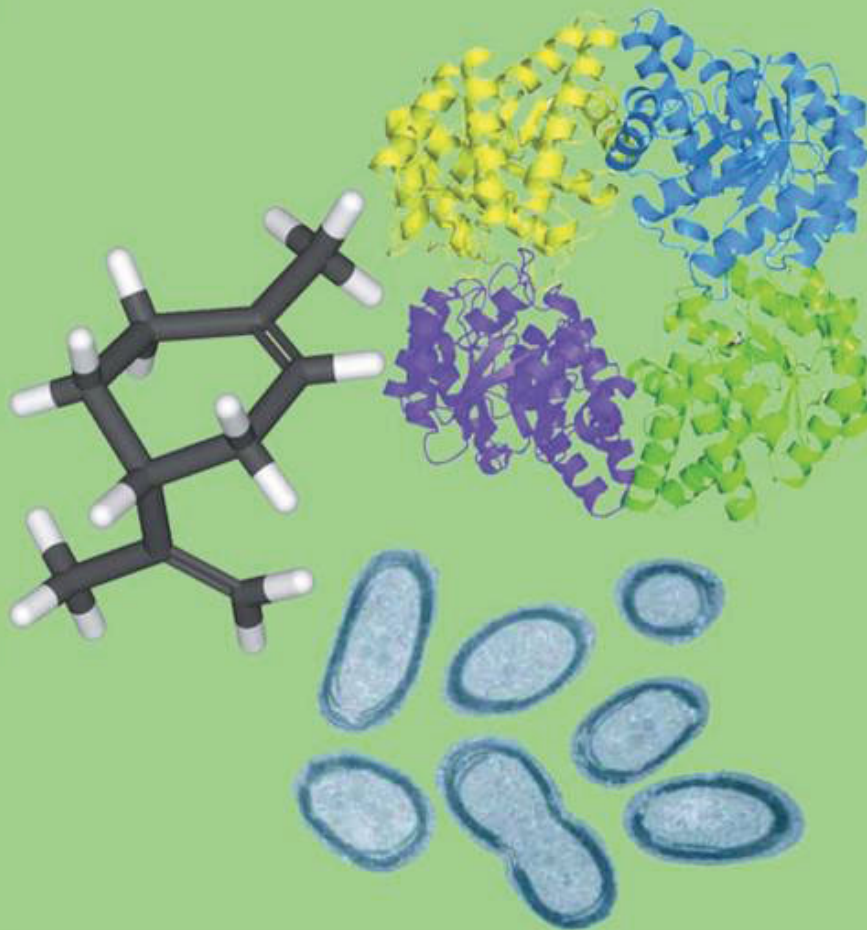


Danny Brodkorb

**Die Linalool-Dehydratase-Isomerase aus dem
nitratreduzierenden Betaproteobakterium
Castellaniella defragrans 65Phen**



Cuvillier Verlag Göttingen
Internationaler wissenschaftlicher Fachverlag

**Die Linalool-Dehydratase-Isomerase aus dem nitratreduzierenden
Betaproteobakterium *Castellaniella defragrans* 65Phen**

Dissertation

zur
Erlangung des akademischen Grades eines

Doktor der Naturwissenschaft
- Dr. rer. nat. -

dem Fachbereich Biologie/Chemie
der Universität Bremen
vorgelegt von

Danny Brodkorb

Bremen 2009

Bibliografische Information der Deutschen Nationalbibliothek

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.d-nb.de> abrufbar.

1. Aufl. - Göttingen : Cuvillier, 2009

Zugl.: Bremen, Univ. Diss., 2009

978-3-86955-213-2

Die Untersuchungen zu der vorliegenden Doktorarbeit wurden von Dezember 2006 bis September 2009 am Max-Planck-Institut für Marine Mikrobiologie in Bremen durchgeführt. Teile dieser Arbeit sind bereits zur Veröffentlichung eingereicht.

1. Gutachter: Prof. Dr. Friedrich Widdel
2. Gutachter: Priv.-Doz. Dr. Jens Harder

Tag des Promotionskolloquiums: 15.12.2009

© CUVILLIER VERLAG, Göttingen 2009

Nonnenstieg 8, 37075 Göttingen

Telefon: 0551-54724-0

Telefax: 0551-54724-21

www.cuvillier.de

Alle Rechte vorbehalten. Ohne ausdrückliche Genehmigung des Verlages ist es nicht gestattet, das Buch oder Teile daraus auf fotomechanischem Weg (Fotokopie, Mikrokopie) zu vervielfältigen.

