTGGTGGCCAGGCCACCATCCCGATGGTC
421                                                                 480
GCCGCGGTATCGCGCGTGCAGCCGGTGGCCTACGGCGAGATCGTCGCCACCGTGTCCTCG
481                                                                 540
CGCTCCATCGGCCCGGGCACCCGCAAGAACATCGACGAGTTCACCCGCACCACGGCCGGC
541                                                                 600
GCCATCGAGCAGGTCGGCGGGGCCAAGGAAGGCAAGGCGATCATCGTCGTCAACCCGGCC
601                                                                 660
GAGCCGCCGCTGATGATGCGCGACACCATCCACTGTCTGACCGAAACCGAGCCGGACCAG
661                                                                 720
GATGCGATCACCGCATCGGTCCACGCGATGATCGCCGAGGTGCAGAAGTACGTGCCCGGC
721                                                                 780
TACCGGCTGAAGAACGGCCCGGTATTCGACGGCAACCGCGTCTCGATCTTCATGGAGGTC
781                                                                 840
GAGGGCCTGGGCGACTACCTGCCCAAGTACGCCGGCAACCTCGACATCATGACCGCCGCC
841                                                                 900
GCGCTGCGCACCGGCGAGATGTTCGCCGAGGAAATCGCCAGCGGCACCATTCAACTGCCA
901                     924
CGTCGTGAAGCGGCACTGGCCTAA
```

Figura 35: *Sequenza nucleotidica del gene pheF codificante l'enzima ADA*

