

**Biochemische, biophysikalische und molekularbiologische  
Charakterisierung bakterieller poly(*cis*-1,4-isopren)  
Oxygenasen**

Von der Fakultät für Energie-, Verfahrens- und Biotechnik (Fakultät 4)  
der Universität Stuttgart zur Erlangung der Würde eines Doktors der  
Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.) genehmigte Abhandlung

vorgelegt von

**Jakob Birke**

aus Mühlacker

Hauptberichter: Prof. Dr. Dieter Jendrossek

Mitberichter: Prof. Dr. Stephan Nußberger

Tag der mündlichen Prüfung: 11.02.2016

Institut für Mikrobiologie der Universität Stuttgart

2016



# Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	6
<b>Zusammenfassung</b> .....	8
<b>Abstract</b> .....	11
<b>1 Einleitung</b> .....	14
1.1 Kautschuk.....	14
1.2 Die industrielle Kautschuk-Produktion.....	15
1.3 Der natürliche Abbau von Kautschuk.....	18
1.4 <i>Xanthomonas</i> sp. 35Y.....	21
1.5 Rubber oxygenase A (RoxA).....	21
1.6 Latex clearing protein (Lcp).....	24
1.7 Ziel der Arbeit.....	26
<b>2 Ergebnisse</b> .....	27
<b>2.1 Der Aminosäurerest Phenylalanin an Position 317 ist essentiell für die Aktivität von RoxA</b> .....	27
2.1.1 Klonierung und Expression der RoxA-F317-Muteine.....	27
2.1.2 Reinigung von RoxA-F317A und RoxA-F317L.....	28
2.1.3 Bestimmung der relativen Aktivität von RoxA-F317A und RoxA-F317L.....	28
2.1.4 UVvis-spektroskopische Untersuchung von RoxA-F317A.....	29
2.2 Das Mutein RoxA-F317Y.....	32

---

2.3 RoxA: Die Position F301.....	34
2.3.1 RoxA-F301Y.....	35
2.4 RoxA: Die Position W291.....	37
2.5 Zusammenfassung der relativen Aktivitäten aller vorgestellten gereinigten RoxA-Muteine.....	39
<b>2.6 Funktionelle Identifizierung von RoxA-orthologen Proteinen in Myxobakterien.....</b>	<b>40</b>
2.6.1 Modellierung der dreidimensionalen Struktur der RoxA-orthologen Proteine.....	41
2.6.2 Klonierung und Expression der RoxA-orthologen Proteine.....	42
2.6.3 Reinigung von nativem RoxA <sub>Mfu</sub> und RoxA <sub>Cco</sub> .....	42
2.6.4 Die poly( <i>cis</i> -1,4-isopren)-Spaltung durch die gereinigten RoxA-orthologen Proteine.....	43
2.6.5 UVvis-spektroskopische Untersuchungen von RoxA <sub>Cco</sub> und RoxA <sub>Mfu</sub> .....	44
<b>2.7 Die Expression und Charakterisierung von nativem Lcp.....</b>	<b>46</b>
2.7.1 Klonierung und Expression von Lcp.....	46
2.7.2 Reinigung von nativem Lcp aus dem Kulturüberstand von <i>Xanthomonas</i> sp. 35Y pNH1::lcp.....	47
2.7.3 Aktivitätsnachweis von gereinigtem Lcp.....	48
2.7.4 Charakterisierung von gereinigtem Lcp.....	50
2.7.5 Einfluss verschiedener Substanzen auf die Aktivität von Lcp.....	51
<b>2.8 Lcp aus Streptomyces sp. K30 ist ein b-Typ Cytochrom.....</b>	<b>52</b>
2.8.1 Klonierung und Expression von Strep-Lcp.....	52
2.8.2 Reinigung von Strep-Lcp.....	52
2.8.3 Bestimmung der Aktivität von Strep-Lcp.....	53
2.8.4 UVvis-spektroskopische Untersuchung von Strep-Lcp.....	54
2.8.5 Die Anwesenheit von Metallionen in Lcp.....	54
2.8.6 Bestimmung des Häm-Typs von Strep-Lcp.....	54
2.8.7 Untersuchung des aktiven Zentrums von Lcp.....	56

---

<b>3 Diskussion</b> .....	57
3.1 RoxA – Wichtige Aminosäurereste im Bereich der N-terminalen Hämgruppe.....	57
3.2 RoxA: Die Position F317.....	57
3.2.1 RoxA-F317Y.....	60
3.3 RoxA: Die Position F301.....	62
3.4 RoxA: Die Position W291.....	64
3.5 Funktionelle Identifizierung RoxA-orthologer Proteine in Myxobakterien.....	66
3.5.1 Die Metabolisierung von Kautschuk.....	68
3.6 Die Reinigung und Charakterisierung von Lcp.....	71
3.6.1 Lcp ist ein <i>b</i> -Typ Cytochrom.....	73
3.7 Der Reaktionsmechanismus der RoxA- und Lcp-abhängigen Polyisoprenspaltung.....	75
<b>4 Ausblick</b> .....	79
4.1 RoxA.....	79
4.2 Lcp.....	80
<b>Literaturverzeichnis</b> .....	82
<b>Anhang: Publikationen</b> .....	92
<b>Erklärung</b> .....	126
<b>Danksagung</b> .....	127
<b>Lebenslauf</b> .....	128

## Abkürzungsverzeichnis

as isolated	Protein im Grundzustand, z.B. nach der Reinigung
ASM	American Society for Microbiology
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
bp	Basenpaare
C-terminal	Carboxy-terminal
CCP(s)	Cytochrom <i>c</i> Peroxidase(n)
CD	Zirkulardichroismus (circular dichroism)
CoA	Coenzym A
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EPR	Elektronen-paramagnetische Resonanz
et al.	et alii (und andere)
ff	und folgende
g	Gramm
GHz	Gigahertz
HC	High capacity
His-Tag	Histidin-Tag (üblicherweise sechs hintereinanderliegende Histidinreste)
HPLC	High performance liquid chromatography
IDO	Indolamin-2,3-Dioxygenase
K	Kelvin
LB	Lysogeny broth (oft auch als Luria Bertani bezeichnet)
LC-MS	Flüssigchromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung
Lcp ( <i>lcp</i> )	Latex clearing protein ( <i>Gen</i> )
Lcp <sub>VH2</sub>	Lcp aus <i>Gordonia polyisoprenivorans</i> Stamm VH2
MADH	Methylamin Dehydrogenase
MALDI-TOF	Matrix-assisted laser desorption/ionization - time of flight
MauG	Methylamine utilisation protein

---

Mbp	Megabasenpaare
N-terminal	Amino-terminal
nm	Nanometer
NR	Natürlicher Kautschuk (natural rubber)
ODTD	12-oxo-4,8-dimethyltrideca-4,8-dien-1-al (RoxA-Hauptspaltprodukt)
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PCR	Polymerase Kettenreaktion
Q-Banden	$\alpha$ -Bande und $\beta$ -Bande im UVvis-Spektrum von Cytochromen (zwischen ca. 500 - 600 nm)
RoxA ( <i>roxA</i> )	Rubber oxygenase A ( <i>Gen</i> )
RoxA <sub>Cco</sub>	Rubber oxygenase A aus <i>Corallocooccus coralloides</i> BO35
RoxA <sub>Hoc</sub>	Rubber oxygenase A aus <i>Haliangium ochraceum</i>
RoxA <sub>Mfu</sub>	Rubber oxygenase A aus <i>Myxococcus fulvus</i> HW-1
RoxA <sub>Xsp.</sub>	Rubber oxygenase A aus <i>Xanthomonas</i> sp. 35Y
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
Sec	Sekretorisches System für Proteine
SR	Synthetischer Kautschuk (synthetic rubber)
Strep-Lcp ( <i>strep-lcp</i> )	Lcp mit einem Strep-Tag ( <i>entsprechende Gensequenz</i> )
Strep-Tag	Tag mit acht Aminosäuren; Affinität zu Strep-Tactin (artifizielles Streptavidin)
TAT	Twin-Arginin Transport
TDO	Tryptophan-2,3-Dioxygenase
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TTQ	Tryptophan-Tryptophyl-Quinon
U	Units (1 U = 1 $\mu$ mol / min)
UVvis	Ultraviolett-visible
Wt	Wildtyp

## Zusammenfassung

Das Thema der Arbeit war die Charakterisierung von RoxA (Rubber oxygenase A) aus *Xanthomonas* sp. 35Y und Lcp (Latex clearing protein) aus *Streptomyces* sp. K30. Beide Enzyme initiieren den Abbau von poly(*cis*-1,4-isopren), indem das Polymer in kleinere Fragmente gespalten und den Produkten dabei Aldehyd- sowie Ketogruppen eingefügt werden.

Bei **RoxA** wurde die Umgebung des N-terminalen Hämzentrums näher untersucht, dem vermuteten aktiven Zentrum, das im „as isolated“ Zustand an der distalen Seite ein O<sub>2</sub>-Molekül bindet. Anhand der dreidimensionalen Struktur wurden hier verschiedene Aminosäurereste ausgewählt und zielgerichtet mutiert.

Tryptophan 291 (W291) liegt auf der proximalen Seite des N-terminalen Hämzentrums und interagiert vermutlich mit dem axialen Histidinliganden (H195). Gereinigtes RoxA-W291Y zeigte eine Aktivität von nur 5% gegenüber dem Wildtyp. Der Aktivitätsverlust und die festgestellten veränderten O<sub>2</sub>-Bindungseigenschaften lassen sich durch eine verringerte Stabilität oder eine veränderte Positionierung von H195 erklären.

Die Aminosäurereste Phenylalanin 301 und 317 (F301 und F317) sind besonders nah und in auffälliger Orientierung zur distalen Seite der N-terminalen Hämgruppe lokalisiert. Eine Substitution der Reste durch andere Aminosäuren führte zu einem Aktivitätsverlust bei den nativ gereinigten Muteinen (von 80% Aktivitätsverlust bei RoxA-F301L bis > 99% bei RoxA-F317Y). Alle Muteine dieser beiden Positionen wiesen veränderte Eigenschaften im UVvis-Spektrum auf, besonders im Bereich der Q-Banden (500 nm - 600 nm), wo im Zustand „as isolated“ eine schwächere Absorption als bei RoxA-Wt deutlich wurde. Bei einer Inkubation mit Pyridin, das zu einem Verdrängen des hämgebundenen Sauerstoffs in der Lage ist, zeigte sich bei diesen Muteinen (bis auf RoxA-F301Y) nahezu keine Auswirkung auf das Spektrum. Dies wurde besonders an dem nur schwach ausgeprägten Absorptionssignal bei 549 nm erkennbar, was sie von RoxA-Wt unterscheidet. Die genannten Eigenschaften lassen sich durch eine verminderte O<sub>2</sub>-Bindungsfähigkeit der Muteine im Vergleich zu RoxA-Wt erklären. In RoxA haben die Aminosäurereste F301 und F317 demnach eine besondere Rolle bei der Bindung und Stabilisierung von molekularem Sauerstoff. Diese Stabilisierung trägt dazu bei, dass RoxA den



molekularen Sauerstoff im „as isolated“ Zustand über sehr lange Zeit binden kann, ohne oxidativ inaktiviert zu werden. Diese Besonderheit unterscheidet RoxA von anderen hämhaltigen Dioxygenasen wie der Tryptophan-2,3-Dioxygenase (TDO) und der Indolamin-2,3-Dioxygenase (IDO).

Ungewöhnliche Merkmale wurden bei zwei untersuchten Muteinen festgestellt. Bei RoxA-F317Y ist das Sauerstoffatom des Tyrosinatrests axial an das N-terminale Eisenatom gekoppelt, wodurch die Sauerstoffbindestelle blockiert ist. Infolgedessen erklärt sich der vollständige Aktivitätsverlust dieses Muteins. RoxA-F301Y interagiert im Gegensatz zu RoxA-F317Y nicht direkt mit dem Eisenatom der Hämgruppe. Das gebundene O<sub>2</sub>-Molekül wird hier über Wasserstoffbrücken mit der Hydroxylgruppe des Tyrosins stabilisiert. Aus diesem Grund war ein Verdrängen von hämgebundenem O<sub>2</sub> mit Imidazol bei diesem Mutein nicht möglich, was es von RoxA-Wt unterscheidet.

Durch die heterologe Expression **RoxA-orthologer Proteine** aus drei verschiedenen Myxobakterien in *Xanthomonas* sp. 35Y  $\Delta$ *roxA* gelang erstmals eine funktionelle Identifizierung von RoxA in anderen Gram-negativen Bakterien. Gezeigt werden konnte die Aktivität der nativ gereinigten RoxA-orthologen Proteine durch die Klärhofbildung entsprechender rekombinanter *Xanthomonas* sp. 35Y Stämme auf Latex overlay Agar und einen HPLC-basierten Nachweis des RoxA-Hauptspaltprodukts ODTD. Die UVvis-spektroskopischen Untersuchungen der RoxA-orthologen ergaben vergleichbare Ergebnisse zu RoxA aus *Xanthomonas* sp. 35Y. Charakteristisch war auch hier die teilweise scheinbare Reduktion nach Inkubation mit Pyridin, die durch das Verdrängen von hämgebundenem Sauerstoff zustande kommt. Im UVvis-Spektrum konnten nach Reduktion mit Dithionit die beiden Hämzentren über die split- $\alpha$ -Bande unterschieden werden, wie es auch bei RoxA aus *Xanthomonas* sp. 35Y der Fall ist. Ein Unterschied ergab sich bei der Auswirkung von  $\beta$ -Carotin auf die Aktivität, RoxA aus *Xanthomonas* sp. 35Y wurde hierdurch deutlich weniger inhibiert (55% Aktivität) als RoxA aus *Coralloccoccus coralloides* BO35 (10% Aktivität). Dadurch kann eine veränderte Substratspezifität der RoxA-orthologen Proteine im Vergleich zu RoxA aus *Xanthomonas* sp. 35Y angenommen werden. Die in der hier vorliegenden Arbeit untersuchten Aminosäurereste F301, F317 und W291 sind innerhalb der RoxA-orthologen konserviert und verdeutlichen die Wichtigkeit der Aminosäurereste für diese Enzyme.

Das aus dem Gram-positiven Bakterium *Streptomyces* sp. K30 stammende **Lcp** konnte in *Xanthomonas* sp. 35Y  $\Delta$ roxA funktionell exprimiert werden, was auf Latex overlay Agar durch den Nachweis der Spaltprodukte mit Schiff's-Reagenz sichtbar gemacht wurde. Eine neu etablierte Zwei-Stufen Reinigung von nativem Lcp erlaubte eine erste Charakterisierung des Enzyms. Das pH-Optimum lag zwischen 7 und 8 in 100 mM Kaliumphosphatpuffer. Detergenzien inhibierten die Aktivität vollständig, Imidazol und Dithiothreitol teilweise. Bis auf Diethyldithiocarbamat hatten andere Chelatbildner keinen inhibitorischen Effekt auf die Aktivität von Lcp. Bei 37°C zeigte sich eine deutlich höhere temperaturabhängige Inaktivierung für Lcp als für RoxA.

Die Ausbeute war mit 1,5 mg Lcp pro 12 l Kultur sehr gering, für weitere Untersuchungen wurde daher Lcp N-terminal mit einem Strep-Tag ausgestattet und in *E. coli* heterolog exprimiert. Die Ausbeute steigerte sich so auf das 40-fache (5 mg/l). Die spezifische Aktivität von Lcp wurde auf Basis des verbrauchten Sauerstoffs im Reaktionsansatz ermittelt (23°C: 1,5 U/mg; 37°C: 4,6 U/mg). Über einen spektroskopischen Test und auch mittels MALDI-TOF Analyse (Matrix-assisted laser desorption/ionization - time of flight) ließ sich Lcp den *b*-Typ Cytochromen zuordnen. Spektroskopische Untersuchungen mit Imidazol und Kohlenstoffmonoxid offenbarten eine oxidierte und damit sauerstofffreie Hämgruppe ( $\text{Fe}^{3+}$ ), was im Gegensatz zur Hämgruppe des aktiven Zentrums von RoxA steht ( $\text{Fe}^{2+}$ -- $\text{O}_2$ ).

## Abstract

The subject of this thesis was the characterization of RoxA (rubber oxygenase A) from *Xanthomonas* sp. 35Y and Lcp (latex clearing protein) from *Streptomyces* sp. K30. Both enzymes initiate the degradation of poly(*cis*-1,4-isoprene) by cleaving the polymer to aldehyde- and keto-group containing fragments.

In **RoxA** the surrounding of the N-terminal heme center was studied. This is the supposed active site of the enzyme, it binds a dioxygen molecule in the „as isolated“ state. The three-dimensional structure of RoxA was used to select several amino acid positions for site-directed mutagenesis.

Tryptophan 291 (W291) is located at the proximal site of the N-terminal heme center. It presumably interacts with the axial histidine ligand (H195). Purified RoxA-W291Y showed an activity of 5% compared to the wildtype. The decreased activity as well as the altered oxygen binding properties seem to be caused by modified positioning of H195 or stability loss of the enzyme.

The amino acid residues phenylalanine 301 and 317 (F301, F317) are located in close distance to the distal site of the N-terminal heme center. Substitution with other amino acids resulted in decreased activity of the purified muteins (from 80% activity loss for RoxA-F301L to >99% for RoxA-F317Y). All muteins showed altered properties in the UVvis-spectrum, particularly in the region of the Q-bands (500 nm - 600 nm). Here, a lower absorption as in RoxA-Wt was observed. In contrast to RoxA-Wt, an incubation with pyridine, which can replace the heme-bound dioxygen, did not result in altered UVvis spectra of the muteins (except RoxA-F301Y). The reason for the stated properties of the muteins can be found in a decreased O<sub>2</sub>-binding ability compared to RoxA-Wt. Thus, the amino acid residues F301 and F317 are important for binding and stabilizing the heme-bound dioxygen. This contributes to the high stability of dioxygen-bound RoxA, a property that distinguishes this enzyme from other heme containing dioxygenases such as tryptophan-2,3-dioxygenase (TDO) or indolamine-2,3-dioxygenase (IDO).

Unusual characteristics were found for two muteins. In RoxA-F317Y, the oxygen atom of the tyrosinate residue interacts with the N-terminal iron, thereby blocking the dioxygen binding pocket. This explains the complete loss of enzymatic activity. In contrast to RoxA-F317Y, the tyrosine residue of RoxA-F301Y does not interact with the iron atom of the heme group. Here, the bound dioxygen is stabilized by hydrogen bonds with the hydroxyl-group of tyrosine.

The heterologous expression of **RoxA-orthologous proteins** in *Xanthomonas* sp. 35Y, obtained from three different myxobacteria, allowed a functional identification of RoxA in other Gram-negative bacteria. The activity of these proteins was demonstrated with the appearance of clearing zones around the corresponding recombinant *Xanthomonas* sp. 35Y strains and by HPLC-based detection of the cleavage product ODTD. The UVvis-spectroscopic properties of the RoxA-orthologous proteins were similar to RoxA from *Xanthomonas* sp. 35Y. Incubation with pyridine resulted in a partial reduction in the spectrum, triggered by replacement of the N-terminal bound dioxygen with this compound. Chemical reduction with dithionite resulted in a split- $\alpha$ -band, similar to RoxA from *Xanthomonas* sp. 35Y. A difference between RoxA and the orthologous proteins was shown after incubation with the inhibitor  $\beta$ -carotene (55% activity for RoxA from *Xanthomonas* sp. 35Y, 10% activity for RoxA from *Corallococcus coralloides* BO35). This suggested a different substrate specificity of the RoxA-orthologous proteins compared to RoxA from *Xanthomonas* sp. 35Y. The amino acid residues F301, F317 and W291, that were studied in this work, are conserved among the different RoxA proteins. This demonstrates the significance of these residues for RoxAs.

**Lcp** of the Gram-positive bacterium *Streptomyces* sp. K30 was functionally expressed in *Xanthomonas* sp. 35Y  $\Delta$ *roxA*. The cleavage products were detected with Schiff's reagent on latex overlay agar. A new developed two-step purification of native Lcp was established, this allowed a first characterization of this enzyme. The pH-optimum was determined between 7 and 8 in 100 mM potassium phosphate buffer. Detergents completely inhibited the activity of Lcp, imidazole and dithiothreitol partially. With the exception of diethyldithiocarbamate, chelators had no inhibitory effect on Lcp activity. An incubation at 37°C showed that Lcp is stronger affected by heat dependent inactivation than RoxA. The Lcp yield was increased 40-fold with a Strep-Tag construct and expression in *E. coli* (5 mg/l). The specific activity for Lcp was determined (23°C:

1,5 U/mg; 37°C: 4,6 U/mg). Lcp was assigned as *b*-type cytochrome by spectroscopic and MALDI-TOF analysis. Moreover, incubation of Lcp with imidazole or carbon monoxide revealed an oxidized, oxygen-free heme-group ( $\text{Fe}^{3+}$ ). This is in sharp contrast to the active site heme of RoxA ( $\text{Fe}^{2+}-\text{O}_2$ ).

# 1 Einleitung

## 1.1 Kautschuk

Kautschuk, oft auch einfach als Gummi bezeichnet, ist ein Wertstoff mit außergewöhnlichen und einzigartigen Eigenschaften, der in der Industrie, aber auch im alltäglichen Leben, essentiell geworden ist. Der Name Kautschuk leitet sich aus der Sprache der Eingeborenen Südamerikas ab: „ca-hu-chu“ bedeutet soviel wie „weinender Baum“ oder „Träne des Holzes“. Eingesetzt wird Gummi von der Menschheit schon seit mehreren hundert Jahren, bereits im 15. Jahrhundert wurden daraus Spielbälle für Kinder hergestellt oder auch Materialien wasserfest abgedichtet. Eine erste wissenschaftliche Beschreibung wurde 1736 von Charles de La Condamine vorgenommen, der auch die Gewinnung von Kautschuk schilderte (Sommer & Röthemeyer, 2006).

Heute wird zwischen natürlichem (NR) und synthetischem Kautschuk (SR) unterschieden. Als SR werden verschiedene Polymere bezeichnet, die meist auf Erdölbasis hergestellt werden (Fang et al., 2001). Der quantitativ bedeutendste ist zweifelsohne Styrol-Butadien-Kautschuk. Über die Hälfte des gesamten synthetischen Gummis besteht aus diesem Polymer, das hauptsächlich für die Herstellung von Reifen verwendet wird (White 2007). Weitere bekannte Vertreter sind der Chloropren-Kautschuk (Markenname Neopren), der unter anderem für Bekleidungen genutzt wird, sowie der Nitril-Kautschuk, welcher beispielsweise in Handschuhen und Dichtungen zum Einsatz kommt.

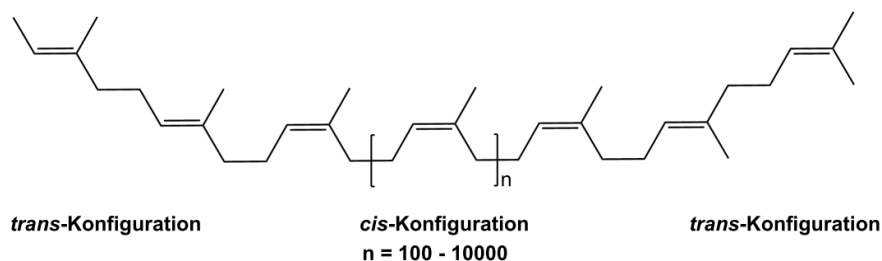
Natürliche Kautschukproduzenten sind neben einigen Pilzen vor allem Pflanzen aus der Klasse der Bedecktsamer, beispielsweise Korbblütler wie der Löwenzahn (*Taraxacum* sp.), Wolfsmilchgewächse wie die Guayule (*Parthenium argentatum*) oder Maulbeergewächse wie der Gummibaum (*Ficus elastica*) (Schmidt et al., 2010; Siler et al., 1997).

Die Latexmilch dieser Pflanzen, in der Kautschuk in kolloidaler Form vorliegt, dient dem Wundverschluss, da der klebrige Milchsaf rasch koaguliert. Je nach Pflanze besteht Naturkautschuk aus Polyisopreneinheiten, die in *cis* oder *trans* Konfiguration, aber auch als Mischung vorliegen können. Bekannte Vertreter für die Produktion von poly(*trans*-isopren) sind *Palaquium gutta* aus Asien sowie *Manilkara bidentata* aus Mittelamerika. Der aus diesen Bäumen

gewonnene Gummi wird als Gutta percha bzw. als Balata bezeichnet. Ein besonderer Fall ist bei dem aus Mittelamerika stammenden Baum *Manilkara chicle* vorzufinden, der poly(*cis/trans*-isopren) zu gleichen Anteilen produziert (Rose & Steinbüchel, 2005).

## 1.2 Die industrielle Kautschuk-Produktion

Über 99% des heute industriell gewonnen Kautschuks stammt aus der Latexmilch des Baumes *Hevea brasiliensis* (Thanseem et al., 2005; Uthup et al., 2011). Dieser Baum gedeiht in einer Zone von etwa 15° nördlich und südlich des Äquators, gehört zur Familie der Wolfsmilchgewächse und kann eine Höhe von über 20 Metern erreichen (Sommer & Röthemeyer, 2006). Durch „Tapping“, darunter versteht man das Einritzen des Baumstamms zwischen Rinde und Kambium, kann die Latexmilch geerntet werden. Diese wird von spezialisierten Zellen gebildet, den Laticiferen. Die Gummi-Ausbeute beträgt pro Baum und Jahr ca. 5 kg und kann über einen Zeitraum von etwa 25 Jahren fortgeführt werden (Sommer & Röthemeyer, 2006). Die Hauptbestandteile der Latexmilch sind Wasser, Polyisopren (25 - 35%, siehe Abb. 1), Proteine (1 - 1,8%), Kohlenhydrate (1 - 2%) und Lipide (0,4 - 1,1%) (Subramaniam, 1995). Der in der Latexmilch enthaltene Kautschuk (Polyisopren) besteht aus zwei flankierenden *trans*-Isopren- und bis zu mehreren zehntausend *cis*-1,4-Isopren-Untereinheiten. Er gehört damit zur Gruppe der Polyterpene.



**Abb. 1: Strukturformel von Polyisopren aus *Hevea brasiliensis*.** Das *cis*-1,4-Polymer kann bis zu 10000 Isopreneinheiten enthalten und ist jeweils von zwei *trans*-Isopren Einheiten flankiert (Tanaka et al., 1996).

Das Polymer liegt in Latexmilch als Emulsion vor, die wenigen Mikrometer messenden Polyisoprentropfen werden hier von einer Schicht aus negativ geladenen Proteinen und Lipiden umgeben. Auf diese Weise wird eine Aggregation der Kautschukpartikel verhindert und deren Löslichkeit gewährleistet (Cornish et al., 1999). Bereits kurz nach dem Kontakt der Latexmilch mit der Luft beginnt die Aggregation der Kautschukpartikel. Für einige industrielle Anwendungen muss die Latexmilch als Emulsion vorliegen, weshalb bereits kurz nach der Ernte Ammonium und gegebenenfalls andere Stoffe wie Antioxidantien hinzugegeben werden, um eine frühzeitige Aggregation zu verhindern.

Durch die Vulkanisation, um 1840 von Charles Goodyear (USA) und Thomas Hancock (GB) entwickelt, gelang es, die Eigenschaften von Naturkautschuk wie beispielsweise die Hitzestabilität, die Elastizität und die generelle Haltbarkeit entscheidend zu verbessern. Bei diesem Prozess wird Naturkautschuk unter Zusatz von Schwefel erhitzt, wodurch die langkettigen Polyisopreneinheiten durch Schwefelbrücken an den Doppelbindungen quervernetzt werden. Durch zusätzliche Modifikationen wie das Einlagern von Ruß, Weichmachern, Antioxidationsmitteln oder Flammenschutzmitteln können diese Eigenschaften weiter modifiziert und an den jeweiligen Einsatzzweck angepasst werden. Daher findet Naturkautschuk Verwendung in vielen Produkten, die besonders strapazierfähig und dabei gleichzeitig elastisch sein müssen. Mit einem Anteil von etwa 75% stellen Autoreifen das Haupteinsatzgebiet dar (Rose & Steinbüchel, 2005), aber auch Dichtungsgummis, Schläuche, Handschuhe, Isolierungen, Kondome und Radiergummis werden aus Naturkautschuk hergestellt.

Hier wird deutlich, wie wichtig dieser Rohstoff für das heutige Leben geworden ist. Aber bereits zu Zeiten des Zweiten Weltkrieges war die Abhängigkeit von Kautschuk sehr groß. Im Zuge des japanischen Vormarsches in den asiatischen Raum wurden die Alliierten von der Kautschuk-Hauptversorgung abgeschnitten. Dies führte in den USA zu staatlich verordneten Einschränkungen im Automobilbau und Straßenverkehr. Im Jahr 1942 rief Präsident Roosevelt die US-amerikanische Bevölkerung dazu auf, zuhause nicht mehr benötigten Gummi an speziellen Sammelstellen abzugeben, um die Versorgung des Landes zu gewährleisten. Er wies auf die Wichtigkeit dieses Materials in Kriegszeiten und für die laufende Wirtschaft hin und betonte auch, dass moderne Kriegsführung ohne Gummi nicht möglich sei. Ein Zitat aus einer Rede lautet:



*You and I want the finest and most efficient Army and Navy the world has ever seen (...). That means rubber - huge quantities of rubber - rubber for trucks and tanks and planes and gun mounts - rubber for gas masks and rubber for landing boats. But it is not the Army and Navy alone which need rubber. The process of production also needs rubber. We need rubber to get our war workers back and forth to their plants – some of them far from workers' homes. We need rubber to keep our essential goods and supplies moving (Roosevelt, 1942).*

Die stetig wachsende internationale Nachfrage an Gummi war der Grund für den ersten Kautschukboom in Brasilien um 1860-1920 (Barham & Coomes, 1994), da der Baum *Hevea brasiliensis* ursprünglich in der Region um den Äquator Südamerikas beheimatet war. Während dieser Zeit erfolgte im Amazonasgebiet ein wirtschaftlicher Aufschwung, bei dem beispielsweise das Dorf Manaus zur luxuriösen Großstadt heranwuchs. Jedoch gelang es bereits im Jahr 1876 Henry Wickham im Auftrag Großbritanniens, *Hevea* Samen aus Brasilien heimlich nach Europa zu überführen (Sommer & Röthemeyer, 2006). Daraufhin wurde der Baum im Laufe der Jahre interkontinental entlang des Äquators verbreitet, diese Zone wird heute auch als „Kautschukgürtel“ bezeichnet. Nur wenige Jahrzehnte nach der Verbreitung von *Hevea brasiliensis* wurde ein Großteil des Gummis in Asien produziert. Thailand, Indonesien und Malaysia beherrschen bis zum heutigen Tag einen Großteil der gesamten Naturkautschukproduktion, die laut Angabe des „Malaysian rubber board“ ([www.lgm.gov.my](http://www.lgm.gov.my)) für das Jahr 2014 etwa 12 Millionen Tonnen betrug.

Die Ursache für diese rasante Ablösung Brasiliens als Kautschuk-Hauptproduzent ist mikrobiologischen Ursprungs. Der Schlauchpilz *Microcyclus ulei* infiziert die Blätter von *Hevea brasiliensis*, wodurch der Baum fast immer abstirbt (Lieberei, 2007). Angelegte *Hevea*-Plantagen sind besonders verwundbar, da sich der Pilz aufgrund der räumlichen Nähe der Bäume leicht ausbreiten kann. Ein bekanntes Beispiel hierfür ist die brasilianische Stadt Fordlandia, die Henry Ford um 1929 zur Kautschukgewinnung gründete (Russell, 1942). Nach einigen Jahren waren alle Bäume durch *Microcyclus ulei* vernichtet, wodurch diese Investition von Henry Ford in einem finanziellen Debakel endete. So muss die Latexmilch in Brasilien bis heute von wildwachsenden Bäumen im Dschungel geerntet werden. Da *Microcyclus ulei* bis jetzt auf Südamerika beschränkt ist, können in Asien problemlos große Plantagen betrieben werden, wodurch eine wesentlich höhere Wirtschaftlichkeit erreicht werden kann.

### 1.3 Der natürliche Abbau von Kautschuk

Trotz der seit über 100 Jahren kontinuierlichen Produktion und Freisetzung von Kautschukprodukten lässt sich keine Anhäufung des Polymers in der Biosphäre beobachten, was sich anderenfalls durch anfallenden Reifenabrieb an den Rändern von Straßen bemerkbar machen würde. Dies lässt sich durch die biologische Abbauleistung verschiedener Mikroorganismen erklären, die das Polyisopren als Kohlenstoffquelle nutzen können. Allerdings schreitet der Abbau von Kautschuk vergleichsweise langsam voran, was sich auch in den relativ geringen Wachstumsraten der beteiligten Mikroorganismen widerspiegelt. Aufgrund dessen und auch durch die Tatsache, dass in der Vergangenheit eher auf eine erhöhte Haltbarkeit von Kautschuk als auf dessen Abbaubarkeit Wert gelegt wurde, ist es nicht verwunderlich, dass die Abbaumechanismen nicht oder nur unvollständig untersucht wurden. Für eine umweltgerechte Entsorgung des anfallenden Kautschuk-Abfalls ist jedoch eine umfassende Kenntnis über Kautschuk-abbauende Organismen sowie deren Abbauwege von großer Bedeutung.

Erste Untersuchungen zum biologischen Abbau von Kautschuk durch Mikroorganismen wurden bereits am Anfang des 20. Jahrhunderts durchgeführt (Söhngen & Fol, 1914). Hier konnte gezeigt werden, dass *Actinomyces fuscus* und *Actinomyces elastica* auf der Basis von Kautschuk wachsen können und dabei kleine Löcher in einer dünnen Naturkautschukschicht entstehen. Der Kautschuk wurde demnach von den Bakterien assimiliert.

Eine andere Möglichkeit den Abbau von Kautschuk nachzuweisen liegt in der Nutzung von Latex overlay Agarplatten. Hier wird eine Agarplatte mit einer dünnen Schicht Latexagar überzogen. Organismen, die Kautschuk als Kohlenstoffquelle nutzen können, sind zu einem Wachstum auf diesen Platten fähig. Hierbei kann ein extrazellulärer Abbau von Naturkautschuk anhand der Bildung von Klärhöfen um die entsprechende Kolonie nachgewiesen werden. So konnten erstmals Aktinomyceten beschrieben werden, die zu einer Klärhofbildung befähigt sind (Spence & van Niel, 1936). Diese Technik ermöglicht infolgedessen die Unterscheidung zwischen klärhofbildenden und nicht-klärhofbildenden Organismen.

Auch Pilze sind zu einem Kautschuk-Abbau in der Lage. Erste Untersuchungen hierzu zeigten einen Gewichtsverlust des Polymers bei gleichzeitiger Zunahme der Biomasse von *Penicillium* und *Aspergillus* (de Vries, 1928). Ein Wachstum auf Kautschuk konnte auch für *Monascus*

*rubber* und *Monascus purpureus* beschrieben werden (Schade, 1937). Durch die Abnahme des durchschnittlichen Molekulargewichts von Polyisopren bei gleichzeitiger Senkung der Viskosität konnten *Cladosporium cladosporioides* und *Fusarium solani* ebenfalls als Latex-abbauende Pilze identifiziert werden (Borel et al., 1982). Diese Methoden zur Identifizierung neuer Kautschuk-Abbauer werden bis heute angewandt, so konnten jüngst weitere *Aspergillus*-Arten als poly(*cis*-1,4-isopren)-spaltende Organismen identifiziert werden (Ismail et al., 2013).

Bei den bis jetzt angeführten Beispielen des Kautschuk-Abbaus handelte es sich immer um den Abbau des in der Industrie praktisch ausschließlich eingesetzten poly(*cis*-1,4-isopren). Bakterien sind aber auch zu einer Spaltung von poly(*trans*-1,4-isopren) fähig (Warneke et al., 2007). Alle sechs der untersuchten Isolate konnten über eine 16S-rDNA Analyse der Gattung *Nocardia* zugeordnet werden. Bewiesen wurde die Assimilierung des *trans*-Polymers durch die Freisetzung des Stoffwechselprodukts Kohlenstoffdioxid. Interessanterweise waren diese Nocardien auch dazu in der Lage, das *cis*-Polymer zu verwerten. Dies ist auch bei *Nocardia nova* SH22a der Fall. Bei einer Mutationsanalyse von *N. nova* SH22a konnte gezeigt werden, dass spezifische Defizite bei dem Abbau von Polyisopren immer das *trans*-Polymer, jedoch nie das *cis*-Polymer betrafen. Hieraus folgerten die Autoren unter anderem, dass viele Abbauschritte der beiden Polymere identisch sind, der Abbau des *trans*-Polymers aber zusätzliche Schritte beinhalten könnte (Luo et al., 2013).

Die Frage, ob Mikroorganismen auch zu einem Abbau von vulkanisiertem Naturkautschuk befähigt sind, versuchte man bereits im Jahr 1942 zu klären. Nach Zugabe von vulkanisierten Kautschukpartikeln zu Meerwasser stieg der Sauerstoffverbrauch an, was als ein Hinweis für eine Abbauleistung gesehen wurde (Zobell & Grant, 1942). In anderen Experimenten wurde gezeigt, dass vulkanisierte Kautschuk-basierte Kabelisolierungen im Erdreich von Mikroorganismen angegriffen und beschädigt werden können. Weiterhin konnte verdeutlicht werden, dass synthetischer Gummi in den durchgeführten Experimenten langsamer angegriffen wurde (Blake & Kitchin, 1949). Erstmals gelang es Rook, zwei Streptomyceten-Stämme zu isolieren und in Reinkultur einen Abbau von vulkanisiertem Naturkautschuk sichtbar zu machen. Durch die Einwirkung dieser Stämme auf einen Dichtungsring waren deutliche makroskopische Veränderungen im Material, wie beispielsweise Löcher, erkennbar (Rook, 1955).

Mittlerweile sind viele Organismen beschrieben, die natürlichen Kautschuk, synthetisches Polyisopren oder vulkanisierten Kautschuk abbauen können (Bode et al., 2001; Tsuchii et al., 1985; Yikmis & Steinbüchel, 2012b). Die meisten lassen sich den Actinobacteria zuordnen (Heisey & Papadatos, 1995; Jendrossek et al., 1997). Wie bereits erwähnt, können die Kautschuk-abbauenden Organismen mit Hilfe von Latex overlay Agarplatten in zwei Kategorien eingeteilt werden:

(i) Die **nicht-klärhofbildenden** Organismen gehören häufig der *Corynebacterium-Nocardia-Mycobacterium*-Gruppe an, sie benötigen einen direkten Kontakt zum Substrat. Einige dieser Vertreter gehören zu den potentesten Kautschuk-abbauenden Organismen, die bisher beschrieben wurden, beispielsweise *Gordonia* sp. Stamm VH2, *Gordonia westfalica* Stamm Kb1, *Nocardia farcinica* und *Mycobacterium fortuitum* Stamm NF4 (Ibrahim et al., 2006; Linos et al., 2000b; Rose & Steinbüchel, 2005). Bisher wurden nur wenige Gram-negative Bakterien mit der Fähigkeit des Kautschuk-Abbaus gefunden. Zu der hier vorgestellten Gruppe der nicht-klärhofbildenden Vertreter zählen einige *Pseudomonas* Arten und *Acinetobacter calcoaceticus* (Bode et al., 2000, 2001; Linos et al., 2000).

(ii) Die **klärhofbildenden** Organismen benötigen keinen direkten Kontakt zum Substrat. Sie sind dazu in der Lage, das Kohlenwasserstoff-Polymer mit extrazellulären Enzymen zu spalten und die Abbauprodukte zu assimilieren, wodurch eine Klärhofbildung um die Kultur sichtbar wird. Vertreter dieser Organismen gehören häufig den Streptomyceten an, beispielsweise *Streptomyces griseus* 1D und *Streptomyces coelicolor* 1A (Bode et al., 2001; Jendrossek et al., 1997).

Auch *Streptomyces* sp. K30 und *Xanthomonas* sp. 35Y gehören zu dieser Gruppe (Rose et al., 2005b; Tsuchii & Takeda, 1990). Die aus diesen Bakterien stammenden Proteine Lcp und RoxA sind für die initiale poly(*cis*-1,4-isopren)-Spaltung verantwortlich und wurden in der vorliegenden Arbeit näher untersucht. Daher werden diese Enzyme und die entsprechenden Bakterienstämme im weiteren Verlauf genauer vorgestellt.

## 1.4 *Xanthomonas* sp. 35Y

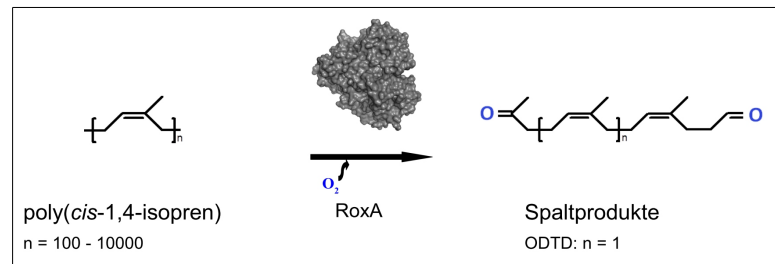
Lange Zeit war *Xanthomonas* sp. 35Y das einzige beschriebene Kautschuk-abbauende Gram-negative Bakterium, das zu einer Klärhofbildung auf Latex overlay Agarplatten befähigt war, bis vor einiger Zeit *Rhizobacter gummiphilus* sp. Stamm NS21 (zuvor: *Methylibium* sp. Stamm NS21) ebenfalls dieser Gruppe zugeordnet werden konnte (Imai et al., 2011, 2013). Der Stamm *Xanthomonas* sp. 35Y wurde im Jahr 1990 von Tsuchii und Takeda erstmals beschrieben und auch taxonomisch zugeordnet. Es handelt sich hierbei um ein obligat aerobes Stäbchenbakterium mit einer Größe von ca. 0,6 x 3-5 µm, die Motilität wird durch 1-2 polare Flagellen gewährleistet. Kolonien weisen eine deutlich gelbliche Färbung auf, was durch ein wasserunlösliches Pigment zustande kommt (Tsuchii & Takeda, 1990). Später wurde gezeigt, dass es sich bei dem gelben Pigment um ein Xanthomonadin-Derivat handelt. Der Stamm konnte den  $\gamma$ -Proteobakterien zugeordnet werden, er ist jedoch nur bedingt mit anderen *Xanthomonas*-Spezies verwandt (Kerkhoff, 2001). Inzwischen konnte die chromosomale DNA von *Xanthomonas* sp. 35Y erfolgreich sequenziert werden, lediglich 126 Lücken in der DNA-Sequenz sind noch vorhanden (Universität Göttingen, Genomische und Angewandte Mikrobiologie, Prof. Dr. Rolf Daniel). Das Genom umfasst etwa 8 Mbp und beinhaltet über 6900 codierende Sequenzen, damit ist es deutlich umfangreicher als das von bekannten *Xanthomonas*-Spezies (um 5 Mbp oder weniger) (Bolot et al., 2013; Lee et al., 2005; da Silva et al., 2002; Simpson et al., 2000). Trotz der Genomsequenzierung war es bisher nicht möglich, *Xanthomonas* sp. 35Y taxonomisch genauer einzuordnen.

## 1.5 Rubber oxygenase A (RoxA)

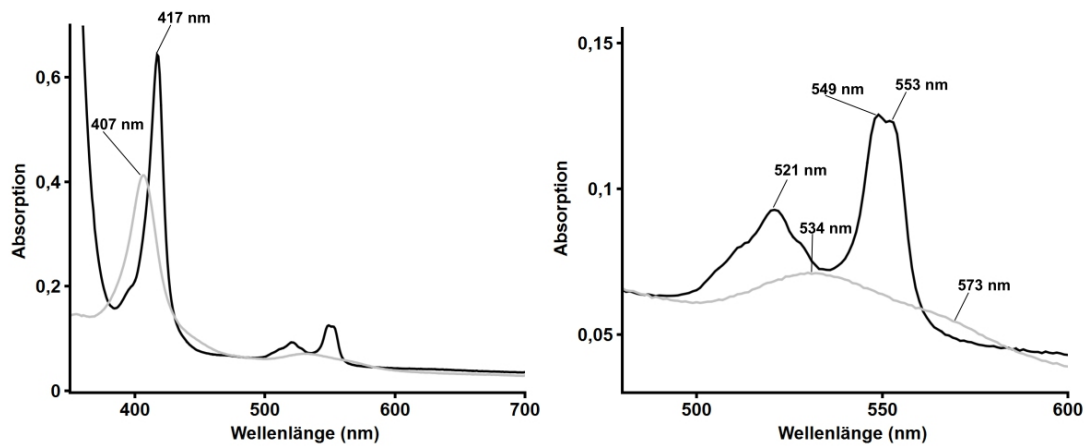
Tsuchii und Takeda konnten im Jahr 1990 erstmals zeigen, dass sich im Kulturüberstand von *Xanthomonas* sp. 35Y ein Protein befindet, das zu einer Spaltung von poly(*cis*-1,4-isopren) in der Lage ist. Das Hauptabbauprodukt dieses Enzyms, nun bekannt als RoxA, ist ODTD (12-oxo-4,8-dimethyl-trideca-4,8-dien-1-al). Es weist ein Rückgrat aus drei Isopreneinheiten auf (C<sub>15</sub>-Molekül) und wird von einer Keto- sowie einer Aldehydgruppe flankiert (Tsuchii & Takeda, 1990). Durch eine Peptidsequenz-Analyse von RoxA konnten zwei typische Cytochrom *c*

Hämbindemotive (CXXCH) gefunden werden, die es als ein Dihäm *c*-Typ Cytochrom ausweisen (Jendrossek & Reinhardt, 2003). Bei Versuchen mit  $^{18}\text{O}_2$  gelang der Nachweis des Einbaus beider Sauerstoffatome in ODTD (Abb. 2), bei der katalytischen Reaktion handelt es sich also um einen Dioxygenase-Mechanismus (Braaz et al., 2005a). Weiterhin konnten neben dem Hauptabbauprodukt ODTD andere Nebenprodukte nachgewiesen werden ( $\text{C}_{10}$  bis  $\text{C}_{30}$ -Moleküle), die sich nur in der Anzahl der vorhandenen Isopreneinheiten voneinander unterscheiden. Diese werden im Vergleich zu ODTD aber wesentlich seltener gebildet, das am häufigsten anzutreffende Nebenprodukt ist das  $\text{C}_{20}$ -Molekül mit etwa 11% der relativen Menge von ODTD (Braaz et al., 2004).

**Abb. 2: RoxA-abhängige Spaltung von poly(*cis*-1,4-isopren).** Bei der Reaktion handelt es sich um einen Dioxygenase-Mechanismus. Hauptabbauprodukt ist ODTD, es konnten aber auch weitere Nebenprodukte nachgewiesen werden ( $n = 0 - 4$ ).



Durch die Aufreinigung des nativen Enzyms aus dem Kulturüberstand von *Xanthomonas* sp. 35Y konnte eine spektroskopische Charakterisierung vorgenommen werden (Braaz et al., 2004). Hierbei zeigte sich im UVvis-Spektrum, dass RoxA sowohl im „as isolated“ Zustand als auch im chemisch reduzierten Zustand (Dithionit) typische Merkmale eines *c*-Typ Cytochroms innewohnen. Eine Besonderheit stellen die eng beieinander liegenden, nahezu gleich intensiven Absorptionsmaxima bei 549 nm und 553 nm dar, die RoxA als ein Cytochrom mit einer split- $\alpha$ -Bande ausweisen (Abb. 3).

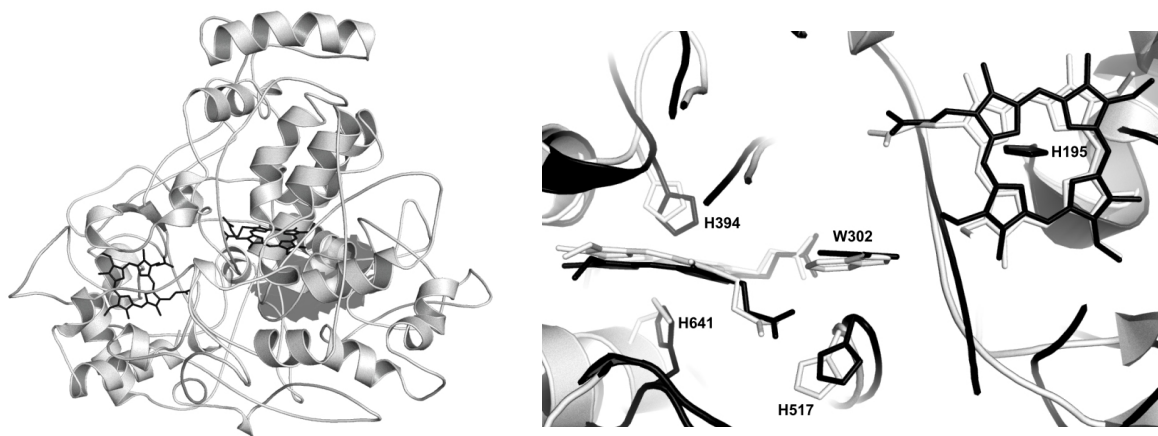


**Abb. 3:** UVvis-Spektren von RoxA „as isolated“ (grau) und Dithionit-reduziert (schwarz), rechts ist der Bereich der Q-Banden (ca. 500 - 600 nm) vergrößert dargestellt. Die für RoxA typischen Absorptionsmaxima liegen „as isolated“ bei 407 nm (Soret-Bande) und 534 nm ( $\beta$ -Bande), auch kann ein schwaches Signal um 573 nm ( $\alpha$ -Bande) erkannt werden. Reduziert sind die Maxima bei 417 nm (Soret-Bande), 521 nm ( $\beta$ -Bande), 549 nm und 553 nm (beides  $\alpha$ -Banden) sichtbar. Die zuletzt Genannten stellen eine Besonderheit dar, wodurch sich RoxA zur Gruppe der split- $\alpha$  Cytochrome zuordnen lässt.

Die beiden Hämgruppen von RoxA sind für die soeben genannten spektroskopischen Eigenschaften verantwortlich. Aufgrund vorhergehender Untersuchungen wird angenommen, dass das **N-terminale**, 5-fach koordinierte Hämzentrum von RoxA für die katalytische Aktivität verantwortlich ist. Wahrscheinlich liegt hier im „as isolated“ Zustand gebundener molekularer Sauerstoff vor (Schmitt, 2012). Durch Kristallisation und anschließende Strukturaufklärung war die dreidimensionale Struktur von RoxA (Abb. 4, links) mit einer Auflösung von 1,8 Å verfügbar (Hoffmann et al., 2008). Es konnte jedoch keine Aussage über ein O<sub>2</sub>-Molekül getroffen werden, das an der N-terminalen Hämgruppe assoziiert sein könnte. Es offenbarte sich aber eine strukturelle Ähnlichkeit zu den bakteriellen Cytochrom *c* Peroxidasen (CCPs), beispielsweise sind die Lage und der Abstand der Hämgruppen von RoxA nahezu identisch zu CCPs (Abb. 4, rechts). Des Weiteren sind einige bei CCPs konservierte Aminosäurereste auch in RoxA zu finden (z. B. H517 und W302, RoxA Nomenklatur).

CCPs sind im Periplasma lokalisiert und schützen die Zelle vor der toxischen Wirkung von Wasserstoffperoxid, indem sie dessen Reduktion zu Wasser katalysieren. Sie haben mit einer Größe von etwa 35 kDa ein deutlich geringeres Molekulargewicht als RoxA (71,5 kDa) (Arciero & Hooper, 1994; Fülöp et al., 1995; Shimizu et al., 2001). Trotz der genannten strukturellen Übereinstimmungen kann aber bei RoxA keine Peroxidaseaktivität nachgewiesen werden (Schmitt et al., 2010). Interessanterweise lassen sich die genannten Verwandtschaftsmerkmale mit

CCPs auch bei MauG wiederfinden, einem Dihäm Cytochrom *c* aus *Paracoccus denitrificans*. Dieses Enzym ist an der posttranslationalen Modifikation der Methylamin Dehydrogenase (MADH) beteiligt. Im Laufe der katalytischen Aktivität werden  $3 \times 2$  Elektronen auf MauG übertragen und ein Sauerstoffatom in prä-MADH eingefügt, wodurch der Kofaktor von MADH, Tryptophan-Tryptophyl-Chinon (TQQ), gebildet wird. Trotz dieser Ähnlichkeit zu CCPs ist auch bei MauG nur eine geringe Peroxidaseaktivität feststellbar (Jensen et al., 2010; Li et al., 2006; Shin et al., 2011; Wang et al., 2003).



**Abb. 4: Links: Cartoon der dreidimensionalen Struktur von RoxA.** Die Sekundärstruktur ist geprägt von Helices und einem relativ hohen Anteil an Loops. Im Bild sind auch die beiden kovalent gebundenen, tief im Inneren liegenden Hämzentren (schwarz) zu sehen, die RoxA als ein Dihäm *c*-Typ Cytochrom ausweisen.

**Rechts: Überlagerung der Strukturen von RoxA (schwarz) und einer bakteriellen Cytochrom *c* Peroxidase aus *Nitrosomonas europaea* (grau) im Bereich der Hämzentren.** Zu erkennen sind die nahezu identische Lage und Ausrichtung der Hämzentren sowie die auch in bakteriellen CCPs konservierten Aminosäurereste W302 und H517. Des Weiteren sind die axialen Liganden der Hämgruppen dargestellt. Die Nummerierung der Aminosäurereste bezieht sich auf die Position in RoxA.

## 1.6 Latex clearing protein (Lcp)

Das Latex clearing protein (Lcp) wurde erstmals im Gram-positiven Bakterium *Streptomyces* sp. K30 identifiziert und für die Klärhofbildung dieses Stamms auf Latex overlay Agarplatten verantwortlich gemacht. Auf den Platten konnten nach einer Inkubation mit Schiff's-Reagenz auch deutliche „Aldehydhöfe“ um *Streptomyces*-Spezies sichtbar gemacht werden, die auf die Aktivität von Lcp zurück zu führen sind. Der nicht-klärhofbildende *Streptomyces lividans* TK23 erhält durch heterologe Expression von Lcp aus *Streptomyces* sp. K30 die Fähigkeit der



Klärhofbildung (Rose et al., 2005b). Die Analyse der Spaltprodukte mittels präparativer GPC und MALDI-TOF ergab, dass im Gegensatz zu RoxA nicht ein Hauptprodukt entsteht, sondern eine Produktmischung. Lcp spaltet poly(*cis*-1,4-isopren) daher wahrscheinlich an zufälligen Positionen der Doppelbindungen innerhalb des Polyisoprenstrangs. Die Produkte tragen alle eine Aldehyd- sowie eine Ketogruppe, unterscheiden sich jedoch in der Anzahl der Isopreneinheiten voneinander (Ibrahim et al., 2006). Der Grundaufbau der Lcp-Spaltprodukte ( $\text{CH}_3\text{-CO-CH}_2\text{-[CH}_2\text{-CH=C(-CH}_3\text{)-CH}_2\text{]}_n\text{-CH}_2\text{-CHO}$ ) ist also identisch zu ODTD, dem Hauptspaltprodukt von RoxA.

Vergleicht man Lcp mit RoxA lassen sich neben den Spaltprodukten weitere Unterschiede feststellen. Die beiden Enzyme zeigen keine signifikante Sequenzhomologie, außerdem weichen die jeweiligen Molekulargewichte erheblich voneinander ab (Lcp: 41 kDa; RoxA: 71,5 kDa). Auch ist bei Lcp kein Cytochrom *c* Hämbindemotiv in der Aminosäuresequenz codiert. Weitere Unterschiede sind bei der Sekretion beider Enzyme vorzufinden. Lcp wird über einen TAT-abhängigen Mechanismus transportiert (Yikmis et al., 2008), während bei RoxA vermutlich das Sec-System zum Einsatz kommt.

Bisher konnte Lcp in allen darauf untersuchten Kautschuk-verwertenden Gram-positiven Bakterien nachgewiesen werden. Bemerkenswert ist, dass *lcp*-Gene in Spezies vorkommen, die keine Klärhöfe auf Latex overlay Agarplatten bilden, sondern adhäsiv darauf wachsen. Hierzu gehören beispielsweise *Gordonia polyisoprenivorans* und *Gordonia westfalica* (Bröker et al., 2008). Manchmal ist im Chromosom Kautschuk-abbauender Stämme auch mehr als eine *lcp*-Variante vorhanden. Bereits eines der Gene ist aber ausreichend, um ein Wachstum mit Kautschuk zu ermöglichen (Hiessl et al., 2012).