1. Auflage, 2009

Gedruckt auf säurefreiem Papier

978-3-86955-213-2

Zusammenfassung

Castellaniella (ex *Alcaligenes*) *defragrans* 65Phen mineralisiert Monoterpene in der Abwesenheit von molekularem Sauerstoff. Unter Nitrat-reduzierenden Bedingungen werden diese Kohlenwasserstoffe komplett zu Kohlenstoffdioxid oxidiert.

In dieser Arbeit wurden die Enzymaktivitäten der Geraniol-Isomerase und der Linalool-Dehydratase gereinigt und enzymatisch charakterisiert. In einem fünfstufigen Reinigungsprotokoll wurde die Linalool-Dehydratase zur Homogenität gereinigt. Das Protein katalysierte darüber hinaus die Isomerisierung von Geraniol zu Linalool. Auch die thermodynamisch nicht begünstigten Rückreaktionen von Myrcen zu Linalool und von Linalool zu Geraniol waren messbar. Als Name für das neue Enzym wird daher Linalool-Dehydratase-Isomerase vorgeschlagen.

Die Linalool-Dehydratase-Isomerase hat ein natives Molekulargewicht von 160 kDa und ist ein Tetramer aus einem 40 kDa-Protein. Die Enzymaktivitäten folgten zwischen 22°C und 35°C einer Arrhenius-Kurve und waren bei 35°C in 80 mM Tris-HCl, pH 9,0, am höchsten. Die Aktivierungsenergie betrug $E_A = 68,6$ kJ/mol. Die Enzymaktivitäten zeigten eine Michaelis-Menten-Kinetik mit V_{max} -Werten von $8,4$ U mg^{-1} für die Linalool-Dehydratase bzw. $24,6$ U mg^{-1} für die Geraniol-Isomerase. Als K_m -Werte wurden 500 μM für Geraniol und 750 μM für Linalool bestimmt. In Gegenwart einer reinen Myrcenphase erfolgte die Hydratisierung von Myrcen zu Linalool mit einer Rate von $8,1$ mU mg^{-1} .

Chirale Gaschromatographie-Analysen zeigten die enantiomerselektive Isomerisierung von Geraniol über (*S*)-(+)-Linalool zu Myrcen, mit einem Enantiomerüberschuss von $\geq 99\%$. *Thauera linaloolentis* 47Lol hatte eine Geraniol-Isomerase-Aktivität zu (*R,S*)-Linalool, *Thauera terpenica* 58Eu eine Geraniol-Dehydratase-Aktivität zu Myrcen.

Für die Aktivität der Linalool-Isomerase-Dehydratase war die Abwesenheit von molekularem Sauerstoff und die Anwesenheit von Dithiothreitol als Reduktionsmittel notwendig. Cofaktoren wurden nicht detektiert. Die Enzymreinigung beinhaltete eine Elution mit 6 M Harnstoff. Eine denaturierende Gradienten-Gel-Elektrophorese zeigte eine schnelle Faltung des denaturierten Proteins in den nativen Zustand, während die Entfaltung durch Zwischenstufen verzögert wurde. Dieses besondere Verhalten könnte zur Stabilität gegenüber den denaturierenden Substraten beitragen.

Das Gen der Linalool-Dehydratase-Isomerase wurde mittels N-terminaler Proteinsequenzierung in einer vorhandenen Fosmidsequenz von *C. defragrans* identifiziert. Die Gense-