```
1                                                                    60
ATGAATCTGCAAGGCAAGAACGTCACCCTGCACGACATGAGCCTGCGCGACGGCATGCAC
61                                                                   120
GCCAAGCGCCACCAGATCAGCCTCGAGCAGATGATCGCGGTCGCCACCGGCCTCGACGCC
121                                                                  180
GCCGGCATGCCGCTGATCGAGATCACCCACGGCGACGGCCTCGGCGGTCGCTCGATCAAC
181                                                                  240
TACGGTTTCCCCGCGCACAGCGACGAGGAATACCTGCGTGCGGTGATCCCGCGCCTCAAG
241                                                                  300
CAGGCCAAGGTATCCGCCCTGCTGCTGCCGGGCATCGGCACGGTCGACCACCTGAAGATG
301                                                                  360
GCGCTCGACTGTGGCGTCTCCACCATTCGTGTGGCCACGCATTGCACCGAGGCCGACGTC
361                                                                  420
TCCGAACAGCACATCGGCATGTCGCGCAAGCTGGGCGCCGATACCGTCGGCTTTCTGATG
421                                                                  480
ATGGCGCACATGATCAGCGCGGAAAAAGTGCTGGAGCAGGCCAGGCTGATGGAAAGCTAC
481                                                                  540
GGCGCCAACTGCATCTACTGCACCGACTCGGCCGGCTACATGCTGCCCGATGAAGTCAGC
541                                                                  600
GAGAAGATCGGCCTGCTGCGCGCCGAGCTGAACCCCGCCACCGAGATCGGCTTCCACGGC
601                                                                  660
CACCACAACATGGGCATGGCCATCGCCAACTCGCTGGCCGCCATCGAAGCTGGCGCCTCG
661                                                                  720
CGTATCGACGGCTCGGTCGCCGGCCTCGGCGCCGGTGCCGGCAACACCCCGCTGGAAGTC
721                                                                  780
TTCGTCGCGGTGTGCAAGCGCATGGGCGTGGAAACCGGCATCGACCTCTACAAGATCATG
781                                                                  840
GATGTGGCCGAAGACCTCGTCGTGCCAATGATGGACCAGCCGATCCGCGTCGACCGCGAT
841                                                                  900
GCGCTGACCCTGGGCTATGCCGGGGTGTACAGCTCGTTCCTGTTGTTTGCCCAGCGCGCC
901                                                                  960
GAGAAGAAATACGGCGTGCCGGCCCGCGACATTCTGGTCGAGCTGGGGCGCCGCGGCACC
961                                                                  1020
GTCGGTGGCCAGGAAGACATGATCGAAGACCTCGCCCTGGATATGTCCCGGGCCCGCCAG
1021                  1041
AGCCAGAAGGTGAGCGCATGA
```

Figura 36: *Sequenza nucleotidica del gene pheG codificante l'enzima HOA*

3.2 Realizzazione del vettore di espressione pET-HOA

Studi relativi all'espressione delle proteine ricombinanti ADA ed HOA di *Pseudomonas* sp. CF600 in *E. coli* e in ceppi di *Pseudomonas* naturalmente privi delle due attività enzimatiche, hanno permesso di osservare che la massima attività dei due enzimi si ottiene solo se essi vengono sintetizzati nella stessa cellula: l'Aldolasi HOA infatti non è attiva in assenza della Deidrogenasi ADA, mentre quest'ultima mantiene una attività minima se prodotta in assenza della sua controparte.

I geni *pheG* e *pheF* sono stati espressi in uno stesso ceppo di *E. coli* BL21(DE3).

Il gene *pheG*, codificante l'Aldolasi HOA, è stato isolato per digestione con le endonucleasi di restrizione *Nde*I e *Nco*I e successivamente subclonato nel vettore d'espressione pET-22b(+), precedentemente digerito con gli stessi enzimi di restrizione (fig. 37), come descritto nella sezione 2.11 di Materiali e Metodi.

Il plasmide ricombinante così ottenuto è stato denominato pET-HOA.

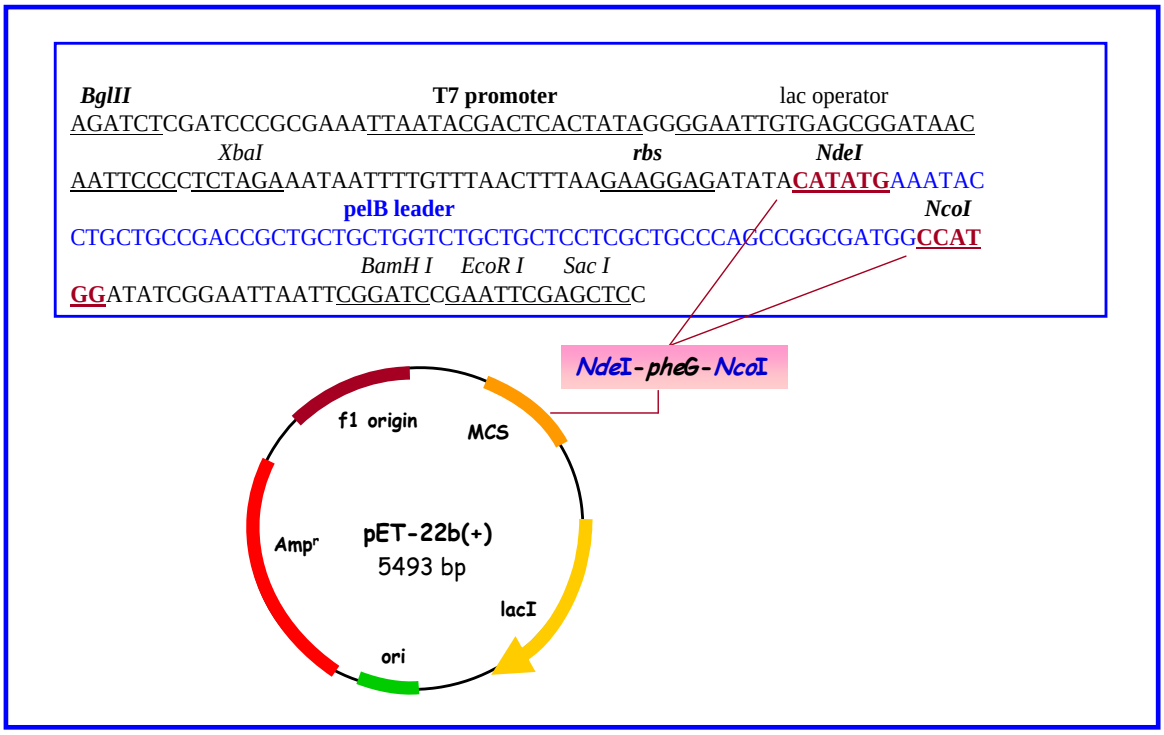


Figura 37: *Strategia di clonaggio del gene pheG nel vettore d'espressione pET-22b(+) in corrispondenza dei siti di restrizione NdeI e NcoI. Il costrutto ottenuto prende il nome di pET-HOA*

3.3 Ingegnerizzazione del plasmide pACYC184 e realizzazione del costrutto pACET-ADA

La coespressione delle proteine ADA ed HOA in una stessa cellula di *E. coli* BL21(DE3) è possibile soltanto se i geni che codificano le due proteine sono clonati in vettori d'espressione appartenenti a diversi gruppi di incompatibilità. Ciò garantisce che entrambi i plasmidi siano mantenuti stabilmente dalla stessa cellula.

Il gene *PheG* è stato clonato nel vettore d'espressione pET-22b(+), che contiene l'origine di replicazione di pMB1 (un plasmide appartenente al gruppo di incompatibilità ColE1). Il vettore di clonaggio pACYC184, contenente l'origine di replicazione p15A, che permette la coesistenza in cellule con plasmidi del gruppo ColE1, è stato ingegnerizzato a vettore d'espressione in cui è stato clonato il gene *pheF*.

Per la realizzazione di questo nuovo costrutto, la regione del vettore d'espressione pET-22b(+), comprendente il *T7 Promoter*, il *Lac operator* ed i siti *Rbs* è stata amplificata per PCR utilizzando primers specifici contenenti i siti di restrizione per le endonucleasi *Nco*I e *Sac*II (sezione 2.12 di Materiali e Metodi). Il prodotto di amplificazione è un frammento di 160 bp: esso è digerito con gli enzimi di restrizione *Nco*I e *Sac*II quindi subclonato nel vettore pACYC184, precedentemente linearizzato con le stesse endonucleasi di restrizione. Questo nuovo vettore d'espressione è stato chiamato pACET (fig. 38 a,b).

Il gene *pheF*, codificante l'enzima ADA, è stato isolato dal plasmide pGEM-T per digestione con le endonucleasi di restrizione *Nde*I e *Sac*II e subclonato nel vettore d'espressione pACET, precedentemente digerito con gli stessi enzimi di restrizione, come descritto nella sezione 2.13 di Materiali e Metodi.

Il plasmide ricombinante così ottenuto, pACET-ADA (fig. 38 c), è stato stabilizzato in cellule competenti di *E. coli* DH5α.

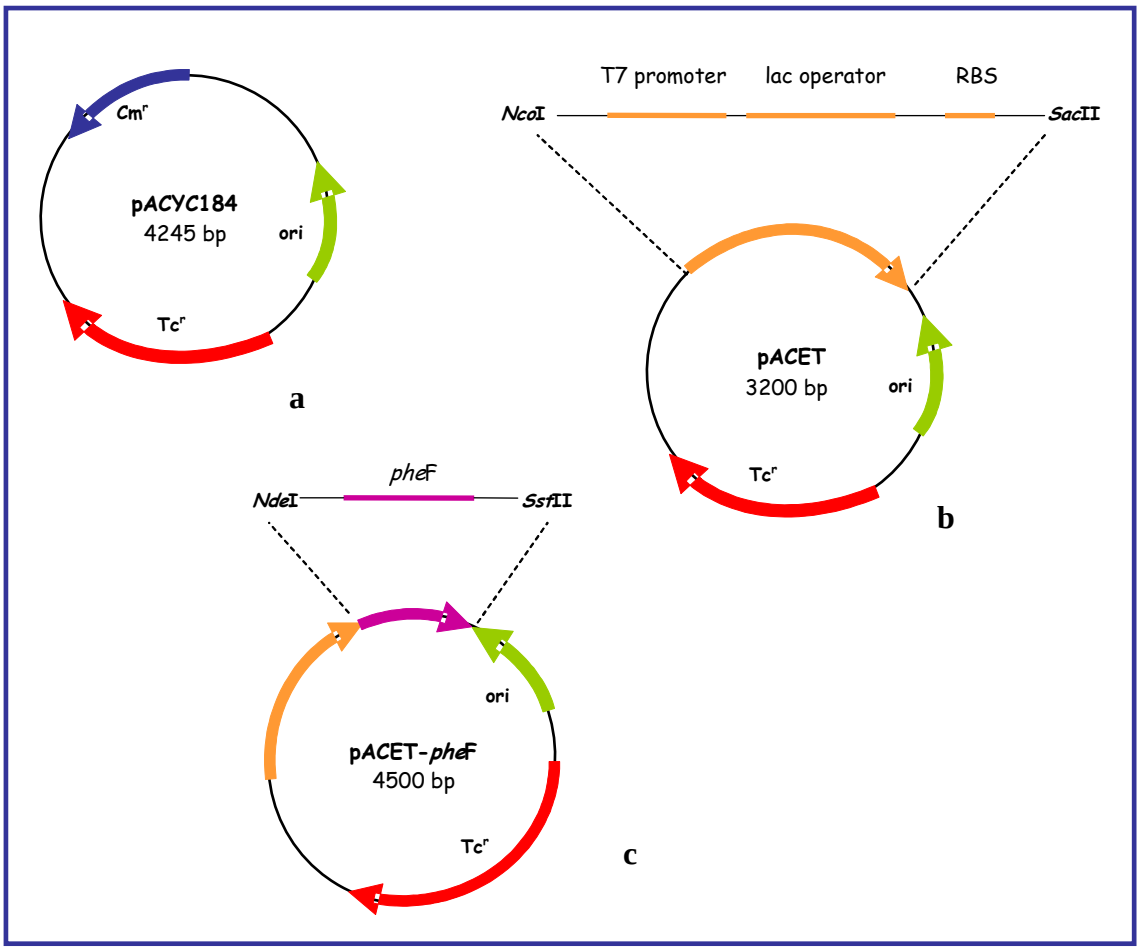


Figura 38: *Realizzazione del vettore d'espressione pACET e clonaggio del gene pheF.*

3.4 Cotrasformazione di cellule BL21(DE3) con i plasmidi ricombinanti pET-HOA e pACET-ADA e screening delle colonie positive

I plasmidi ricombinanti pET-HOA e pACET-ADA sono stati trasferiti in cellule competenti di *E. coli* BL21(DE3), selezionate per l'espressione delle proteine ricombinanti.

La selezione delle cellule che hanno acquisito entrambi i plasmidi è stata fatta tramite Colony PCR. Tre colonie sono state prelevate dalla piastra di trasformazione ed usate come stampo in una reazione di Colony PCR con la coppia di primers OEH1 e HOA1 per l'amplificazione del gene *pheF* codificante ADA (fig. 39, *lanes* 1, 2 e 3). Delle tre colonie analizzate solo due hanno acquisito il plasmide pACET-ADA (fig. 39, *lanes* 1 e 2).

Le stesse tre colonie sono state usate come stampo in altre tre reazioni di Colony PCR usando la coppia di primers HOA3 e HOArev che amplificano il gene *pheG* codificante HOA. Anche in questo caso solo due colonie contengono il plasmide pET-HOA (fig. 39, *lanes* 4 e 6).

Da quanto osservato soltanto la colonia 1 risulta contenere entrambi i plasmidi (fig. 39, *lane*s 1 e 4). Essa è stata propagata su una nuova piastra allo scopo di verificare se i due costrutti ricombinanti vengano mantenuti stabilmente nelle cellule. I cloni positivi sono stati identificati tramite Colony PCR, realizzata come indicato nel primo *screening*. I risultati ottenuti dimostrano che i costrutti pET-HOA e pACET-ADA sono replicati e mantenuti in modo stabile in una stessa cellula di *E. coli* BL21(DE3) (fig. 40).

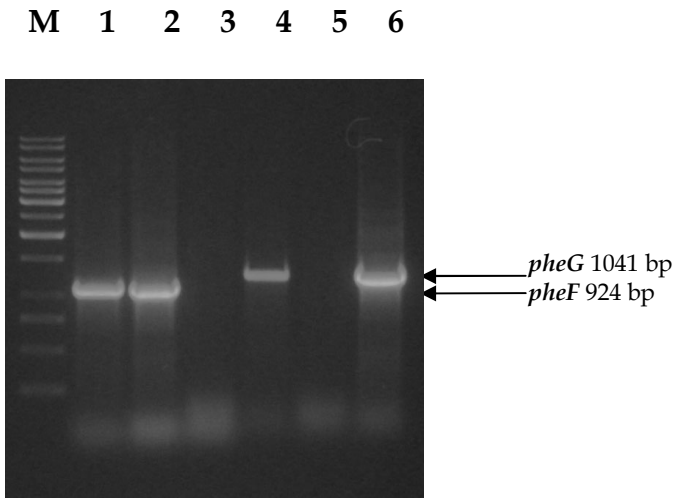


Figure 39: *Elettroforesi su gel d'agarosio allo 0,8% per lo screening delle colonie positive. M) Markers di peso molecolare 1 Kb DNA ladder; 1) Colonia 1 ADA, 2) Colonia 2 ADA, 3) Colonia 3 ADA, 4) Colonia 1 HOA, 5) Colonia 2 HOA, 6) Colonia 3 HOA.*

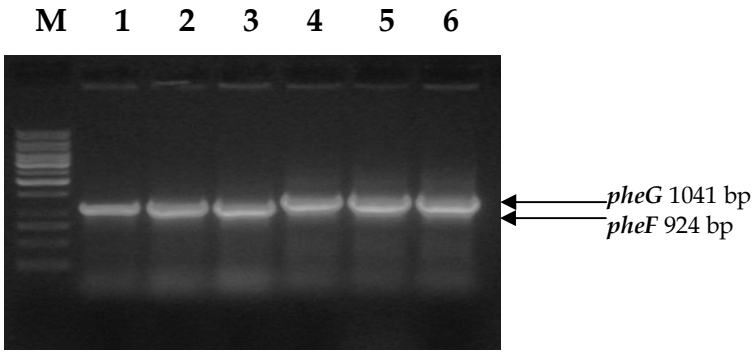


Figura 40: *Elettroforesi su gel d'agarosio allo 0,8% per lo screening di colonie positive. M) Markers 1 Kb DNA ladder, 1) Colonia 1 ADA, 2) Colonia 2 ADA, 3) Colonia 3 ADA, 4) Colonia 1 HOA, 5) Colonia 2 HOA, 6) Colonia 3 HOA.*

3.5 Espressione delle proteine ricombinanti

I plasmidi pET-HOA e pACET-ADA sono stati usati per cotrasformare cellule di *E. coli* BL21(DE3). I ceppi ricombinanti sono poi serviti per l'espressione degli enzimi ADA ed HOA.

Sono state realizzate delle espressioni analitiche utilizzando 10 ml di brodo di coltura LB. L'espressione delle proteine eterologhe è stata indotta con diverse concentrazioni di IPTG e per tempi diversi in modo da trovare le migliori condizioni per indurre l'espressione delle proteine d'interesse. Per la prima prova d'espressione una colonia di BL21(DE3) è stata inoculata in 10 ml di brodo LB, in presenza degli antibiotici ampicillina e tetraciclina, fatta crescere a 37°C, in un incubatore a piatto orbitante, per 16 ore. Il preinoculo è stato poi diluito 1:100 in 40 ml di LB e fatto crescere a 37°C, in agitazione, fino al raggiungimento di una densità cellulare corrispondente ad un OD_{600} di 0,6. A questo punto è stato prelevato 1 ml di coltura da analizzare come controllo prima dell'induzione mentre al resto della coltura è stato aggiunto IPTG 0,2 mM e le cellule sono state fatte crescere per 3 ore a 37 °C, in agitazione. Dopo il suddetto tempo, dalla coltura è stato prelevato 1 ml come controllo dopo induzione mentre il resto della coltura è stato centrifugato a 9000 rpm, 4°C per 15 minuti per separare il pellet dal supernatante. Il pellet cellulare è stato risospeso nel tampone di sonicazione e sottoposto a frazionamento cellulare, come indicato nella sezione 2.18 di Materiali e Metodi. Dopo la sonicazione sono stati prelevati 200 µl del campione da analizzare come controllo frazionato mentre il resto della sospensione è stato centrifugato a 13500 rpm, 4°C per 20 minuti per separare il supernatante dal pellet cellulare.

I campioni prelevati nei vari passaggi sono stati centrifugati e le frazioni solubili ed insolubili sono state analizzate su un gel al 15% di poliacrilammide mediante SDS-PAGE. Tutti i pellet sono stati risospesi in una opportuna quantità di Sample Buffer contenente DTT e bolliti per 10 minuti. I supernatanti, invece, sono stati sottoposti a precipitazione delle proteine in etanolo quindi il precipitato è stato anch'esso risospeso in Sample Buffer contenente DTT e bollito per 10 minuti. Tutti i campioni sono stati analizzati mediante SDS-PAGE (fig. 41).

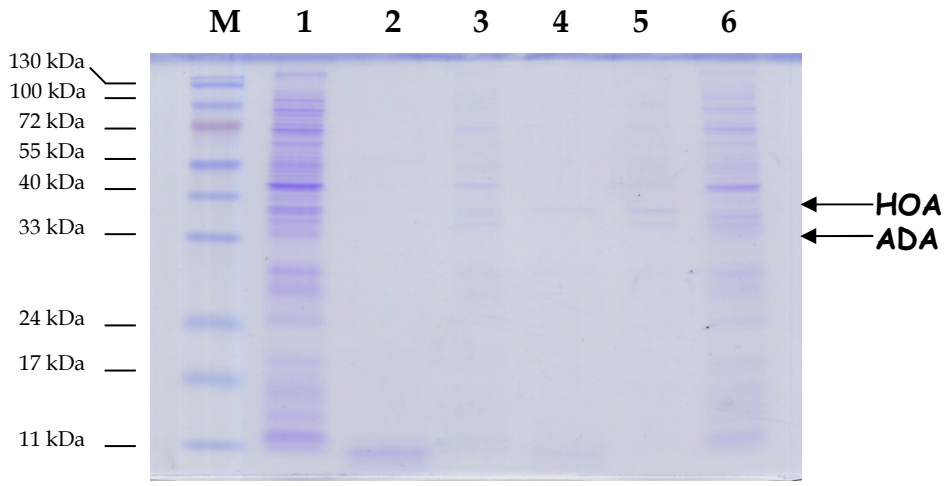


Figura 41: *Analisi su gel di poliacrilammide al 15% delle proteine ADA ed HOA coespresse da E. coli BL21(DE3) in presenza di IPTG 0,2 mM. M) Markers di peso molecolare Prestained Protein Ladder, 1) Pellet del campione prima dell'induzione con IPTG, 2) Supernatante del campione prima dell'induzione con IPTG, 3) Pellet del campione dopo induzione con IPTG, 4) supernatante del campione dopo induzione con IPTG, 5) Pellet del campione dopo sonicazione, 6) Supernatante del campione dopo sonicazione.*

Dall'analisi del gel si deduce che la quantità di IPTG utilizzata per indurre l'espressione di ADA ed HOA ricombinanti non sia stata sufficiente, infatti le bande di interesse relative ai pesi di 32,8 KDa (ADA) e 37,1 KDa (HOA) non sono visibili in nessuno dei campioni analizzati.

Sono state realizzare altre due prove di induzione con 0,4 mM e 0,6 mM di IPTG per 4 e 16 ore. Come prima sono stati prelevati dei campioni, come controllo delle varie fasi dell'induzione, che sono stati analizzati tramite SDS-PAGE. Sono stati preparati due gel di poliacrilammide: nel primo (fig. 42) sono stati caricati i pellets recuperati dalla centrifugazione di tutti i campioni, mentre nel secondo (fig. 43) sono stati caricati i supernatanti.

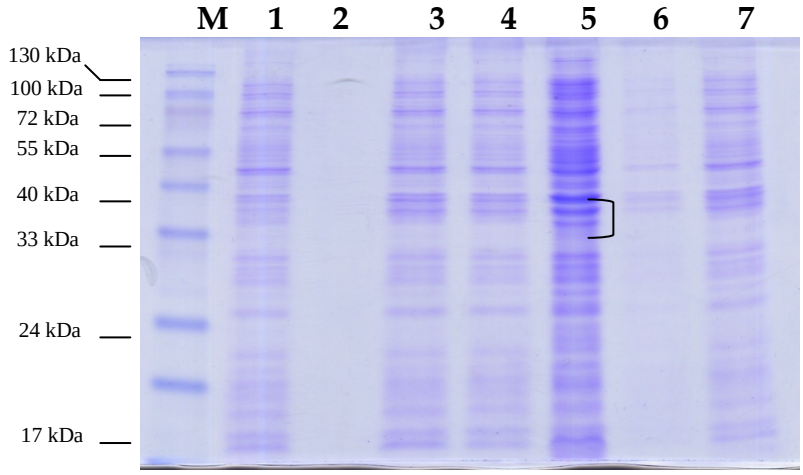


Figura 42: *Analisi su gel di poliacrilammide al 15% dei pellet recuperati dai controlli dell'espressione di ADA ed HOA coespresse in E. coli BL21(DE3). M) Markers di peso molecolare Prestained Protein Ladder, 1) Campione non indotto al tempo zero, 2) Campione non indotto a 4 h, 3) Campione dopo l'induzione con 0,4 mM di IPTG per 4 h, 4) Campione dopo l'induzione con 0,6 mM di IPTG per 4 h, 5) Campione non indotto a 16 h, 6) Campione dopo induzione con 0,4 mM di IPTG per16 h, 7) Campione dopo induzione con 0,6 mM di IPTG per 16 h.*

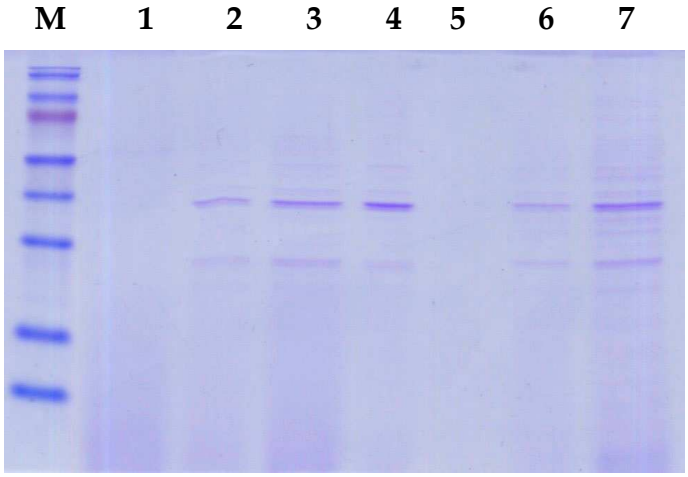


Figura 43: *Analisi su gel di poliacrilammide al 15% dei supernatanti recuperati dai controlli dell'espressione di ADA ed HOA coespresse da E. coli BL21(DE3). M) Markers di peso molecolare Prestained Protein Ladder, 1), Campione non indotto al tempo zero, 2) Campione non indotto a 4 h, 3), Campione dopo l'induzione con 0,4 mM di IPTG per 4 h, 4) Campione dopo induzione con 0,6 mM di IPTG per 4 h, 5) Campione non indotto a 16 h, 6) Campione dopo induzione con 0,4 mM di IPTG per 16 h, 7) Campione dopo induzione con 0,6 mM di IPTG per 16 h.*

L’analisi dei gel rivela una scarsa induzione delle proteine d’interesse che sono prodotte principalmente in forma insolubile; le due diverse concentrazioni di IPTG (0,4 mM e 0,6 mM) ed i due tempi di induzione (4 e 16 ore) mostrano profili di espressione molto simili ai campioni non indotti, in particolare sembra venire espressa in maggiore quantità l’Aldolasi HOA (37,1 KDa). La scarsa produzione della Deidrogenasi ADA può essere dovuta al fatto che il vettore pACET, da noi realizzato ed in cui è stato clonato il gene *pheF*, non risponde in maniera ottimale all’induttore IPTG. Inoltre si può notare, osservando il profilo del campione non indotto con IPTG ma cresciuto per 16 ore a 37°C (fig. 42, *lane* 5), come l’espressione dei geni d’interesse sia comunque possibile. Questo problema di espressione basale è molto frequente in ceppi di *E. coli* quali BL21(DE3) che non hanno plasmidi come il pLysS. Questo plasmide, infatti porta il gene che codifica il lisozima T7, un inibitore naturale della T7 RNA polimerasi, contribuendo così a mantenere silenti i geni clonati in pET fino a quando non viene fornito IPTG.

3.6 Realizzazione dei costrutti pET-FG-Nde/B e pET-FG-Nco/B per l’espressione delle proteine ADA ed HOA

Per l’insuccesso della strategia adottata precedentemente, è stato deciso di isolare i geni *pheG* e *pheF* dal cosmide pFB3411 in un unico frammento genico che sarà poi clonato nel vettore d’espressione pET22b(+). Il plasmide così realizzato permette la trascrizione delle cornici aperte di lettura dei geni codificanti ADA ed HOA in un unico mRNA, in modo tale da garantire la produzione di entrambe le proteine ricombinanti all’interno della stessa cellula.

Per l’espressione delle proteine ADA e HOA di *P*. sp. OX1 in *E. coli* sono stati realizzati due costrutti plasmidici: nel primo la coppia genica *pheFG* è stata clonata in corrispondenza dei siti di restrizione *Nde-Bam* del vettore d’espressione pET-22b(+), nel secondo in corrispondenza dei siti *Nco-Bam* dello stesso vettore. Le proteine espresse da questo secondo costrutto presentano a monte della loro sequenza aminoacidica un peptide segnale coinvolto nella loro traslocazione nello spazio periplasmatico. In questo modo si vuole cercare di aumentare la porzione solubile delle proteine espresse facilitando così la loro purificazione; infatti, in base a quanto già osservato nelle prove di coespressione precedenti, la maggior parte delle proteine ricombinanti prodotte tende a formare aggregati insolubili noti come corpi di inclusione.

I nuovi costrutti così ottenuti, pET-FG-Nde/B e pET-FG-Nco/B, sono stati usati per trasformare cellule di *E. coli* BL21(DE3), adatte per l'espressione delle proteine ricombinanti.

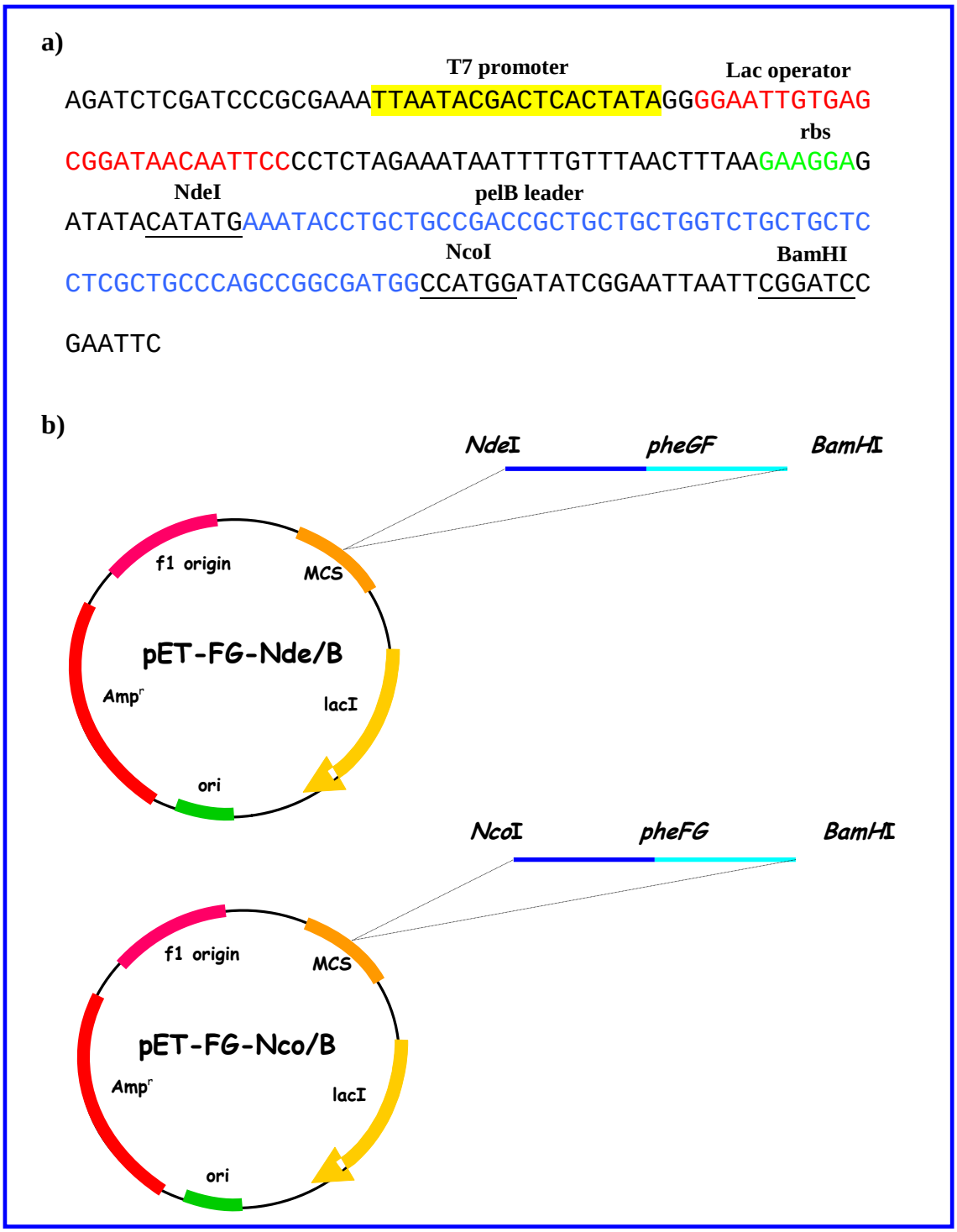


Figura 44: *a) Multiple cloning site del vettore pET22b(+): sono indicati i siti di restrizione usati per il clonaggio dei geni pheFG; b) realizzazione dei due costrutti pET-FG-Nde e pET-FG-Nco*

3.7 Espressione dell'enzima bifunzionale

Le cellule di *E. coli* BL21(DE3), trasformate con i plasmidi ricombinanti pET-FG-Nde/B e pET-FG-Nco/B sono state inoculate in 10 ml di brodo di coltura LB contenente ampicillina e sono state fatte crescere per 16 ore a 37°C, in un incubatore termostato a piatto orbitante per mantenere la coltura in continua agitazione garantendone la giusta ossigenazione. Il preinoculo è stato diluito in 300 ml di LB con ampicillina e fatto crescere fino al raggiungimento di una densità cellulare pari a un OD_{600} di 0,6. Quindi l'espressione delle proteine ADA ed HOA è stata indotta aggiungendo alla coltura IPTG 0,5 mM e lasciandola crescere per ulteriori 3 ore. Le cellule di *E. coli* recuperate dalla centrifugazione delle colture batteriche indotte sono state risospese in un tampone di sonicazione ed incubate in ghiaccio per 30 minuti. Al termine del raffreddamento le cellule sono state lisate mediante l'uso di un sonicatore. Le onde vibrazionali prodotte dal sonicatore colpiscono le cellule batteriche e causano la rottura del doppio strato fosfolipidico delle membrane cellulari; durante la sonicazione, quindi, vengono rilasciati in soluzione frammenti di membrana, acidi nucleici e proteine. Il DNA, che avrebbe potuto interferire con i successivi passaggi, è stato eliminato mediante un trattamento con DN*asi* I, mentre i corpi d'inclusione, ossia gli aggregati contenenti parte delle proteine ricombinanti denaturate, sono stati recuperati per centrifugazione. Le frazioni solubile ed insolubile così ottenute sono state analizzate mediante SDS-PAGE. Nel gel realizzato con il 12% di poliacrilammide sono stati caricati gli estratti proteici delle due colture cellulari relative all'espressione di ADA ed HOA, mettendo a confronto i supernatanti ed i pellets ottenuti dopo centrifugazione (fig. 45).

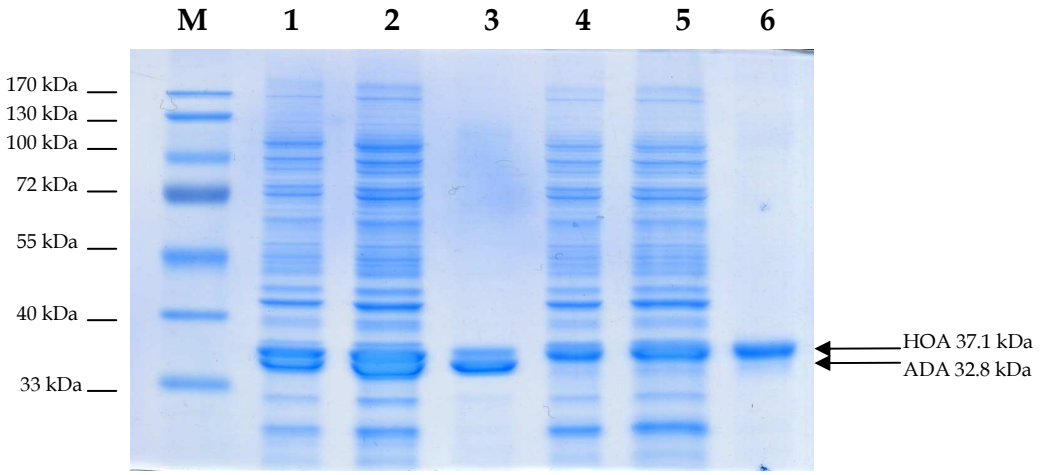


Figura 45: *Analisi su gel di poliacrilammide al 12% dell'espressione dell'enzima bifunzionale ADA-HOA. M) Markers di peso molecolare Prestained Protein Ladder; 1), 2), 3) Overespressione dei geni pheFG da E. coli BL21(DE3) esprimenti il plasmide pET-FG-Nde, rispettivamente 5 µg e 10 µg del supernatante e il pellet in quantità pari ad un OD_{600} di 0,02; 4), 5), 6) Overespressione dei geni pheFG da E. coli BL21(DE3) esprimenti il plasmide pET-FG-Nco, rispettivamente 5 µg e 10 µg del supernatante e il pellet in quantità pari ad un OD_{600} di 0,02.*

L'analisi del gel mette in evidenza che le proteine d'interesse, la Deidrogenasi ADA di 32,8 kDa e l'Aldolasi HOA di 37,1 kDa, precipitano abbondantemente nei corpi d'inclusione sebbene una notevole quantità sia presente nel supernatante a rappresentare la porzione solubile liberata con la sonicazione. Inoltre la presenza del peptide segnale a monte di ADA ed HOA, espresse dal plasmide pET-FG-Nco/B, non aiuta ad aumentare la porzione solubile delle proteine anzi, sembra che interferisca con l'espressione della deidrogenasi ADA: sia nel supernatante che nel pellet si può osservare una netta prevalenza della aldolasi HOA (fig. 45, *lanes* 4, 5 e 6).

Per quanto riguarda le proteine ADA ed HOA espresse dal plasmide pET-FG-Nde/B, sono entrambe presenti nel supernatante mentre nel pellet è maggiormente rappresentata ADA (fig. 45, *lanes* 1, 2 e 3)

3.8 Purificazione dei corpi d'inclusione e rinaturazione delle proteine ricombinanti

Le proteine ADA ed HOA espresse in *E.* coli si trovano principalmente in forma inattiva in aggregati insolubili noti come corpi di inclusione. È stato messo a punto un protocollo che prevede la loro solubilizzazione e rinaturazione (sezione 2.17 di Materiali e Metodi). Il processo prevede che i corpi di inclusione, formatesi dopo la sonicazione, siano risospesi in un tampone sodio fosfato a pH 7.5, successivamente lavati in H_2O ed infine trattati con urea, un agente caotropico che permette l'efficace solubilizzazione delle proteine legate alle membrane e di quelle associate aspecificamente ai corpi d'inclusione. Dal campione in urea è stato poi recuperato per centrifugazione il supernatante, contenente le proteine solubilizzate. Questo campione proteico è stato sottoposto a passaggi di dialisi contro un tampone di rinaturazione composto da MOPS 100 mM a pH 7,5, $MgCl_2$ 0,5 mM, $MnCl_2$ 0,5 mM, DTT 1 mM e glicerolo 10% (v/v) e successivamente contro un tampone di sodio fosfato 50 mM a pH 7,5 e glicerolo 10% (v/v). L'analisi elettroforetica di aliquote dei campioni prelevate ai vari passaggi del processo di purificazione e rinaturazione sono mostrate nelle figure 35 a, b.

L'elevata concentrazione di urea utilizzata (8 M) ha consentito la solubilizzazione di una buona parte delle proteine d'interesse anche se una certa quantità del campione risulta comunque insolubile. In particolare, l'analisi su gel di poliacrilammide evidenzia che dai corpi d'inclusione derivanti dall'espressione del plasmide pET-FG-Nco/B, buona parte di HOA (37,1 kDa) viene solubilizzata dal trattamento con urea mentre ADA (32,8 kDa) permane nello stato insolubile (fig. 46 a, *lane* 6; 46 b, *lane 8*).

Le proteine ADA ed HOA espresse a partire dal plasmide pET-FG-Nde/B vengono solubilizzate dall'urea nella stessa percentuale, ma rimangono in abbondanza i forma insolubile nei corpi di inclusione (fig. 46 b, *lane* 7).

La fase successiva prevede una caratterizzazione funzionale delle proteine di nostro interesse attraverso la realizzazione di saggi di attività enzimatica condotti sia sulla frazione solubile recuperata dopo sonicazione che sulle proteine solubilizzate e rinaturate dai corpi d'inclusione.

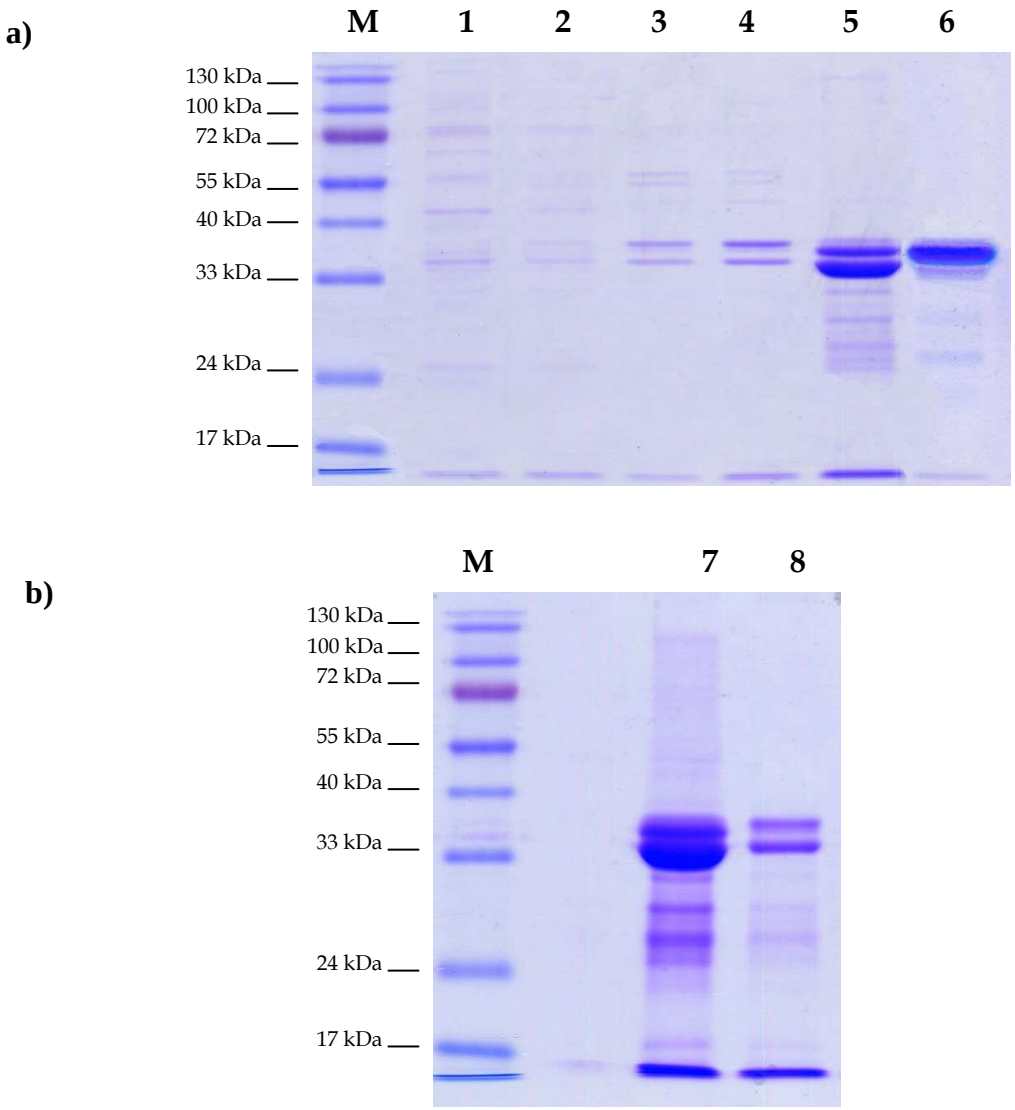


Figure 46: *Analisi su gel di poliacrilammide al 15% dei campioni prelevati alle varie tappe del processo di purificazione dei corpi d'inclusione.*
M) Markers di peso molecolare Prestained Protein Ladder
1, 3, 5 e 7) Campioni da BL21(DE3) esprimenti il plasmide pET-FG-Nde/B
2, 4, 6 e 8) Campioni da BL21(DE3) esprimenti il plasmide pET-FG-Nco/B.
a: *1, 2) Supernatante recuperato dopo risospensione del pellet cellulare in tampone sodio fosfato pH 7,5*
3, 4) Supernatante relativo al lavaggio in H_2O
5, 6) Proteine solubilizzate dopo trattamento con urea 8M.
b: *7, 8) Proteine non solubilizzate dopo trattamento con urea 8M*

3.9 Saggi di attività enzimatica per testare l'attività della deidrogenasi ADA

Gli enzimi ADA ed HOA si associano a formare un complesso grazie al quale l'acetaldeide, prodotta dall'aldolasi HOA e tossica per la cellula, viene direttamente incanalata verso il sito attivo della deidrogenasi ADA. Studi di attività enzimatica condotti sulle proteine omologhe di *Pseudomonas* sp. CF600, chiariscono che i due enzimi sono attivi soltanto se associati a formare un complesso bifunzionale. In particolare sembra che HOA possa svolgere la sua attività enzimatica solo se complessata ad ADA, mentre bassi livelli di attività possono essere registrati anche se ADA viene espressa in assenza della sua controparte.