Die Expression und Reinigung von Lcp aus dem homologen Wirtstamm *Streptomyces* sp. K30 war bisher problematisch. In anderen Bakterienstämmen wie beispielsweise *Escherichia coli* oder *Pseudomonas putida* führte die Expression zu einem inaktivem Enzym (Yikmis & Steinbüchel, 2012a). So konnte eine molekularbiologische Charakterisierung von Lcp bisher nicht durchgeführt werden.

## 1.7 Ziel der Arbeit

Das Ziel der Arbeit ist es, weiterführende Einblicke in den mikrobiellen Abbau von Kautschuk zu erhalten. Die Enzyme der initialen Spaltung von poly(*cis*-1,4-isopren) sollen dazu näher untersucht werden.

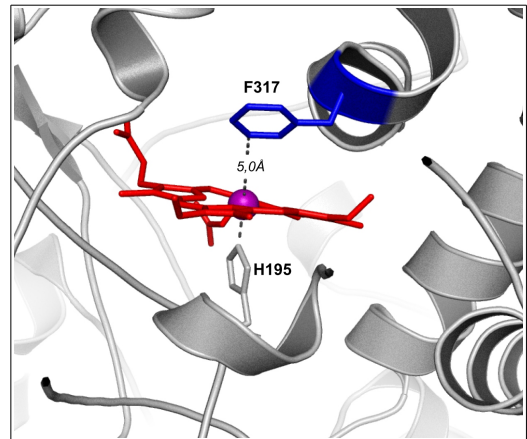
Für **RoxA** wird hierfür die Umgebung des N-terminalen, aktiven Hämzentrums genauer studiert. Hierbei sollen Aminosäurereste identifiziert werden, die für eine Interaktion mit den Substraten verantwortlich sind oder einen anderen Einfluss auf die Aktivität von RoxA ausüben. Die entsprechenden, zu untersuchenden Aminosäurereste sollen anhand der bekannten RoxA-Struktur ausgewählt, molekularbiologisch verändert und die Muteine später in *Xanthomonas* sp. 35Y überexprimiert werden. Zur genaueren Untersuchung der Muteine werden Methoden wie die UVvis-Spektroskopie, die CD-Spektroskopie und die EPR-Spektroskopie herangezogen, da RoxA außergewöhnliche spektroskopische Eigenschaften zeigt, womit sich präzise Aussagen über den aktuellen Zustand der Hämgruppen und deren Umgebung treffen lassen. Außerdem sollten aus Myxobakterien stammende, zu **RoxA-orthologe** hypothetische Proteine auf die Fähigkeit der Spaltung von poly(*cis*-1,4-isopren) geprüft werden. Hierzu werden diese in *Xanthomonas* sp. 35Y  $\Delta$ *roxA* heterolog exprimiert. Durch Vergleiche der Substrat- und Inhibitorspezifitäten könnten bei einem direkten Vergleich der Aminosäuresequenzen und auch der dreidimensionalen Strukturen in Zukunft Erkenntnisse über die bis jetzt unbekannt Polyisopren-Bindestelle gefunden werden.

Des Weiteren wird die Expression von **Lcp** mit *Xanthomonas* sp. 35Y  $\Delta$ *roxA* erprobt. Dieses in einigen Gram-positiven Bakterien vorzufindende, poly(*cis*-1,4-isopren)-spaltende Enzym konnte in der Vergangenheit lediglich in geringen Mengen funktionsfähig exprimiert werden, wodurch eine genaue Beschreibung bisher nicht möglich war. Daher sind bis jetzt die dreidimensionale Struktur, die Anwesenheit von Kofaktoren und auch der Reaktionsmechanismus nicht bekannt. Bei erfolgreicher Expression soll Lcp gereinigt und charakterisiert werden, wodurch sich Erkenntnisse im initialen Schritt der Polyisoprenspaltung durch Gram-positive Bakterien gewinnen ließen.

## 2 Ergebnisse

### 2.1 Der Aminosäurerest Phenylalanin an Position 317 ist essentiell für die Aktivität von RoxA (Birke et al., 2012)

Aufgrund der Kenntnis der dreidimensionalen Struktur von RoxA war es möglich, die N-terminale Hämgruppe (rot) genauer zu untersuchen. Hier wurde das Zentrum der katalytischen Aktivität von RoxA vermutet. Dabei erwies sich der Aminosäurerest F317 (blau) als besonders interessant. In der distalen N-terminalen Häm-Bindetasche ist neben Histidin 195 (grau) kein zweiter axialer Ligand am Eisenatom (magenta) zu finden, wodurch dieser Bereich als



besonders wahrscheinlich für eine Substratinteraktion angesehen wurde. Hier besitzt F317 von allen Aminosäuren mit 5 Å den geringsten Abstand zum Eisenatom. Diese räumliche Nähe suggeriert eine wichtige Rolle bei der Substratinteraktion, weshalb diese Position genauer untersucht wurde.

#### 2.1.1 Klonierung und Expression der RoxA-F317-Muteine

Fünf verschiedene RoxA-F317-Muteine (F317A, F317H, F317L, F317W, F317Y) wurden hergestellt und in *Xanthomonas* sp. 35Y überexprimiert. Dabei ergaben sich Schwierigkeiten mit dem zuvor beschriebenen Expressionsvektor p4872.1::*roxA* (Hamsch et al., 2010), so dass von Nadja Hamsch die Deletionsmutante *Xanthomonas* sp. 35Y  $\Delta$ *roxA* hergestellt wurde. Anstelle der chromosomalen *roxA*-Sequenz fand sich nun eine *attB*-Sequenz, über die ein entsprechender Vektor (pNH1) mit *attP*-Sequenz und codierender PhiC31 Integrase zielgerichtet in das bakterielle Chromosom integriert werden konnte. Dadurch war eine erfolgreiche und zuverlässige Rhamnose-abhängige *roxA*-Expression gewährleistet.

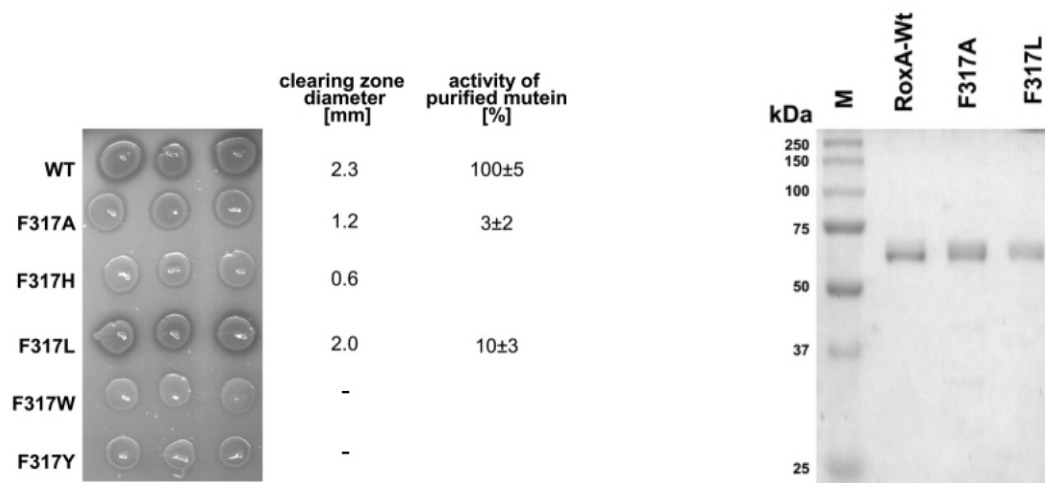
Die entsprechenden *roxA*-F317-Muteinsequenzen wurden in den Expressionsvektor pNH1 eingefügt, dieser wurde durch Konjugation von *Escherichia coli* S17-1 in *Xanthomonas* sp. 35Y  $\Delta$ *roxA* überführt. Die erfolgreiche Expression der Muteine bei vergleichbarer Ausbeute konnte durch eine SDS-PAGE der unkonzentrierten Kulturüberstände mit anschließender Hämefärbung gezeigt werden. Die *Xanthomonas* sp. 35Y Stämme mit den entsprechenden RoxA-F317 Muteinen wurden dann auf Latex overlay Agar überführt und mit Rhamnose induziert, anschließend für sechs Tage bei 30°C inkubiert. Die unterschiedlich großen Klärhöfe der Muteine könnten auf verschiedene Aktivitäten schließen lassen, da die Ausbeute, wie zuvor beschrieben, vergleichbar war (Abb. 5, links).

### **2.1.2 Reinigung von RoxA-F317A und RoxA-F317L**

Die Muteine RoxA-F317A und RoxA-F317L wurden über zwei Stufen Tag-frei gereinigt. Die erste Reinigung erfolgte über einen Anionenaustauscher (Q-Sepharose Fast Flow 50/11, Tris-HCl pH 8,5), RoxA konnte mit 50 mM NaCl eluiert werden. Nach erfolgter Umpufferung in 10 mM Kaliumphosphatpuffer (KPP, pH 6,8) erfolgte die zweite Reinigung über eine Hydroxyapatit-Säule (CHT5-I), bei der gereinigtes RoxA mit Hilfe eines KPP-Gradienten bei etwa 40 mM eluiert werden konnte. Der Reinigungserfolg der Muteine wurde über eine SDS-PAGE mit anschließender Coomassiefärbung überprüft (Abb. 5, rechts).

### **2.1.3 Bestimmung der relativen Aktivität von RoxA-F317A und RoxA-F317L**

Die gereinigten Muteine RoxA-F317A und RoxA-F317L zeigten eine relative Aktivität von 3% bzw. 10% zu RoxA-Wt. Die Bestimmung erfolgte über einen Aktivitätsassay, die Enzyme inkubierten hier für drei Stunden bei 37°C mit Latexmilchemulsion (0,2% Polyisopren). Anschließend wurde das Hauptabbauprodukt ODTD mittels Ethylacetat extrahiert, getrocknet, in Methanol aufgenommen und über eine HPLC analysiert (RP-8 Säule). Die dabei ermittelten Flächen für das ODTD-Signal von RoxA-Wt (festgelegt auf 100% relative Aktivität) und der Muteine wurde anschließend miteinander verglichen.

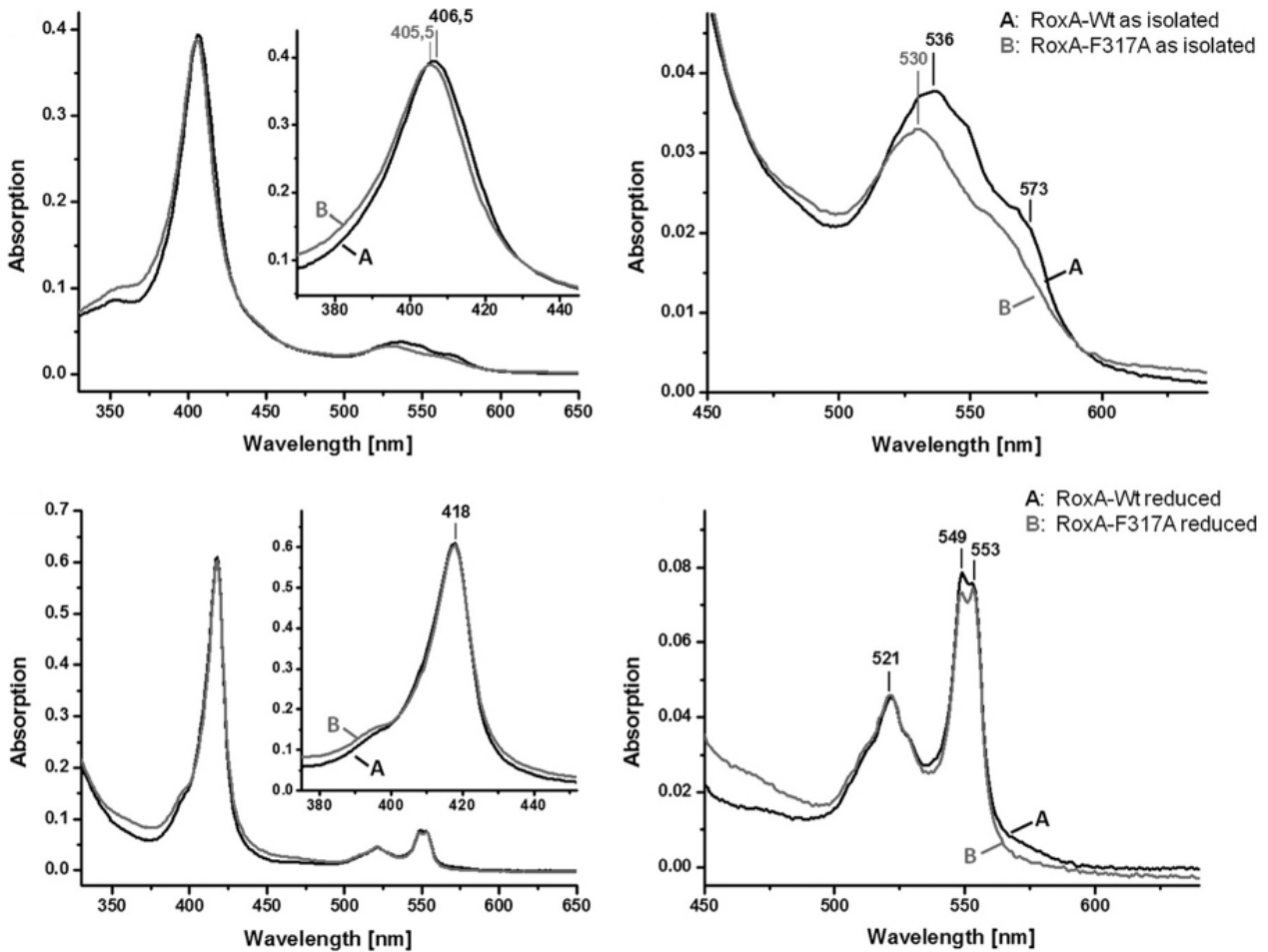


**Abb. 5: Links: *Xanthomonas* sp. 35Y Expressionskulturen der RoxA-F317-Muteine auf Latex overlay Agarplatten.** Die Inkubation der Kulturen erfolgte für sechs Tage bei 30°C. Zu erkennen sind Klärhöfe unterschiedlicher Größen, ausgelöst durch den entsprechenden Aminosäureaustausch in RoxA an der Position F317. In der Abbildung notiert ist die Größe des Klärhofs, die eine erste Abschätzung der relativen Aktivitäten zu RoxA-Wt ermöglicht. Auch aufgeführt ist die relative Aktivität, die für die gereinigten Muteine im Vergleich zu RoxA-Wt ermittelt wurde.

**Rechts: SDS-PAGE (Coomassiefärbung) der gereinigten RoxA-Varianten RoxA-Wt, RoxA-F317A und RoxA-F317L.** Zu erkennen ist eine hohe Reinheit aller Proteine.

#### 2.1.4 UVvis-spektroskopische Untersuchung von RoxA-F317A

Das Mutein RoxA-F317A wurde UVvis-spektroskopisch genauer untersucht und mit RoxA-Wt verglichen (Abb. 6). Bei der Soret-Bande erfolgte für das Mutein eine leichte Verschiebung von 406,5 nm zu 405,5 nm, weiterhin war eine leichte Erhöhung der Absorption zwischen ~350 nm und 380 nm zu erkennen. Eine besonders deutliche Veränderung ergab sich im Bereich der Q-Banden (500 nm - 600 nm), wobei zunächst eine generell schwächere Absorption bei dem Mutein erkennbar war. Des Weiteren zeigte RoxA-F317A eine Blauverschiebung des 536 nm Maximums auf 530 nm, auch war die schwache Absorptionsschulter um 573 nm nicht mehr erkennbar. Im reduzierten Zustand (Dithionit) ergab sich für RoxA-F317A ebenfalls eine Erhöhung der Absorption zwischen ~350 nm und 380 nm, außerdem war bei 549 nm eine leichte Abschwächung des Signals sichtbar.



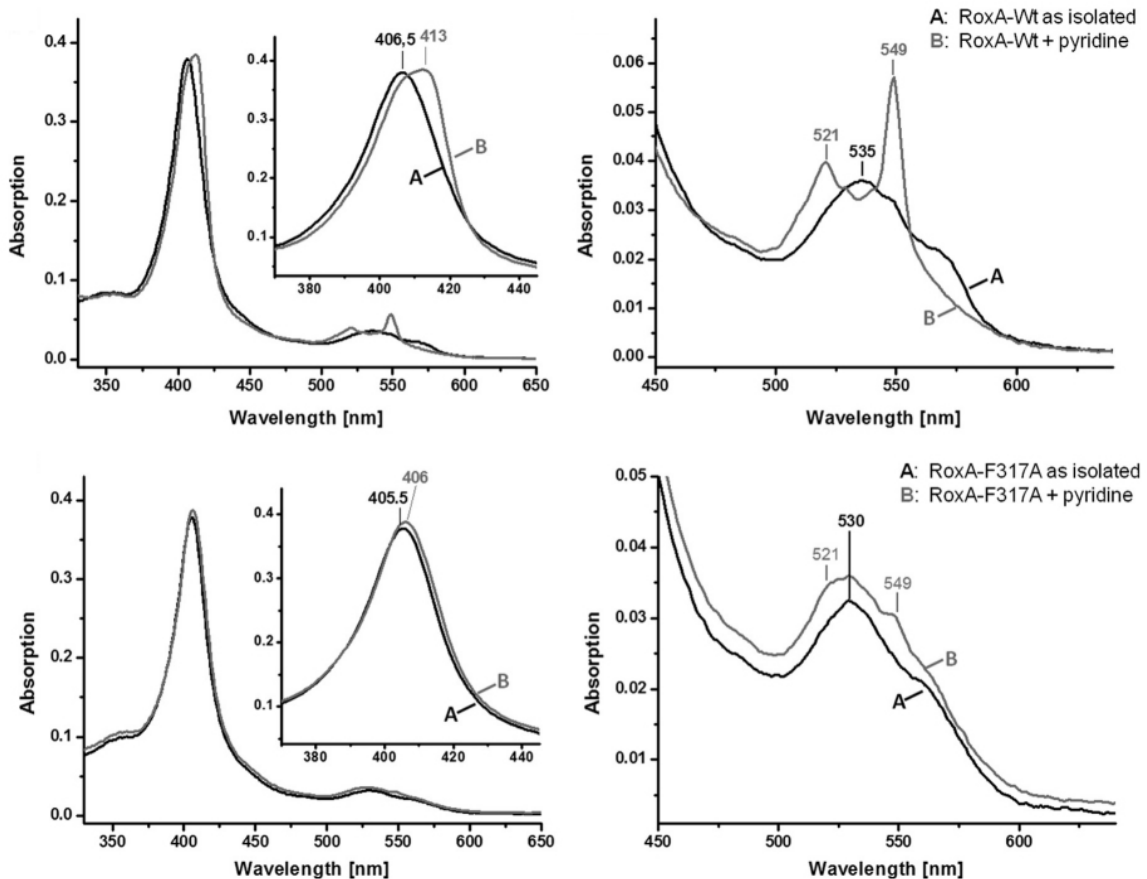
**Abb. 6: UVvis-Spektren von RoxA-Wt (A) und RoxA-F317A (B), rechts ist der Bereich der Q-Banden jeweils vergrößert dargestellt.**

**Oben: „as isolated“.** Das Mutein zeigt bei der Soret-Bande eine Blauverschiebung von etwa 1 nm und auch eine erhöhte Absorption zwischen ~350 nm und 380 nm. Die Q-Banden sind weniger stark ausgeprägt und etwas in den kürzeren Wellenlängenbereich verschoben.

**Unten: Dithionit-reduziert (Stickstoff-Atmosphäre)**

Die Soret-Bande hat in beiden Fällen ein Maximum bei 418 nm. Wie auch im „as isolated“ Zustand fällt bei RoxA-F317A eine leichte Erhöhung der Absorption zwischen ~350 nm und 380 nm auf, außerdem ist bei 549 nm eine leichte Abschwächung des Signals sichtbar.

Eine weitere UVvis-spektroskopische Untersuchung wurde in Gegenwart des bekannten RoxA Inhibitors Pyridin durchgeführt (Abb. 7). Hier zeigten sich erhebliche Unterschiede zwischen dem Mutein und dem Wildtyp. Bei RoxA-Wt wurde durch Pyridin eine scheinbare teilweise Reduktion eines der Hämzentren erreicht, sichtbar an den entstehenden Q-Banden bei 549 nm und 521 nm sowie einer Verschiebung/Verbreiterung der Soret-Bande mit einem neuen Maximum bei 413 nm. Dieser Effekt von Pyridin auf RoxA-Wt wurde bereits zuvor beschrieben (Schmitt, 2010). Bei RoxA-F317A war hingegen nahezu keine Veränderung im UVvis-Spektrum zu bemerken.



**Abb. 7: UVvis-Spektren von RoxA-Wt und RoxA-F317A „as isolated“ (A) und in Anwesenheit von 5 mM Pyridin (B), rechts ist der Bereich der Q-Banden jeweils vergrößert dargestellt.**

**Oben: RoxA-Wt.** In Gegenwart von Pyridin ist eine deutliche Verschiebung/Verbreiterung der Soret-Bande mit einem neuen Maximum bei 413 nm sichtbar. Außerdem werden neue Signale im Bereich der Q-Banden bei 549 nm und 521 nm deutlich, die eine teilweise Reduktion von RoxA zeigen. Zu beachten ist das Fehlen der 553 nm Bande, die im Falle einer vollständigen chemischen Reduktion mit Dithionit zu sehen ist (vgl. Abb. 6)

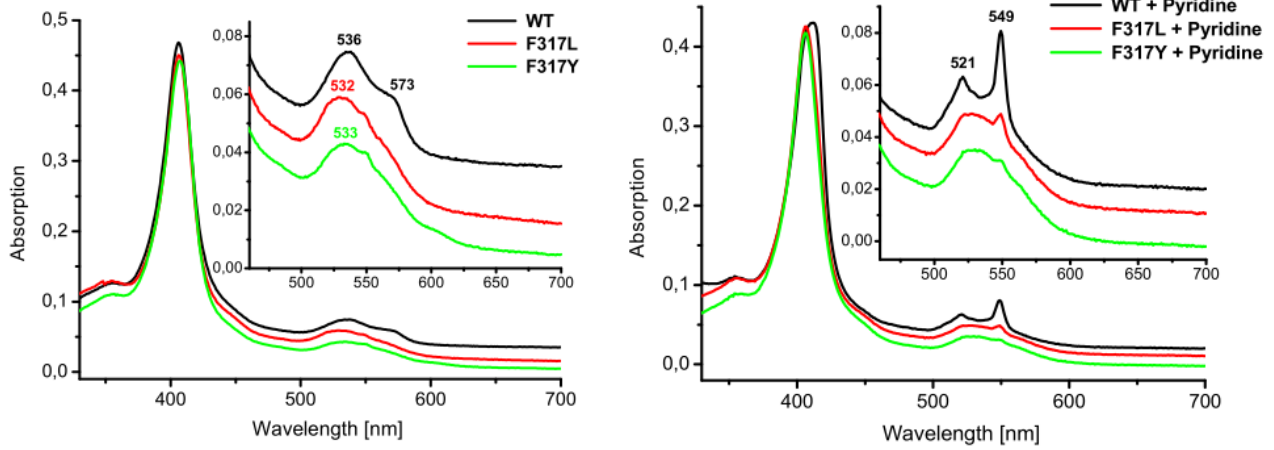
**Unten: RoxA-F317A.** Pyridin hat im Gegensatz zu RoxA-Wt nur eine sehr schwache Auswirkung auf das Mutein.

## 2.2 Das Mutein RoxA-F317Y

Das Mutein RoxA-F317Y konnte neben RoxA-F317A und RoxA-F317L ebenfalls gereinigt und charakterisiert werden. Das Vorgehen erfolgte analog zu RoxA-F317A (siehe Kapitel 2.1, Seite 27ff). Die Aktivität wurde über die HPLC-basierte Analyse von ODTD bestimmt, sie betrug weniger als 1% der Aktivität von RoxA-Wt. Es zeigte sich kein Klärhof der entsprechenden Expressionskultur auf Latex overlay Agar (vgl. Abb. 5). Die korrekte Faltung und eine vergleichbare Hitzestabilität wie für RoxA-Wt konnte mittels CD-Spektroskopie und Schmelztemperaturbestimmung (beide um 55°C) gezeigt werden. Eine UVvis-spektroskopische Untersuchung von RoxA-F317Y „as isolated“ ergab insgesamt ähnliche Ergebnisse wie für RoxA-F317A, auch hier war keine Absorptionserhöhung bei 573 nm erkennbar, wie es für RoxA-Wt charakteristisch ist (Abb. 8, rechts). Zu beobachten war jedoch eine sehr schwache Erhöhung der Absorption um 600 nm, die bei keiner der anderen untersuchten RoxA-Varianten (RoxA-Wt, RoxA-F317A, RoxA-F317L) detektiert werden konnte (Abb. 8, links und Abb. 6, Seite 30). Eine Inkubation von RoxA-F317Y mit Pyridin zeigte nur schwache Auswirkungen im UVvis-Spektrum. Es ergab sich nahezu keine Soret-Verschiebung zu längeren Wellenlängen und es zeigten sich nur geringe Auswirkungen im Bereich der Q-Banden bei 521 nm und 549 nm, was dieses Mutein von RoxA-Wt unterscheidet (Abb. 8, rechts). Insgesamt ähneln die Ergebnisse denen von RoxA-F317A (siehe dazu Abb. 7, Seite 31).

Eine Untersuchung von RoxA-F317Y über die EPR-Spektroskopie zeigte deutliche Veränderungen im Vergleich zu RoxA-Wt, da hier drei neue, scharf abgetrennte Signale zu erkennen waren ( $g_z=2,67$ ,  $g_y=2,22$ ,  $g_x=1,81$ ), die auf eine zusätzliche rhombische Spezies schließen lassen (Abb. 9).

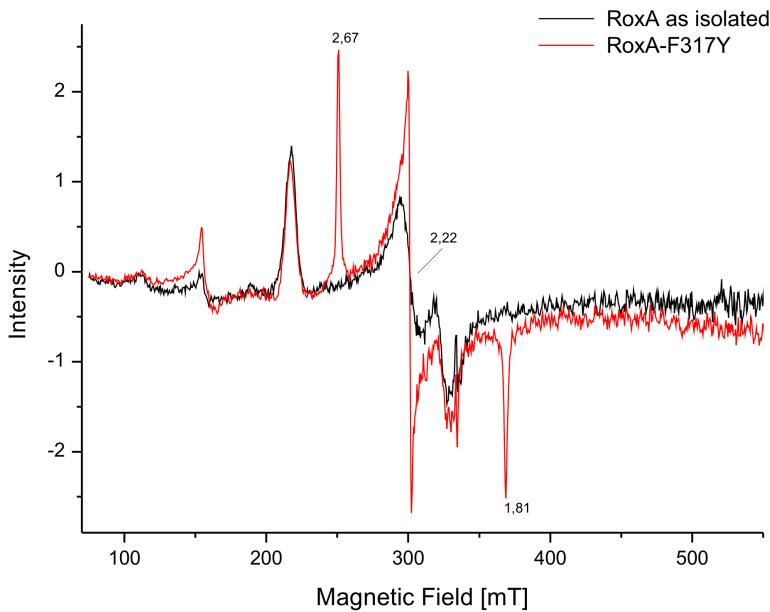




**Abb. 8 :** UVvis-Spektren von RoxA-Wt (schwarz), RoxA-F317Y (grün) und RoxA-F317L (rot). Die Q-Banden sind vergrößert dargestellt.

**Links: „as isolated“.** Die Muteine haben weniger ausgeprägte Q-Banden mit einer Blauverschiebung um 3 - 4 nm. Bei 573 nm erscheint bei RoxA-Wt ein Maximum, welches in allen gereinigten RoxA-F317-Muteinen fehlt. Erkennbar ist auch eine leichte Erhöhung der Absorption um 600 nm bei RoxA-F317Y.

**Rechts: Mit Pyridin (5 mM, 1 h bei RT).** Eine Behandlung von RoxA-Wt mit Pyridin wird im Spektrum durch eine teilweise scheinbare Reduktion von RoxA sichtbar. Deutlich wird dies vor allem durch das Auftreten der Signale bei 521 und 549 nm. Dieser Effekt war bei allen RoxA-F317-Muteinen deutlich weniger ausgeprägt.

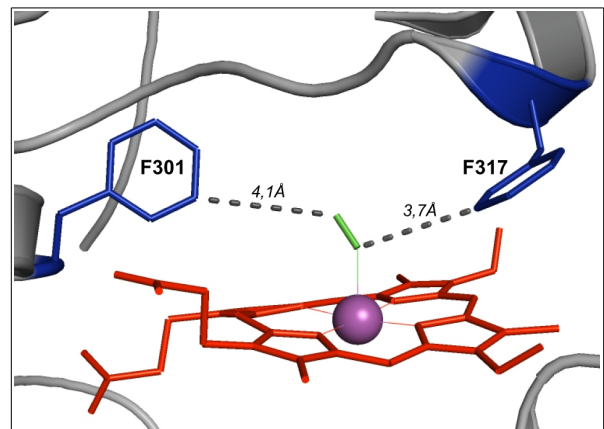


**Abb. 9: EPR-Spektrum von RoxA-Wt (schwarz) und RoxA-F317Y (rot) „as isolated“.** Messparameter: Temperatur 10 K, Frequenz: 9,478 GHz, Gain:  $10^5$ . Zu sehen sind deutliche Unterschiede in den Spektren. RoxA-F317Y weist eine zusätzliche intensive *low-spin*-Spezies mit scharfer rhombischer Signalaufspaltung auf ( $g_z=2,67$ ;  $g_y=2,22$ ;  $g_x=1,81$ ).

## 2.3 RoxA: Die Position F301

Durch spektroskopische Untersuchungen an RoxA-Wt wurde bereits vermutet, dass molekularer Sauerstoff am N-terminalen Hämzentrum gebunden ist (Schmitt, 2012). Die zu diesem Zeitpunkt bekannte RoxA Struktur erlaubte jedoch keine Aussage über ein mögliches assoziiertes O<sub>2</sub>-Molekül. Erst durch weitere kristallographische Analysen wurde die O<sub>2</sub>-Bindung an RoxA „as isolated“ zur Gewissheit (Seidel et al., 2013).

Neben dem bereits vorgestellten Aminosäurerest Phenylalanin an Position 317 konnte ein weiteres Phenylalanin (F301) identifiziert werden, welches auf der gegenüberliegenden Seite von F317 lokalisiert und etwa 1 Å weiter vom Eisenatom (magenta) des N-terminalen Hämzentrums (rot) entfernt ist. Eine genauere Betrachtung des N-terminalen



Hämzentrums zeigt, dass die beiden Reste F301 und F317 (blau) in auffälliger Nähe und Ausrichtung zu dem gebundenen O<sub>2</sub>-Molekül (grün) stehen. Aufgrund der Bedeutung von Position F317 auf die Aktivität von RoxA wurden die Muteine RoxA-F301L und RoxA-F301Y exprimiert und gereinigt.

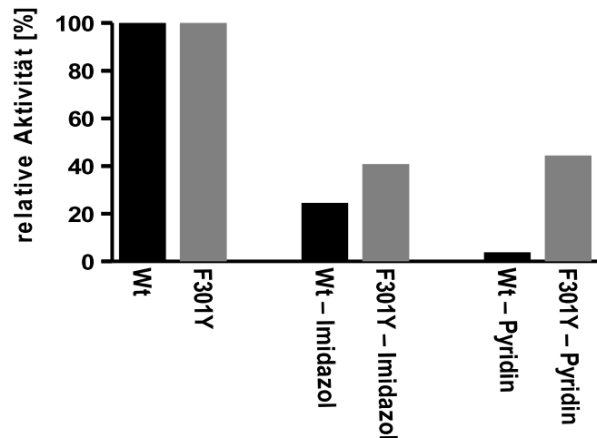
Die Expression der Muteine konnte über eine SDS-PAGE nachgewiesen werden. Die Aktivitäten von gereinigtem RoxA-F301L (20%) und RoxA-F301Y (11%) wurden ermittelt, ferner konnte für RoxA-F301L über die CD-Spektroskopie die Integrität der Struktur des Proteins verifiziert werden.

Untersuchungen im UVvis-Spektrum wurden in gleicher Weise durchgeführt wie mit den RoxA-F317-Muteinen (vgl. Kapitel 2.1.4). Für RoxA-F301L ergaben sich hierbei vergleichbare Ergebnisse wie für die RoxA-F317-Varianten, allerdings etwas weniger stark ausgeprägt (siehe dazu Abb. 8, Seite 33), was auch mit der relativ hohen Aktivität korrelierte. RoxA-F301Y wies jedoch einige bemerkenswerte Eigenschaften auf, die im Folgenden näher gezeigt werden sollen.

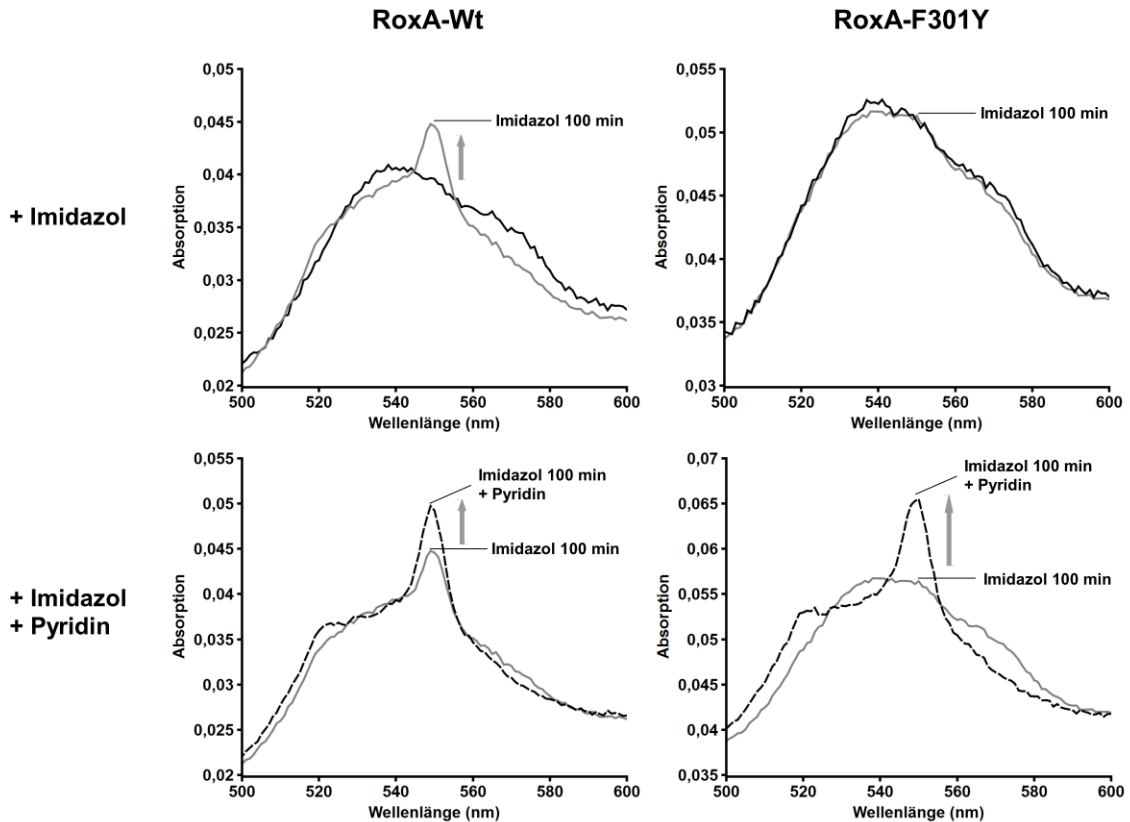
### 2.3.1 RoxA-F301Y

Bei einer Betrachtung der Aktivität von RoxA-F301Y in Anwesenheit der bekannten RoxA Inhibitoren Pyridin und Imidazol ließen sich erhebliche Unterschiede zu RoxA-Wt feststellen. Wie bereits beschrieben, löst der RoxA Inhibitor Pyridin eine teilweise Reduktion des Enzyms aus, sichtbar an den neuen Signalen bei 521 nm und 549 nm im UVvis-Spektrum (vgl. Abb. 7, Seite 31). Imidazol zeigt ähnliche Auswirkungen, ist jedoch ein etwas schwächerer RoxA-Inhibitor und benötigt für die Veränderungen im UVvis-Spektrum von RoxA eine längere Zeitspanne. Die Aktivität von RoxA-F301Y wurde durch Pyridin und Imidazol wesentlich weniger inhibiert als die des Wildtyps. Besonders deutlich sind diese Unterschiede bei der Hemmung mit Pyridin, das im Fall von RoxA-Wt einen nahezu vollständigen Aktivitätsverlust verursachte (4%), RoxA-F301Y zeigte hingegen noch eine residuale Aktivität von 45% (Abb. 10).

**Abb. 10: Relative Aktivitäten von RoxA-Wt und RoxA-F301Y in Anwesenheit der Inhibitoren Pyridin und Imidazol (je 1 mM).** Die relativen Aktivitäten der Inhibitoren beziehen sich auf 100% Aktivität des jeweiligen Enzyms ohne Inhibitor. Zu erkennen ist, dass das Mutein deutlich weniger von den Inhibitoren beeinflusst wird, als es für den Wildtyp der Fall ist.



Die Interaktion von RoxA-F301Y mit den beiden Inhibitoren wurde auch durch die UVvis-Spektroskopie untersucht. Im „as isolated“ Zustand war das Mutein mit dem Wildtyp vergleichbar. Die bekannte Auswirkung der teilweisen Reduktion durch Imidazol trat bei RoxA-Wt im Laufe von etwa 100 Minuten ein, bei RoxA-F301Y verblieb das Spektrum hingegen im „as isolated“ Zustand. Nach Zugabe von 2 mM Pyridin zu diesem Ansatz war für RoxA-F301Y nach 20 Minuten eine langsame, teilweise Reduktion feststellbar. Bei RoxA-Wt konnte dagegen nur noch eine schwache Erhöhung des Signals bei 549 nm erkannt werden, da zu Beginn bereits eine hohe Absorption vorlag. Die gesamte Absorptionzunahme der beiden Proteine im Bereich von 549 nm war in etwa vergleichbar (Abb. 11).



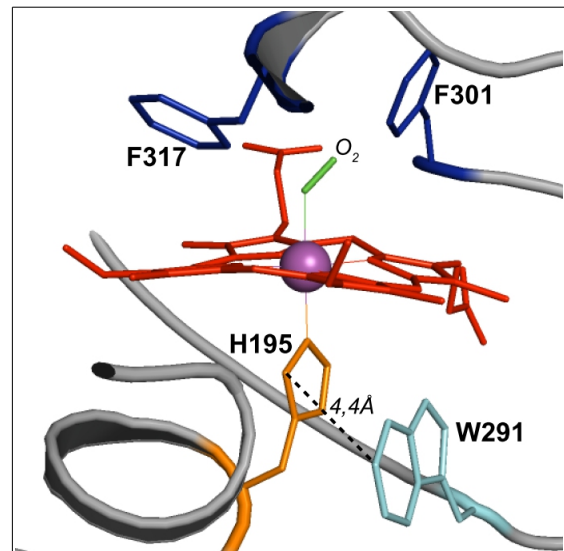
**Abb. 11: Spektren von RoxA-Wt (links) und RoxA-F301Y (rechts) im Bereich der Q-Banden.**

**Oben: „as isolated“ (schwarz) nach Zugabe von 2 mM Imidazol (grau).** Auch nach 100 Minuten ist bei dem Mutein keine Veränderung im Spektrum feststellbar, der Wildtyp zeigt hingegen eine langsame teilweise Reduktion mit einem deutlichen Signal bei 549 nm. Der Pfeil zeigt die Richtung des Reaktionsverlaufs über 100 Minuten.

**Unten: RoxA-Wt (links) und RoxA-F301Y (rechts) mit Imidazol (grau) nach Zugabe von 2 mM Pyridin (gestrichelt).** Gibt man zu dem oben genannten Ansatz nach 100 Minuten 2 mM Pyridin hinzu, lässt sich auch bei dem Mutein eine langsame, teilweise Reduktion feststellen, bei RoxA-Wt ist dagegen nur noch eine schwache Erhöhung der Reduktionsbande bei 549 nm zu erkennen. Die absolute Absorptionzunahme bei 549 nm fällt nach der gesamten Inkubationszeit bei beiden Proteinen vergleichbar aus. Der Pfeil zeigt die Richtung des Reaktionsverlaufs über 20 Minuten.

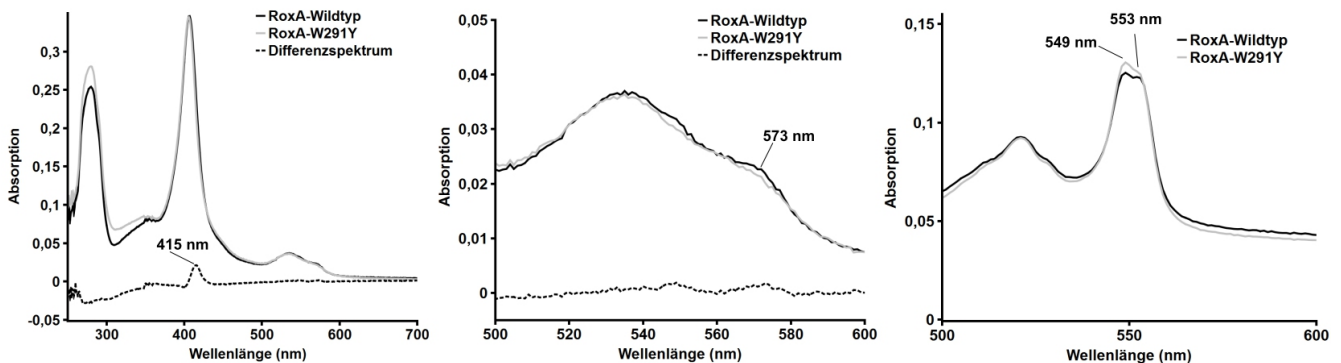
## 2.4 RoxA: Die Position W291

Eine weitere Aminosäure, die untersucht wurde, befindet sich ebenfalls am N-terminalen Hämzentrum (**rot**), jedoch an der proximalen Seite, nicht wie die bisher vorgestellten Reste F301 und F317 (**blau**) an der distalen Seite. Es handelt sich hier um W291 (**cyan**), das auffallend parallel zu H195 (**orange**) ausgerichtet ist.



Erstellt wurden die Muteine RoxA-W291A, RoxA-W291F, RoxA-W291H und RoxA-W291Y, die alle im unkonzentrierten Kulturüberstand von *Xanthomonas* sp. 35Y eine stark eingeschränkte Aktivität zeigten (maximal 8% für RoxA-W291A). Die Expression der Muteine konnte mittels SDS-PAGE nachgewiesen werden. RoxA-W291Y wurde gereinigt, die relative Aktivität betrug 5% zu RoxA-Wt.

Untersuchungen von RoxA-W291Y ergaben im UVvis-Spektrum Unterschiede zu RoxA-Wt (Abb. 12). Im Zustand „as isolated“ war vor allem eine schwächere 573 nm Bande und eine leichte Verengung der Soret-Bande zu bemerken. Im anaeroben, mit Dithionit reduzierten Mutein offenbarte sich im Vergleich zum Wildtyp auch eine leichte Änderung im Verhältnis der beiden  $\alpha$ -Banden zueinander.



**Abb. 12: UVvis-spektroskopische Untersuchung von RoxA-W291Y.** Das Differenzspektrum zeigt den Abzug des RoxA-W291Y-Signals vom RoxA-Wt-Signal.

**Links: Spektrum „as isolated“.** Erkennbar ist eine schwache Verengung der Soret-Bande an der rechten Flanke, was im Differenzspektrum in einer Absorptionszunahme bei 415 nm sichtbar wird.

**Mitte: Vergrößerung der Q-Banden aus dem „as isolated“ Spektrum.** Es fällt bei 573 nm eine schwächere Absorption bei dem Mutein auf.

**Rechts: Reduziertes Spektrum (Dithionit) unter anaeroben Bedingungen im Bereich der Q-Banden.** Bei dem Mutein zeigt die Bande bei 549 nm im Vergleich zur benachbarten 553 nm Bande eine leichte Erhöhung der Absorption.

Neben den gezeigten UVvis-spektroskopischen Untersuchungen wurde das Experiment mit den Inhibitoren Pyridin und Imidazol durchgeführt, analog zu den Experimenten mit dem Mutein RoxA-F301Y. Interessanterweise konnten hier vergleichbare Ergebnisse erzielt werden. Imidazol hatte keinen nennenswerten Effekt auf das Spektrum der Q-Banden (500 – 600 nm). Nachdem zu diesem Ansatz zusätzlich Pyridin gegeben wurde, konnte eine langsame Zunahme der 549 nm Bande und somit eine teilweise Reduktion beobachtet werden, wie es auch für RoxA-F301Y gezeigt werden konnte (vgl. Abb. 11, Seite 36). Die endgültige Absorptionszunahme war hierbei aber deutlich weniger ausgeprägt als bei RoxA-Wt (etwa 25%), was es dadurch auch von RoxA-F301Y unterscheidet.

## 2.5 Zusammenfassung der relativen Aktivitäten aller vorgestellten gereinigten RoxA-Muteine

Eine Zusammenfassung der ermittelten relativen Aktivitäten aller bisher vorgestellten gereinigten RoxA-Muteine ist in der nachfolgenden Tabelle 1 aufgeführt.

**Tab. 1: Übersicht der relativen Aktivitäten aller bisher vorgestellten gereinigten RoxA-Muteine zu RoxA-Wt.**

RoxA-Mutein	F317A	F317L	F317Y	F301L	F301Y	W291Y
relative Aktivität zu RoxA-Wt (%)	3	10	<1	20	11	5

## 2.6 Funktionelle Identifizierung von RoxA-orthologen Proteinen in Myxobakterien (Birke et al., 2013)

Die Suche in Datenbanken von sequenzierten Organismen ergab lange Zeit keine signifikante Homologie von RoxA zu einem anderen (hypothetischen) Protein. Folglich waren RoxA, aber auch *Xanthomonas* sp. 35Y als der Wirt dieses Enzyms, etwas Besonderes in der bekannten Welt der Mikrobiologie. Auch die Fähigkeit eines Gram-negativen Bakteriums zur Klärhofbildung auf Latex overlay Agarplatten blieb lange Zeit ein Alleinstellungsmerkmal. Erst im Jahr 2011 konnte mit *Methylibium* sp. Stamm NS21 (jetzt *Rhizobacter gummiphilus* sp. Stamm NS21) ein weiteres Gram-negatives Bakterium gefunden werden, das ebenfalls dazu befähigt ist (Imai et al., 2011). Im Gegensatz zu vielen Gram-positiven Bakterien können also nur sehr wenige bekannte Gram-negative Bakterien dieser Gruppe zugeordnet werden.

Im Jahr 2009 wurde nach einer BLAST Suche erstmals ein Protein gefunden, das mit RoxA eine Ähnlichkeit der Aminosäuresequenz teilt. Dieses Protein, genannt Hoch\_1661, wurde bei der Sequenzierung des Stammes *Haliangium ochraceum* (DSM 14365) als hypothetisches Protein annotiert (Ivanova et al., 2010). Kurze Zeit später folgten weitere zu RoxA-orthologe hypothetische Proteine, die zu RoxA eine signifikante Aminosäuresequenzhomologie von über 60% zeigen (Tab. 2). Es handelt sich hierbei, wie auch im Falle von Hoch\_1661, offenbar um Dihäm-Cytochrom *c* Proteine aus verschiedenen Myxobakterien (*Myxococcus fulvus*, *Corallocooccus coralloides* und *Chondromyces apiculatus*). Die entsprechenden Gene codieren außerdem alle für eine potentielle Sec-Signalsequenz von etwa 30 bp.

All diese Merkmale treffen auch auf RoxA zu, die Funktion der genannten hypothetischen Proteine ist jedoch noch unklar. Bei den entsprechenden Myxobakterien stellt sich die Frage, ob sie durch die RoxA-orthologen Proteine zu einem Abbau von Latex befähigt sein könnten. Im positiven Fall ließen sich diese Bakterien der kleinen Gruppe von Gram-negativen Bakterien mit der Fähigkeit zur Klärhofbildung zuordnen. Um dieser Fragestellung nachzugehen, sollten die RoxA-orthologen Proteine in *Xanthomonas* sp. 35Y  $\Delta$ *roxA* exprimiert und auf ihre Fähigkeit zur poly(*cis*-1,4-isopren)-Spaltung untersucht werden.



Im Folgenden werden die RoxA-orthologen Proteine ebenfalls als RoxA bezeichnet, die tiefgestellten Buchstaben bezeichnen den jeweiligen Stamm, aus dem das Gen ursprünglich stammt (beispielsweise RoxA<sub>Mfu</sub> für RoxA aus *Myxococcus fulvus*).

Protein	% similarity or identity					
	RoxA <sub>Xsp</sub>	RoxA <sub>Cco</sub> <sup>T</sup>	RoxA <sub>Cco</sub>	RoxA <sub>Mfu</sub>	RoxA <sub>Cap</sub>	RoxA <sub>Hoc</sub>
RoxA <sub>Xsp</sub>	100	67	65	65	65	63
RoxA <sub>Cco</sub> <sup>T</sup>	78	100	89	85	83	75
RoxA <sub>Cco</sub>	77	93	100	83	82	75
RoxA <sub>Mfu</sub>	75	89	90	100	89	75
RoxA <sub>Cap</sub>	76	88	88	92	100	74
RoxA <sub>Hoc</sub>	75	83	82	82	80	100

**Tab. 2: Identität (weiß hinterlegt) und Ähnlichkeit (grau hinterlegt) der Aminosäuresequenzen von RoxA aus verschiedenen Organismen.** RoxA<sub>Xsp</sub>: RoxA aus *Xanthomonas* sp. 35Y; RoxA<sub>Cco</sub>: RoxA aus *Corallocooccus coralloides* Stamm BO35; RoxA<sub>Cco</sub><sup>T</sup>: RoxA aus *Corallocooccus coralloides* (DSMZ 2259); RoxA<sub>Mfu</sub>: RoxA aus *Myxococcus fulvus* HW1; RoxA<sub>Cap</sub>: RoxA aus *Chondromyces apiculatus*; RoxA<sub>Hoc</sub>: RoxA aus *Haliangium ochraceum*.

### 2.6.1 Modellierung der dreidimensionalen Struktur der RoxA-orthologen Proteine

Bei einem Alignment der Sequenzen aller bekannten RoxA-orthologen fielen neben den zuvor genannten Gemeinsamkeiten weitere auf: Neben den beiden vorhandenen CXXCH Hämbindemotiven sind auch die Aminosäurereste H517 und W301 konserviert, die bei bakteriellen Cytochrom *c* Peroxidasen eine wichtige Rolle einnehmen und auch in RoxA<sub>Xsp</sub> vorhanden sind. Die Aminosäurereste F317, F301 und W291 sind ebenfalls konserviert. Für diese wurde in der vorliegenden Arbeit bereits ein direkter Einfluss auf die RoxA-Aktivität festgestellt. Eine dreidimensionale Modellierung wurde auf Basis der bekannten Kristallstruktur von RoxA<sub>Xsp</sub> vorgenommen (SWISS-Model Server). Bei einem Vergleich der erhaltenen Modelle offenbarte sich ein ähnlicher Aufbau aller RoxA-orthologen Proteine.

### 2.6.2 Klonierung und Expression der RoxA-orthologen Proteine

Da mit dem zuvor beschriebenen Expressionssystem für RoxA auch verschiedene RoxA-Muteine zuverlässig und mit guter Ausbeute erhalten werden konnten, sollte dieses für einige der genannten RoxA-orthologen eingesetzt und die Proteine anschließend charakterisiert werden. Ausgewählt wurden hierfür:

- RoxA<sub>Cco</sub>: RoxA aus *Coralloccoccus coralloides* Stamm BO35  
RoxA<sub>Mfu</sub>: RoxA aus *Myxococcus fulvus* HW1  
RoxA<sub>Hoc</sub>: RoxA aus *Haliangium ochraceum*

Zunächst erfolgte eine PCR mit den entsprechenden Genen. Die jeweiligen Gensequenzen wurden dann in den Expressionsvektor pNH1 überführt und dieser in *Xanthomonas* sp. 35Y  $\Delta$ roxA eingebracht. Die entsprechenden Stämme wurden auf Latex overlay Agarplatten ausgestrichen und bei 22°C sowie bei 30°C inkubiert (Abb. 13). Hier bildeten RoxA<sub>Cco</sub> und RoxA<sub>Hoc</sub> bei 22°C größere Klärhöfe als bei 30°C. RoxA<sub>Xsp.</sub> und RoxA<sub>Mfu</sub> hatten hingegen in diesem Test bei 30°C die größten aller beobachteten Klärhöfe. So konnte bereits die Fähigkeit der Polyisoprenspaltung durch diese Proteine gezeigt werden. Eine SDS-PAGE mit anschließender Hämfärbung der unkonzentrierten Kulturüberstände verifizierte die Anwesenheit von Hämgruppen des *c*-Typs in allen untersuchten RoxA-orthologen Proteinen (RoxA<sub>Mfu</sub>, RoxA<sub>Cco</sub> und RoxA<sub>Hoc</sub>).

### 2.6.3 Reinigung von nativem RoxA<sub>Mfu</sub> und RoxA<sub>Cco</sub>

Die Expression der RoxA-orthologen erfolgte bei 22°C über 92 Stunden in 5-11 Liter modifiziertem LB-Medium. Die Reinigung wurde in gleicher Weise durchgeführt, wie es bereits für RoxA<sub>Xsp.</sub> beschrieben wurde (2 Stufen: Anionenaustauscher-Säule, Hydroxyapatit-Säule). Die Reinheit wurde mit der SDS-PAGE (Silberfärbung) auf über 98% geschätzt. Die Ausbeuten nach der Reinigung betragen (in Milligramm Protein je Liter Kulturüberstand):

RoxA<sub>Xsp.</sub>: 3,5; RoxA<sub>Mfu</sub>: 0,1; RoxA<sub>Cco</sub>: 1,5



**Abb. 13: Expression der RoxA-orthologen durch *Xanthomonas* sp. 35Y auf Latex overlay Agar bei 22°C und 30°C für 21 Tage.** RoxA<sub>Cco</sub>: RoxA aus *Corallocooccus coralloides* Stamm BO35; RoxA<sub>Mfu</sub>: RoxA aus *Myxococcus fulvus* HW1; RoxA<sub>Hoc</sub>: RoxA aus *Haliangium ochraceum*; RoxA<sub>Xsp</sub>: RoxA aus *Xanthomonas* sp. 35Y;  $\Delta$ RoxA: *Xanthomonas* sp. 35Y mit *roxA*-Deletion; Xanth sp. 35Y wt: *Xanthomonas* sp. 35Y Wildtyp (*roxA* unter Kontrolle des nativen Promotors).

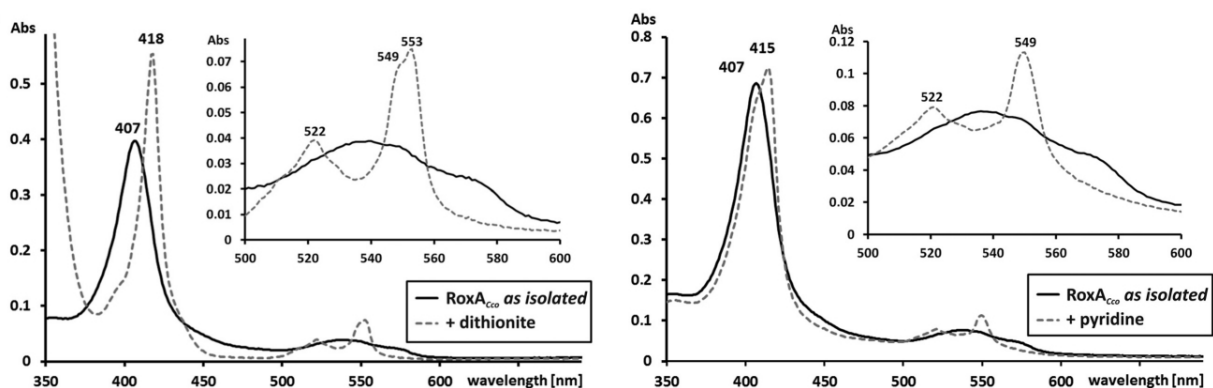
RoxA<sub>Cco</sub> und RoxA<sub>Hoc</sub> zeigen bei 22°C größere Klärhöfe, RoxA<sub>Xsp</sub> und RoxA<sub>Mfu</sub> hingegen bei 30°C. Die beiden zuletzt genannten verursachen die größten aller beobachteten Klärhöfe. Dieser Test zeigt, dass bei einer Expression der RoxA-orthologen größere Klärhöfe entstehen als bei der *roxA*-Deletionsmutante, was bereits eine poly(*cis*-1,4-isopren)-Spaltung durch diese Proteine vermuten lässt.

