

Enzymes in the degradative pathway of p-toluenesulfonate and p-toluate and regulation of their expression in *Comamonas testosteroni* T-2

Doctoral Thesis

Author(s):

Schläfli Oppenberg, Hans Rudolf

Publication date:

1995

Permanent link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-001459651>

Rights / license:

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

Diss. ETH ex. B

DISS. ETH Nr. 11157

**Enzymes in the Degradative Pathway of *p*-Toluenesulfonate
and *p*-Toluate and Regulation of
their Expression in *Comamonas testosteroni* T-2**

A dissertation submitted to the

SWISS FEDERAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY

for the degree of

DOCTOR OF NATURAL SCIENCES

presented by

HANS RUDOLF SCHLÄFLI OPPENBERG

Dipl. Mikrobiologe, Uni Zürich

born 16 Dezember 1963

citizen of Steinhof (SO)

accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Thomas Leisinger, examiner

Prof. Dr. Josef Zeyer, co-examiner

Prof. Dr. Alasdair M. Cook, co-examiner



Ca 1 E

Zürich 1995

Summary

Aromatic sulfonates are an important class of xenobiotic compounds which are released to the environment in industrial and communal waste water. 4-Toluenesulfonate (TS) is degraded in the Gram-negative soil bacterium *Comamonas testosteroni* T-2 via oxygenation by the multicomponent non-heme iron TS methyl-monooxygenase system (TSMOS) and subsequent oxidation of the methyl-sidechain to 4-sulfobenzoate (PSB). The same set of enzymes also degrades *p*-toluate (TC) to terephthalate (TER). PSB, by the action of the multicomponent non-heme iron PSB dioxygenase system (PSBDOS), is oxygenated and desulfonated to the common intermediate protocatechuate (PC). PC, after *meta*-fission, is introduced into intermediary metabolism. TER is also degraded via PC. Multicomponent oxygenases play an important role in this degradative pathway and generally in the biodegradation of aromatic (xenobiotic) compounds. Little is known about the origins and evolution of enzymes specific for xenobiotic substrates. The similarities in the degradative routes for TS and TC in *C. testosteroni* T-2 led to the hypothesis that PSBDOS evolved from the previously uncharacterized TER oxygenating enzyme system in *C. testosteroni* T-2.

Multicomponent non-heme iron mono- and dioxygenases, to which belong the oxygenases in the TS/TC-degradative pathway in strain T-2, are generally organized in three classes (I, II and III). For a comprehensive comparison of such enzymes on the mechanistic level, the stereospecificity of hydride removal from NADH catalyzed by the reductase components of all three classes was examined. Characteristic *pro-R* specificity for classes I and III and *pro-S* specificity for class II enzymes supported the classification. An evaluation of primary and X-ray structures of related flavoproteins, together with our mechanistic data, confirmed that the reductase components of multicomponent oxygenases were recruited from two families of flavoenzymes.

In order to verify the initial hypothesis about the evolution of PSBDOS, the enzyme system catalyzing the NADH-dependent oxygenation of TER to (1*R*,2*S*)-1,2-dihydroxy-1,4-dicarboxy-3,5-cyclohexadiene (DCD) in *C. testosteroni* T-2, terephthalate 1,2-dioxygenase (TERDOS), was purified, characterized and particularly compared to PSBDOS. The oxygenase (component Z) of TERDOS consisted of a heterotetramer of subunits with M_r s of 49 (α) and 18 kDa (β). It contained one Rieske [2Fe-2S] center per α -subunit and was activated by Fe²⁺. The incorporation of ¹⁸O₂ proved the nature of the dioxygenase reaction. Affinity-purified antibodies specific for the oxygenase component of PSBDOS did not interact with component Z. The reductase component of TERDOS was not amenable to purification and it could not be replaced *in vitro* by the reductase of PSBDOS. Thus, only few (general) similarities between TERDOS and PSBDOS were found and the hypothesis that TERDOS is an ancestor of PSBDOS was not confirmed.