A causa della difficoltà legata alla sintesi del substrato di HOA, necessario per lo studio della sua attività e per investigare la possibilità del *channeling* tra i due enzimi, durante questo lavoro di tesi l'attenzione è stata concentrata su ADA ed in particolare sulla messa a punto di condizioni che permettano di saggiare la sua attività a partire da un campione proteico molto complesso quale un estratto totale da *E. coli* ricombinante. L'uso di enzimi non purificati rende particolarmente difficile stabilire quali siano le quantità ottimali di estratto proteico e dei cofattori da usare nel saggio.

Sono stati realizzati una serie di saggi che hanno permesso una prima valutazione della Km per l'acetaldeide che si può definire *approssimativa* dato che non sono stati condotti saggi sull'enzima purificato ma sull'estratto proteico totale di un ceppo di *E. coli* esprimente l'enzima d'interesse.

Risulta chiaro che, in assenza di test relativi ad HOA, questi dati non permettono di dimostrare il corretto assemblaggio e funzionamento del complesso enzimatico bifunzionale ADA-HOA ricombinante.

Studi condotti sulle proteine omologhe di *E. coli* K12, hanno messo in evidenza che la deidrogenasi ADA (MphF) funziona come una proteina *chaperon* per il corretto *folding* della aldolasi HOA (MphE). Sembra che l'espressione delle due proteine sia unita ad un meccanismo che previene un eccesso di produzione di MphE, che non può assumere la sua conformazione nativa in assenza di MphF.

Quanto riportato per le proteine MphF e MphE di *E. coli* K12 ed il valore di Km registrato nei nostri saggi, molto simile alla Km per l'acetaldeide trovata per ADA *wilde-type* di *Pseudomonas* CF600, può far ipotizzare che l'aldolasi HOA sia presente nei nostri campioni e possa formare un complesso con ADA funzionalmente attivo. Se così non fosse avremmo probabilmente riportato per ADA un'attività enzimatica molto più bassa, indice

dell'assenza o dell'inattività di HOA.

Prove di attività enzimatica sono state eseguite sia sui campioni proteici derivanti dalla purificazione dei corpi d'inclusione sia sui supernatanti recuperati subito dopo il frazionamento delle cellule che esprimono i costrutti con e senza il peptide segnale.

È stata registrata una scarsa attività enzimatica sia per le proteine rinaturate dai corpi d'inclusione che per quelle presenti nel supernatante relative al campione da BL21(DE3) esprimente il plasmide pET-FG-Nco/B, mentre una buona attività della deidrogenasi ADA è stata riscontrata nel supernatante del campione da BL21(DE3) esprimente il plasmide pET-FG-Nde/B: si è allora scelto di utilizzare quest'ultimo campione per l'esecuzione di una serie di saggi di attività enzimatica volti a determinare le costanti cinetiche, K_M e V_{max}, di ADA. Le reazioni sono state monitorate a 340 nm misurando la quantità di NADH che si produce dalla riduzione del NAD^+ e che equivale alla quantità di substrato che l'enzima consuma. In questi saggi sono state mantenute costanti le concentrazioni di βNAD^+ e CoA ed è stata variata la concentrazione del substrato acetaldeide. I valori di assorbanza/minuto (ΔA_{340}/minuto), ottenuti dalle varie prove, sono stati convertiti in μM/minuto usando la relazione indicata nella sezione 2.19.2 di Materiali e Metodi ed i dati ottenuti sono stati riportati in un grafico, mostrato in figura 47, che descrive un'iperbole equilatera secondo l'equazione di Michaelis-Menten.

Poiché l'equazione suddetta per il calcolo delle costanti cinetiche, K_M e V_{max} non fornisce valori precisi per alte concentrazioni di substrato, si è fatto uso di una trasformazione lineare dell'equazione di Michaelis-Menten, definita dall'equazione di Hanes. È stato così costruito il grafico mostrato in figura 48 che ci ha permesso di definire una K_M di ADA per l'Acetaldeide pari a 37.6 mM, per intersezione della retta con l'asse delle ascisse, ed una V_{max} pari a 21.15 μM/minuto, ottenuta sapendo che l'intercetta con l'asse delle ordinate, che vale 1.78, è pari a K_M/V_{max}.

Sono in corso ulteriori saggi per la determinazione della K_M dell'enzima in relazione ai cofattori NAD^+ e CoA, allo scopo di definire con precisione il meccanismo cinetico della deidrogenasi.

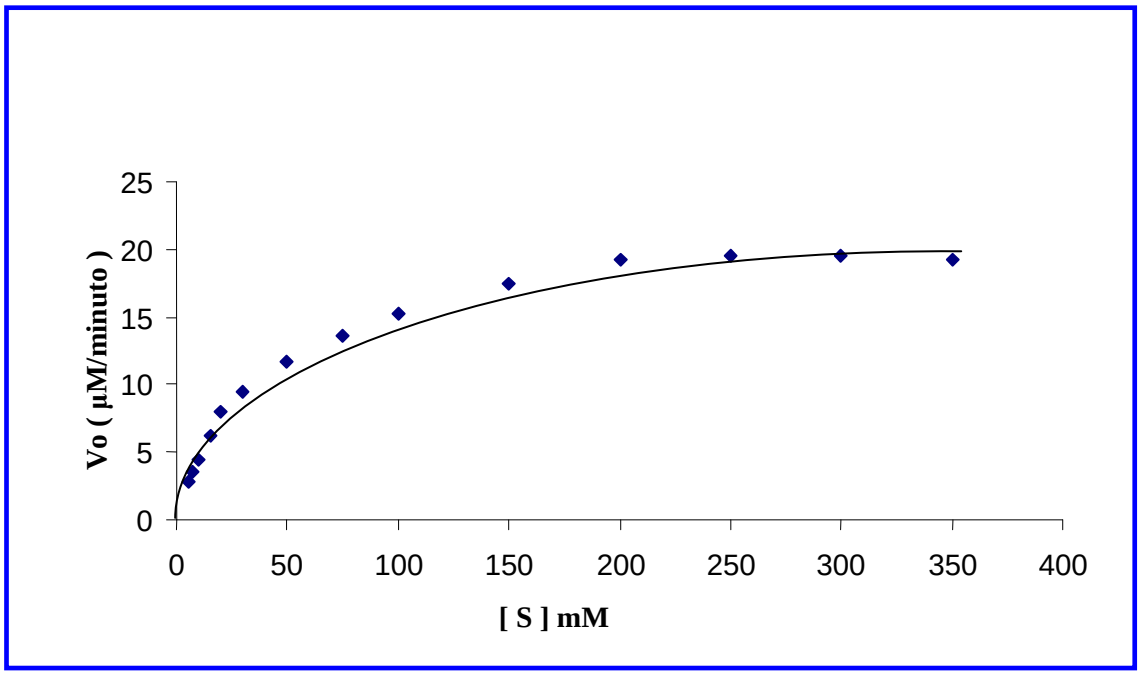


Figura 47: *Curva di Michaelis-Menten. Effetto della concentrazione del substrato Acetaldeide sulla velocità iniziale della reazione catalizzata da ADA. La curva è stata ottenuta eseguendo saggi con 1,25 µg di estratto proteico totale, 1,425 mM di βNAD$^+$, 0,5 mM di Coenzima A (CoA), 50 mM di sodio fosfato buffer a pH 7,5 e con concentrazioni crescenti di acetaldeide comprese tra 5 mM e 350 mM.*

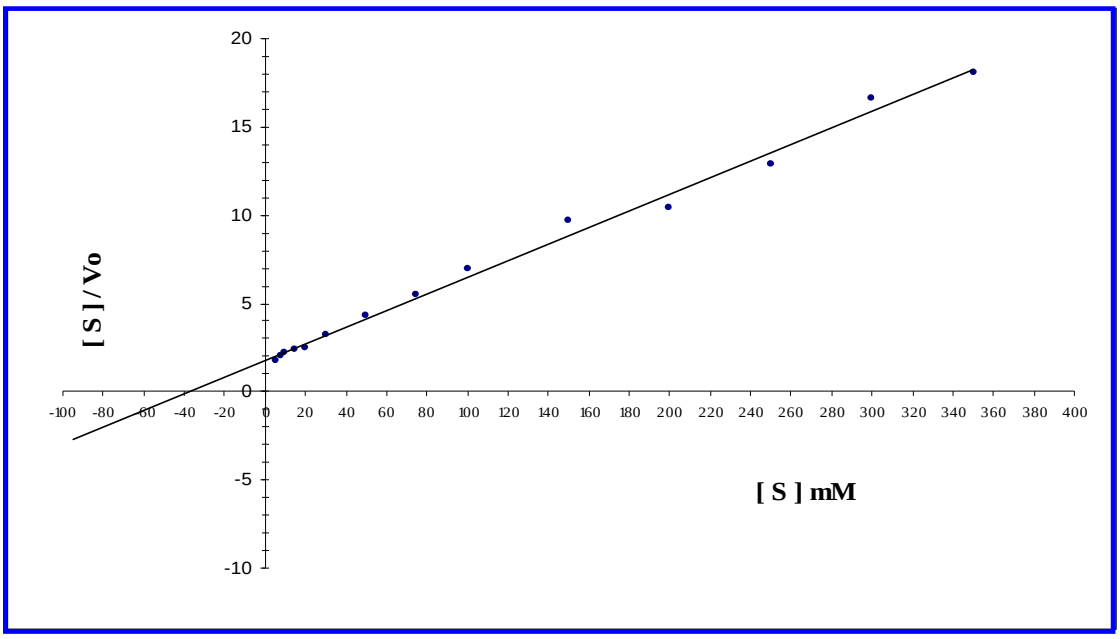


Figura 48: *Grafico lineare di Hanes per il calcolo dei parametri cinetici K_M e V_{max} della Deidrogenasi ADA rispetto al substrato acetaldeide. Il grafico è stato realizzato con i dati precedentemente utilizzati per la costruzione della curva di Michaelis-Menten.*
X intercetta quando Y=0 : -37,6 questo valore definisce la Km
Y intercetta quando X=0 : 1,78 questo valore corrisponde a Km/Vmax

PARTE II

L'operone xyl-like di Pseudomonas sp. OX1 per il catabolismo di m- e p-xilene

Pseudomonas sp. OX1 non è capace di utilizzare *m*- e *p*-xilene come fonte di carbonio ed energia. A partire da questi due isomeri dello xilene, le monoossigenasi ToMO e PH catalizzano la progressiva ossidazione dell'anello aromatico per dare 3,5- e 3,6-dimetilcatecoli che non vengono metabolizzati dalla C2,3O risultando tossici per la cellula. Ciononostante, *Pseudomonas* sp. OX1 conserva nel suo cromosoma i geni per il catabolismo di *m*- e *p*-xilene omologhi ai geni *xyl* del plasmide TOL di *Pseudomonas putida* mt-2, un ceppo che normalmente utilizza questi composti come substrati di crescita. In ambienti contaminati dai due isomeri dello xilene sono stati isolati mutanti spontanei di *Pseudomonas* sp. OX1 in grado di attaccare tali composti ma non l'*o*-xilene: il catabolismo procede mediante il TOL *pathway* attraverso la progressiva ossidazione del gruppo metilico che porta a metilcatecoli non letali. Si ritiene che i geni *xyl-like* di *Pseudomonas* sp. OX1 siano stati acquisiti in seguito a trasferimento di un trasposone catabolico: nel ceppo *wild-type* tale operone è inattivato da una sequenza di inserzione impedendo la crescita su *m*- e *p*-xilene. Sono stati isolati mutanti spontanei in cui la sequenza di inserzione traspone nel locus codificante ToMO bloccando l'utilizzo dell' *o*-xilene permettendo invece la crescita su *m*- e *p*-xilene (Bolognese *et al.*, 1999).

3.10 Isolamento dei geni xyl-likeQK, subclonaggio nel vettore plasmidico pGEM-T Easy e sequenziamento

Nel laboratorio in cui ho svolto il mio dottorato di ricerca, la caratterizzazione genetica dell'operone *xyl-like* di *Pseudomonas* sp. OX1, codificante gli enzimi omologhi a quelli coinvolti nelle reazioni del *lower-meta pathway* di *Pseudomonas putida* mt-2, era già stata intrapresa. In particolare, sono stati isolati gli ultimi due geni del *pathway* catabolico, *xyl-likeHI,* codificanti la decarbossilasi 4OD e l'isomerasi 4OI coinvolte nell'*oxalocrotonato branch* (fig.12, pag. 24 Introduzione).

La sequenza dei geni *xyl-likeHI* è stata allineata a quella dei geni *pheHI* noti: è stato così individuato il 94% di identità di sequenza relativamente ai geni codificanti la decarbossilasi 4OD e l'83% di identità tra i geni codificanti l'isomerasi 4OI. L'allineamento ha messo in evidenza una regione di minore similitudine al 5' dei geni *pheI* e *xyl-likeI:* sulla base della sequenza di questa regione è stato progettato un primer reverse per amplificare la coppia genica *xyl-likeQK* codificante gli enzimi ADA ed HOA. Il primer così progettato è stato chiamato g4ODrev: esso è stato utilizzato insieme al primer forward OEH1, già a nostra disposizione per il sequenziamento dei geni *phe*, per amplificare il frammento comprendente i geni *xyl-likeQK* dal DNA genomico di *P*. sp. OX1 (sezione 2.15 di Materiali e Metodi).

Per essere certi che il primer g4ODrev amplificasse specificamente solo i geni *xyl-like* di interesse, sono state realizzate delle reazioni di PCR a confronto utilizzando sia il DNA genomico di *P*. sp. OX1 che il cosmide pFB3411 come stampo. La coppia di primers OEH1/g4ODrev, usata per isolare i geni *xyl-likeQK,* produce l'amplificato d'interesse soltanto quando il DNA genomico è usato come stampo; invece, in presenza del cosmide pFB3411 non viene prodotto l'amplificato d'interesse. La coppia di primers OEH1/HOArev, usati per l'isolamento dei geni *pheFG,* produce lo stesso amplificato sia dal DNA genomico che dal cosmide pFB3411. Poiché nel cosmide pFB3411 è contenuto l'intero operone *phe* la mancanza dell'amplificato che si osserva usando i primers OEH1/g4ODrev fa ritenere che essi permettano di isolare specificatamente dal DNA genomico i geni *xyl-likeQK* e non gli omologhi *pheFG* (fig. 49).

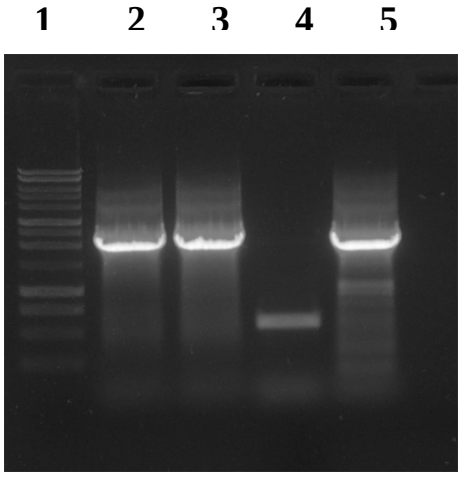


Figura 49: *PCR per verificare la specificità del primer g4ODrev.*
1) Markers 1kb DNA ladder; la coppia OEH1/HOArev da lo stesso amplificato su pFB3411 (2) e su DNA genomico (3); la coppia OEH1/g4ODrev non da l'amplificato di interesse su pFB3411 (4) ma solo su DNA genomico (5).

Il prodotto di amplificazione ottenuto dal DNA genomico usando la coppia di primers OEH1/g4ODrev è stato subclonato nel vettore plasmidico pGEM-T Easy (fig. 50).

Il plasmide ricombinante ottenuto, denominato pQK, è stato sottoposto ad analisi di sequenza utilizzando i primers universali T7 e SP6 che hanno consentito di identificare, il primo, 331 bp al 3' del gene *hoa*, il secondo 307 bp al 5' del gene *ada*. Il primer ADA1, utilizzato per il sequenziamento dell'operone *phe* clonato nel cosmide, è interno alla sequenza ottenuta con il primer SP6: esso ha permesso di estendere la lettura in direzione 5'→3' per 538 bp, mentre il primer ADA2 ha consentito un'estensione di 524 bp arrivando ad individuare il codone di stop di *ada*, completandone la sequenza, e l'ATG di *hoa*. Il primer HOAfor ha permesso di leggere 257 basi, estendendo la sequenza del gene *hoa* in direzione 5'→3'. Il primer HOAfor2, infine, ha consentito di aggiungere altri 218 nucleotidi sovrapponendoci così alla sequenza ottenuta con il primer T7. In questo modo è stata completata la sequenza del frammento clonato nel plasmide pQK, per un totale di 1977 bp (fig. 51).

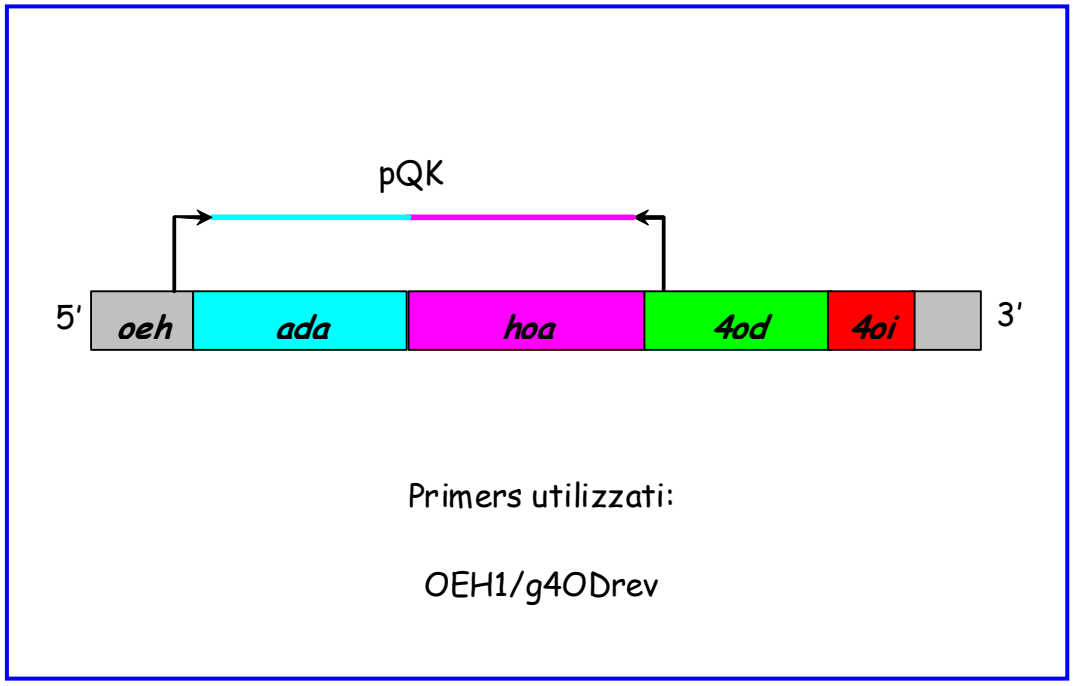


Figura 50. *Rappresentazione schematica del subclonaggio dei geni xyl-likeQK di P. sp.* OXI *in pGEM-T Easy.*

1 60
ATGAGCAAGAAACTGAAAGCGGCGATTATCGGCCCGGGCAACATCGGCACGGACCTGGTG
61 120
ATGAAGATGCTGCGCTCCGAATGGATCGAGCCGGTCTGGATGGTCGGCATCGACCCCAAC
121 180
TCCGATGGCCTCAAGCGCGCCCGCGAGTTCGGCCTGAAGACCACCGCCGAAGGCGTCGAC
181 240
GGCCTGCTGCCGCACGTGCTCGACGACGACATCCGCATCGCCTTCGATGCCACCTCCGCC
241 300
TATGTACATGCCGAGAACAGCCGCAAGCTCAACGAGCTGGGCGTGCTGATGGTCGACCTG
301 360
ACCCCGGCCGCCATCGGCCCGTACTGCGTGCCGCCGGTAAACCTCAAGCAGCACGTCGGC
361 420
ACGCTGGAAATGAACGTCAACATGGTCACCTGTGGTGGCCAGGCCACCATCCCGATGGTC
421 480
GCCGCGGTATCGCGCGTGCAGCCGGTGGCCTACGGCGAGATCGTCGCCACCGTGTCCTCG
481 540
CGCTCCATCGGCCCGGGCACCCGCAAGAACATCGACGAGTTCACCCGCACCACGGCCGGC
541 600
GCCATCGAGCAGGTCGGCGGGGCCAAGGAAGGCAAGGCGATCATCGTCGTCAACCCGGCC
601 660
GAGCCGCCGCTGATGATGCGCGACACCATCCACTGTCTGACCGAAACCGAGCCGGACCAG
661 720
GATGCGATCACCGCATCGGTCCACGCGATGATCGCCGAGGTGCAGAAGTACGTGCCCGGC
721 780
TACCGGCTGAAGAATGGCCCGGTATTCGACGGCAACCGCGTCTCGATCTTCATGGAGGTC
781 840
GAGGGCCTGGGCGACTACCTGCCCAAGTACGCCGGCAACCTCGACATCATGACCGCCGCC
841 900
GCGCTGCGCACCGGCGAGATGTTCGCCGAGGAAATCGCCAGCGGCACCATTCAACTGCCA
901 960
CGTCGTGAAGCGGCACTGGCC**TAA**AGGAGTCGCGCC**ATG**AATCTGCAAGGCAAGAACGTC
961 1020
ACCCTGCACGACATGAGCCTGCGCGACGGCATGCACGCCAAGCGCCACCAGATCAGCCTC
1021 1080
GAGCAGATGATCGCGGTCGCCACCGGCCTCGACGCCGCCGGCATGCCGCTGATCGAGATC
1081 1140
ACCCACGGCGACGGCCTCGGCGGTCGCTCGATCAACTACGGTTTCCCCGCGCACAGCGAC
1141 1200
GAGGAATACCTGCGTGCGGTGATCCCGCGCCTCAAGCAGGCCAAGGTATCCGCCCTGCTG
1201 1260
CTGCCGGGCATCGGCACGGTCGACCACCTGAAGGTGGCGCTCGACTGTGGCGTCTCCACC
1261 1320
ATTCGTGTGGCCACGCATTGCACCGAGGCCGACGTCTCCGAACAGCACATCGGCATGTCG
1321 1380
CGCAAGCTGGGCGCCGATACCGTCGGCTTTCTGATGATGGCGCACATGATCAGCGCGGAA
1381 1440
AAAGTGCTCGAACAGGCCAGGCTGATGGAAAGCTACGGCGCCAACTGCATCTACTGCACC
1441 1500
GACTCGGCCGGCTACATGCTGCCCGATGAGGTCAGCGAGAAGATCGGCCTGCTGCGCGCC
1501 1560
GAGCTGAACCCCGCCACCGAGATCGGCTTCCACGGCCACCACAACATGGGCATGGCCATC
1561 1620
GCCAACTCGCTGGCCGCCATCGAAGCTGGCGCCTCGCGTATCGACGGCTCGGTCGCCGGC
1621 1680
CTCGGCGCCGGTGCCGGCAACACCCCGCTGGAAGTCTTCGTCGCGGTGTGCAAGCGCATG
1681 1740
GGCGTGGAAACCGGCATCGACCTCTACAAGATCATGGATGTGGCCGAAGACATCGTCGTG
1741 1800
CCAATGATGGACCAGCCGATTCGCGTCGACCGCGATGCGCTGACCCTGGGCTATGCCGGG
1801 1860
GTGTACAGCTCGTTCCTGTTGTTTGCCCAGCGCGCCGAGAAGAAATACGGCGTACCGGCC
1861 1920
CGCGACATTCTGGTCGAGCTGGGCCGCCGCGGCACCGTCGGTGGCCAGGAAGACATGATC
1921 1977
GAAGACCTCGCCCTGGATATGTCCCGGGCCCGCCAGAACCAGAAGGTGAGCGCA**TGA**

Figura 51. *Sequenza nucleotidica dei geni xyl-likeQK, codificanti gli enzimi ADA (in celeste) e HOA (in fucsia). Sottolineati i siti di inizio e fine della trascrizione.*

3.11 Studi di omologia

Un'analisi più approfondita delle sequenze dei geni *pheFG e xyl-likeQK* è stata realizzata mediante l'uso di programmi disponibili in internet. In particolare si è voluta verificare la percentuale nell'identità di sequenza esistente tra i geni studiati di *Pseudomonas* sp. OX1 e i geni omologhi da specie diverse di *Pseudomonas.*

Gli allineamenti tra due o più sequenze sono stati realizzati con l'ausilio di programmi quali:

- *Gene Stream Align*

  disponibile all'indirizzo internet http://xylian.igh.cnrs.fr/

- *Clustal W*

  disponibile all'indirizzo internet http://www.expasy.org

Gli allineamenti sono stati ottimizzati automaticamente mediante l'introduzione di "*gaps*" nelle sequenze: sono state messe in evidenza, così, le regioni in cui la sequenza nucleotidica è maggiormente conservata e quelle in cui le basi differiscono tra le varie specie analizzate.

In particolare, l'allineamento tra la sequenza dei geni *xyl-likeQK* con i geni *pheFG* corrispondenti mostra il 99% di identità sia fra i geni codificanti ADA che fra i geni codificanti HOA.

Inoltre è stato ricercato il livello di identità di sequenza tra i geni *phe* e *xyl-like* con i geni corrispondenti da altre specie di *Pseudomonas* fra cui: *Pseudomonas* sp. CF600 (operone *dmp* per il catabolismo del fenolo/dimetilfenolo nel plasmide pVI150), *Pseudomonas putida* mt-2 (operone *xyl* per il catabolismo di *m*- e *p*-xilene nel plasmide TOL pWW0), *Pseudomonas putida* HS1 (operone *xyl* per il catabolismo di *m*- e *p*-xilene nel plasmide TOL pDK1), *Pseudomonas* sp. S-47 (operone *xyl* per la degradazione del 4-clorobenzoato) e *Pseudomonas stutzeri* AN10 (operone *nah* per il catabolismo del naftalene) (Tab. 3).

ada	CF600	mt-2	HS1	S-47	OX1 *dmp-like*	OX1 *xyl-like*
AN10	66	64	66	99	97	98
OX1 *xyl-like*	67	64	66	97	99	
OX1 *dmp-like*	66	64	66	97		
S-47	66	64	66			
HS1	86	91				
mt-2	85					

hoa	CF600	mt-2	HS1	S-47	OX1 *dmp-like*	OX1 *xyl-like*
AN10	65	62	63	96	98	98
OX1 *xyl-like*	65	62	63	96	99	
OX1 *dmp-like*	64	62	63	96		
S-47	64	63	63			
HS1	80	92				
mt-2	81					

Tabella 3. *Le tabelle di identità nucleotidica: indicano le percentuali di identità fra le sequenze dei geni ada ed hoa da specie diverse di Pseudomonas. In rosso sono cerchiati i valori che indicano l'omologia tra i geni phe e xyl-like di P. sp. OX1.*

La traduzione delle sequenze dei geni *xyl-likeQK* è stata effettuata utilizzando il programma *Traslate* disponibile al sito internet http://www.expasy.org. Allo stesso indirizzo internet, il programma *ProtParam* ha permesso l'analisi della struttura primaria delle proteine ADA ed HOA, definendo caratteristiche chimico-fisiche come pI, coefficiente di estinzione molare…

L'analisi della sequenza nucleotidica del gene *xyl-likeQ*, codificante ADA, rivela una ORF che codifica per una putativa proteina di 307 amminoacidi, con un peso molecolare di 32,9 KDa ed un teorico pI di 5,25. L'analisi effettuata sulla sequenza del gene *xyl-likeK*, codificante HOA, rivela una ORF di 346 residui amminoacidici, con un peso molecolare di 37,1 KDa ed un teorico pI di 5,54. (Fig. 52).

ADA

M S K K L K A A I I G P G N I G T D L V **M** K **M** L R S E W I E P V W **M** V G I D
P N S D G L K R A R E F G L K T T A E G V D G L L P H V L D D D I R I A F D
A T S A Y V H A E N S R K L N E L G V L **M** V D L T P A A I G P Y C V P P V N
L K Q H V G T L E **M** N V N **M** V T C G G Q A T I P **M** V A A V S R V Q P V A Y G
E I V A T V S S R S I G P G T R K N I D E F T R T T A G A I E Q V G G A K E
G K A I I V V N P A E P P L **M** **M** R D T I H C L T E T E P D Q D A I T A S V H
A **M** I A E V Q K Y V P G Y R L K N G P V F D G N R V S I F **M** E V E G L G D Y
L P K Y A G N L D I **M** T A A A L R T G E **M** F A E E I A S G T I Q L P R R E A
A L A **Stop**

HOA

M N L Q G K N V T L H D **M** S L R D G **M** H A K R H Q I S L E Q **M** I A V A T G L
D A A G **M** P L I E I T H G D G L G G R S I N Y G F P A H S D E E Y L R A V I
P R L K Q A K V S A L L L P G I G T V D H L K V A L D C G V S T I R V A T H
C T E A D V S E Q H I G **M** S R K L G A D T V G F L **M** **M** A H **M** I S A E K V L E
Q A R L **M** E S Y G A N C I Y C T D S A G Y **M** L P D E V S E K I G L L R A E L
N P A T E I G F H G H H N **M** G **M** A I A N S L A A I E A G A S R I D G S V A G
L G A G A G N T P L E V F V A V C K R **M** G V E T G I D L Y K I **M** D V A E D I
V V P **M** **M** D Q P I R V D R D A L T L G Y A G V Y S S F L L F A Q R A E K K Y
G V P A R D I L V E L G R R G T V G G Q E D **M** I E D L A L D **M** S R A R Q N Q
K V S A **Stop**

Figura 52: *Putativa sequenza amminoacidica delle proteine ADA e HOA xyl-like da P. sp. OX1.*

Come fatto precedentemente per le sequenze nucleotidiche, è stato interessante procedere all'allineamento delle sequenze amminoacidiche relative alle proteine ADA e HOA xyl-like. Le percentuali di identità delle sequenze proteiche sono riportate nelle tabelle in figura 53.

SeqA	Name	Len(aa)	SeqB	Name	Len(aa)	Score
1	CF600	312	2	pWW0	312	89
1	CF600	312	3	pDK1	312	89
1	CF600	312	4	sp.S-47	307	58
1	CF600	312	5	AN10	307	58
1	CF600	312	6	ADApheOX1	307	58
1	CF600	312	7	ADAxyl-likeOX1	307	58
2	pWW0	312	3	pDK1	312	95
2	pWW0	312	4	sp.S-47	307	58
2	pWW0	312	5	AN10	307	58
2	pWW0	312	6	ADApheOX1	307	58
2	pWW0	312	7	ADAxyl-likeOX1	307	58
3	pDK1	312	4	sp.S-47	307	58
3	pDK1	312	5	AN10	307	58
3	pDK1	312	6	ADApheOX1	307	58
3	pDK1	312	7	ADAxyl-likeOX1	307	58
4	sp.S-47	307	5	AN10	307	99
4	sp.S-47	307	6	ADApheOX1	307	99
4	sp.S-47	307	7	ADAxyl-likeOX1	307	98
5	AN10	307	6	ADApheOX1	307	99
5	AN10	307	7	ADAxyl-likeOX1	307	99
6	ADApheOX1	307	7	ADAxyl-likeOX1	307	99

SeqA	Name	Len(aa)	SeqB	Name	Len(aa)	Score
1	CF600	345	2	pWW0	345	87
1	CF600	345	3	pDK1	348	83
1	CF600	345	4	sp.S-47	346	53
1	CF600	345	5	AN10	346	53
1	CF600	345	6	HOApheOX1	346	53
1	CF600	345	7	HOAxyl-likeOX1	346	53
2	pWW0	345	3	pDK1	348	92
2	pWW0	345	4	sp.S-47	346	55
2	pWW0	345	5	AN10	346	55
2	pWW0	345	6	HOApheOX1	346	55
2	pWW0	345	7	HOAxyl-likeOX1	346	55
3	pDK1	348	4	sp.S-47	346	52
3	pDK1	348	5	AN10	346	52
3	pDK1	348	6	HOApheOX1	346	52
3	pDK1	348	7	HOAxyl-likeOX1	346	52
4	sp.S-47	346	5	AN10	346	99
4	sp.S-47	346	6	HOApheOX1	346	99
4	sp.S-47	346	7	HOAxyl-likeOX1	346	99
5	AN10	346	6	HOApheOX1	346	99
5	AN10	346	7	HOAxyl-likeOX1	346	99
6	HOApheOX1	346	7	HOAxyl-likeOX1	346	99

Figura 53: *Identità di sequenza amminoacidica (%) delle proteine ADA e HOA.*
In rosso le percentuali di identità delle proteine ADA ed HOA di P. sp. OX1 e di P. sp. CF600.

Il maggiore livello di similitudine si nota tra le sequenze proteiche di ADA ed HOA di *P.* sp. OX1 e le proteine omologhe di *P. stutzeri* AN10 (99%) e *P*. sp. S-47 (99%).

Una minore ma significativa identità di sequenza è presente tra le proteine ADA e HOA di *P.* sp. OX1 e le omologhe di *P*. sp. CF600 (in rosso nelle tabelle in figura 19), di cui è nota la struttura tridimensionale determinata mediante cristallografia ai raggi X (Manjasetty *et al.* 2003).

3.12 "Modeling" molecolare

La struttura tridimensionale dell'enzima bifunzionale Deidrogenasi/Aldolasi (DmpFG) di *Pseudomonas* sp. CF600 determinata mediante cristallografia ai raggi X, disponibile in internet nella banca dati PDB (Code n. 1NVM), è stata utilizzata come stampo per costruire un modello dell'enzima ADA-HOA xyl-like di *P.* sp. OX1.

Un preliminare allineamento delle sequenze amminoacidiche tra le proteine ADA e HOA e le proteine omologhe cristallizzate da *P*. sp. CF600, ha messo in evidenza rispettivamente un'identità del 58% e del 53% tale da consentire uno studio di *homolgy modeling* (fig. 53) (Caruso *et al.*, non pubblicato).

L'enzima bifunzionale DmpFG catalizza gli steps finali del *meta cleavage pathway* per la degradazione dei (metil)-fenoli in *P*. sp. CF600. La 4-Idrossi-2-Chetovalerato Aldolasi (HOA), prodotto del gene *dmpG* e l'Acetaldeide Deidrogenasi (ADA) codificata dal gene *dmpF,* convertono il 4-idrossi-2-chetovalerato in piruvato ed acetil-CoA attraverso l'intermedio acetaldeide. Studi di accessibilità del solvente hanno rivelato la presenza di un canale che collega i siti attivi di DmpG e DmpF. I residui amminoacidici che delimitano questo tunnel sono principalmente idrofobici e creano un ambiente non reattivo attraverso il quale l'acetaldeide passa direttamente tra i siti attivi dei due enzimi.

L'enzima bifunzionale ADA/HOA si presenta, in forma attiva, come un tetrametro di 140 kDa costituito da due eterodimeri DmpFG. In particolare, due tetrameri si assemblano a formare l'unità asimmetrica del cristallo ortorombico. Quindi otto catene polipeptidiche (A-H) sono presenti nell'unità asimmetrica del cristallo. Le catene ACEG e BDFH rappresentano rispettivamente i protomeri DmpG e DmpF.

Le subunità DmpG di ogni eterodimero formano il core dell'enzima, mentre le subunità DmpF sono localizzate all'estremità della struttura tetramerica (fig. 54).

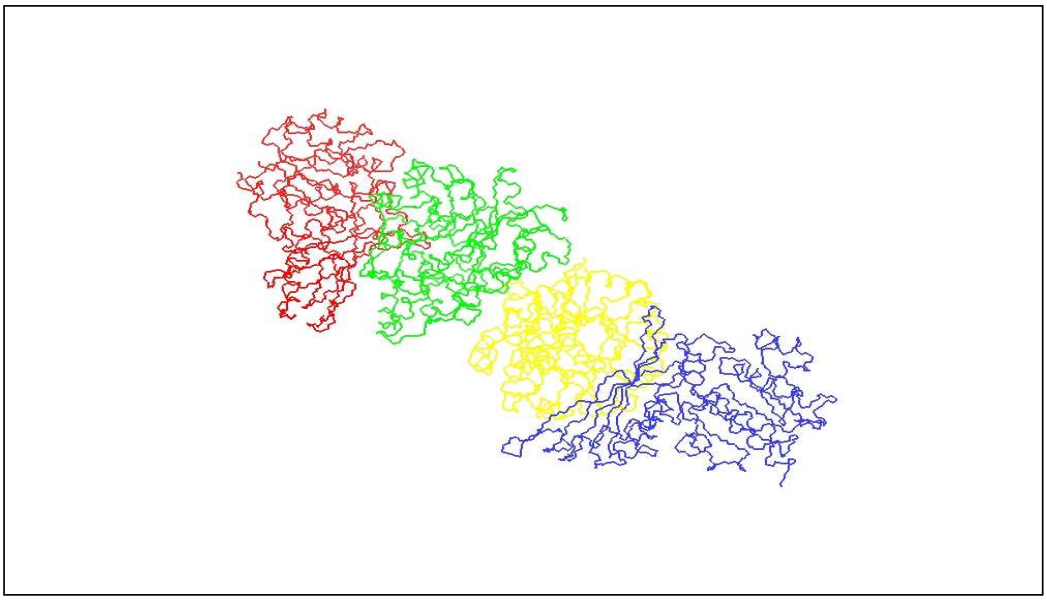


Figura 54: *Organizzazione tetramerica dell'enzima bifunzionale DmpFG di P. sp.* CF600. *Gli eterodimeri DmpG sono indicati in verde e in giallo. Gli eterodimeri DmpF, localizzati all'estremità della struttura tetramerica sono indicati in rosso e in blu.*

Lo studio di *homology modeling* è iniziato allineando le sequenze amminoacidiche dedotte per le proteine ADA ed HOA xyl-like con le sequenze delle catene polipeptidiche omologhe di *P.* CF600.

Gli allineamenti sono stati ottimizzati automaticamente mediante l'introduzione di "*gaps*" nelle sequenze: sono state messe in evidenza, così, le regioni in cui la sequenza nucleotidica è maggiormente conservata e quelle in cui le basi differiscono (fig. 55 a,b).