quenz kodiert für ein Präprotein mit 397 Aminosäuren inklusive einem N-terminalen Signalpeptid für eine Sec-abhängige Translokation ins Periplasma. Die Linalool-Dehydratase-Isomerase ist das erste Protein einer neuen Proteinfamilie.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen	V
Teil I Darstellung der Ergebnisse im Gesamtzusammenhang	1
A Bisheriger Stand des Wissens	1
1. Isoprene und Monoterpene	1
1. 1 Biogenetische Isoprenregel.....	1
1. 2 Synthese von Isoprenen und Monoterpenen.....	2
1. 3 Monoterpene in der Umwelt.....	3
2. Biologischer Abbau von Kohlenwasserstoffen	6
2. 1 Aerober Abbau von Kohlenwasserstoffen.....	6
2. 2 Anaerober Abbau von Kohlenwasserstoffen.....	7
2. 3 Abbau von Monoterpenen.....	8
B Aufgabenstellung der Arbeit	12
C Ergebnisse und Diskussion	13
1. Enzymaktivitäten im Rohextrakt	13
2. Reinigung der Linalool-Dehydratase und der Geraniol-Isomerase	13
3. Klonierung der Gene und Sequenzanalysen der Linalool-Dehydratase- Isomerase und co-gereinigter Enzyme	16
4. Charakterisierung der gereinigten Enzymaktivitäten	19
4. 1 Bestimmung der Reaktionsgeschwindigkeit und Substrataffinität.....	19
4. 2 Einfluss von Cofaktoren und anderen Chemikalien.....	20
4. 3 Einfluss von redoxaktiven Thiolgruppen.....	22

5. Enantiomeraselektivität im anaeroben Monoterpen-Abbau	23
6. Umsatz von Myrcen im enzymgekoppelten Assay	27
7. Ausblick	28
8. Literatur	31
Teil II Manuskripte	41
A Liste der Manuskripte und Erläuterungen	41
1. Linalool dehydratase-isomerase, a bifunctional enzyme in the anaerobic degradation of monoterpenes	43
2. Enantioselective isomerization of geraniol to the tertiary monoterpene alcohol (<i>S</i>)-(+)-linalool	65
3. Linalool dehydratase-isomerase undergoes reversible unfolding in the presence of the denaturant agent urea	83
Danksagung	103

Abkürzungen

ACP	<i>Acyl carrier protein</i>
APS	Ammoniumpersulfat
BLAST	<i>Basic local alignment tool</i>
BSA	Rinderserumalbumin
CoASH	Coenzym A
DMAPP	Dimethylallylpyrophosphat
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FPLC	<i>Fast performance liquid chromatography</i>
GC	Gaschromatograph/-ie
GC-MS	Gaschromatographie-Massenspektrometrie
GGPP	Geranylgeranylpyrophosphat
GPP	Geranylpyrophosphat
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HMN	2,2,4,4,6,8,8-Heptamethylnonan
HPLC	<i>High performance liquid chromatography</i>
IPP	Isopentenylpyrophosphat
ORF	<i>Open reading frame</i>
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	Polymerasekettenreaktion
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
SAM	S-Adenosylmethionin
SDS	Natriumdodecylsulfat
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris-hydroxymethylaminomethan

Teil I Darstellung der Ergebnisse im Gesamtzusammenhang

A Bisheriger Stand des Wissens

1. Isoprene und Monoterpene

1. 1 Biogenetische Isoprenregel

In der Struktur vieler Naturstoffe kann man Isopren (2-Methyl-1,3-butadien, C_5H_8) als chemische Grundeinheit erkennen (Conolly und Hill, 1992; Breitmaier, 2006). Terpenoide oder Isoprenoide sind Verbindungen, die aus Isopren-Einheiten aufgebaut sind (Wallach, 1885). Mit der „Biogenetischen Isoprenregel“ wurde die Annahme formuliert, dass eine Biosynthese aller Isoprenoide universell vom Isopentenylpyrophosphat (IPP) ausgeht (Ruzicka et al., 1953). IPP bildet die biologisch aktive Isopreneinheit (Lynen, 1958; Lynen, 1959; Bloch et al., 1959). Auch wenn es nur wenige Nachweise über den *in vitro*-Einbau von markiertem IPP in pflanzliche Isoprenoide gibt, so ist der Weg der pflanzlichen Isoprenoidbiosynthese von der IPP-Isomerase über die Prenyltransferasen und beispielsweise die Phytoensynthase und weiterer Enzyme der Carotinoidbiosynthese sehr gut dokumentiert (Britton et al., 1998). Die biologischen Isopren-Einheiten können in unterschiedlicher Anzahl linear verknüpft und die isoprenoide Grundstruktur anschließend modifiziert werden, z. B. durch Oxidation oder Wasseranlagerung. Kristallstrukturanalysen lieferten detaillierte Einblicke in die intramolekularen Zyklisierungsreaktionen, auf der die enorme Diversität der Isoprenoid-Ringstrukturen basiert. Die beachtliche Zahl von über 30.000 isoprenoiden Naturstoffen unterscheidet sich hinsichtlich der Anzahl an Isopren-Einheiten im Molekül. Es gibt Hemi- (C_5), Mono- (C_{10}), Sesqui- (C_{15}), Di- (C_{20}), Tri- (C_{30}), Tetra- (C_{40}) und Polyterpene ($>C_{40}$). Ihre große Vielfalt ist in allen drei fundamentalen Domänen des Lebens vertreten. In Pflanzen befinden sich isoprenoide Naturstoffe in den ätherischen Ölen, *Bacteria* enthalten Chinone und *Archaea* charakteristische Etherlipide. Wichtige Strukturbestandteile in der bakteriellen und tierischen Zellmembran sind Hopanoide und Sterole.