#### 2.6.4 Die poly(*cis*-1,4-isopren)-Spaltung durch die gereinigten RoxA-orthologen Proteine

Mit den gereinigten Proteinen RoxA<sub>Mfu</sub> und RoxA<sub>Cco</sub> wurden *in vitro* Aktivitätstests durchgeführt. Hierbei wurden die RoxAs mit poly(*cis*-1,4-isopren) bei Raumtemperatur 18 Stunden inkubiert. Die potentiellen Spaltprodukte wurden mit Ethylacetat extrahiert und schließlich über eine HPLC mit RP8 Säule aufgetrennt. Hierbei konnte für beide RoxA-orthologen Proteine ein Hauptsignal identifiziert werden, das die gleiche Retentionszeit besaß wie ODTD, das Hauptabbauprodukt von RoxA<sub>Xsp</sub>. Bei einem Aktivitätstest mit dem Kulturüberstand eines *roxA<sub>Hoc</sub>*-exprimierenden *Xanthomonas* sp. 35Y Stammes wurde dieses Signal ebenfalls beobachtet. Alle der genannten RoxAs scheinen also ODTD als Hauptabbauprodukt zu bilden. Die Fläche des ODTD-Signals und damit die relative Aktivität der RoxA-orthologen RoxA<sub>Mfu</sub> und RoxA<sub>Cco</sub> belief sich bei gleicher eingesetzter Enzymmenge nur auf etwa 10% der Aktivität von RoxA<sub>Xsp</sub>. Die Inhibitoren Pyridin,  $\alpha$ -Tocopherol und Squalen hatten vergleichbare Auswirkungen auf RoxA<sub>Xsp</sub> und RoxA<sub>Cco</sub>, ein Unterschied zeigte sich jedoch bei  $\beta$ -Carotin (RoxA<sub>Xsp</sub>: 55% Aktivität; RoxA<sub>Cco</sub>: 10% Aktivität).

### 2.6.5 UVvis-spektroskopische Untersuchungen von RoxA<sub>Cco</sub> und RoxA<sub>Mfu</sub>

Mit gereinigtem RoxA<sub>Cco</sub> wurden UVvis-spektroskopische Untersuchungen durchgeführt. Die Spektren „as isolated“, chemisch reduziert (Dithionit) und in Gegenwart von Pyridin waren mit den bereits bekannten Spektren von RoxA<sub>Xsp.</sub> vergleichbar. Besonders auffällig war bei RoxA<sub>Cco</sub> wie auch bei RoxA<sub>Xsp.</sub> das Vorhandensein einer split- $\alpha$ -Bande nach chemischer Reduktion (549 nm und 553 nm). Eine teilweise Reduktion nach einer Inkubation mit Pyridin, bei der nur die 549 nm Bande, nicht aber die 553 nm Bande sichtbar wird, konnte ebenfalls für beide Proteine beobachtet werden (Abb. 14). Für RoxA<sub>Mfu</sub> war ein nahezu identisches Verhalten zu bemerken. Nach einer chemischen Reduktion konnten die  $\alpha$ -Banden im Bereich um 550 nm jedoch nicht voneinander diskriminiert werden, sie scheinen also geringfügig näher beieinander zu liegen. Die genannten Effekte für RoxA<sub>Cco</sub> ließen sich auch mit dem konzentriertem Kulturüberstand einer *Xanthomonas* sp. 35Y pNH1::roxA<sub>Hoc</sub> Expressionskultur beobachten.



**Abb. 14:** UVvis-Spektren von gereinigtem RoxA<sub>Cco</sub>.

**Links:** „as isolated“ (schwarz) und Dithionit-reduziert (gestrichelt). Die Spektren sind mit RoxA<sub>Xsp.</sub> vergleichbar. Im Zustand „as isolated“ ist ein Soret-Maximum bei 407 nm zu beobachten, reduziert werden Maxima bei 418 nm (Soret-Bande), 522 nm ( $\beta$ -Bande), 549 nm und 553 nm (beides  $\alpha$ -Banden) deutlich. Besonders auffällig ist das Auftreten einer split- $\alpha$ -Bande, was auch für RoxA<sub>Xsp.</sub> beschrieben wurde.

**Rechts:** RoxA<sub>Cco</sub> „as isolated“ (schwarz) inkubiert mit 2 mM Pyridin (gestrichelt). In Gegenwart von Pyridin tritt eine teilweise Reduktion des Enzyms ein, die ebenfalls für RoxA<sub>Xsp.</sub> beschrieben wurde. Bemerkbar ist dies an der Verschiebung der Soret-Bande von 407 nm zu 415 nm und im Bereich der Q-Banden, hier werden Signale bei 549 nm und 522 nm sichtbar.

Eine Zusammenfassung der UVvis-spektroskopisch erhaltenen Ergebnisse für die RoxA-orthologen Proteine findet sich in der nachfolgenden Tabelle 3.

**Tabelle 3: Übersicht der UVvis-spektroskopischen Ergebnisse der RoxA-orthologen Proteine „as isolated“ und Dithionit-reduziert.**

	<u>RoxA<sub>Xpr</sub></u>	<u>RoxA<sub>Cco</sub></u>	<u>RoxA<sub>Mfu</sub></u>	<u>RoxA<sub>Hoc</sub></u> <sup>*</sup>
<u>Soret-Bande (oxidiert) [nm]</u>	407	407	408	409
<u>Soret-Bande (reduziert) [nm]</u>	418	418	418	418
<u><math>\alpha</math>-Banden (reduziert) [nm]</u>	549, 553	549, 553	~551, 552	550, 553
<u><math>\beta</math>-Bande (reduziert) [nm]</u>	521	522	522	523

Für alle Proteine wurden die Ergebnisse mit gereinigtem Enzym erhalten, mit Ausnahme von RoxA<sub>Hoc</sub> (in der Tabelle durch „\*“ markiert). Für RoxA<sub>Mfu</sub> können nach chemischer Reduktion die  $\alpha$ -Banden im Bereich um 550 nm nicht voneinander diskriminiert werden.

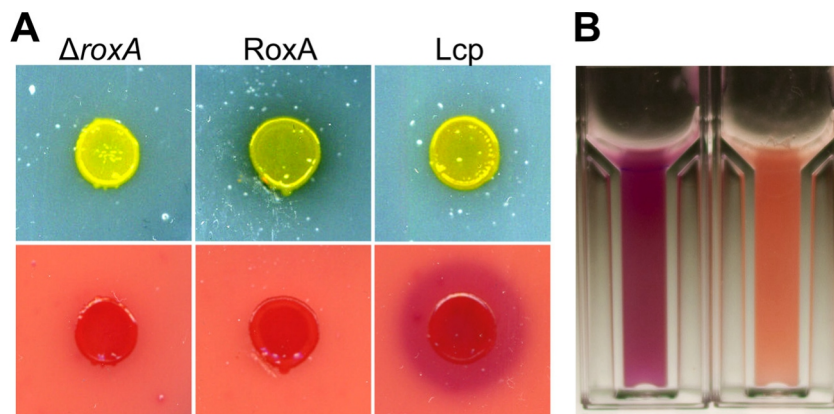
## 2.7 Die Expression und Charakterisierung von nativem Lcp (Birke & Jendrossek, 2014)

Wie in der Einleitung bereits geschildert, wurde Lcp als das verantwortliche Enzym für eine Klärhofbildung auf Latex overlay Agarplatten bei Gram-positiven Bakterien identifiziert (Bröker et al., 2008; Hiessl et al., 2012; Rose et al., 2005b; Rose & Steinbüchel, 2005). Die heterologe Expression von Lcp erwies sich in der Vergangenheit als schwierig, wodurch eine Reinigung in signifikanten Mengen bisher nicht durchgeführt werden konnte. Infolgedessen war eine Charakterisierung von Lcp bisher nicht durchführbar, weswegen die molekularbiologische Beschreibung von Lcp im Vergleich zu RoxA weniger weit fortgeschritten ist. Auch die heterologe Expression von RoxA war mit Schwierigkeiten verbunden und nur im natürlichen Wirt *Xanthomonas* sp. 35Y erfolgreich (Hamsch et al., 2010). Daher war es naheliegend, die Expression von *lcp* mit *Xanthomonas* sp. 35Y  $\Delta$ *roxA* zu versuchen.

### 2.7.1 Klonierung und Expression von Lcp

Die bekannte *lcp*-Sequenz wurde manuell an die *codon usage* von *Xanthomonas* sp. 35Y angepasst. Ein entsprechendes *lcp*-codierendes DNA Fragment wurde über GeneArt (Darmstadt) bezogen, in den Expressionsvektor pNH1 eingebracht und das Plasmid pNH1::*lcp* anschließend in *Xanthomonas* sp. 35Y  $\Delta$ *roxA* überführt.

Der erhaltene Stamm *Xanthomonas* sp. 35Y pNH1::*lcp* wurde auf Latex overlay Agarplatten ausgestrichen und drei Wochen bei Raumtemperatur inkubiert (Abb. 15A). Nach dieser Zeit war im Gegensatz zur Kontrolle ein kleiner Klärhof um die entsprechende Kolonie sichtbar. Es konnte nach einer Behandlung mit Schiff's-Reagenz eine deutliche violette Färbung um die Kolonie beobachtet werden. Mit dieser Methode können Aldehyde nachgewiesen werden, wodurch schon zuvor die Aktivität von Lcp durch den Nachweis der Spaltprodukte sichtbar gemacht wurde (Bröker et al., 2008; Rose et al., 2005b). Hier offenbarte sich die funktionelle Expression von Lcp mit *Xanthomonas* sp. 35Y.



**Abb. 15(A):** *Xanthomonas* sp. 35Y pNH1::*roxA* und *Xanthomonas* sp. 35Y pNH1::*lcp* auf Latex overlay Agarplatten. Die Inkubation der Platten erfolgte drei Wochen bei Raumtemperatur.  **$\Delta roxA$ :** *Xanthomonas* sp. 35Y mit *roxA*-Deletion; **RoxA:** *Xanthomonas* sp. 35Y pNH1::*roxA*; **Lcp:** *Xanthomonas* sp. 35Y pNH1::*lcp*. **Oben:** Stämme auf Latex overlay Agarplatten. Ein deutlicher Klärhof ist bei RoxA sichtbar, Lcp zeigt nur eine kleine Aufklarungszone. **Unten:** Stämme auf Latex overlay Agarplatten, die nach drei Wochen mit Schiff's-Reagenz behandelt wurden. Der violette „Fuchsinhof“ der Lcp-Expressionskultur ist deutlich sichtbar und lässt sich bei den anderen nicht beobachten.

**(B): Schneller Aktivitätsnachweis von Lcp.** Werden Lcp-haltige Fraktionen mit poly(*cis*-1,4-isopren) inkubiert, entstehen Spaltprodukte mit Aldehydgruppen, die mit Schiff's-Reagenz zu einem sichtbaren Farbumschlag von orange zu violett führen. **Küvette rechts:** 0,2% poly(*cis*-1,4-isopren) ohne Lcp; **Küvette links:** 0,2% poly(*cis*-1,4-isopren) mit Lcp. Durch diesen Test wird ein Screening von Lcp-beihaltenden Fraktionen während der Reinigung von nativen Lcp innerhalb von einer Stunde ermöglicht.

### 2.7.2 Reinigung von nativem Lcp aus dem Kulturüberstand von *Xanthomonas* sp. 35Y pNH1::*lcp*

Für die Reinigung von Lcp musste ein Protokoll etabliert werden. Da Lcp im Kulturüberstand von *Xanthomonas* sp. 35Y pNH1::*lcp* zu finden ist, erfolgte zunächst eine Konzentrierung des Kulturüberstands (Volumen: 12 l) mit einer Querstrom-Ultrafiltration (Amersham KVICKLAB, 10 kDa Ausschlussgrenze). Dabei wurde in Tris-HCl umgepuffert (20 mM, pH 8) und darauffolgend über eine Anionentauschersäule gereinigt, wobei Lcp mit 120 mM NaCl eluiert wurde (Q-Sepharose Fast Flow 50/11, 210 ml Säulenbettvolumen). Nach einer Umpufferung in Kaliumphosphatpuffer (KPP: 1 mM, pH 6) wurde Lcp mit einer Hydroxyapatitsäule weiter gereinigt (CHT5-I; Säulenbettvolumen: 20 ml). Lcp konnte hier mit einem linearen KPP-Gradienten von 1-200 mM bei etwa 75 mM eluiert werden (Abb. 16, links). Erhalten wurden 1,5 mg Lcp aus 12 Liter Kultur. Die Reinheit wurde durch eine SDS-PAGE mit anschließender Silberfärbung überprüft (Abb. 16, rechts). Es konnte auch ein Schnelltest etabliert werden, der

eine Bestimmung der Lcp-beihaltenden Fraktionen schon während der Reinigung durch eine Farbreaktion ermöglichte. Durch Zugabe von Schiff's-Reagenz nach einstündiger Inkubation von Lcp mit poly(*cis*-1,4-isopren) bei Raumtemperatur ließ sich ein Farbumschlag von orange zu violett erkennen, ausgelöst durch die Aldehydgruppen an den Lcp-Spaltprodukten. Dieses Verfahren erleichterte die Auswahl der relevanten Fraktionen während der Reinigung (Abb. 15B).

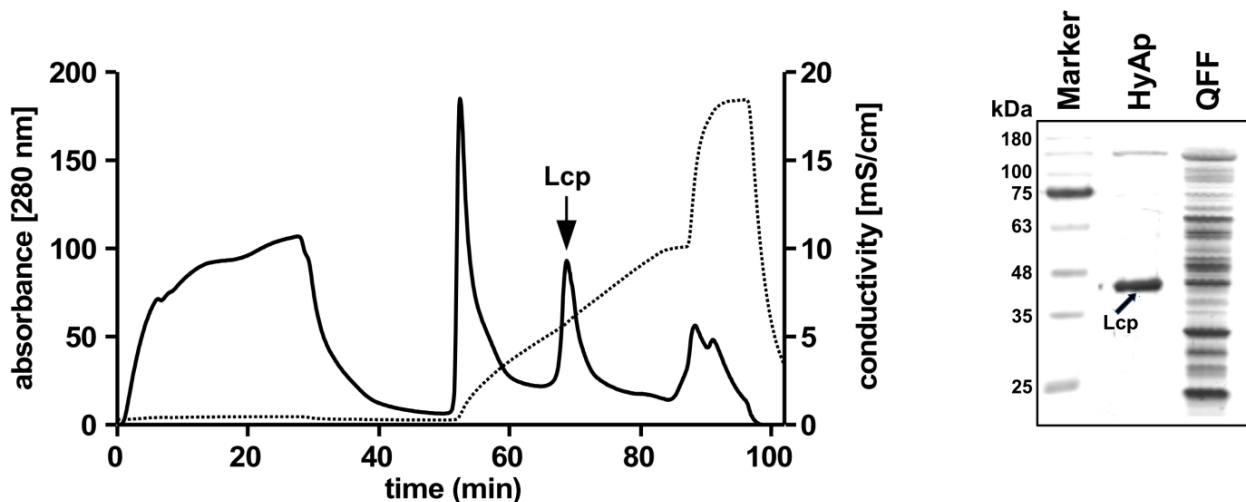


Abb. 16: Reinigung von nativem Lcp aus dem Kulturüberstand von *Xanthomonas* sp. 35Y pNH1::*lcp*.

**Links:** Elutionsprofil der Lcp-beihaltenden Anionentauscher-Fraktion auf Hydroxyapatit (2. Reinigungsschritt). **Schwarz:** Absorption bei 280 nm; **gestrichelt:** Leitfähigkeit. Die Lcp-beihaltende Fraktion ist mit einem Pfeil markiert.

**Rechts:** SDS-PAGE (Silberfärbung) von verschiedenen Schritten der Lcp-Reinigung. **HyAp:** Hydroxyapatit-Säule (2. Reinigungsstufe); **QFF:** Q-Sepharose Fast Flow-Säule (1. Reinigungsstufe). Zu sehen ist Lcp auf einer Höhe von etwa 40 kDa (mit einem Pfeil markiert).

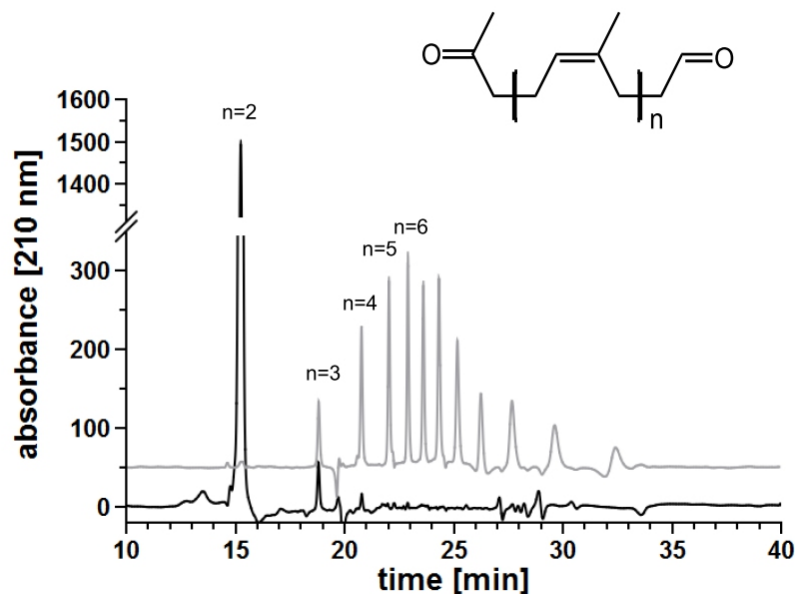
### 2.7.3 Aktivitätsnachweis von gereinigtem Lcp

Mit gereinigtem Lcp wurde ein Aktivitätstest durchgeführt. Lcp wurde mit verdünnter Latexmilch versetzt und zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert, die Spaltprodukte dann mit Ethylacetat extrahiert und mittels HPLC aufgetrennt. Für Lcp wurden mit dieser Methode 11 verschiedene Spaltprodukte nachgewiesen, im Gegensatz dazu waren bei RoxA das Hauptabbauprodukt ODTD sowie kleine Nebenproduktsignale sichtbar (Abb. 17). Durch eine LC-MS Analyse konnten die Massen der ersten 4 Signale ermittelt werden. Das erste erkennbare deckte sich mit der Retentionszeit und auch der Masse eines bekannten Nebenprodukts von



RoxA. Dieses  $C_{20}$ -Molekül besitzt, wie auch das RoxA-Hauptabbauprodukt ODTD, eine flankierende Keto- sowie eine Aldehydgruppe und unterscheidet sich davon nur darin, dass eine zusätzliche Isopreneinheit im Molekül vorhanden ist.

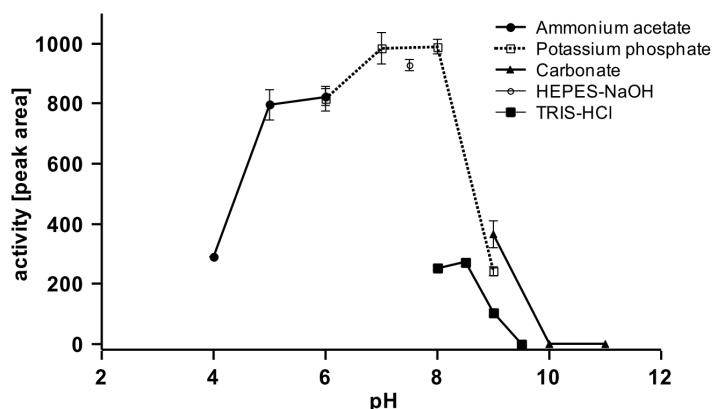
Die untersuchten weiteren Spaltprodukte von Lcp unterschieden sich voneinander ebenfalls in der Masse von jeweils einem Isopren Molekül, das gebunden vorliegt. Es ist daher anzunehmen, dass sich die Spaltprodukte von Lcp nur durch ihre Anzahl an Isopreneinheiten voneinander unterscheiden und jeweils von einer Keto- und einer Aldehydgruppe flankiert sind. Interessanterweise ließen sich die extrahierten Lcp-Spaltprodukte teilweise durch RoxA weiter umsetzen, was an einen entstandenen ODTD-Signal bei gleichzeitiger Abnahme der Lcp-Produktsignale gezeigt werden konnte.



**Abb. 17: HPLC-basierte Auftrennung der poly(*cis*-1,4-isopren)-Spaltprodukte von RoxA (schwarz) und Lcp (grau).** Das Lcp Signal wurde zur besseren Übersicht 50 Absorptionseinheiten versetzt dargestellt. Im Fall von Lcp lassen sich 11 verschiedene Signale erkennen, für RoxA lässt sich ODTD bei 15,3 Minuten und ein Nebenprodukt bei 18,8 Minuten Retentionszeit erkennen. Das zuletzt genannte liegt auf gleicher Höhe wie das erste erkennbare Signal von Lcp und besitzt auch die identische molekulare Masse (bei  $n = 3$ ;  $m/z$ : 305). Die molekularen Massen wurden mit Hilfe einer LC-MS Analyse bestimmt (nicht gezeigt). Die Signale bei 20,8 Minuten ( $n = 4$ ;  $m/z$ : 373), 22,0 Minuten ( $n = 5$ ;  $m/z$ : 441) und 22,9 Minuten ( $n = 6$ ;  $m/z$ : 509) unterscheiden sich in ihrer Masse jeweils um eine Isopreneinheit ( $m/z$ : 68). Für die anderen Signale konnten die Massen nicht bestimmt werden, möglicherweise sind die Moleküle mit zunehmender Größe nicht für eine LC-MS Analyse geeignet.

### 2.7.4 Charakterisierung von gereinigtem Lcp

Da nun genügend gereinigtes Lcp zur Verfügung stand, konnte eine erste Charakterisierung vorgenommen werden. Zunächst erfolgte eine Untersuchung und Optimierung des Puffersystems. Hierzu wurde die Aktivität von Lcp zwischen pH 4 bis pH 11 in verschiedenen Puffern ermittelt (Acetat-, Phosphat-, Carbonat-, HEPES- und Tris-Puffer; Abb. 18). Die Auswertung erfolgte durch die HPLC-basierte Analyse der Fläche des Produktsignals bei 22,9 Minuten (vgl. Abb. 17, Seite 49), was Rückschlüsse auf die Aktivität von Lcp erlaubte. Als optimal erwies sich 100 mM Kaliumphosphatpuffer mit einem pH Wert zwischen 7 und 8 (Abb. 18).



**Abb. 18: pH Profil der Aktivität von Lcp in verschiedenen Puffern.** Die Aktivität wurde anhand der Fläche des Produktsignals bei 22,9 Minuten Retentionszeit bestimmt, das bei einer Auftrennung der Produkte durch die HPLC Analyse entsteht. Lcp hat unter den hier untersuchten Bedingungen ein Optimum bei einem pH Wert zwischen 7 und 8 in 100 mM Kaliumphosphatpuffer.

Unter diesen Bedingungen wurden die spezifischen Aktivitäten von RoxA und Lcp bestimmt. Hierfür wurde eine Clark-Elektrode verwendet, die mit einem Aktivitätstest in Verbindung stand. Der Reaktionsansatz wurde ohne Enzym als zu 100% Sauerstoff-gesättigt betrachtet und hierfür eine  $O_2$ -Konzentration von 275  $\mu M$  (22°C) bzw. 235  $\mu M$  (30°C) angenommen. Über das Verhältnis von verbrauchtem Sauerstoff über die Zeit kann mit Hilfe der eingesetzten Enzymmenge die spezifische Aktivität berechnet werden. Für 22°C ergaben sich so 0,26 U/mg (RoxA) und 0,7 U/mg (Lcp), bei 30°C konnte für RoxA eine spezifische Aktivität von 0,48 U/mg bestimmt werden.

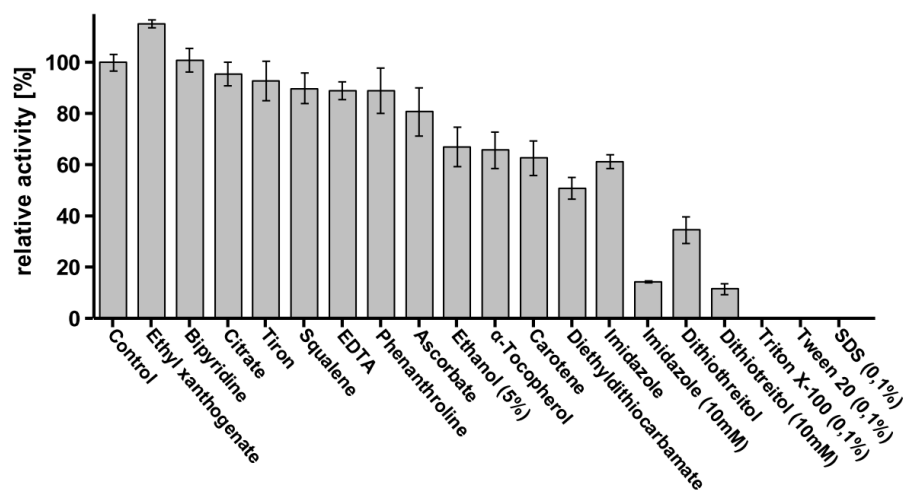
Bei einem Test, in dem Lcp und RoxA für verschiedene Zeiträume bei 37°C inkubiert und anschließend für einen Aktivitätstest eingesetzt wurden, zeigte sich, dass Lcp weit weniger hitzestabil als RoxA ist. RoxA wurde auch nach 22 Stunden nicht temperaturabhängig inaktiviert, bei Lcp konnte ein Aktivitätsverlust von etwa 80% verzeichnet werden.

### 2.7.5 Einfluss verschiedener Substanzen auf die Aktivität von Lcp

Eine Untersuchung auf Inhibitoren der Lcp-Aktivität erfolgte durch die HPLC-basierte Analyse der Flächen eines Produktsignals. Jeweils 1 mM der entsprechenden Komponente wurde dem Aktivitätstest hinzugefügt und vermischt, bevor Lcp hinzugegeben und damit die Reaktion gestartet wurde. Von allen untersuchten Substanzen zeigten Imidazol (35% Inhibition), Dithiothreitol (65% Inhibition) und Diethyldithiocarbamat als einziger Chelatbildner (50% Inhibition) die stärksten Auswirkungen auf die Aktivität von Lcp (Abb. 19). Weitere untersuchte Chelatbildner waren Phenanthrolin, Tiron, EDTA, Ethylxanthogenat und Bipyridin.

Eine Metallanalyse wurde für die Elemente der Ordnungszahlen 23 – 30 durchgeführt (Vanadium – Zink). Es wurden keine Metalle in gereinigtem Lcp gefunden. Allerdings konnte aufgrund der geringen Enzymmenge Eisen nicht ausgeschlossen werden, da hierfür im Vergleich zu den anderen Elementen eine höhere Proteinkonzentration erforderlich ist.

**Abb. 19: Effekt von potentiellen Inhibitoren auf die Aktivität von Lcp (5 µg/ml).** Jeweils 1 mM der entsprechenden Substanz wurde dem Aktivitätstest zugesetzt (wenn nicht anders angegeben), bevor die Reaktion durch Zugabe von Lcp gestartet wurde. Deutliche Auswirkungen können für Imidazol, Dithiothreitol und Diethyldithiocarbamat gezeigt werden. Bis auf die zuletzt genannte Verbindung haben Chelatbildner keine Auswirkung auf die Aktivität, Detergenzien inhibieren hingegen die katalytische Aktivität von Lcp vollständig.



## 2.8 Lcp aus *Streptomyces* sp. K30 ist ein *b*-Typ Cytochrom (Birke et al., 2015)

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden in Lcp alle Metalle bis auf Eisen ausgeschlossen. Zeitgleich mit den hier vorgestellten Ergebnissen zu Lcp in Kapitel 2.7, Seite 46ff, wurde eine zweite Arbeit veröffentlicht, in der eine Expression von His-Tag-Lcp (His-Lcp) in *E. coli* beschrieben wurde (Hiessl et al., 2014). Die *lcp*-Sequenz entstammte hier *Gordonia polyisoprenivorans* Stamm VH2, die Aminosäuresequenz ist zu 52% identisch mit Lcp aus *Streptomyces* sp. K30. Die Ergebnisse deuteten auf die Anwesenheit von Kupfer in His-Lcp hin. Zur Klärung der unterschiedlichen Aussagen über die Anwesenheit von Metallionen sollte zunächst die Ausbeute von Lcp gesteigert werden. Dies wurde durch eine Reinigung von Lcp mit einem Strep-Tag angestrebt.

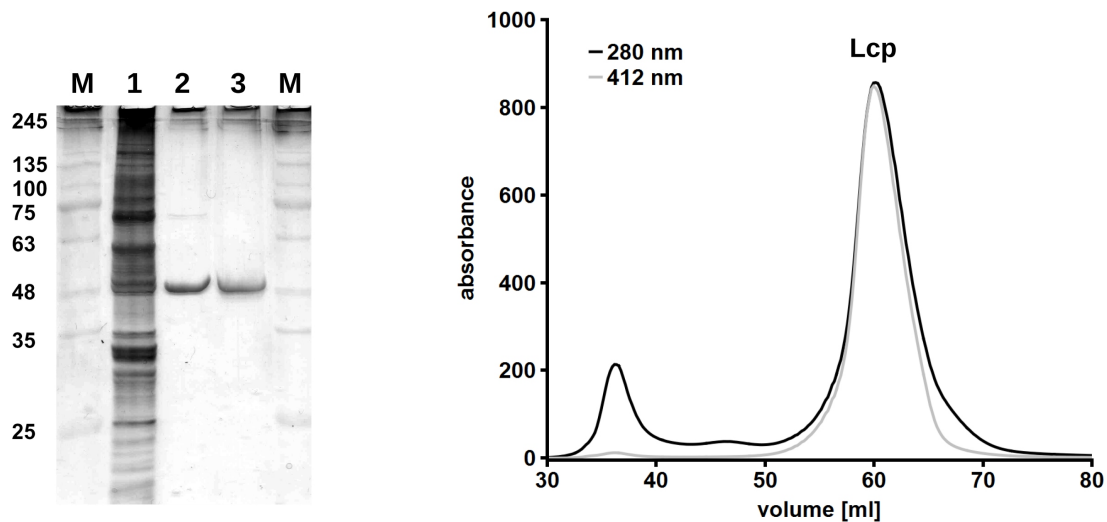
### 2.8.1 Klonierung und Expression von Strep-Lcp

Über eine PCR erfolgte mit geeigneten Primern das Ersetzen der TAT-abhängigen Signalsequenz von Lcp durch den Strep-Tag. Die Sequenz *strep-lcp* wurde in den Expressionsvektor p4782.1 kloniert. Dieser Vektor erlaubte eine induzierbare rhamnoseabhängige Expression von *strep-lcp*. Nach anschließender Transformation des Vektors in *E. coli* JM109 erfolgte die Expression bei 22°C über 20 Stunden.

### 2.8.2 Reinigung von Strep-Lcp

Die Expressionskultur *E. coli* JM109 p4782:1::*strep-lcp* wurde abzentrifugiert (4,8 l), das Zellpellet resuspendiert und mittels French-Press aufgeschlossen. Nach einem Ultrazentrifugationsschritt wurde der lösliche Überstand des Zellaufschlusses auf eine Strep-Tactin-HC-Säule gegeben (10 ml Säulenbettvolumen). Bei diesem Schritt konnte eine deutliche Rotfärbung des Eluats beobachtet werden, das Maximum der Absorption lag bei 412 nm. Das Strep-Lcp-Eluat wurde umgepuffert in KPP (1 mM, pH 6). Der zweite Reinigungsschritt erfolgte mit einer Gelfiltration über eine Superdex-Säule, 200 16/600 (Abb. 20, rechts). Die Ausbeute von

Lcp wurde so im Vergleich zur *Xanthomonas* sp. 35Y Expression etwa um den Faktor 40 gesteigert (5,4 mg pro Liter Zellkultur). Der Reinigungsverlauf wurde mit einer SDS-PAGE und anschließender Silberfärbung überprüft (Abb. 20, links).



**Abb. 20: Reinigung von Strep-Lcp.**

**Links: SDS-PAGE (Silberfärbung) verschiedener Reinigungsschritte von Strep-Lcp. M: Marker; Spur 1: lösliches Zellextrakt; Spur 2: Strep-Lcp nach dem ersten Reinigungsschritt mit einer Strep-Tactin-HC-Säule; Spur 3: Strep-Lcp nach dem zweiten Reinigungsschritt durch Gelfiltration (Superdex 200).**

**Rechts: Verlauf der Absorption bei 280 nm und 412 nm während des zweiten Reinigungsschritts durch die Gelfiltration mit Superdex 200.** Zu erkennen ist, dass das Signal bei 412 nm mit dem stärksten Signal bei 280 nm korreliert.

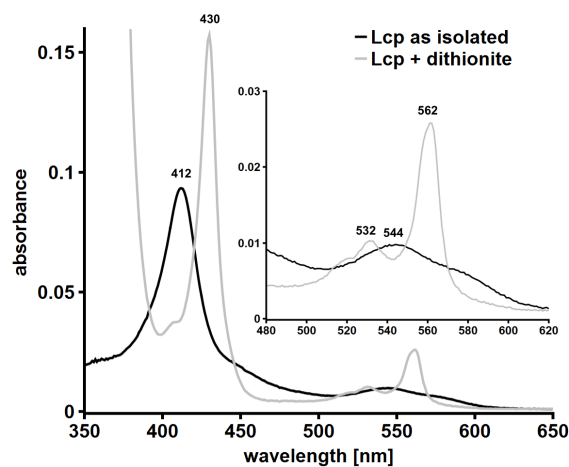
### 2.8.3 Bestimmung der Aktivität von Strep-Lcp

Die Aktivität von gereinigtem Strep-Lcp wurde durch den HPLC-basierten Nachweis der Spaltprodukte gezeigt, in gleicher Weise, wie es zuvor für natives Lcp aus *Xanthomonas* sp. 35Y durchgeführt wurde. Für Strep-Lcp konnten ebenfalls 11 Produktsignale nachgewiesen werden, wie zuvor bereits für natives Lcp (siehe dazu Abb. 17, Seite 49).

Weiterhin wurde die spezifische Aktivität von Strep-Lcp über einen optischen Nachweis des Sauerstoffverbrauchs bestimmt. Hierzu wurde ein Sensorspot, der einen speziellen Farbstoff enthält, in eine Glasküvette eingeklebt. Die prozentuale Sauerstoffsättigung konnte so über diesen Sensorspot ausgelesen werden. Die errechneten Werte für die spezifische Aktivität von Strep-Lcp betragen mit dieser Methode 1,5 U/mg (23°C) und 4,6 U/mg (37°C).

### 2.8.4 UVvis-spektroskopische Untersuchung von Strep-Lcp

Während der Reinigung von Strep-Lcp fiel bereits eine deutliche rote Färbung der Elutionsfraktion auf, weshalb das gereinigte Enzym UVvis-spektroskopisch untersucht wurde (Abb. 21). Für Strep-Lcp „as isolated“ ergaben sich Maxima bei 412 nm und 544 nm, chemisch reduziert durch Dithionit bei 430 nm, 532 nm und 562 nm. Hier fiel bereits eine Ähnlichkeit zu Cytochromen auf.



**Abb. 21:** UVvis-Spektren von Strep-Lcp „as isolated“ (schwarz) und nach chemischer Reduktion mit Dithionit (grau). „As isolated“ ist ein Maximum bei 412 nm und 544 nm zu sehen, reduziert ergeben sich Maxima bei 430 nm, 532 nm und 562 nm.

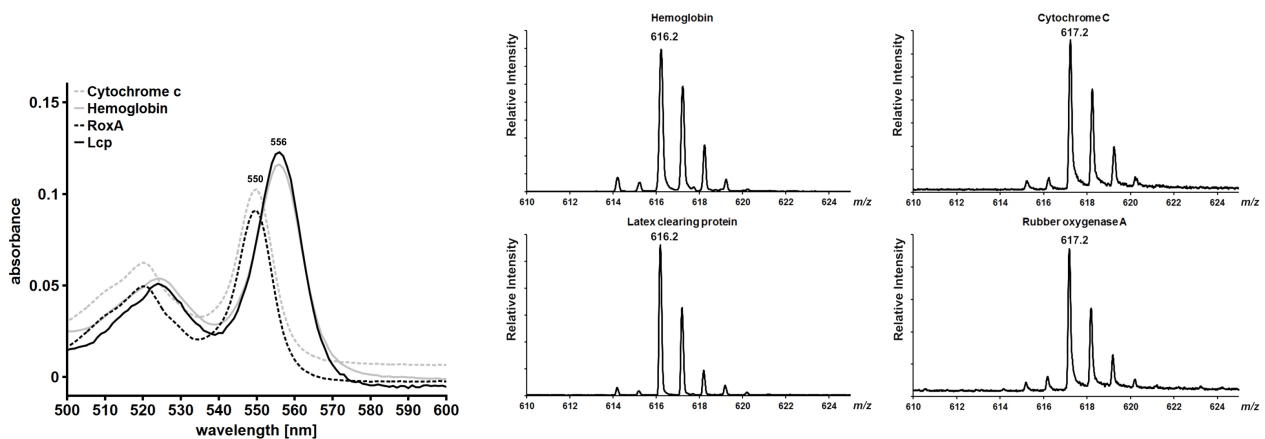
### 2.8.5 Die Anwesenheit von Metallionen in Lcp

Zur Bestimmung von Metallionen von gereinigtem Strep-Lcp wurden zwei Proben analysiert (Vanadium bis Zink wurden getestet). Hierbei ergaben sich pro Lcp Molekül 1,16 mol Eisen bzw. 1,04 mol Eisen. Kupfer konnte nur in sehr geringen Konzentrationen von unter 0,056 mol pro Lcp nachgewiesen werden.

### 2.8.6 Bestimmung des Häm-Typs von Strep-Lcp

Um die Ähnlichkeit von Strep-Lcp mit Cytochromen zu untersuchen, wurden Cytochrom *c*, RoxA (beides *c*-Typ Cytochrome) und Hämoglobin (*b*-Typ Cytochrom) sowie Strep-Lcp spektroskopisch auf ihre Zugehörigkeit zu den verschiedenen Cytochrom-Typen untersucht (nach Berry & Trumpower, 1987). Hierbei wurden die Enzyme chemisch denaturiert und die

Hämgruppen axial durch Pyridin ligiert. Die  $\alpha$ -Banden erlaubten eine Aussage über den Häm-Typ des entsprechenden Proteins [Häm *a* (584-588 nm), Häm *b* (550 nm) und Häm *c* (556 nm)]. Für Cytochrom *c*, RoxA und Hämoglobin konnte so der jeweilige Häm-Typ verifiziert werden. Für Strep-Lcp offenbarte sich die Zugehörigkeit zu Cytochromen des *b*-Typs (Abb. 22, links). Diese spektroskopisch basierte Zuordnung für Strep-Lcp sollte nun mit einer weiteren Methode bestätigt werden. Hierzu wurden Cytochrom *c*, RoxA und Hämoglobin tryptisch verdaut und anschließend über MALDI-TOF untersucht. Dadurch, dass die Hämgruppen typische Isotopenmuster besitzen (Yang et al., 2013), können diese voneinander unterschieden werden (Häm *c* ( $m/z$ : 617,2) und Häm *b* ( $m/z$ : 616,2)). Die Methode bestätigte die Häm-Typen der bereits bekannten untersuchten Proteine Cytochrom *c*, RoxA und Hämoglobin und konnte die spektroskopische Einordnung von Strep-Lcp als *b*-Typ Cytochrom verifizieren (Abb. 22, rechts).



**Abb. 22: Bestimmung des unbekanntes Häm-Typs von Strep-Lcp.** Als Kontrolle dienen die bekannten hämhaltigen Proteine Cytochrom *c*, RoxA (beides *c*-Typ Cytochrome) und Hämoglobin (*b*-Typ Cytochrom).

**Links: spektroskopischer Nachweis mit dem bi-Pyridyl-Assay.** Durch die charakteristische Absorption der  $\alpha$ -Bande kann der Typ eines hämhaltigen Proteins (*a*-, *b*- oder *c*-Typ) bestimmt werden. Strep-Lcp zeigt hier das gleiche Maximum der  $\alpha$ -Bande wie Hämoglobin (556 nm), wodurch es als ein *b*-Typ Cytochrom klassifiziert werden kann.

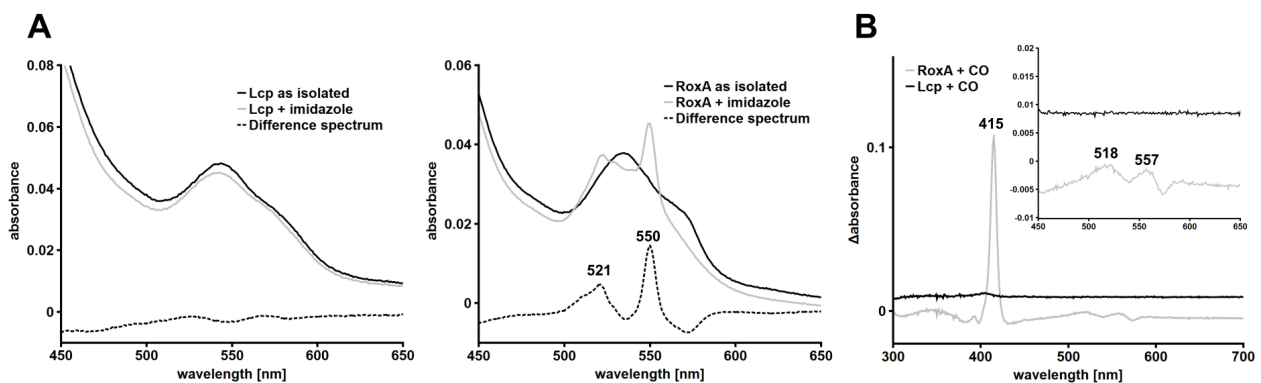
**Rechts: MALDI-TOF Analyse von tryptisch verdauten hämhaltigen Proteinen.** Durch die spezifische molekulare Masse der Hämgruppen von Häm *a*, *b* oder *c* lässt sich für ein hämhaltiges Protein der genaue Typ bestimmen. Die Methode bestätigt die Einordnung von Strep-Lcp zu den *b*-Typ Cytochromen.

### 2.8.7 Untersuchung des aktiven Zentrums von Lcp

Aus den vorangegangenen Versuchen ließ sich Lcp den *b*-Typ Cytochromen zuordnen. Auch RoxA ist ein hämhaltiges Protein, das sauerstoffhaltige Spaltprodukte mit dem gleichen Grundaufbau erzeugt wie Lcp. Lcp könnte also einen ähnlichen „as isolated“ Zustand der Hämgruppe besitzen. Von RoxA war bereits bekannt, dass bei einer Inkubation von Pyridin oder Imidazol eine teilweise Reduktion eintritt, erkennbar an den entstehenden Signalen bei 521 nm und 549 nm. Um dies für Lcp zu untersuchen, wurde eine Inkubation mit Imidazol durchgeführt, da hierfür bereits ein Einfluss auf die Aktivität festgestellt wurde (siehe Abb. 19, Seite 51). Auswirkungen im UVvis-Spektrum blieben jedoch aus (Abb. 23A).

Weiterhin wurde die Interaktion von Kohlenstoffmonoxid (CO) mit Lcp und RoxA untersucht. Eine Bindung von CO an die Hämgruppe eines Proteins lässt sich im UVvis-Spektrum an einer Änderung der Absorptions-Charakteristika erkennen (Hirata et al., 1977). RoxA und Strep-Lcp wurden deshalb mit CO-haltigem Puffer versetzt. Für RoxA ließ sich daraufhin eine Absorptionserhöhung bei 415 nm, 518 nm und 557 nm feststellen. Für Strep-Lcp war nach Inkubation mit CO keine Änderung im Spektrum zu bemerken (siehe Abb. 23B)

Die zuvor gezeigte Inhibierung von Lcp durch Diethyldithiocarbamat (Abb. 19, Seite 51) wurde ebenfalls UVvis-spektroskopisch untersucht. Hier konnte auch nach längerer Inkubation kein Einfluss auf das Spektrum festgestellt werden.



**Abb. 23A: Effekt von Imidazol (1 mM) auf das UVvis-Spektrum von Strep-Lcp (links) und RoxA (rechts).** Gezeigt sind die Spektren der beiden Proteine im Bereich der Q-Banden in Abwesenheit und in Gegenwart von Imidazol. Im Fall von RoxA zeigen sich Absorptionsmaxima bei 521 nm und 550 nm. Im Gegensatz dazu lassen sich bei Strep-Lcp nahezu keine Änderungen beobachten.

**B: Effekt von Kohlenstoffmonoxid (CO) auf das UVvis-Spektrum von RoxA und Strep-Lcp.**

Gezeigt sind die Differenzspektren der beiden Proteine in Abwesenheit und in Gegenwart von CO. Zu sehen sind deutliche Änderungen im Spektrum von RoxA. Bei Strep-Lcp lassen sich keine Änderungen beobachten.



## 3 Diskussion

### 3.1 RoxA – Wichtige Aminosäurereste im Bereich der N-terminalen Hämgruppe

Das N-terminale Hämzentrum stellt das aktive Zentrum von RoxA dar. Auf Grundlage der dreidimensionalen Struktur wurden verschiedene Aminosäurereste, die in der direkten Umgebung dieses Hämzentrums liegen, ausgewählt und zielgerichtet mutiert. So sollten Erkenntnisse gewonnen werden, welche Reste eine essentielle Rolle bei der Substratbindung oder der katalytischen Umsetzung von Polyisopren einnehmen. Im Rahmen dieses Vorhabens konnte in der vorliegenden Arbeit für die Positionen W291, F301 und F317 ein Einfluss auf die katalytische Aktivität gezeigt werden. Die erhaltenen Ergebnisse für die einzelnen Positionen werden im Folgenden genauer diskutiert.

### 3.2 RoxA: Die Position F317

Das Substituieren des Phenylalaninrests an Position 317 (F317) durch fünf verschiedene Aminosäurereste (A, L, H, W, Y) hatte unterschiedlich stark ausgeprägte Klärhöfe der jeweiligen *Xanthomonas* sp. 35Y Expressionskulturen zur Folge. Da das Expressionsniveau dieser RoxA-Mutante vergleichbar war, wurde zunächst davon ausgegangen, dass anhand der Klärhofgröße bereits die Aktivität der Muteine abgeschätzt werden kann. Nach einer Reinigung von drei RoxA-F317-Muteinen (A, L, Y) wurde deutlich, dass die erste Abschätzung der Aktivität über die Klärhofgröße nur einen Anhaltspunkt darstellt. Beispielsweise waren die Klärhofgrößen von RoxA-Wt und RoxA-F317L nahezu identisch, der Abstand der entsprechenden *Xanthomonas* sp. 35Y Kultur vom Rand der Aufklarungszone betrug jeweils 2,3 mm und 2,0 mm. Die relativen Aktivitäten unterschieden sich jedoch beträchtlich voneinander (100% und 10%). Eine Erklärung hierfür könnte in einer erhöhten Stabilität des Muteins vermutet werden, da sich die Inkubationszeit auf Latex overlay Agar (6 Tage) über einen wesentlich längeren Zeitraum

erstreckte als bei dem HPLC-basierten Aktivitätstest mit Latexmilch (3 Stunden). Eine erhöhte Stabilität von RoxA-F317L würde dazu führen, dass das weniger aktive Enzym die Polyisoprenspaltung über einen längeren Zeitraum katalysiert als RoxA-Wt, was eine geringere Aktivität auf Latex overlay Agar maskieren könnte. Eine höhere Stabilität eines anderen RoxA-Muteins (RoxA-H312R) im Vergleich zu RoxA-Wt konnte in der Vergangenheit bereits gezeigt werden (Gassner, 2014). Dies sollte also für die Diskrepanz zwischen Klärhofgröße und Aktivität in Betracht gezogen werden. Eine andere Erklärung findet sich vielleicht in der diffusionsabhängigen Verteilung von RoxA auf Latex overlay Agar und der Aufnahme der Spaltprodukte in die Zellen. Der Klärhof um die Kultur wird nach heutiger Erkenntnis nicht direkt durch die RoxA-abhängige Spaltung von Polyisopren sichtbar, sondern durch die Aufnahme der Spaltprodukte in *Xanthomonas* sp. 35Y. Da in den hier durchgeführten Versuchen die RoxA-Varianten überexprimiert wurden, lag lokal eine sehr hohe RoxA Konzentration außerhalb der Zellen vor. Dadurch könnte die Polyisoprenspaltung schneller bewerkstelligt worden sein als die Verteilung von RoxA auf den Latex overlay Agarplatten oder die Aufnahme der Spaltprodukte in die Zellen. Hierdurch würde die Klärhofgröße nicht von der enzymatischen Aktivität bestimmt, sondern von der diffusionsabhängigen Verteilung von RoxA sowie der Aufnahme und Metabolisierung von den Spaltprodukten durch *Xanthomonas* sp. 35Y.

Für eine genauere Charakterisierung der RoxA-F317-Muteine erfolgten UVvis-spektroskopische Untersuchungen. Alle Muteine zeigten „as isolated“ ein zu RoxA-Wt verändertes, untereinander jedoch sehr ähnliches Spektrum. Vergleichbares war für RoxA-Wt nach einer Inkubation mit Pyrogallol (Schmitt, 2012, Differenzspektrum, Abb. 3.39, Seite 167) und nach Inkubation mit geringen Mengen an Wasserstoffperoxid erkennbar (Schmitt, 2012, Differenzspektrum, Abb. 3.41, Seite 169). Die Ergebnisse wurden so interpretiert, dass ein möglicherweise Hämgebundenes O<sub>2</sub>-Molekül durch diese Substanzen von RoxA-Wt entfernt wird und ein oxidiertes N-terminales Hämzentrum zurückbleibt. Diese Sauerstoffverdrängung vom Hämzentrum ist im UVvis-Differenzspektrum an einer Absorptionsabnahme bei 438 nm und 573 nm zu erkennen. Ähnliche Ergebnisse konnten bereits für die Autooxidation und damit den O<sub>2</sub>-Verlust von hämhaltigen Proteinen gezeigt werden (Avila et al., 2003). Den UVvis-spektroskopischen Eigenschaften der RoxA-F317-Muteine im „as isolated“-Zustand liegt ebenfalls diese verminderte Absorption bei 438 nm und 573 nm zugrunde, was an den schwächeren, verschobenen Q-Banden (~ 500 - 600 nm) im Vergleich zu RoxA-Wt zu sehen war. Somit lässt

sich für die RoxA-F317-Muteine ein oxidiertes ( $\text{Fe}^{3+}$ ) und sauerstofffreier Zustand des N-terminalen Hämzentrums vermuten.

Bei Anwesenheit vom Inhibitor Pyridin verhalten sich die UVvis-Spektren der RoxA-F317-Muteine im Vergleich zu RoxA-Wt unterschiedlich. Bei RoxA-Wt wird eine teilweise Reduktion deutlich, unter anderem erkennbar an der  $\alpha$ -Bande bei 549 nm. Bei den RoxA-F317-Muteinen war hingegen durch Pyridin nur eine schwache Auswirkung auf das UVvis-Spektrum zu erkennen.

Bei RoxA können die beiden Signale der split- $\alpha$ -Bande jeweils einem Hämzentrum zugeordnet werden (N-terminales, aktives Hämzentrum: 549 nm; C-terminales Hämzentrum: 553 nm) (Schmitt, 2012). Durch die Inkubation mit Pyridin wird also das N-terminale Hämzentrum von RoxA beeinflusst. Für eine Erklärung der genannten Auswirkung von Pyridin war die verbesserte RoxA-Struktur, zusammen mit der spektroskopischen Charakterisierung, von entscheidender Bedeutung. Die Ergebnisse offenbarten ein reduziertes N-terminales Hämzentrum, an dem molekularer Sauerstoff gebunden wird (Schmitt, 2012; Seidel et al., 2013). Das Eisen liegt Mesomerie-stabilisiert als  $\text{Fe}^{3+}\text{-O}_2^- \leftrightarrow \text{Fe}^{2+}\text{-O}_2$  vor, was im UVvis-Spektrum oxidiert erscheint. Die Reaktion von RoxA mit Pyridin kann man sich so wie folgt erklären: Pyridin (und auch Imidazol) sind bekannte Hämliganden, die an eine freie axiale Position eines Hämzentrums binden können (Du et al., 2008; Viola et al., 1996; Wei et al., 2002). Durch diese Bindung wird das zuvor an RoxA gebundene  $\text{O}_2$ -Molekül verdrängt, wodurch ein reduziertes Hämzentrum ( $\text{Fe}^{2+}$ ) zurückbleibt. Dieser Zustand ist im Spektrum als eine Reduktion des N-terminalen Hämzentrums ( $\alpha$ -Bande bei 549 nm) zu erkennen (Schmitt, 2012; Schmitt et al., 2010; Seidel et al., 2013). Im Falle der RoxA-F317-Varianten findet nur eine geringe Veränderung im Spektrum statt und bekräftigt die damit bereits genannte Vermutung eines überwiegend oxidierten ( $\text{Fe}^{3+}$ ), sauerstofffreien Zustands des N-terminalen Hämzentrums dieser Muteine. Das Phenylalanin an Position 317 scheint demnach in RoxA eine essentielle Rolle bei der Bindung und Stabilisierung von molekularem Sauerstoff einzunehmen. Diese Vermutung steht im Einklang mit den Ergebnissen, die für Myoglobin-L29F angeführt wurden. Der genannte Aminosäureaustausch führte zu einer wesentlich stärkeren Bindung von molekularem Sauerstoff an das Protein. Zurückgeführt wurde dies auf eine 10-fach geringere  $\text{O}_2$ -Dissoziationskonstante, ausgelöst durch die Wechselwirkung des negativen  $\text{O}_2$ -Dipols mit dem positiven Anteil des Phenylring-Multipols (Carver et al., 1992).

Dithionit-reduziert schien im UVvis-Spektrum aller RoxA-F317-Muteine die  $\alpha$ -Bande bei 549 nm eine geringere Absorption aufzuweisen als bei RoxA-Wt. Da Dithionit den Sauerstoff aus der Reaktionslösung und vermutlich auch von RoxA entfernt (Dalziel & O'Brien, 1957; Morello et al., 1964; Vandegriff & Olson, 1984), kann folglich im reduzierten UVvis-Spektrum kein Unterschied der O<sub>2</sub>-Bindungsfähigkeit erkannt werden. Da sich Phenylalanin 317 sehr nahe am Eisenatom des N-terminalen Hämzentrums befindet, ist denkbar, dass dieser Rest einen direkten Einfluss auf die UVvis-spektroskopischen Absorptionscharakteristika und damit auf die entsprechende  $\alpha$ -Bande bei 549 nm ausübt. Die Substitution dieses Restes durch andere Aminosäuren könnte dann Unterschiede im reduzierten Spektrum zur Folge haben.

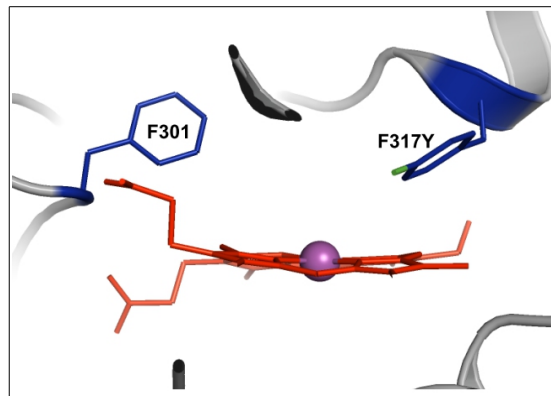
Das Mutein RoxA-F317Y zeigt neben den auch für die anderen RoxA-F317-Muteine genannten UVvis-spektroskopischen Eigenschaften einige Besonderheiten, auf die nun genauer eingegangen werden soll.