```
Cat.H              ---LKVAIIGSGNIGTDLMIKVLRNAKYLEMGAMVGIDAASDGLARAQRMGVTTTYAGV 57
Cat.F              ---KLKVAIIGSGNIGTDLMIKVLRNAKYLEMGAMVGIDAASDGLARAQRMGVTTTYAGV 57
Cat.D              --QKLKVAIIGSGNIGTDLMIKVLRNAKYLEMGAMVGIDAASDGLARAQRMGVTTTYAGV 58
Cat.B              MNQKLKVAIIGSGNIGTDLMIKVLRNAKYLEMGAMVGIDAASDGLARAQRMGVTTTYAGV 60
ADAxyl-likeOX1     MSKKLKAAIIGPGNIGTDLVMKMLR-SEWIEPVWMVGIDPNSDGLKRAREFGLKTTAEGV 59
                      ***.****.*******::*:** ::::*   *****. **** **:.:*:.**  **

Cat.H              EGLIKLPEFADIDFVFDATSASAHVQNEALLRQAKPGIRLIDLTPAAIGPYCVPVVNLEE 117
Cat.F              EGLIKLPEFADIDFVFDATSASAHVQNEALLRQAKPGIRLIDLTPAAIGPYCVPVVNLEE 117
Cat.D              EGLIKLPEFADIDFVFDATSASAHVQNEALLRQAKPGIRLIDLTPAAIGPYCVPVVNLEE 118
Cat.B              EGLIKLPEFADIDFVFDATSASAHVQNEALLRQAKPGIRLIDLTPAAIGPYCVPVVNLEE 120
ADAxyl-likeOX1     DGLLPHVLDDDIRIAFDATSAYVHAENSRKLN--ELGVLMVDLTPAAIGPYCVPPVNLKQ 117
                   :**:      ** :.****** .*.:*.  *.  : *: ::************* ***::

Cat.H              HLG--KLNVNMVTCGGQATIPMVAAVSRVAKVHYAEIVASISSKSAGPGTRANIDEFTET 175
Cat.F              HLG--KLNVNMVTCGGQATIPMVAAVSRVAKVHYAEIVASISSKSAGPGTRANIDEFTET 175
Cat.D              HLG--KLNVNMVTCGGQATIPMVAAVSRVAKVHYAEIVASISSKSAGPGTRANIDEFTET 176
Cat.B              HLG--KLNVNMVTCGGQATIPMVAAVSRVAKVHYAEIVASISSKSAGPGTRANIDEFTET 178
ADAxyl-likeOX1     HVGTLEMNVNMVTCGGQATIPMVAAVSRVQPVAYGEIVATVSSRSIGPGTRKNIDEFTRT 177
                   *:*  ::********************  * *.****::**:* ***** ******.*

Cat.H              TSKAIEVIGGAAKGKAIIIMNPAEPPLIMRDTVYVLSAA-ADQAAVAASVAEMVQAVQAY 234
Cat.F              TSKAIEVIGGAAKGKAIIIMNPAEPPLIMRDTVYVLSAA-ADQAAVAASVAEMVQAVQAY 234
Cat.D              TSKAIEVIGGAAKGKAIIIMNPAEPPLIMRDTVYVLSAA-ADQAAVAASVAEMVQAVQAY 235
Cat.B              TSKAIEVIGGAAKGKAIIIMNPAEPPLIMRDTVYVLSAA-ADQAAVAASVAEMVQAVQAY 237
ADAxyl-likeOX1     TAGAIEQVGGAKEGKAIIVVNPAEPPLMMRDTIHCLTETEPDQDAITASVHAMIAEVQKY 237
                   *: *** :*** :*****::*******:****:: *: : .** *::***  *:  ** *

Cat.H              VPGYRLKQQVQFDVIPESAPLNIPGLGRFSGLKTSVFLEVEGAAHYLPAYAGNLDIMTSA 294
Cat.F              VPGYRLKQQVQFDVIPESAPLNIPGLGRFSGLKTSVFLEVEGAAHYLPAYAGNLDIMTSA 294
Cat.D              VPGYRLKQQVQFDVIPESAPLNIPGLGRFSGLKTSVFLEVEGAAHYLPAYAGNLDIMTSA 295
Cat.B              VPGYRLKQQVQFDVIPESAPLNIPGLGRFSGLKTSVFLEVEGAAHYLPAYAGNLDIMTSA 297
ADAxyl-likeOX1     VPGYRLKNGPVFD-----------------GNRVSIFMEVEGLGDYLPKYAGNLDIMTAA 280
                   *******:   **                 * :.*:*:**** ..*** *********:*


Cat.H              ALATAERMAQSML-------------- 307
Cat.F              ALATAERMAQSMLNA------------ 309
Cat.D              ALATAERMAQSML-------------- 308
Cat.B              ALATAERMAQSMLNA------------ 312
ADAxyl-likeOX1     ALRTGEMFAEEIASGTIQLPRREAALA 307
                   ** *.* :*:.:
```

Figura 55 a: *Allineamento della sequenza amminoacidica della proteine ADA xyl-like di P. sp.* OX1 *con le catene polipeptidiche BDFH (DmpF) di P. sp.* CF600. *Nella figura sono indicati i residui amminoacidici identici (*) *e quelli* conservati (**.**).