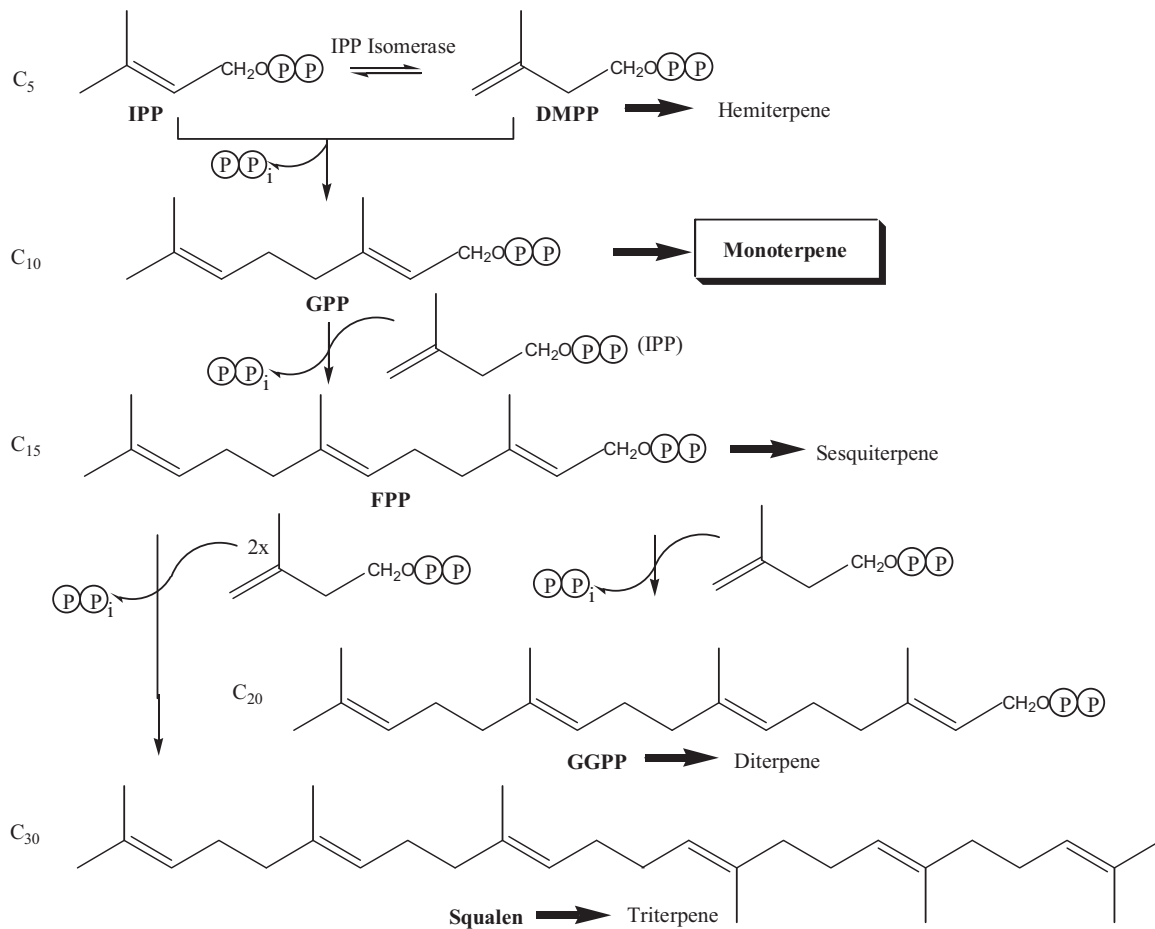


Abb. 1: Synthesewege der höheren Terpene

1. 2 Synthese von Isoprenen und Monoterpenen

Aus Isopentenylpyrophosphat (IPP) wird mit Hilfe der IPP-Isomerase das allylische Dimethylallylpyrophosphat (DMAPP) synthetisiert. Dieses ist das Startermolekül für die Bildung von Prenylketten. Hierbei wird zunächst die Diphosphatgruppe des DMAPP abgespalten. Das entstehende allylische Kation addiert an die Doppelbindung eines IPP und nach Eliminierung eines Protons entsteht Geranylpyrophosphat (C₁₀, GPP, Dev, 1982). Analog dazu kann das allylische GPP mit IPP zu Farnesylpyrophosphat (C₁₅, FPP) und dieses weiter zu Geranylgeranylpyrophosphat (C₂₀, GGPP) verlängert werden, wenn höhere Terpene synthetisiert werden (Abb.1). IPP und die isomere Verbindung DMAPP sind die C₅-Grundbausteine der Isoprenoid-Biosynthese in allen Organismengruppen. Über den Acetat-Mevalonat-Weg wird aus drei Molekülen Acetyl-CoA die Mevalonsäure synthetisiert. Nach zweifacher Phosphorylierung wird unter Abspaltung von CO₂ und Wasser IPP

gebildet. In allen höheren Eukaryonten, *Archaea* und vielen *Bacteria* erfolgt die IPP-Synthese über den Acetat-Mevalonat-Weg (Goodwin, 1977; Bach und Lichtenthaler, 1983; Bach und Lichtenthaler, 1987; Gershenzon und Croteau, 1993). Die Entdeckung eines Mevalonat-unabhängigen IPP-Biosynthese-Weges zeigte, dass Monoterpene und andere Isoprenoide auch ausgehend von Triosephosphat und Pyruvat (Lichtenthaler et al., 1997) synthetisiert werden können. Durch eine Thiamin-katalysierte