### 3.2.1 RoxA-F317Y

Im SDS-Gel zeigte sich, dass RoxA-F317Y in vergleichbaren Mengen wie RoxA-Wt exprimiert wurde. Für RoxA-F317Y konnte jedoch kein Klärhof der entsprechenden *Xanthomonas* sp. 35Y Expressionskultur auf Latex overlay Agar erkannt werden. Die ermittelte relative Aktivität zu RoxA-Wt betrug  $< 1\%$  und war damit im Bereich der Nachweisgrenze, was im Einklang mit dem nicht vorhandenen Klärhof steht. Die Reinigung für RoxA-F317Y, wie auch für die anderen RoxA-Muteine, wurde ohne Tag durchgeführt und das Reinigungsprotokoll im Vergleich zu RoxA-Wt nicht verändert. Es kann also davon ausgegangen werden, dass die Oberfläche und damit die Faltung der RoxA-Varianten mit RoxA-Wt vergleichbar ist, was für eine native Faltung aller gereinigten Proteine spricht. Dies konnte für das Mutein RoxA-F317Y mittels CD-Spektroskopie verifiziert werden.

Im Unterschied zu den anderen RoxA-F317-Muteinen fiel für RoxA-F317Y bereits im UVvis-Spektrum eine schwache Absorptionsschulter um 600 nm auf. Auch das EPR-Spektrum offenbarte Unterschiede zu anderen RoxA-Varianten. Hier ließen sich drei neue, scharf abgetrennte Signale erkennen, die auf eine rhombische *low-spin*-Spezies hindeuteten ( $g_z=2,67$ ,  $g_y=2,22$ ,  $g_x=1,81$ ). Da das EPR-Spektrum von RoxA ausschließlich durch die vorhandenen

Eisenatome zustande kommt, muss die Substitution F317Y also einen direkten Einfluss auf eines der Eisenatome ausüben. Da der Aminosäureaustausch im Bereich des N-terminalen Hämzentrums erfolgte, muss die dreidimensionale Struktur in diesem Bereich für eine Erklärung der gezeigten Ergebnisse zunächst genauer betrachtet werden (Abb. 24). Wie in der modellierten Struktur zu sehen ist, könnte sich die Hydroxylgruppe des eingefügten Tyrosin-Rests in räumlicher Nähe zum N-terminalen Eisenatom befinden. Die genannten Ergebnisse lassen vermuten, dass das Sauerstoffatom des Tyrosins direkt mit dem Eisenatom interagiert und so Tyrosinat als distaler axialer Ligand der N-terminalen Hämgruppe dient. Durch diese neue Konfiguration wäre die Sauerstoffbindestelle in RoxA blockiert, was den vollständigen Verlust der Aktivität von RoxA-F317Y erklären würde. Ein Beispiel für eine Tyrosinat-Ligation an einer Hämgruppe findet sich bei dem Dihäm Cytochrom *c* Enzym MauG, das Tyrosin als nativen axialen Liganden an einem der Hämzentren besitzt. Die EPR-Signale für diese Koordination sind  $g_z=2,54$   $g_y=2,19$   $g_x=1,87$  und korrelieren gut mit den zuvor genannten Signalen für RoxA (Abu Tarboush et al., 2012). Die bereits genannte Absorptionsschulter um 600 nm im UVvis-Spektrum könnte ebenfalls durch die Tyrosinat-Koordination ausgelöst werden.



**Abb. 24: N-terminales Hämzentrum von RoxA-F317Y.** Die Abbildung wurde mit PyMOL auf Basis der RoxA-Wt Struktur erstellt. **Rot:** N-terminale Hämgruppe; **magenta:** Eisenatom; **blau:** F301 und Y317. Durch die O<sup>-</sup>-Gruppe (**grün**) des Tyrosinat-Rests könnte eine distale axiale Ligation des Eisenatoms verursacht werden, wodurch eine Bindung von molekularem Sauerstoff nicht mehr stattfinden kann.

### 3.3 RoxA: Die Position F301

Phenylalanin 301 (F301) liegt im aktiven Zentrum gegenüber der Position F317 und zeigt eine ebenso interessante Ausrichtung zur N-terminalen Hämgruppe (Kapitel 2.3, Seite 34). Mit einem Abstand von 5,9 Å ist es allerdings etwas weiter vom Eisenatom der Hämgruppe entfernt als F317 (5,0 Å). Die Aktivität der gereinigten nativen RoxA-F301-Mutante betrug 20% (RoxA-F301L) und 11% (RoxA-F301Y). Auch dieser Position konnte so bereits eine wichtige Rolle in der katalytischen Aktivität von RoxA zugeschrieben werden. Vergleichbar zu RoxA-F317L zeigte sich in den UVvis-Spektren von RoxA-F301L ein eher oxidiertes, sauerstofffreies N-terminales Hämzentrum. Dies war für RoxA-F301L allerdings etwas schwächer ausgeprägt als für RoxA-F317L, was mit der höheren Restaktivität korreliert. Beide Phenylalanine (F301, F317) sind folglich für eine stabile Bindung von molekularem Sauerstoff an die N-terminale Hämgruppe von RoxA erforderlich. Die im Vergleich zu den RoxA-F317-Mutanten etwas höhere Aktivität beider RoxA-F301-Mutante lässt aber die Vermutung zu, dass F317 eine wichtigere Rolle bei der Sauerstoffbindung einnimmt.

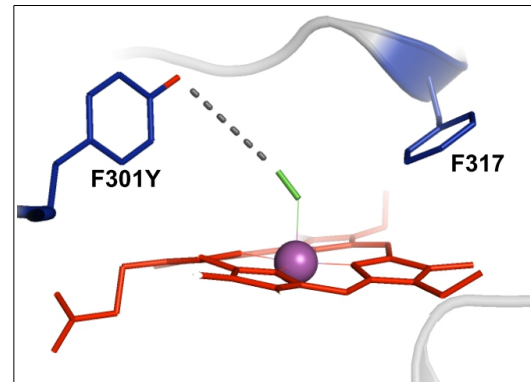
Die UVvis-spektroskopischen Untersuchungen von RoxA-F301Y (Abb. 25) werden im Folgenden genauer erörtert, da die Ergebnisse im Vergleich zu RoxA-F301L, aber auch zu den F317-Mutanten, höchst ungewöhnlich waren. Das Mutant war in den Zuständen „as isolated“ und Dithionit-reduziert mit RoxA-Wt vergleichbar. Es konnte auch hier eine leichte Signalschulter bei 573 nm erkannt werden, was es von den anderen F317- und F301-Mutanten unterscheidet. Diese Beobachtungen deuten auf ein gebundenes O<sub>2</sub>-Molekül in RoxA-F301Y. Die Inkubation mit Imidazol und Pyridin zeigte allerdings eine schwächere Wirkung auf die Aktivität des Mutants als auf den Wildtyp (siehe Abb.10, Seite 35). Das veränderte Verhalten zu Pyridin und Imidazol ließ sich auch im UVvis-Spektrum nachweisen. Bei RoxA-F301Y war Imidazol auch nach langer Inkubation nicht zu einer scheinbaren Reduktion des N-terminalen Hämzentrums fähig (549 nm), anders als bei RoxA-Wt. Wurden die beiden Enzyme anschließend zusätzlich mit Pyridin versetzt, setzte für RoxA-F301Y eine langsame, teilweise Reduktion ein, während bei RoxA-Wt nur noch eine schwache Steigerung der Absorption festzustellen war. Die gesamte Absorptionzunahme beider Proteine nach der Behandlung war vergleichbar (siehe Abb. 11, Seite 36). Die scheinbare Reduktion, die durch diese Substanzen ausgelöst wird, kommt vermutlich durch ein Verdrängen des an RoxA gebundenen Sauerstoffs zustande (siehe Kapitel 3.1,

Seite 57), was für eine ähnliche Menge an gebundenem O<sub>2</sub> an RoxA-Wt und RoxA-F301Y spricht. Da Imidazol im Allgemeinen ein schwächerer Inhibitor von RoxA ist als Pyridin, kann vermutet werden, dass Imidazol schwächer an das N-terminale Hämzentrum bindet. Dadurch kommt es zu einer langsameren Verdrängung von gebundenem molekularem Sauerstoff, was in einer geringeren Inhibition der Aktivität von RoxA-Wt resultiert (Pyridin: 4% Aktivität; Imidazol: 25% Aktivität). Bei RoxA-F301Y scheint also Imidazol nicht zu einer O<sub>2</sub>-Verdrängung fähig zu sein. Pyridin ist dazu aber in der Lage. Da aber Pyridin eine längere Zeitspanne benötigt, um den molekularen Sauerstoff von RoxA-F301Y zu verdrängen als von RoxA-Wt, ist die Auswirkung des Inhibitors auf die Aktivität des Muteins schwächer ausgeprägt (Aktivität für RoxA-Wt: 4%; für RoxA-F301Y: 45%).

Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass molekularer Sauerstoff stärker am N-terminalen Hämzentrum von RoxA-F301Y gebunden wird als bei RoxA-Wt. Dies geht einher mit der geringeren relativen Aktivität von RoxA-F301Y (11%), da die katalytische Reaktion aufgrund der stärkeren Sauerstoffbindung wahrscheinlich einen langsameren Substratumsatz zur Folge hat. Für die Theorie der Stabilisierung des molekularen Sauerstoffs durch einen Tyrosinrest sprechen bereits gezeigte Ergebnisse anderer Cytochrome. In HbN, einem Hämoglobin aus *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv, wird ein Tyrosinrest für die starke Sauerstoffaffinität des Proteins mit geringer Dissoziationsrate verantwortlich gemacht. Es wird angenommen, dass das oxygenierte Protein Stickstoffmonoxid zu Nitrat umsetzt und dadurch die Zellen vor dessen toxischer Wirkung schützt (Couture et al., 1999; Yeh et al., 2000).

Neben der vorgestellten Möglichkeit der erhöhten O<sub>2</sub>-Affinität von RoxA-F301Y könnte auch eine Änderung der Struktur um das N-terminale Hämzentrum durch die Substitution F301Y für die genannten Effekte verantwortlich sein. Dadurch könnte Pyridin, nicht aber Imidazol, zu einer Bindung am Eisenatom in der Lage sein oder einen Zugang zur Hämgruppe haben.

**Abb. 25: N-terminales Hämzentrum von RoxA-F301Y.** Die Abbildung wurde mit PyMOL auf Basis der RoxA-Wt Struktur erstellt. **Rot:** N-terminale Hämgruppe; **magenta:** Eisenatom; **grün:** molekularer Sauerstoff; **blau:** Y301 und F317. Die Hydroxyl-Gruppe (**rot**) des Tyrosin-Rests befindet sich nah am Eisenatom. Über eine Wasserstoffbrücke könnte diese den an der Hämgruppe gebundenen molekularen Sauerstoff stabilisieren, was in einer stärkeren O<sub>2</sub>-Bindung resultieren würde.



### 3.4 RoxA: Die Position W291

Die Position W291 befindet sich auf der proximalen Seite des N-terminalen Hämzentrums von RoxA, also gegenüber der O<sub>2</sub>-Bindetasche (vgl. Kapitel 2.4, Seite 37). Die Muteine RoxA-W291A, RoxA-W291F, RoxA-W291H und RoxA-W291Y zeigten im unkonzentrierten Zellüberstand eingeschränkte Aktivität gegenüber RoxA-Wt (maximal 8% für RoxA-W291A). RoxA-W291Y wies die geringste Aktivität auf, weshalb es gereinigt und daraufhin die Aktivität bestimmt wurde (5%).

UVvis-spektroskopische Unterschiede zwischen RoxA-W291Y und RoxA-Wt konnten beispielsweise im Dithionit-reduzierten Zustand in einer erhöhten Maximalabsorption des Signals bei 549 nm beobachtet werden. Somit wird deutlich, dass die Position W291 aufgrund ihrer Nähe zum N-terminalen Hämzentrum das Absorptionsverhalten beeinflusst, obwohl es vermutlich an der Substratbindung selbst unbeteiligt ist. Interessanterweise zeigten die RoxA-F317-Muteine im Vergleich zum Wildtyp hier eine schwächere Absorption.

Im Zustand „as isolated“ ist eine leichte Blauverschiebung der Soret-Bande und eine geringere Absorption bei 538 nm und 573 nm erkennbar. Dies lässt bereits vermuten, dass an RoxA-W291Y weniger Sauerstoff gebunden ist als an RoxA-Wt. Nach einer Inkubation von RoxA-W291Y mit Pyridin und Imidazol ergaben sich im UVvis-Spektrum Unterschiede zu RoxA-Wt, die denen von RoxA-F301Y ähneln. Auch hier war nur Pyridin, nicht aber Imidazol, zu einer Veränderung im UVvis-Spektrum in der Lage, sichtbar an einer scheinbaren Reduktion des N-terminalen Hämzentrums (549 nm).



Wie bei RoxA-F301Y angeführt, könnte eine stärkere O<sub>2</sub>-Bindung als bei RoxA-Wt vorliegen. Darauf kann hier jedoch nicht direkt geschlossen werden, da sich die Position W291 an der gegenüberliegenden Seite der Sauerstoffbindetasche befindet. Vorstellbar ist, dass hierfür eine Wechselwirkung von W291 mit dem proximalen axialen Hämliganden H195 verantwortlich ist. Die Positionierung dieses Histidins zum Eisenatom könnte so stabilisiert oder auch im Abstand modifiziert werden. Die exakte Lage des proximalen Histidins ist in Häm-Peroxidasen ein kritischer Faktor, der zum Beispiel das Redox-Potential der Hämgruppe maßgeblich beeinflusst. Eine Erhöhung des Abstandes zwischen dem proximalen Histidin und dem Eisenatom hat beispielsweise bei der Prostaglandin H<sub>2</sub> Synthase-1 eine Erhöhung des Redoxpotentials zur Folge (Gupta et al., 2004).

Aber auch andere Faktoren können durch das proximale Histidin beeinflusst werden. Bei Hämoglobin wird vermutet, dass hierdurch die allosterischen Effekte nach der Sauerstoffbindung auslöset werden. Das Eisenatom bei oxy-Hämoglobin befindet sich in der Porphyrinring-Ebene, bei desoxy-Hämoglobin hingegen nicht. Nach einer Bindung von O<sub>2</sub> wird das Eisenatom, und so auch das proximale Histidin, in Richtung der Hämebene bewegt, was Änderungen in der Konformation des Proteins zur Folge hat (Barrick et al., 1997; Perutz, 1989).

Aus den genannten Beispielen wird ersichtlich, dass schon kleine Unterschiede im Bereich des proximalen Histidinrests Auswirkungen auf das Redoxpotenzial, aber auch auf die gesamte Struktur eines Proteins haben können. Bereits die veränderte Positionierung des Eisenatoms oder eine andersartige Umgebung des N-terminalen Hämzentrums könnte in RoxA-W291Y für neue Charakteristika bezüglich der O<sub>2</sub>-Bindung und der katalytischen Aktivität verantwortlich sein. Festzuhalten bleibt, dass bei RoxA-W291Y der Gegensatz zwischen weniger gebundenem O<sub>2</sub> bei scheinbar höherer O<sub>2</sub>-Affinität mit den hier vorliegenden Ergebnissen nicht abschließend geklärt werden kann.

### 3.5 Funktionelle Identifizierung RoxA-orthologer Proteine in Myxobakterien

In der hier vorliegenden Arbeit konnten neben RoxA<sub>Xsp.</sub> erstmals drei weitere Proteine aus Gram-negativen Bakterien beschrieben werden, die zu einer Polyisopren-Spaltung in der Lage sind. Diese Proteine zeigen zu RoxA eine Aminosäuresequenz-Identität von über 60% und werden wahrscheinlich durch ihre postulierte Sec-Signalsequenz über die Cytoplasmamembran transportiert. Die extrazelluläre Spaltung von Polyisopren durch diese RoxA-orthologen Proteine konnte auf Latex overlay Agar durch Klärhöfe um die entsprechende *Xanthomonas*-Expressionskultur gezeigt werden. Alle stammen aus verschiedenen Myxobakterien, die meist aus Meerwasser, aber auch aus Bodenproben, isoliert wurden. Es ist anzunehmen, dass die ursprünglichen Wirtsstämme dieser Proteine (*Myxococcus fulvus*, *Corallocooccus coralloides* und *Haliangium ochraceum*) auch zu einer Metabolisierung von Polyisopren befähigt sind. Bis jetzt war bekannt, dass Myxobakterien einige unlösliche Biopolymere wie Stärke oder Cellulose metabolisieren können (Dworkin, 1966), eine Verwertung von Polyisopren ist bisher aber noch nicht beschrieben worden.

Die Strukturen der RoxA-orthologen Proteine wurden auf Grundlage von RoxA<sub>Xsp.</sub> modelliert, alle zeigten hierzu eine sehr hohe Ähnlichkeit. Da die Reinigung der nativen Proteine ohne eine Veränderung des Reinigungsprotokolls von RoxA<sub>Xsp.</sub> erfolgreich durchgeführt wurde, ist die hohe vorhergesagte strukturelle Übereinstimmung als sehr wahrscheinlich anzunehmen. Ein Vergleich aller RoxA-orthologen Aminosäuresequenzen offenbart weiterhin die Konservierung der in dieser Arbeit bereits vorgestellten Positionen RoxA<sub>Xsp.</sub>-F317, RoxA<sub>Xsp.</sub>-F301 und RoxA<sub>Xsp.</sub>-W291, die die Wichtigkeit dieser Aminosäurereste unterstreicht. Neben diesen genannten offensichtlichen Gemeinsamkeiten der Struktur müssen jedoch auch noch weitere vorhanden sein. Für die Enzyme RoxA<sub>Cco</sub>, RoxA<sub>Hoc</sub> und RoxA<sub>Mfu</sub> konnte beispielsweise ein Hauptsplattprodukt identifiziert werden, das bei einer HPLC-basierten Analyse die gleiche Retentionszeit besaß wie das RoxA<sub>Xsp.</sub>-Hauptabbauprodukt ODTD. Die RoxA-orthologen Proteine scheinen also auch ODTD als spezifisches Splattprodukt zu bilden. Diese Eigenschaft der Bildung eines spezifischen Produkts ist höchst interessant, da alle RoxAs die Fähigkeit besitzen müssen, die Länge des Produkts zu bestimmen. Aus dem Grund wurde für RoxA<sub>Xsp.</sub> bereits ein interner „molecular ruler“

vorgeschlagen (Seidel et al., 2013). Die aktuelle Vorstellung der Längenmessung beruht darauf, dass RoxA initial an das Substrat bindet, daraufhin gebunden bleibt und die Spaltung dann immer bei der ODTD-spezifischen Länge erfolgt (*exo-cleavage-Mechanismus*). Die Längenmessung könnte am Produkt ODTD durch eine Interaktion der Carbonylgruppen mit speziellen Aminosäureresten erfolgen. Als wahrscheinlich wurden die Reste H312 und Y462 angesehen (Seidel et al., 2013), die ungefähr in dem Abstand zum aktiven Zentrum lokalisiert sind, der für die Länge von ODTD in Frage kommt (16 - 21 Å). Durch Wasserstoffbrücken zwischen diesen Aminosäuren und einer der Carbonylgruppen des Produkts könnte eine Stabilisierung stattfinden, wodurch RoxA zu einem Sauerstoffeinbau und damit zu einer Spaltung an einer spezifischen Position im Polymer befähigt wird. Diese für RoxA<sub>Xsp.</sub> genannten strukturellen Grundvoraussetzungen sollten also auch in den RoxA-orthologen Proteinen wiederzufinden sein. Die für den Produktkanal postulierten Aminosäurereste Y462 und H312 in RoxA<sub>Xsp.</sub> sind in den RoxA-orthologen Proteinen nicht konserviert, was ihre Beteiligung am „molecular ruler“ unwahrscheinlich macht. Weitere Untersuchungen ergaben, dass diese Reste in RoxA<sub>Xsp.</sub> nicht für eine Stabilisierung von ODTD verantwortlich sind (Gassner, 2014). Die Ergebnisse deuteten vielmehr auf eine Struktur-Stabilisierung durch Wechselwirkung mit benachbarten Aminosäureresten hin. Das Auffinden des „molecular rulers“ war bisher also nicht erfolgreich. Durch Vergleiche der modellierten Strukturen der RoxA-orthologen Proteine könnte die Auswahl potentieller Reste in Zukunft jedoch weiter eingeschränkt werden.

Festzuhalten ist, dass die RoxA-orthologen Proteine poly(*cis*-1,4-isopren) spalten und ODTD als Hauptspaltprodukt bilden. Überraschend ist jedoch die relativ geringe Aktivität dieser Proteine im Vergleich zu RoxA<sub>Xsp.</sub> (10%). Die UVvis-Spektren von den gereinigten RoxA-orthologen zeigten insgesamt ähnliche Verläufe wie für RoxA<sub>Xsp.</sub>, wodurch von einer vergleichbaren Hämumgebung ausgegangen werden kann. Die Ursache für die geringe Aktivität ist daher vermutlich nicht am aktiven Zentrum selbst zu finden. Große Unterschiede in der Struktur sind ebenfalls unwahrscheinlich, wie bereits weiter oben angeführt wurde. Im Rahmen der Bachelorarbeit von Wolf Röther wurden jedoch für RoxA<sub>Xsp.</sub> und RoxA<sub>Cco</sub> unterschiedliche Auswirkungen bei einer Inkubation mit den Inhibitoren  $\beta$ -Carotin und Linolsäure festgestellt (Röther, 2013, Abb. 41, Seite 98). Da beide Hämgruppen und so auch das aktive Zentrum im Enzym-inneren liegen, sind diese von außen nur schwer zugänglich. Die unterschiedlichen Auswirkungen der beiden Substanzen auf die Aktivitäten von RoxA<sub>Xsp.</sub> und RoxA<sub>Cco</sub> lassen daher eine andere

Substratspezifität in Betracht ziehen. Es ist also denkbar, dass sich die an der Oberfläche liegende Substratbindedomäne von RoxA<sub>Xsp.</sub> von den anderen RoxA-orthologen unterscheidet. Hierdurch ließe sich auch die geringere Aktivität der RoxA-orthologen bei dem Abbau von poly(*cis*-1,4-isopren) erklären.

### 3.5.1 Die Metabolisierung von Kautschuk

Auffallend ist, dass *downstream* der Region aller hier untersuchten *roxA*-orthologen-Gene immer codierende Sequenzen für Proteine gefunden wurden, die an der  $\beta$ -Oxidation beteiligt sein könnten (z.B. Aldehyd-Dehydrogenase, Hydroxyacyl-CoA-Dehydrogenase, Acyl-CoA-Acetyltransferase). Vergleicht man diese Beobachtung mit den hier bereits vorgestellten Kautschukabbauenden Bakterien, lassen sich Parallelen erkennen. In *Xanthomonas* sp. 35Y codieren die Sequenzen *downstream* von *roxA*<sub>Xsp.</sub> für die putativen Proteine Enoyl-CoA Hydratase/Isomerase, Acyl-CoA-Acetyltransferase und Aminoglycosid-Phosphotransferase (Braaz, 2005b). Das zuletzt genannte Enzym besitzt die konservierte Domäne einer Acyl-CoA-Dehydrogenase. In *Streptomyces* sp. K30 ist das *lcp*-Gen zusammen mit einer heterodimeren Molybdän-Hydroxylase (OxiAB) in einem Operon organisiert (Rose et al., 2005b; Yikmis et al., 2008). Es ist wahrscheinlich, dass über dieses Enzym die Oxidation der Spaltprodukte zu den entsprechenden Carbonsäuren bewerkstelligt wird. Jedes der genannten Proteine kann in der  $\beta$ -Oxidation beteiligt sein, durch welche Fettsäuren metabolisiert werden.

Die Beteiligung der  $\beta$ -Oxidation am Abbau von Polyisopren wurde schon früher vermutet. Eine Disruptionsmutante von *Gordonia polyisoprenivorans* Stamm VH2, die ein *mcr*-Gen betraf ( $\alpha$ -Methylacyl-Coenzym A Racemase), war beispielsweise nicht zu einem Abbau von Kautschuk und verzweigt-kettigen Kohlenwasserstoffen fähig (Banh et al., 2005). Durch die Identifizierung mehrerer Zwischenprodukte des Kautschuk-Abbaus gelang es bereits, ein hypothetisches Abbauschema auf der Grundlage der  $\beta$ -Oxidation aufzustellen. Aus einer Isopreneinheit des Polymers entstehen so die Produkte Acetyl-CoA und Propionyl-CoA (Bode et al., 2001). Später konnte durch eine Genomanalyse von *Gordonia polyisoprenivorans* Stamm VH2 ein Abbaupfad für poly(*cis*-1,4-isopren) postuliert werden, der ebenfalls zu den oben genannten Produkten führt (Abb. 26). Auch wurde die Aufnahme der extrazellulären Spaltprodukte über einen ATP-abhängigen ABC-Transporter postuliert, an dem Mce-Proteine beteiligt sind (*mammalian cell*

entry) (Hiessl et al., 2012). Für die Gram-negativen Bakterien ist bis jetzt nicht viel über den weiteren Abbau von Kautschuk bekannt. Aber auch hier müsste ein spezifischer Transporter vorhanden sein, der die extrazellulären Spaltprodukte in den intrazellulären Raum überführt. Interessanterweise konnte bei der Sequenzierung von *Xanthomonas* sp. 35Y ein Protein identifiziert werden, welches eine Homologie zu einem Mce-Protein zeigt (contig 49, 14901-15797). Auch in den Myxobakterien mit *roxA*-Sequenz lassen sich Mce-orthologe Proteine finden. Ferner ist das an *roxA*<sub>Mfu</sub> downstream anschließende Gen als ein putatives „ABC-transporter substrate binding protein“ annotiert, was ebenfalls als ein Hinweis auf diesen Transportmechanismus der Spaltprodukte gesehen werden kann.

Alle bisher genannten Proteine waren direkt an der Aufnahme und Metabolisierung von Kautschuk beteiligt. Es konnte aber auch mit der Superoxid Dismutase (SodA) ein Enzym identifiziert werden, das eine wichtige Funktion bei dem bakteriellen Wachstum auf Kautschuk erfüllt, ohne direkt an der Umsetzung des Polymers beteiligt zu sein. Bei *Gordonia*-Stämmen wird SodA bei Wachstum auf Kautschuk exprimiert. Der Grund hierfür ist wahrscheinlich der Schutz der Zelle vor reaktiven Sauerstoffspezies, die bei der initialen Kautschukspaltung durch Lcp entstehen könnten (Schulte et al., 2008). In *Xanthomonas* sp. 35Y enthält eine von vier putativen Superoxid Dismutasen eine vorhergesagte Signalsequenz (SodC2, contig 22, 156799-157410; SignalP 4.1-Server). Es ist möglich, dass *Xanthomonas* sp. 35Y bei Wachstum auf Kautschuk mit diesem Enzym toxische reaktive Sauerstoffspezies unschädlich macht.

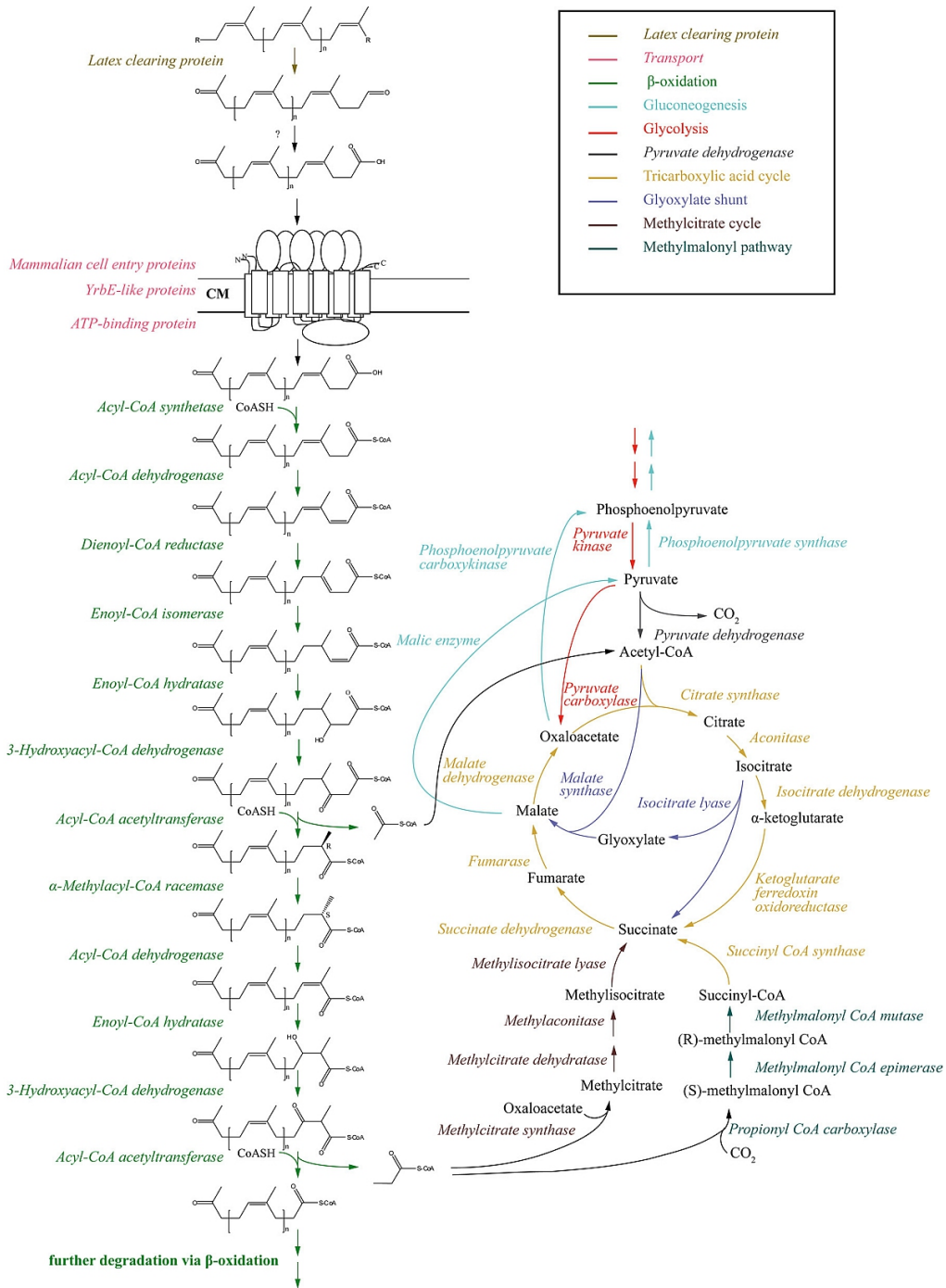


Abb. 26 (aus Hiessl et al., 2012): Postulierter Abbauweg für poly(*cis*-1,4-isopren) über die  $\beta$ -Oxidation in *Gordonia polyisoprenivorans* Stamm VH2. CoA und CoASH: Coenzym A. CM Cytoplamsa-Membran (mit freundlicher Genehmigung von ASM-Journals).

### 3.6 Die Reinigung und Charakterisierung von Lcp

Lcp wurde als das verantwortliche Enzym für eine Klärhofbildung auf Latex overlay Agarplatten bei Gram-positiven Bakterien identifiziert (Hiessl et al., 2012; Rose et al., 2005b; Rose & Steinbüchel, 2005). Die Expression von *lcp* erwies sich in der Vergangenheit als schwierig, deshalb konnte eine Expression und Reinigung in signifikanten Mengen nicht durchgeführt werden. Eine Charakterisierung von Lcp war dadurch bisher nicht möglich.

Mit *Xanthomonas* sp. 35Y  $\Delta$ *roxA* und dem Expressionsvektor pNH1::*lcp* gelang in der vorliegenden Arbeit die funktionelle Expression und eine Reinigung von nativem Lcp mit einer Ausbeute von ca. 1,5 mg aus 12 Litern Zellkultur. Hierdurch wurde eine erste Charakterisierung dieses Enzyms ermöglicht. Einige Spaltprodukte der von Lcp katalysierten Reaktion konnten über LC-MS analysiert werden. Es wurden 11 Produkte nachgewiesen, die sich voneinander um die Masse von jeweils einer Isopreneinheit unterscheiden. Zu bedenken ist, dass mit der hier vorgestellten Methode der Extraktion nur die kleinsten Spaltprodukte von Lcp isoliert werden können und vermutlich noch wesentlich größere Moleküle vorhanden sind. Das Vorkommen größerer Spaltprodukte konnte bereits bei dem Polyisopren-Abbau von *Nocardia farcinica* gezeigt werden, einem Bakterium, das eine *lcp*-Sequenz im Genom trägt (Ibrahim et al., 2006). Die Lcp-katalysierte Spaltung des Polymers erfolgt demnach scheinbar zufällig an den Doppelbindungen des Polymers, wodurch sich die verschiedenen Produktgrößen erklären lassen (*endo*-Mechanismus). Im Gegensatz dazu scheint RoxA initial an das Substrat zu binden, woraufhin es gebunden bleibt und die Spaltung dann immer, ausgehend von den Polyisopren-Enden, bei der ODTD-spezifischen Länge erfolgt (*exo*-Mechanismus).

Die Aufnahme der durch Lcp und RoxA erzeugten Spaltprodukte stellt die Bakterien vor eine Herausforderung. Wie zuvor bereits beschrieben, wird für *Gordonia polyisoprenivorans* ein ABC-Transporter angenommen, der die Moleküle ins Zellinnere transportiert (Hiessl et al., 2012). Für den Transport über die Membran sind vermutlich aber nur Spaltprodukte bis zu einem bestimmten Molekulargewicht geeignet, wie sich aus den erhaltenen Ergebnissen der Lcp- und RoxA-Expressionen annehmen lässt. Bei einem Vergleich der *Xanthomonas* sp. 35Y Expressionskulturen von RoxA und Lcp auf Latex overlay Agar fiel auf, dass RoxA einen großen Klärhof zeigte, jedoch konnte nach Färbung mit Schiff's-Reagenz kein „Fuchsinhof“ um die

Kultur erkannt werden. Für Lcp war hingegen um die Kultur nur ein kleiner Klärhof, jedoch ein großer „Fuchsinhof“ sichtbar. Diese genannten Beobachtungen lassen sich mit den verschiedenen Produktgrößen von RoxA und Lcp erklären. Der „Fuchsinhof“ macht die Aldehyd-haltigen Spaltprodukte von Lcp sichtbar. Ein Großteil der Spaltprodukte von Lcp kann möglicherweise aufgrund ihrer Größe nicht von *Xanthomonas* sp. 35Y aufgenommen werden und verbleibt dadurch extrazellulär, was zu einem kleinen Klärhof und einem großen „Fuchsinhof“ führt. Da bei RoxA hauptsächlich das relativ kleine Hauptspaltprodukt ODTD entsteht, werden nahezu alle Spaltprodukte von *Xanthomonas* sp. 35Y aufgenommen und metabolisiert. Dadurch zeigt sich ein großer Klärhof, jedoch kein „Fuchsinhof“ um die entsprechende Kultur. Es bleibt hier die Frage bestehen, ob der natürliche Lcp-Wirt *Streptomyces* sp. K30 ebenfalls nur die kleinsten Spaltprodukte verstoffwechseln kann oder ob andere Mechanismen den Anteil der nutzbaren Spaltprodukte erhöhen. Da jedoch auch bei *Streptomyces* sp. K30 „Fuchsinhöfe“ um die Kulturen auf Latex overlay Platten sichtbar sind (Bröker et al., 2008), scheint zumindest ein Teil nicht von den Bakterien genutzt werden zu können. Das bedeutet, dass für RoxA im Vergleich zu Lcp trotz einer geringeren spezifischen Aktivität der Anteil der nutzbaren Spaltprodukte für den Wirtsorganismus ungleich höher ist (RoxA: 0,26 U/mg und Lcp: 0,7 U/mg bei Raumtemperatur). RoxA ist also ein langsames, aber zugleich auch effizienteres Enzym für den Abbau von Polyisopren als Lcp.

Nach Ermittlung der optimalen Pufferbedingungen von Lcp (KPP, 100 mM, pH 7) wurde die Temperaturstabilität untersucht. RoxA wurde auch nach 20 Stunden bei 37°C nahezu nicht inaktiviert, bei Lcp war hingegen ein Aktivitätsverlust von etwa 80% zu bemerken. Die Gründe hierfür lassen sich eventuell in der Lcp-Struktur finden, die aber noch nicht bekannt ist. In der Aminosäuresequenz lassen sich jedoch keine Cysteinreste finden, wodurch das Fehlen von stabilisierenden Schwefelbrücken als ein Faktor für die geringere Stabilität gedeutet werden kann. In RoxA stabilisieren zwei Schwefelbrücken die strukturelle Integrität des Enzyms. Umso erstaunlicher ist es, dass die Aktivität von Lcp durch Dithiothreitol inhibiert wird, da in Lcp aus *Streptomyces* sp. K30 keine Cysteinreste vorkommen und demnach eine Inaktivierung durch das Reduzieren von Schwefelbrücken durch diese Verbindung nicht als Ursache in Frage kommt. Der gezeigte vollständige Aktivitätsverlust von Lcp in Anwesenheit von Detergenzien (Tween 20, SDS, Triton X-100) lässt sich möglicherweise durch eine Störung bei der Interaktion mit dem Substrat Polyisopren erklären.



Für die weitere Charakterisierung von Lcp war es erforderlich, die Ausbeute erheblich zu steigern. Hierfür wurde die native TAT-abhängige Signalsequenz durch den Strep-Tag ersetzt, das Konstrukt wurde dann in *E. coli* JM109 exprimiert. Die Ausbeute von Strep-Lcp betrug 5,4 mg pro Liter Zellkultur und war hiermit etwa 40-fach höher als mit dem *Xanthomonas* sp. 35Y Expressionssystem, was die genauere Untersuchung von Lcp ermöglichte.

### 3.6.1 Lcp ist ein *b*-Typ Cytochrom

Über einen UVvis-spektroskopischen Test und MALDI-TOF Analysen konnte Lcp den *b*-Typ Cytochromen zugeordnet werden. Die Metallanalyse ergab etwa ein Molekül Eisen pro Lcp. Bei einer Analyse der Auswirkung von Chelatbildnern auf die Lcp Aktivität zeigte sich, dass nur Diethyldithiocarbamat zu einer Inhibierung führte (getestet wurden auch Phenanthrolin, Tiron, EDTA, Ethylxanthogenat und Bipyridin). Da bei einer Inkubation von Lcp mit Diethyldithiocarbamat das UVvis-Spektrum nahezu unverändert blieb, kann eine Abstraktion oder Bindung des Eisenmoleküls der Hämgruppe durch diese Verbindung ausgeschlossen werden. Die Inhibierung wird daher vermutlich durch einen unbekanntem Mechanismus hervorgerufen.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit stehen im Gegensatz zu den Ergebnissen bei Lcp aus *Gordonia polyisoprenivorans* Stamm VH2 (Lcp<sub>VH2</sub>). Dort wurde Lcp<sub>VH2</sub> als ein kupferhaltiges Enzym beschrieben (Hiessl et al., 2014). Die Aminosäuresequenzen beider Lcps zeigen eine hohe Identität (52%), was verschiedene aktive Zentren unwahrscheinlich macht. Denkbar ist, dass der His-Tag, der zur Reinigung von Lcp<sub>VH2</sub> verwendet wurde, Kupfer aus dem Puffer bindet und so für ein falsch-positives Ergebnis sorgt. Es ist bekannt, dass Histidin, und so auch der His-Tag (sechs hintereinanderliegende Histidinreste), eine hohe Affinität zu Übergangsmetallen wie Kupfer zeigt (Astatke, 2008). Die His-Tag-abhängigen Proteinreinigungssäulen mit der höchsten Affinität für den His-Tag sind beispielsweise nicht Nickel- sondern Kupfer-abhängig (z. B. Goldbio H-311-C8). Da die Spezifität bei einer Kupfer-basierten Reinigung von Proteinen aber häufig zu gering ist, werden von ThermoFischer (lifetechnologies.com) entsprechende Materialien nicht zur Proteinreinigung eingesetzt. Diese werden beispielsweise zum Fixieren von His-Tag Proteinen an Oberflächen verwendet, die dann für andere Applikationen zur Verfügung stehen (z. B. Pierce™ Copper Coated High Capacity Plates, Bestellnummer 15143).

Die Ergebnisse in der vorliegenden Arbeit zeigen eindeutig, dass es sich bei Lcp aus *Streptomyces* sp. K30 um ein eisenabhängiges, hämhaltiges Enzym handelt. Kupfer konnte nur in Spuren nachgewiesen werden. Gram-positive Bakterien (Lcp, *b*-Typ Cytochrom) und auch Gram-negative Bakterien (RoxA, *c*-Typ Cytochrom) scheinen also eine Hämgruppe als aktives Zentrum für die Polyisoprenspaltung einzusetzen. Des Weiteren erzeugen beide Proteine durch die katalytische Aktivität sauerstoffhaltige Spaltprodukte mit dem gleichen Grundaufbau. Da sich die Enzyme hinsichtlich des Molekulargewichts und der Aminosäuresequenz unterscheiden, aber auch anderen Hämtypen angehören, kann davon ausgegangen werden, dass sie analog jeweils in Gram-negativen und Gram-positiven Bakterien entstanden sind. Bei den genannten Gemeinsamkeiten kommt jedoch die Fragestellung auf, ob beiden Enzymen der gleiche Reaktionsmechanismus zu Grunde liegt. Zur Klärung dieser Frage wurde zunächst der „as isolated“ Zustand von Lcp mit RoxA verglichen. Im Fall von RoxA liegt das N-terminale, aktive Hämzentrum von RoxA reduziert vor und bindet im „as isolated“ Zustand molekularen Sauerstoff (Schmitt, 2012; Seidel et al., 2013). Die Bindung von molekularem Sauerstoff im „as isolated“ Zustand ist also auch für Lcp denkbar. Wie bereits zuvor beschrieben führen Pyridin, aber auch Imidazol, zu einer scheinbaren Reduktion von RoxA. Ausgelöst wird dies durch das Verdrängen des O<sub>2</sub>-Moleküls von der N-terminalen Hämgruppe (siehe dazu Kapitel 3.2, Seite 57ff). Eine Inkubation von Lcp mit Imidazol, dem stärkeren Inhibitor der beiden, resultierte zwar in reduzierter katalytischer Aktivität, jedoch wurde keine signifikante Änderung im UVvis-Spektrum sichtbar. Ein Lcp-gebundenes O<sub>2</sub>-Molekül kann hier demnach nicht erkannt werden. Ein weiterer aufschlussreicher Test ist die Inkubation von hämhaltigen Proteinen mit Kohlenstoffmonoxid (CO). CO ist zu einer Bindung an reduziertem Eisen (Fe<sup>2+</sup>) in der Lage, jedoch nicht an oxidiertem Eisen (Fe<sup>3+</sup>). Eine CO-Bindung an Fe<sup>2+</sup> führt bei hämhaltigen Proteinen zu einer sichtbaren Veränderung im UVvis-Spektrum (Hirata et al., 1977). Für RoxA ließ sich nach Inkubation mit CO eine Absorptionserhöhung bei 415 nm, 518 nm und 557 nm feststellen, was aufgrund des vorliegenden reduzierten Hämzentrums (Fe<sup>2+</sup>) im „as isolated“ Zustand zu erwarten war. Für Lcp war nach Inkubation mit CO keine Änderung im Spektrum zu bemerken. Die Versuche mit Imidazol und CO implizieren ein oxidiertes, sauerstofffreies Hämzentrum von Lcp, was es deutlich von RoxA unterscheidet.

### 3.7 Der Reaktionsmechanismus der RoxA- und Lcp-abhängigen Polyisoprenspaltung

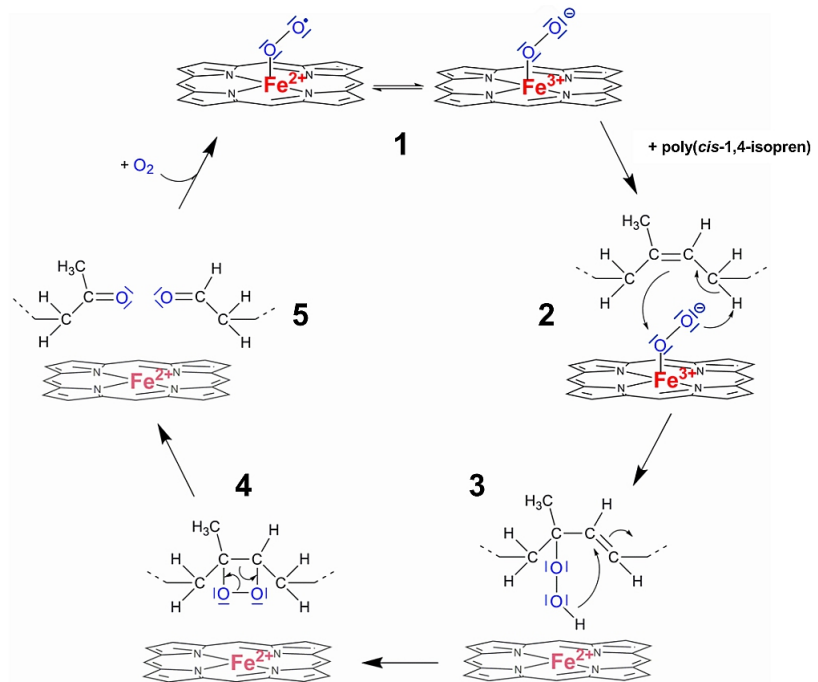
Das C-terminale Hämzentrum ist nach der aktuellen Vorstellung am RoxA-Reaktionsmechanismus unbeteiligt. Es wäre möglich, dass es sich um ein Relikt aus der Abstammung von bakteriellen Cytochrom *c* Peroxidasen handelt. Für eine genauere Untersuchung wurden bereits früher verschiedene RoxA-Muteine hergestellt, die diese Hämgruppe beeinflussen sollten. Beispielsweise ist bekannt, dass durch eine Mutation eines der Cysteine zu Serin im CXXCH Hämbindemotiv der Einbau einer Hämgruppe an dieser Position verhindert wird (Allen et al., 2002). Die entsprechenden RoxA-Muteine waren jedoch nicht exprimierbar, wodurch keine Versuche mit den entsprechenden Enzym-Varianten durchgeführt werden konnten. Auch war der Austausch des axialen C-terminalen Hämliganden Histidin 641 zu Methionin oder Tyrosin nicht exprimierbar (persönliche Beobachtungen).

Mutationsanalysen von RoxA im Bereich zwischen den Hämzentren zeigten des Weiteren, dass die konservierte Position W302 keine wichtige Funktion bei der Katalyse einnimmt. Beispielsweise war das Mutein RoxA-W302L in der Aktivität gegenüber dem Wildtyp nicht beeinflusst (Schmitt, 2012). Dieser Tryptophanrest (vgl. Abb. 4, Seite 24) wirkt in CCPs und MauG als Elektronenüberträger zwischen den beiden Hämzentren (Fülöp et al., 1995; Jensen et al., 2010; Shimizu et al., 2001). Bei CCP aus *Rhodobacter capsulatus* und MauG aus *Paracoccus denitrificans* führte die Substitution mit anderen Aminosäuren zu einem nahezu vollständigen Aktivitätsverlust (Shin et al., 2013; de Smet et al., 2006). Aus den erhaltenen Ergebnissen lässt sich schließen, dass das C-terminale Hämzentrum für die strukturelle Stabilität von RoxA unabdingbar ist, jedoch keinen direkten Einfluss auf die katalytische Aktivität zu haben scheint.

Im Reaktionsmodell von RoxA (Abb. 27) greift der an die N-terminale Hämgruppe gebundene molekulare Sauerstoff die Doppelbindung von poly(*cis*-1,4-isopren) an, wodurch eine Hydroperoxid-Verbindung gebildet wird. Eine autokatalytische Spaltung des Substrat-Hydroperoxids könnte über eine Dioxetan-Zwischenstufe erfolgen, wodurch am Produkt eine Keto- und eine Aldehydgruppe entsteht. Die reduziert vorliegende Hämgruppe von RoxA kann dann wieder molekularen Sauerstoff aufnehmen und eine weitere sauerstoffabhängige Spaltung von Polyisopren katalysieren (Schmitt, 2012).

**Abb. 27 (aus Schmitt, 2012, verändert): Hypothetischer Reaktionsmechanismus von RoxA.**

Dargestellt ist das N-terminale Hämzentrum mit Eisenatom (rot); Sauerstoff (blau) sowie poly(*cis*-1,4-isopren). Im „as isolated“ Zustand liegt ein reduziertes Eisenatom mit gebundenem molekularem Sauerstoff vor (1). Das O<sub>2</sub>-Molekül wird auf Polyisopren übertragen, das Hämzentrum bleibt hierbei reduziert zurück (2 und 3). Die entstandene Substrat-Hydroperoxid-Verbindung könnte dann über eine Dioxetan-Zwischenstufe die Spaltung des Polyisoprenmoleküls verursachen, wodurch eine Keto- und eine Aldehydgruppe entsteht (4 und 5).



Da das Eisenatom reduziert zurückbleibt, kann es wieder molekularen Sauerstoff binden und so die nächste poly(*cis*-1,4-isopren)-Spaltung einleiten. Die Hämgruppe selbst ist in diesem Reaktionsmodell nicht an der Spaltung beteiligt (dargestellt durch das hell hinterlegte Hämsymbol in 3, 4 und 5).

Für Lcp stellt sich die interessante Frage, wie die katalytische Aktivität initiiert werden kann, da sich das Hämzentrum „as isolated“ im oxidierten (Fe<sup>3+</sup>), sauerstofffreien Zustand zu befinden scheint. Die Bindung von molekularem Sauerstoff an ein Hämzentrum kann nur erfolgen, wenn dieses in der reduzierten Form (Fe<sup>2+</sup>) vorliegt (Dorman et al., 2002; Maines, 1988). Sollte der Reaktionsmechanismus von Lcp dem von RoxA entsprechen, müsste die Lcp-Hämgruppe zunächst reduziert werden, um eine O<sub>2</sub>-Bindung und so die katalytische Aktivität der Polyisoprenspaltung zu ermöglichen. Dies könnte beispielsweise direkt durch eine Oxidation des Substrats erfolgen, möglicherweise begleitet durch eine Konformationsänderung von Lcp. Hierdurch könnte dann eine O<sub>2</sub>-Bindestelle am Hämzentrum freigegeben werden. Eine substratabhängige Bindung von Sauerstoff ist insofern sinnvoll, da ein ständig gebundenes O<sub>2</sub>-Molekül schnell oxidative Schäden am Enzym verursachen kann, weswegen beispielsweise den beiden hämhaltigen Dioxygenasen IDO und TDO ein solcher Mechanismus innewohnt (Thackray et al., 2008). Mit gebundenem O<sub>2</sub>-Molekül sind sie nur in einer Zeitspanne von Sekunden bis Minuten stabil, bevor eine Autooxidation des Hämzentrums stattfindet (Batabyal & Yeh, 2009;

Hirata et al., 1977). RoxA stellt als hämhaltige Dioxygenase einen Sonderfall mit dauerhaft gebundenem molekularem Sauerstoff dar, nach einer Lagerung des Enzyms bei 4°C ist auch nach Monaten nahezu kein Aktivitätsverlust feststellbar.

Neben der bereits angeführten Möglichkeit der direkten Reduktion von Lcp durch die Oxidation des Substrates sind auch andere Mechanismen denkbar, die eine initiale Reduktion der Hämgruppe und so eine katalytische Aktivität von Lcp einleiten könnten. Eine abschließende Klärung ist bei dem aktuellen Stand der Lcp Charakterisierung nicht möglich, jedoch können verschiedene Theorien dazu genannt werden:

### **Aktivierung von Lcp durch Wasserstoffatom-Abstraktion vom Substrat**

Eine Möglichkeit zur Aktivierung von oxidierten Enzymen zeigen Lipoxygenasen, eisenhaltige Enzyme, die keine Hämgruppe enthalten. Sie katalysieren die Peroxidierung von ungesättigten Fettsäuren und kommen in Pflanzen und Säugetieren, aber auch in Pilzen und Bakterien vor. In der Katalyse wird ein Wasserstoffatom vom Substrat abstrahiert und auf eine an  $\text{Fe}^{3+}$  gebundene Hydroxylgruppe übertragen, wodurch Wasser freigesetzt wird und reduziertes Eisen zurückbleibt. Hierdurch entsteht ein Substratradikal, das mit molekularem Sauerstoff reagiert. Das gebildete Substrat-Peroxidradikal oxidiert  $\text{Fe}^{2+}$ , wodurch eine Hydroperoxidverbindung und ein oxidiertes  $\text{Fe}^{3+}$  Molekül entsteht (Andreou & Feussner, 2009; Borowski & Broclawik, 2003).

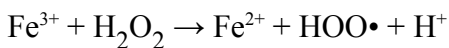
Prinzipiell wäre ein solcher Mechanismus für die Polyisoprenspaltung denkbar, da hierbei ebenfalls ein Substrat-Hydroperoxid entsteht, wie es auch im Reaktionsmodell von RoxA vermutet wird. Jedoch wurde ein solcher Reaktionsmechanismus noch nie für hämhaltige Enzyme beschrieben. Die in der Literatur geschilderten „pseudo-Peroxidase“ Aktivitäten von hämhaltigen Enzymen wie zum Beispiel Hämoglobin und Cytochrom *c* beruhen vermutlich auf anderen Reaktionsmechanismen, die häufig eine schnelle Zerstörung des Enzyms zur Folge haben (Iwase et al., 1998; Kühn et al., 1981).

### Aktivierung von Lcp durch Peroxidverbindungen

Bekannt ist eine Reduktion eines oxidierten Eisenmoleküls auch durch Peroxide. Diese kommen mit Sicherheit in Polyisoprenverbindungen vor, da molekularer Sauerstoff zu einem gewissen Teil mit den darin enthaltenen Doppelbindungen reagiert, woraufhin Hydroperoxide entstehen.

#### Die Fenton Reaktion

Ein Mechanismus, der eine Reduktion von oxidiertem Eisen über Peroxidverbindungen beschreibt, ist ein Teil der Fenton Reaktion. Hierbei entsteht durch die Reduktion des Eisenatoms ein Peroxidradikal und ein Proton (Fenton, 1894; Haber & Weiss, 1934; Salgado et al., 2013). Somit könnten Substratperoxide die initiale Aktivierung des Enzyms bewerkstelligen.



#### Aktivierung von TDO über Wasserstoffperoxid

Im Fall der TDO konnte gezeigt werden, dass mit Wasserstoffperoxid ein oxidiertes Hämeisen reduziert werden kann. Die Reaktion setzt hierbei Wasser frei und lässt das Hämzentrum als oxoferryl-Species ( $\text{Fe}^{4+}=\text{O}$ ) zurück, wobei auch ein Porphyrin- und so letztlich ein Proteinradikal entsteht. Das hämgebundene Sauerstoffatom wird dann an das Substrat Tryptophan abgegeben, dabei bleibt ein reduziertes Hämzentrum ( $\text{Fe}^{2+}$ ) zurück. Das noch vorhandene Proteinradikal reagiert ebenfalls mit einem Tryptophan, woraufhin ein Tryptophanradikal entsteht. Zwei solche Tryptophanradikale reagieren dann wiederum zu einem di-Tryptophan-Molekül (Fu et al., 2011).

## 4 Ausblick

### 4.1 RoxA

Zukünftig sollte das Auffinden der unbekanntenen **poly(*cis*-1,4-isopren)-Bindedomäne** von RoxA ein primäres Ziel darstellen. Da die Hämzentren von RoxA im Inneren des Enzyms verborgen liegen, muss das Substrat nach erfolgter Bindung zum aktiven Zentrum gelangen. Bis jetzt wird vermutet, dass bei RoxA drei Loops über dem distalen N-terminalen Hämzentrum involviert sind. Durch sogenannte „hydrophobic brushes“ wäre ein Substratzugang zu dem N-terminalen Hämzentrum durch Rotationsflexibilität bestimmter Tryptophanreste möglich (W495, W445, W450, W449) (Seidel et al., 2013). In Zukunft sollten diese Positionen durch Mutationsanalysen auf ihre Wichtigkeit an der poly(*cis*-1,4-isopren)-Interaktion untersucht werden. Zwei der genannten Tryptophanreste (W449, W450) lassen sich nur in RoxA<sub>Xsp</sub> finden, jedoch nicht in den anderen untersuchten RoxA-orthologen Proteinen. Da diese eine Aktivität von nur 10% gegenüber RoxA<sub>Xsp</sub> zeigen, wäre es denkbar, dass ein gezielter Austausch der entsprechenden Aminosäurereste zu Tryptophan bei den RoxA-orthologen Proteinen zu einer Steigerung der Aktivität führt. Hierdurch wäre ein erster Hinweis auf eine Beteiligung dieser Aminosäuren an der poly(*cis*-1,4-isopren)-Interaktion gegeben.