In contrast, multicomponent PSB- and TER-oxygenating enzyme systems closely related to the analogous systems in *C. testosteroni* T-2 were found in another strain of *C. testosteroni*, PSB-4. Components of both oxygenase systems were immuno-reactive with an-

tisera elicited against the corresponding components of the TS/TC-pathway in strain T-2. However, strain PSB-4 lacked the enzymes converting TS (TC) to PSB (TER) and possibly represents an alternative (i.e. partial) combination of similar pathway modules in *C. testosteronei*.

The list of at least partially characterized enzymes in the TS/TC-pathway in *C. testosteronei* T-2 was completed with the enzyme oxidizing the stoichiometric NAD⁺-dependent transformation of DCD to PC, DCD dehydrogenase (DCDDH). The apparent K_m s for NAD⁺ and DCD were determined. The enzyme was a homodimer of subunits with a M_r of 39 kDa. It transferred hydride ions to the (4S)-position of NAD⁺ and was activated by Fe²⁺. DCDDH showed similarities to the alcohol dehydrogenases but could not be attributed to any class of these enzymes.

The regulation of the TS/TC-degradative pathway(s) in *C. testosteronei* T-2 was examined. Physiological and immunological evidence was found for the presence of at least three regulatory units controlling the expression of specific enzymes. A first regulatory unit comprizes the inducible set of enzymes involved in the conversion of TS (TC) to PSB (TER), a second consists of inducible TERDOS and DCDDH, whereas a third regulatory unit, which is expressed nearly constitutively, includes the oxygenase component of PSBDOS but no associated reductase. The activities of all pathway enzymes examined were remarkably stable during and even after growth.

Enzymes and regulation of the TS/TC-degradative pathway(s) in *C. testosteronei* T-2 are now biochemically and physiologically well characterized and they are wide open for further investigations on the genetic level.

Zusammenfassung

Sulfonierte Aromaten sind eine wichtige Klasse von xenobiotischen Substanzen. Sie gelangen vor allem durch Industrie- und Haushaltabwässer in die Umwelt. Das Gram-negative Bodenbakterium *Comamonas testosteroni* T-2 baut 4-Toluolsulfonsäure (TS) via Oxygenierung durch TS-Methylmonooxygenase (TSMOS) und die nachfolgende Oxidation der Methylgruppe zu 4-Sulfobenzoat (PSB) ab. Dieselben Enzyme katalysieren auch die Oxidation von *p*-Toluylsäure (TC) zu Terephthalat (TER). PSB wird durch das Nicht-Haem-Eisen enthaltende Mehrkomponentensystem PSB-3,4-Dioxygenase (PSBDOS) zu Protocatechuat (PC) oxygeniert und nachfolgend desulfoniert. PC wird nach *meta*-Spaltung in den Intermediärstoffwechsel eingeschleust. TER wird ebenfalls über PC abgebaut. Mehrkomponenten-Oxygenasen sind die Schlüsselenzyme beim Abbau von (xenobiotischen) Aromaten. Allerdings ist nur wenig bekannt über Ursprung und Evolution von Xenobiotika-umsetzenden Enzymen. Die Ähnlichkeiten im Abbau von TS und TC in *C. testosteroni* T-2 führten zur Hypothese, dass PSBDOS sich aus der vorher unbekanntem TER-Oxygenase in diesem Stamm entwickelt haben könnte.

Nicht-Häm-Eisen enthaltende Mehrkomponenten-Mono- und Dioxygenasen, zu denen die Oxygenasen aus dem TS/TC-Abbauweg in Stamm T-2 gehören, werden in drei Klassen eingeteilt (I, II und III). Für einen umfassenden mechanistischen Vergleich solcher Enzymsysteme wurde die Stereochemie der von Reduktasekomponenten aller drei Klassen katalysierten Hydridabspaltung von NADH untersucht. Charakteristische *pro-R*-Stereospezifität der Klasse-I/III-Reduktasen und *pro-S*-Stereospezifität der Klasse-II-Reduktasen unterstützten die gängige Klassierung. Die Stereospezifität und publizierte Daten über Primär- und 3D-Strukturen solcher und verwandter Enzyme zeigten, dass die Reduktasen von Mehrkomponenten-Oxygenasen aus zwei verschiedenen Familien von Flavoproteinen stammen.