Decarboxylierung von Pyruvat und die anschließende Addition des entstandenen Hydroxyethyl-Thiamin an die Carbonylfunktion des Triosephosphats entsteht der C₅-Körper: 1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat. Durch die katalytische Aktivität mehrerer Synthasen entsteht (*E*)-4-Hydroxy-3-methyl-but-2-enyl-pyrophosphat, dass durch Umlagerungen im Kohlenstoffgerüst zu IPP umgewandelt wird (Broers, 1994; Zeidler et al., 1997; Schwender et al., 1997). Der Mevalonat-unabhängige IPP-Biosyntheseweg dient vielen Bakterien, Algen (*Scenedesmus obliquus*) und den Plastiden höherer Pflanzen zur Synthese von Isoprenoiden und somit auch von Monoterpenen (Zimmerman et al., 1978; Boucher und Doolittle, 2000; Hunter, 2007).

1. 3 Monoterpene in der Umwelt

Monoterpene werden aufgrund ihrer großen Variabilität primär in azyklische Verbindungen, wie Myrcen und Ocimen, in monozyklische Monoterpene, u. a. Limonen und Phellandren, und in dizyklische Monoterpene, wie Pinen und Sabinen unterteilt (Abb. 2). Letztere können in zweizyklische C₆-C₃-, C₆-C₄- und C₆-C₅-Systeme unterschieden werden. Es handelt sich bei allen Monoterpenen um ungesättigte Kohlenwasserstoffe, die als flüchtige organische Substanzen (*volatile organic compounds* [VOC]) klassifiziert werden (Erman, 1985; Gershenzon und Croteau, 1991; van de Werf et al., 1999). Pflanzen emittieren über eine Million Tonnen jährlich in die Atmosphäre (Zimmerman et al., 1978), wo Monoterpene in der Regel durch Photooxidation in kleinere Bestandteile zerlegt werden.