Die angeführte geringe Aktivität der RoxA-orthologen Proteine könnte auch in einer anderen Substratspezifität begründet sein, wie die unterschiedlichen Auswirkungen von  $\beta$ -Carotin auf die Aktivität von RoxA<sub>cco</sub> bereits andeuteten (siehe Kapitel 2.6.4, Seite 43). Eine weitere Vorgehensweise zum Auffinden der Substratbindestelle ergibt sich durch die Ergebnisse, die für das Mutein RoxA<sub>cco</sub>-DOM erhalten wurden (Gassner, 2014). Durch den Austausch von zwei Positionen (H444T und Y448S) an der Proteinoberfläche durch die jeweiligen Aminosäurereste aus RoxA<sub>Xsp</sub> steigerte sich mit Kulturüberstand die Aktivität um den Faktor 1,6. Dieses Ergebnis muss jetzt auch für das gereinigte RoxA<sub>cco</sub>-Mutein gezeigt werden. Sollte sich dies bestätigen, ist es sehr wahrscheinlich, dass die Aminosäurereste im Bereich der Polyisopren-Substratbindedomäne liegen. In weiteren RoxA<sub>cco</sub>-Muteinen, die auf Basis von RoxA<sub>Xsp</sub> erstellt werden, sollte dann eine weitere Aktivitätssteigerung möglich sein. Die umgekehrten Mutationen in RoxA<sub>Xsp</sub> sollten wiederum für eine Verminderung der Aktivität sorgen.

Ein anderer Ansatz für das Auffinden der Substratbindedomäne ist die Kristallisation von RoxA mit Substrat. In der Vergangenheit war dies nicht möglich. Beispielsweise führen Versuche, RoxA Kristalle mit ODTD zu inkubieren, nicht zur gewünschten dreidimensionalen Struktur mit gebundenem ODTD-Molekül. Das inaktive Mutein RoxA-F317Y eröffnet jedoch zusammen mit den Produkten der Lcp-Spaltung neue Möglichkeiten. Es konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass die Aktivität von RoxA-F317Y praktisch vollständig unterdrückt ist, aber auch, dass RoxA-Wt einige Produkte der Lcp-Spaltung als Substrat akzeptiert. Eines der Lcp-Spaltprodukte könnte durch eine präparative HPLC isoliert und anschließend für eine Inkubation mit RoxA-F317Y eingesetzt werden. Dies könnte zu einer entsprechenden Kristallstruktur mit gebundenem Substrat führen.

Neben dem Substratkanal muss auch ein **Produktkanal** vorhanden sein, wodurch die Spaltprodukte nach erfolgter Katalyse wieder freigesetzt werden können. Die für diesen Produktkanal in RoxA postulierten Aminosäurereste Y462 und H312 sind nicht für die Stabilisierung von ODTD verantwortlich, wie in Gassner, 2014 gezeigt werden konnte. Das Auffinden dieses Kanals ist sehr schwierig, da er aus der Struktur nicht abgeleitet werden kann. Eine PC-basierte Modellierung mit ODTD im Bereich des N-terminalen Hämzentrums könnte zu einer Entdeckung dieses Kanals beitragen. Da die Resultate eines solchen Vorhabens unvorhersehbar sind und hierfür viel Zeit investiert werden muss, sollte das Hauptziel jedoch zunächst die Substratbindedomäne darstellen.

## 4.2 Lcp

Für Lcp konnte gezeigt werden, dass es sich um ein *b*-Typ Cytochrom mit oxidiertem ( $\text{Fe}^{3+}$ ) Hämgruppe handelt. Es stellt sich die Frage, ob für Lcp der gleiche Reaktionsmechanismus wie für RoxA angenommen werden kann oder, ob es sich um einen anderen handeln könnte. Da sich im Zustand „as isolated“ die beiden Enzyme scheinbar in unterschiedlichen Grundzuständen befinden, müsste im Fall von Lcp zunächst eine initiale Reduktion von Lcp erfolgen, um eine  $\text{O}_2$ -Bindung zu ermöglichen. Einige Mechanismen hierfür wurden bereits in Kapitel 3.7, Seite 75 aufgezeigt.



Die EPR-Spektroskopie könnte für eine weitere Charakterisierung von Lcp und auch zur Klärung der soeben genannten Fragestellung über die Art des Reaktionsmechanismus, analog zu den bei Schmitt 2012 durchgeführten Versuchen mit RoxA, eingesetzt werden. So könnte das oxidierte Hämzentrum verifiziert, aber auch der *spin*-Zustand sowie die Art der axialen Liganden des Eisenatoms festgestellt werden. Durch Inkubation mit Polyisopren ließen sich möglicherweise *spin*- oder *redox*-Veränderungen verfolgen. Des Weiteren könnten so mögliche (Substrat-)Radikale sichtbar werden. Durch die daraus gewonnenen Erkenntnisse wären eventuell Aussagen für den Reaktionsmechanismus von Lcp möglich, beispielsweise, ob das RoxA-Modell oder ein anderes in Frage kommt.

Die dreidimensionale Struktur von Lcp wäre für weitere Versuche von großer Hilfe. Hierdurch ließen sich durch eine gerichtete Mutagenese einzelner Aminosäurereste Hinweise auf die Sauerstoffbindung sowie die Interaktion mit Polyisopren finden.

## Literaturverzeichnis

- Allen, J.W.A., Tomlinson, E.J., Hong, L. & Ferguson, S.J. (2002).** The *Escherichia coli* cytochrome *c* maturation (ccm) system does not detectably attach heme to single cysteine variants of an apocytochrome *c*. *The Journal of Biological Chemistry*, 277 (37), 33559–33563.
- Andreou, A. & Feussner, I. (2009).** Lipoxygenases – structure and reaction mechanism. *Phytochemistry*, 70 (13–14), 1504–1510.
- Arciero, D.M. & Hooper, A.B. (1994).** A di-heme cytochrome *c* peroxidase from *Nitrosomonas europaea* catalytically active in both the oxidized and half-reduced states. *Journal of Biological Chemistry*, 269 (16), 11878–11886.
- Astatke, M. (2008).** Comparison of HisDetector™ Nickel-NTA conjugates with a single-step antibody method for the detection of His-tagged proteins. *Nature Methods | Application Notes*. DOI: 10.1038/an5492
- Avila, L., Huang, H., Damaso, C.O., Lu, S., Moënne-Loccoz, P. & Rivera, M. (2003).** Coupled oxidation vs heme oxygenation: Insights from axial ligand mutants of mitochondrial cytochrome *b5*. *Journal of the American Chemical Society*, 125 (14), 4103–4110.
- Banh, Q., Arenskötter, M. & Steinbüchel, A. (2005).** Establishment of Tn5096-based transposon mutagenesis in *Gordonia polyisoprenivorans*. *Applied and Environmental Microbiology*, 71 (9), 5077–5084.
- Barham, B. & Coomes, O. (1994).** Wild rubber: Industrial organisation and the microeconomics of extraction during the amazon rubber boom (1860–1920). *Journal of Latin American Studies*, 26 (01), 37–72.
- Barrick, D., Ho, N.T., Simplaceanu, V., Dahlquist, F.W. & Ho, C. (1997).** A test of the role of the proximal histidines in the Perutz model for cooperativity in haemoglobin. *Nature Structural & Molecular Biology*, 4 (1), 78–83.
- Batabyal, D. & Yeh, S.-R. (2009).** Substrate–protein interaction in human tryptophan dioxygenase: The critical role of H76. *Journal of the American Chemical Society*, 131 (9), 3260–3270.
- Berry, E.A. & Trumpower, B.L. (1987).** Simultaneous determination of hemes *a*, *b*, and *c* from pyridine hemochrome spectra. *Analytical Biochemistry*, 161 (1), 1–15.
- Birke, J., Hamsch, N., Schmitt, G., Altenbuchner, J. & Jendrossek, D. (2012).** Phe317 is essential for rubber oxygenase RoxA activity. *Applied and Environmental Microbiology*, 78 (22), 7876–7883.

- Birke, J., Röther, W., Schmitt, G. & Jendrossek, D. (2013).** Functional identification of rubber oxygenase (RoxA) in soil and marine myxobacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 79 (20), 6391–6399.
- Birke, J. & Jendrossek, D. (2014).** Rubber oxygenase and latex clearing protein cleave rubber to different products and use different cleavage mechanisms. *Applied and Environmental Microbiology*, 80 (16), 5012–5020.
- Birke, J., Röther, W. & Jendrossek, D. (2015).** Latex clearing protein (Lcp) of *Streptomyces* sp. K30 is a *b*-type cytochrome and differs from rubber oxygenase A (RoxA) in its biophysical properties. *Applied and Environmental Microbiology*, 81 (11), 3793–3799.
- Blake, J.T. & Kitchin, D.W. (1949).** Effect of soil microorganisms on rubber insulation. *Industrial & Engineering Chemistry*, 41 (8), 1633–1641.
- Bode, H.B., Zeeck, A., Plüchhahn, K. & Jendrossek, D. (2000).** Physiological and chemical investigations into microbial degradation of synthetic poly(*cis*-1,4-isoprene). *Applied and Environmental Microbiology*, 66 (9), 3680–3685.
- Bode, H.B., Kerkhoff, K. & Jendrossek, D. (2001).** Bacterial degradation of natural and synthetic rubber. *Biomacromolecules*, 2 (1), 295–303.
- Bolot, S., Guy, E., Carrere, S., Barbe, V., Arlat, M. & Noël, L.D. (2013).** Genome sequence of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* strain xca5. *Genome Announcements*, 1 (1), e00032–12.
- Borel, M., Kergomard, A. & Renard, M.F. (1982).** Degradation of natural rubber by fungi imperfecti. *Agricultural and Biological Chemistry*, 46 (4), 877–881.
- Borowski, T. & Broclawik, E. (2003).** Catalytic reaction mechanism of lipoxygenase. A density functional theory study. *The Journal of Physical Chemistry B*, 107 (19), 4639–4646.
- Braaz, R., Fischer, P. & Jendrossek, D. (2004).** Novel type of heme-dependent oxygenase catalyzes oxidative cleavage of rubber (poly-*cis*-1,4-Isoprene). *Applied and Environmental Microbiology*, 70 (12), 7388–7395.
- Braaz, R. (2005b).** Poly(*cis*-1,4-Isopren) Oxygenase A (RoxA): Identifizierung, Isolierung, Charakterisierung, Kristallisation und Reaktionsmechanismus einer neuartigen extrazellulären Dioxygenase. Dissertation. *Universität Stuttgart*.
- Braaz, R., Armbruster, W. & Jendrossek, D. (2005a).** Heme-dependent rubber oxygenase RoxA of *Xanthomonas* sp. cleaves the carbon backbone of poly(*cis*-1,4-isoprene) by a dioxygenase mechanism. *Applied and Environmental Microbiology*, 71 (5), 2473–2478.

- Bröker, D., Dietz, D., Arenskötter, M. & Steinbüchel, A. (2008).** The genomes of the non-clearing-zone-forming and natural-rubber-degrading species *Gordonia polyisoprenivorans* and *Gordonia westfalica* harbor genes expressing Lcp activity in *Streptomyces* strains. *Applied and Environmental Microbiology*, 74 (8), 2288–2297.
- Carver, T.E., Brantley, R.E., Jr, Singleton, E.W., Arduini, R.M., Quillin, M.L., Phillips, G.N., Jr & Olson, J.S. (1992).** A novel site-directed mutant of myoglobin with an unusually high O<sub>2</sub> affinity and low autooxidation rate. *The Journal of biological chemistry*, 267 (20), 14443–14450.
- Cornish, K., Wood, D.F. & Windle, J.J. (1999).** Rubber particles from four different species, examined by transmission electron microscopy and electron-paramagnetic-resonance spin labeling, are found to consist of a homogeneous rubber core enclosed by a contiguous, monolayer biomembrane. *Planta*, 210 (1), 85–96.
- Couture, M., Yeh, S.-R., Wittenberg, B.A., Wittenberg, J.B., Ouellet, Y., Rousseau, D.L. & Guertin, M. (1999).** A cooperative oxygen-binding hemoglobin from *Mycobacterium tuberculosis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96 (20), 11223–11228.
- Dalziel, K. & O'Brien, J.R. (1957).** Side reactions in the deoxygenation of dilute oxyhaemoglobin solutions by sodium dithionite. *The Biochemical Journal*, 67 (1), 119–124.
- Dorman, S.C., Kenny, C.F., Miller, L., Hirsch, R.E. & Harrington, J.P. (2002).** Role of redox potential of hemoglobin-based oxygen carriers on methemoglobin reduction by plasma components. *Artificial Cells, Blood Substitutes and Biotechnology*, 30 (1), 39–51.
- Du, J., Sono, M. & Dawson, J.H. (2008).** The proximal and distal pockets of the H93G myoglobin cavity mutant bind identical ligands with different affinities: Quantitative analysis of imidazole and pyridine binding. *Journal of Spectroscopy*, 22 (2-3), 123–141.
- Dworkin, M. (1966).** Biology of the myxobacteria. *Annual Review of Microbiology*, 20 (1), 75–106.
- Fang, Y., Zhan, M. & Wang, Y. (2001).** The status of recycling of waste rubber. *Materials & Design*, 22 (2), 123–128.
- Fenton, H.J.H. (1894).** Oxidation of tartaric acid in presence of iron. *Journal of the Chemical Society, Transactions*, 65, 899–910.
- Fülöp, V., Ridout, C.J., Greenwood, C. & Hajdu, J. (1995).** Crystal structure of the di-haem cytochrome *c* peroxidase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Structure*, 3 (11), 1225–1233.
- Fu, R., Gupta, R., Geng, J., Dornevil, K., Wang, S., Zhang, Y., Hendrich, M.P. & Liu, A. (2011).** Enzyme reactivation by hydrogen peroxide in heme-based tryptophan dioxygenase. *The Journal of Biological Chemistry*, 286 (30), 26541–26554.

- Gassner, T.E. (2014).** Struktur- und Funktionsanalyse von Rubber Oxygenase A (RoxA) aus *Xanthomonas* sp. 35Y und *Corallocooccus coralloides* BO35. Diplomarbeit. *Universität Stuttgart*.
- Gupta, K., Selinsky, B.S., Kaub, C.J., Katz, A.K., Loll, P.J. (2004).** The 2.0 Å resolution crystal structure of prostaglandin H<sub>2</sub> synthase-1: structural insights into an unusual peroxidase. *Journal of Molecular Biology*, 335 (2): 503–518.
- Haber, F. & Weiss, J. (1934).** The catalytic decomposition of hydrogen peroxide by iron salts. *Proceedings of the Royal Society of London. Series A, Mathematical and Physical Sciences*, 147 (861), 332–351.
- Hamsch, N., Schmitt, G. & Jendrossek, D. (2010).** Development of a homologous expression system for rubber oxygenase RoxA from *Xanthomonas* sp. *Journal of Applied Microbiology*, 109 (3), 1067–1075.
- Heisey, R.M. & Papadatos, S. (1995).** Isolation of microorganisms able to metabolize purified natural rubber. *Applied and Environmental Microbiology*, 61 (8), 3092–3097.
- Hiessl, S., Schuldes, J., Thürmer, A., Halbsguth, T., Bröker, D., Angelov, A., Liebl, W., Daniel, R. & Steinbüchel, A. (2012).** Involvement of two latex clearing proteins during rubber degradation and insights into the subsequent degradation pathway revealed by the genome sequence of *Gordonia polyisoprenivorans* strain VH2. *Applied and Environmental Microbiology*, 78 (8), 2874–2887.
- Hiessl, S., Böse, D., Oetermann, S., Eggers, J., Pietruszka, J. & Steinbüchel, A. (2014).** Latex clearing protein - an oxygenase cleaving poly(*cis*-1,4-isoprene) rubber at the *cis*-double bonds. *Applied and Environmental Microbiology*, 80 (17), 5231–5240.
- Hirata, F., Ohnishi, T. & Hayaishi, O. (1977).** Indoleamine 2,3-dioxygenase. Characterization and properties of enzyme-O<sub>2</sub>-complex. *Journal of Biological Chemistry*, 252 (13), 4637–4642.
- Hoffmann, M., Braaz, R., Jendrossek, D. & Einsle, O. (2008).** Crystallization of the extracellular rubber oxygenase RoxA from *Xanthomonas* sp. strain 35Y. *Acta Crystallographica Section F: Structural Biology and Crystallization Communications*, 64 (2), 123–125.
- Ibrahim, E.M.A., Arenskötter, M., Luftmann, H. & Steinbüchel, A. (2006).** Identification of poly(*cis*-1,4-isoprene) degradation intermediates during growth of moderately thermophilic actinomycetes on rubber and cloning of a functional *lcp* homologue from *Nocardia farcinica* strain E1. *Applied and Environmental Microbiology*, 72 (5), 3375–3382.

- Imai, S., Ichikawa, K., Muramatsu, Y., Kasai, D., Masai, E. & Fukuda, M. (2011).** Isolation and characterization of *Streptomyces*, *Actinoplanes*, and *Methylibium* strains that are involved in degradation of natural rubber and synthetic poly(*cis*-1,4-isoprene). *Enzyme and Microbial Technology*, 49 (6–7), 526–531.
- Imai, S., Yoshida, R., Endo, Y., Fukunaga, Y., Yamazoe, A., Kasai, D., Masai, E. & Fukuda, M. (2013).** *Rhizobacter gummiphilus* sp. nov., a rubber-degrading bacterium isolated from the soil of a botanical garden in Japan. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 59 (3), 199–205.
- Ismail, M.A., Mohamed, N.H. & Shoreit, A.A.M. (2013).** Degradation of *Ficus elastica* rubber latex by *Aspergillus terreus*, *Aspergillus flavus* and *Myceliophthora thermophila*. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 78, 82–88.
- Ivanova, N., Daum, C., Lang, E., Abt, B., Kopitz, M., Saunders, E., Lapidus, A., Lucas, S., Glavina Del Rio, T., Nolan, M. et al. (2010).** Complete genome sequence of *Haliangium ochraceum* type strain (SMP-2). *Standards in genomic sciences*, 2 (1), 96–106.
- Iwase, H., Sakurada, K., Takatori, T., Nagao, M., Niijima, H., Matsuda, Y. & Kobayashi, M. (1998).** Calcium ions potentiate lipoxygenase activity of cytochrome *c* at the physiological pH. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 243 (2), 485–491.
- Jendrossek, D., Tomasi, G. & Kroppenstedt, R.M. (1997).** Bacterial degradation of natural rubber: A privilege of actinomycetes? *FEMS microbiology letters*, 150 (2), 179–188.
- Jendrossek, D. & Reinhardt, S. (2003).** Sequence analysis of a gene product synthesized by *Xanthomonas* sp. during growth on natural rubber latex. *FEMS microbiology letters*, 224 (1), 61–65.
- Jensen, L.M.R., Sanishvili, R., Davidson, V.L. & Wilmot, C.M. (2010).** In crystallo posttranslational modification within a MauG/pre-methylamine dehydrogenase complex. *Science*, 327 (5971), 1392–1394.
- Kerkhoff, K. (2001).** Molekularbiologische und biochemische Untersuchungen zum bakteriellen Naturkautschuk-Abbau, sowie Charakterisierung eines dazu befähigten Bakteriums. Dissertation. *Universität Stuttgart*.
- Kühn, H., Götze, R., Schewe, T. & Rapoport, S.M. (1981).** Quasi-lipoxygenase activity of haemoglobin. *European Journal of Biochemistry*, 120 (1), 161–168.
- Lee, B.-M., Park, Y.-J., Park, D.-S., Kang, H.-W., Kim, J.-G., Song, E.-S., Park, I.-C., Yoon, U.-H., Hahn, J.-H., Koo, B.-S. et al. (2005).** The genome sequence of *Xanthomonas oryzae* pathovar *oryzae* KACC10331, the bacterial blight pathogen of rice. *Nucleic Acids Research*, 33 (2), 577–586.

- Lieberei, R. (2007).** South American leaf blight of the rubber tree (*Hevea* spp.): New steps in plant domestication using physiological features and molecular markers. *Annals of Botany*, 100 (6), 1125–1142.
- Linos, A., Berekaa, M.M., Reichelt, R., Keller, U., Schmitt, J., Flemming, H.-C., Kroppenstedt, R.M. & Steinbüchel, A. (2000b).** Biodegradation of *cis*-1,4-polyisoprene rubbers by distinct actinomycetes: Microbial strategies and detailed surface analysis. *Applied and Environmental Microbiology*, 66 (4), 1639–1645.
- Linos, A., Reichelt, R., Keller, U. & Steinbüchel, A. (2000).** A Gram-negative bacterium, identified as *Pseudomonas aeruginosa* AL98, is a potent degrader of natural rubber and synthetic *cis*-1,4-polyisoprene. *FEMS Microbiology Letters*, 182 (1), 155–161.
- Li, X., Jones, L.H., Pearson, A.R., Wilmot, C.M. & Davidson, V.L. (2006).** Mechanistic possibilities in MauG-dependent tryptophan tryptophylquinone biosynthesis. *Biochemistry*, 45 (44), 13276–13283.
- Luo, Q., Hiessl, S., Poehlein, A. & Steinbüchel, A. (2013).** Microbial gutta-percha degradation shares common steps with rubber degradation by *Nocardia nova* SH22a. *Applied and Environmental Microbiology*, 79 (4), 1140–1149.
- Maines, M.D. (1988).** Heme oxygenase: Function, multiplicity, regulatory mechanisms, and clinical applications. *The FASEB Journal*, 2 (10), 2557–2568.
- Morello, J.A., Craw, M.R., Constantine, H.P. & Forster, R.E. (1964).** Rate of reaction of dithionite ion with oxygen in aqueous solution. *Journal of Applied Physiology*, 19 (3), 522–525.
- Perutz, M.F. (1989).** Mechanisms of cooperativity and allosteric regulation in proteins. *Quarterly Reviews of Biophysics*, 22 (2), 139–237.
- Rook, J.J. (1955).** Microbiological deterioration of vulcanized rubber. *Applied Microbiology*, 3 (5), 302–309.
- Roosevelt, F.D. (1942).** Radio appeal on scrap-rubber campaign. In: **Ciment, J., Russell, T.** (2006). The home front encyclopedia: United States, Britain, and Canada in World Wars I and II (page 1252). 1. Edition. ISBN-13: 9781576078495. *ABC-CLIO, Santa Barbara, California (USA)*
- Rose, K. & Steinbüchel, A. (2005).** Biodegradation of natural rubber and related compounds: Recent insights into a hardly understood catabolic capability of microorganisms. *Applied and Environmental Microbiology*, 71 (6), 2803–2812.
- Rose, K., Tenberge, K.B. & Steinbüchel, A. (2005b).** Identification and characterization of genes from *Streptomyces* sp. strain K30 responsible for clear zone formation on natural rubber latex and poly(*cis*-1,4-isoprene) rubber degradation. *Biomacromolecules*, 6 (1), 180–188.

- Röther, W.D. (2013).** Isolierung und biochemische Charakterisierung von RoxA (Rubber Oxygenase A) Orthologen aus Gram-negativen Mikroorganismen. Bachelorarbeit. *Universität Stuttgart*.
- Russell, J.A. (1942).** Fordlandia and Belterra, rubber plantations on the tapajos river, Brazil. *Economic Geography*, 18 (2), 125–145.
- Salgado, P., Melin, V., Contreras, D., Moreno, Y. & Mansilla, H.D. (2013).** Fenton reaction driven by iron ligands. *Journal of the Chilean Chemical Society*, 58 (4), 2096–2101.
- Schade, A.L. (1937).** Observations on a *Monascus* isolated from rubber. *Mycologia*, 29 (3), 295–302.
- Schmidt, T., Lenders, M., Hillebrand, A., Deenen, N. van, Munt, O., Reichelt, R., Eisenreich, W., Fischer, R., Prüfer, D. & Gronover, C.S. (2010).** Characterization of rubber particles and rubber chain elongation in *Taraxacum koksaghyz*. *BMC Biochemistry*, 11 (1), 11.
- Schmitt, G., Seiffert, G., Kroneck, P.M.H., Braaz, R. & Jendrossek, D. (2010).** Spectroscopic properties of rubber oxygenase RoxA from *Xanthomonas* sp., a new type of dihaem dioxygenase. *Microbiology (Reading, England)*, 156 (Pt 8), 2537–2548.
- Schmitt, G. (2012).** Spektroskopische Charakterisierung der Rubber oxygenase RoxA aus *Xanthomonas* sp. 35Y. Dissertation. *Universität Stuttgart*.
- Schulte, C., Arenskötter, M., Berekaa, M.M., Arenskötter, Q., Priefert, H. & Steinbüchel, A. (2008).** Possible involvement of an extracellular superoxide dismutase (SodA) as a radical scavenger in poly(*cis*-1,4-isoprene) degradation. *Applied and Environmental Microbiology*, 74 (24), 7643–7653.
- Seidel, J., Schmitt, G., Hoffmann, M., Jendrossek, D., Einsle, O. (2013).** Structure of the processive rubber oxygenase RoxA from *Xanthomonas* sp. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110 (34), 13833–13838.
- Shimizu, H., Schuller, D.J., Lanzilotta, W.N., Sundaramoorthy, M., Arciero, D.M., Hooper, A.B. & Poulos, T.L. (2001).** Crystal structure of *Nitrosomonas europaea* cytochrome *c* peroxidase and the structural basis for ligand switching in bacterial di-heme peroxidases. *Biochemistry*, 40 (45), 13483–13490.
- Shin, S., Feng, M., Chen, Y., Jensen, L.M.R., Tachikawa, H., Wilmot, C.M., Liu, A. & Davidson, V.L. (2011).** The tightly bound calcium of MauG is required for tryptophan tryptophylquinone cofactor biosynthesis. *Biochemistry*, 50 (1), 144–150.
- Shin, S., Feng, M. & Davidson, V.L. (2013).** Mutation of Trp(93) of MauG to tyrosine causes loss of bound Ca<sup>2+</sup> and alters the kinetic mechanism of tryptophan tryptophylquinone cofactor biosynthesis. *The Biochemical Journal*, 456 (1), 129–137.



- Siler, D.J., Goodrich Tanrikulu, M., Cornish, K., Stafford, A.E. & McKeon, T.A. (1997).** Composition of rubber particles of *Hevea brasiliensis*, *Parthenium argentatum*, *Ficus elastica*, and *Euphorbia lactiflua* indicates unconventional surface structure. *Plant Physiology and Biochemistry*, 35 (11), 881–889.
- da Silva, A.C.R., Ferro, J.A., Reinach, F.C., Farah, C.S., Furlan, L.R., Quaggio, R.B., Monteiro-Vitorello, C.B., Van Sluys, M.A., Almeida, N.F., Alves, L.M.C. et al. (2002).** Comparison of the genomes of two *Xanthomonas* pathogens with differing host specificities. *Nature*, 417 (6887), 459–463.
- Simpson, A.J., Reinach, F.C., Arruda, P., Abreu, F.A., Acencio, M., Alvarenga, R., Alves, L.M., Araya, J.E., Baia, G.S., Baptista, C.S. et al. (2000).** The genome sequence of the plant pathogen *Xylella fastidiosa*. The *Xylella fastidiosa* consortium of the organization for nucleotide sequencing and analysis. *Nature*, 406 (6792), 151–159.
- de Smet, L., Savvides, S.N., van Horen, E., Pettigrew, G. & Van Beeumen, J.J. (2006).** Structural and mutagenesis studies on the cytochrome *c* peroxidase from *Rhodobacter capsulatus* provide new insights into structure-function relationships of bacterial di-heme peroxidases. *The Journal of Biological Chemistry*, 281 (7), 4371–4379.
- Söhngen, N. & Fol, J. (1914).** Die Zersetzung des Kautschuks durch Mikroben. *Zentralbl. Bakteriol. Parasitenkd. Infekt.*, 40:87–98.
- Sommer, F. & Röthemeyer, F. (2006).** Kautschuktechnologie: Werkstoffe - Verarbeitung - Produkte. 2. Auflage. ISBN-13: 9783446404809. *Carl Hanser Verlag GmbH & Co. KG, München (Deutschland)*.
- Spence, D. & van Niel, C.B. (1936).** Bacterial decomposition of the rubber in *Hevea* latex. *Rubber Chemistry and Technology*, 9 (4), 633–643.
- Subramaniam, A. (1995).** The chemistry of natural rubber latex. *Immunology and allergy clinics of North America*, 15 (1), 1–20.
- Tanaka, Y., Aik-Hwee, E., Ohya, N., Nishiyama, N., Tangpakdee, J., Kawahara, S. & Wititsuwannakul, R. (1996).** Initiation of rubber biosynthesis in *Hevea brasiliensis*: Characterization of initiating species by structural analysis. *Phytochemistry*, 41 (6), 1501–1505.
- Abu Tarboush, N., Shin, S., Geng, J., Liu, A. & Davidson, V.L. (2012).** Effects of the loss of the axial tyrosine ligand of the low-spin heme of MauG on its physical properties and reactivity. *FEBS Letters*, 586 (24), 4339–4343.
- Thackray, S.J., Mowat, C.G. & Chapman, S.K. (2008).** Exploring the mechanism of tryptophan 2,3-dioxygenase. *Biochemical Society Transactions*, 36 (Pt 6), 1120–1123.

- Thanseem, I., Joseph, A. & Thulaseedharan, A. (2005).** Induction and differential expression of  $\beta$ -1,3-glucanase mRNAs in tolerant and susceptible *Hevea* clones in response to infection by *Phytophthora meadii*. *Tree physiology*, 25 (11), 1361–1368.
- Tsuchii, A., Suzuki, T. & Takeda, K. (1985).** Microbial degradation of natural rubber vulcanizates. *Applied and Environmental Microbiology*, 50 (4), 965–970.
- Tsuchii, A. & Takeda, K. (1990).** Rubber-degrading enzyme from a bacterial culture. *Applied and Environmental Microbiology*, 56 (1), 269–274.
- Uthup, T.K., Ravindran, M., Bini, K. & Thakurdas, S. (2011).** Divergent DNA methylation patterns associated with abiotic stress in *Hevea brasiliensis*. *Molecular Plant*, 4 (6), 996–1013.
- Vandegriff, K.D. & Olson, J.S. (1984).** The kinetics of O<sub>2</sub> release by human red blood cells in the presence of external sodium dithionite. *The Journal of Biological Chemistry*, 259 (20), 12609–12618.
- Viola, F., Aime, S., Coletta, M., Desideri, A., Fasano, M., Paoletti, S., Tarricone, C. & Ascenzi, P. (1996).** Azide, cyanide, fluoride, imidazole and pyridine binding to ferric and ferrous native horse heart cytochrome *c* and to its carboxymethylated derivative: A comparative study. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 62 (3), 213–222.
- de Vries, O. (1928).** Zersetzung von Kautschuk-Kohlenwasserstoff durch Pilze. *Zentbl. Bakteriol. Parasitenkd. Infektionskr.*, 74, 22–24.
- Wang, Y., Graichen, M.E., Liu, A., Pearson, A.R., Wilmot, C.M. & Davidson, V.L. (2003).** MauG, a novel diheme protein required for tryptophan tryptophylquinone biogenesis. *Biochemistry*, 42 (24), 7318–7325.
- Warneke, S., Arenskötter, M., Tenberge, K.B. & Steinbüchel, A. (2007).** Bacterial degradation of poly(*trans*-1,4-isoprene) (gutta percha). *Microbiology*, 153 (2), 347–356.
- Wei, J., Liu, H., Dick, A.R., Yamamoto, H., He, Y. & Waldeck, D.H. (2002).** Direct wiring of cytochrome *c*'s heme unit to an electrode: electrochemical studies. *Journal of the American Chemical Society*, 124 (32), 9591–9599.
- White, W.C. (2007).** Butadiene production process overview. *Chemico-Biological Interactions*, 166 (1-3): 10–14.
- Yang, H.-J., Park, K.H., Shin, S., Lee, J., Park, S., Kim, H.S. & Kim, J. (2013).** Characterization of heme ions using MALDI-TOF MS and MALDI FT-ICR MS. *International Journal of Mass Spectrometry*, 343–344, 37–44.

- Yeh, S.-R., Couture, M., Ouellet, Y., Guertin, M. & Rousseau, D.L. (2000).** A cooperative oxygen binding hemoglobin from *Mycobacterium tuberculosis* - stabilization of heme ligands by a distal tyrosine residue. *Journal of Biological Chemistry*, 275 (3), 1679–1684.
- Yikmis, M., Arenskötter, M., Rose, K., Lange, N., Wernsmann, H., Wiefel, L. & Steinbüchel, A. (2008).** Secretion and transcriptional regulation of the latex clearing protein, Lcp, by the rubber-degrading bacterium *Streptomyces* sp. strain K30. *Applied and Environmental Microbiology*, 74 (17), 5373–5382.
- Yikmis, M. & Steinbüchel, A. (2012b).** Historical and recent achievements in the field of microbial degradation of natural and synthetic rubber. *Applied and Environmental Microbiology*, 78 (13), 4543–4551.
- Yikmis, M. & Steinbüchel, A. (2012a).** Importance of the latex clearing protein (Lcp) for poly(*cis*-1,4-isoprene) rubber cleavage in *Streptomyces* sp. K30. *MicrobiologyOpen*, 1 (1), 13–24.
- Zobell, C.E. & Grant, C.W. (1942).** The bacterial oxidation of rubber. *Science*, 96 (2495), 379–380.

## Anhang: Publikationen

Im Anhang finden sich Publikationen, die im Rahmen der vorliegenden Arbeit veröffentlicht wurden. Alle sind bei AEM erschienen (Applied and Environmental Microbiology), die Publikationen werden mit der Genehmigung von ASM-Journals gezeigt (American Society for Microbiology).

**Birke, J., Hamsch, N., Schmitt, G., Altenbuchner, J. & Jendrossek, D. (2012).** Phe317 is essential for rubber oxygenase RoxA activity. *Applied and Environmental Microbiology*, 78 (22), 7876–7883.

**Birke, J., Röther, W., Schmitt, G. & Jendrossek, D. (2013).** Functional identification of rubber oxygenase (RoxA) in soil and marine myxobacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 79 (20), 6391–6399.

**Birke, J. & Jendrossek, D. (2014).** Rubber oxygenase and latex clearing protein cleave rubber to different products and use different cleavage mechanisms. *Applied and Environmental Microbiology*, 80 (16), 5012–5020.

**Birke, J., Röther, W. & Jendrossek, D. (2015).** Latex clearing protein (Lcp) of *Streptomyces* sp. K30 is a *b*-type cytochrome and differs from rubber oxygenase A (RoxA) in its biophysical properties. *Applied and Environmental Microbiology*, 81 (11), 3793–3799.



## Phe317 Is Essential for Rubber Oxygenase RoxA Activity

Jakob Birke,<sup>a</sup> Nadja Hamsch,<sup>a</sup> Georg Schmitt,<sup>a</sup> Josef Altenbuchner,<sup>b</sup> and Dieter Jendrossek<sup>a</sup>

Institut für Mikrobiologie, Universität Stuttgart, Stuttgart, Germany,<sup>a</sup> and Institut für Industrielle Genetik, Universität Stuttgart, Stuttgart, Germany<sup>b</sup>

RoxA is an extracellular *c*-type diheme cytochrome secreted by *Xanthomonas* sp. strain 35Y during growth on rubber. RoxA cleaves poly(*cis*-1,4-isoprene) to 12-oxo-4,8-dimethyltrideca-4,8-diene-1-al (ODTD). Analysis of the RoxA structure revealed that Phe317 is located in close proximity ( $\approx 5$  Å) to the N-terminal heme that presumably represents the active site. To find evidence of whether Phe317 is important for catalysis, we changed it to tyrosine, tryptophan, leucine, histidine, or alanine. All five RoxA mutants were expressed after integration of the respective gene into the chromosome of a *Xanthomonas* sp.  $\Delta$ roxA strain. Residual clearing zone formation on opaque latex agar was found for *Xanthomonas* sp. strains expressing the Phe317Leu, Phe317Ala, or Phe317His variant (wild type > Leu > Ala > His). Strains in which Phe317 was changed to tyrosine or tryptophan were inactive. Phe317Ala and Phe312Leu RoxA mutants were purified, and polyisoprene cleavage activities were reduced to  $\approx 3\%$  and 10%, respectively. UV-visible spectroscopy of RoxA mutants confirmed that both heme groups were present in an oxidized form, but spectral responses to the addition of low-molecular-weight (inhibitory) ligand molecules such as imidazole and pyridine were different from those of wild-type RoxA. Our results show that residue 317 is involved in interaction with substrates. This is the first report on structure-function analysis of a polyisoprene-cleaving enzyme and on the identification of an amino acid that is essential for polyisoprene cleavage activity.

Natural rubber [poly(*cis*-1,4-isoprene)] (NR) is an important naturally produced hydrocarbon polymer. Products made on the basis of NR have been in use on the scale of thousands of tons per year for more than a century. However, the fate of rubber materials in the environment is poorly understood. Only the fact that rubber is principally biodegradable is well-documented (2, 9, 10, 16, 26). The enzymes that are responsible for primary attack of polyisoprene in rubber-degrading microorganisms and the biochemical mechanisms by which these enzymes cleave rubber materials into low-molecular-weight products are almost unknown. Due to the high stability of carbon-carbon bonds, biodegradation of NR is a slow process compared to biodegradation of biopolymers, such as polypeptides, polysaccharides, and others, in which the polymer backbone contains heteroatoms such as nitrogen, oxygen, or other elements that facilitate enzymatic cleavage reactions. Heteroatoms are absent in polyisoprene; the C=C double bond is the only functional group in polyisoprene that allows an attack by oxidizing enzymes. In fact, rubber-degrading organisms are widespread in nature (9, 10, 16). Some rubber-degrading bacteria, such as *Xanthomonas* sp. strain 35Y (23) and many actinomycetes, produce clearing zones on opaque latex agar, while others grow adhesively on rubber without clearing zone formation. *Gordonia polyisoprenivorans* and *Gordonia westfalica* belong to the latter group (see references 16 and 26 and references therein).

To date, two types of proteins that are essential for rubber degradation and that catalyze the primary attack of polyisoprene have been identified in rubber-degrading microorganisms. One is the latex clearing protein (Lcp) and was first described for *Streptomyces* sp. K30 but apparently is widely distributed in rubber-degrading bacteria (17). The other is the rubber oxygenase RoxA of *Xanthomonas* sp. 35Y (11), a potent rubber degrader isolated more than 20 years ago (23). Lcp and RoxA are completely different polypeptides without significant similarities in amino acid sequence. RoxA consists of 678 amino acids and is a *c*-type cytochrome that features two heme binding sites as well as a MauG motif (11). In contrast, Lcp (397 amino acids) does not have any

metals or cofactors (17). Both Lcp and RoxA are responsible for cleavage of rubber to low-molecular-weight degradation products with aldehyde and keto groups at the molecule ends (4, 8, 22, 23), and therefore they apparently catalyze similar or even the same reaction. RoxA has been purified and studied *in vitro* (3, 4, 11). Purified RoxA is active in an aqueous environment if only the substrates, rubber and dioxygen, are present (4) and the physical conditions (pH and temperature) are appropriate. 12-Oxo-4,8-dimethyltrideca-4,8-diene-1-al (ODTD) was identified as the major degradation product. Isotope labeling experiments revealed that RoxA is a dioxygenase (3). Spectroscopic characterization of RoxA (18) showed that the two heme centers are present in an oxidized form and can be differentiated spectroscopically. Recently, our cooperation partners succeeded in solving the three-dimensional structure of RoxA (7; O. Einsle, University of Freiburg, personal communication) (Protein Data Bank [PDB] accession code 4B2N). The structure in the neighborhood of the two hemes is similar to that of bacterial cytochrome *c* peroxidases (CCPs), with two hemes buried deeply in the protein and arranged perpendicular to each other (Fig. 1a). However, unlike CCPs, RoxA does not need external reductants such as cytochrome *c* for activity (4), and consequently, all attempts to demonstrate peroxidase activity of RoxA were not successful (18). In conclusion, RoxA must have a reaction mechanism that is different from that of CCPs. Phe317 was identified in close proximity to the distal coordination site of the N-terminal heme, sloped opposite and at

Received 30 July 2012 Accepted 23 August 2012

Published ahead of print 31 August 2012

Address correspondence to Dieter Jendrossek, dieter.jendrossek@imb.uni-stuttgart.de.

J.B. and N.H. contributed equally to this article.

Copyright © 2012, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

doi:10.1128/AEM.02385-12

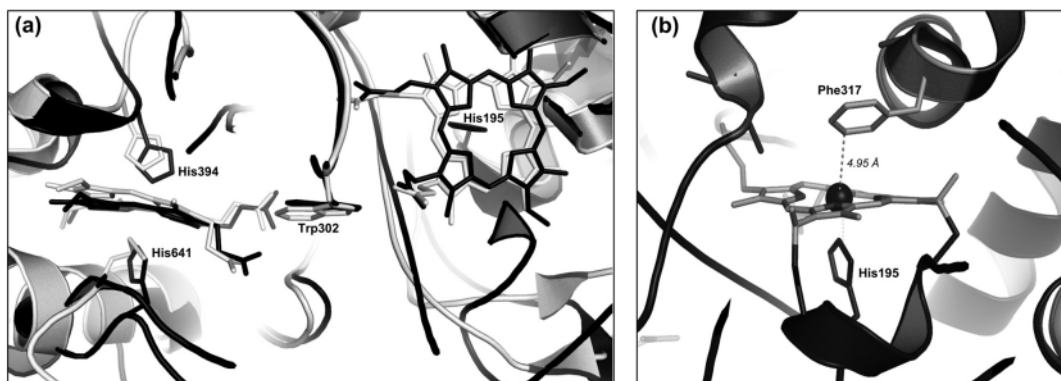


FIG 1 (a) Similarity of RoxA structure to that of cytochrome *c* peroxidase of *Nitrosomonas europaea* (NEP). An overlay of the central regions of RoxA (black) and NEP (gray), including the two heme centers and the interheme region, is shown. The heme axial amino acid ligands and the tryptophan residues, located in the middle between the two hemes (Trp302 in RoxA), are also shown. (b) Structure around the N-terminal heme center of RoxA. Phe317 is located in close proximity (4.95 Å) to the sixth coordination site of the heme iron.

a short distance from the Fe ion (Fig. 1b). We assume that this heme represents the active site of RoxA and that Phe317 is involved in interaction with substrate molecules. Consequently, we investigated the importance of residue 317 by site-directed mutagenesis.

#### MATERIALS AND METHODS

**Bacterial strains, plasmids, and culture conditions.** Table 1 shows strains, plasmids, and primers used in this study. *Xanthomonas* sp. 35Y (23) and related strains were grown in modified LB medium with a reduced concentration of yeast extract (10 g tryptone, 5 g NaCl, and 0.25 g yeast extract per liter) or in a mineral salts medium (MSM) with 0.1 to 0.2% purified rubber latex at 30°C for 10 to 12 days. For purification of recombinant RoxA, a *Xanthomonas* sp.  $\Delta$ roxA-attB strain harboring the roxA variant of interest (Table 1) was grown in 0.5 liter of modified LB medium (20 individual cultures in 3-liter Erlenmeyer flasks) supplemented with 0.1% (wt/vol) L-rhamnose for  $\approx$ 60 h at 30°C with continuous shaking. Cells were harvested (4°C) by centrifugation, and RoxA was purified from cell-free culture fluid as described below.

**Construction of a  $\Delta$ roxA mutant of *Xanthomonas* sp.** In contrast to previous assumptions (6), expression of recombinant roxA in *Xanthomonas* sp. from plasmids provided in *trans* was not possible. Rather, expression of recombinant roxA required integration of the roxA gene into the chromosome. To avoid recombination of an introduced roxA copy with chromosomal roxA, it was necessary to remove the wild-type (WT) roxA copy from the chromosome. The plasmid used for deletion of roxA was constructed using the sacB-containing suicide plasmid pLO3 (13), into which the kanamycin resistance gene aphII of the plasmid pBBR1MCS-2 (12) was cloned by PCR (with primer pair 1), yielding pLO3-Km. A 3,603-bp SacI fragment of *Xanthomonas* sp. chromosomal DNA containing roxA and its up- and downstream regions was cloned into the SacI restriction sites of pLO3-Km and pBBR1MCS-2 as well as into the SmaI sites of pUC9 (via blunt ligation after restriction by the neoschizomer Ecl136II), yielding pLO3-Km::roxA-region, pBBR1MCS2::roxA-region, and pUC9::roxA-region, respectively. The coding sequences of roxA were removed from pLO3-Km::roxA-region and pUC9::roxA-region by PCR amplification using primer pair 2 and religation of the purified PCR products (via XbaI restriction in the case of pUC9::roxA-region and via blunt ligation in the case of pLO3-Km::roxA-region), yielding pUC9::roxA-region- $\Delta$ roxA and pLO3-Km::roxA-region- $\Delta$ roxA, respectively. The attB attachment site of PhiC31 was inserted into pUC9::roxA-region- $\Delta$ roxA by

QuikChange PCR using primer pair 3. Finally, the attB site and the adjacent roxA up- and downstream DNA regions (1,145 bp) were cloned into pLO3-Km::roxA-region- $\Delta$ roxA via DraIII and SacII restriction, giving pLO3::roxA-region- $\Delta$ roxA-attB. The resulting construct was checked by DNA sequencing. The chromosomal roxA gene of the *Xanthomonas* sp. CM strain was removed by exchange with the attB site after conjugative transfer of the plasmid pLO3-Km- $\Delta$ roxA-attB (with selection of plasmid integrants on kanamycin agar and subsequent selection for double-crossover events by growth on 10% sucrose-containing solid medium). The success of roxA deletion in purified individual clones was confirmed by PCR amplification of the former roxA locus and by DNA sequencing.

**Construction of a plasmid suitable for PhiC31-mediated integration into the chromosome of a *Xanthomonas* sp.  $\Delta$ roxA strain and rhamnose-dependent expression of RoxA variants.** The PhiC31-dependent integration vector for roxA expression was constructed in a modular way. Starting from pIC20HE, a PmlI restriction site was first introduced downstream of the ampicillin resistance gene (bla) by PCR amplification of pIC20HE (with primers S6549 and S6550) and ligation of the linear DNA, giving plasmid pJOE6776.1. Subsequently, the bla gene was replaced by a kanamycin resistance gene (aphII) amplified from pBBR1MCS-2 (with primers S6551 and S6552). The aphII gene was inserted between the PmlI and SspI sites of pJOE6776.1, giving pJOE6772.2. In the next step, the PhiC31 integrase gene (int) together with the attP site was inserted into pJOE6772.2. The DNA fragment was obtained by a PCR using plasmid pSI17 as the template, with primers S6553 and S6554, and then was cut with AseI and inserted at the NdeI site of pJOE6772.2 to give pJOE6776.3. Finally, the mob gene and oriT region of pBBR1MCS-2 for conjugal transfer were PCR amplified (with primers S6565 and S6566) and the fragment inserted into the AatII site of pJOE6776.3. The new plasmid, pJOE6787.1, was the basis for anchoring of a cloned roxA copy into the chromosomal attB site of the *Xanthomonas* sp.  $\Delta$ roxA-attB strain. For this purpose, the rhamnose regulation genes and the roxA coding sequence were PCR amplified using primer pair 4, with 4782.1::roxA as the template (6), to give pNH1-roxA-attP. The insertion was confirmed by DNA sequencing. In cases of roxA variants with mutations in the roxA sequence, pUC9::roxA was mutagenized via QuikChange PCR. The roxA sequence of pNH1-roxA-attP was replaced by the roxA variant sequence harboring the respective mutated codon by NdeI/ApaI ligation of pUC9::roxA (via replacement of respective NdeI-ApaI DNA fragments) into pNH1-roxA-attP. The plasmid harboring the roxA variant gene of interest

Birke et al.

TABLE 1 Strains, plasmids, and primers used in this study

Strain or plasmid	Relevant characteristics or sequence (5'-3')	Reference or source
<b>Strains</b>		
<i>Escherichia coli</i> strains		
S17-1	Conjugation strain	19
XL1-Blue	QuikChange transformation strain	
<i>Xanthomonas</i> sp. strains		
35Y	Growth on poly( <i>cis</i> -1,4-isoprene) latex, clearing zone formation	23
35Y-CM	Chloramphenicol-resistant mutant of 35Y	6
35Y-CM $\Delta$ <i>roxA-attB</i> (SN3727)	Chromosomal deletion of <i>roxA</i> , <i>attB</i> at former <i>roxA</i> site, no clearing zone formation on latex agar	This study
35Y-CM $\Delta$ <i>roxA-attB</i> /pNH1- <i>roxA-attP</i> (in chromosome) (SN4230)	Expression of <i>RoxA</i> from rhamnose promoter; Km <sup>r</sup> Cm <sup>r</sup> ; clearing zone formation in the presence of rhamnose	This study
35Y-CM $\Delta$ <i>roxA-attB</i> /pNH1- <i>roxA-F317A-attP</i> (in chromosome) (SN4784)	Expression of <i>RoxA-F317A</i> from rhamnose promoter; Km <sup>r</sup> Cm <sup>r</sup>	This study
35Y-CM $\Delta$ <i>roxA-attB</i> /pNH1- <i>roxA-F317H-attP</i> (in chromosome) (SN4785)	Expression of <i>RoxA-F317H</i> from rhamnose promoter; Km <sup>r</sup> Cm <sup>r</sup>	This study
35Y-CM $\Delta$ <i>roxA-attB</i> /pNH1- <i>roxA-F317L-attP</i> (in chromosome) (SN4786)	Expression of <i>RoxA-F317L</i> from rhamnose promoter; Km <sup>r</sup> Cm <sup>r</sup>	This study
35Y-CM $\Delta$ <i>roxA-attB</i> /pNH1- <i>roxA-F317W-attP</i> (in chromosome) (SN4787)	Expression of <i>RoxA-F317W</i> from rhamnose promoter; Km <sup>r</sup> Cm <sup>r</sup>	This study
35Y-CM $\Delta$ <i>roxA-attB</i> /pNH1- <i>roxA-F317Y-attP</i> (in chromosome) (SN4788)	Expression of <i>RoxA-F317Y</i> from rhamnose promoter; Km <sup>r</sup> Cm <sup>r</sup>	This study
<b>Plasmids</b>		
pIC20HE	Cloning vector	1
pSI17	Source of <i>PhiC31</i> integrase gene	20
pUC9: <i>roxA</i> -region	Source of <i>roxA</i> ; Ap <sup>r</sup>	6
pUC9: <i>roxA</i> -region- $\Delta$ <i>roxA</i>	Precise deletion of <i>roxA</i> coding sequence	This study
pUC9: <i>roxA</i> -region- $\Delta$ <i>roxA-attB</i>	<i>PhiC31 attB</i> site at position of former <i>roxA</i> gene	This study
pLO3	<i>sacB</i> -containing suicide vector; Tc <sup>r</sup>	13
pLO3-Km	pLO3 with 1,108-bp <i>aphII</i> fragment of pBBR1MCS-2 in <i>SmaI</i> site; Tc <sup>r</sup> Km <sup>r</sup>	This study
pLO3-Km- <i>roxA</i> -region	pLO3 with 3,603-bp <i>SacI</i> fragment including <i>roxA</i> gene	This study
pLO3-Km- <i>roxA</i> -region- $\Delta$ <i>roxA</i>	Precise deletion of <i>roxA</i> coding sequence	This study
pLO3-Km- <i>roxA</i> -region- $\Delta$ <i>roxA-attB</i>	Precise deletion of <i>roxA</i> coding sequence with <i>attB</i> at former <i>roxA</i> sequence	This study
pJOE6787.1	pBR322 ori <i>aphII</i> (Km <sup>r</sup> ) <i>mob int</i> ( <i>PhiC31</i> integrase) <i>attP</i>	J. Altenbuchner
pNH1	pJOE6787.1 with rhamnose regulation genes of p4782.1	This study
pNH1- <i>roxA</i>	Coding sequence of <i>roxA</i> under rhamnose promoter control	This study
pNH1- <i>roxA-attP</i> (SN4230)	Coding sequence of <i>roxA</i> under rhamnose promoter control, with <i>attP</i> site	This study
pNH1- <i>roxA-attP</i> F317A (SN4784)	<i>RoxA-F317A</i> expression vector with <i>attP</i> site; Km <sup>r</sup>	This study
pNH1- <i>roxA-attP</i> F317H (SN4785)	<i>RoxA-F317H</i> expression vector with <i>attP</i> site; Km <sup>r</sup>	This study
pNH1- <i>roxA-attP</i> F317L (SN4786)	<i>RoxA-F317L</i> expression vector with <i>attP</i> site; Km <sup>r</sup>	This study
pNH1- <i>roxA-attP</i> F317W (SN4787)	<i>RoxA-F317W</i> expression vector with <i>attP</i> site; Km <sup>r</sup>	This study
pNH1- <i>roxA-attP</i> F317Y (SN4788)	<i>RoxA-F317Y</i> expression vector with <i>attP</i> site; Km <sup>r</sup>	This study
<b>Primers</b>		
s6549	CACGTGATGAGTAAACTTGGTCTGACAGT	
s6550	CCCCGTAGAAAAGATCAAAGGAT	
s6551	GGGAATATTTGCAACCCAGAGTCC	
s6552	GGGCACGTGCAAGCGCAAAGAGAAAGC	
s6553	ATCATTAAATCAACCCTCAGCGGATGCC	
s6554	ATCATTAAATCCCGTCTCAGCGCCTAACAGG	
s6555	GGGACGTCCATCGTCCACATATCCAG	
s6556	GGGACGTCCCTTGTCCAGATAGCCC	
1fw	ACCGCTCGAGTGCCACCTGGGATGAATGTC	
1rev	TCCGCTCGAGCGCTTGGTCCGTCATTTG	
2fw	GCTCTAGAGCTAGGGTTGGCTTACGCCCGTAATCGAT	
2rev	GCTCTAGAGCGATTCCCCTGTACGTCCCAACGAATGAGT	
3fw	GTACAGGGGAATCGCTCTAGAGTGCCAGGGCGTGCCTTGGGCTCCCCG	
3rev	CGCGGCGTGAAGCCAACCTAGCCCGCCCGGGAGCCCAAGGGCACGGC	
4fw	CGGGTACCTTCAGGTTTCATCATGCGGTTTGTG	
4rev	TTCCGAGCTCCTCCAGGGGAGAGCCTGAGC	
5fw	TCTCTGCAAACTGCTTTTAC	
5rev	GCGAATCTGAACATCTCATCC	

was conjugatively transferred from *Escherichia coli* S17-1 to *Xanthomonas* sp. CM  $\Delta$ roxA by spot mating on NB agar. Transconjugants were selected and purified on NB agar supplemented with 30  $\mu$ g/ml kanamycin and 10  $\mu$ g/ml chloramphenicol. Expression of PhiC31 integrase from pNH1-*roxA-attP* ensured instantaneous integration of the plasmid into the chromosome at the former position of the chromosomal *roxA* locus via the *attB/attP* sites (21, 25). Correct integration of the *roxA* variant was verified via PCR and DNA sequencing. The recombinant *Xanthomonas* sp. strains express the *roxA* variants only in the presence of rhamnose.

**Purification of recombinant RoxA.** RoxA was purified at room temperature by use of an Akta fast-performance liquid chromatography (FPLC) system (GE Healthcare, Uppsala, Sweden), using a modified protocol (18). In brief, cell-free concentrated (10-kDa cutoff) supernatant of a *Xanthomonas* sp. culture was passed through a Q-Sepharose Fast Flow column (Q-FF 50/11) pre-equilibrated with 20 mM Tris-HCl (pH 8.5) at a flow rate of 3 ml/min. RoxA was bound to the column and eluted in a step gradient at  $\approx$ 50 mM NaCl. RoxA-containing fractions were combined and concentrated via ultrafiltration. An additional purification step was performed on a hydroxyapatite column. The column (CHT5-1) was equilibrated with potassium phosphate buffer (10 mM; pH 6.8) and was used after changing the buffer of the RoxA pool to 10 mM potassium phosphate, pH 6.8, by gel filtration on a HiPrep 26/10 column. RoxA was eluted with a linear gradient of 10 to 200 mM potassium phosphate, pH 6.8, at  $\approx$ 40 mM. RoxA fractions were pooled and concentrated via ultrafiltration (30-kDa cutoff) to approximately 5 mg/ml with the addition of 300 mM NaCl on ice. High ionic strength prevented precipitation of RoxA at high protein concentrations. Purity was tested by SDS-PAGE and by determination of the quotient of absorption (optical densities [ODs]) at 406 nm and 280 nm, which was 1.35 for pure RoxA. Purified RoxA was frozen and stored in liquid nitrogen.