```
CatG                -FNPS-KKLYISDVTLRDGSHAIRHQYTLDDVRAIARALDKAKVDSIEVAHGDGLQGSSF 58
CatC                -FNPS-KKLYISDVTLRDGSHAIRHQYTLDDVRAIARALDKAKVDSIEVAHGDGLQGSSF 58
CatA                TFNPS-KKLYISDVTLRDGSHAIRHQYTLDDVRAIARALDKAKVDSIEVAHGDGLQGSSF 59
CatE                TFNPS-KKLYISDVTLRDGSHAIRHQYTLDDVRAIARALDKAKVDSIEVAHGDGLQGSSF 59
HOAxyl-likeOX1      -MNLQGKNVTLHDMSLRDGMHAKRHQISLEQMIAVATGLDAAGMPLIEITHGDGLGGRSI 59
                     :* . *:: : *::**** ** *** :*::: *:* .** * :  **::***** * *:

CatG                NYGFGRHTDLEYIEAVAGEISHAQIATLLLPGIGSVHDLKNAYQAGARVVRVATHCTEAD 118
CatC                NYGFGRHTDLEYIEAVAGEISHAQIATLLLPGIGSVHDLKNAYQAGARVVRVATHCTEAD 118
CatA                NYGFGRHTDLEYIEAVAGEISHAQIATLLLPGIGSVHDLKNAYQAGARVVRVATHCTEAD 119
CatE                NYGFGRHTDLEYIEAVAGEISHAQIATLLLPGIGSVHDLKNAYQAGARVVRVATHCTEAD 119
HOAxyl-likeOX1      NYGFPAHSDEEYLRAVIPRLKQAKVSALLLPGIGTVDHLKVALDCGVSTIRVATHCTEAD 119
                    ****  *:* **:.**  .:.:*::::*******:*..** * :.*. .:**********

CatG                VSKQHIEYARNLGMDTVGFLMMSHMIPAEKLAEQGKLMESYGATCIYMADSGGAMSMNDI 178
CatC                VSKQHIEYARNLGMDTVGFLMMSHMIPAEKLAEQGKLMESYGATCIYMADSGGAMSMNDI 178
CatA                VSKQHIEYARNLGMDTVGFLMMSHMIPAEKLAEQGKLMESYGATCIYMADSGGAMSMNDI 179
CatE                VSKQHIEYARNLGMDTVGFLMMSHMIPAE----------------------------- 148
HOAxyl-likeOX1      VSEQHIGMSRKLGADTVGFLMMAHMISAEKVLEQARLMESYGANCIYCTDSAGYMLPDEV 179
                    **:***  :*:** ********:***.**

CatG                RDRMRAFKAVLKPETQVGMHAHHNLSLGVANSIVAVEEGCDRVDASLAGMGAGAGNAPLE 238
CatC                RDRMRAFKAVLKPETQVGMHAHHNLSLGVANSIVAVEEGCDRVDASLAGMGAGAGNAPLE 238
CatA                RDRMRAFKAVLKPETQVGMHAHHNLSLGVANSIVAVEEGCDRVDASLAGMGAGAGNAPLE 239
CatE                ------------------HAHHNLSLGVANSIVAVEEGCDRVDASLAGMGAGAGNAPLE 189
HOAxyl-likeOX1      SEKIGLLRAELNPATEIGFHGHHNMGMAIANSLAAIEAGASRIDGSVAGLGAGAGNTPLE 239
                                     *.***:.:.:***:.*:* *..*:*.*:**:******:***

CatG                VFIAVAERLGWNHGTDLYTLMDAADDIVRPLQDRPVRVDRETLGLGYAGVYSSFLRHAEI 298
CatC                VFIAVAERLGWNHGTDLYTLMDAADDIVRPLQDRPVRVDRETLGLGYAGVYSSFLRHAEI 298
CatA                VFIAVAERLGWNHGTDLYTLMDAADDIVRPLQDRPVRVDRETLGLGYAGVYSSFLRHAEI 299
CatE                VFIAVAERLGWNHGTDLYTLMDAADDIVRPLQDRPVRVDRETLGLGYAGVYSSFLRHAEI 249
HOAxyl-likeOX1      VFVAVCKRMGVETGIDLYKIMDVAEDIVVPMMDQPIRVDRDALTLGYAGVYSSFLLFAQR 299
                    **:**.:*:* : * ***.:**.*:*** *: *:*:****::* ********** .*:

CatG                AAAKYNLKTLDILVELGHRRMVGGQEDMIVDVALDLLAAHK------ 339
CatC                AAAKYNLKTLDILVELGHRRMVGGQEDMIVDVALDLLAA-------- 337
CatA                AAAKYNLKTLDILVELGHRRMVGGQEDMIVDVALDLLAAHK------ 340
CatE                AAAKYNLKTLDILVELGHRRMVGGQEDMIVDVALDLLAA-------- 288
HOAxyl-likeOX1      AEKKYGVPARDILVELGRRGTVGGQEDMIEDLALDMSRARQNQKVSA 346
                    *  **.: : *******:*  ******** *:***:  *
```

Figura 55 b: *Allineamento della sequenza amminoacidica della proteina HOA xyl-like di P. sp.* OX1 *con le catene polipeptidiche GCAE (DmpG) di P. sp.* CF600. *Nella figura sono indicati i residui amminoacidici identici (*) *e quelli* conservati (.).

L’elevata identità di sequenza proteica che risulta allineando le sequenze amminoacidiche delle proteine ADA ed HOA rispettivamente con le catene polipeptidiche BDHF (DmpF) e AGEC (DmpG) di *P.* sp. CF600 (fig. 56) assicura l’omologia ed una similarità tridimensionale tra le proteine in esame, permettendo la realizzazione di uno studio di *homology modeling*. Testata sia la stabilità termodinamica che la qualità stereochimica mediante il grafico di Ramachandran, il modello tridimensionale ricavato è risultato essere sovrapponibile allo stampo (fig. 56).

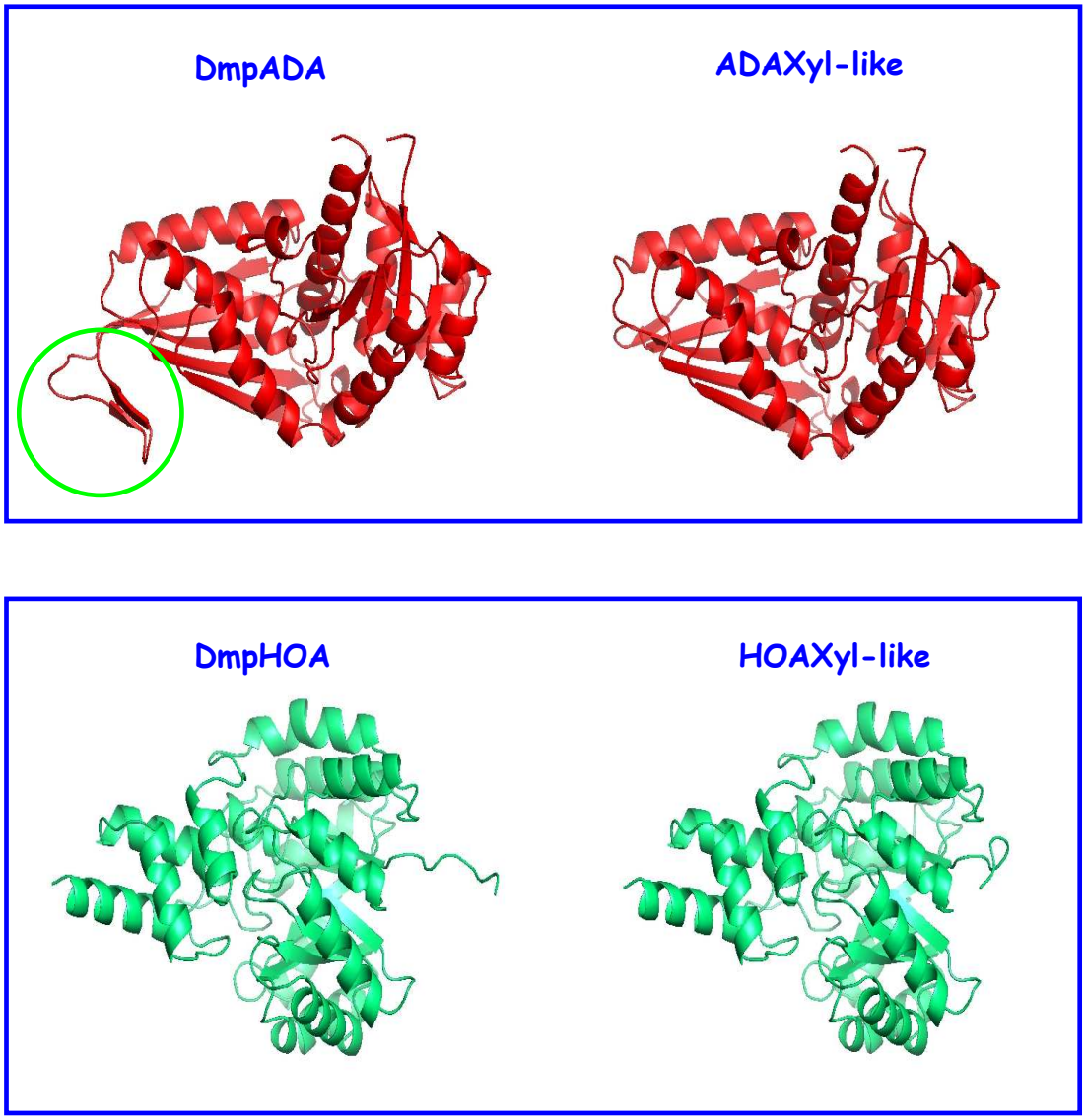


Figura 56: *Rappresentazione dei modelli tridimensionali degli enzimi ADA e HOA xyl-like da P. sp.*OX1 *e degli omologhi DmpF e DmpG da P. sp.* CF600.

Nell'allineamento relativo alla proteina ADA con le catene polipeptidiche BDFH di DmpF da *P.* CF600 (fig. 55) si può notare una delezione di 17 residui amminoacidici (251-267) nella proteina ADA xyl-like da *P.* sp. OX1. I residui amminoacidici mancanti corrispondono ad un tratto che si ripiega a loop nella struttura tridimensionale dell'enzima DmpF di *P.* CF600, assente invece nella proteina corrispondente di *P.* sp. OX1 (fig. 56). Ipotizzando un funzionamento analogo dei due complessi enzimatici, questa delezione può essere considerata ininfluente ai fini dell'attività catalitica.

I residui amminoacidici che costituiscono il sito attivo di DmpG sono coordinati da un atomo di manganese. I ligandi del centro metallico sono: Asp18, His200, His202. La minima distanza tra la catena laterale della His202 e lo ione $Mn2^{+}$ del sito attivo è rispettivamente di 2,28 Å. Nel modello tridimensionale dell'enzima HOA xyl-like di *P.* sp. OX1 si nota che la proteina conserva in analoghe posizioni di sequenza i tre ligandi del metallo: His199, His201 e Asp17 (fig 57). La distanza minima tra la His201 e lo ione Mn^{2+}è di 2,62 Å.

Questo dato strutturale, confrontato con quello dell'enzima corrispondente di *P.* sp. CF600, permette di assumere che il sito attivo di HOA è identico a quello di DmpG nel quale, sulla base della densità elettronica, è stato modellato l'ossalato, un analogo strutturale dell'enolato, prodotto da HOA insieme all'acetaldeide.

Oltre ai ligandi dello ione Mn^{2+} anche i residui amminoacidici coinvolti nel *channeling* enzimatico sono conservati: His20 e Arg16 corrispondono alla His21 e Arg17 in *P.* CF600 (fig. 57).

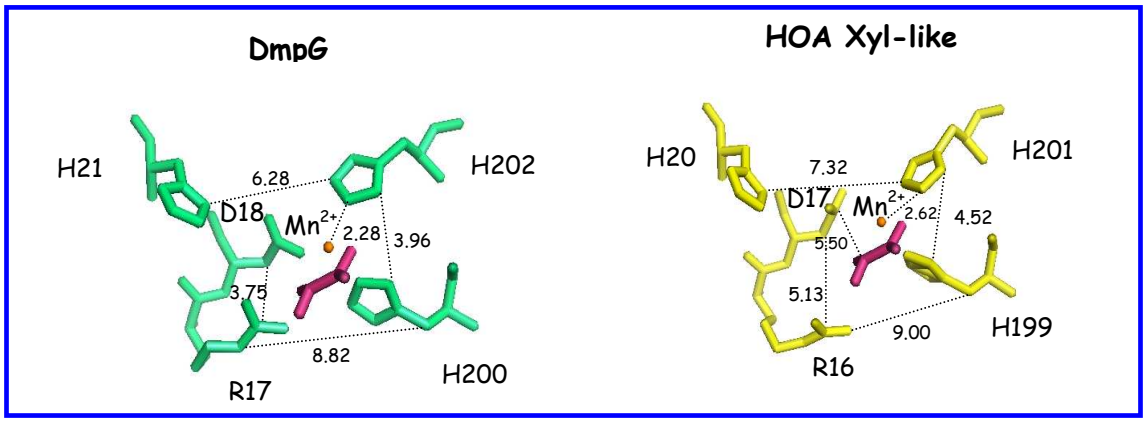


Figura 57: *Rappresentazione del sito attivo di DmpG e dell'enzima HOA xyl-like da P. sp.* OX1. *In arancio è rappresentato lo ione Mn^{2+}e in viola l'ossalato, analogo strutturale dell'intermedio enolato. H21, R17 sono i residui amminoacidici coinvolti nel channeling enzimatico.*

La struttura di DmpF è simile a quella degli enzimi appartenenti alla famiglia della gliceraldeide 3-fosfato deidrogenasi (Cobessi *et al*., 1999; Vellieux, *et al*. 1993) ed è organizzata in due domini: un dominio di legame per il NAD^+ (1-30 e 286-312) e un dominio di dimerizzazione (131-285). Sebbene l'enzima sia stato cristallizzato in presenza di NAD^+ la struttura rivela la presenza sia della forma *apo*, che della forma *olo* di DmpF.

Il sito attivo di DmpF è localizzato a livello dell'interfaccia tra il dominio di legame per il NAD^+ e il dominio di dimerizzazione, dove la Cys132 è adiacente all'anello nicotinammidico del NAD^+ (fig. 58).

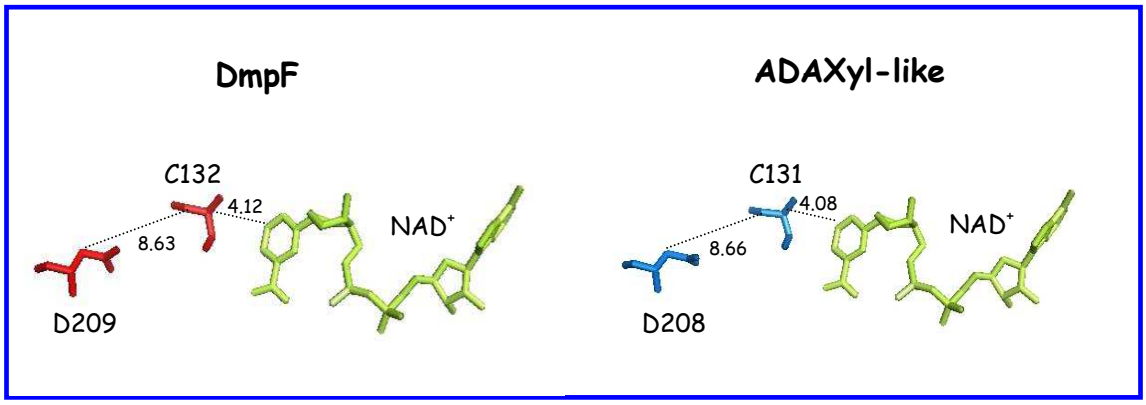


Figura 58: *Schema del sito attivo di DmpF e dell'enzima ADA xyl-like da P. sp. OX1. In giallo è rappresentato il cofattore* NAD^+.

Allineamenti di sequenza indicano che la Cys132 è l'unico residuo di cisteina conservato tra le sequenze proteiche.

Nel sito attivo di DmpF la minima distanza Cys132-NAD^+, Cys132-Asp209 è rispettivamente 4,12 Å e 8.63 Å. In *P*. sp.OX1 i residui amminoacidici coinvolti nel meccanismo catalitico sono conservati, in questo caso la minima distanza Cys131-NAD^+, Cys131-Asp208 è rispettivamente di 4,08 Å e 8.66 Å (fig.58).

A livello del sito attivo della deidrogenasi, l'uscita del tunnel che permette il passaggio dell'acetaldeide da HOA ad ADA è bloccata dalle catene laterali di Ile172, Ile196, e Met198 che possono assumere conformazioni multiple (fig. 59).

In DmpF le distanze Ile172-Ile196, Ile172-Met198, Ile-196-Met-198 nello scheletro peptidico sono rispettivamente di 7.86 Å, 10.87 Å e 6.89 Å.

Nella forma *apo* dell'enzima sono state identificate quattro coppie conformazionali ciascuna delle quali risulta in una conformazione chiusa del canale. Nella forma *olo* è stata osservata un'unica conformazione della Ile172 che facilita l'interazione tra Asn171 e il NAD^+. Il movimento della Ile172 indotto dalle interazioni tra il cofattore, Asn171 e le conformazioni multiple di Ile196 e Met198 crea un arrangiamento strutturale che mantiene il canale in una conformazione aperta, permettendo all'intermedio acetaldeide di entrare nel sito attivo della deidrogenasi. È stato osservato che l'attività dell'aldolasi è stimolata dall'aggiunta del cofattore alla miscela di reazione, suggerendo che la reattività dell'aldolasi è modulata allostericamente dal legame del NAD^+ al sito attivo di DmpF.

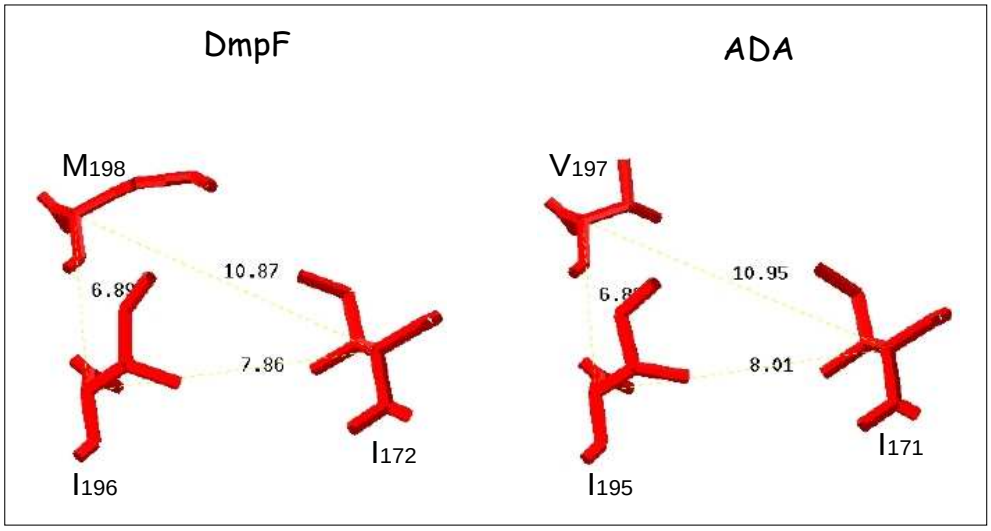


Figura 59: *Schema tridimensionale dei residui amminoacidici coinvolti nel channeling enzimatico a livello del sito attivo di DmpF e dell'enzima ADA da P. sp. OX1.*

In *Pseudomonas* sp. OX1 i residui amminoacidici coinvolti nel *channeling* enzimatico a livello del sito attivo di ADA sono conservati, fatta eccezione per una sostituzione conservativa, la Val197 al posto della Met198 (fig. 59).

3.13 Realizzazione del costrutto pET-QK-Nde per l'espressione delle proteine ADA ed HOA xyl-like

Per l'espressione delle proteine ADA e HOA xyl-like di *P*. *sp*. OX1 in *E. coli* è stato realizzato un costrutto plasmidico clonando la coppia genica *xyl-likeQK* in corrispondenza dei siti di restrizione *Nde-Bam* del vettore d'espressione pET-22b(+). La realizzazione di tali costrutti è analoga a quanto già descritto nella sezione 3.7.

Il costrutto così ottenuto, chiamato pET-QK-Nde, è stato usato per trasformare cellule competenti di *E*. *coli* BL21(DE3) secondo il protocollo descritto nel paragrafo 2.6.2 di Materiali e Metodi.

Le cellule di *E*. *coli* BL21(DE3), trasformate con il plasmide ricombinante pET-FG-Nde è stata inoculata in 10 ml di brodo di coltura LB contenente ampicillina ed è stata fatta crescere per 16 ore a 37°C, in un incubatore termostato a piatto orbitante per mantenere la coltura in continua agitazione garantendone la giusta ossigenazione. Il preinoculo è stato diluito in 300 ml di LB con ampicillina e fatto crescere fino al raggiungimento di una densità cellulare pari a un OD_{600} di 0,6. L'espressione delle proteine ADA ed HOA è stata indotta aggiungendo alla coltura IPTG 0,5 mM e lasciandola crescere per ulteriori 3 ore. Le cellule di *E*. *coli* recuperate per centrifugazione delle colture batteriche indotte sono state risospese in un tampone di sonicazione ed incubate in ghiaccio per 30 minuti. Al termine del raffreddamento le cellule sono state lisate mediante l'uso di un sonicatore come indicato nella sezione 2.18 di Materiali e metodi. Il campione sonicato è stato quindi centrifugato per separare la frazione solubile da quella insolubile.

Mediante SDS-PAGE sono state analizzate le frazioni solubile ed insolubile recuperate in tre punti della procedura di espressione: sono stati messi a confronto i campioni non indotti, gli indotti da IPTG ed i campioni sonicati (fig. 60).

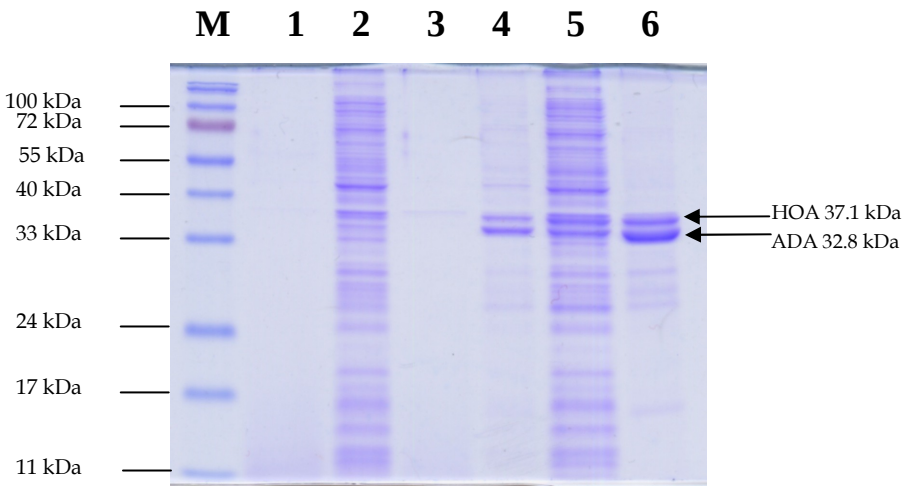


Figura 60: *Analisi su gel di poliacrilammide al 15% dell'espressione dell'enzima bifunzionale ADA-HOA xyl-like.*
M, Markers di peso molecolare Prestained Protein Ladder;
lanes 1-2, campione non indotto supernatante e pellet; lanes 3-4, campione indotto supernatante e pellet; lanes 5-6, campione sonicato supernatante e pellet.

L'analisi mediante SDS-PAGE mostra chiaramente come le due proteine siano prodotte in risposta ad IPTG in cellule esprimenti i geni xyl-likeQK a partire dal costrutto pET-QK-Nde (fig. 60) ma, anche in questo caso, l'iperespressione delle proteine ADA ed HOA xyl-like provoca il loro accumulo nei corpi di inclusione che si producono con la sonicazione delle cellule (fig. 60, lane6).

La frazione insolubile, recuperata dopo il frazionamento mediante sonicazione delle cellule di E. *coli* che esprimono il costrutto pET-QK-Nde, è stata sottoposta al trattamento per la solubilizzazione e rinaturazione delle proteine qui incluse, come già descritto nel paragrafo 3.9. Il protocollo prevede che i corpi di inclusione siano risospesi in un tampone sodio fosfato a pH 7.5, successivamente lavati in H_2O ed infine trattati con urea, un agente caotropico che permette l'efficace solubilizzazione delle proteine legate alle membrane e di quelle associate in modo aspecifico ai corpi d'inclusione. Il campione in urea è stato poi centrifugato ed il supernatante, contenente le proteine solubilizzate, è stato sottoposto a passaggi di dialisi contro un tampone di rinaturazione appropriato. Nel gel realizzato con il 12% di poliacrilammide è stata fatta un'analisi delle varie fasi del processo di purificazione e rinaturazione di ADA ed HOA xyl-like dai corpi di inclusione (fig. 61).

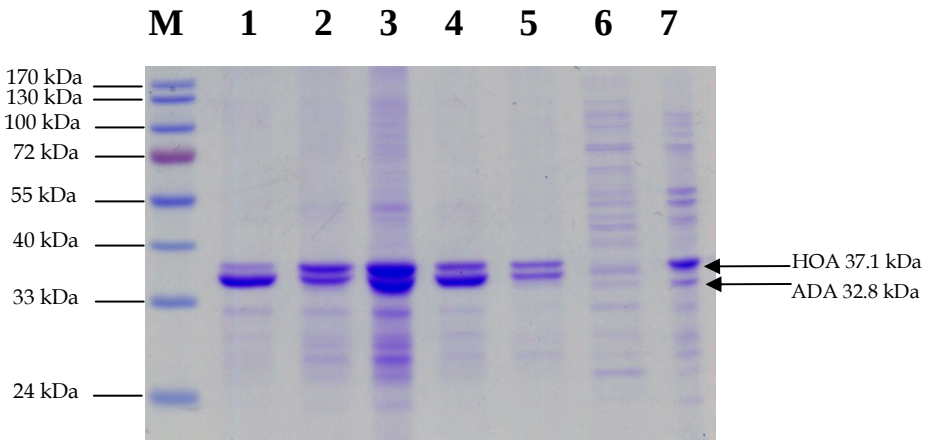


Figura 61: *Purificazione e rinaturazione di ADA ed HOA xyl-like dai corpi di inclusione. M) Markers di peso molecolare Prestained Protein Ladder; 1) Campione proteico rinaturato dopo dialisi; 2-3) Proteine precipitate durante il processo di dialisi; 4) Campione proteico solubilizzato in urea 8M; 5) Proteine non solubilizzate dall'urea 8M; 6) Lavaggio dei corpi di inclusione in tampone sodio fosfato; 7) Lavaggio dei corpi di inclusione in acqua.*

L'elevata concentrazione di urea utilizzata (8 M) ha permesso di solubilizzare parte delle proteine d'interesse anche se una certa quantità del campione risulta comunque insolubile (fig. 61, *lanes* 4-5). In particolare, l'analisi su gel di poliacrilammide evidenzia che dai corpi d'inclusione derivanti dall'espressione del plasmide pET-QK-Nde, buona parte di ADA (32,8 kDa) viene solubilizzata dal trattamento con urea mentre HOA (37,1 kDa) permane nello stato insolubile (fig. lane 4). Si può notare che HOA è presente in forma solubile principalmente nel campione recuperato dopo il lavaggio iniziale in H_2O (fig. 61, *lane* 7). Questo fa pensare che HOA sia solo debolmente associata ai corpi di inclusione e con questo blando lavaggio viene facilmente rilasciata in forma solubile ma comunque sottratta in grande quantità al campione che deve proseguire il processo di purificazione e che contiene anche ADA. La *lane* 1 della figura mostra il campione proteico contenente le proteine rinaturate: ADA è presente in abbondanza mentre la controparte HOA è contenuta in percentuale molto bassa.

La fase successiva prevede una caratterizzazione funzionale delle proteine di nostro interesse attraverso la realizzazione di saggi di attività enzimatica condotti sia sulla frazione solubile recuperata dopo sonicazione che sulle proteine solubilizzate e rinaturate dai corpi d'inclusione.

3.14 Saggi di attività enzimatica per testare l'attività della deidrogenasi ADA xyl-lke

Lo studio dell'attività catalitica della deidrogenasi ADA xyl-like è stato condotto con modalità analoghe a quelle già adottate per la caratterizzazione di ADA phe ed anche in questo caso non è stato possibile testare il *channeling* tra i due enzimi e l'attività di HOA a causa della difficoltà legata alla sintesi del substrato stesso di HOA.

I saggi di attività enzimatica sono stati eseguiti sia sui campioni proteici derivanti dalla purificazione dei corpi d'inclusione sia sui supernatanti recuperati subito dopo il frazionamento delle cellule che esprimono il costrutto pET-QK-Nde. Non è stata registrata alcuna attività enzimatica per le proteine presenti in forma solubile nel supernatante recuperato subito dopo la sonicazione e che costituisce l'estratto proteico grezzo. Una discreta attività della deidrogenasi ADA è stata riscontrata invece nel campione contenente le proteine rinaturate dai corpi di inclusione. È stato deciso di utilizzare questo materiale per l'esecuzione di una serie di saggi di attività enzimatica volti a determinare le costanti cinetiche, K_M e V_{max}, di ADA xyl-like. Le reazioni sono state monitorate a 340 nm misurando la quantità di NADH che si produce dalla riduzione del NAD^+ e che equivale alla quantità di substrato che l'enzima consuma. In questi saggi sono state mantenute costanti le concentrazioni di βNAD^+ e CoA ed è stata variata la concentrazione del substrato Acetaldeide, come descritto nel paragrafo 2.21.1 di Materiali e Metodi. I valori di assorbanza/minuto (ΔA_{340}/minuto), ottenuti dalle varie prove, sono stati convertiti in μM/minuto usando la relazione indicata nella sezione 2.21.2 di Materiali e Metodi ed i dati ottenuti sono stati riportati in un grafico, mostrato in figura 62, che descrive un'iperbole equilatera secondo l'equazione di Michaelis-Menten.

Tale equazione, per il calcolo delle costanti cinetiche, K_M e V_{max}, non fornisce valori precisi per alte concentrazioni di substrato, quindi è stata applicata una trasformazione lineare dell'equazione di Michaelis-Menten definita dall'equazione di Hanes e con la quale è stato costruito il grafico mostrato in figura 63, che ci ha permesso di definire una K_M di ADA per l'acetaldeide pari a 12 mM ed una V_{max} pari a 3,856 μM/minuto.

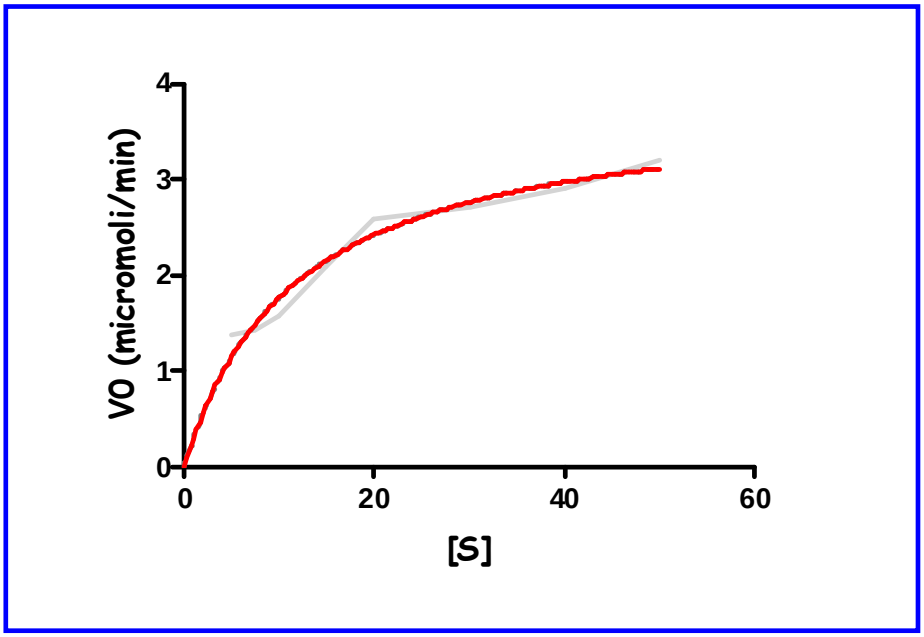


Figura 62: *Curva di Michaelis-Menten. Effetto della concentrazione del substrato acetaldeide sulla velocità iniziale della reazione catalizzata da ADA. La curva è stata ottenuta eseguendo saggi con 37,5 μg di estratto proteico totale, 210 μM di βNAD$^+$, 75 μM di Coenzima A (CoA), 50 mM di sodio fosfato buffer a pH 7,5 e con concentrazioni crescenti di acetaldeide comprese tra 5 mM e 50 mM.*
Il valore determinato per Km è 11.85 con una Vmax pari a 3.856 μM/min.

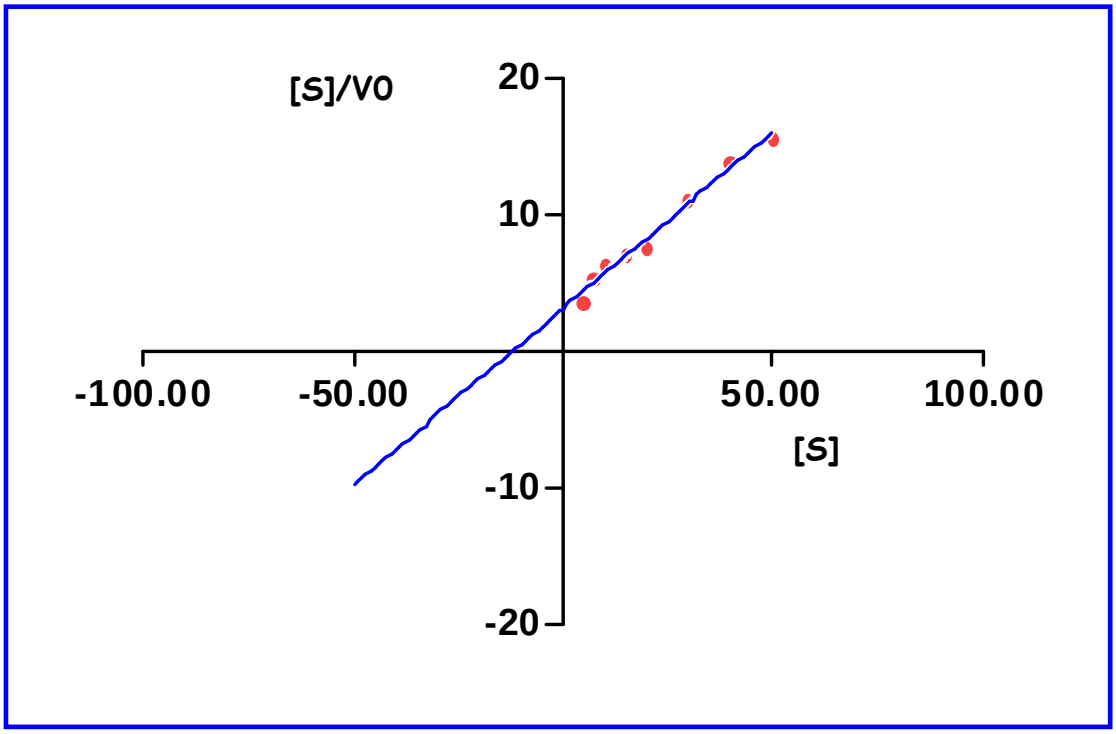


Figura 63: *Grafico lineare di Hanes per il calcolo dei parametri cinetici K_M e V_{max} della Deidrogenasi ADA rispetto al substrato acetaldeide. Il grafico è stato realizzato con i dati precedentemente utilizzati per la costruzione della curva di Michaelis-Menten.*
X intercetta quando Y=0 : -12,01 questo valore definisce la Km
Y intercetta quando X=0 : 3,098 questo valore corrisponde a Km/Vmax

PARTE III

Caratterizzazione del promotore Pphe

In *Pseudomonas* sp. OX1 i geni codificanti gli enzimi per il catabolismo di toluene ed *o*-xilene sono organizzati in due operoni: uno, il locus *tou*, codifica il complesso ToMO, l'altro, noto come operone *phe*, presenta la stessa organizzazione genica dell'operone *dmp* per il catabolismo dei dimetilfenoli di *Pseudomonas* sp. CF600. Questo *cluster* genico codifica il complesso multienzimatico PH, che insieme a ToMO catalizza le reazioni *dell'upper pathway*, e gli enzimi del *lower pathway*: C2,3O, HMSD, HMSH, OEH, ADA, HOA, 4OD e 4OI.

È noto il meccanismo che regola l'espressione del locus *tou*: ToMO viene trascritto a partire da un promotore σ^{54}-dipendente, P_{ToMO}, che è sotto il controllo del regolatore positivo NtrC-*like* TouR. Questo regolatore trascrizionale è attivato dall'associazione con i substrati aromatici del *pathway*, toluene ed *o*-xilene, ma anche dai cresoli intermedi prodotti attraverso l'*upper pathway*.

Pseudomonas sp. OX1 è il primo ceppo che degrada il toluene in cui un operone codificante una toluene-monoossigenasi (*tou operon)* è stato trovato associato ad un operone *dmp-like* (*phe operon*). La presenza dell'operone *phe* e di un regolatore responsivo a fenolo e metil-fenoli (TouR) nel genoma di *Pseudomonas* sp. OX1 suggerisce che, in questo ceppo, la via per il catabolismo di toluene e di *o*-xilene si sia evoluta in seguito ad un evento di espansione verticale che ha portato all'incorporazione del *cluster* genico *tou* in una via preesistente per il catabolismo del fenolo. Ciò fa ipotizzare che anche l'espressione dell'operone *phe* sia sotto il controllo di un promotore σ^{54}-dipendente e che possa essere regolata positivamente da TouR o da un attivatore appartenente alla stessa famiglia.

In questa parte del lavoro di tesi è stata identificata la regione promotrice dell'operone *phe*, omologo all'operone *dmp* di *P.* CF600, ed il suo putativo regolatore della trascrizione.

3.15 Identificazione del promotore Pphe

Per identificare il promotore P*phe* del *lower pathway* di *Pseudomonas* sp. OX1, un frammento di 6 Kb, che si estende dalla *orf1* a monte del locus *tou* fino al gene *pheK*, è stato isolato dal cosmide pFB3411 mediante digestione con l'endonucleasi di restrizione *Bgl*II, secondo la procedura descritta nel paragrafo 2.23 di Materiali e Metodi (fig. 64). Tale frammento è stato clonato nel vettore pGEM-7Zf(+) ed il plasmide ricombinante ottenuto, chiamato pGEM7Z-6B/B, è stato sottoposto ad analisi di sequenza.

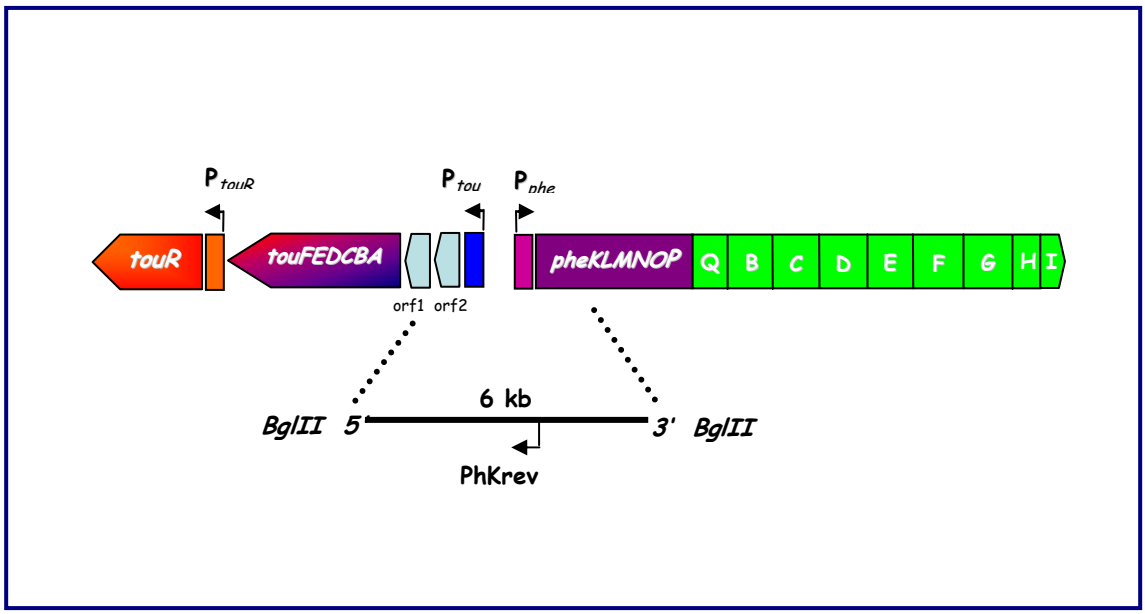


Figura 64: *Rappresentazione schematica della regione di 6 Kb isolata dal cosmide pFB3411. Tale regione si estende dalla orf1 fino al gene codificante la subunità K della Fenolo Idrossilasi PH. È indicato il primer PhK rev usato per il sequenziamento.*

Sono state sequenziate circa 1300 bp all'interno del frammento di 6 kb, a partire dalla regione a cui si appaia il primer PhK rev, in direzione del locus *tou*. Allineamenti di sequenza, realizzati utilizzando il programma NCBI Blast (http://ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi), e l'analisi effettuata grazie all'uso del programma PromScan (http://molbiol-tools.ca/mtoolwww-cgi/promscan.cgi), hanno consentito di individuare, all'interno di questa regione, i siti di legame per la RNA-P sigma-54 dipendente, rappresentati dai motivi GG e GC nelle posizioni -24 e -12, rispettivamente, seguiti dai primi nucleotidi codificanti la subunità K della fenolo idrossilasi PH (fig. 65).

Figura 65: *Sequenza nucleotidica della regione comprendente il putativo promotore Pphe. In seguito all'analisi in silico sono state individuate le regioni -12/-24 (in fucsia) a cui si lega la RNA-P σ^{54} -dipendente.*
Sono sottolineati i primers utilizzati per l'isolamento del frammento di 370 bp comprendente il promotore.
In nero è riportata la sequenza parziale del gene pheK.

Il promotore P*phe* è stato isolato dal frammento di 6 Kb mediante una reazione di PCR utilizzando una coppia di primers progettata sulla base della sequenza precedentemente delucidata. I primers utilizzati sono l'oligonucleotide PheXho for (5'-CCG**CTCGAG**GCGATCACTTCTCTTTGC-3'), che include il sito di restrizione per *Xho*I (in evidenza) e l'oligonucleotide PheBam rev (5'-CGC**GGATCC**CCCTTTATGTTTGTGATCGG-3'), che include il sito di restrizione per *BamH*I (in evidenza) (fig. 65).

Il frammento di 370 bp ottenuto è stato digerito con gli enzimi di restrizione *Xho*I e *BamH*I, secondo le condizioni indicate nel paragrafo 2.23 di Materiali e Metodi. Questo frammento, denominato Δ370X/B, è stato subclonato nel vettore pGEM7Zf(+), precedentemente digerito con le stesse endonucleasi di restrizione. Il vettore realizzato è stato denominato pGEM7Z-Δ370X/B (fig. 66).

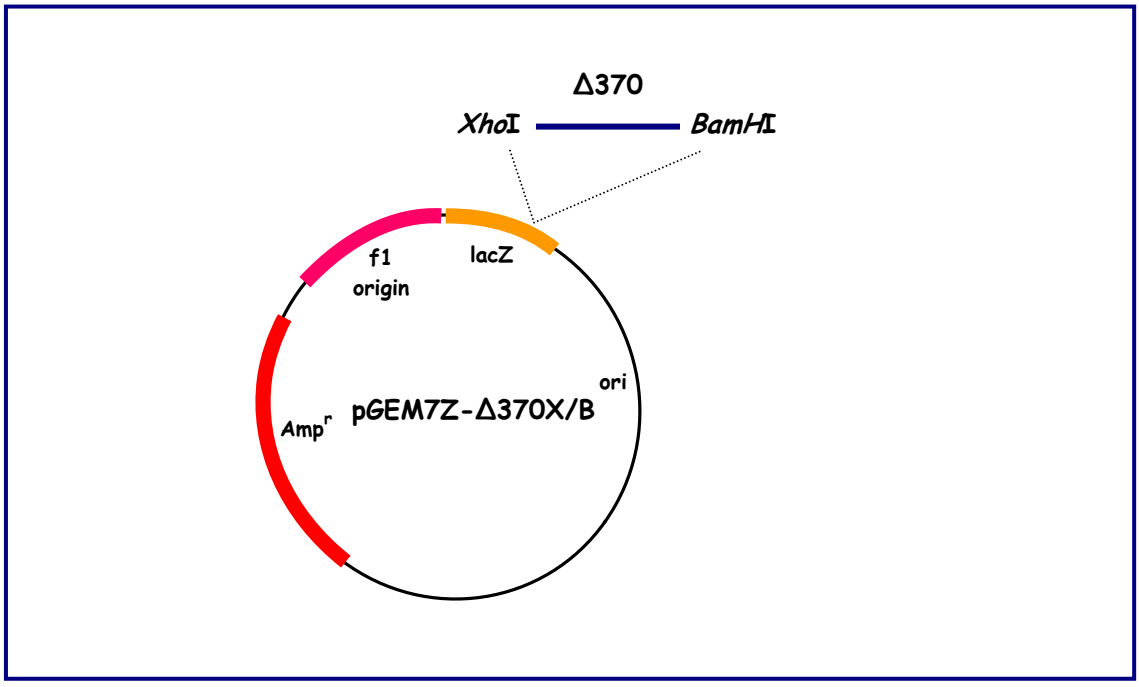


Figura 66: *Realizzazione del costrutto pGEM7Z-Δ370X/B.*

L'analisi *in silico* della regione Δ370X/B ha consentito di identificare la natura della regione promotrice: è stata confermata la presenza delle putative sequenze consenso -12/-24, che permettono di classificare il promotore P*phe* nella famiglia dei promotori a cui si lega la RNA-P che utilizza il fattore alternativo σ^{54}. Questa ipotesi è sostenuta dalla scoperta, a monte delle regioni -12/-24, di elementi definiti *enhancer-like* o UASs (***U**pstream **A**ctivating **S**equences),* riconosciute dagli attivatori trascrizionali σ^{54}-dipendenti (fig. 67).

Figura 67: *Allineamento tra la sequenza del promotore Pphe di P. sp. OX1 con altri promotori σ^{54}dipendenti: Po, promotore dell'operone dmp di P. sp. CF600; Pu, promotore del TOL upper pathway di P. putida mt-2; Ptou, promotore del locus tou di P. sp. OX1.*
In verde sono indicate le regioni UAS2; in celeste le regioni UAS1; in fucsia le regioni -12/-24; in giallo i siti di inizio della trascrizione.

3.16 Produzione di frammenti biotinilati del promotore Pphe

Caratterizzare sotto il profilo bioinformatico il promotore del locus *phe,* rappresenta il primo passo di un'indagine approfondita riguardante la regolazione trascrizionale dell'operone.

I risultati dell'analisi bioinformatica del promotore P*phe* ci hanno spinto ad accentrare il nostro interesse su due sequenze di circa 100 bp ciascuna: la prima va dalla posizione -226 alla -138, mentre la seconda si estende dalla posizione -60 alla +32. Tali frammenti di particolare interesse sono stati da noi denominati Δ1 e Δ3.

La figura 68 di seguito proposta riporta la schematizzazione di tali regioni: il frammento Δ1 comprende le regioni -12/-24 e il putativo sito di inizio della trascrizione; il frammento Δ3 comprende, invece, le regioni UAS1 e UAS2.

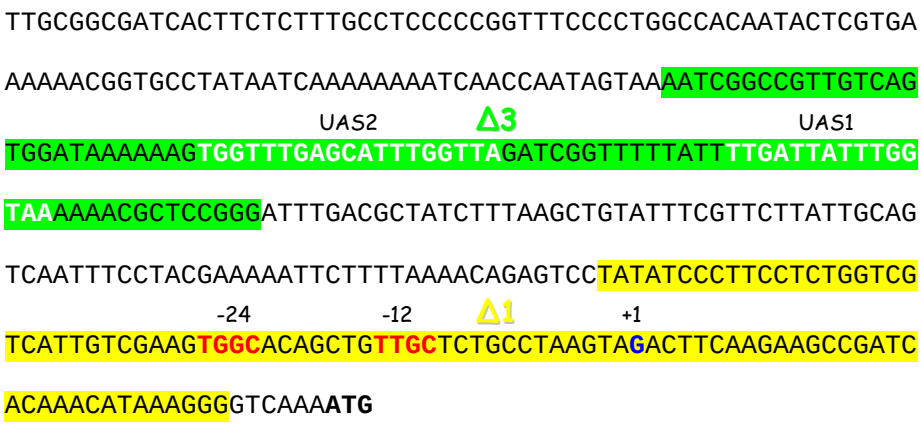


Figura 68: *In verde è indicato il frammento Δ3, che comprende le UASs, e in giallo il frammento Δ1, che comprende le regioni -12/-24 ed il sito di inizio della trascrizione (in blu). Tali frammenti sono marcati al 5' con biotina.*

L'isolamento dei frammenti Δ1 e Δ3 è stato realizzato mediante PCR secondo la reazione già descritta nel paragrafo 2.25 di Materiali e Metodi. Il plasmide pGEM7Z-Δ370X/B è stato utilizzato come stampo ed i primers specifici, usati per amplificare tali frammenti, sono stati progettati sulla base della sequenza nota della regione Δ370X/B.

I primers senso usati nella reazione di PCR sono coniugati con la biotina: in questo modo i frammenti generati vengono marcati al 5' con tale molecola.

La lunghezza dell'amplificato, visibile su gel all'1.5% di agarosio, è di 91 bp per quanto riguarda il frammento Δ1; l'amplificato relativo a Δ3 è lungo invece 89 bp (fig. 69).

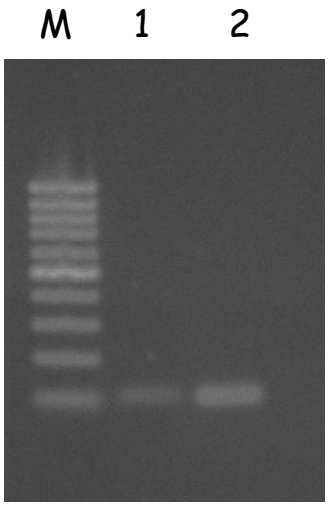


Figura 69: *Elettroforesi su gel all'1.5% d'agarosio del prodotto di amplificazione relativo a Δ1 e a Δ3. Nella corsia 1 è visibile la banda relativa all'amplificato di 91 bp di Δ1; nella corsia 2 è visibile la banda relativa all'amplificato di 89 bp di Δ3.*
I markers sono i 100 bp DNA Ladder.

3.17 South-Western

Questa metodica, descritta nel paragrafo 2.27 di Materiali e Metodi, è stata adottata per riscontrare la presenza di fattori trascrizionali, nell'estratto proteico di *Pseudomonas* sp. OX1, in grado di interagire con le sequenze consenso che caratterizzano i frammenti Δ1 e Δ3. Sono stati utilizzati estratti proteici totali ricavati da *Pseudomonas* sp. OX1 cresciuto su terreno M9, contenente Malato come unica fonte di carbonio, in presenza di Fenolo per indurre l'espressione dei geni catabolici (par. 2.26), e l'estratto proteico totale preparato allo stesso modo ma ottenuto da cellule cresciute in assenza di fenolo.

Tali estratti sono stati sottoposti ad elettroforesi su gel al 10% di poliacrilammide in presenza di SDS; successivamente sono stati trasferiti su nitrocellulosa e quindi sottoposti a rinaturazione, data la necessità di avere proteine allo stato nativo per verificare la loro

interazione con il DNA. Le sonde usate nell'ibridazione sono i frammenti Δ1 e Δ3 ottenuti per PCR, come descritto nel par. 2.25, marcati al 5' con biotina. Nella figura 70 (pannello A) è mostrata l'elettroforesi su gel di poliacrilammide dell'estratto proteico totale da *Pseudomonas* sp. OX1 cresciuto in presenza (lane 1) e in assenza (lane 2) di fenolo. I due estratti sembrano avere lo stesso profilo elettroforetico. Nel pannello B della stessa figura è mostrata la membrana di nitrocellulosa su cui sono visualizzate le proteine presenti nell'estratto proteico totale da *P.* sp. OX1 cresciuto in presenza di fenolo ed interagenti con le sonde Δ1 e Δ3 biotinilate. Dai risultati visibili in figura si nota la presenza di una proteina di peso molecolare inferiore ai 72 kDa che interagisce debolmente con entrambe le sonde: questa banda di ibridazione non è stata invece trovata utilizzando l'estratto proteico da *P.* sp. OX1 cresciuto in assenza di fenolo (risultato non mostrato).

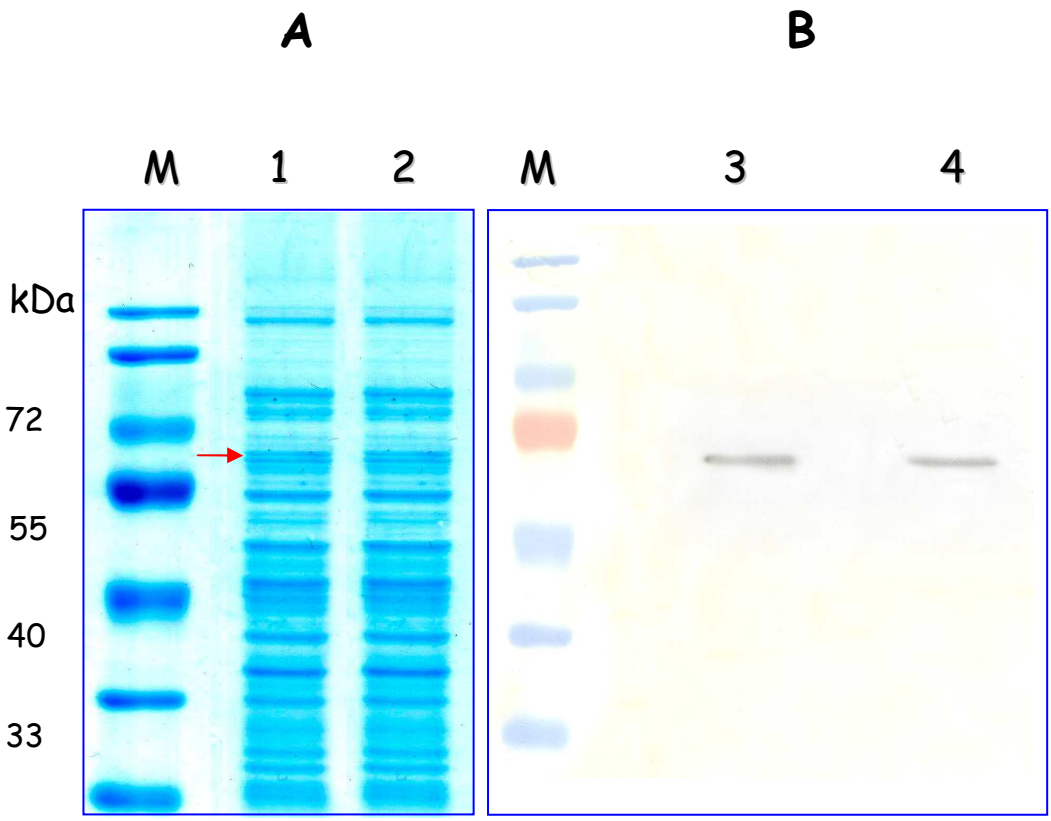


***Figura 70**: South-western analysis: ibridazione con le sonde Δ1 e Δ3 marcate con biotina.*
Pannello A) M. Markers di peso molecolare Prestained Protein Ladder; 1. Estratto proteico totale da P. OX1 cresciuto in presenza di fenolo; 2. Estratto proteico totale da P. OX1 cresciuto in assenza di fenolo .
PannelloB) M. Markers di peso molecolare Prestained Protein Ladder; 2. Estratto proteico totale da P. OX1 cresciuto in presenza di fenolo + sonda Δ1-Bio; 3.Estratto proteico totale da P. OX1 cresciuto in presenza di fenolo + sonda Δ3-Bio

La presenza, in *Pseudomonas* sp. OX1, del *tou operon* associato ad un operone *dmp-like* (*phe* operon) insieme al regolatore NtrC-*like* TouR, responsivo a fenolo e metil-fenoli ed omologo al regolatore DmpR di *P.* CF600, suggerisce che, in questo ceppo, la via per il catabolismo di toluene e di *o*-xilene si sia evoluta in seguito ad un evento di espansione verticale che ha portato all'incorporazione del *cluster* genico *tou* in una via preesistente per il catabolismo del fenolo. Considerando valida l'ipotesi che il locus *tou* sia stato acquisito nel genoma di *Pseudomonas* sp. OX1 in seguito ad un evento di espansione di una via catabolica preesistente, si ritiene che anche l'espressione dell'operone *phe* sia sotto il controllo di un promotore σ^{54}-dipendente e che possa essere regolata positivamente da TouR o da un attivatore appartenente alla stessa famiglia (Arenghi *et al.*, 1999 e 2001).

Il regolatore TouR ha una massa molecolare di 67 kDa. La banda di ibridazione ottenuta negli esperimenti South-western indica una proteina di peso molecolare simile.

Come già osservato la stessa banda di ibridazione si osserva sia con la sonda Δ1 che con la sonda Δ3. I regolatori NtrC-like, come TouR, si attivano in seguito alla loro interazione con il substrato aromatico; attraverso il loro dominio D carbossi-terminale riconoscono e legano le regioni UASs (presenti nel frammento Δ3), mentre l'RNAP-σ^{54} forma un complesso chiuso con il promotore. Affinché la trascrizione venga attivata è necessaria l'interazione del regolatore con il complesso trascrizionale chiuso: ciò si realizza attraverso il ripiegamento del DNA in un *loop* mediato da fattori di curvatura, quali la proteina IHF (*integration host factor*), permettendo così l'interazione con il DNA a livello delle regioni -12/-24 (presenti nel frammento Δ1) ed un rimodellamento della RNAP-σ^{54} per promuovere l'inizio della trascrizione.

I risultati conseguiti grazie agli esperimenti di South-western fanno ipotizzare che la trascrizione dei geni *phe* sia indotta da un regolatore positivo, in risposta al fenolo, del peso molecolare inferiore ai 72 kDa, in grado di riconoscere e legare le sequenze consenso UASs e -12/-24. Come già proposto, potrebbe trattarsi del regolatore TouR o di un attivatore appartenente alla stessa famiglia.

3.18 Analisi mediante spettrometria di massa

Quest'analisi, resa necessaria per l'identificazione della specie proteica d'interesse rilevata con l'esperimento di South-Western che lega le regioni Δ1 e Δ3 del promotore P*phe*, è stata realizzata grazie alla collaborazione con il Prof. Zolla dell'Università degli Studi della Tuscia di Viterbo.

È stata realizzata un'analisi di spettrometria di massa LC MS/MS, che prevede innanzitutto che la miscela peptidica, ottenuta sottoponendo a trattamenti con tripsina la banda proteica d'interesse, venga frazionata su sistemi di cromatografia capillare. I peptidi ottenuti sono stati estratti e sottoposti a RP-nHPLC-ESI-MS/MS. Man mano che i peptidi fluiscono ad un flusso di circa 200 nl/min, vengono introdotti nella sorgente ionica ad electrospray nanoESI appartenente allo spettrometro di massa dotato di un analizzatore a trappola ionica (HTCplus Bruker-Daltonik).

Dagli spettri di frammentazione ottenuti è possibile risalire alla sequenza amminoacidica del peptide analizzato.

L'identificazione della proteina d'interesse è stata realizzata mediante MS/MS Ions Search dei frammenti riconosciuti, utilizzando il programma MASCOT che elabora gli spettri di frammentazione ottenuti dall'analisi di spettrometria. Tali spettri sono stati confrontati con quelli teorici ottenuti da simulazioni di frammentazione di tutti i peptidi triptici appartenenti alle proteine presenti nella banca dati NCBInr (www.matrixscience.com).

Si riporta di seguito la tabella delle identificazioni dei frammenti realizzate, tramite MS/MS Ions Search, ricercando nel database NCBInr grazie all'uso del programma MASCOT.

Match to	NCBI Accession number	Mascot score	Peptides number	Sequence Coverage (%)	MW kDa/pI
TmbR Sigma54-dependent transcriptional activator (*Pseudomonas putida* TMB)	gi|1145786	407	8	19	66.017/6.20
Pyruvate carboxylase subunit B (*Pseudomonas fluorescens* Pf-5)	gi|70733440	760	16	26	65.759/5.56
Putative ABC transporter ATP-binding protein (*Pseudomonas fluorescens* Pf0-1)	gi|77461096	611	11	29	61.710/5.34

Tabella 4: *Mascot Search Results. Identificazioni dei frammenti realizzate ricercando nel database NCBInr grazie all'uso del programma MASCOT.*

Tra le proteine identificate, la presenza del regolatore TmbR di *Pseudomonas putida* TMB dà sostegno alla ipotesi formulata precedentemente.

Pseudomonas putida TMB è stato isolato per la sua capacità di crescere su 1,2,4-TMB, che usa come unica fonte di carbonio e di energia (Baggi *et al.*, 1982). Queste proprietà metaboliche sono dovute ad un set di geni che sono geneticamente e funzionalmente omologhi ai geni *xyl* di *P. putida* mt-2.

Pseudomonas putida TMB si distingue da *P. putida* mt-2 per due aspetti: (i) gli operoni *tmb* sono localizzati sul cromosoma ed hanno un organizzazione genica in cui l'operone codificante l'*upper pathway* ed i geni codificanti i regolatori TmbR e TmbS sono vicini tra loro; (ii) l'espressione dell'upper pathway *tmb* è indotta da MSA-HC che da MSA-COOH (Bestetti and Galli, 1987; Polissi *et al*., 1990) (fig. 71).

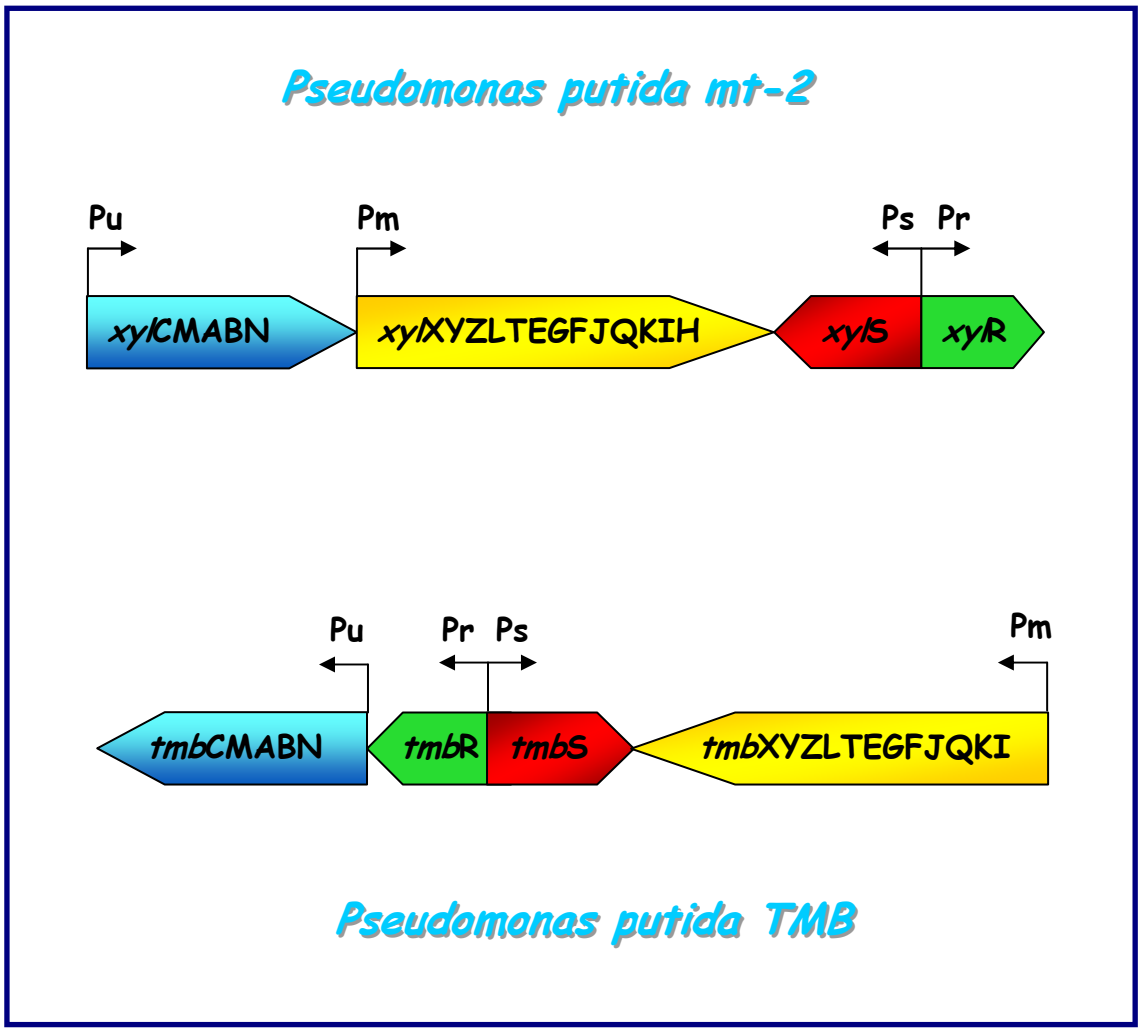


Figura 71: *organizzazione degli operoni xyl e tmb. Gli operoni tmb sono localizzati sul cromosoma batterico mentre gli operoni xyl sono localizzati sul plasmide pWW0.*

Il regolatore TmbR appartiene alla famiglia degli attivatori trascrizionali NtrC-*like*. È un polipeptide costituito da 581 residui aminoacidici con un peso molecolare di 65,43 kDa. I dati ottenuti dalla spettrometria di massa fanno ipotizzare che una proteina ad esso omologa potrebbe essere coinvolta nella regolazione della trascrizione dei geni *phe* in *Pseudomonas* sp. OX1. Tale proteina sarà indicata come TmbR-*like*.

3.19 Isolamento del gene codificante il regolatore TmbR-like

Il gene codificante il regolatore TmbR-*like* è stato isolato dal genoma di *P*. sp. OX1 mediante una reazione di PCR realizzata come indicato nel paragrafo 2.28 di Materiali e Metodi.

La sequenza nucleotidica codificante TmbR di P. putida TMB è disponibile nella banca dati NCBI (Acc. Num. AAA84988). Essa è stata allineata, utilizzando il programma ClustalW, con le sequenze di altri regolatori sigma-54 dipendenti, come mostrato nella figura seguente (fig. 72).