Um die vermutete Verwandtschaft mit PSBDOS zu bestätigen, wurde das Enzym, das in *C. testosteroni* T-2 die Oxygenierung von TER zu (1*R*,2*S*)-1,2-Dihydroxy-1,4-dicarboxy-3,5-cyclohexadien (DCD) katalysiert, das TER 1,2-Dioxygenase-System (TER-DOS), gereinigt und charakterisiert. Die Oxygenase (Komponente Z) des Systems hatte eine native $\alpha_2\beta_2$ -Struktur mit einem Molekulargewicht von 126 kDa. Die Untereinheiten waren 49 (α) und 18 kDa (β) groß. Ein Rieske [2Fe-2S] Zentrum pro α -Untereinheit wurde gefunden, das Enzym wurde durch Fe^{2+} aktiviert. Die Dioxygenase-Reaktion wurde durch den Einbau von $^{18}\text{O}_2$ bestätigt. Affinitätsgereinigte Antikörper gegen die Oxygenasekomponente von PSBDOS zeigten keine Immunreaktion mit Oxygenase Z. Die Reduktasekomponente von TERDOS war keinem Reinigungsverfahren zugänglich und sie konnte *in vitro* nicht durch die Reduktase von PSBDOS ersetzt werden. Die markanten Unterschiede zwischen TERDOS und PSBDOS widersprechen der Hypothese einer nahen Verwandtschaft der beiden Dioxygenase-Systeme.

Dagegen wurden in einem anderen Stamm von *C. testosteroni*, PSB-4, PSB- und TER-Oxygenasen gefunden, die mit den analogen Enzymsystemen in *C. testosteroni* T-2 nahe verwandt sind. Komponenten beider Oxygenasesysteme in Stamm PSB-4 zeigten

Immunreaktionen mit Antisera, die gegen die entsprechenden Komponenten im TS/TC-Abbaueg von Stamm T-2 hergestellt worden waren. Enzyme, welche die Umwandlung von TS (TC) zu PSB (TER) katalysieren, fehlten allerdings vollständig in Stamm PSB-4. Dieser Stamm hat also möglicherweise eine alternative (d.h. teilweise) Kombination von sehr ähnlichen Abbauegmodulen.

Die Liste der mindestens teilweise charakterisierten Enzyme im TS/TC-Abbaueg in *C. testosteroni* T-2 wurde mit dem Enzym, welches die stöchiometrische, NAD⁺-abhängige Umsetzung von DCD zu PC katalysiert, DCD-Dehydrogenase (DCDDH), vervollständigt. Die apparenten K_m -Werte für Substrat und Koenzym wurden bestimmt. Das Enzym war ein Homodimer von Untereinheiten mit einer Grösse von 39 kDa. DCDDH transferierte Hydrid-Ionen spezifisch in die (4S)-Stellung von NAD⁺ und wurde durch Fe²⁺ aktiviert. DCDDH zeigte allgemeine Ähnlichkeiten zu Alkohol-Dehydrogenasen, liess sich aber keiner Gruppe dieser Enzyme eindeutig zuordnen.

Die Regulation des Abbaus von TS und TC in *C. testosteroni* T-2 wurde mit physiologischen und immunologischen Verfahren untersucht. Hinweise auf mindestens drei unabhängige Regulationseinheiten wurden gefunden. Eine erste Regulationseinheit umfasst die induzierbaren Enzyme, welche die Umwandlung von TS (TC) zu PSB (TER) katalysieren, eine zweite besteht aus den induzierbaren TERDOS und DCDDH, während in einer dritten, annähernd konstitutiv exprimierten Regulationseinheit wohl die Oxygenase- aber keine assoziierte Reduktasekomponente von PSBDOS enthalten ist. Die Aktivitäten aller untersuchten Abbauezyme waren bemerkenswert konstant während allen Wachstumsphasen.

Enzyme und Regulation des TS/TC-Abbauegs in *C. testosteroni* T-2 sind damit biochemisch und physiologisch gut charakterisiert für vertiefende Untersuchungen auf genetischer Ebene.