**Assay of RoxA.** The following conditions were used for product analysis of RoxA-catalyzed polyisoprene cleavage by high-pressure liquid chromatography (HPLC) analysis. The reaction mixture contained 100  $\mu$ l purified RoxA (2 to 20  $\mu$ g/ml), rubber latex (0.2% [wt/vol] emulsion), and potassium phosphate buffer (100 mM; pH 7.0) in a total volume of 1 ml. The reaction was carried out at 37°C for 3 h in a 15-ml Falcon tube. The mixture was extracted with ethyl acetate, dried, dissolved in 100  $\mu$ l methanol, and then subjected to HPLC analysis. An RP8 HPLC column (12  $\times$  4 mm, 5- $\mu$ m particle size) was operated at 0.7 ml/min with water (A) and methanol (B) as the mobile phase. The concentration of B was increased from 50% (vol/vol) to 100% (vol/vol) over 20 min. Products were detected at 210 nm, and ODTD eluted after 15.3 min. Purified ODTD (4) was used as a standard. Mixtures without RoxA or with heat-inactivated RoxA (10 min at 95°C) served as controls.

**Semiquantitative clearing zone assay for RoxA activity determination.** Recombinant *Xanthomonas* sp.  $\Delta$ roxA::attB strains harboring chromosomally anchored *roxA* variants under rhamnose control (Table 1) were grown in modified LB liquid culture. Five microliters of the respective culture was spotted onto a mineral salts agar plate with an opaque overlay agar ( $\approx$ 8 ml) of polyisoprene latex (0.25% [wt/vol] in agar) after purification (via 3 washes in 0.1% [wt/vol] Nonidet P-40) (kindly provided by Weber and Schaer, Hamburg, Germany). A *Xanthomonas* sp.  $\Delta$ roxA::attB strain harboring chromosomally anchored wild-type *roxA* under rhamnose control served as a positive control. The plates were incubated at 30°C for 6 to 7 days. The intensity of clearing zone formation semiquantitatively indicated RoxA activity produced by the strain.

**Heme staining and protein determination.** Heme staining was performed after separation of RoxA samples by nonreducing SDS-PAGE and subsequent assay for pseudoperoxidase activity of the RoxA heme groups as described recently (18). Protein concentration was determined by the Bradford method (5). Purified RoxA samples were determined by using the molar extinction coefficients of RoxA at 280 nm ( $\epsilon_{280} = 1.53 \times 10^5$  M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>) and 406 nm ( $\epsilon_{406} = 1.8 \times 10^5$  M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>).

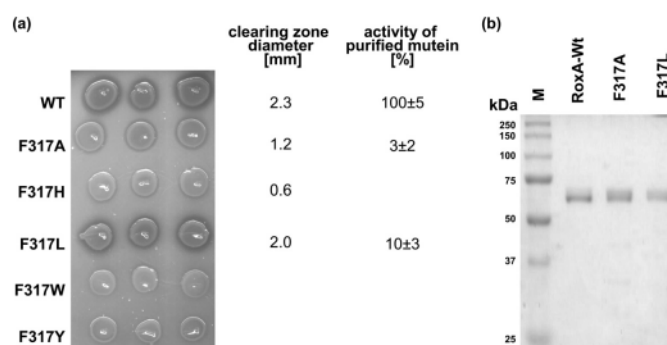
## RESULTS AND DISCUSSION

**Construction of a *Xanthomonas* sp. strain for stable expression of recombinant RoxA.** Expression in *E. coli* of *c*-type cytochromes with MauG motifs, such as RoxA and MauG, has not been possible (6, 24). Apparently, RoxA (and MauG) holoenzymes are assembled by cytochrome *c* maturation systems that are different from that of *E. coli*. We therefore decided to express *roxA* in a homologous *Xanthomonas* sp. host. Recently, we showed that cloned *roxA* can be expressed in the homologous wild-type host *Xanthomonas* sp. (6). However, it turned out in this study that homologue expression did not occur from the introduced plasmid, as expected, but required integration of *roxA* into the chromosome. Chromosomal integration of the *roxA*-containing plasmid took long periods depending on clone length (weeks to months, with repeated transfers on solid or liquid medium) and could not be accelerated by increasing the size of cloned *Xanthomonas* DNA up- and downstream of *roxA*. Moreover, recombinant *roxA* with introduced site-specific mutations could recombine with the chromosomal wild-type copy of *roxA* in *Xanthomonas* sp., which sometimes resulted in elimination of the introduced mutation (data not shown). To avoid these disadvantages and to gain more rapid and reproducible integration of *roxA* into the chromosome, we deleted the chromosomal *roxA* locus and replaced it with the *attB* site of phage PhiC31 as described in Materials and Methods. The resulting *Xanthomonas* sp.  $\Delta$ roxA::attB strain contained the *attB* site at the position of the former *roxA* gene, was sensitive to kanamycin and resistant to sucrose, and did not produce clearing zones on opaque latex agar. This result confirmed that functional homologue genes that can compensate for the absence of *roxA* are not present in *Xanthomonas* sp. A constructed plasmid (pNH1-*roxA-attP*) harboring the PhiC31 integrase gene (14, 15) plus the *attP* site, together with a *roxA* copy under the control of a rhamnose-dependent promoter, was introduced into the *Xanthomonas* sp.  $\Delta$ roxA::attB mutant via conjugation. Both *attP* and *attB* sites represent short stretches of DNA, each having a different (imperfect) palindrome sequence and a central common TTG sequence at which recombination between both DNA strands by PhiC31 integrase occurs (21). The integration of the complete *roxA*-containing plasmid at the previous *roxA* site (now the *attB* site) was confirmed by PCR and by DNA sequencing of the *roxA* locus. Recombinant RoxA was reproducibly expressed in the presence of rhamnose by the transconjugant *Xanthomonas* strain but was not detectable on latex medium or any other medium in the absence of rhamnose. In conclusion, a reliable system for expression of recombinant RoxA variants in a homologous *Xanthomonas* sp.  $\Delta$ roxA::attB host strain was now available and allowed the performance of structure-function analysis of RoxA. This expression system was superior to our previous system (6), which required repeated cultivation passages and waiting for rarely occurring recombination events.

**Construction and expression of RoxA muteins.** The three-dimensional structure of RoxA showed that the two hemes are arranged perpendicular to each other, similar to the case in bacterial CCPs (Fig. 1a). The C-terminal heme center of RoxA has two axial His ligands (His394 and His641), while the N-terminal heme has only one axial amino acid ligand (His195). The sixth coordination site is not occupied by an amino acid ligand. This finding suggested that this position could be accessible to external ligands or substrates. The amino acid residue next to the free coordination



Birke et al.



**FIG 2** (a) Clearing zone formation of recombinant *Xanthomonas* sp. strains and activities of purified Phe317Leu and Phe317Ala muteins. Five-microliter aliquots of concentrated cell suspensions of *Xanthomonas* sp.  $\Delta$ roxA strains harboring and expressing different RoxA muteins were spotted in triplicate on opaque latex overlay agar with 1-rhamnose and then incubated for 6 days at 30°C. Clearing zone formation semiquantitatively indicates the activity of expressed RoxA muteins. The clearing zone diameters (averages for 3 biological replicates minus diameter of colony) are given in mm. The ODTD-forming activities of purified RoxA muteins are provided on the right for purified WT-RoxA (100%) and the Phe317Leu and Phe317Ala muteins. (b) Purification of recombinant muteins. WT-RoxA and the Phe317Ala and Phe317Leu muteins were purified as described in the text, separated by reducing SDS-PAGE, and stained with Coomassie blue.

site of the N-terminal heme is Phe317 and is located  $\approx 5$  Å from and sloped opposite to the Fe ion (Fig. 1b). We hypothesized that the Fe center of this heme could represent the active site of the enzyme and that Phe317 is involved in interaction with substrate molecules. To find experimental support for this assumption, we replaced Phe317 by tyrosine, tryptophan, leucine, histidine, or alanine via site-directed mutagenesis of the *roxA* gene. All five *roxA* variants were separately integrated into the chromosome of the *roxA* deletion strain of *Xanthomonas* sp. via PhiC31 integrase-mediated *attP/attB* recombination. To test for the effects of the mutations, the *Xanthomonas* sp.  $\Delta$ roxA strains harboring the wild-type *roxA* gene or one of the five mutant *roxA* variant genes were grown on solid latex overlay agar that had been supplemented with 0.1% rhamnose. The Phe317Leu mutant produced clearing zones that appeared later than those of the wild type and had a slightly smaller diameter (2.0 mm, compared to 2.3 mm for the wild type) (Fig. 2a), indicating that the replacement of the aromatic ring by an aliphatic residue of similar size had an effect on RoxA activity. However, the clearing zone of the Phe317Ala mutant was even more reduced (1.2 mm), and the Phe317His mutant formed only a hardly visible clearing zone near the detection limit (0.6 mm). No clearing zones were detected around colonies of the other two mutants (Phe317Trp and Phe317Tyr). In summary, changing the side chain of residue 317 resulted in stronger or weaker effects on RoxA activity. The replacement of phenylalanine by leucine had the weakest effect on activity. This was not surprising, since leucine has the same hydrophobic character as phenylalanine and occupies a similar space. Since RoxA with the Phe317Tyr mutation (or with Phe317His or Phe317Trp) was inactive, the presence of a hydrophilic functional group in the ring structure of tyrosine or of a bulky group apparently prevents activity.

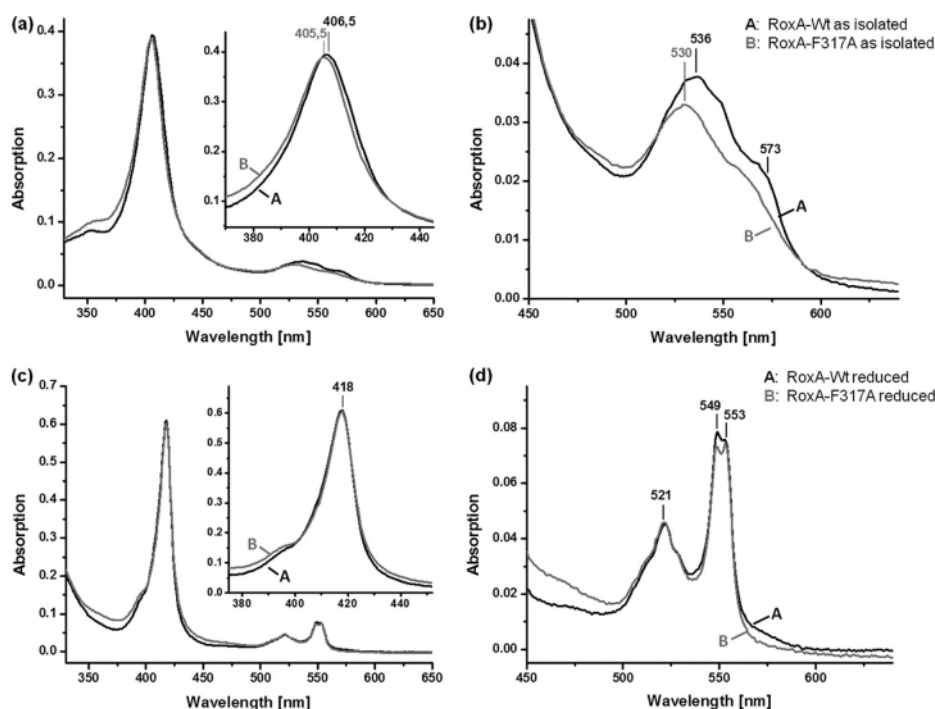
These results confirmed our assumption that the side chain of residue 317 is important for RoxA activity. SDS-PAGE analysis of culture supernatants obtained from the respective strains after growth in the presence of rhamnose revealed RoxA bands for all strains (data not shown). Moreover, bands of comparable intensity were obtained after staining the gels for pseudoperoxidase

activity (“heme staining”) and indicated that heme was stably incorporated in all RoxA variants (not shown). These results suggest that the observed differences in clearing zone formation resulted from different activities of the RoxA muteins, not from different degrees of expression.

**RoxA activity and biochemical properties of Phe317Ala and Phe317Leu muteins.** To analyze the effect of the mutations more precisely, both RoxA muteins with reduced activity (Phe317Ala and Phe317Leu muteins) were purified as described in Materials and Methods. About 4 or 7 mg of purified RoxA mutein was obtained for each variant, with  $OD_{280}/OD_{406}$  ratios of 1.13 (Phe317Ala) and 1.36 (Phe317Leu). This indicated a sufficient degree of purity of both RoxA muteins (>90% purity) that was confirmed by SDS-PAGE (Fig. 2b). No differences in the binding properties of RoxA muteins on Q-Sepharose or hydroxyapatite in comparison to wild-type RoxA were noticed during protein purification.

When purified Phe317Ala and Phe317Leu RoxA muteins were subjected to a quantitative polyisoprene cleavage assay, ODTD-forming activity was reduced to  $3\% \pm 2\%$  and  $10\% \pm 3\%$  residual activity, respectively, compared with that for purified wild-type RoxA. These values are in agreement with the reduced clearing zone diameters of the respective *Xanthomonas* sp. strains shown in Fig. 2a and confirmed that a residue with hydrophobic character at position 317 is important for RoxA activity. Significant amounts of products other than ODTD were not detected by HPLC analysis (not shown). Other biochemical properties, such as the temperature optimum (40°C) or pH optimum (pH 7), were also not changed detectably compared to wild-type properties. These results suggested that the mutations negatively influenced the reaction of the active center with substrate molecules but not the general properties of the enzyme.

In our previous study, we showed that wild-type RoxA specifically responded to reducing agents and to the presence of low-molecular-weight inhibitory compounds such as imidazole and pyridine (18). Since residue 317 is the closest amino acid to the free coordination site of the N-terminal heme center, and since the chemical environment of heme is reflected by its spectroscopic



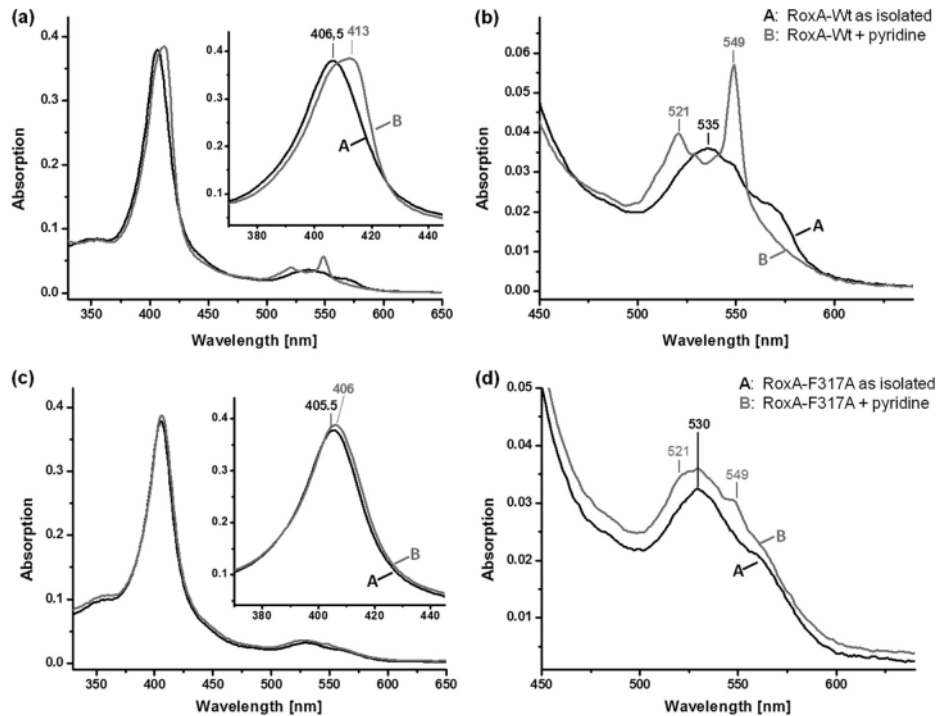
**FIG 3** UV-vis spectra of WT-RoxA and RoxA-F317A. (a and b) Spectra of recombinant WT-RoxA and RoxA-Phe317Ala, as isolated (2  $\mu$ M). The Soret-band region is enlarged in the inset of panel a; panel b shows the Q-band region from panel a. The Phe317Ala mutein had a 1-nm blue-shifted Soret maximum and less pronounced Q bands, with a blue-shifted maximum at 530 nm. (c and d) Spectra of recombinant WT-RoxA and RoxA-Phe317Ala, both reduced with  $\text{Na}^+$ -dithionite under an  $\text{N}_2$  gas atmosphere. In panel c, the Soret-band region is enlarged in the inset; panel d shows the Q-band region from panel c. WT-RoxA and the Phe317Ala mutein both had a Soret band at 418 nm and exhibited only minor differences in intensity for the  $\alpha$ -bands, which were of almost equal intensities. The 549-nm  $\alpha$ -band appears to be slightly more intense than the 553-nm band in the WT spectrum and appears to be less intense in the Phe317Ala spectrum.

properties, UV-visible (UV-vis) spectroscopy was performed with both muteins (Phe317Ala and Phe317Leu). The UV-vis spectra of both muteins, as isolated, showed typical *c*-type cytochrome spectra in an oxidized state (shown for Phe317Ala RoxA in Fig. 3). The Soret and Q bands were shifted by  $\approx 1$  nm, to a shorter wavelength (405 to 406 nm for the Phe317Ala RoxA mutein compared to 406 to 407 nm for WT-RoxA), and by 5 to 6 nm (530 nm for the Phe317Ala RoxA mutein compared to 535 to 536 nm for WT-RoxA), respectively (Fig. 3a). When the UV-vis spectrum of the chemically (dithionite) reduced Phe317Ala mutein was determined, the Soret band was shifted to 418 nm and two separated  $\alpha$ -bands, with maxima at 549 nm and 553 nm, appeared that were very similar to those of wild-type RoxA, but with a slightly decreased intensity of the 549-nm  $\alpha$ -band (Fig. 3b). Reoxidation of chemically reduced Phe317Ala RoxA by dioxygen resulted in a disappearance of the  $\alpha$ -bands, as also found for wild-type RoxA (not shown). Thus, the spectral UV-vis properties of the Phe317Ala RoxA mutein, as isolated and in a reduced state, were similar but showed some differences from those of wild-type RoxA, as may be expected from an exchange of an amino acid that influences the electronic transitions of a porphyrin system. When the Phe317Leu mutein was analyzed by UV-vis spectroscopy, very

similar results to those described for the Phe317Ala mutein were found (not shown).

**Low-molecular-weight heme ligands have different effects on WT-RoxA and on Phe317 muteins.** The results of UV-vis spectroscopy of RoxA muteins shown above suggest some differences in the biophysical properties and/or electronic environment of the N-terminal heme center of RoxA muteins compared to WT-RoxA. Reaction of WT-RoxA with imidazole, pyridine, or other related heterocyclic compounds with free electron pairs at the hetero atom resulted in a notable strong increase of the 549-nm  $\alpha$ -band, even in the presence of dioxygen, and in almost complete inhibition of polyisoprene cleavage activity (Fig. 4a). Imidazole (in the form of histidine) is a typical axial heme ligand in many heme proteins. The effects of imidazole and related heterocyclic compounds mimicked the UV-vis effects of a partial reduction of the N-terminal heme center (increase of  $\alpha$ -bands as in the presence of chemical reductants). In contrast to complete reduction (e.g., by dithionite), no increase of absorption of the other  $\alpha$ -band at 553 nm appeared, confirming that the C-terminal bis-His-coordinated heme was not affected. We assume that low-molecular-weight heterocyclic compounds such as imidazole and pyridine have access to the free sixth coordination sphere of the

Birke et al.



**FIG 4** UV-vis spectra of WT-RoxA and RoxA-F317A with heme ligands. (a and b) Spectra of recombinant WT-RoxA, as isolated (2  $\mu$ M) and after addition of pyridine (5 mM; 1 h at room temperature), at the endpoint of the reaction. The Soret-band region is enlarged in the inset of panel a; panel b shows the Q-band region from panel a. WT-RoxA rapidly reacted with pyridine to give characteristic spectral changes as formerly reported (18), in accordance with a partial reduction of one heme center. (c and d) Spectra of recombinant RoxA-Phe317Ala, as isolated (2  $\mu$ M) and after addition of pyridine (5 mM; 1 h at room temperature). In panel c, the Soret-band region is enlarged in the inset; panel d shows the Q-band region from panel c. Only minor changes appeared in the presence of pyridine and did not proceed through a prolonged incubation time. Similar weak effects on the UV-vis spectrum of RoxA-Phe317Ala were obtained by addition of other external heme ligands, such as imidazole (not shown). The characteristic changes in the WT-RoxA spectrum caused by imidazole have been reported previously (see Fig. 3a of reference 18).

N-terminal heme (active site), thereby leading to a competitive inhibition of polyisoprene cleavage activity of RoxA.

Remarkably, and in contrast to the case for WT-RoxA, only minor effects on UV-vis spectra were observed when the Phe317Ala and Phe317Leu RoxA mutants were incubated with 1 mM imidazole or pyridine (Fig. 4b), results shown only for the Phe317Ala mutant. Only a very little broadening or shift of the Soret band and a marginal increase in the 549-nm  $\alpha$ -band occurred upon incubation with imidazole or pyridine. The possibility that binding of imidazole or pyridine does not occur in the Phe317Ala and Phe317Leu mutants is unlikely, because the exchange of Phe against Ala (or leucine, to a minor extent) provides even more space around the sixth coordination sphere of heme. Binding of imidazole or pyridine to the active site of Phe317Ala and Phe317Leu mutants is additionally supported by the finding that both compounds minimized the rest activity of the Phe317Ala ( $\approx$ 3%) and Phe317Leu (10%) mutants to a hardly detectable level ( $<$ 0.5%). Presumably, the distribution of  $\pi$  electron density along the Fe-N-ligand bond was affected in the RoxA mutants. These results indicate that the mutations either nega-

tively influenced access to the active center of the two RoxA mutants for substrates and inhibitors or influenced an overlapping the iron and the N-ligand that might be responsible for the intense 549-nm  $\alpha$ -band in WT-RoxA in the presence of certain ligands. Both possibilities are in agreement with the conclusion that Phe317 is important for interaction of the enzyme with substrates, e.g., Phe317 is important for correct positioning of substrate molecules at the active site. Spectroscopic experiments with the true substrate (polyisoprene) are not possible because polyisoprene latex is opaque and absorbs light. The observation that a smaller residue at position 317 partially inhibits the enzyme might also be explained by the assumption that the substrate molecules have more degrees of freedom to bind and to orientate themselves in the active site in Phe317Ala RoxA and are not forced to bind in the correct position for latex cleavage or, in the case of external heme ligands, in their geometric position in WT-RoxA.

In summary, we have succeeded in providing all the tools necessary to study the enzymatic cleavage mechanism of polyisoprene systematically at the molecular level: (i) the 3-dimensional structure of RoxA can be investigated *in silico* and used for prediction of

effects of structural changes by mutagenesis of RoxA, (ii) the *roxA* gene can be manipulated in *E. coli*, (iii) the *roxA* gene can be expressed in and purified from recombinant *Xanthomonas* sp. strains after integration into the chromosome, and (iv) the effects of manipulations on activity and structure can be studied by biochemical and biophysical methods. Here, for the first time, we identified an amino acid that is essential for polyisoprene cleavage activity and is part of the active site of RoxA.

#### ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by a grant from the Deutsche Forschungsgemeinschaft to D.J.

We thank the Weber and Schaer company for proving polyisoprene. The input of O. Einsle (University of Freiburg) and P. Kroneck (University of Konstanz) during discussions of RoxA function is gratefully acknowledged.

#### REFERENCES

1. Altenbuchner J, Viell P, Pelletier I. 1992. Positive selection vectors based on palindromic DNA sequences. *Methods Enzymol.* 216:457–466.
2. Bode HB, Kerkhoff K, Jendrossek D. 2001. Bacterial degradation of natural and synthetic rubber. *Biomacromolecules* 2:295–303.
3. Braaz R, Armbruster W, Jendrossek D. 2005. Heme-dependent rubber oxygenase RoxA of *Xanthomonas* sp. cleaves the carbon backbone of poly(*cis*-1,4-isoprene) by a dioxygenase mechanism. *Appl. Environ. Microbiol.* 71:2473–2478.
4. Braaz R, Fischer P, Jendrossek D. 2004. Novel type of heme-dependent oxygenase catalyzes oxidative cleavage of rubber (poly-*cis*-1,4-isoprene). *Appl. Environ. Microbiol.* 70:7388–7395.
5. Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72:248–254.
6. Hamsch N, Schmitt G, Jendrossek D. 2010. Development of a homologous expression system for rubber oxygenase RoxA from *Xanthomonas* sp. *J. Appl. Microbiol.* 109:1067–1075.
7. Hoffmann M, Braaz R, Jendrossek D, Einsle O. 2008. Crystallization of the extracellular rubber oxygenase RoxA from *Xanthomonas* sp. strain 35Y. *Acta Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun.* 64:123–125.
8. Ibrahim EMA, Arenskotter M, Luftmann H, Steinbüchel A. 2006. Identification of poly(*cis*-1,4-isoprene) degradation intermediates during growth of moderately thermophilic actinomycetes on rubber and cloning of a functional *lcp* homologue from *Nocardia farcinica* strain E1. *Appl. Environ. Microbiol.* 72:3375–3382.
9. Imai S, et al. 2011. Isolation and characterization of *Streptomyces*, *Actinoplanes*, and *Methylobium* strains that are involved in degradation of natural rubber and synthetic poly(*cis*-1,4-isoprene). *Enzyme Microb. Technol.* 49:526–531.
10. Jendrossek D, Tomasi G, Kroppenstedt RM. 1997. Bacterial degradation of natural rubber: a privilege of actinomycetes? *FEMS Microbiol. Lett.* 150:179–188.
11. Jendrossek D, Reinhardt S. 2003. Sequence analysis of a gene product synthesized by *Xanthomonas* sp. during growth on natural rubber latex. *FEMS Microbiol. Lett.* 224:61–65.
12. Kovach ME, et al. 1995. Four new derivatives of the broad-host-range cloning vector pBBR1MCS, carrying different antibiotic-resistance cassettes. *Gene* 166:175–176.
13. Lenz O, Friedrich B. 1998. A novel multicomponent regulatory system mediates H<sub>2</sub> sensing in *Alcaligenes eutrophus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95:12474–12479.
14. Lomovskaia ND, Mkrtumian NM, Gostimskaya NL. 1970. Isolation and characterization of the actinophage of *Streptomyces coelicolor*. *Genetica* 6:135.
15. Lomovskaya ND, Mkrtumian NM, Gostimskaya NL, Danilenko VN. 1972. Characterization of temperate actinophage phi C31 isolated from *Streptomyces coelicolor* A3(2). *J. Virol.* 9:258–262.
16. Rose K, Steinbüchel A. 2005. Biodegradation of natural rubber and related compounds: recent insights into a hardly understood catabolic capability of microorganisms. *Appl. Environ. Microbiol.* 71:2803–2812.
17. Rose K, Tenberge KB, Steinbüchel A. 2005. Identification and characterization of genes from *Streptomyces* sp. strain K30 responsible for clear zone formation on natural rubber latex and poly(*cis*-1,4-isoprene) rubber degradation. *Biomacromolecules* 6:180–188.
18. Schmitt G, Seiffert G, Kroneck PMH, Braaz R, Jendrossek D. 2010. Spectroscopic properties of rubber oxygenase RoxA from *Xanthomonas* sp., a new type of dihaem dioxygenase. *Microbiology* 156:2537–2548.
19. Simon R, Priefer U, Pühler A. 1983. A broad host-range mobilization system for in vivo genetic engineering: transposon mutagenesis in Gram-negative bacteria. *Nat. Biotechnol.* 1:784–791.
20. Sladkova IA, Orekhov AV. 1994. Actinomycete plasmid and integrative vectors based on DNA of the temperate phi C31 actinophage, determining limitation of lytic development of phage phi C31, not dependent on repressor. *Antibiot. Khimioter.* 39:3–11.
21. Thorpe HM, Smith MC. 1998. In vitro site-specific integration of bacteriophage DNA catalyzed by a recombinase of the resolvase/invertase family. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95:5505–5510.
22. Tsuchii A, Suzuki T, Takeda K. 1985. Microbial degradation of natural rubber vulcanizates. *Appl. Environ. Microbiol.* 50:965–970.
23. Tsuchii A, Takeda K. 1990. Rubber-degrading enzyme from a bacterial culture. *Appl. Environ. Microbiol.* 56:269–274.
24. Wang Y, et al. 2003. MauG, a novel diheme protein required for tryptophan tryptophylquinone biogenesis. *Biochemistry* 42:7318–7325.
25. Watanabe S, Nakamura S, Sakurai T, Akasaka K, Sato M. 2011. Improvement of a phiC31 integrase-based gene delivery system that confers high and continuous transgene expression. *Nat. Biotechnol.* 28:312–319.
26. Yikmis M, Steinbüchel A. 2012. Historical and recent achievements in the field of microbial degradation of natural and synthetic rubber. *Appl. Environ. Microbiol.* 78:4543–4551.



## Functional Identification of Rubber Oxygenase (RoxA) in Soil and Marine Myxobacteria

Jakob Birke, Wolf Röther, Georg Schmitt,\* Dieter Jendrossek

Institut für Mikrobiologie, Universität Stuttgart, Stuttgart, Germany

The rubber oxygenase (RoxA) of *Xanthomonas* sp. strain 35Y (RoxA<sub>Xsp</sub>) is so far the only known extracellular *c*-type diheme cytochrome that is able to cleave poly(*cis*-1,4-isoprene). All other rubber-degrading bacteria described are Gram positive and employ a nonheme protein (latex-clearing protein [Lcp]) for the postulated primary attack of polyisoprene. Here, we identified RoxA orthologs in the genomes of *Haliangium ochraceum*, *Myxococcus fulvus*, *Corallococcus coralloides*, and *Chondromyces apiculatus*. The *roxA* orthologs of *H. ochraceum* (RoxA<sub>Hoc</sub>), *C. coralloides* BO35 (RoxA<sub>Cco</sub>), and *M. fulvus* (RoxA<sub>Mfu</sub>) were functionally expressed in a  $\Delta$ *roxA* *Xanthomonas* sp. 35Y background. All RoxA orthologs oxidatively cleaved polyisoprene, as revealed by restoration of clearing-zone formation and detection of 12-oxo-4,8-dimethyltrideca-4,8-diene-1-al (ODTD) as a cleavage product. RoxA<sub>Xsp</sub>, RoxA<sub>Mfu</sub>, and RoxA<sub>Cco</sub> were purified and biochemically characterized. The optimal temperature of RoxA<sub>Cco</sub> and RoxA<sub>Mfu</sub> was between 22 and 30°C. All RoxA orthologs as isolated showed an oxidized UV-visible spectrum. Chemical reduction of RoxA<sub>Cco</sub> and RoxA<sub>Mfu</sub> indicated the presence of two slightly different heme centers with absorption maxima between 549 and 553 nm, similar to RoxA<sub>Xsp</sub>. Sequence analysis and modeling of the three-dimensional structures of the RoxA orthologs revealed a high degree of similarity to the recently solved RoxA<sub>Xsp</sub> structure and included several conserved residues, notably, W<sub>302</sub>, F<sub>317</sub>, and a MauG motif at about H<sub>517</sub>. Lcp-like sequences were not detected in the genomes of the *Xanthomonas* sp. 35Y, *H. ochraceum*, *M. fulvus*, and *C. coralloides*. No RoxA orthologs were found in Gram-positive bacteria, and this first description of functional RoxA in Gram-negative bacteria other than *Xanthomonas* proves that RoxA is more common among rubber degraders than was previously assumed.

Natural rubber [NR; poly(*cis*-1,4-isoprene)] is a hydrocarbon polymer that has been produced by cultivating the rubber tree (*Hevea brasiliensis*) on a large scale for over 150 years. Innumerable products based on NR are known in industry and households, but the majority of the NR produced goes into the production of tires. Abrasion from tires generates a constant supply of small rubber particles that go into roadside ditches. The fact that no enrichment of rubber particles in the environment has been observed already indicates that rubber is effectively degraded in the environment. However, the fate of rubber materials in soil and the biochemical mechanism of its biodegradation are poorly understood.

Due to the high stability of carbon-carbon bonds, biodegradation of NR is a slow process compared to biodegradation of other biopolymers, such as proteins or polysaccharides, in which the polymer backbone contains heteroatoms, such as nitrogen and/or oxygen. Heteroatoms are absent in polyisoprene, apart from sulfur atoms in vulcanized rubber. The double bonds in polyisoprene are the only functional groups in NR that allow an attack by oxidizing enzymes. In fact, rubber-degrading organisms are widespread in nature (1, 2). Some rubber-degrading bacteria, such as *Xanthomonas* sp. strain 35Y (3) and many actinomycetes, produce clearing zones on opaque latex agar, while others grow adhesively on rubber without clearing zone formation. *Gordonia polyisoprenivorans* and *Gordonia westfalica* belong to the latter group (see reference 4 and references cited therein).

Rubber oxygenase A (RoxA) and latex-clearing protein (Lcp) represent two types of enzymes that share no detectable amino acid similarities but which both catalyze the primary attack of NR and cleave the hydrocarbon polymer to low-molecular-weight degradation products. Lcp was first described in *Streptomyces* sp. strain K30 and is widely distributed in rubber-degrading bacteria

(5, 6), including clearing zone formers (e.g., streptomycetes) and in adhesively growing species, such as *G. polyisoprenivorans* (7). Lcp is apparently secreted via a TAT-dependent pathway (8). No cofactors are known for Lcp, and the biochemical mechanism by which Lcp catalyzes the cleavage of polyisoprene is unknown. RoxA consists of 678 amino acids and is a *c*-type cytochrome that features two binding sites for covalent attachment of heme as well as a MauG motif (9). In contrast, the Lcp amino acid sequence (397 amino acids) does not indicate the presence of metals. Both Lcp and RoxA are responsible for the cleavage of rubber to low-molecular-weight degradation products with aldehyde and keto end groups and therefore apparently catalyze a similar or even the same reaction. RoxA has been purified and studied *in vitro* (10–12). Isolated RoxA is active in aqueous environments if the enzyme substrates, rubber and dioxygen, are present and the physical conditions (pH, temperature) are appropriate. Notably, no separate cofactors are required for activity. 12-Oxo-4,8-dimethyltrideca-4,8-diene-1-al (ODTD) was identified to be the major degradation product, and a dioxygenase cleavage mechanism was shown (13).

Received 3 July 2013 Accepted 5 August 2013

Published ahead of print 9 August 2013

Address correspondence to Dieter Jendrossek, dieter.jendrossek@imb.uni-stuttgart.de.

\* Present address: Georg Schmitt, University Marburg, Laboratorium für Mikrobiologie, Philipps-Universität Marburg, Marburg, Germany.

J.B. and W.R. share first authorship.

Copyright © 2013, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

doi:10.1128/AEM.02194-13

Birke et al.

TABLE 1 Strains, plasmids, and primers used in this study

Strain, plasmid, or oligonucleotide	Relevant characteristic or sequence <sup>a</sup>	Reference or source
<b>Strains</b>		
<i>Escherichia coli</i> S17-1	Conjugation strain	28
<i>E. coli</i> XLI-Blue	Transformation strain	
<i>Coralloccoccus coralloides</i>	Strain BO35, source of RoxA <sub>Cco</sub>	T. Schäberle, University of Bonn
<i>Myxococcus fulvus</i> HW1	Source of RoxA <sub>Mfu</sub>	Y. Li, Shandong University
<i>Haliangium ochraceum</i>	Source of RoxA <sub>Hoc</sub>	DSMZ 14365
<i>Xanthomonas</i> sp. 35Y (SN5065)	Growth on poly( <i>cis</i> -1,4-isoprene) latex, clearing zone formation	3
<i>Xanthomonas</i> sp. 35Y-CM	Chloramphenicol-resistant mutant of strain 35Y	15
<i>Xanthomonas</i> sp. 35Y-CM $\Delta$ roxA-attB (SN4114)	Chromosomal deletion of <i>roxA</i> , <i>attB</i> at former <i>roxA</i> site, no clearing zone formation on latex agar	12
<i>Xanthomonas</i> sp. 35Y-CM $\Delta$ roxA-attB/pNH1- <i>roxA</i> -attP (in chromosome; SN4230)	Expression of RoxA from rhamnose promoter, Km <sup>r</sup> Cm <sup>r</sup> , clearing zone formation in the presence of rhamnose	12
<i>Xanthomonas</i> sp. 35Y-CM $\Delta$ roxA-attB/pNH1- <i>roxA</i> <sub>Hoc</sub> -attP (in chromosome; SN5127)	Expression of RoxA <sub>Hoc</sub> from rhamnose promoter, Km <sup>r</sup> Cm <sup>r</sup>	This study
<i>Xanthomonas</i> sp. 35Y-CM $\Delta$ roxA-attB/pNH1- <i>roxA</i> <sub>Cco</sub> -attP (in chromosome; SN5129)	Expression of RoxA <sub>Cco</sub> from rhamnose promoter, Km <sup>r</sup> Cm <sup>r</sup>	This study
<i>Xanthomonas</i> sp. 35Y-CM $\Delta$ roxA-attB/pNH1- <i>roxA</i> <sub>Mfu</sub> -attP (in chromosome; SN5132)	Expression of RoxA <sub>Mfu</sub> from rhamnose promoter, Km <sup>r</sup> Cm <sup>r</sup>	This study
<b>Plasmids</b>		
pJOE6787.1	pBR322 ori, <i>aphIII</i> (Km <sup>r</sup> ) <i>mob int</i> ( $\phi$ C31 integrase) <i>attP</i>	J. Altenbuchner
pNH1	pJOE6787.1 with rhamnose regulation genes	12
pNH1- <i>roxA</i> <sub>Xsp</sub>	Coding sequence of <i>roxA</i> <sub>Xsp</sub> under rhamnose promoter	12
pNH1- <i>roxA</i> <sub>Xsp</sub> -attP (SN4230)	Coding sequence of <i>roxA</i> <sub>Xsp</sub> under rhamnose promoter and <i>attP</i> site	12
pNH1- <i>roxA</i> <sub>Hoc</sub> -attP (SN4126)	Coding sequence of <i>roxA</i> <sub>Hoc</sub> under rhamnose promoter and <i>attP</i> site	This study
pNH1- <i>roxA</i> <sub>Mfu</sub> -attP (SN5021)	Coding sequence of <i>roxA</i> <sub>Mfu</sub> under rhamnose promoter and <i>attP</i> site	This study
pNH1- <i>roxA</i> <sub>Cco</sub> -attP (SN5084)	Coding sequence of <i>roxA</i> <sub>Cco</sub> under rhamnose promoter and <i>attP</i> site	This study
<b>Oligonucleotides</b>		
NdeI- <i>roxHoc</i> _f	GGAATTCATATGACGACCCGAGCGAACTTAC	
<i>roxHoc</i> -HindIII_r	CCC <u>AAGCTT</u> CTACAGGGTCTTGAGGTACTC	
NdeI- <i>roxCco</i> _f	GGAATTCATATGAGACTGCGATGGAGCC	
<i>roxCco</i> -HindIII_r	CCC <u>AAGCTT</u> CTACAGCGTCTTCATGTACT	
NdeI- <i>roxMfu</i> _f	GGAATTCATATGCGGGTACACTGGAGTC	
<i>roxMfu</i> -HindIII_r	CCC <u>AAGCTT</u> TCAGAGCGTCTTCAGGTATT	

<sup>a</sup> Underlining indicates the restriction enzyme sites.

*Xanthomonas* sp. 35Y is the only known Gram-negative rubber degrader. Attempts to isolate other rubber-degrading Gram-negative bacteria were not successful (1; unpublished data). When we screened the database for RoxA orthologs after the first cloning of the *Xanthomonas* sp. 35Y *roxA* gene (*roxA*<sub>Xsp</sub>) about 10 years ago (9), no other RoxA-related sequence could be identified. However, a recently repeated BLAST search revealed several potential RoxA orthologs. Remarkably, all identified RoxA-related sequences were from members of the myxobacteria, namely, *Haliangium ochraceum*, *Coralloccoccus coralloides*, *Myxococcus fulvus*, and *Chondromyces apiculatus*. Rubber-degrading activities have not been described for myxobacteria or any other Gram-negative bacteria, except for *Xanthomonas* sp. 35Y. This prompted us to investigate the potential of the putative RoxA orthologs from myxobacteria for oxidative cleavage of polyisoprene.

## MATERIALS AND METHODS

**Bacterial strains, plasmids, and culture conditions.** All strains and plasmids used in this study are given in Table 1. Recombinant *Xanthomonas* sp. 35Y  $\Delta$ roxA-attB harboring *roxA* under the control of a rhamnose promoter was grown in modified LB medium with a reduced concentration

of yeast extract (10 g/liter tryptone, 5 g/liter NaCl, 0.25 g/liter yeast extract, 1 g/liter L-rhamnose) for 3 to 4 days. The growth temperature was 30°C for expression of RoxA<sub>Xsp</sub> and 22°C for expression of RoxA orthologs. *H. ochraceum* was grown on DSMZ medium 246 (pH 7.3) that included beef extract (1%), peptone (1%), and artificial seawater (750 ml per liter medium). The beef extract and peptone were dissolved in 250 ml of tap water and combined with 750 ml of artificial seawater. *M. fulvus* HW1 and *C. coralloides* BO35 were grown on solid nutrient broth agar.

**Cloning of *roxA* from myxobacteria.** The coding sequences of the *roxA* genes of *H. ochraceum* (*roxA*<sub>Hoc</sub>), *C. coralloides* BO35 (*roxA*<sub>Cco</sub>), and *M. fulvus* HW1 (*roxA*<sub>Mfu</sub>) were PCR amplified from the respective genomic DNAs (for primer sequences, see Table 1) and cloned into pUC9. In the case of *roxA*<sub>Cco</sub>, the chromosomal template DNA was isolated from *C. coralloides* strain BO35 and the *roxA* region was sequenced *de novo*. Finally, the *roxA*<sub>Xsp</sub>-coding sequence of the pNH1-*roxA*-attP plasmid was replaced by the *roxA* orthologs (*roxA*<sub>Hoc</sub>, *roxA*<sub>Mfu</sub>, or *roxA*<sub>Cco</sub>), resulting in plasmids pNH1-*roxA*<sub>Hoc</sub>-attP, pNH1-*roxA*<sub>Mfu</sub>-attP, and pNH1-*roxA*<sub>Cco</sub>-attP, respectively (Table 1). The three plasmids were conjugatively transferred from *Escherichia coli* S17-1 to *Xanthomonas* sp. 35Y  $\Delta$ roxA-attB and were chromosomally integrated via attP/attB recombination, as previously described in detail (12). The correct integration of *roxA* orthologs and DNA sequences was confirmed by PCR and subsequent DNA sequencing of the *roxA* genes for each *Xanthomonas* sp. 35Y clone.

**Purification of recombinant RoxA.** Construction of tagged variants of RoxA did not result in a simplified purification process, regardless of whether a C-terminal, N-terminal, or internal tag (a His<sub>6</sub> or Strep tag) was chosen (unpublished result). Therefore, conventional chromatography methods were applied for purification of RoxA. *Xanthomonas* sp. 35Y  $\Delta$ roxA-attB harboring the roxA ortholog of interest (Table 1) was grown in 10 to 20 individual 600-ml cultures of modified LB medium (each in a 3-liter Erlenmeyer flask) supplemented with 0.1% (wt/vol) l-rhamnose for 92 h at 22°C by continuous shaking. Cells were harvested (4°C) by centrifugation, and RoxA was purified from the culture supernatant. The cell-free supernatant was concentrated by ultrafiltration (10-kDa cutoff) and was applied to a Q-Sepharose fast-flow column (Q-FF 50/11) that had been equilibrated with 20 mM Tris-HCl (pH 8.5; flow rate, 8 ml/min). RoxA was eluted in a subsequent step gradient at  $\approx$ 50 mM NaCl in equilibration buffer. Combined RoxA-containing fractions were concentrated  $\approx$ 20-fold, and Tris-HCl buffer was exchanged against potassium phosphate buffer (10 mM, pH 6.8) by gel filtration on a HiPrep 26/10 column. The RoxA pool was then applied to a hydroxyapatite column (CHT5-1) that had been equilibrated with the same buffer. RoxA was eluted with a linear gradient of 10 to 200 mM potassium phosphate, pH 6.8, at  $\approx$ 40 mM. RoxA fractions were pooled and concentrated via ultrafiltration (30-kDa cutoff) in the presence of 300 mM NaCl at 0 to 4°C (on ice). High ionic strength prevented precipitation of RoxA. Purity was tested by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and by determination of the quotient of the absorption at 406 nm and that at 280 nm, which was  $\approx$ 1.35 for pure RoxA, 1.48 for RoxA<sub>Cco</sub>, and 1.27 for RoxA<sub>Mfu</sub>. Purified RoxA was frozen in liquid nitrogen and stored at  $-70^{\circ}\text{C}$ .

**Determination of RoxA activity.** RoxA was assayed by determination of the polyisoprene cleavage product ODTD via high-pressure liquid chromatography (HPLC). The assay mixture contained 5  $\mu\text{g}$  of the respective purified RoxA ortholog, rubber latex (0.2% [wt/vol] emulsion), and potassium phosphate buffer (100 mM; pH 4.5 to 9.0) in a total volume of 1 ml. In some experiments, artificial seawater consisting of 28.1 g NaCl, 0.77 g KCl, 1.6 g CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, 4.8 g MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, 0.11 g NaHCO<sub>3</sub>, and 3.5 g MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O (all components were dissolved in 1 liter water) was additionally present in the assay buffer. The reaction was performed at the indicated temperatures for 18 h in a 15-ml Falcon tube. The mixture was extracted with 1.5 ml ethyl acetate, and 1.0 ml of the extract was dried, dissolved in 100  $\mu\text{l}$  methanol, and then subjected to HPLC analysis (20  $\mu\text{l}$  per sample). An RP8 HPLC column (12 by 4 mm; particle size, 5  $\mu\text{m}$ ) was used with water (solution A) and methanol (solution B) as the mobile phases. The concentration of solution B was increased starting from 50% (vol/vol) to 100% (vol/vol) at 20 min at a flow rate of 0.7 ml/min; products were detected at 210 nm. ODTD eluted after 15.3  $\pm$  0.4 min. Purified ODTD was used as the standard. Mixtures without RoxA served as controls.

**Clearing zone assay.** RoxA activity was semiquantitatively estimated by streaking recombinant *Xanthomonas* sp. 35Y  $\Delta$ roxA::attB that contained the different roxA orthologs (Table 1) onto previously described solid mineral salts agar plates (3) supplemented with 0.05% (wt/vol) yeast extract and 0.1% (wt/vol) l-rhamnose and with an opaque overlay agar ( $\approx$ 8 ml) of purified polyisoprene latex (0.25% rubber [dry wt/vol in agar]). Polyisoprene latex was obtained from Weber and Schaefer, Hamburg, Germany, and was purified by washing 3 times with an aqueous solution of 0.1% (wt/vol) Nonidet P-40. *Xanthomonas* sp. 35Y  $\Delta$ roxA::attB harboring chromosomally anchored wild-type roxA under rhamnose control (pNH1-roxA-attP) and *Xanthomonas* sp. 35Y  $\Delta$ roxA served as positive and negative controls, respectively. *Xanthomonas* sp. 35Y wild type was used as a supplementary control. The plates were incubated at room temperature ( $\approx$ 22°C) or at 30°C. The intensity of clearing zone formation semiquantitatively indicated RoxA activity and consumption of the ODTD produced by the strain.

**Other methods.** Heme staining was performed after separation of RoxA-containing fractions by SDS-PAGE and subsequent assay for pseudo-

TABLE 2 Identities and similarities between RoxA amino acid sequences

Protein	% similarity or identity <sup>a</sup>					
	RoxA <sub>Xsp</sub>	RoxA <sub>Cco</sub> <sup>Tb</sup>	RoxA <sub>Cco</sub>	RoxA <sub>Mfu</sub>	RoxA <sub>Cap</sub>	RoxA <sub>Hoc</sub>
RoxA <sub>Xsp</sub>	100	67	65	65	65	63
RoxA <sub>Cco</sub> <sup>T</sup>	78	100	89	85	83	75
RoxA <sub>Cco</sub>	77	93	100	83	82	75
RoxA <sub>Mfu</sub>	75	89	90	100	89	75
RoxA <sub>Cap</sub>	76	88	88	92	100	74
RoxA <sub>Hoc</sub>	75	83	82	82	80	100

<sup>a</sup> Percent similarity is identified by shading.

<sup>b</sup> RoxA<sub>Cco</sub><sup>T</sup>, RoxA from *Coralloccoccus coralloides* type strain (DSMZ 2259).

doperoxidase activity of the RoxA heme groups, as described previously (11). The concentrations of the purified RoxA proteins were determined using the molar absorption coefficient of RoxA at 406 nm ( $\epsilon_{406}$ ;  $2.07 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ). RoxA structures were visualized and modeled using the SWISS MODEL server (14). The genomic DNA of *H. ochraceum* and *M. fulvus* was prepared by standard methods.

**Nucleotide sequence accession numbers.** Annotations of the RoxA sequences from *Xanthomonas* sp. 35Y, *H. ochraceum*, *C. coralloides*, and *C. apiculatus* have been submitted to GenBank under accession numbers KC980911 to KC980914.

## RESULTS

**Identification, cloning, and expression of RoxA orthologs in *Xanthomonas* sp. 35Y.** A BLAST search (January 2013) using the *Xanthomonas* sp. 35Y RoxA-coding sequence (GenBank accession number AAP41848.1) as the template revealed the presence of several putative RoxA orthologs in the database: The amino acid sequences of COCOR\_02166 from *C. coralloides* DSM 2259, of LILAB\_11505 from *M. fulvus* HW1, and of A176\_5502 from *C. apiculatus* DSM 436 had 65% amino acid sequence identity (75 to 78% similarity) to the RoxA<sub>Xsp</sub> amino acid sequence, and the amino acid sequence of Hoch\_1661 from *H. ochraceum* DSM 14365 was 63% identical (75% similar) to that of RoxA<sub>Xsp</sub> (Table 2). All RoxA-like sequences were characterized by a high fraction of aromatic residues (Table 3). Apparently, roxA-like genes are present in the genomes of several species of myxobacteria.

The deduced amino acid sequences of all putative RoxA orthologs have potential signal peptides for secretion; the apparent molecular masses of the putative mature proteins were highly similar and were 73.7 kDa for RoxA<sub>Hoc</sub>, 72.5 kDa for RoxA<sub>Cco</sub>, 73.3 kDa for RoxA<sub>Mfu</sub>, 73.4 kDa for RoxA<sub>Cap</sub>, and 73.0 kDa for RoxA<sub>Xsp</sub> (Table 3). All RoxA orthologs (i) harbored two heme motifs (CXXCH) for covalent attachment of heme, (ii) had conserved histidine residues as axial heme ligands, (iii) contained a conserved MauG motif, and (iv) had conserved W<sub>302</sub> and F<sub>317</sub> residues (Fig. 1; Table 3). W<sub>302</sub> in RoxA<sub>Xsp</sub> is located between the two hemes, and F<sub>317</sub> is essential for optimal binding of dioxygen (12). In conclusion, the high similarity of the identified putative proteins suggests a structure similar to that of RoxA<sub>Xsp</sub> and, presumably, a biochemical function similar to that of RoxA<sub>Xsp</sub>. To test whether the identified myxobacteria can degrade polyisoprene, *H. ochraceum* was cultivated on opaque latex agar (with 0.05% yeast extract and 0.1% polyisoprene latex supplemented with artificial seawater). Although the growth of *H. ochraceum* was poor, clearing zone formation became visible within 2 weeks and suggested that the putative roxA gene could have the same function for the cleavage of polyisoprene as it does in *Xanthomonas* sp. 35Y. To

Birke et al.

TABLE 3 Properties of RoxA orthologs<sup>a</sup>

Attribute	RoxA <sub>Xsp</sub>	RoxA <sub>Cco</sub> <sup>Tb</sup>	RoxA <sub>Cco</sub>	RoxA <sub>Mfu</sub>	RoxA <sub>Hoc</sub>	RoxA <sub>Cop</sub>
Gene length (bp)	2,037	2,022	2,022	2,025	2,031	2,016
Molecular mass (kDa)						
Mature protein	71.5	71.0	71.0	71.9	72.1	71.9
Mature protein + 2 hemes	73.0	72.5	72.5	73.3	73.7	73.4
P <sub>i</sub> (theoretical)	7.3	6.1	6.7	7.0	4.9	6.6
% aromatic amino acids (no. of F, W, and Y amino acids)	11.4 (24, 20, 30)	11.3 (31, 16, 26)	11.3 (34, 16, 23)	11.6 (32, 16, 27)	12.7 (35, 17, 30)	11.1 (36, 15, 21)
Heme attachment (N terminus/ C terminus)	CSACH <sub>195</sub> /CASCH <sub>394</sub>	CSACH <sub>181</sub> /CASCH <sub>379</sub>	CSACH <sub>181</sub> /CASCH <sub>379</sub>	CSACH <sub>181</sub> /CASCH <sub>379</sub>	CSACH <sub>181</sub> /CASCH <sub>379</sub>	CSACH <sub>181</sub> /CASCH <sub>379</sub>
Axial heme ligands (N terminus/ C terminus)	H <sub>195</sub> /H <sub>394</sub> H <sub>441</sub>	H <sub>181</sub> /H <sub>379</sub> H <sub>626</sub>	H <sub>181</sub> /H <sub>379</sub> H <sub>626</sub>	H <sub>181</sub> /H <sub>379</sub> H <sub>626</sub>	H <sub>181</sub> /H <sub>379</sub> H <sub>626</sub>	H <sub>181</sub> /H <sub>379</sub> H <sub>626</sub>
MauG motif	PYFH <sub>517</sub> NGSVP	PFFH <sub>502</sub> NGSVP	PFFH <sub>502</sub> NGSVP	PYFH <sub>502</sub> NSSVP	PYFH <sub>502</sub> NGSVP	PYFH <sub>502</sub> NSSVP
F <sub>317</sub> equivalent	F <sub>317</sub>	F <sub>302</sub>	F <sub>302</sub>	F <sub>302</sub>	F <sub>302</sub>	F <sub>302</sub>
W <sub>302</sub> equivalent	W <sub>302</sub>	W <sub>287</sub>	W <sub>287</sub>	W <sub>287</sub>	W <sub>287</sub>	W <sub>287</sub>
pH optimum at 22°C	6–7	6–7	6–7	7	7	7
Optimal temp range at pH 7 (°C)	30–37		22–30	22–30	≈22 <sup>c</sup>	
Sp act (ODTD area/μg RoxA [%])	6,700 (100)		660 (9.9)	590 (8.7)		
Sortet maximum (nm)						
Oxidized	407		407	408	409 <sup>d</sup>	
Reduced	418		418	418	418 <sup>d</sup>	
α band (reduced) (nm)	549, 553		549, 553	551–552	550, 553 <sup>d</sup>	
β band (reduced) (nm)	521		522	522	523 <sup>d</sup>	
Main cleavage product	ODTD		ODTD	ODTD	ODTD <sup>d</sup>	
Salt tolerance	+		+	+		
Activity with the following activators/ inhibitors (%):						
Ethanol solvent (1%/5%/10%)	110/140/140		120/190/140			
Squalene	75		85			
α-Tocopherol	25		35			
Carotene <sup>e</sup>	55		10			
Pyridine	<3		<3			

<sup>a</sup> Inhibitor compounds were dissolved in ethanol (final concentration, 1%, vol/vol). Blank cells indicate that the value was not determined.<sup>b</sup> RoxA<sub>Cco</sub><sup>Tb</sup>, RoxA from *Corallocccus coralloides* type strain (DSMZ 2259).<sup>c</sup> From Fig. 1.<sup>d</sup> The experiment was performed with a cell-free culture supernatant of the *Xanthomonas* sp. Δ*roxA* strain with chromosomally integrated pNH1-*roxA<sub>Hoc</sub>*-*attP* plasmid. The red shift in UV-vis signals of the RoxA<sub>Hoc</sub> protein by 1 nm is probably explained by impurities of medium components.<sup>e</sup> Mixture of carotenes (Roth; catalog no. 7864.1).

find evidence for this assumption, we functionally analyzed RoxA<sub>Hoc</sub>, RoxA<sub>Cco</sub>, and RoxA<sub>Mfu</sub>.