```
tmbR            ATGTGCTGCGGGGCGGATCATCCCGATAAAAACAAGAGAAAAACAATGTCGCTTATATAC 60
xylRpWW0        ------------------------------------------ATGTCGCTTACATAC 15
dmpRCF600       ------------------------------------------ATGCCGATCAAGTAC 15
touROX1         ------------------------------------------ATGGCAACCAGCTAT 15
                                                           *** *    *  **

tmbR            AAACCCAAGATGCAGCATGAGGATATGCAAGACCTTATCAGCCAGATCCGTTTCGTTGCC 120
xylRpWW0        AAACCCAAGATGCAGCATGAGGATATGCAAGACCTTAGCAGCCAGATCCGTTTCGTTGCC 75
dmpRCF600       AAGCCTGAAATCCAGCACTCCGATTTCAAGGACCTGACCAACCTGATCCACTTCCAGAGC 75
touROX1         AAGCCCCAGCTGAAATATTCTGATTTTCAGGATCTTACGGAGCAGATCCAGTTCCAAAGC 75
                ** **  *  *  *  *    *** *  * ** ** *     * *****  ***     *

tmbR            GGCGAAGGCAAGATCTGGCTGGGAGAGCAGCGCATGCTGCTAATGCAGCTATCTACGCTG 180
xylRpWW0        GCCGAAGGCAAGATCTGGTTGGGAGAGCAGCGCATGCTCGTAATGCAGCTATCTACGCTG 135
dmpRCF600       ATGGAAGGCAAGATCTGGCTTGGCGAACAGCGCATGCTGTTGCTGCAGTTTTCAGCGATG 135
touROX1         ACGGAAGGCAAAATCTGGTTAGGCGAGAAACGCATGCTACTGATGCAGCTCTCCGCCCTG 135
                   ******** ****** * ** **  * ********  *  ***** * **  *  **

tmbR            GCCAGCTTCCGCCGCGAAATTATCAGCTTGATCGGCATCGAGCGGGCCAAGGGTTTCTTC 240
xylRpWW0        GCCAGCTTCCGTCGCGAAATTATCAGCTTGATCGGCGTCGAGCGGGCCAAGGGTTTCTTC 195
dmpRCF600       GCCAGCTTTCGCCGGGAAATGGTCAATACCCTGGGCATCGAACGCGCCAAGGGCTTGTTC 195
touROX1         GCGGCATTTCGCCGGGAAATGGTCAACACCATCGGTATCGAGCGGGCAAAAGGTTTCTTT 195
                **    ** ** ** *****  ***      * **  **** ** ** ** ** ** **

tmbR            CTGCGGTTGGGCTATCAGTCCGGCCTGATGGATGCCGAGCTGGCACGCAAGCTGCGGCCG 300
xylRpWW0        CTGCGGTTGGGCTATCAGTCCGGCCTGATGGATGCCGAGCTGGCACGCAAGCTGCGGCCG 255
dmpRCF600       CTGCGCCATGGTTACCAGTCCGGCCTGAAGGATGCCGAACTGGCCAGGAAGCTGAGACCG 255
touROX1         CTTCGCCTCGGTTACCAGTCCGGCCTTAGGGATGCTGAACTCGCCCGCAAGCTGCGCCCG 255
                ** **    ** ** ********** * ****** ** ** **  * ****** * ***

tmbR            GCCATGCGCGAGGAGGAGGTGTTCCTGGCTGGGCCTCAATTGTACGCGCTCAAGGGGATG 360
xylRpWW0        GCCATGCGCGAGGAGGAGGTGTTCCTGGCTGGGCCTCAATTGTATGCGCTCAAGGGGATG 315
dmpRCF600       AATGCCAGCGAAGTCGGCATGTTCCTCGCTGGGCCGCAGATGCATTCACTCAAGGGTCTG 315
touROX1         CACTGCAGTGAGCTCGATATATTTCTGGCCGGACCACAACTCCACTCCCTGACGGGTATG 315
                       * **    *   * ** ** ** ** ** **  *  *  * ** * ***  **

tmbR            GTCAAAGTACGCTTGCTGACGATGGATATCGCCATCCGGGACGGACGTTTCAACGTGGAG 420
xylRpWW0        GTCAAAGTACGCTTGCTGACAATGGATATCGCCATCCGGGACGGACGTTTCAACGTGGAG 375
dmpRCF600       GTCAAGGTCCGCCCCACCGAGCTCGATATCGACAAGGAATACGGGCGCTTCTATGCCGAG 375
touROX1         GTGAAAGTGGTTCCTATCGAGATCGATATCGATCAGGAAACAGGGGGTTTTTACGGTGAG 375
                ** ** **              * *******           **  * **  * *  ***

tmbR            GCCGAGTGGATTGATTCCTTTGAAGTGGATATCTGCCGAACTGAGCTGGGCCTGATGAAT 480
xylRpWW0        GCCGAGTGGATTGATTCCTTTGAAGTGGATATCTGCCGAACTGAGCTGGGCCTGATGAAT 435
dmpRCF600       AG-GAGTGGATCGACTCCTTCGAGGTGGAAATCTGCCAGACCGACCTGGGGCAGATGCAA 434
touROX1         TTGGACTGGATTGATTCGTTCGAGGTGGAGATCTGCCAAACCGAGCTCGGCCAGATGAAC 435
                   ** ***** ** ** ** ** ***** *******  ** ** ** ** * **** *

tmbR            GAGCCCGTCTGCTGGACGGTGCTAGGCTATGCTAGCGGCTATGGTTCGGCATTCATGGGC 540
xylRpWW0        GAGCCCGTCTGCTGGACGGTGCTAGGCTATGCTAGCGGCTATGGTTCGGCATTCATGGGC 495
dmpRCF600       GACCCGGTGTGCTGGACTCTGCTCGGCTACGCCTGCGCCTATTCCTCGGCGTTCATGGGC 494
touROX1         GAACCCGTCTGCTGGTCCCTGCTAGGGTATGCTTGCGCCTATACCTCCTCATTCAGGGGC 495
                ** ** ** ****** *  **** ** ** **  *** ****   **  * **** ****
```

```
tmbR            CGCAGAATCATTTTCCAGGAAACTAGCTGTCGCGGGTGCGGTGACGATAAATGCCTTATC 600
xylRpWW0        CGCAGAATCATTTTCCAGGAAACTAGCTGTCGCGGGTGCGGTGACGATAAATGCCTTATC 555
dmpRCF600       CGGGAAATCATCTTCAAGGAAGTCAGCTGCCGCGGCTGCGGCGGCGACAAGTGCCGGGTC 554
touROX1         CGTCAGATCGTCTTTAGAGAAGTCACCTGTCGCGGCTGCGGCGATGAAAAGTGCCATATC 555
                **    *** * **    ***   * *** ***** ***** *  ** ** ****   **

tmbR            GTAGGCAAGACCGCAGAAGAGTGGGGCGATGTCAGCAGTTTCGAAGCCTACTTCAAAAGC 660
xylRpWW0        GTCGGCAAGACCGCAGAAGAGTGGGGCGATGTCAGCAGTTTCGAAGCCTACTTCAAAAGC 615
dmpRCF600       ATTGGCAAGCCGGCCGAAGAGTGGGACGACGTTGCCAGCTTCAAACAGTATTTCAAGAAC 614
touROX1         GTCGGCAAACCAGCAGAAGAGTGGGACGACGCCGAAGAATTCACCCAGTACTTCAAAGCA 615
                 * *****  * ** ********** *** *        ***      ** *****

tmbR            GACCCGATCGTAGACGAGCGCTACGAGCTGCAGACCCAGGTTGCCAACCTGCGCAACCGC 720
xylRpWW0        GACCCGATCGTAGACGAGCGCTACGAGCTGCAGACCCAGGTTGCCAACCTGCGCAACCGC 675
dmpRCF600       GACCCCATCATCGAGGAACTCTACGAGTTGCAATCGCAACTGTTGTCGCTGCGTACCAAC 674
touROX1         GACCCGATGATCGAAGAGCTCTACGACCTGCAGTCACAGGTGAGTTCGCTGCGCAGCAGT 675
                ***** **  * ** ** * ******  ****  * **  *       ***** * *

tmbR            CTGAAGCAGTACGATGGGCAGTATTACGGCATTGGCCATTCGCCAGCCTACAAGCGCATC 780
xylRpWW0        CTGAAGCAGTACGATGGGCAGTATTACGGCATTGGCCATTCGCCAGCCTACAAGCGCATC 735
dmpRCF600       CTCGACAAACAGGAAGGCCAGTACTACGGCATCGGTCAGACCCCGGCCTACCAGACCGTG 734
touROX1         CTTGAGAAACAGCAGGGCCAGTACTACGGGATTGGCCAGTCCGCGTCGTATAACAAGGTC 735
                **  *  *  *  * ** ***** ***** ** ** **  *  *  * **  *     *

tmbR            TGTGAGACCATCGACAAGGCTGCACGCGGCAAGGTTTCGGTTCTGCTACTGGGTGAGACT 840
xylRpWW0        TGTGAGACCATCGACAAGGCTGCACGCGGCAGGGTTTCGGTCCTGCTACTGGGTGAGACT 795
dmpRCF600       CGCAATATGATGGACAAGGCCGCACAGGGCAAAGTCTCGGTGCTGCTGCTTGGCGAGACC 794
touROX1         TGCAAAATGATCGACAAGGCCGCTCTGGGCAAGGTCTCGGTGCTTCTTCTGGGTGAGACT 795
                 *  * *  ** ******** ** *  ****  ** ***** ** ** ** ** *****

tmbR            GGGGTGGGCAAGGAGGTAATCGCGCGCAGCGTGCATTTGCGCAGTGAGCGCGCAGAGCAA 900
xylRpWW0        GGGGTGGGCAAGGAGGTAATCGCGCGCAGCGTGCATTTGCGCAGTGAGCGCGCAGAGCAA 855
dmpRCF600       GGGGTCGGCAAGGAGGTCATCGCGCGTAGCGTGCACCTGCGCAGCAAACGCGCCGCCGAG 854
touROX1         GGTGTGGGCAAAGAGGTTATTGCCAGAAGCGTTCATTTACGCAGTGAGCGGGCGGAACAA 855
                ** ** ***** ***** ** **  * ***** **  * *****  * ** ** *   *

tmbR            CCCTTCGTCGCGGTGAACTGTGCGGCAATTCCGCCGGATCTGATCGAGTCGGAACTGTTT 960
xylRpWW0        CCCTTCGTCGCGGTGAACTGTGCGGCAATTCCGCCGGATCTGATCGAGTCGGAACTGTTT 915
dmpRCF600       CCCTTTGTCGCGGTGAACTGTGCGGCGATCCCGCCGGACCTGATCGAGTCCGAATTGTTC 914
touROX1         CCTTTTATTGCCGTGAATTGCGCGGCCATACCGCCCGATCTCATTGAAGCGGAATTGTTT 915
                ** **  * ** ***** ** ***** ** ***** ** ** ** **  * *** ****

tmbR            GGTGTCGATAAGGGCGCCTATACGGGCGCGGTCAATGCACGCGCTGGACGTTTTGAACGG 1020
xylRpWW0        GGTGTCGATAAGGGCGCCTATACGGGCGCGGTCAATGCACGCGCTGGACGTTTTGAACGG 975
dmpRCF600       GGCGTGGAAAAAGGCGCCTTCACCGGCGCCACCCAGTCACGCATGGGCCGCTTCGAGCGG 974
touROX1         GGCGTCGAGAAGGGAGCCTACACTGGCGCAAATCAGTCCCGGCCGGGGCGTTTTGAGCGA 975
                ** ** ** ** ** ****  ** *****     *  * **    ** ** ** ** **

tmbR            GCCAACGGCGGCACCATCTTTCTTGATGAGGTGATCGAATTGACGCCGAGGGCTCAGGCC 1080
xylRpWW0        GCCAACGGCGGCACCATCTTTCTTGATGAGGTGATCGAATTGACGCCGAGGGCCCAGGCC 1035
dmpRCF600       GCCGACAAGGGCACCATCTTCCTTGACGAGGTGATCGAACTCAGCCCGCGCGCTCAGGCC 1034
touROX1         GCCCATGGCGGCACCATATTCCTGGACGAGGTAGTAGAGCTTACGCCCCGAGCCCAGGCA 1035
                *** *    ******** ** ** ** *****  * **  * *  **  * ** *****

tmbR            ACCCTGCTACGGGTATTGCAGGAAGGAGAGCTAGAGCGGGTCGGCGGCGACCGCACGCGA 1140
xylRpWW0        ACCCTGCTACGGGTATTGCAGGAAGGAGAGCTAGAGCGGGTCGGCGGCGACCGCACGCGA 1095
dmpRCF600       AGTCTGCTGCGCGTGCTGCAAGAAGGCGAGCTGGAGCGAGTTGGCGACAACCGCACGCGC 1094
touROX1         ACCTTGCTGAGGGTCCTGCAGGAAGGCGAACTGGAACGGGTGGGTGACAATCGCACGCGC 1095
                *   ****  * **  **** ***** ** ** ** ** ** ** * * * ********

tmbR            AAGGTCGACGTGAGGTTAATCACCGCAACAAACGAGAACCTGGAAGAGGCGGTCAAGATG 1200
xylRpWW0        AAGGTCGACGTGAGGTTAATCACCGCAACAAACGAGAACCTGGAAGAGGCGGTCAAGATG 1155
dmpRCF600       AAGATCGACGTAAGGGTTATCGCCGCCACCCACGAGGACCTGGCCGAAGCGGTCAAGGCC 1154
touROX1         TCAGTCAACGTCCGTGTAATCGCCGCCACCAATGAGAGCCTTGCCGAGGCGGTTGAGAGC 1155
                    ** ****  *  * *** **** **  * ***  *** *  ** *****  **

tmbR            GGGCGCTTTCGCGCAGACCTGTTCTTTCGGCTGAATGTTTTTCCCGTGCAGATCCCGCCG 1260
xylRpWW0        GGGCGCTTTCGCGCAGACCTGTTCTTTCGGCTGAATGTTTTTCCCGTGCATATCCCGCCG 1215
dmpRCF600       GGGCGTTTTCGCGCCGACCTGTACTACCGACTGAACGTTTTCCCGGTGGCGATCCCGGCG 1214
touROX1         GGCAAGTTCCGGGCAGATCTTTACTACCGTCTGAATGTTTTCCCGGTAAAGATTCCACCC 1215
                **    ** ** ** ** ** * **  ** ***** ***** ** **    ** **  *

tmbR            TTGCGCGAGCGCGTGGAAGACATCCCGCTGCTGGTCGAGCATTTTCTCAGAAGGCACCAT 1320
xylRpWW0        TTGCGCGAGCGCGTGGAAGATATCCCGCTGCTGGTCGAGCATTTTCTTAGAAGGCACCAT 1275
dmpRCF600       TTGCGCGAACGCCGCGAGGACATTCCACTGCTGGTTGAGCACTTCCTGCAGCGCTTCCAC 1274
touROX1         CTGCGGGAGCGCCTGGAAGACCTGCCATTATTGGCGGAACATTTCCTCAAGAAGTTCCAC 1275
                 **** ** ***   ** **  * **  *  ***  ** ** ** **         ***
```

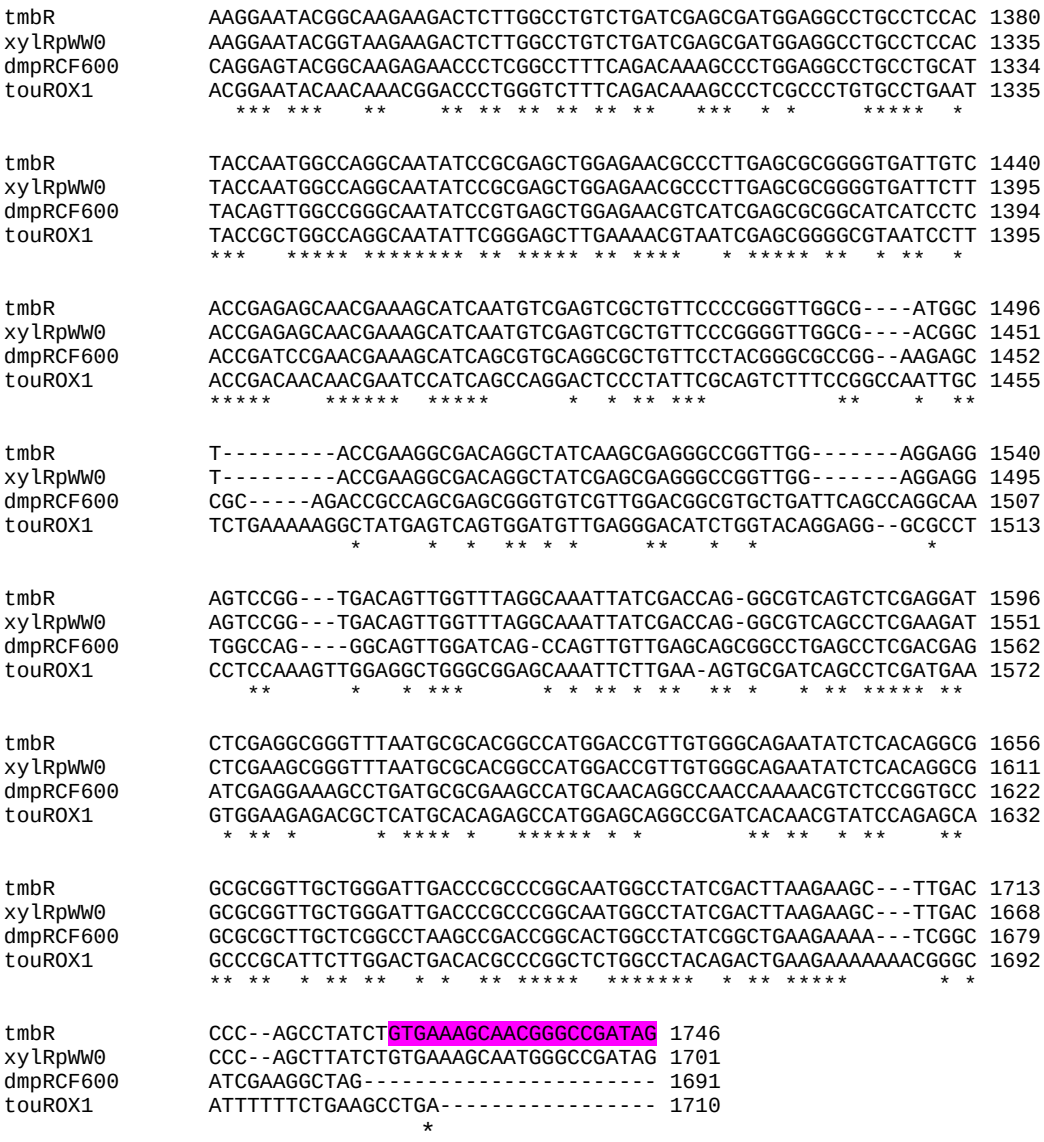


Figura 72: *allineamento delle sequenze nucleotidiche tmbR di P. putida TMB, xylR di P. putida mt-2, dmpR di P. sp. CF600 e touR di P. sp. OX1. Sono evidenziate le regioni a cui si appaiano i primers utilizzati per l'isolamento di tmbR-like.*

Il gene *tmbR* mostra il 98% di identità nucleotidica con *xylR*, mentre con *touR* e *dmpR* si registra il 66% e il 70% di identità, rispettivamente. La sequenza di *tmbR* si caratterizza per la presenza di una regione al 5' di 45 bp che manca nelle altre sequenze analizzate. Il primer senso Nde-Tmb for, utilizzato per isolare il gene *tmbR-like* dal genoma di *P.* sp. OX1, è omologo alla estremità 5' del gene *tmbR* di *P. putida* TMB (fig. 72). L'elevata percentuale di identità nucleotidica esistente tra il gene *tmbR* e *xylR* e la presenza, nel genoma di *P.* sp. OX1, degli operoni *xyl* genera una buona probabilità di isolare il gene codificante *xylR* anziché il gene *tmbR-like*: la natura del primer for dovrebbe consentire di selezionare solo il gene *tmbR-like* di interesse.

Per l'isolamento del gene *tmbR-like* è stata allestita una reazione di PCR, realizzata utilizzando il DNA genomico di *P.* sp. OX1 come stampo e la coppia di primers Nde-Tmb for/Bam-Tmb rev (par. 2.28): è stato prodotto un unico amplificato di circa 1700 bp (fig. 73), visibile su gel allo 0,8% di agarosio. La banda è stata quindi isolata dal gel e clonata nel vettore plasmidico pGEMT-Easy (fig. 74).

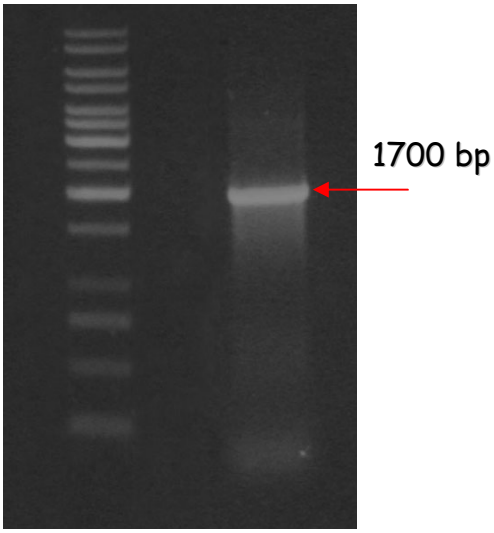


Figura 73: *Amplificazione del gene tmbR-like dal DNA genomico di P. OX1. Sono presenti gli 1 kb DNA ladders.*

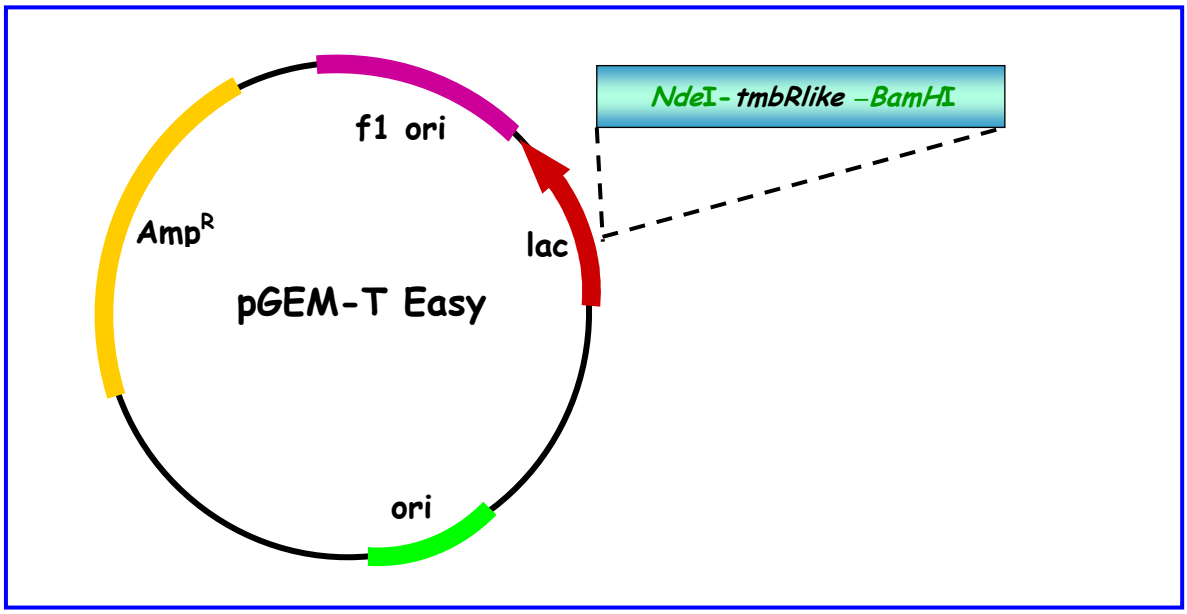


Figura 74: *rappresentazione schematica del clonaggio del gene tmbR-like in pGEM-T Easy*

Il plasmide ricombinante, denominato pGEMT-TmbRlike è stato utilizzato per trasformare cellule di *E. coli* del ceppo DH5α. Da alcune delle colonie selezionate risultate positive allo screening effettuato mediante colony PCR, usando i primers specifici per il gene, è stato estratto il DNA plasmidico, successivamente sottoposto a sequenziamento con i primers universali T7 ed SP6. La sequenza delucidata è lunga 1746 bp (fig.75).

1 **60**

ATGTGCTGCGGGGCGGATCATCCCGATAAAAACAAGAGAAAAACAATGTCGCTTATATAC
AAACCCAAGATGCAGCATGAGGATATGCAAGACCTTATCAGCCAGATCCGTTTCGTTGCC
GCCGAAGGCAAGATCTGGCTGGGAGAGCAGCGCATGCTGCTAATGCAGCTATCTACGCTG
GCCAGCTTCCGCCGCGAAATTATCAGCTTGATCGGCATCGAGCGGGCCAAGGGTTTCTTC
CTGCGGTTGGGCTATCAGTCCGGCCTGATGGATGCCGAGCTGGCACGCAAGCTGCGGCCG
GCCATGCGCGAGGAGGAGGTGTTCCTGGCTGGGCCTCAATTGTACGCGCTCAAGGGGATG
GTCAAAGTACGCTTGCTGACGATGGATATCGCCATCCGGGACGGACGTTTCAACGTGGAG
GCCGAGTGGATTGATTCCTTTGAAGTGGATATCTGCCGAACTGAGCTGGGCCTGATGAAT
GAGCCCGTCTGCTGGACGGTGCTAGGCTATGCTAGCGGCTATGGTTCGGCATTCATGGGC
CGCAGAATCATTTTCCAGGAAACTAGCTGTCGCGGGTGCGGTGACGATAAATGCCTTATC
GTAGGCAAGACCGCAGAAGAGTGGGGCGATGTCAGCAGTTTCGAAGCCTACTTCAAAAGC
GACCCGATCGTAGACGAGCGCTACGAGCTGCAGACCCAGGTTGCCAACCTGCGCAACCGC
CTGAAGCAGTACGATGGGCAGTATTACGGCATTGGCCATTCGCCAGCCTACAAGCGCATC
TGTGAGACCATCGACAAGCTGCACGCGGCAAGGTTTCGGTTCTGCTACTGGGTGAGACTG
GGGTGGGCAAGGAGGTAATCGCGCGCAGCGTGCATTTGCGCAGTGAGCGCGCAGAAGCAA
CCCTTCGTCGCGGTGAACTGTGCGGCAATTCCGCCGGATCTGATCGAGTCGGAACTGTTT
GGTGTCGATAAGGGCGCCTATACGGGCGCGGTCAATGCACGCGCTGGACGTTTTGACGGG
CCAACGGCGGCACCATCTTTCTTGATGAGGTGATCGAATTGACGCCGAGGGCCTCAGGCC
ACCCTGCTACGGGTATTGCAGGAAGGAGAGCTAGAGCGGGTCGGCGGCGACCGCACGCGA
AAGGTCGACGTGAGGTTAATCACCGCAACAAACGAGAACCTGGAAGAGGCGGTCAAGATG
GGGCGCTTTCGCGCAGACCTGTTCTTTCGGCTGAATGTTTTTCCCGTGCAGATCCCGCCG
TTGCGCGAGCGCGTGGAAGACATCCCGCTGCTGGTCGAGCATTTTCTCAGAAGGCACCAT
AAGGAATACGGCAAGAAGACTCTTGGCCTGTCTGATCGAGCGATGGAGGCCTGCCTCCAC
TACCAATGGCCAGGCAATATCCGCGAGCTGGAGAACGCCCTTGAGCGCGGGGTGATTCTC
ACCGAGAGCAACGAAAGCATCAATGTCGAGTCGCTGTTCCCCGGGTTGGCGATGGCTACC
GAAGGCGACAGGCTATCAAGCGAGGGCCGGTTGGAGGAGGAGTCCGGTGACAGTTGGTTT
AGGCAAATTATCGACCAGGGCGTCAGTCTCGAGGATCTCGAGGCGGGTTTAATGCGCACG
GCCATGGACCGTTGTGGGCAGAATATCTCACAGGCGGCGCGGTTGCTGGGATTGACCCGC
CCGGCAATGGCCTATCGACTTAAGAAGCTTGACCCCAGCCTATCTGTGAAAGCAACGGGC
CGA**TAG**

Figura 75: *sequenza nucleotidica del gene tmbR-like. Sono indicati in rosso i siti di inizio e di fine della trascrizione*

Un'analisi più approfondita della sequenza del gene *tmbR-like* è stata realizzata mediante l'uso di programmi disponibili in internet. In particolare si è voluta verificare la percentuale nell'identità di sequenza esistente tra il gene isolato da *Pseudomonas* sp. OX1 e i geni omologhi da specie diverse di *Pseudomonas.*

Gli allineamenti tra le sequenze sono stati realizzati con l'ausilio di programmi quali *Clustal W,* disponibile all'indirizzo internet http://www.expasy.org.

La sequenza del gene *tmbR-like* da *P*. sp. OX1 mostra il 98% e il 99% di identità con il gene *xylR* da *P. putida* mt-2 e da *P. putida* mt-53, rispettivamente; l'identità di sequenza tra il gene *tmbR-like* da *P*. sp. OX1 e il gene *tmbR* da *P.putida* TMB è del 99%; l'allineamento tra la sequenza del gene *tmbR-like* da *P*. sp. OX1 con i geni *touR* da *P*. sp. OX1 e il gene *dmpR* da *P*. sp. CF600 mostra un'identità del 67% e del 70%, rispettivamente.

La traduzione della sequenza del gene *tmbR-like* è stata effettuata utilizzando il programma *Traslate* disponibile al sito internet http://www.expasy.org. Allo stesso indirizzo internet, il programma *ProtParam* ha permesso l'analisi della struttura primaria della proteina TmbR-like, definendo caratteristiche chimico-fisiche come il pI e il peso molecolare.

L'analisi della sequenza nucleotidica del gene *tmbR-like* rivela una ORF che codifica per una putativa proteina di 588 amminoacidi, con un peso molecolare di 65,84 kDa ed un teorico pI di 8,43 (Fig. 76).