**Cloning and functional expression of RoxA<sub>Hoc</sub>, RoxA<sub>Cco</sub>, and RoxA<sub>Mfu</sub>.** Substantial expression of RoxA<sub>Xsp</sub> in *E. coli*, other Gram-negative bacteria, or *Bacillus subtilis* was not successful, as observed earlier for RoxA and MauG (12, 15, 16). When we attempted expression of RoxA<sub>Hoc</sub> in an *E. coli* strain that harbored the cytochrome *c* maturation (*ccm*) genes on pEC86 (17), growth of the recombinant *E. coli* strain stopped shortly after induction and no substantial expression was detected. We concluded that experiments aimed at the expression of RoxA<sub>Cco</sub> or RoxA<sub>Mfu</sub> in *E. coli* also might not be successful. Therefore, we decided to express *roxA* orthologs in *Xanthomonas* sp. 35Y Δ*roxA* via *attP/attB* recombination using the phiC31 integrase system that had successfully been developed in our lab for RoxA<sub>Xsp</sub> expression; this system is so far the only way to obtain reproducible expression of recombinant RoxA (12).

The RoxA<sub>Hoc</sub>, RoxA<sub>Cco</sub>, and RoxA<sub>Mfu</sub>-encoding genes were PCR amplified, cloned, and finally, integrated into the chromosome of *Xanthomonas* sp. 35Y Δ*roxA* under rhamnose promoter control, as described in detail in Materials and Methods. Successful expression of the chromosomally anchored *roxA* orthologs was tested by growth of the recombinant strains in modified latex medium supplemented with rhamnose. Expression of active RoxA proteins was indicated (i) by the formation of clearing zones around the colonies on opaque latex-rhamnose agar (Fig. 2) and (ii) by the appearance of bands with pseudoperoxidase activity and with relative mobility in SDS-polyacrylamide gels similar to

that for RoxA<sub>Xsp</sub> for all three cloned *roxA* orthologs (Fig. 3A). The clearing zone diameter of the RoxA<sub>Mfu</sub> strain was similar to that of the RoxA<sub>Xsp</sub> strain (control), while the clearing zones for the RoxA<sub>Cco</sub> and RoxA<sub>Hoc</sub> strains were considerably smaller. Those strains formed small clearing zones at 22°C but no or only very small clearing zones at 30°C. Therefore, we assume a considerable temperature sensitivity of the RoxA<sub>Hoc</sub> and RoxA<sub>Cco</sub> orthologs. In no case were any clearing zones formed on latex agar in the absence of rhamnose. This confirmed that RoxA expression by recombinant *Xanthomonas* sp. 35Y depends on the presence of the inducer rhamnose.

**Purification and biochemical properties of RoxA<sub>Mfu</sub> and RoxA<sub>Cco</sub>.** *Xanthomonas* sp. 35Y RoxA and two RoxA orthologs (RoxA<sub>Mfu</sub> and RoxA<sub>Cco</sub>) were purified from 10, 11, or 5 liters of cell-free culture supernatants by subsequent chromatography on Q-Sepharose and hydroxyapatite (for details, see Materials and Methods). A 32-mg quantity of RoxA<sub>Xsp</sub>, 1.1 mg of RoxA<sub>Mfu</sub>, and 7.7 mg of RoxA<sub>Cco</sub> were obtained as yields after the final chromatography and concentration step. All purified RoxA orthologs were highly pure (>98%), as revealed by SDS-PAGE analysis (Fig. 3B) and by spectral analysis (not shown).

ODTD was identified as the major *in vitro* product of oxidative cleavage of natural polyisoprene latex using the three purified RoxA orthologs (RoxA<sub>Xsp</sub>, RoxA<sub>Cco</sub>, and RoxA<sub>Mfu</sub>) (Table 3). RoxA<sub>Hoc</sub> was not purified, but the polyisoprene-cleaving activity of RoxA<sub>Hoc</sub> was verified using a 10-fold-concentrated culture supernatant of a RoxA<sub>Hoc</sub>-expressing culture, and ODTD was identified to be the main cleavage product as well. These results con-



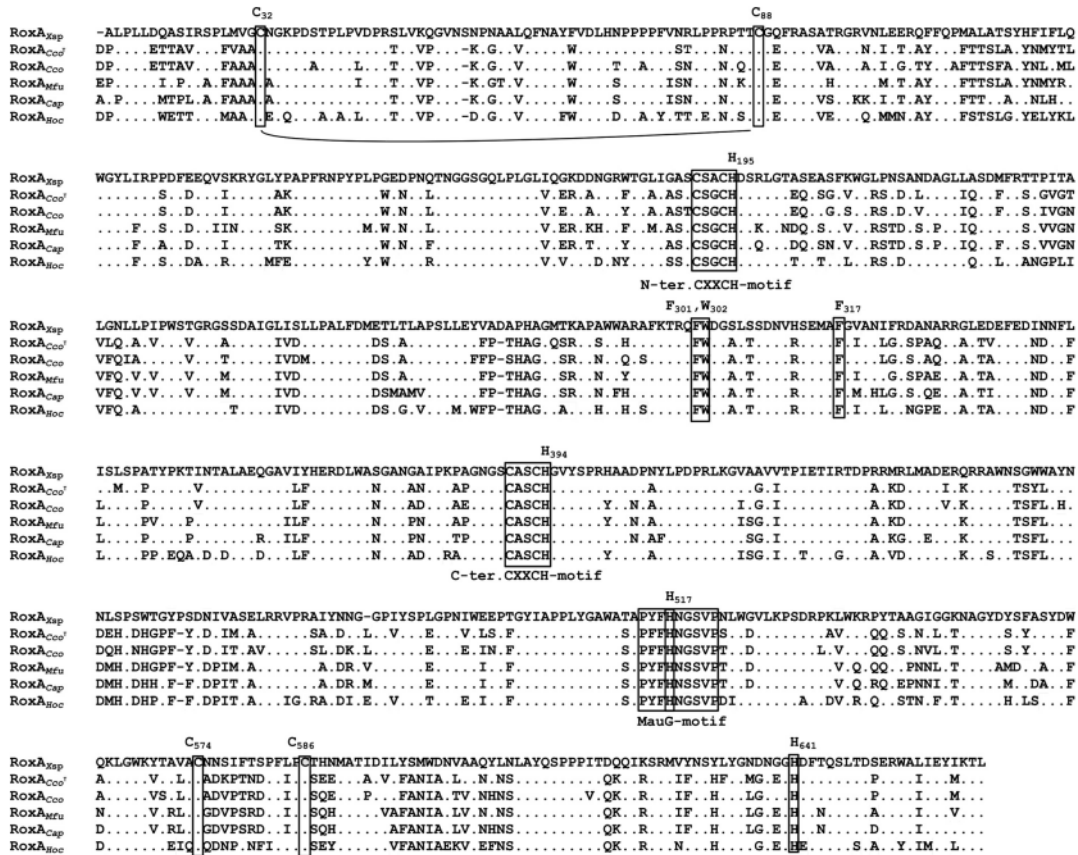


FIG 1 Alignment of amino acid sequences of RoxA orthologs. Amino acid residues of RoxA orthologs that were identical to those of RoxA<sub>Xsp</sub> are indicated by dots. Residues different from those in RoxA<sub>Xsp</sub> are given by the 1-letter amino acid code. Heme binding and MauG motifs as well as important residues in RoxA<sub>Xsp</sub> are boxed. Conserved cysteine residues that contribute to disulfide bridges are connected with solid lines. Numbering of residues refers to that of RoxA<sub>Xsp</sub>, as described in reference 9. RoxA<sub>Cco</sub><sup>T</sup>, RoxA from *Coralloccoccus coralloides* type strain (DSMZ 2259).

firmed that RoxA<sub>Mfu</sub>, RoxA<sub>Cco</sub>, and RoxA<sub>Hoc</sub> are true rubber oxygenases (RoxAs). Purified RoxA<sub>Xsp</sub> had an approximately 10-fold higher specific activity than purified RoxA<sub>Cco</sub> and RoxA<sub>Mfu</sub>. Determination of the pH and temperature profiles showed that the purified RoxA orthologs were active in a range from pH 5 to 9 and at 20 to 37°C. The highest activities were determined at between pH 6 and 7 and 30°C (Table 3). The thermal stability of RoxA<sub>Hoc</sub> was slightly lower at 30°C than at room temperature, as revealed by the reduced clearing zone formation of the RoxA<sub>Hoc</sub>-expressing *Xanthomonas* sp. 35Y (Fig. 2) and by quantitative determination of ODTD peak areas in RoxA activity assays.

RoxA<sub>Hoc</sub> and RoxA<sub>Mfu</sub> originate from marine species, suggesting that salts could influence their activity. However, repetition of enzyme assays in the presence of different salt concentrations (0, 1, and 3% NaCl tested with or without artificial seawater) had no or only a minor influence on the formation of ODTD. RoxA orthologs of soil bacteria or of bacteria from marine habitats appar-

ently do not differ significantly in salt tolerance. They do not depend on the presence of high salt concentrations but are not negatively affected if salts are present at considerable concentrations. Substrate analogs, such as squalene, carotene, or α-tocopherol, partially inhibited RoxA<sub>Cco</sub> to variable extents (only RoxA<sub>Xsp</sub> and RoxA<sub>Cco</sub> were tested with substrate analogs; Table 3). Notably, ethanol, which was used as the solvent for the inhibitor compounds, moderately increased the ODTD formation activity of RoxA in a dose-dependent manner, possibly by changing the buoyant force in the emulsion. This may simply lead to a faster concentration of latex aggregated to RoxA at the surface of the test tube, resulting in a more efficient enzyme/substrate ratio. The highest inhibitory effect on activity was, however, found for pyridine, which can act as a heme ligand. A 1 mM concentration of this compound completely inhibited the RoxA activity of all RoxA orthologs, consistent with previous investigations with RoxA<sub>Xsp</sub> (11).

Birke et al.

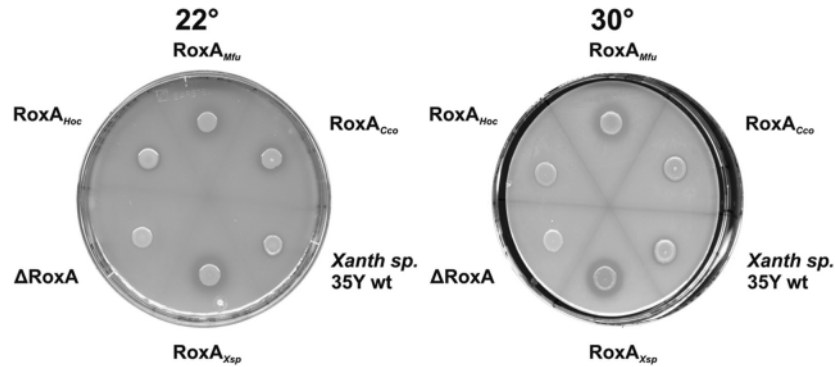


FIG 2 Functional expression of RoxA orthologs in *Xanthomonas* sp. 35Y  $\Delta$ roxA. *Xanthomonas* sp. 35Y wild type (*Xanth* sp. 35Y wt) and *Xanthomonas* sp. 35Y  $\Delta$ roxA ( $\Delta$ RoxA) with chromosomally integrated *roxA* orthologs from *M. fulvus* (RoxA<sub>Mfu</sub>), *C. coralloides* BO35 (RoxA<sub>Cco</sub>), *Xanthomonas* sp. 35Y (RoxA<sub>Xsp</sub>), and *H. ochraceum* (RoxA<sub>Hoc</sub>) under rhamnose control were grown on opaque latex medium that had been supplemented with L-rhamnose (0.1%) at 22°C and at 30°C. The formation and the diameter of the clearing zones semiquantitatively indicate expression of the RoxA protein and consumption of polyisoprene cleavage products. Note the reduced clearing zone formation (RoxA<sub>Hoc</sub>) at 30°C compared to that at 22°C.

**Spectral properties of RoxA orthologs.** UV-visible (UV-vis) spectroscopy of RoxA<sub>Xsp</sub> as isolated indicated an oxidized spectrum of the heme groups. Both heme groups could be differentiated by separate absorption maxima of the  $\alpha$  bands (549 nm and 553 nm) after chemical reduction with dithionite (11). The newly isolated RoxA preparations (RoxA<sub>Mfu</sub>, RoxA<sub>Cco</sub>, as well as the 10-fold-concentrated supernatant of the RoxA<sub>Hoc</sub>-expressing culture) in the state as isolated also showed an oxidized spectrum (Soret band at  $408 \pm 1$  nm). In the chemically reduced state, a comparison of the UV-vis properties of RoxA<sub>Xsp</sub> with those of RoxA of myxobacteria revealed almost identical Soret bands (at 418 nm; shown for RoxA<sub>Cco</sub> as an example in Fig. 4) and maxima of  $\beta$  bands ( $522 \pm 1$  nm) and  $\alpha$  bands ( $549 \pm 1$  and  $553 \pm 1$  nm)

(Table 3; Fig. 4A). Only the  $\alpha$  bands of RoxA<sub>Mfu</sub> were not well separated and composed a broad maximum from 551 to 552 nm, indicating different but very closely located maxima (not shown). In conclusion, the two hemes of RoxA<sub>Xsp</sub> and the hemes of the orthologs RoxA<sub>Mfu</sub>, RoxA<sub>Cco</sub>, and RoxA<sub>Hoc</sub> have very similar optical properties with uncommon features (11, 12) which can be seen to be characteristic for RoxA. This suggests very similar chemical environments in the immediate vicinities of the heme centers of all RoxA orthologs.

**Structures of RoxA orthologs.** Determination of the recently solved three-dimensional structure of the RoxA<sub>Xsp</sub> protein showed that the N-terminal heme has only one axial amino acid ligand (H<sub>195</sub>) on the proximal side and that dioxygen represents

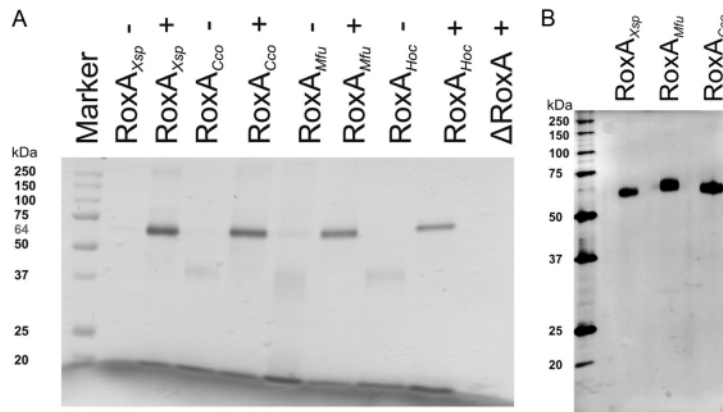


FIG 3 (A) SDS-PAGE and subsequent pseudoperoxidase staining (heme staining) of culture supernatants of *Xanthomonas* sp. 35Y  $\Delta$ roxA harboring chromosomally integrated *roxA*<sub>Xsp</sub> orthologs. Each strain was grown in the absence (–) or presence (+) of the inducer L-rhamnose (0.1%). *Xanthomonas* sp. 35Y  $\Delta$ roxA and *Xanthomonas* sp. 35Y  $\Delta$ roxA with pNH1-*roxA*<sub>Xsp</sub> (RoxA<sub>Xsp</sub>) were used as negative and positive controls, respectively. (B) Purification of recombinant RoxA orthologs. RoxA<sub>Xsp</sub>, RoxA<sub>Cco</sub>, and RoxA<sub>Mfu</sub> were purified from rhamnose-grown cultures by chromatography of concentrated cell-free culture fluid on Q-Sepharose and hydroxyapatite, as described in Materials and Methods. Aliquots of the respective RoxA pools after the hydroxyapatite step were separated by SDS-PAGE and stained with silver. Overloading of the lanes indicates the absence of significant amounts of contaminating proteins.

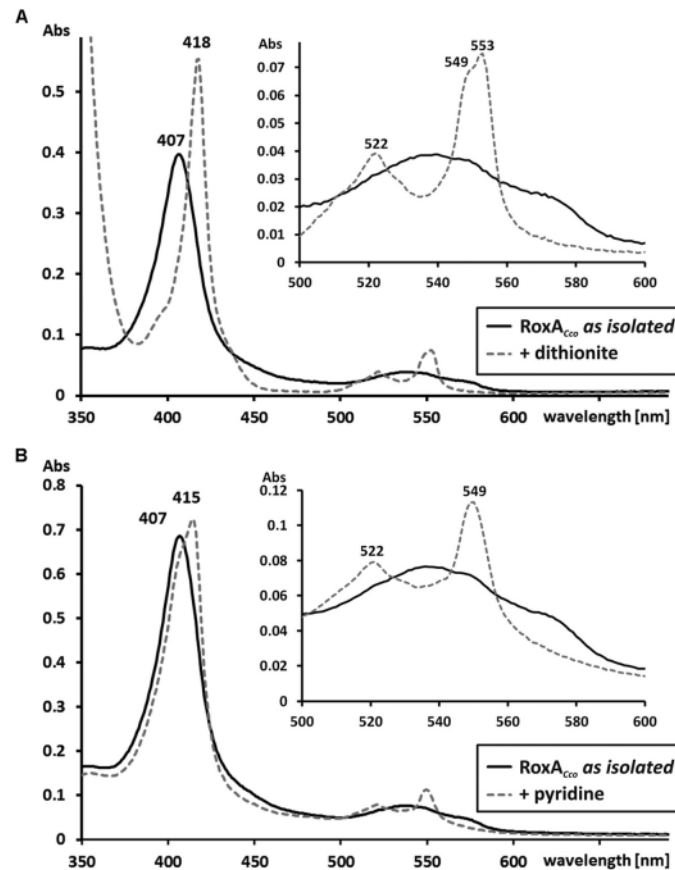


FIG 4 UV-vis spectra of purified RoxA<sub>Cco</sub>. (A) UV-vis spectra of RoxA<sub>Cco</sub> as isolated (solid line) and of dithionite-reduced RoxA<sub>Cco</sub> (dashed line); (B) UV-vis spectrum of RoxA<sub>Cco</sub> as isolated (solid line) compared with the spectrum obtained after incubation of RoxA with 2 mM pyridine. The Soret band region is enlarged in the insets in both panels, and the absorption maxima of RoxA are indicated. Note that the presence of pyridine resulted in an increase of only the 549-nm  $\alpha$  band, while in chemically reduced RoxA<sub>Cco</sub>, both  $\alpha$  bands (549 to 553 nm) are visible. Abs, absorbance.

the distal heme ligand (18, 19). The N-terminal heme constitutes the active site of RoxA. The other (C-terminal) heme is coordinated by two axial histidine ligands (for residue numbers, see Table 3). UV-vis and electron paramagnetic resonance (EPR) spectroscopy data suggested that a considerable part of the isolated RoxA molecules is in an  $\text{Fe}^{2+}\text{-O}_2 \leftrightarrow \text{Fe}^{3+}\text{-O}_2^-$  equilibrium at the N-terminal heme comparable to that of oxyhemoglobin (20, 21). Incubation of RoxA<sub>Xsp</sub> with amino acid-like molecules, such as imidazole or pyridine, that can function as axial ligands to heme resulted in a selective increase of the 549-nm  $\alpha$  band and in inactivation of the enzyme. This can be explained by the displacement of dioxygen and binding of the ligand to  $\text{Fe}^{2+}$ . A selective increase of the 549-nm  $\alpha$  band was also observed in the UV-vis spectrum upon incubation of RoxA<sub>Cco</sub> with pyridine (Fig. 4B) and indicated that the N-terminal heme of RoxA<sub>Cco</sub> apparently has no amino acid ligand and is present in an oxygenated state, as in RoxA<sub>Xsp</sub>. This assumption was supported by comparing the modeled struc-

tures of RoxA orthologs shown in Fig. 5. It is evident that all structures are almost identical (root mean square deviation [RMSD] values,  $<1 \text{ \AA}$ ). Only a minor difference was noticed for the RoxA<sub>Mfi</sub> structure: the major  $\alpha$  helix (the top helix in Fig. 5) was reduced in length, and a small  $\alpha$  helix in the enzyme center was present as a random coil. In conclusion, the structures of all RoxA orthologs, including the positions and relative orientations of the two heme centers, are highly similar and support the same biochemical function, i.e., oxidative cleavage of polyisoprene.

#### DISCUSSION

About 12 million tons of poly(*cis*-1,4-isoprene) are produced every year by cultivating the rubber tree (*Hevea brasiliensis*; natural rubber), and a comparable amount is produced by chemical synthesis (synthetic rubber). Polyisoprene is also produced by many plants and some fungal species (4), although the concentration of polyisoprene in the latex is much lower than that in the latex from

Birke et al.

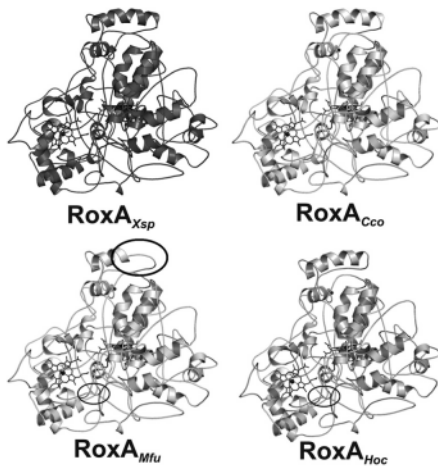


FIG 5 Similarity of the  $RoxA_{Xsp}$  structure to the structures of  $RoxA_{Mfu}$ ,  $RoxA_{Cco}$ , and  $RoxA_{Hoc}$ . Cartoons of the modeled structures of  $RoxA_{Mfu}$ ,  $RoxA_{Cco}$ , and  $RoxA_{Hoc}$  are shown and are compared with the known  $RoxA_{Xsp}$  structure (Protein Data Bank accession number 4B2N). Areas with differences in secondary structures are indicated (circles). All modeled structures showed RMSD values of  $<1 \text{ \AA}$  (0.62 to 0.71  $\text{\AA}$ ) compared to the  $RoxA_{Xsp}$  structure.

*H. brasiliensis*, where the rubber solid content of the laticifers can be as high as 35% (wt/vol). For example, the common dandelion (*Taraxacum*) and lactiferous mushrooms contain substantial amounts of polyisoprene. The portion of natural rubber that is produced by non-*Hevea* species is difficult to estimate, but it is reasonable to assume that polyisoprene compounds are ubiquitous.

Most of the artificially produced polyisoprene is released to the environment after use and, together with polyisoprene-containing biomass, constitutes an abundantly available carbon source for microorganisms. Streptomycetes and related actinobacteria are well-known for their potential to degrade biopolymers, such as proteins, polysaccharides, or polyesters. Previous analysis of the distribution of rubber-degrading bacteria showed that, indeed, members of the actinobacteria are frequently able to utilize polyisoprene as a source of carbon and energy (1, 6, 22–24). As far as it has been investigated, most—if not all—of the rubber-degrading actinobacteria employ latex-clearing protein (Lcp) as the catalyst for the primary attack of polyisoprene (6, 7). *Xanthomonas* sp. 35Y is so far the only known rubber-degrading Gram-negative bacterium, and this strain does not have Lcp but produces rubber oxygenase (RoxA). Reports on the isolation of other Gram-negative bacteria that can utilize natural rubber as a sole source of carbon and energy have not been published since the description of latex degradation by *Xanthomonas* sp. 35Y, and even a directed search among related strains was not successful (1). One could assume that *Xanthomonas* sp. 35Y represents an exception and that most Gram-negative bacteria are not able to utilize polyisoprene as a carbon source. Few gene products with high similarity to RoxA that are described in this study have been deposited in databases, and none were deposited before 2009, suggesting that RoxA, at least, is not widespread in nature. We verified the function of RoxA as a polyisoprene-cleaving enzyme in at least 3 species (*H.*

*ochraceum*, *M. fulvus*, and *C. coralloides*) by functional expression. On the basis of the high amino acid sequence similarities (76 to 92%; Table 2), it is very likely that *C. apiculatus* has a functional RoxA ortholog as well.

Myxobacteria are known to prefer a variety of insoluble biopolymers, such as cellulose, chitin, and starch, for growth. They are also able to grow bacteriotrophically by lysing intact bacterial cells and proteins (25). However, their ability to degrade poly(*cis*-1,4-isoprene) has not been described prior to this study but seems plausible for myxobacteria, which are decomposers of recalcitrant substrates. The finding of RoxA orthologues only in myxobacteria, besides *Xanthomonas* sp. 35Y, is indeed conspicuous and suggests that RoxA is overrepresented in this group (compared to other Gram-negative bacteria). The rubber degradation ability may generally be restricted to certain groups of bacteria, like the Gram-positive actinomycetes or the Gram-negative myxobacteria, which both share the capacity to decompose hardly accessible molecules. Although the rubber degradation ability among Gram-negative bacteria was not discovered first in myxobacteria, this group may represent the counterpart to the actinomycetes, which combine the majority of Gram-positive bacteria that are rubber degraders. Our results suggest that rubber-degrading Gram-negative bacteria use RoxA instead of Lcp as the rubber-cleaving enzyme. Inspection of the genome sequences of *Xanthomonas* sp. 35Y and that of the myxobacteria indicated that none of them harbor any Lcp orthologs. In conclusion, nature has evolved polyisoprene-cleaving enzymes at least two times: the Lcp system is widespread in and apparently specific for Gram-positive bacteria (*Streptomyces*, *Gordonia*, and other actinomycetes), and the RoxA system is present only in Gram-negative bacteria. It will be interesting to see whether exceptions to this rule can be found in future.

Nevertheless, a commonality of all rubber degraders seems to be the metabolization of polyisoprene cleavage products like ODTD.  $\beta$ -Oxidation has been proposed to be a further metabolic route for rubber latex cleavage products by Lcp in Gram-positive bacteria that are rubber degraders (26, 27). Moreover, genes necessary for  $\beta$ -oxidation are also found in all the myxobacteria investigated in the genomic context surrounding the respective *roxA* genes. Only a small region of 7.6 kb around *roxA* of *Xanthomonas* sp. 35Y has been sequenced. However, genes coding for a putative aminoglycoside-phosphotransferase, enoyl coenzyme A (enoyl-CoA) hydratase, and acetyl-CoA acetyltransferase are located within this region, suggesting that a  $\beta$ -oxidation cluster is also present around *roxA\_{Xsp}* and that there is a metabolic connection between the function of RoxA and  $\beta$ -oxidation. One could speculate that the localization of *roxA* in this metabolic gene cluster is indicative of the potential of the rubber oxygenase to use other hydrocarbons, in addition to poly(*cis*-1,4-isoprene), as substrates which are metabolized by  $\beta$ -oxidation.

Expression of active RoxA in *E. coli* or other heterologous hosts was not successful, regardless of the absence or presence of cytochrome *c* maturation genes (*ccm* genes). We assume that the maturation machinery for the covalent attachment of two hemes and/or for the formation of two disulfide bridges proceeds via different mechanisms in *Xanthomonas* sp. 35Y than in *E. coli* or *B. subtilis*. Since expression of RoxA from three species of myxobacteria was possible in recombinant *Xanthomonas* cells, we assume that the RoxA maturation systems for *H. ochraceum*, *C. coralloides*, and *M. fulvus* are related and are interchangeable. We postulate

the existence of a yet unknown (or at least modified) cytochrome *c* maturation system in *Xanthomonas* sp. 35Y and RoxA-expressing myxobacteria, and we assume that RoxA of *C. apiculatus* and other not yet described RoxA orthologs from other Gram-negative bacteria can be functionally expressed in recombinant *Xanthomonas* sp. 35Y as well.

#### ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by a grant from the Deutsche Forschungsgemeinschaft to D.J. The support of the Weber and Schaeer Company for providing polyisoprene latex is also acknowledged.

We thank Y. Li (Shandong University, Shandong, China) and T. Schäberle (University of Bonn, Bonn, Germany) for providing *M. fulvus* HW1 and *C. coralloides* BO35, including BO35 genomic DNA.

#### REFERENCES

- Jendrossek D, Tomasi G, Kroppenstedt RM. 1997. Bacterial degradation of natural rubber: a privilege of actinomycetes? *FEMS Microbiol. Lett.* 150:179–188.
- Rose K, Steinbüchel A. 2005. Biodegradation of natural rubber and related compounds: recent insights into a hardly understood catabolic capability of microorganisms. *Appl. Environ. Microbiol.* 71:2803–2812.
- Tsuchii A, Takeda K. 1990. Rubber-degrading enzyme from a bacterial culture. *Appl. Environ. Microbiol.* 56:269–274.
- Yikmis M, Steinbüchel A. 2012. Historical and recent achievements in the field of microbial degradation of natural and synthetic rubber. *Appl. Environ. Microbiol.* 78:4543–4551.
- Rose K, Tenberge KB, Steinbüchel A. 2005. Identification and characterization of genes from *Streptomyces* sp. strain K30 responsible for clear zone formation on natural rubber latex and poly(*cis*-1,4-isoprene) rubber degradation. *Biomacromolecules* 6:180–188.
- Yikmis M, Steinbüchel A. 2012. Importance of the latex-clearing protein (Lcp) for poly(*cis*-1,4-isoprene) rubber cleavage in *Streptomyces* sp. K30. *Microbiologyopen* 1:13–24.
- Hiessl S, Schuldes J, Thürmer A, Halbsguth T, Broker D, Angelov A, Liebl W, Daniel R, Steinbüchel A. 2012. Involvement of two latex-clearing proteins during rubber degradation and insights into the further degradation pathway revealed by the genome sequence of *Gordonia polyisoprenivorans* strain VH2. *Appl. Environ. Microbiol.* 78:2874–2887.
- Yikmis M, Arenskötter M, Rose K, Lange N, Wernsmann H, Wiefel L, Steinbüchel A. 2008. Secretion and transcriptional regulation of the latex-clearing protein, Lcp, by the rubber-degrading bacterium *Streptomyces* sp. strain K30. *Appl. Environ. Microbiol.* 74:5373–5382.
- Jendrossek D, Reinhardt S. 2003. Sequence analysis of a gene product synthesized by *Xanthomonas* sp. during growth on natural rubber latex. *FEMS Microbiol. Lett.* 224:61–65.
- Braaz R, Fischer P, Jendrossek D. 2004. Novel type of heme-dependent oxygenase catalyzes oxidative cleavage of rubber (poly-*cis*-1,4-isoprene). *Appl. Environ. Microbiol.* 70:7388–7395.
- Schmitt G, Seiffert G, Kroneck PMH, Braaz R, Jendrossek D. 2010. Spectroscopic properties of rubber oxygenase RoxA from *Xanthomonas* sp., a new type of dihaem dioxygenase. *Microbiology* 156:2537–2548.
- Birke J, Hamsch N, Schmitt G, Altenbuchner J, Jendrossek D. 2012. Phe317 is essential for rubber oxygenase RoxA activity. *Appl. Environ. Microbiol.* 78:7876–7883.
- Braaz R, Armbruster W, Jendrossek D. 2005. Heme-dependent rubber oxygenase RoxA of *Xanthomonas* sp. cleaves the carbon backbone of poly(*cis*-1,4-isoprene) by a dioxygenase mechanism. *Appl. Environ. Microbiol.* 71:2473–2478.
- Schwede T, Kopp J, Guex N, Peitsch MC. 2003. SWISS-MODEL: an automated protein homology-modeling server. *Nucleic Acids Res.* 31:3381–3385.
- Hamsch N, Schmitt G, Jendrossek D. 2010. Development of a homologous expression system for rubber oxygenase RoxA from *Xanthomonas* sp. *J. Appl. Microbiol.* 109:1067–1075.
- Wang Y, Graichen ME, Liu A, Pearson AR, Wilmot CM, Davidson VL. 2003. MauG, a novel di-heme protein required for tryptophan tryptophylquinone biogenesis. *Biochemistry* 42:7318–7325.
- Arslan E, Schulz H, Zufferey R, Künzler P, Thöny-Meyer L. 1998. Overproduction of the *Bradyrhizobium japonicum* *c*-type cytochrome subunits of the *cbh3* oxidase in *Escherichia coli*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 251:744–747.
- Hoffmann M, Braaz R, Jendrossek D, Einsle O. 2008. Crystallization of the extracellular rubber oxygenase RoxA from *Xanthomonas* sp. strain 35Y. *Acta Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun.* 64:123–125.
- Seidel J, Schmitt G, Hoffmann M, Jendrossek D, Einsle O. 2013. Structure of the processive rubber oxygenase RoxA from *Xanthomonas* sp. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110:13833–13838.
- Weiss JJ. 1964. Nature of the iron-oxygen bond in oxyhaemoglobin. *Nature* 202:83–84.
- Wittenberg JB, Wittenberg BA, Peisach J, Blumberg WE. 1970. On the state of the iron and the nature of the ligand in oxyhemoglobin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 67:1846–1853.
- Heisey RM, Papadatos S. 1995. Isolation of microorganisms able to metabolize purified natural rubber. *Appl. Environ. Microbiol.* 61:3092–3097.
- Imai S, Ichikawa K, Muramatsu Y, Kasai D, Masai E, Fukuda M. 2011. Isolation and characterization of *Streptomyces*, *Actinoplanes*, and *Methyl-ibium* strains that are involved in degradation of natural rubber and synthetic poly(*cis*-1,4-isoprene). *Enzyme Microb. Technol.* 49:526–531.
- Warneke S, Arenskötter Q, Tenberge KB, Steinbüchel A. 2007. Bacterial degradation of poly(*trans*-1,4-isoprene) (Gutta percha). *Microbiology* 153:347–356.
- Dworkin M. 1966. Biology of the myxobacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 20:75–106.
- Bode HB, Kerkhoff K, Jendrossek D. 2001. Bacterial degradation of natural and synthetic rubber. *Biomacromolecules* 2:295–303.
- Banh Q, Arenskötter M, Steinbüchel A. 2005. Establishment of Tn5096-based transposon mutagenesis in *Gordonia polyisoprenivorans*. *Appl. Environ. Microbiol.* 71:5077–5084.
- Simon R, Priefer U, Pühler A. 1983. A broad host-range mobilization system for in vivo genetic engineering: transposon mutagenesis in Gram-negative bacteria. *Nat. Biotechnol.* 1:784–791.



## Rubber Oxygenase and Latex Clearing Protein Cleave Rubber to Different Products and Use Different Cleavage Mechanisms

Jakob Birke, Dieter Jendrossek

Institut für Mikrobiologie, Universität Stuttgart, Stuttgart, Germany

Two types of enzyme for oxidative cleavage of poly(*cis*-1,4-isoprene) are known. One is rubber oxygenase (RoxA) that is secreted by *Xanthomonas* sp. strain 35Y and a few other Gram-negative rubber-degrading bacteria during growth on polyisoprene. RoxA was studied in the past, and the recently solved structure showed a structural relationship to bacterial cytochrome *c* peroxidases (J. Seidel et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 110:13833–13838, 2013, <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1305560110>). The other enzyme is latex-clearing protein (Lcp) that is secreted by rubber-degrading actinomycetes, but Lcp has not yet been purified. Here, we expressed Lcp of *Streptomyces* sp. strain K30 in a  $\Delta$ roxA background of *Xanthomonas* sp. strain 35Y and purified native (un-tagged) Lcp. The specific activities of Lcp and RoxA were 0.70 and 0.48 U/mg, respectively. Lcp differed from RoxA in the absence of heme groups and other characteristics. Notably, Lcp degraded polyisoprene via endo-type cleavage to tetra-C<sub>20</sub> and higher oligo-isoprenoids with aldehyde and keto end groups, whereas RoxA used an exo-type cleavage mechanism to give the main end product 12-oxo-4,8-dimethyltrideca-4,8-diene-1-al (ODTD). RoxA was able to cleave isolated Lcp-derived oligo-isoprenoid molecules to ODTD. Inhibitor studies, spectroscopic investigations and metal analysis gave no indication for the presence of iron, other metals, or cofactors in Lcp. Our results suggest that Lcp could be a member of the growing group of cofactor-independent oxygenases and differs in the cleavage mechanism from heme-dependent RoxA. In conclusion, RoxA and Lcp represent two different answers to the same biochemical problem, the cleavage of polyisoprene, a polymer that has carbon-carbon double bonds as the only functional groups for enzymatic attack.

A large fraction of the organic biomass on earth is composed of biopolymers such as polysaccharides, polyamino acids (proteins), polyconiferylalcohols (lignins), polyhydroxyalkanoic acids (PHAs), and polyisoprenes (rubbers). Biopolymers are degraded by chemical, physical, and/or biochemical reactions. These mineralization processes are essential to keep the global carbon cycle running. Here, microorganisms fulfill a major role, and the collectivity of all microorganisms is able to degrade any naturally produced biopolymer. The first step in the degradation of biopolymers consists of the breakdown of the polymer to low-molecular-weight products and is often catalyzed by hydrolytic enzymes such as cellulases, proteases, lipases, polyesterases, and related hydrolases. However, polyisoprene, which is naturally produced by many plants (e.g., the rubber tree *Hevea brasiliensis* [natural rubber]) is a pure hydrocarbon, and therefore polyisoprene cannot be attacked by hydrolytic reactions. Instead, oxidative reactions are necessary for the primary attack of rubber. The fact that natural rubber can be biodegraded and used as a carbon and energy source by microorganisms has been known for more than 100 years, but it was only a decade ago that the first polyisoprene-specific rubber-degrading enzyme (rubber oxygenase [RoxA]) was isolated (1). RoxA is an extracellular dioxygenase secreted by *Xanthomonas* sp. strain 35Y during growth on poly(*cis*-1,4-isoprene) and cleaves rubber to one major product, 12-oxo-4,8-dimethyltrideca-4,8-diene-1-al (ODTD; C<sub>15</sub> tri-isoprenoid). Mature RoxA is a 73-kDa protein with two heme centers that are covalently attached to RoxA via two heme-binding motifs (2). Electron paramagnetic resonance (EPR) measurements and analysis of the three-dimensional structure revealed that the N-terminal heme represents the active site and has a stably bound dioxygen molecule as an axial ligand (3–5). Recently, we identified functional RoxA orthologs in several soil and marine myxobacteria (6); in addition, Imai et al. isolated *Rhizobacter gummiphilus* NS21 as a

novel Gram-negative rubber-degrading species (7, 8). However, the total number of known Gram-negative rubber-degrading species is still rather low. In contrast to this, the ability to degrade rubber is widespread among Gram-positive organisms, in particular among actinomycetes. Remarkably, RoxA orthologs were not found in any of the rubber-degrading Gram-positive organisms as far as the genomes of the species have been sequenced. Instead, multiple evidence exists that another protein, named the latex-clearing protein (Lcp), is responsible for the primary attack on polyisoprene by actinomycetes. Lcp was first described for *Streptomyces* sp. strain K30 (9), but orthologs of Lcp can be found in *Gordonia westfalica* and *Gordonia polyisoprenivorans* (10) and apparently are present in all rubber-degrading Gram-positive species that have been examined thus far (for reviews, see references 11 and 12).

Lcps are not related to RoxAs. For instance, Lcps (~40 kDa) and RoxAs (~73 kDa) differ in molecular mass, and Lcp sequences do not have a binding motif for covalent attachment of heme to the protein or other motifs that could be indicative for the binding of metal ions such as a cupin fold (13). This indicates that Lcps could be members of the family of cofactor-independent oxygenases (14, 15). Unfortunately, Lcp—similarly to RoxA—is difficult to express in quantities sufficient for protein purification

Received 16 April 2014 Accepted 31 May 2014

Published ahead of print 6 June 2014

Editor: M. J. Pettinari

Address correspondence to Dieter Jendrossek, dieter.jendrossek@imb.uni-stuttgart.de.

Copyright © 2014, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

doi:10.1128/AEM.01271-14

TABLE 1 Bacterial strains and plasmids used in this study

Strain or plasmid	Relevant characteristic(s) <sup>a</sup>	Source or reference
<b>Strains</b>		
<i>E. coli</i>		
JM109	Plasmid storage	
XL1-Blue	QuikChange transformation strain	Stratagene
<i>Xanthomonas</i> sp.		
35Y	Growth on poly( <i>cis</i> -1,4-isoprene) latex, clearing zone formation	16
35Y-CM	Cm <sup>r</sup> mutant of 35Y	18
35Y $\Delta$ roxA-attB (SN3727)	Chromosomal deletion of <i>roxA</i> in <i>Xanthomonas</i> sp. 35Y-CM, attB at former <i>roxA</i> site; no clearing zone formation on latex agar	4
35Y $\Delta$ roxA-attB pNH1- <i>roxA</i> -attP in chromosome (SN4230)	Expression of RoxA from rhamnose promoter in <i>Xanthomonas</i> sp. 35Y-CM; Km <sup>r</sup> Cm <sup>r</sup> ; clearing zone formation in the presence of rhamnose plus latex	4
35Y $\Delta$ roxA-attB pNH1- <i>lcp</i> -attP in chromosome (SN5343)	Expression of Lcp from rhamnose promoter in <i>Xanthomonas</i> sp. 35Y-CM; Km <sup>r</sup> Cm <sup>r</sup> ; positive fuchsin staining on latex overlay agar	This study
<b>Plasmids</b>		
pMK::lcp (SN5314)	GeneArt vector, source of <i>lcp</i> ; Km <sup>r</sup>	This study
pUC9::lcp (SN5339)	Cloning vector for <i>lcp</i> ; Ap <sup>r</sup>	This study
pNH1- <i>roxA</i> -attP (SN4230)	Coding sequence of <i>roxA</i> under rhamnose promoter control, attP site; Km <sup>r</sup>	4
pNH1- <i>lcp</i> -attP (SN5341)	Coding sequence of <i>lcp</i> under rhamnose promoter control, attP site; Km <sup>r</sup>	This study

<sup>a</sup> Cm<sup>r</sup>, chloramphenicol resistance; Ap<sup>r</sup>, ampicillin resistance; Km<sup>r</sup>, kanamycin resistance.

in wild-type strains, and the purification of Lcp in active form has not yet been described. In the present study, we expressed functional Lcp by chromosomal anchoring of *lcp* in a *Xanthomonas*  $\Delta$ roxA background. We developed a purification procedure for native Lcp and determined the biochemical properties of this novel type of extracellular rubber oxygenase. Comparison of the properties of RoxA and Lcp showed that both enzymes oxidatively cleaved rubber by different mechanisms.

## MATERIALS AND METHODS

**Bacterial strains, plasmids, and culture conditions.** Table 1 shows the strains and plasmids used in the present study. *Xanthomonas* sp. 35Y and mutant strains derived from the wild type were grown in lysogeny broth (LB) or in modified LB with a reduced concentration of yeast extract (10 g of tryptone, 5 g of NaCl, and 0.25 g of yeast extract/liter). To demonstrate clearing zones on opaque latex agar, *Xanthomonas* strains were grown on Tsuchii's mineral salts medium with 0.25% (vol/vol) purified rubber latex and 1.5% (wt/vol) agar at 30°C for 1 to 3 weeks (16). Polyisoprene latex (0.25% [wt/vol]) was kindly provided by Weber and Schaer (Hamburg, Germany) and was used after three washing steps in 0.1% (wt/vol) Nonidet P-40. For the purification of recombinant Lcp, the *Xanthomonas*  $\Delta$ roxA-attB strain with the chromosomally integrated pNH1::lcp plasmid was grown in modified LB medium (12 individual 1-liter cultures, each in a 3-liter Erlenmeyer flask) supplemented with 0.1% (wt/vol) l-rhamnose for 3 to 4 days at room temperature by continuous shaking. Cells were harvested (4°C) by centrifugation, and Lcp was purified from cell-free culture fluid as described below.

**Cloning of the *Streptomyces* sp. K30 *lcp* gene and expression of Lcp in *Xanthomonas* sp.** A DNA sequence that coded for the complete 407 amino acids of Lcp (including the Tat signal peptide) of *Streptomyces* sp. K30 (GenBank accession number AY387589) (17) was synthesized by GeneArt (Darmstadt, Germany). The codon usage was adapted to that of *Xanthomonas* sp. 35Y to enhance the probability of a high expression level in *Xanthomonas* sp. 35Y. The *lcp* gene was cloned via single NdeI and SacI sites into the pNH1 vector (Table 1), yielding pNH1::lcp, and transformed into *E. coli* S17-1. The pNH1::lcp construct was conjugatively transferred to the *Xanthomonas*  $\Delta$ roxA-attB strain as described previously for pNH1::roxA (4, 18). Integration of *lcp* into the chromosome at the former *roxA* site via Phi31 integrase-mediated recombination was verified by PCR and

DNA sequencing. Figure 1 shows the map and relevant characteristics of the pNH1::lcp plasmid.

**Purification of recombinant RoxA and Lcp.** RoxA was purified from the *Xanthomonas*  $\Delta$ roxA strain with chromosomally integrated *roxA* plasmid (pNH1::roxA) under rhamnose control as described previously (3, 4). Lcp was purified at room temperature using an ÄKTA fast-performance liquid chromatographic system (GE Healthcare, Uppsala, Sweden). In brief, the combined cell-free supernatants of 12 parallel 1-liter cultures of the *Xanthomonas*  $\Delta$ roxA strain with integrated pNH1::lcp plasmid were concentrated and buffer exchanged against 20 mM Tris-HCl (pH 8) via cross-flow ultrafiltration (Amersham KVICLAB cartridge, 10-kDa cut-off). The concentrate was then applied to a Q-Sepharose Fast Flow column (Q-FF 50/11, 210-ml bed volume) that had been equilibrated with 20 mM Tris-HCl (pH 8) at a flow rate of 8 ml/min. Lcp was bound to the column and—after a washing step with 1 volume of equilibration buffer—eluted by applying a step NaCl gradient (0 to 120 mM) in equilibration buffer. Lcp-containing fractions were identified by activity staining of

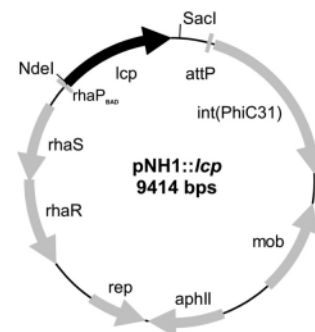


FIG 1 Map of the pNH1::lcp plasmid. The genes responsible for replication (*rep*), conjugative transfer (*mob*), chromosomal integration via *attB/attP* recombination [*int*(PhiC31)], l-rhamnose control (*rhaS*, *rhaR*), the selective marker (*aphII*), the rhamnose promoter (*rhaP<sub>BAD</sub>*) and latex clearing protein (*lcp*) are indicated.

Birke and Jendrosseck

selected fractions with Schiff reagent (see below) and by SDS-PAGE, combined and concentrated via ultrafiltration. A second chromatographic step was performed on a hydroxyapatite column. To this end, the Q-Sepharose pool was rebuffered by size-exclusion chromatography on a HiPrep Sephadex G25 26/10 column (bed volume, 53 ml) with potassium phosphate buffer (1 mM, pH 6.0) and subsequently loaded on a hydroxyapatite column (CHT5-I; bed volume, 20 ml) that had been equilibrated with the same buffer. Lcp was eluted with a linear gradient of 1 to 200 mM potassium phosphate (pH 6.0) at ~75 mM. Lcp fractions were pooled, concentrated via ultrafiltration (10-kDa cutoff), and stored on ice for up to 2 weeks or frozen ( $-70^{\circ}\text{C}$ ) for long-term storage.

**Assay of Lcp.** Lcp activity was assayed in several ways. (i) For rapid estimation of Lcp activity in fractions after a chromatographic step, 25  $\mu\text{l}$  of the respective fraction was incubated in 0.25 ml of assay buffer (100 mM potassium phosphate buffer [pH 7]) containing 0.2% polyisoprene latex at room temperature for 1 h. The presence of polyisoprene cleavage products was semiquantitatively indicated by the intensity of the developed purple color after the addition of 25  $\mu\text{l}$  of a fuchsin solution (2 g of fuchsin dissolved in 50 ml of glacial acetic acid, 10 g of  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ , 100 ml of 0.1 N HCl, and 50 ml of  $\text{H}_2\text{O}$ ) to the assay mixture, as described previously by Yikmis and Steinbüchel (19). (ii) Lcp activity was also determined by high-pressure liquid chromatography (HPLC) detection of cleavage products. The reaction mixture contained 100  $\mu\text{l}$  of purified Lcp (1 to 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), rubber latex (0.2% [wt/vol] emulsion), and potassium phosphate buffer (100 mM; pH 7.0) in a total volume of 1 ml. The reaction was performed at room temperature, at  $30^{\circ}\text{C}$ , or at  $37^{\circ}\text{C}$  (as indicated) for 2 h in a 15-ml Falcon tube. The mixture was extracted with ethyl acetate (1.5 ml); 1 ml of the mixture was dried, dissolved in 100  $\mu\text{l}$  of methanol, and then subjected to HPLC analysis. An RP8 HPLC column (12 by 4 mm, 5- $\mu\text{m}$  particle size) was operated at 0.7 ml/min with water (A) and methanol (B) as mobile phases. The concentration of B was increased from 50% (vol/vol) to 100% (vol/vol) within 15 min; products were detected at 210 nm. Purified ODTD was used as a standard and eluted after 15.3 min. Lcp-derived cleavage products eluted after ODTD (18.8 min and later). Mixtures without Lcp or with heat-inactivated Lcp (10 min  $95^{\circ}\text{C}$ ) served as controls. (iii) Lcp activity was also determined by monitoring the consumption of molecular oxygen in a YSI model 5300 biological oxygen monitor (Scientific Division, Yellow Springs Instrument Co., Inc., Yellow Springs, OH) equipped with an oxygen electrode. (iv) Lcp activity *in vivo* was also demonstrated by the cultivation of recombinant *Xanthomonas*  $\Delta\text{roxA}::\text{attB}$  strains harboring chromosomally anchored lcp under rhamnose control on mineral salts agar plates with an opaque overlay agar (~8 ml) of polyisoprene latex (0.25% [wt/vol] in agar) and 0.1% (wt/vol) L-rhamnose prepared as described previously (6). Lcp-expressing strains formed (after a prolonged incubation period at room temperature) a small zone around arising colonies that could be stained with a solution of Schiff's reagent (for the composition, see above) and indicated the formation of keto-/aldehyde group-containing cleavage products. The colonies of a *Xanthomonas*  $\Delta\text{roxA}$  clone (negative control) did not form any halos. Purified RoxA was assayed as described previously (3, 4) or by the methods described for Lcp above.

**HPLC-mass spectrometry (MS).** Lcp-catalyzed polyisoprene cleavage products were separated on an RP8 HPLC column (12 by 4 mm; 5- $\mu\text{m}$  particle size; flow rate, 0.5 ml/min) that was directly coupled with an Agilent 6130 series quadrupole LC/MS system (buffer A, water containing 0.1% [vol/vol] formic acid; buffer B, methanol, HPLC grade; stating condition 50% B, gradient to 100% B within 21 min).

**Inhibitor studies and stability assays. (i) Inhibitor assays.** To examine the effect of potential inhibitors on Lcp activity, 1 mM concentrations of each test compound (unless stated otherwise) were added to the activity assay described for assay ii in the "Assay of Lcp" section above before the reaction was started by the addition of Lcp.

**(ii) Stability assays.** RoxA or Lcp were diluted in potassium phosphate buffer (100 mM, pH 7) to a final concentration of 0.05 mg/ml. The respective enzyme solutions were incubated at room temperature or at  $37^{\circ}\text{C}$

for up to 22 h. After the indicated time intervals, 100- $\mu\text{l}$  portions of RoxA or Lcp were used for activity assay as described for assay ii in the "Assay of Lcp" section above. The activity assay mixture was incubated for 2 h at room temperature, at  $30^{\circ}\text{C}$ , or at  $37^{\circ}\text{C}$ . For each time interval, the activity of the enzymes was determined by integration of the corresponding peak after HPLC analysis (RoxA, ODTD peak at 15.3 min; Lcp,  $\text{C}_{35}$  oligoisoprenoid peak at 22.9 min).

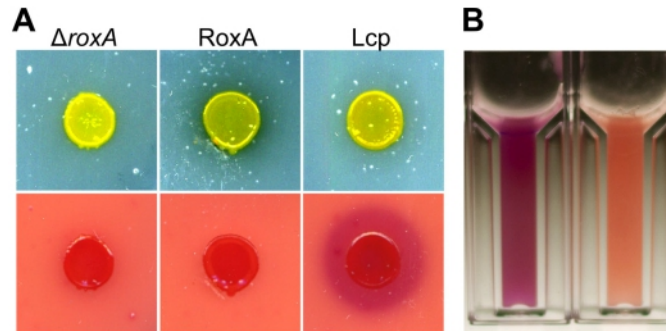
**Other techniques.** The protein concentration was determined by the bicinchoninic acid (BCA) method using a BCA kit. The concentrations of purified Lcp samples were also determined from the molar extinction coefficients of Lcp at 280 nm ( $\epsilon_{280} = 68,000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ). Heme staining for pseudoperoxidase activity was conducted as described previously (3) after the separation of proteins via nonreducing SDS-PAGE. The metal content of purified Lcp was determined using inductively coupled plasma-MS (ICP-MS) by the Spuren-Analytisches Laboratorium Dr. Baumann (Germany).

## RESULTS

**Construction of a *Xanthomonas* sp. strain for stable expression of recombinant Lcp from *Streptomyces* sp. K30.** All attempts to express *Xanthomonas* RoxA in substantial amounts in recombinant *Escherichia coli* even in the presence of cytochrome maturation genes or in other heterologous hosts were unsuccessful (for details, see our previous report [4]). We assumed that the synthesis of functional RoxA requires the presence of some kind of maturation system that is absent or is not correctly working in *E. coli*. Therefore, expression of RoxA was performed by homologous expression in a  $\Delta\text{roxA}$  background. A polyisoprene-independent induction of RoxA expression was achieved by anchoring the *roxA* gene into the chromosome under the control of a L-rhamnose-inducible promoter. This enabled us to shorten the cultivation time of the expression strain from ~2 weeks in the presence of natural rubber latex to 3 to 4 days in the presence of L-rhamnose.

Substantial expression of active Lcp from *Streptomyces* sp. K30 in heterologous hosts such as *E. coli* or *Pseudomonas putida* strains was also not possible, a finding similar to our experience with RoxA. Only in species of the same genus, i.e., *Streptomyces lividans* and *Streptomyces erythraea*, was the expression of Lcp successful (12). However, the amount of produced Lcp was low and apparently not suited for purifying Lcp in sufficient quantities. Since our *Xanthomonas*  $\Delta\text{roxA}$ (pNH1::*roxA*) strains produced 2 to 5 mg of RoxA per liter of culture fluid, as well as for RoxA orthologs from myxobacteria, we speculated that *Xanthomonas* sp. 35Y could be a suitable host for the heterologous expression of Lcp. To this end, we cloned a synthetic DNA sequence that coded for the entire amino acid sequence of Lcp from *Streptomyces* sp. K30, including the signal sequence for TAT-dependent secretion (17), into our pNH1 plasmid. The resulting pNH1::lcp plasmid was chromosomally anchored in a *Xanthomonas*  $\Delta\text{roxA}$  background via  $\Phi\text{C}31$  integrase-mediated *attB/attP* recombination at the site of the former *roxA* locus (for further details, see Materials and Methods and also reference 4). When the recombinant *Xanthomonas*  $\Delta\text{roxA}$ (pNH1::lcp) strain was grown on opaque latex overlay agar that had been supplemented with 0.1% L-rhamnose, the arising colonies produced small clearing zones and could be positively stained with fuchsin solution (Fig. 2A). The negative control (i.e., the *Xanthomonas*  $\Delta\text{roxA}$  strain without pNH1::lcp) produced no clearing zone and could not be stained with fuchsin. We concluded that the *Xanthomonas*  $\Delta\text{roxA}$ (pNH1::lcp) strain expressed and secreted functional Lcp protein. In agreement with this, a new protein band appeared after SDS-PAGE of cell-free supernatants





**FIG 2** Growth of *Xanthomonas* sp. 35Y on latex agar and staining of degradation products by Schiff reagent. (A)  $\Delta$ roxA *Xanthomonas* sp. (left),  $\Delta$ roxA *Xanthomonas* harboring pNH1::roxA (middle), and  $\Delta$ roxA *Xanthomonas* harboring pNH1::lcp (right) were grown on solid latex plates (top row) for 3 weeks at room temperature and subsequently stained with Schiff reagent (bottom row). There was no fuchsin staining for RoxA (bottom middle) because of uptake and the use of degradation product ODTD. Note the clearing zone for RoxA (top middle) and stained halo for Lcp (bottom right), presumably because of insufficient uptake of Lcp-derived degradation products that are considerably larger than ODTD. (B) Activity assay for purified Lcp after staining with Schiff reagent (cuvette on the left with Lcp, cuvette on the right without Lcp).