```
MCCGADHPDKNKRKTMSLIYKPKMQHEDMQDLISQIRFVAAEGKIWLGEQRMLLMQLSTL
ASFRREIISLIGIERAKGFFLRLGYQSGLMDAELARKLRPAMREEEVFLAGPQLYALKGM
VKVRLLTMDIAIRDGRFNVEAEWIDSFEVDICRTELGLMNEPVCWTVLGYASGYGSAFMG
RRIIFQETSCRGCGDDKCLIVGKTAEEWGDVSSFEAYFKSDPIVDERYELQTQVANLRNR
LKQYDGQYYGIGHSPAYKRICETIDKLHAARFRFCYWVRLGWARRUAGSRAACICAVSAQ
KQPFVAVNCAAIPPDLIESELFGVDKGAYTGAVNARAGRFDGPTAAPSFLMRUAGSNUAG
RRGPQATLLRVLQEGELERVGGDRTRKVDVRLITATNENLEEAVKMGRFRADLFFRLNVF
PVQIPPLRERVEDIPLLVEHFLRRHHKEYGKKTLGLSDRAMEACLHYQWPGNIRELENAL
ERGVILTESNESINVESLFPGLAMATEGDRLSSEGRLEEESGDSWFRQIIDQGVSLEDLE
AGLMRTAMDRCGQNISQAARLLGLTRPAMAYRLKKLDPSLSVKATGRStop
```

Figura 76: *Putativa sequenza amminoacidica del regolatore TmbR-like da P. sp. OX1.*

Come fatto precedentemente per le sequenze nucleotidiche, è stato interessante procedere all'allineamento della sequenza amminoacidica relativa alla proteina TmbR-like con quelle di altri regolatori NtrC-like. Le percentuali di identità delle sequenze proteiche sono riportate nella tabella in figura 77.

1	XylR PUTIDAmt2pWW0	566	2	XylR PUTIDAmt53pWW53	566	98
1	XylR PUTIDAmt2pWW0	566	3	TmbR PUTIDAtmb	581	98
1	XylR PUTIDAmt2pWW0	566	4	TmbRlike POX1	587	90
1	XylR PUTIDAmt2pWW0	566	5	TouR POX1	569	65
1	XylR PUTIDAmt2pWW0	566	6	DmpR CF600	563	66
2	XylR PUTIDAmt53pWW53	566	3	TmbR PUTIDAtmb	581	99
2	XylR PUTIDAmt53pWW53	566	4	TmbRlike POX1	587	91
2	XylR PUTIDAmt53pWW53	566	5	TouR POX1	569	65
2	XylR PUTIDAmt53pWW53	566	6	DmpR CF600	563	66
3	TmbR PUTIDAtmb	581	4	TmbRlike POX1	587	91
3	TmbR PUTIDAtmb	581	5	TouR POX1	569	65
3	TmbR PUTIDAtmb	581	6	DmpR CF600	563	66
4	TmbRlike POX1	587	5	TouR POX1	569	57
4	TmbRlike POX1	587	6	DmpRC F600	563	58
5	TouR POX1	569	6	DmpR CF600	563	71

Figura 77: *In rosso le identità di sequenza amminoacidica (%) fra la proteina TmbR-like di P. sp. OX1 e altri regolatori NtrC-like.*

Per confermare l'esatta natura del regolatore TmbR-like si procederà con l'isolamento del cDNA *TmbR-like* mediante RT-PCR, usando come stampo l'RNA totale estratto da *P.* sp. OX1 cresciuto su terreno M9 arricchito con malato, in presenza di fenolo o di *o*-cresolo per indurre l'espressione dei geni catabolici *tou* e *phe*. Vista la straordinaria identità di sequenza nucleotidica presente fra il gene *tmbR-like* e il gene *xylR*, esiste la possibilità che la strategia adottata per l'isolamento di *tmbR-like* dal genoma di *P.* sp. OX1 abbia portato ad isolare il gene *xylR-like*. Infatti, *P.* sp. OX1 conserva i geni per il catabolismo di *m*- e *p*-xilene omologhi ai geni *xyl* di *P. putida* mt-2. I geni *xyl-like* sono silenti: solo l'esposizione a *m*- e *p*-xilene potrebbe attivare questo *pathway* catabolico e silenziare il *tou pathway* per il catabolismo di toluene e di *o*-xilene. Quindi, in presenza di induttori catabolici quali fenolo o *o*-cresolo, i geni *xyl-like* non vengono espressi: in questo modo la cellula è protetta da un sovraccarico metabolico.

Il passo successivo per realizzare la caratterizzazione strutturale e funzionale della proteina TmbR-like sarà l'isolamento del gene *tmbR-like* dal plasmide pGEMT-TmbRlike in cui è stato clonato, mediante digestione con gli enzimi di restrizione *Nde*I e *Bam*HI, che trovano i loro siti nucleotidici di riconoscimento all'estremità 5' e 3' della sequenza. L'inserto escisso sarà poi clonato nel vettore di espressione pET22b(+), anch'esso previamente digerito con *Nde*I e *Bam*HI. Il costrutto pET-TmbRlike potrà essere utilizzato per l'espressione del regolatore TmbR-like.

Capitolo 4

Conclusioni

Pseudomonas sp. OX1 utilizza, come unica fonte di carbonio e di energia, l'*o*-xilene, il toluene, i cresoli ed alcuni dimetilfenoli. Questa capacità permette che tale microrganismo possa essere efficacemente impiegato per interventi di biorisanamento di aree inquinate da composti di natura aromatica.

La degradazione dei substrati aromatici procede attraverso la progressiva ossidazione dell'anello aromatico catalizzata dalla Toluene/*o*-xilene Monoossigenasi (ToMO) e dalla Fenolo idrossilasi (PH): tali complessi multienzimatici costituiscono l'*upper pathway* della via degradativa. Sia ToMO che PH presentano un range simile di substrati e pertanto la loro funzione appare ridondante.

Le molecole prodotte nell'*upper pathway* (catecoli e catecoli metil-sostituiti) sono poi convertite, dagli enzimi del *lower pathway,* in intermedi del ciclo di Krebs. I primi enzimi del *lower pathway* del batterio sono la catecolo 2,3 diossigenasi (C2,3O), enzima responsabile del taglio extradiolico dell'anello aromatico, la semialdeide 2-idrossimuconica deidrogenasi (HMSD) e la semialdeide 2-idrossimuconica idrolasi (HMSH).

P. sp. OX1, a livello fenotipico, non mostra alcuna similitudine con i ceppi TOL, sebbene conservi le informazioni genetiche per il catabolismo di *m*- e *p*-xilene. Infatti, nel suo cromosoma mappano geni *xyl* codificanti un *pathway* catabolico omologo al TOL *pathway* di *Pseudomonas putida* mt-2. Il primo enzima del TOL *upper pathway* è la xilene monoossigenasi (XMO). La contemporanea espressione di XMO e di ToMO sembra essere letale per il microrganismo. È stato dimostrato, infatti, che i due isomeri dello xilene sono parzialmente degradati da ToMO in composti estremamente tossici, il 3,5- e il 3,6-dimetilcatecolo. Per salvaguardare la cellula dalla tossicità di tali composti, i geni *xyl* non sono espressi, ma la loro conservazione conferisce un vantaggio selettivo alla popolazione batterica.

Pseudomonas sp. OX1 è il primo ceppo che degrada il toluene in cui un operone codificante una toluene-monoossigenasi (*tou operon)* è stato trovato associato ad un operone *dmp-like* (*phe operon*). Si ritiene che, in questo ceppo, il cluster genico codificante ToMO sia stato recentemente acquisito ed incorporato in una via preesistente per il catabolismo del fenolo.

L’acquisizione di un’attività enzimatica in grado di convertire gli idrocarburi in composti fenolici che possono così essere ulteriormente degradati attraverso il *pathway* preesistente, rappresenta un esempio di espansione verticale che risulta, inoltre, nelle attività enzimatiche ridondanti di ToMO e PH per la conversione dei fenoli in catecoli.

È noto il meccanismo che regola l’espressione dei geni *tou* in *P*. sp. OX1: un regolatore trascrizionale appartenente alla famiglia degli attivatori NtrC-*like*, detto TouR, controlla positivamente l’espressione di ToMO, che viene trascritto a partire da un promotore (P*tou*) sigma-54 dipendente.

L’obiettivo principale del presente lavoro di tesi è stata la comprensione delle proprietà cataboliche di alcuni enzimi del *meta cleavage pathway*, responsabili delle peculiari capacità degradative del batterio *Pseudomonas* sp. OX1; inoltre è stata effettuata la caratterizzazione del promotore dell’operone *phe* per arrivare alla comprensione dei meccanismi coinvolti nella regolazione dell’espressione di questo *pathway*. Tale progetto si è articolato in diversi punti.

In primo luogo, il lavoro di ricerca è stato indirizzato alla caratterizzazione biochimica degli enzimi Phe ADA e HOA del *lower-meta pathway* di *P*. sp. OX1. L’operone *phe* di *Pseudomonas* sp. OX1 presenta la stessa organizzazione genica dell’operone *dmp* per il catabolismo dei dimetilfenoli di *Pseudomonas* sp. CF600. Le proteine ADA e HOA, codificate dai geni *pheF* e *pheG*, rispettivamente, si associano in un complesso enzimatico bifunzionale grazie al quale il prodotto dell’aldolasi HOA, l’acetaldeide, è incanalata direttamente verso il sito attivo di ADA, proteggendo la cellula dalla sua tossicità. La deidrogenasi ADA trasforma l’acetaldeide in acetil-CoA. Quest’ultimo e il piruvato, prodotto da HOA insieme all’acetaldeide, sono i prodotti finali del *pathway* che verranno incanalati nel ciclo degli acidi tricarbossilici. Questo studio è iniziato con il clonaggio dei geni, per proseguire poi con l’espressione e la purificazione delle proteine ricombinanti. Successivamente è stata condotta una caratterizzazione cinetica dell’enzima ADA, impiegando estratti cellulari da *E. coli* esprimenti entrambe le proteine. Sono stati realizzati una serie di saggi che hanno permesso una prima valutazione della Km per l’acetaldeide che si può definire *approssimativa* dato che non sono stati condotti saggi sull’enzima purificato ma sull’estratto proteico totale di un ceppo di *E. coli* esprimente l’enzima d’interesse. Risulta chiaro che, in assenza di test relativi ad HOA, non eseguibili per la difficoltà di sintesi del substrato, questi dati non permettono di dimostrare il corretto assemblaggio e funzionamento del complesso enzimatico bifunzionale ADA-HOA ricombinante. Studi condotti sulle proteine omologhe di *E. coli* K12, hanno messo in evidenza che la deidrogenasi ADA (MphF) funziona come una proteina *chaperon* per il corretto *folding* della aldolasi HOA (MphE).

Sembra che l'espressione delle due proteine sia unita ad un meccanismo che previene un eccesso di produzione di MphE, che non può assumere la sua conformazione nativa in assenza di MphF. Quanto riportato per le proteine MphF e MphE di *E. coli* K12 ed il valore di Km registrato nei nostri saggi, molto simile alla Km per l'acetaldeide trovata per ADA *wilde-type* di *Pseudomonas* CF600, può far ipotizzare che l'aldolasi HOA sia presente nei nostri campioni e possa formare un complesso con ADA funzionalmente attivo. Se così non fosse avremmo probabilmente riportato per ADA un'attività enzimatica molto più bassa, indice dell'assenza o dell'inattività di HOA.

La seconda parte del progetto ha portato alla caratterizzazione del complesso enzimatico Xyl-like ADA-HOA. *Pseudomonas* sp. OX1 è capace di utilizzare *o*-xilene, il più recalcitrante alla degradazione tra gli isomeri dello xilene, come substrato di crescita, ma non può utilizzare *m*- e *p*-xilene come fonte di carbonio ed energia. L'isolamento di rari mutanti in grado di degradare *m*- e *p*-xilene e non più capaci di crescere in presenza di *o*-xilene ha suggerito che in *P.* sp. OX1 gli enzimi coinvolti nel catabolismo dei composti aromatici fossero codificati da geni cromosomici. Eventi di riarrangiamento genetico sono alla base della comparsa di questi mutanti: *P.* sp. OX1 è potenzialmente capace di metabolizzare i tre isomeri dello xilene ma questa capacità metabolica non è espressa simultaneamente.

I geni *xyl-likeQK,* codificanti le proteine ADA e HOA, sono stati isolati dal DNA genomico di *P.* sp. OX1 quindi sono stati realizzati sistemi per la loro espressione in *E. coli*. Estratti cellulari contenenti gli enzimi ricombinanti sono stati utilizzati per realizzare una parziale caratterizzazione cinetica della deidrogenasi xyl-like ADA. Successivamente, utilizzando le coordinate spaziali di DmpF e DmpG depositate nella banca dati PDB, è stato realizzato uno studio di *homolgy modeling* per costruire i modelli 3D delle proteine ricombinanti.

La caratterizzazione strutturale degli enzimi ricombinanti ADA e HOA ha portato all'elaborazione di strutture 3-D praticamente sovrapponibili allo stampo, rappresentato dalle strutture cristallografiche delle proteine DmpF e DmpG di *P.* CF600. Inoltre, i dati ottenuti dalle analisi cinetiche mostrano una efficienza catalitica di ADA xyl-like maggiore dell'efficienza mostrata da ADA phe.

La terza parte della ricerca ha portato all'isolamento del promotore dell'operone *phe.* La putativa regione promotrice è stata isolata mediante la produzione di frammenti di restrizione del cosmide pFB3411 che comprendono l'intera regione, tuttora sconosciuta, che separa il *cluster phe* da quello *tou*. L'analisi di sequenza nucleotidica è iniziata a partire dalla sequenza nota della prima subunità K del complesso PH ed è proseguita fino a coprire l'intera regione promotrice dell'operone *phe*. Tale regione è stata quindi caratterizzata mediante analisi *in silico*. Inoltre, utilizzando estratti proteici di *P.* sp. OX1 cresciuto in presenza di fenolo e frammenti biotinilati del promotore, è stato identificato, mediante esperimenti di south-western e spettrometria di massa LC MS/MS, un putativo fattore di regolazione della trascrizione dei geni *phe*, indicato come TmbR-like.

Le conoscenze fin'ora acquisite riguardo alle singole attività enzimatiche coinvolte nel catabolismo dei composti aromatici in *Pseudomonas* sp. OX1 e le informazioni relative ai meccanismi che regolano l'espressione dei geni catabolici, sono il punto di partenza per arrivare ad impiegare questo microrganismo per interventi di biorisanamento.

Nel batterio *P*. sp. OX1, così come in tutti i ceppi batterici finora studiati, i *pathway* metabolici tendono a convergere. I primi enzimi del *pathway*, in questo caso ToMO e PH, si caratterizzano per una bassa specificità di substrato e quindi per la capacità di ossidrilare un gran numero di composti aromatici. Al contrario gli enzimi successivi divengono progressivamente più specifici, consentendo l'introduzione di poche molecole nei *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 debbano necessariamente accordarsi con le nuove proprietà cataboliche. La caratterizzazione delle attività dell'operone *phe* di *P.* sp. OX1 può portare nella creazione di un *lower pathway* modificato in grado di degradare, ad esempio, i prodotti ottenuti in seguito al taglio dell'anello aromatico da parte della C2,3O che altrimenti non sarebbero metabolizzati. Inoltre, la capacità metabolica del batterio in esame può essere incrementata attraverso la razionale alterazione delle proprietà, quali la specificità di substrato, l'efficienza catalitica o la regioselettività, dei primi enzimi del *pathway*, i complessi ToMO e PH. Con riferimento agli studi riportati nella prima parte del presente progetto di tesi, gli enzimi ADA ed HOA potrebbero essere utilizzati nella costruzione di un nuovo *pathway* in grado di metabolizzare l'acetaldeide, altrimenti tossica per la cellula.

In generale, l’evoluzione di enzimi rilevanti per il recupero ambientale è possibile grazie a tecniche quali mutagenesi random, mutagenesi sito-specifica, DNA shuffling: in questo modo è possibile generare nuovi *pathways* catabolici, ingegnerizzare *pathways* per la degradazione di composti particolarmente recalcitranti, e sviluppare processi biocatalitici per la produzione di composti utili. Inoltre, le proteine di regolazione associate ai *pathways* catabolici possono essere utilizzate per la costruzione di biosensori.

I biosensori rappresentano un modo molto semplice e di facile impiego per la rilevazione degli inquinanti nell’ambiente. La maggior parte dei biosensori realizzati sono costituiti da regolatori quali DmpR o XylR, che attivano l’espressione di un gene reporter. Questi biosensori hanno una capacità di rilevazione dell’inquinante limitata a quelle molecole che sono i naturali effettori del regolatore *wild-type*. Lo sviluppo di regolatori mutanti può portare alla creazione di biosensori in grado di rilevare anche molecole che non sono riconosciute come gli effettori naturali dalla proteina di regolazione.

APPENDICE A

Abbreviazioni

ADA	aldeide deidrogenasi (acetilante)
ATP	adenosina 5'-trifosfato
bph	catabolismo di (cloro-)bifenili
BSA	Bovine Serum Albumin
C2,3O	catecolo 2,3 ossigenasi
CDE	catecolo diossigenasi extradiolica
CDI	catecolo diossigenasi intradiolica
CoA	coenzima A
dmp	catabolismo del fenolo/dimetilfenolo
DmpR	regolatore dell'operone dmp
dNTP	deossinucleotidi 5'-trifosfato
DTT	Dithiothreitol
EDTA	etilendiammino tetraacetato disodico
ESI	ElectroSpray Ionization
FAD, $FADH_2$	flavin adenina dinucleotide e la sua forma ridotta
HMS	semialdeide 2-idrossimuconica
HMSD	semialdeide 2-idrossimuconica deidrogenasi
HMSH	semialdeide 2-idrossimuconica idrolasi
HOA	4-idrossi-2-oxovalerato aldolasi
IPTG	isopropil-β-tiogalattoside
MS/MS	massa tandem
MSA-HC	methyl-substituted aromatic hydrocarbon(s)
MSA-COOH	methyl-substituted aromatic acid(s)
MOPS	3-(N-Morpholino) Ethanesulfonic Acid
$NAD(P)^+$	nicotinammide adenina dinucleotide (fosfato) ossidata
NAD(P)H	nicotinammide adenina dinucleotide (fosfato) ridotta
nah	catabolismo del naftalene
NahR	regolatore dell'operone nah (proteina)
NtrC	nitrogen-regulatory protein C

OD	densità ottica
4OD	4-oxalocrotonato decarbossilasi
OEH	2-oxopenta-4-dienoato idratasi
4OI	4-oxalocrotonato isomerasi
ORFs	open reading frames
PAGE	Polyacrylamide Gel Electrophoresis
PCR	reazione a catena della polimerasi
PH	phenol hydroxilase
Phe	operone di P.OX1
P_{ToMO}	promotore di ToMO
RP-HPLC	Reverse Phase High Performance Liquid Chromatography
TCA	ciclo degli acidi tricarbossilici
TDO	toluene diossigenasi
TMB	trimethylbenzene
tod	catabolismo del toluene
TOL	plasmide pWW0 per il catabolismo di toluene/xilene
ToMO	toluene/*o*-xilene monoossigenasi
tou	toluene/*o*-xylene utilization
TouR	regolatore di ToMO
TRIS	tris(idrossimetil)-amminometano
U	unità enzimatiche
UASs	upstream activating sequences
UV	ultravioletto
VIS	visibile
X-Gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galattoside
xyl	catabolismo di *m*- e *p*-xilene/ *m*- e *p*-toluato

APPENDICE B

Abbreviazioni degli amminoacidi

Glicina	Gly	G
Alanina	Ala	A
Valina	Val	V
Leucina	Leu	L
Isoleucina	Ile	I
Prolina	Pro	P
Fenilalanina	Phe	F
Tirosina	Tyr	Y
Triptofano	Trp	W
Serina	Ser	S
Treonina	Thr	T
Cisteina	Cys	C
Metionina	Met	M
Asparagina	Asn	N
Glutammina	Gln	Q
Aspartato	Asp	D
Glutammato	Glu	E
Lisina	Lys	K
Arginina	Arg	R
Istidina	His	H

Bibliografia

❖ **Achenbach, L. A., R. A. Bruce, U. Michaelidou, J. D. Coates, (2001).** *Dechloromonas agitata* N. N. gen., sp. nov. and *Dechlorosoma suillum* N. N. gen., sp. nov. Two novel environmentally dominant (per)chlorate-reducting bacteria and their phylogenetic position. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 51, 527-533.*

❖ **APAT.** Annuncio dei dati ambientali. *Edizione 2003*.

❖ **Applegate, B. M., S. R. Kehrmeyer, and G. S. Sayler, (1998).** A chromosomally based *tod-lux*CDABE whole-cell reporter for benzene, toluene, ethylbenzene, and xylene (BTEX) sensing. *Appl. Environ. Microbiol., 64, 2730-2735.*

❖ **Arenghi F.L.G., Barbieri P., Bertoni G. and de Lorenzo V. (2001).** New insights into the activation of *o*-xylene biodegradation in *Pseudomonas stutzeri* OX1 by pathway substrates. *Embo reports, 5, 409-414*.

❖ **Arenghi F.L.G., Berlanda D., Galli E., Sello G. and Barbieri P. (2001).** Organization and regulation of *meta* cleavage pathway genes for toluene and *o*-xylene derivative degradation in *Pseudomonas stutzeri* OX1. *Appl. Environ. Microbiol., 67, 3304-3308.*

❖ **Arenghi F.L.G., Pinti M., Galli E. and Barbieri P. (1999).** Identification of the *Pseudomonas stutzeri* OX1 toluene-*o*-xylene monooxygenase regulatory gene (touR) and of its cognate promoter. *Appl. Environ. Microbiol., 65, 4057-4063.*

❖ **Atlas, R. M., (1981).** Microbial degradation of petroleum hydrocarbons: an environmental perspective. *Microbiol. Rev., 45, 180-209.*

❖ **Atlas, R. M., (1995).** Petroleum biodegradation and oil spill bioremediation. *Mar. Poll. Bull., 31, 178-182.*

❖ **Baggi G., Barbieri P., Galli E. and Tollari S. (1987).** Isolation of a *Pseudomonas stutzeri* strain that degrades *o*-xylene. *Appl. Environ. Microbiol., 53, 2129-2131.*

❖ **Baggi G., Catelani D., Sorlini C. and Treccani V. (1982).** Microbial degradation of methylbenzenes: metabolism of 1,2,4-trimethylbenzene by *P. putida*. *Ann. Microbiol. 32, 37-45.*

❖ **Barbieri P, Arenghi FLG, Bretoni G, Bolognese F and Galli E (2001).** Evolution of catabolic pathways and metabolic versatility in *Pseudomonas stutzeri* OX1. *Antonie van Leeuwenhoek,* 79, *135–140.*

❖ **Barbieri P., Arenghi F. L. G., Bertoni G., Bolognese F. and Galli E. (2000).** Evolution of catabolic pathways and metabolic versatility in *Pseudomonas stutzeri* OX1. *Antoine van Leeuwenhoek, 79, 135-140*.

❖ **Barbieri P., Palladino L., Di Gennaro P. and Galli E. (1993).** Alternative pathways for *o*-xylene or *m*-xylene and *p*-xylene degradation in a *Pseudomonas stutzeri* strain. *Biodegradation, 4, 71-80.*

❖ **Benson S. and Shapiro J. (1978).** TOL is a broad-host-range plasmid. *J. Bacteriol., 135(1), 278-80.*

❖ **Bertoni G., Bolognese F., Galli E. and Barbieri P. (1996).** Cloning of the genes and characterization of the early stages of toluene and *o*-xylene catabolism in *Pseudomonas stutzeri* OX1. *Appl. Environ. Microbiol., 62, 3704-3711*

❖ **Bertoni G., Martino M., Galli E. and Barbieri P. (1998a).** Analysis of the gene cluster encoding toluene/*o*-xylene monooxygenase from *Pseudomonas stutzeri* OX1. *Appl. Environ. Microbiol., 64, 3626-3632.*

❖ **Bertoni, G., S. Marqués, and V. de Lorenzo, (1998b).** Activation of the toluene-responsive regulator XylR causes a transcriptional switch between σ^{54} and σ^{70} promoters at the divergent Pr/Ps region of the TOL plasmid. *Mol. Microbiol., 27, 651-659.*

❖ **Bestetti G. and Galli E. (1987).** Characterization of a novel TOL-like plasmid from *P. putida* involved in 1,2,4-trimethylbenzene degradation. *J. Bacteriol. 169, 1780-1783.*

❖ **Boll, M., and G. Fuchs, (1995).** Benzoyl-coenzyme A reductase (dearomatizing), a key enzyme of anaerobic aromatic metabolism. ATP dependence of the reaction, purification and some properties of the enzyme from *Thauera aromatica* strain K172. *Eur. J. Biochem., 234, 921-933.*

❖ **Boll, M., G. Fuchs, J. Heider, (2002).** Anaerobic oxidation of aromatic compounds and hydrocarbons. *Curr. Opin. Chem. Biol., 6, 604-611.*

❖ **Boll, M., S. J. P. Albracht, and G. Fuchs, (1997).** Benzoyl-CoA reductase (dearomatizing), a key enzyme of anaerobic aromatic metabolism. A study of adenosinephosphate activity, ATP stoichiometry of the reaction and EPR properties of the enzyme. *Eur. J. Biochem., 244, 840-851.*

❖ **Bolognese F., Di Lecce C., Galli E. and Barbieri P. (1999).** Activation and inactivation of *Pseudomonas stutzeri* methylbenzene catabolism pathways mediated by a transposable element. *Appl. Environ. Microbiol., 65, 1876-1882.*

❖ **Bradford M.M. (1976).** A rapid sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal.Biochem., 72, 248-254.*

❖ **Burlage, R. S., (1997).** Emerging technologies: bioreporters, biosensors, and microprobes, *p. 115-123. In C. J. Hurst, G. R. Knudsen, M. J. McInerney, L. D. Stetzenbach, and M. V. Walter (ed.), Manual of environmental microbiology. ASM Press, Washington, D. C.*

❖ **Burlage, R. S., S. W. Hooper, and G. S. Sayler, (1989).** The TOL (pWWO) catabolic plasmid. *Appl. Environ. Microbiol., 55, 1323-1328.*

❖ **Cadieux E., Vrajmasu V., Achim C., Powlowski J. and Munck E. (2002).** Biochemical, Mossbauer and EPR studies of diiron cluster of phenol hydroxylase from *Pseudomonas* sp. strain CF600. *Biochemistry, 41, 10680-10691.*

❖ **Cafaro V, Scognamiglio R, Viggiani A, Izzo V, Passaro I, Notomista E, Piaz FD, Amoresano A, Casbarra A, Pucci P, Di Donato A. (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.*

❖ **Cafaro V., Izzo V., Scognamiglio R., Notomista E., Papasso P., Casbarra A., Pucci P., and Di Donato A. (2004).** Phenol Hydroxylase and Toluene/o-Xylene Monooxygenase from *Pseudomonas stutzeri* OX1: interplay between two enzymes. *Appl Environ Microbiol, 70(4), 2211-9.*

❖ **Chakraborty, R., and J. D. Coates, (2004).** Anaerobic degradation of monoaromatic hydrocarbons. *Appl. Microbiol. Biotechnol., 64, 437-446.*

❖ **Chaloupkova, R. (2003),** Modification of activity and specificity of haloalkane dehalogenase from Sphingomonas paucimobilis UT26 by engineering of its entrance tunnel. *J Biol Chem, 278, 52622-52628.*

❖ **Chung C.T. and Miller R.H. (1988).** A rapid and convenient method for the preparation and storage of competent bacterial cells. *Nucleic Acid Research, 16, 3580.*

❖ **Cladera A .M., de C Sepùlveda-Torres L., Valens-Vadell M., Meyer J. M., Lalucat J. and Valdès E. G. (2006).** A detailed phenotypic and genotypic description of *Pseudomas* strain OX1. *Systemic and Applied Microbiology, 29, 422-430.*

❖ **Coates, J. D., R. Chakraborty, and M. J. McInerney, (2002).** Anaerobic benzene biodegradation-a new era. *Res. Microbiol., 153, 621-628.*

❖ **Coates, J. D., R. Chakraborty, J. G. Lack, S. M. O'Connor, K. A. Cole, K. S. Bender, and L. A. Achenbach, (2001).** Anaerobic benzene oxidation coupled to nitrate reduction in pure culture by two strains of *Dechloromonas. Nature, 411, 1039-1043.*

❖ **Damborsky, J., M. Damborska, S. Stipek, A. Jesenska, L. Trantirek, and V. Sklenar, (2000).** Effect of the carbon source on assessment of degrading bacteria with the spread-plating technique during *in situ* bioremediation. *Folia Microbiol., 45, 35-40.*

❖ **de Lorenzo, V. (1993).** Engineering of alkyl- and haloaromatic-responsive gene expression with mini-transposons containing regulated promoters of biodegradative pathway of Pseudomonas. *Gene, 130, 41-46.*

❖ **de Lorenzo, V. and Timmis K.N. (1994).** Analysis and construction of stable phenotypes in gram-negative bacteria withTn5- and Tn10-derived minitransposons. *Methods Enzymol., 235, 386-405.*

❖ **de Lorenzo, V., (2001).** Cleaning up behind us. *Embo reports, 2, 357-359.*

❖ **Deeth R. J. and Bugg T. D. (2003).** A density functional investigation of the extradiol cleavage mechanism in non-heme iron catechol dioxygenase. *J. Biol. Inorg. Chem., 8, 409-418.*

❖ **Delgado A. and Ramos J. L. (1994).** Genetic evidence for activation of the positive transcriptional regulator XylR, a member of the NtrC family of regulators, by effector binding. *J. Biol. Chem., 269, 8059-8062.*

❖ **Di Lecce C., Accarino M., Bolognese F., Galli E. and Barbieri P. (1997).** Isolation and metabolic characterization of a *Pseudomonas stutzeri* mutant able to grow on the three isomers of xylene. *Appl. Environ. Microbiol., 63, 3270-3281.*

❖ **Diamand, E. (1999).** Genetically modified organism and monitoring. *J Environ Monit, 1, 108-110.*

❖ **Drobnik, J. (1999).** Genetically modified organisms (GMO) in bioremediation and legislation. *International Biodeterioration & Biodegradation, 44, 3-6.*

❖ **Ellis, L.B., Hershberger C.D. and L.P. Wackett (1999).** The University of Minnesota Biocatalysis/Biodegradation Database: specialized metabolism for functional genomics. *Nucleic Acid Res, 27, 373-376.*

❖ **Ellis, L.B., Hershberger C.D. and L.P. Wackett (2000).** The University of Minnesota Biocatalysis/Biodegradation Database: microorganism, genomics and prediction. *Nucleic Acid Res, 28, 377-379.*

❖ **Ellis, L.B., Hershberger C.D. and L.P. Wackett (2003).** The University of Minnesota Biocatalysis/Biodegradation Database: post-genomic data mining. *Nucleic Acid Res, 31, 262-265.*

❖ **Engesser K. L., Cain R. B. and Knackmuss H. J. (1988).** Bacterial metabolism of side chain fluorinated aromatics: cometabolism of 3-trifluoromethyl (TFM)-benzoate by *Pseudomonas putida (arvilla)* mt-2 and *Rhodococcus rubropertinctus* N657. *Arch. Microbiol., 149, 188-197.*

❖ **Entsch B., Ballou D. P. and Massey V. (1976).** Flavin-oxygen derivatives involved in hydroxylation by p-hydroxybenzoate hydroxylase. *J. Biol. Chem., 2550-63.*

❖ **Fernandez S., de Lorenzo V. and Pérez-Martin J. (1995).** Activation of the transcriptional regulator XylR of *Pseudomonas putida* by release of repression between functional domains. *Mol. Microbiol., 16, 205-213*.

❖ **Fetzner, S. and F. Lingens, (1994).** Bacterial dehalogenases: biochemistry, genetics, and biotechnological applications. *Microbiol. Rev., 58, 641-685.*

❖ **Gallegos, M. T., S. Marqués, and J. L. Ramos, (1996).** Expression of the TOL plasmid *xyl*S gene in *Pseudomonas putida* occurs from a σ^{70}-dependent promoter or from σ^{70}- and σ^{54}-dependent tandem promoters according to the compound used for growth. *J. Bacteriol., 178, 2356-2361*.

❖ **Gallert, C., G. Knoll, and J. Winter, (1991).** Anaerobic carboxylation of phenol to benzoate: use of deuterated phenols revealed carboxylation exclusively in the C4-position. *Appl. Microbiol. Biotechnol., 36, 124-129.*

❖ **Galli, E., P. Barbieri, and G. Bestetti, (1992).** Potential of *Pseudomonas* in the degradation of methylbenzenes, *p. 268-276 in E. Galli, S. Silver and B. Witholt (ed.), Pseudomonas*: *Molecular Biology and Biotechnology*. *American Society for Microbiology, Washington, D. C.*

❖ **Gibson J. and C. S. Harwood, (2002).** Metabolic diversity in aromatic compound utilization by anaerobic microbes. *Annu. Rev. Microbiol., 56, 345-369.*

❖ **Gibson, D. T., G. J. Zylstra, and S. Chauhan, (1990).** Biotransformations catalyzed by toluene dioxygenase from *Pseudomonas putida* F1, *p. 121-132 in S. Silver, A. M. Chakrabarty, B. Iglewski, and S. Kaplan (ed.), Pseudomonas: biotransformations, pathogenesis, and evolving biotechnology. American Society for Microbiology, Washington, D. C.*

❖ **Gibson, D. T., M. Hensley, H. Yoshioka, and T. J. Mabry, (1970).** Formation of (+)-*cis*-2,3-dihydroxy-1-methylcyclohexa-4,6-diene from toluene by *Pseudomonas putida*. *Biochemistry, 9, 1626-1630.*

❖ **Glick B. R., and Jack J. Pasternak. (1998).** Molecular Biotechnology. Principles and applications of recombinant DNA. Chapter 13: Bioremediation and use of biomass.

❖ **Gorny, N. and B. Schink, (1994 a).** Anaerobic degradation of catechol by *Desulfobacterium* sp. strain Cat2 proceeds via carboxylation to protocatechuate. *Appl. Env. Microbiol., 60, 3396-3400.*

❖ **Greated A, Lambertsen L, Williams PA, Thomas CM (2002).** Complete sequence of the IncP-9 TOL plasmid pWW0 from Pseudomonas putida. *Environ Microbiol. 4(12), 856-71*.

❖ **Haner, A., P. Hohener, and J. Zeyer, (1995).** Degradation of *p*-xylene by a denitrifying enrichment culture. *Appl. Environ. Microbiol., 61, 3185-3188.*

❖ **Harayama S., Leppik R. A., Rekik M., Mermod N., Lehrbach P. R., Reineke W. and Timmis K. N. (1986).** Gene order of the TOL catabolic plasmid upper pathway operon and oxidation of both toluene and benzyl alcohol by *xyl*A product. *J. Bacteriol., 167, 455-461*

❖ **Haro, M.A. and V. de Lorenzo (2001).** Metabolic engineering of bacteria for environmental applications: construction of Pseudomonas strain for biodegradation of 2-chlorotoluene. *Journal of Biotechnology, 85, 103-113.*

❖ **Heider, J., and G. Fuchs, (1997).** Anaerobic metabolism of aromatic compounds . *Eur. J. Biochem., 243, 577-596.*

❖ **Heitzer, A., B. Applegate, S. Kehrmeyer, H. Pinkart, O. F. Webb, T. J. Phelps, D. C. White, and G. S. Sayler, (1998).** Physiological considerations of environmental applications of *lux* reporter fusions. *J. Microbiol. Methods, 33, 45-57.*

❖ **Herrero, M., V. de Lorenzo, and K.N. Timmis (1990).** Transposon vectors containing conantibiotic resistance selection markers for cloning stable chromosomal insertion of foreign genes in gram-negative bacteria. *J Bacteriol, 172, 6557-6567.*

❖ **Hess, A., B. Zarda, D. Hahn, A. Haner, D. Stax, P. Hohener, and J. Zeyer, (1997).** *In situ* analysis of denitrifying toluene- and *m*-xylene degrading bacteria in a diesel fuel-contaminated laboratory aquifer column. *Appl. Environ. Microbiol., 65, 2136-2141.*

❖ **Holtel, A., M. A. Abril, S. Marqués, K. N. Timmis, and J. L. Ramos, (1990).** Promoter-upstream activator sequences are required for expression of the *xyl*S gene and *upper-pathway* operon on the *Pseudomonas* TOL plasmid. *Mol. Microbiol., 4, 1551-1556.*

❖ **Hou, B.K., L.P. Wackett, and L.B. Ellis (2003).** Microbial pathway prediction: a functional group approach. *J Chem Inf Comput Sci, 43, 1051-1057.*

❖ **Jain, R.K. and G.S. Sayler (1987).** Problems and potential for in situ treatment of environmental pollutants by engineered microorganism. *Microbiol. Sci., 4, 59-63.*

❖ **Jindrova, E., M. Chocova, K. Demnerova, V. Brenner (2002).** Bacterial aerobic degradation of benzene, toluene, ethylbenzene and xylene. *Folia Microbiol., 47, 83-93.*

❖ **Kim S., Shin H. J., Kim Y., Kim S. J. and Kim Y. C. (1997)**. Nucleotide sequence of the *Pseudomonas* sp. DJ77 *phn*G gene encoding 2-hydroxymuconic semialdehyde dehydrogenase. *Biochem. Biophys. Res. Commun., 240, 41-45.*

❖ **Kimura, N. (1997).** Functional analyses of a variety of chimeric dioxygenases constructed from two biphenyl dioxygenases that are similar structurally but different functionally. *J Bacteriol, 179, 3936-3943.*

❖ **King, J. M. H., P. M. DiGrazia, B. Applegate, R. Burlage, J. Sanseverino, P. Dunbar, F. Larimer, and G. S. Sayler, (1990).** Rapid, sensitive bioluminescent reporter technology for naphthalene exposure and biodegradation. *Science, 249, 778-781.*

❖ **Kita A., Kita S., Fujisawa I., Inaka K., Ishida T., Horiike K., Nozaki M. and Miki K. (1999).** An archetypical extradiol-cleaving catecholic dioxygenase: the crystal structure of catechol 2,3 dioxygenase (*meta*pyrocatechase) from *Pseudomonas putida* mt-2. *Structure Fold. Des., 7, 25-34.*

❖ **Klein, J., J. Altenbuchner, and R. Mattes, (1997).** Genetically modified *Escherichia coli* for colorimetric detection of inorganic and organic Hg compounds. *EXS, 80, 133-151.*

❖ **Koch, J., and G. Fuchs (1992).** Enzymatic reduction of benzoyl-CoA to alicyclic compounds, a key reaction in anaerobic aromatic metabolism. *Eur. J. Biochem., 205, 195-202.*

❖ **Koch, J., W. Eisenreich, A. Bacher and G. Fuchs, (1993).** Products of enzymatic reduction of benzoyl-CoA, a key reaction in anaerobic aromatic metabolism. *Eur. J. Biochem., 211, 649-661.*

❖ **Köhler, S., S. Belkin, and R. D. Schmid, (2000).** Reporter gene bioassays in environmental analysis. *Fresenius J. Anal. Chem., 366, 769-779.*

❖ **Kolata, G. (1985),** How safe are engineered organism? *Science, 229, 34-35.*

❖ **Krieger, C. J. (1999).** Initial reactions in anaerobic oxidation of *m*-xylene by the denitrifying bacterium *Azoarcus* sp. strain T. *J. Bacteriol., 181, 6403-6410.*

❖ **Kuhn, E. P., J. Zeyer, P. Eicher, and R. P. Schwarzenbach (1988).** Anaerobic degradation of alkylated benzenes in denitrifying laboratory aquifer columns. *Appl. Environ. Microbiol., 54, 490-496.*

❖ **Kumumaru, T. (1998),** Enhanced degradation of polychlorinated biphenyls by directed evolution of biphenyl dioxygenase. *Nat Biotechnol., 16, 663-666.*

❖ **Kunz D. A. and Chapman P. J. (1981a).** Catabolism of pseudocumene and 3-ethyltoluene by *Pseudomonas putida* mt-2: evidence for new fuctions of the TOL (pWWO) plasmid. *J. Bacteriol., 146, 179-191.*

❖ **Kunz D. A. and Chapman P. J. (1981b).** Isolation and characterization of spontaneously occurring TOL plasmid mutants of *Pseudomonas putida* HS1. *J. Bacteriol., 146, 952-964.*

❖ **Kustu S., North A. K. and Weiss D. S. (1991).** Prokaryotic transcriptional enhancer and enhancer binding proteins. *Trends Biochem. Sci., 16, 397-402.*

❖ **Laemmli U.K. (1970).** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature, 227, 680-684.*

❖ **Lau P.C.K. and Lorenzo V.D.E. (1999).** Genetic engineering: the frontier of bioremediation. *Environ Sci Technol, 4, 124A-128A.*

❖ **Lee S.J, Ko J.H, Kang H.Y and Lee Y. (2006).** Coupled expression of MhpE aldolase and MhpF dehydrogenase in *Escherichia coli*. *Biochemical and Biophysical Research Communications, 346, 1009-1015.*

❖ **Leuthner B., C. Leutwein, H. Schulz, P. Horth, W. Haehnel, E. Schiltz, H. Schagger, and J. Heider (1998).** Biochemical and genetic characterization of benzylsuccinate synthase from *Thauera aromatica*: a new glycyl radical enzyme catalysing the first step in anaerobic toluene metabolism. *Mol. Microbiol., 28, 615-628.*

❖ **Manjasetty B. A., Powlowski J. and Vrielink A. (2003).** Crystal structure of a bifunctional aldolase-dehydrogenase: sequestering a reactive and volatile intermediate. *PNAS, 100, 6992-6997*.

❖ **Marqués, S., M. T. Gallégos, M. Manzanera, A. Holtel, K. N. Timmis, and J. L. Ramos, (1998).** Activation and repression of transcription at the double tandem divergent promoters for the *xyl*R and *xyl*S genes of the TOL plasmid of *Pseudomonas putida*. *J. Bacteriol., 180, 2889-2894.*

❖ **Martinez D., E. Pocurull, R. Marce, F. Borrull, and M. Calull, (1996).** Separation of eleven priority phenols by capillary zone electrophoresis with ultraviolet detection. *J. Chromatogr. A, 734, 367-373.*

❖ **Merrick M. J. (1993).** In a class of its own – the RNA polymerase factor σ^{54} (σ^{N}). *Mol. Microbiol., 10, 903-909.*

❖ **Molin, S. (1993).** Environmental potential of suicide genes. *Curr Opin Biotechnol, 4, 299-305.*

❖ **Molin, S. (1993).** Suicidal genetic elements and their use in biological containment of bacteria. *Annu Rev Microbiol, 47, 139-166.*

❖ **Morett E. and Segovia L. (1993).** The σ^{54} bacterial enhancer-binding protein family: mechanism of the action and phylogenetic relationship of their functional domains. *J. Bacteriol., 175, 6067-6074*.

❖ **Ng L. C., O'Neill E. and Shingler V. (1996).** Genetic evidence for interdomain regulation of the phenol-responsive final σ^{54}-dependent activator DmpR. *J. Biol. Chem., 271, 17281-17286*.

❖ **Nordlund I., Powlowski J. and Shingler V. (1990).** Complete nucleotide sequence and polypeptide analysis of multicomponent phenol hydroxylase from *Pseudomonas* sp. strain CF600. *J. Bacteriol. 6826-33.*

❖ **North A. K., KloseK. E., Stedman K. M. and Kustu S. (1993).** Prokaryotic enhancer-binding proteins reflect eucaryotic-like modularity: the puzzle of nitrogen regulatory protein C. *J. Bacteriol., 175, 4267-4273*.

❖ **Nozaki M., Kotan S., Ono K. and Seno S. (1970).** *Meta*pyrocatechase. 3. Substrate specificity and mode of the ring fission. *Biochim. Biophis. Acta., 220, 213-223.*

❖ **O'Neill E., Wilstrom P. and Shingler V. (2001).** An active role for a structured B-linker in effector control of the sigma54-dependent regulator DmpR. *EMBO J. 20, 819-827.*

❖ **Olsen, R. H., J. J. Kukor, and B. Kaphammer (1994).** A novel toluene-3-monooxygenase pathway cloned from *Pseudomonas pickettii* PKO1. *J. Bacteriol., 176, 3749-3756.*

❖ **Panke, S., J.M. Sanchez-Romero, and V. de Lorenzo (1998),** Engineering of quasi-natural *Pseudomonas putida* strains for toluene metabolism throught an ortho-cleavage degradation pathway. *Applied and Environmental Microbiology, 64(2), 748-751*.

❖ **Pavel H., Forsman M. and Shingler V. (1994).** An aromatic effector specificity mutant of the transcriptional regulator DmpR overcomes the growth constraints of *Pseudomonas* sp. strain CF600 on *para*-substituted methylphenols. *J. Bacteriol., 176, 7550-7557*.

❖ **Pazos, F., A. Valencia, and V. de Lorenzo (2003),** The organization of the microbial biodegradation network from a systems-biology perspective. *EMBO reports, 4(10), 994-999.*

❖ **Pérez-Martin J. and de Lorenzo V. (1996a).** ATP binding to the σ^{54}-dependent activator XilR triggers a protein multimerization cycle catalized by UAS DNA. *Cell, 86, 331-339.*

❖ **Pérez-Martin J. and de Lorenzo V. (1996b).** *In vitro* activities of an N-terminal truncated form of XilR, a σ^{54}-dependent transcriptional activator of *Pseudomonas putida*. *J. Mol. Biol., 258, 575-587*.

❖ **Pérez-Martin J., Rojo F. and de Lorenzo V. (1994)**. Promoters responsive to DNA bending: a common theme in prokaryotic gene expression. *Microbiol. Rev., 58, 268-290*.

❖ **Pieper, D.H. and W. Reineke (2000).** Engineering bacteria for bioremediation. *Curr Opin Biotechnol, 11, 262-270.*

❖ **Polaina J. and Adam A.C. (1991).** A fast procedure for yeast DNA purification. *Nucleic Acid Res., 19.*

❖ **Polissi A., Bestetti G., Bertoni G., Galli E. and Dehò G. (1990).** Genetic analysis of chromosomal operons involved in degradation of aromatic hydrocarbons in *P. putida* TMB. *J. Bacteriol. 172, 6355-6362.*

❖ **Porter S. C., North A. K. and Kustu S. (1995)**. Mechanism of transcriptional activation by NtrC (nitrogen regulatory protein C): requirement for oligomerization and phosphorylation. In *Two-component Signal Transduction*. Silhavy T. and Hoch J. (ed). *Washington, D.C.: ASM Press, 147-158.*

❖ **Porter S. C., North A. K., Wedel A. B. and Kustu S. (1993).** Oligomerization of NtrC at the *gln*A enhancer is required for transcriptional activation. *Genes Dev., 7, 2258-2273*.

❖ **Powlowski J, Sahlman L, Shingler V. (1993).** Purification and properties of the physically associated meta-cleavage pathway enzymes 4-hydroxy-2-ketovalerate aldolase and aldehyde dehydrogenase (acylating) from *Pseudomonas* sp. strain CF600. *J Bacteriol. 175(2), 377-85*.

❖ **Powlowski J. and Shingler V. (1990).** *In vitro* analysis of polypeptide requirements of multicomponent phenol hydroxylase from *Pseudomonas* sp. strain CF600. *J. Bacteriol., 6834-40*.

❖ **Powlowski J. and Shingler V. (1994).** Genetics and biochemistry of phenol degradation by *Pseudomonas* sp. CF600. *Biodegradation, 5, 219-236*.

❖ **Quel L. Jr. (1993).** The cathecol dioxygenase**.** *Adv. Inorg. Biochem., 5, 167-199.*

❖ **Rabus, R., and F. Widdel, (1995).** Anaerobic degradation of ethylbenzene and other aromatic hydrocarbons by new denitrifying bacteria. *Arch. Microbiol., 163, 96-103.*

❖ **Ramos, J.L., et al. (1987).** Redesigning metabolic routes: manipulation of TOL plasmid pathway for catabolism of alkybenzoates. *Science, 235, 593-596.*

❖ **Ramos-Gonzalez M I, Duque E and Ramos J L (1991).** Conjugational transfer of recombinant DNA in cultures and in soils: host range of Pseudomonas putida TOL plasmids. *Appl Environ Microbiol., 57(10), 3020–3027.*

❖ **Reineke, W. and H.J. Knackmuss (1980),** Hybrid Pathway for Chlorobenzoate Metabolism in Pseudomonas sp. B13 Derivatives. *Journal of Bacteriology, 142(2), 467-473.*

❖ **Ripp, S., D. E. Nivens, Y. Ahn, C. Werner, J. Jarrell IV, J. P. Easter, C. D. Cox, R. S. Burlage, and G. S. Sayler, (2000).** Controlled field release of a bioluminescent genetically engineered microorganism for bioremediation process monitoring and control. *Environ. Sci. Technol., 34, 846-853.*

❖ **Ronchel, M.C. (1995).** Construction and behavior of biologically contained bacteria for environmental applications in bioremediation. *Appl Environ Microbiol, 61, 2990-2994.*

❖ **Rui, L. (2004).** Saturation Mutagenesis of Toluene ortho-Monooxygenase of Burkholderia cepacia G4 for Enhanced 1-Naphthol Synthesisand Chloroform Degradation. *Applied and Environmental Microbiology, 7(6), 3246-3252.*

❖ **Sambrook J., Fritsch E.F. and Maniatis T. (1989).** Molecular cloning. A laboratory manual. Second edition. *Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, N.Y.*

❖ **Sato N., Uragami Y., Nishizaki T., Takahashi Y., Sazaki G., Sugimoto K., Nonaka T., Masai E., Fuxuda M. and Senda T. (2002).** Crystal structure of the reaction intermediate and its homologue of an extradiol-cleaving cathecolic dioxygenase. *J. Mol. Biol., 321, 621-636.*

❖ **Schell M. A. (1985).** Transcriptional control of the *nah* and *sal* hydrocarbon-degradation operons by the *nah*R gene product. *Gene, 36, 301-309.*

❖ **Schell M. A. (1993).** Molecular biology of the LysR family of transcriptional regulators. *Annu. Rev. Microbiol., 47, 597-626.*

❖ **Schevchenko A.**, **Wilm M., Vorm O., Mann M. (1996).** Mass spectrometric sequencing of proteins Silver stained polyacrylamide gels. *Analytical Chemistry, 68, 850-858.*

❖ **Scott, D. L., S. Ramanathan, W. Shi, B. P. Rosen, and S. Daunert, (1997).** Genetically engineered bacteria: electrochemical sensing systems for antimonite and arsenite. *Anal. Chem., 69, 16-20.*

❖ **Senda T., Yamada T., Sakurai N., Kubota M., Nishizaki T., Masai E., Fukuda M. and Mitsuidagger Y. (2000).** Crystal structure of NADH-dependent ferredoxin reductase component in biphenyl dioxygenase. *J. Mol. Biol., 304, 397-410.*

❖ **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.*

❖ **Shingler V. (1996).** Signal sensing by σ^{54}-dependent regulators: derepression as a control mechanism. *Mol. Microbiol., 19, 409-416.*

❖ **Shingler V. and Moore T. (1994).** Sensing of aromatic compounds by the DmpR transcriptional activator of phenol-catabolizing *Pseudomonas* sp. strain CF600. *J. Bacteriol., 176, 1555-1560.*

❖ **Shingler V. and Pavel H. (1995).** Direct regulation of the ATPase activity of the transcriptional activator DmpR by aromatic compounds. *Mol. Microbiol., 17, 505-513.*

❖ **Shingler V., Bartilson M. and Moore T. (1993).** Cloning and nucleotide sequence of the gene encoding the positive regulator (DmpR) of the phenol catabolic pathway encoded by pVI150 and identification of DmpR as a member of the NtrC family of transcriptional activators. *J. Bacteriol., 175, 1596-1604.*

❖ **Shingler V., Franklin F. C., Tsuda M., Holroyd D. and Bagdasarian M. (1989).** Molecular analysis of a plasmid-encoded phenol hydroxylase from *Pseudomonas* CF600. *J. Gen. Microbiol., 1989, 1083-92.*

❖ **Sticher, P., M. C. M. Jaspers, K. Stemmler, H. Harms, A. J. B. Zehnder, and J. R. van der Meer, (1997).** Development and characterization of a whole-cell bioluminescent sensor for bioavailable middle-chain alkanes in contaminated groundwater samples. *Appl. Environ. Microbiol., 63, 4053-4060.*

❖ **Stock J. B., Ninfa A. J. and Stock A. M. (1989).** Protein phosphorilation and regulation of adaptive responses in bacteria. *Microbiol. Rev., 53, 450-490.*

❖ **Stock J. B., Stock A. M. and Motten J. M. (1990).** Signal transduction in bacteria. *Nature 344, 395-400.*

❖ **Timmis, K. N., R. J. Steffan, and R. Untermann, (1994).** Designing microorganisms for the treatment of toxic wastes. *Annu. Rev. Microbiol., 48, 525-557.*

❖ **Timmis, K.N. and D.H. Pieper (1999),** Bacteria designed for bioremediation. *Trends Biotechnol., 17, 201-204.*

❖ **Tropel, D., and J. R. van der Meer, (2004).** Bacterial transcriptional regulators for degradation pathways of aromatic compounds. *Microbiol. Mol. Biol. Rev., 68, 474-500.*

❖ **U.S. EPA (1990)**. Draft engineering bulletin : *in situ* vetrification.

❖ **Urbance, J.W. (2003),** BSD: the Biodegradative Strain Database. *Nucleic Acid Res, 31, 152-155.*

❖ **Urgun-Demirtas, M., B. Stark, and K. Pagilla, (2006).** Use of genetically engineered microorganisms (GEMs) for the bioremediation of contaminants. *Crit. Rev. Biotechnol, 26, 145-164.*

❖ **Vaillancourt F. H., Barbosa C. J., Spiro T. G., Bolin J. T., Blades M. W., Turner R. F. and Eltis L. D. (2002).** Definitive evidence for monoanionic binding of 2,3-dihydroxybiphenyl-1,2-dioxygenase from UV resonance Raman spectroscopy, UV/VIS absorption spectroscopy, and crystallography. *J. Am. Chem. Soc., 124, 2485-2496.*

❖ **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.*

❖ **Viggiani A, Siani L, Notomista E, Birolo L, Pucci P, and Di Donato A (2004).** The Role of the Conserved Residues His-246, His-199, and Tyr-255 in the Catalysis of Catechol 2,3-Dioxygenase from *Pseudomonas stutzeri* OX1. *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY Vol. 279, No. 47, Issue of November 19, pp. 48630–48639.*

❖ **Vogel, T.M. (1996).** Bioaugmentation as a soil bioremediation approach. *Curr Opin Biotechnol, 7, 311-317.*

❖ **Weiss D. S., Batut J., Klose K. E., Keener J. and Kustu S. (1991).** The phosphorylated form of enhancer-binding protein NTRC has an ATPase activity that is essential for activation of transcription. *Cell, 67, 155-167.*

❖ **Werlen C., M. C. M. Jaspers, and J. R. van der Meer, (2004).** Measurement of biologically available naphthalene in gas and aqueous phases by use of a *Pseudomonas putida* biosensor. *Appl. Environ. Microbiol., 70, 43-51.*

❖ **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.*

❖ **Wiedemeier, T.H., Swanson, M.A., Moutoux, D.E., Wilson, J.T., Kampbell, D.H., Hansen, J.E., Haas, P. (1998).** Technical Protocol for Evaluating Natural Attenuation of Chlorinated Solvents in Groundwater. *Report EPA/600/R-98/128, USA.*

❖ **Williams P. A. and Murray K. (1974)**. Metabolism of benzoate and the methylbenzoates by *Pseudomonas putida (arvilla*) mt-2: evidence for the existence of a TOL plasmid. *J. Bacteriol., 120, 416-423*.

❖ **Wise A. A., and C. R. Kuske, (2000).** Generation of novel bacterial regulatory proteins that detect priority pollutant phenols. *Appl. Environ. Microbiol., 66, 163-169.*

❖ **Wood, K. V., and M. G. Gruber, (1996).** Transduction in microbial biosensors using multiplexed bioluminescence. *Biosens. Bioelectron., 11, 207-214.*

❖ **Worsey M. and Williams P. A. (1975).** Metabolism of toluene and xylenes by *Pseudomonas putida (arvilla)* mt-2: evidence for a new function of the TOL plasmid. *J. Bacteriol., 124, 7-13*.

❖ **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.*

❖ **Zengler, K., J. Heider, R. Rossello'-Mora, and F. Widdel, (1999).** Phototrophic utilization of toluene under anoxic conditions by a new strain of *Blastochloris sulfoviridis*. *Arch. Microbiol., 172, 204-212.*

❖ **Zhang X., Chaney M., Wigneshweraraj S. R., Schumacher J., Bordes P., Cannon W. And Buck M. (2002).** Mechanochemical ATPase and transcriptional activation. *Mol. Microbiol., 45, 895-9*03.

❖ **Zobell, C.E., (1945).** The role of bacteria in the formation and transformation of petroleum hydrocarbons. *Science, 102, 364-369.*