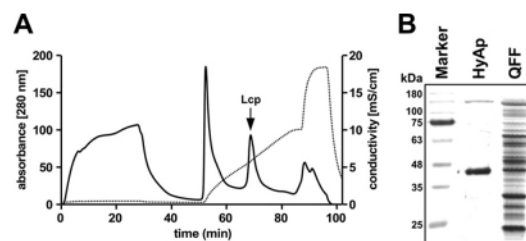
at an apparent molecular mass of  $\sim$ 40 kDa, and this value corresponded to the theoretical value for mature Lcp (41 kDa). Moreover, rubber-cleaving activity was detected in the cell-free culture fluid using the fuchsin assay or the HPLC method, whereas no activity was found in culture fluids of control cells (data not shown).

**Development of a purification procedure for Lcp.** Preliminary experiments showed that Lcp is able to bind to ion exchange materials Q-Sepharose and hydroxyapatite and to elute from the column matrices by raising the concentrations of NaCl or potassium phosphate, respectively. Based on these results, a three-step purification protocol was developed as described in Materials and Methods and was applied to purify Lcp from combined cell-free culture fluids (the total culture volume was 12 liters) of a *Xanthomonas*  $\Delta$ roxA(pNH1::lcp) culture on modified LB-rhamnose medium. Due to the low expression of Lcp at 30°C (probably due to the instability of Lcp at this temperature), the cells were grown at room temperature. The hydroxyapatite step turned out to be very efficient, and a sharp Lcp-containing peak was obtained at  $\sim$ 75 mM potassium phosphate (buffer pH, 6) (Fig. 3A). In total, 1.5 mg of Lcp was obtained after the last purification step. SDS-PAGE of the final Lcp fraction indicated that Lcp was almost homogeneous, and only a few minor contaminating bands were detected after application of the sensitive silver-staining method (Fig. 3B). RoxA was purified from a *Xanthomonas*  $\Delta$ roxA(pNH1::roxA) culture as described previously (4).

**RoxA and Lcp are indirectly responsible for clearing zones on opaque latex agar.** *Xanthomonas* sp. 35Y and *Streptomyces* sp. K30 both belong to the group of rubber-degrading bacteria that produce clearing zones during growth on opaque polyisoprene latex-containing media (1, 9, 20). Other rubber-degrading species, such as *Gordonia westfalica* and *Gordonia polyisoprenivorans*, grow adhesively on solid rubber and do not form clearing zones (10, 21), although they have *lcp* genes in their genomes. To investigate whether Lcp and/or RoxA are responsible for clearing zone formation, we applied purified Lcp and purified RoxA (5  $\mu$ g of each) to an opaque polyisoprene agar plate and incubated the plate at room temperature. Remarkably, no clearing zones were

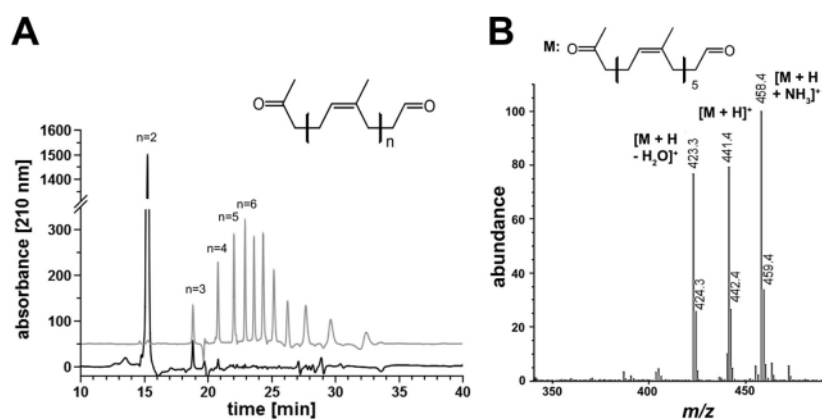
formed by either Lcp or by RoxA, even if the plates were incubated for longer times. However, the enzymes had cleaved polyisoprene, as shown by positive staining with Schiff reagent. We conclude that the RoxA- and Lcp-derived degradation products contribute to the opaqueness of the plate because of the poor solubility of the cleavage products. Only if consuming cells were present nearby did a clearing zone become visible. In conclusion, clearing zones on opaque latex media are formed as a consequence of two events: the secretion of an active rubber-degrading enzyme and the uptake and consumption of the cleavage product by the cells.

**RoxA and Lcp cleave polyisoprene to oligo-isoprenoids with different numbers of isoprene units.** Polyisoprene latex was incubated with purified RoxA or Lcp (each, 5  $\mu$ g/ml) for 2 h at 37°C (RoxA) or room temperature (Lcp). In both cases, a purple color developed upon staining of the assay mixtures with Schiff reagent and indicated the presence of carbonyl groups in the products



**FIG 3** (A) Elution profile of Lcp-containing Q-Sepharose pool on hydroxyapatite. A 55-ml portion of a concentrated Lcp pool after chromatography on Q-Sepharose was applied to a 20-ml hydroxyapatite column that had been equilibrated with 1 mM potassium phosphate buffer (pH 6) and eluted with a 1 to 200 mM potassium phosphate gradient in equilibration buffer. Solid and dotted lines represent the absorbance at 280 nm and conductivity, respectively. Note that the second sharp peak of the gradient contained Lcp (arrow) and illustrates the separation power of hydroxyapatite. (B). SDS-PAGE of Lcp-containing fractions at different stages of purification. The gel was stained with silver. Molecular mass markers are indicated. HyAp, hydroxyapatite step; QFF, Q-Sepharose Fast Flow step.

Birke and Jendrossek



**FIG 4** Separation of RoxA and Lcp-derived polyisoprene cleavage products. Polyisoprene latex was cleaved by RoxA and Lcp (each 5  $\mu\text{g}$ ) for 2 h at room temperature. Cleavage products were extracted with ethyl acetate, dissolved in methanol, and separated on a reversed-phase  $\text{C}_8$  HPLC column. (A) A UV (210-nm) absorbance spectrum of RoxA products (black line) and of Lcp products (gray line) elevated artificially by 50 absorption units for better visibility is shown. Note that of at least 11 species of degradation products, the first 4 were identified by MS analysis. The peaks at 23.6 min or later did not give signals in ESI-MS analysis, probably because of poor ionization and/or poor acceleration. The figure generally shows difference spectra (spectrum in the presence of enzyme minus the spectrum of the same experiment without the added enzyme). (B) HPLC-MS of Lcp-derived polyisoprene cleavage products. A part of the mass spectrum of the 22.0 min peak is shown. The  $m/z$  values of prominent signals are assigned. The minor side peaks at  $m/z$  424.3, 442.4, and 459.4 represent  $^{13}\text{C}$  isotope peaks.

(Fig. 2B). No purple color was produced when heat-treated (10 min, 95°C) RoxA or Lcp was used. The RoxA- and Lcp-catalyzed cleavage products were solvent extracted with ethyl acetate, dissolved in methanol, and then separated by HPLC on a reversed-phase  $\text{C}_8$  column. A series of at least 11 different product peaks were detected after cleavage of the rubber by purified Lcp (18.8, 20.8, 22.0, 22.9, 23.6, 24.3, 25.2, 26.2, 27.6, 29.4, and 32.0 min), whereas only one major peak at 15.3 min was detected in RoxA-treated samples (Fig. 4A). The latter corresponded to ODTD, the well-known major cleavage product of RoxA (1). None of the peaks occurred without enzymes or with heat-treated enzymes. When oxygen was removed from the assay mixture (by flushing with nitrogen gas and subsequent incubation under nitrogen atmosphere), no cleavage products could be detected by HPLC analysis. These results confirmed that both RoxA and Lcp require molecular oxygen for the cleavage reaction.

To determine the nature of the compounds behind the observed peaks of the Lcp-catalyzed reaction, the HPLC column was coupled with a mass spectrometry unit using the electrospray ionization (ESI)-MS technique. The peaks at 18.8, 20.8, 22.0, and 22.9 min corresponded to  $m/z$  values of 305, 373, 441, and 509, respectively. These values have an  $m/z$  increment of 68, and this mass difference matches the mass of one isoprene unit in polyisoprene. The  $m/z$  values of 305, 373, 441, and 509 correspond to protonated  $[\text{M}+\text{H}]^+$  oligo-isoprenoids with four ( $\text{C}_{20}$ ), five ( $\text{C}_{25}$ ), six ( $\text{C}_{30}$ ), or seven ( $\text{C}_{35}$ ) isoprene units, with the general structure  $\text{CH}_3-\text{CO}-\text{CH}_2-[\text{CH}_2-\text{CH}=\text{C}(\text{CH}_3)-\text{CH}_2]_n-\text{CH}_2-\text{CHO}$ , and all of them are larger than ODTD ( $\text{C}_{15}$ ;  $[\text{M}+\text{H}]^+$ ,  $m/z = 237$ ) (Fig. 4B). When the Lcp-derived HPLC-ESI-MS spectrum was analyzed for other peaks that differed in  $m/z$  values from the above-mentioned values by 68, a minor peak at  $m/z$  of 237 ( $[\text{M}+\text{H}]^+$ ) corresponding to ODTD was also detected in the mass spectrum but was not visible in the UV spectrum. Apparently, ODTD is a minor trace product of Lcp-catalyzed polyisoprene

cleavage that is only detectable by the sensitive ESI-MS method. The structure of the polyisoprene degradation product ODTD had been previously confirmed by nuclear magnetic resonance spectroscopy (1). At higher  $m/z$  values ( $>500$ ) and at elution times where additional Lcp-derived UV product peaks were detected (23.6 min, 24.3 min, and later [see Fig. 4A]), no mass signals or only minor mass signals could be detected, and a direct proof of  $\text{C}_{40}$  and higher oligo-isoprenoids failed. We assume that the ionization of large oligo-isoprenoids is less efficient and/or that the mobilities of the respective higher oligo-isoprenoid ions were too poor to be detected. When purified RoxA was used to cleave polyisoprene, only one major peak at 15.3 min was detected by HPLC analysis, and this peak corresponded to protonated ODTD with an  $m/z$  value of 237, as described earlier (Fig. 4A). The minor peaks at 18.8 and 20.8 min correspond to ODTD analogs with one or two more isoprene units and represent minor products as described previously (1).

The Lcp-derived peaks at  $m/z$  values of 305 (18.8 min), 373 (20.8 min), 441 (22.0 min), and 509 (22.9 min) had side peaks with  $m/z$  values that were higher by 17 or lower by 18 (as shown, for example, for the  $m/z$  441 peak in Fig. 4B). These side peaks corresponded to the respective ammonium  $[\text{M}+\text{NH}_3]^+$  adduct molecules or to molecules in which a water molecule was removed  $[\text{M}+\text{H}-\text{H}_2\text{O}]^+$ . Analog side peaks were also observed for RoxA-derived ODTD earlier (22). Extension of the assay time or use of larger amounts of Lcp in the assay mixture did not result in a detectable difference of the product pattern. To identify the smallest degradation products of Lcp-catalyzed rubber cleavage, we isolated the cleavage products after incubation of polyisoprene latex with purified Lcp by solvent extraction. The products were emulsified in assay buffer (sample 1) and incubated with fresh Lcp at room temperature. After 2 h, the products were solvent extracted (sample 2), and both samples were analyzed by HPLC. The same 11 peaks displayed in Fig. 4A were detected in sample 1 and cor-

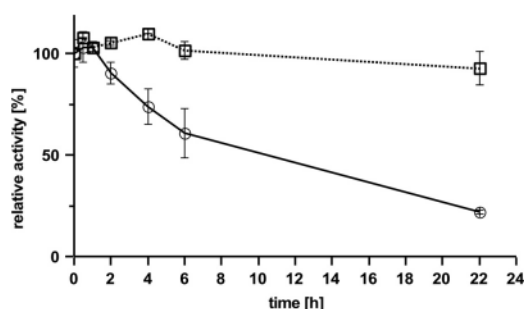


FIG 5 Stability of RoxA and Lcp. RoxA (□) and Lcp (○) were incubated at 37°C for various times, as indicated, before the residual activity was determined. 100% activity corresponds to an area of 1,280 (Lcp, 22.9-min peak) or 17,500 (RoxA, ODTD peak).

responded to the C<sub>20</sub> tetra-isoprenoid and higher oligo-isoprenoids. Sample 2 revealed the same peaks, but the peak areas of the C<sub>20</sub> tetra- and the C<sub>25</sub> penta-isoprenoids were significantly larger (i.e., about double the peak areas) than in sample 1. We identified no significant increase in the trace amounts of ODTD (C<sub>15</sub>) or other smaller degradation products in the UV spectrum. We conclude that Lcp produces a large series of degradation products of different chain lengths and that the tetra-isoprenoid analog (C<sub>20</sub> oligo-isoprenoid) is the smallest main end product.

When we added purified RoxA to the extracted product mixture of Lcp-catalyzed polyisoprene cleavage products and incubated the mixture for 2 h at room temperature in buffer, we determined that the C<sub>20</sub> and higher oligo-isoprenoids had disappeared and that ODTD was the major end product. Neither RoxA nor Lcp was able to cleave ODTD to smaller products (not shown). In summary, the main end products of Lcp-catalyzed polyisoprene cleavage are ODTD analogs with four or more isoprene units and thus are considerably larger than RoxA-derived ODTD (tri-isoprenoid).

**Properties of purified Lcp.** In contrast to RoxA, concentrated solutions of purified Lcp showed no red color, and no pseudoperoxidase activity was detected by the application of heme staining to SDS-PAGE-separated Lcp. In experiments with less-purified Lcp preparations, concentrated solutions revealed a minor absorption of ~411 nm by UVvis spectroscopy. Reduction of such preparations by dithionite gave absorption maxima at approximately 429, 528, and 561 nm that are typical for reduced *c*-type cytochromes, and in SDS-PAGE analyses a minor contaminating band with pseudoperoxidase activity appeared below the 20-kDa standard band. This band corresponded to a *Xanthomonas* cytochrome and was also present in less-purified RoxA solutions (unpublished observations). Our data, along with the absence of a heme-binding motif in the amino acid sequence of Lcp, showed the absence of covalently attached heme groups in Lcp. Together with the differences in the amino acid sequences and in the determined cleavage products, our results confirmed that RoxA and Lcp fundamentally differ from each other.

Routinely, we performed activity assays by quantitative determination of cleavage products via HPLC. The HPLC assay has the advantage that many samples can be assayed simultaneously. We selected the area of the 22.9-min peak (C<sub>35</sub> hepta-isoprenoid) or

#### Rubber Oxygenase and Latex Clearing Protein

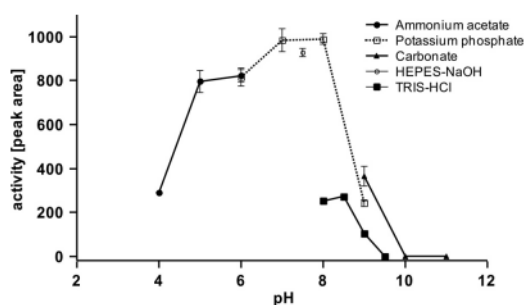


FIG 6 pH profile of Lcp-catalyzed cleavage of polyisoprene. Activity assays were performed as described in Materials and Methods using different buffer systems: 50 mM acetate buffer (●), 0.1 M potassium phosphate buffer (□), 50 mM HEPES buffer (○), 0.1 M Tris-HCl (■), or 0.1 M carbonate buffer (▲). The area of the major product peak after HPLC analysis at 22.9 min is shown.

combined the areas of the first four product peaks (at 18.8 to 22.9 min, corresponding to C<sub>20</sub> to C<sub>35</sub> terpenoids) for product quantification in the case of Lcp assay and the area of the C<sub>15</sub>-ODTD peak in the case of RoxA. A linear dependence of the product area peak was determined for purified Lcp ( $\leq 5 \mu\text{g}$  of Lcp/ml) and from the incubation time up to 2 h at room temperature (data not shown). RoxA is a very stable enzyme, and no significant reduction in activity was determined after incubation of RoxA at 37°C for 22 h. In contrast, Lcp activity decreased by incubation at 37°C by 80% within the 22 h of incubation time (Fig. 5). Lcp was less inactivated at room temperature (~70%) but was almost stable during storage on ice ( $\leq 5\%$  inactivation).

Similarly to RoxA, no addition of cofactors was necessary for the Lcp-catalyzed cleavage reaction. Besides the two substrates, polyisoprene and dioxygen, only appropriate physical conditions (aqueous buffer with a pH of around 7; temperature, ca. 25°C) were necessary. Maximum rubber-cleaving activities were determined between pH 6 and 8 in potassium phosphate buffer or in HEPES buffer (Fig. 6). Other buffers (Tris, carbonate-ammonium acetate, and glycylglycine) and pH values below pH 6 or above 8.5 resulted in only poor activities. Alternatively, we determined the Lcp activity by monitoring the decrease in dissolved dioxygen using an oxygen electrode. A time- and Lcp-dependent decrease in dissolved oxygen was determined, and a specific activity of 0.70  $\mu\text{mol}$  of consumed dioxygen  $\text{min}^{-1}$  ( $\text{mg}$  of purified Lcp) $^{-1}$  was calculated at room temperature (22°C). Purified RoxA had a lower activity of ~0.26  $\mu\text{mol}$   $\text{min}^{-1}$  ( $\text{mg}$  of purified RoxA) $^{-1}$  at room temperature. At 30°C, the specific activity of RoxA was almost double as high (0.48  $\mu\text{mol}$  of consumed dioxygen  $\text{min}^{-1}$   $\text{mg}^{-1}$ ).

Low-molecular-weight substrate analogs with isoprenoid structure such as squalene (1,4-*trans*-isoprenoid), carotenoids, or  $\alpha$ -tocopherol were not cleaved by Lcp. When polyisoprene latex was cleaved by Lcp in the presence of carotenoids or  $\alpha$ -tocopherol (at a 1 mM end concentration), an inhibition of the cleavage reaction by ~40% was determined (Fig. 7). Squalene inhibited the cleavage of polyisoprene only a little (~90% residual activity). Reducing agents, such as dithiothreitol (DTT), strongly inhibited Lcp. The inhibition by DTT is remarkable because Lcp has no cysteine residues and therefore cannot have any essential disulfide bridges. Imidazole inhibited Lcp by 35 and 85% at 1 and 10 mM,

Birke and Jendrossek

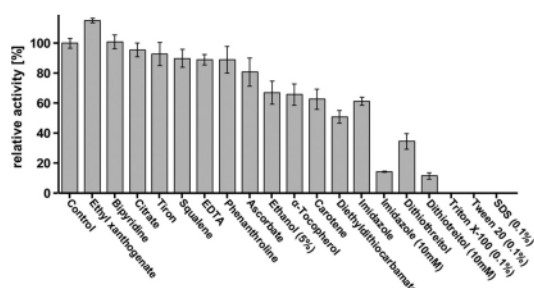


FIG 7 Effect of potential inhibitors on Lcp activity after a 1 mM concentration (unless stated otherwise) of the test compound was added to the assay mixture before the reaction was started by addition of purified Lcp protein. 100% value corresponds to 1,260 peak area in HPLC.

respectively. Chelators (at 1 mM) such as sodium citrate, EDTA, ethyl xanthogenate, 4,5-dihydroxybenzene-1,3-disulfonate (tiron), 1,10-phenanthroline, or potassium ethyl 2,2'-bipyridine also had only minor effects on Lcp activity, and this indicated that Lcp activity is unlikely to depend on essential (metal) cations. Only sodium diethyl dithiocarbamate resulted in substantial inhibition at 1 mM (50% residual activity). Determination of the metal content of purified Lcp by ICP-MS did not result in the detection of iron, copper, or another transition metal (vanadium to zinc tested). However, because of a low protein concentration, the detection limits were relatively high, and the presence of up to 0.8 mol of Fe per mol of Lcp (0.2 mol of Cu per mol of Lcp) could not be excluded. Strong inhibitory effects were determined for ionic and nonionic detergents such as SDS, Triton X-100, or Tween 20. For the effects of other potential inhibitors, see Fig. 7.

## DISCUSSION

In this study, we succeeded to functionally express and purify Lcp of a rubber-degrading strain, *Streptomyces* sp. K30, in a  $\Delta$ roxA background of *Xanthomonas* sp. From the combined culture fluids of a 12-liter culture, ~1.5 mg of purified Lcp was obtained. A specific activity of 0.70 U/mg (consumed oxygen determined) was determined for purified Lcp at room temperature that was slightly higher than that obtained for RoxA at 30°C (0.48 U/mg). These low specific activities are in agreement with the relatively slow growth of rubber-degrading bacteria on polyisoprene (23, 24). The growth of many rubber-degrading bacteria takes weeks to months, especially if solid rubber pieces with small surface areas are used.

RoxA and Lcp have in common that both enzymes oxidatively attack the double bonds of rubber molecules to give cleavage products with aldehyde ( $-\text{CH}_2-\text{CHO}$ ) and keto ( $\text{CH}_3-\text{CO}-\text{CH}_2-$ ) end groups and a certain number of isoprene units in between (1, 16, 25). RoxA produces only one major polyisoprene cleavage product (ODTD;  $\text{C}_{15}$  tri-isoprenoid); in contrast, Lcp cleaves rubber to multiple products ranging from  $\text{C}_{20}$  tetra-isoprenoid to at least  $\text{C}_{35}$  hepta-isoprenoid. Presumably, Lcp can also produce significantly larger degradation products that were not detectable by HPLC-MS analysis or were lost by the poor solubility during product extraction with ethyl-acetate and solubilization in methanol. Extension of the incubation time or addition of fresh Lcp enzyme during a polyisoprene cleavage re-

action did not result in the appearance of degradation products smaller than the  $\text{C}_{20}$  tetra-isoprenoid and confirmed that the  $\text{C}_{20}$  tetra-isoprenoid is the smallest Lcp product (apart from the tiny traces of ODTD that were only seen in the highly sensitive mass-spec analysis). Previous determination of rubber intermediates from an Lcp-expressing wild-type culture of *Nocardia farcinica* E1 had revealed a large range of degradation products having molecular masses from approximately 900 to 4,500 Da and terminal aldehyde ( $-\text{CH}_2-\text{CHO}$ ,  $m/z$  43) and keto ( $\text{CH}_3-\text{CO}-\text{CH}_2-$ ,  $m/z$  57) end groups (25). The same terminal aldehyde and keto end groups that had been previously determined for rubber cleavage products of RoxAs of *Xanthomonas* sp. 35Y and other Gram-negative bacteria (1, 6, 16) were also present in the degradation products of Lcp from *Streptomyces* sp. K30. We conclude that cleavage of polyisoprene by RoxAs and by Lcps generally occurs at the double bonds and that cleavage products only differ in the number of intact isoprene units between the terminal  $-\text{CH}_2-\text{CHO}$  and  $\text{CH}_3-\text{CO}-\text{CH}_2-$  groups. An explanation for why Ibrahim et al. (25) did not identify the  $\text{C}_{20}$  to  $\text{C}_{35}$  oligo-terpenoid degradation products among the rubber degradation intermediates of whole-cell cultures might be the uptake and consumption of the smallest degradation products by the bacteria.

The different product spectra of Lcp compared to RoxA show that the active sites of both enzymes are different. The latter is deeply buried in the enzyme structure (5) and has no direct open access to the protein surface. An exo-type cleavage and a molecular ruler are postulated for RoxA to explain the uniform spacing between two adjacent cleavage sites of the polymeric substrate. Such a molecular ruler obviously does not exist in Lcp, and the variability of different cleavage products is in agreement with an endo-type cleavage mechanism. We assume that the active site of Lcp is more surface exposed and should be located close to the substrate binding site. The latter should comprise at least the length of the smallest degradation product ( $\text{C}_{20}$  isoprenoid). Depending on the binding of the polymer to the protein, the substrate can be cleaved at different relative positions with respect to the end of the polymer molecule, resulting in cleavage products that differ largely in the number of isoprene units.

The second major difference between RoxA and Lcp is the absence of essential cofactors in Lcp. We excluded the presence of covalently attached heme in purified Lcp, and we found no evidence for the dependence of Lcp activity from metals. We conclude that Lcp activity does not depend on known cofactors and thus differs from Fe-containing (heme) RoxA.

Lcp catalyzes the oxidative cleavage of polyisoprene with dioxygen as a cosubstrate. A direct reaction of molecular oxygen (triplet state) with a singlet organic substrate is not possible ("spin forbidden") (26). Therefore, the Lcp-catalyzed oxygenase reaction should require either the presence of a transition metal resulting in orbital overlapping or the transfer of an electron to oxygen (e.g., by a reduced cofactor) to give an (enzyme-bound) reduced oxygen species. However, we found no evidence for the presence of a metal ion or a cofactor in Lcp, suggesting that Lcp might be a member of the growing group of so-called cofactor-independent oxygenases. (For reviews on cofactor-independent oxygenases, see references 14 and 15.) In this case, Lcp should be able to abstract a proton from the substrate to give a carbanion. The carbanion could then transfer an electron to dioxygen, and this would result in the formation of a substrate radical and a superoxide radical. Recombination of the substrate radical with the superoxide

ide is a spin-allowed process and would give a peroxide intermediate. A prominent example for a cofactor-independent dioxygenase is 3-hydroxy-4-oxoquinoline 2,4-dioxygenase (Hod) from *Arthrobacter* sp. R61a (27, 28). Analysis of the three-dimensional structure of Hod and the biochemical data of His251Ala Homoteins showed that His251 is the catalytically active base that accepts a proton from the substrate. The formed substrate anion then reacts with molecular oxygen without the need for a metal or a cofactor (29–31). Hod was partially inhibited by imidazole (as Lcp) in a concentration-dependent manner. However, the mechanism of inhibition remained unknown (29). Interestingly, Lcp proteins of different species have two conserved His residues (His198 and His203 in Lcp of *Streptomyces* sp. K30) (9) that are possible candidates to function as a base for proton abstraction from the substrate. The assumption of a histidine residue as the active site would be in agreement with the determined preferred pH value of Lcp between 6 and 8. Future research should target these residues to find experimental evidence for the involvement of these residues in catalysis.

#### ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by a grant of the Deutsche Forschungsgemeinschaft to D.J.

We thank Weber and Schaer company for providing polyisoprene and T. Gassner for assistance in some experiments. We also thank B. Nebel (Institute of Technical Biochemistry) for assistance with the HPLC-MS analysis and J. Altenbuchner (Institute of Industrial Genetics) for assistance with the experimental setup in Lcp expression.

#### REFERENCES

- Braaz R, Fischer P, Jendrossek D. 2004. Novel type of heme-dependent oxygenase catalyzes oxidative cleavage of rubber (poly-*cis*-1,4-isoprene). *Appl. Environ. Microbiol.* 70:7388–7395. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.70.12.7388-7395.2004>.
- Jendrossek D, Reinhardt S. 2003. Sequence analysis of a gene product synthesized by *Xanthomonas* sp. during growth on natural rubber latex. *FEMS Microbiol. Lett.* 224:61–65. [http://dx.doi.org/10.1016/S0378-1097\(03\)00424-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0378-1097(03)00424-5).
- Schmitt G, Seiffert G, Kroneck PMH, Braaz R, Jendrossek D. 2010. Spectroscopic properties of rubber oxygenase RoxA from *Xanthomonas* sp., a new type of dihaem dioxygenase. *Microbiology* 156:2537–2548. <http://dx.doi.org/10.1099/mic.0.038992-0>.
- Birke J, Hamsch N, Schmitt G, Altenbuchner J, Jendrossek D. 2012. Phe317 is essential for rubber oxygenase RoxA activity. *Appl. Environ. Microbiol.* 78:7876–7883. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.02385-12>.
- Seidel J, Schmitt G, Hoffmann M, Jendrossek D, Einsle O. 2013. Structure of the processive rubber oxygenase RoxA from *Xanthomonas* sp. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110:13833–13838. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1305560110>.
- Birke J, Röther W, Schmitt G, Jendrossek D. 2013. Functional identification of rubber oxygenase (RoxA) in soil and marine myxobacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 79:6391–6399. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.02194-13>.
- Imai S, Ichikawa K, Muramatsu Y, Kasai D, Masai E, Fukuda M. 2011. Isolation and characterization of *Streptomyces*, *Actinoplanes*, and *Methylibium* strains that are involved in degradation of natural rubber and synthetic poly(*cis*-1,4-isoprene). *Enzyme Microb. Technol.* 49:526–531. <http://dx.doi.org/10.1016/j.enzmictec.2011.05.014>.
- Imai S, Yoshida R, Endo Y, Fukunaga Y, Yamazoe A, Kasai D, Masai E, Fukuda M. 2013. *Rhizobacter gummiphilus* sp. nov., a rubber-degrading bacterium isolated from the soil of a botanical garden in Japan. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 59:199–205. <http://dx.doi.org/10.2323/jgam.59.199>.
- Rose K, Tenberge KB, Steinbüchel A. 2005. Identification and characterization of genes from *Streptomyces* sp. strain K30 responsible for clear zone formation on natural rubber latex and poly(*cis*-1,4-isoprene) rubber degradation. *Biomacromolecules* 6:180–188. <http://dx.doi.org/10.1021/bm0496110>.
- Bröker D, Dietz D, Arenskötter M, Steinbüchel A. 2008. The genomes of the non-clearing-zone-forming and natural-rubber-degrading species *Gordonia polyisoprenivorans* and *Gordonia westfalica* harbor genes expressing Lcp activity in *Streptomyces* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 74:2288–2297. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.02145-07>.
- Rose K, Steinbüchel A. 2005. Biodegradation of natural rubber and related compounds: recent insights into a hardly understood catabolic capability of microorganisms. *Appl. Environ. Microbiol.* 71:2803–2812. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.71.6.2803-2812.2005>.
- Yikmis M, Steinbüchel A. 2012. Historical and recent achievements in the field of microbial degradation of natural and synthetic rubber. *Appl. Environ. Microbiol.* 78:4543–4551. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.00001-12>.
- Fetzner S. 2012. Ring-cleaving dioxygenases with a cupin fold. *Appl. Environ. Microbiol.* 78:2505–2514. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.07651-11>.
- Fetzner S. 2007. Cofactor-independent oxygenases go it alone. *Nat. Chem. Biol.* 3:374–375. <http://dx.doi.org/10.1038/nchembio0707-374>.
- Fetzner S, Steiner RA. 2010. Cofactor-independent oxidases and oxygenases. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 86:791–804. <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-010-2455-0>.
- Tsuchii A, Takeda K. 1990. Rubber-degrading enzyme from a bacterial culture. *Appl. Environ. Microbiol.* 56:269–274.
- Yikmis M, Arenskötter M, Rose K, Lange N, Wernsmann H, Wiefel L, Steinbüchel A. 2008. Secretion and transcriptional regulation of the latex-clearing protein, Lcp, by the rubber-degrading bacterium *Streptomyces* sp. strain K30. *Appl. Environ. Microbiol.* 74:5373–5382. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.01001-08>.
- Hamsch N, Schmitt G, Jendrossek D. 2010. Development of a homologous expression system for rubber oxygenase RoxA from *Xanthomonas* sp. *J. Appl. Microbiol.* 109:1067–1075. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2672.2010.04732.x>.
- Yikmis M, Steinbüchel A. 2012. Importance of the latex-clearing protein (Lcp) for poly(*cis*-1,4-isoprene) rubber cleavage in *Streptomyces* sp. K30. *Microbiologypen* 1:13–24. <http://dx.doi.org/10.1002/mb03.3>.
- Jendrossek D, Tomasi G, Kroppenstedt RM. 1997. Bacterial degradation of natural rubber: a privilege of actinomycetes? *FEMS Microbiol. Lett.* 150:179–188. [http://dx.doi.org/10.1016/S0378-1097\(97\)00072-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0378-1097(97)00072-4).
- Linós A, Berekaa MM, Reichelt R, Keller U, Schmitt J, Flemming HC, Kroppenstedt RM, Steinbüchel A. 2000. Biodegradation of *cis*-1,4-polyisoprene rubbers by distinct actinomycetes: microbial strategies and detailed surface analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* 66:1639–1645. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.66.4.1639-1645.2000>.
- Braaz R, Armbruster W, Jendrossek D. 2005. Heme-dependent rubber oxygenase RoxA of *Xanthomonas* sp. cleaves the carbon backbone of poly(*cis*-1,4-isoprene) by a dioxygenase mechanism. *Appl. Environ. Microbiol.* 71:2473–2478. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.71.5.2473-2478.2005>.
- Bode HB, Zecek A, Plüchhahn K, Jendrossek D. 2000. Physiological and chemical investigations into microbial degradation of synthetic poly(*cis*-1,4-isoprene). *Appl. Environ. Microbiol.* 66:3680–3685. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.66.9.3680-3685.2000>.
- Berekaa MM, Linós A, Reichelt R, Keller U, Steinbüchel A. 2000. Effect of pretreatment of rubber material on its biodegradability by various rubber degrading bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* 184:199–206. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-6968.2000.tb09014.x>.
- Ibrahim EMA, Arenskötter M, Luftmann H, Steinbüchel A. 2006. Identification of poly(*cis*-1,4-isoprene) degradation intermediates during growth of moderately thermophilic actinomycetes on rubber and cloning of a functional lcp homologue from *Nocardia farcinica* strain E1. *Appl. Environ. Microbiol.* 72:3375–3382. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.72.5.3375-3382.2006>.
- Bugg T. 2003. Dioxygenase enzymes: catalytic mechanisms and chemical models. *Tetrahedron* 59:7075–7101. [http://dx.doi.org/10.1016/S0040-4020\(03\)00944-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0040-4020(03)00944-X).
- Bauer I, Max N, Fetzner S, Lingens F. 1996. 2,4-Dioxygenases catalyzing N-heterocyclic-ring cleavage and formation of carbon monoxide. Purification and some properties of 1H-3-hydroxy-4-oxoquinoline 2,4-dioxygenase from *Arthrobacter* sp. R61a and comparison with 1H-3-hydroxy-4-oxoquinoline 2,4-dioxygenase from *Pseudomonas putida* 33/1. *Eur. J. Biochem.* 240:576–583.
- Frerichs-Deeken U, Fetzner S. 2005. Dioxygenases without requirement for cofactors: identification of amino acid residues involved in substrate binding and catalysis, and testing for rate-limiting steps in the reaction of

Birke and Jendrossek

- 1*H*-3-hydroxy-4-oxoquinaldine 2,4-dioxygenase. *Curr. Microbiol.* 51: 344–352. <http://dx.doi.org/10.1007/s00284-005-0065-3>.
29. Hernandez-Ortega A, Quesne MG, Bui S, Heuts DPHM, Steiner RA, Heyes DJ, de Visser SP, Scrutton NS. 2014. Origin of the proton-transfer step in the cofactor-free (1*H*)-3-hydroxy-4-oxoquinaldine 2,4-dioxygenase: effect of the basicity of an active site His residue. *J. Biol. Chem.* 289:8620–8632. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M113.543033>.
30. Steiner RA, Janssen HJ, Roversi P, Oakley AJ, Fetzner S. 2010. Structural basis for cofactor-independent dioxygenation of N-heteroaromatic compounds at the alpha/beta-hydrolase fold. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107:657–662. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0909033107>.
31. Thierbach S, Bui N, Zapp J, Chhabra SR, Kappl R, Fetzner S. 2014. Substrate-assisted O<sub>2</sub> activation in a cofactor-independent dioxygenase. *Chem. Biol.* 21:217–225. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chembiol.2013.11.013>.



## Latex Clearing Protein (Lcp) of *Streptomyces* sp. Strain K30 Is a *b*-Type Cytochrome and Differs from Rubber Oxygenase A (RoxA) in Its Biophysical Properties

Jakob Birke, Wolf Röther, Dieter Jendrossek

Institut für Mikrobiologie, Universität Stuttgart, Germany

Specific polyisoprene-cleaving activities of 1.5 U/mg and 4.6 U/mg were determined for purified Strep-tagged latex clearing protein (Lcp) of *Streptomyces* sp. strain K30 at 23°C and 37°C, respectively. Metal analysis revealed the presence of approximately one atom of iron per Lcp molecule. Copper, which had been identified in Lcp<sub>1<sub>VH2</sub></sub> of *Gordonia polyisoprenivorans* previously, was below the detection limit in Lcp<sub>K30</sub>. Heme was identified as a cofactor in purified Lcp<sub>K30</sub> by (i) detection of characteristic  $\alpha$ -,  $\beta$ -, and  $\gamma$  (Soret)-bands at 562 nm, 532 nm, and 430 nm in the visible spectrum after chemical reduction, (ii) detection of an acetone-extractable porphyrin molecule, (iii) determination of a heme *b*-type-specific absorption maximum (556 nm) after chemical conversion of the heme group to a bipyridyl-heme complex, and (iv) detection of a *b*-heme-specific *m/z* value of 616.2 via mass spectrometry. Spectroscopic analysis showed that purified Lcp as isolated contains an oxidized heme-Fe<sup>3+</sup> that is free of bound dioxygen. This is in contrast to the rubber oxygenase RoxA, a *c*-type heme-containing polyisoprene-cleaving enzyme present in Gram-negative rubber degraders, in which the covalently bound heme firmly binds a dioxygen molecule. Lcp<sub>K30</sub> also differed from RoxA in the lengths of the rubber degradation cleavage products and in having a higher melting point of 61.5°C (RoxA, 54.3°C). In summary, RoxA and Lcp both are equipped with a heme cofactor and catalyze an oxidative C-C cleavage reaction but differ in the heme subgroup type and in several biochemical and biophysical properties. These findings suggest differences in the catalytic reaction mechanisms.

The hydrocarbon natural rubber [poly(*cis*-1,4-isoprene)] is an important biopolymer that is produced by many plants and some fungi. Natural rubber, as well as chemically synthesized poly(*cis*-1,4-isoprene) (synthetic rubber), has been in use by mankind for more than 100 years. Huge amounts of rubber derived from the rubber tree *Hevea brasiliensis* are the basis for the manufacturing of tires, sealers, latex gloves, condoms, and many other items. Most of these materials are released to the environment in the form of waste or by abrasion in the case of tires. As a natural compound, rubber is a fully biodegradable material, and many rubber-degrading microorganisms have been isolated from various ecosystems in the past (1–8). The initial step of rubber biodegradation is the enzymatic cleavage of the polymeric carbon backbone to smaller products. Two types of rubber-cleaving enzymes have been characterized so far. One is rubber oxygenase A, RoxA, which is found in Gram-negative clearing zone formers. The other is latex clearing protein, Lcp, which has been identified only in Gram-positive organisms so far. RoxA first was isolated and biochemically characterized from *Xanthomonas* sp. strain 35Y (9). Biochemical and biophysical investigation revealed that RoxA is an extracellular dioxygenase with two covalently attached heme groups (10, 11) and is structurally but not functionally related to cytochrome *c* peroxidases (12, 13). RoxA cleaves poly(*cis*-1,4-isoprene) to 12-oxo-4,8-dimethyltrideca-4,8-diene-1-al (ODTD; C<sub>15</sub>-tri-isoprenoid) as a main end product. Recently, several orthologs of RoxA were described in other Gram-negative bacteria (14). Lcp is widespread in Gram-positive rubber degraders and is unrelated to RoxA; Lcps have a significantly different molecular mass of about 42 kDa, compared to  $\approx$ 72 kDa for RoxAs. The amino acid sequences of Lcps have no heme binding motifs that could serve as covalent attachment sites for heme groups, and Lcps cleave rubber to larger degradation products than RoxAs (6, 15,

16). Recently, the Lcp proteins of two species (*Streptomyces* sp. strain K30 [Lcp<sub>K30</sub>] [17] and *Gordonia polyisoprenivorans* VH2 [Lcp<sub>1<sub>VH2</sub></sub>]) (18, 19) were purified and biochemically characterized. Remarkably, copper was identified in recombinantly expressed hexa-His-tagged Lcp<sub>1<sub>VH2</sub></sub>, and results of inhibitor studies were in agreement with the presence of Cu(II) ions in Lcp<sub>1<sub>VH2</sub></sub> (19). The authors suggested that Lcp<sub>1<sub>VH2</sub></sub> is a member of the so-called copper-containing white laccase family. In contrast to Lcp<sub>1<sub>VH2</sub></sub>, copper or other metals could not be detected in Lcp<sub>K30</sub> (52%/69% amino acid identity/similarity), which was purified from a constructed  $\Delta$ roxA *Xanthomonas* sp. mutant harboring a chromosomally anchored native lcp<sub>K30</sub> gene. However, only a very low protein concentration was available for metal analysis; accordingly, the detection limit was high and a metal content of up to 0.8 mol of Fe per mol of Lcp or 0.2 mol of Cu per mol of Lcp could not be excluded in our previous study (17). The aim of the present study was to clarify the metal content of Lcp by increasing expression and yield of Lcp protein and repetition of metal anal-

Received 27 January 2015 Accepted 23 March 2015

Accepted manuscript posted online 27 March 2015

Citation Birke J, Röther W, Jendrossek D. 2015. Latex clearing protein (Lcp) of *Streptomyces* sp. strain K30 is a *b*-type cytochrome and differs from rubber oxygenase A (RoxA) in its biophysical properties. *Appl Environ Microbiol* 81:3793–3799. doi:10.1128/AEM.00275-15.

Editor: H. Nojiri

Address correspondence to Dieter Jendrossek, dieter.jendrossek@imb.uni-stuttgart.de.

Copyright © 2015, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

doi:10.1128/AEM.00275-15

Birke et al.

TABLE 1 Bacterial strains and plasmids used in this study

Strain or plasmid	Relevant characteristic(s) <sup>a</sup>	Reference or source
<i>E. coli</i> JM109	Plasmid storage and expression of <i>lcp</i>	
<i>E. coli</i> XLI-blue	QuikChange transformation strain	Stratagene
<i>Xanthomonas</i> sp. strain 35Y $\Delta$ roxA-attB	No clear zone formation on latex agar	12
<i>Xanthomonas</i> sp. strain 35Y $\Delta$ roxA-attB	Expression of RoxA from rhamnose promoter in <i>Xanthomonas</i> sp. strain 35Y-CM, Km <sup>r</sup> , Cm <sup>r</sup> ;	12
pNH1- <i>roxA-attP</i> in chromosome (SN4230)	clearing zone formation in the presence of rhamnose plus latex	
pMK::lcp (SN5314)	GeneArt vector, source of <i>lcp</i> , Km <sup>r</sup>	17
pUC9::lcp (SN5339)	Cloning vector for <i>lcp</i> , Amp <sup>r</sup>	This study
p4782.1 (SN3513)	Mobilizable broad-host-range expression vector, Km <sup>r</sup>	21
p4782.1::strep-lcp (SN5496)	Coding sequence of <i>strep-lcp</i> under rhamnose promoter control, Km <sup>r</sup>	This study

<sup>a</sup> Km<sup>r</sup>, kanamycin resistance; Amp<sup>r</sup>, ampicillin resistance; Cm<sup>r</sup>, chloramphenicol resistance.

ysis at higher fidelity. We decided to use a Strep-tagged Lcp variant to facilitate enzyme purification and to avoid the possibility of artificial binding of metal ions to a hexa-His tag. This construct was used for further characterization and to address the question of whether a cofactor is present or not in Strep-Lcp.

## MATERIALS AND METHODS

**Bacterial strains, plasmids, and culture conditions.** Table 1 shows strains and plasmids used in this study. Recombinant *E. coli* strains were grown in LB medium at 22°C or 37°C in the presence of appropriate antibiotics. Polyisoprene latex was kindly provided by Weber and Schaefer, Hamburg (Germany), and was used after 3 washing steps in 0.1% (wt/vol) Nonidet P40. For purification of Lcp<sub>K30</sub>, recombinant *E. coli* strains were grown in 4.8 liters of LB medium (8 individual cultures each in a 3-liter Erlenmeyer flask) supplemented with 0.1% (wt/vol) l-rhamnose for 20 h at 22°C by continuous shaking (120 rpm). Cells were harvested (4°C) by centrifugation, and Lcp was purified from soluble cell extracts as described below.

**Construction of a recombinant *E. coli* strain for expression of the *Streptomyces* sp. strain K30 *lcp* gene (*lcp*<sub>K30</sub>).** The *lcp*<sub>K30</sub> gene sequence was cloned into pUC9 via single NdeI and HindIII sites using pMK::lcp (Table 1) as the template. For substitution of the *lcp* TAT-dependent signal sequence (20) with the Strep-tag, the resulting vector pUC9::lcp was used as the template for PCR with the following primers: strep\_f, GCTCATATGTG GAGCCACCCGACGTTTCGAAAAGAGAACCCTCTACTTCCAGGGC CTGCAGCGACCACTGTGGACGTGGTCACCGAGC; *lcp*-strep-r, GTCA ATAAACCGGTAAGCTTTCAGGACG. The resulting Strep-tag-*lcp* DNA sequence (~1.25 kbp) was cut with NdeI and HindIII and subcloned into p4782.1 (Table 1), yielding p4782.1::strep-lcp. This construct was transformed into the expression strain *E. coli* JM109.

**Purification of recombinant RoxA and Lcp.** During all chromatographic steps, the concentration of RoxA and Lcp was monitored by recording the absorption at 280 nm and 408 nm (RoxA) or 280 nm and 412 nm (Lcp), respectively. RoxA was purified from a  $\Delta$ roxA *Xanthomonas* sp. with chromosomally integrated *roxA* plasmid (pNH1::roxA) under rhamnose control as described previously (12, 21). Lcp with the replacement of the TAT sequence by a Strep-tag was purified by using *E. coli* JM109 harboring p4782.1::lcp (volume, 4.8 liters) grown at 22°C for 20 h. The cells were harvested and resuspended in buffer A (1 ml buffer A/g cells, 100 mM potassium phosphate buffer [KPP], pH 7.7, 150 mM sodium chloride). After two subsequent French press lysis steps, the soluble fraction was obtained by ultracentrifugation (30 min, 40,000  $\times$  g, 4°C) and was applied to a 10-ml Strep-Tactin HC gravity flow column (IBA, Göttingen, Germany). Subsequently, the column was washed five times with 1 bed volume each time of buffer A, and Lcp was eluted with 3 applications (1 bed volume each) of buffer A plus 5 mM desthiobiotin. For further chromatographic steps, the ÄKTA fast protein liquid chromatography system (GE Healthcare, Sweden) was used. First, the Lcp preparation was rebuffed in 1 mM potassium phosphate buffer (pH 7.0) with a HiPrep Sephadex

G25 26/10 column (bed volume, 53 ml). This step was necessary to avoid precipitation of Lcp during the following concentration step. The pooled Lcp-containing fractions were concentrated to a final volume of ~4 ml via ultrafiltration (10-kDa cutoff) and then applied to a Superdex 200 16/600 size-exclusion chromatography column (2 separate runs, each loaded with 2 ml of the concentrated Lcp solution). The Lcp-containing fractions where pooled, concentrated via ultrafiltration (10-kDa cutoff), and stored on ice for up to 1 week. Alternatively, Lcp was frozen in liquid nitrogen and kept at -70°C for long-term storage.

**Hemochrome pyridine assay.** The heme type of Lcp was determined spectroscopically with the bipyridyl assay according to Berry and Trumpower (22). RoxA, cytochrome *c* (horseheart, type III; Sigma, St. Louis, MO) (both *c*-type), and hemoglobin (*b*-type) (bovine; Sigma, St. Louis, MO) served as controls. A total of 25  $\mu$ l of the respective protein stock solution (4 to 7 mg/ml) was added to 975  $\mu$ l solution A (100 mM sodium hydroxide, 20% [vol/vol] pyridine, 0.3 mM potassium ferricyanide). Subsequently, 2 to 5 mg sodium dithionite was added, and the spectrum of the reduced cytochrome was recorded. The absorption maxima of the resulting  $\alpha$ -bands are characteristic for  $\alpha$ -type (584 to 588 nm), *b*-type (556 nm), and *c*-type (550 nm) cytochromes.

**CD spectra.** Circular dichroism (CD) spectra were recorded with a J-815 CD spectrophotometer (Jasco, Gross-Umstadt, Germany). Eighty microliters of an Lcp solution (4.5 mg/ml in 1 mM KPP, pH 7.0) after the final Sephadex 200 gel filtration step was measured in a 0.2-mm cuvette in a wavelength range between 185 and 260 nm with standard sensitivity and a bandwidth of 1 nm. The spectra recorded with buffer were used as a baseline and subtracted from the spectrum of the protein solution in the same buffer. Twenty-five scans were collected and averaged. The melting curve was measured at the CD minimum of 230 nm with an increase of 1°C/minute from 20 to 80°C.

**Assay of Lcp activity.** Lcp activity was determined by the consumption of molecular oxygen with an OXY-4 mini apparatus and a corresponding optical oxygen sensor spot (PreSens, Regensburg, Germany). The sensor was attached to the inner surface of a 1.5-ml cuvette. The oxygen-dependent fluorescence of the sensor was continuously recorded via an optical fiber that had been fixed to the outside of the cuvette. The system was calibrated with oxygen-saturated (air) and anoxic (dithionite) buffer. Potassium phosphate buffer (100 mM, pH 7) supplemented with 0.2% (wt/vol) polyisoprene latex was added into the cuvette for determination of Lcp activity. The cuvette was sealed with a silicone lid to ensure the absence of a gas phase on top of the reaction mix that could replenish consumed dissolved dioxygen and would falsify the results (total volume, 1.5 ml). Homogeneity of the oxygen concentration in the cuvette was ensured by mixing with the aid of a magnetic stirrer and a microstirring bar. For determination of Lcp activity at temperatures above room temperature, the whole system was placed in a breeding incubator until a constant temperature, monitored in a reference cuvette, was reached. The baseline was recorded for approximately 7 min before the reaction was started by the addition of Lcp (final concentration, 4  $\mu$ g/ml) using a Ham-



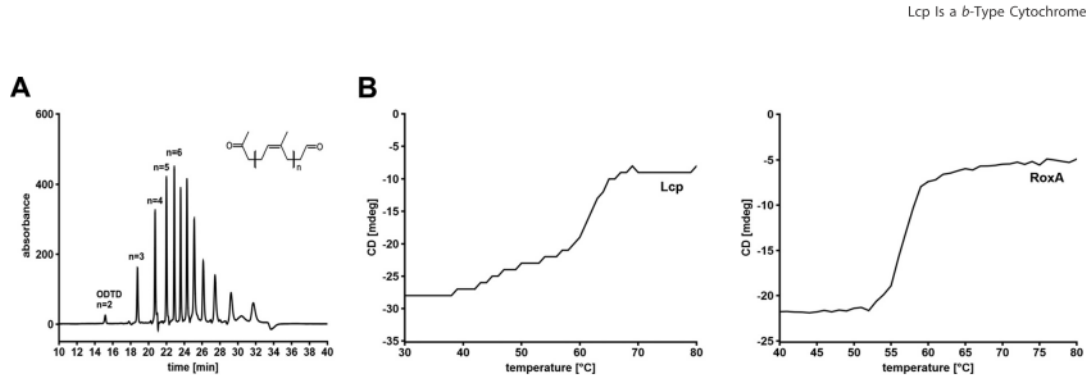


FIG 1 Degradation products of oxidative cleavage of poly(*cis*-1,4-isoprene). Rubber latex was incubated in the presence of purified Strep-Lcp<sub>K30</sub> for 2 h. Degradation products were extracted with ethyl-acetate and separated by HPLC. (B) Determination of the melting points of Strep-Lcp<sub>K30</sub> (left) and RoxA (right). Melting points were recorded at the CD minima of Lcp (230 nm) and RoxA (207 nm) and were at 61.5°C (Lcp) and 54.3°C (RoxA).

ilton pipette. The resulting time-dependent decrease of oxygen concentration (100% to  $\approx$ 80% oxygen saturation) was used to determine the specific activity of Lcp. One hundred percent oxygen in the reaction mix was equivalent to 260  $\mu$ M at room temperature or 210  $\mu$ M at 37°C. Triplicates and one control without Lcp were recorded simultaneously.

**Inhibitor studies.** To examine the effect of potential inhibitors on Lcp activity, a 10 mM concentration of each test compound was added to Lcp. After an incubation period of 30 min at room temperature, the Lcp-inhibitor mixture was added to the reaction mix [100 mM potassium phosphate buffer, pH 7, supplemented with 0.2% poly(*cis*-1,4-isoprene), resulting in a final inhibitor concentration of 1 mM and an Lcp concentration of 4  $\mu$ g/ml]. After incubation at room temperature for 2 h, the reaction mixture (700  $\mu$ l in a 2-ml Eppendorf tube) was extracted with ethyl acetate (1 ml), dried, dissolved in 100  $\mu$ l methanol, and further subjected to high-performance liquid chromatography (HPLC) analysis. An RP8 HPLC column (12 by 4 mm, 5- $\mu$ m particle size) was operated at 0.7 ml/min with water (A) and methanol (B) as mobile phases. The concentration of B was increased from 50% (vol/vol) to 100% (vol/vol) within 15 min; products were detected at 210 nm. The C<sub>35</sub> product peak ( $n = 6$ ) was used for quantification and compared to a control without inhibitor (Fig. 1A).

**Matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS).** A Bruker Daltonics autoflex speed apparatus (Bruker Corporation, Billerica, MA) was employed, and 4-hydroxycinnamic acid (HCCA) was used as the matrix. To this end, the Bruker MTP anchor-chip target was prepared with protein calibration standard 2 (part number 222570) in 125  $\mu$ l TA30 (30% [vol/vol] acetonitrile, 0.1% [wt/vol] trifluoroacetic acid [TFA]) and mixed with the HCCA matrix solution (in TA30). Equal volumes of the samples were mixed with matrix solution, and 1  $\mu$ l was spotted on the target. Data acquisition was conducted by employing reflection mode, and the flex analysis program was used for interpretation of the data. The following protein samples were used: cytochrome *c*, RoxA, hemoglobin, and Lcp<sub>K30</sub> (each at 10 mg/ml in 10 mM KPP buffer, pH 7). Determinations of  $m/z$  values of the heme groups were performed (i) with the untreated protein, (ii) with a trypsin-digested protein (10  $\mu$ l protein stock mixed with 4  $\mu$ l trypsin [0.5  $\mu$ g/ $\mu$ l] and 86  $\mu$ l 10 mM potassium phosphate buffer, pH 7, incubated overnight at 37°C), and (iii) with the supernatant of acetone-extracted protein. For extraction with acetone, the method of Morrison and Horie was used (23). In brief, 5 mg (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> was dissolved in 20  $\mu$ l of each protein solution, and 167  $\mu$ l acetone was added. The formed precipitate was centrifuged at 12,000 rpm for 2 min in an Eppendorf centrifuge. The supernatant was discarded, another 167  $\mu$ l acetone was added, and the centrifugation step was repeated. A total of 67  $\mu$ l of acidic acetone (90  $\mu$ l of 37% HCl-5 ml acetone) was added to the pellet, and the suspension was mixed thoroughly. The samples were centrifuged for 3

min at 12,000 rpm to separate the red supernatant containing the extracted heme from the white protein precipitate of Lcp or hemoglobin. A clear supernatant and a red precipitate were obtained for RoxA and cytochrome *c*, and this was in agreement with a covalent attachment of heme to the polypeptide chain in RoxA and cytochrome *c*.

**Other techniques.** Protein concentration was determined by the bicinchoninic acid (BCA) method. The concentrations of purified Lcp samples also were determined by molar extinction coefficients of Lcp at 412 nm ( $\epsilon_{412} = 80,000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ). Heme staining for pseudoperoxidase activity and UV-visible (UV-vis) spectroscopy were conducted as described previously after separation of proteins via nonreducing SDS-PAGE (11). Metal content of purified Lcp was determined using inductively coupled plasma-MS (ICP-MS) by the Spuren-Analytisches Laboratorium Dr. Baumann (Germany).

## RESULTS AND DISCUSSION

**Purification of Lcp<sub>K30</sub>.** Strep-Lcp<sub>K30</sub> was purified from soluble cell extracts of a recombinant *E. coli* JM109 culture via Strep-tag affinity chromatography and subsequent size-exclusion chromatography as described in Materials and Methods. About 26 mg of an almost homogeneous Lcp<sub>K30</sub> preparation was obtained from the cells present in a culture volume of 4.8 liters (5.4 mg Lcp/liter culture). This result corresponds to an over 40-fold increase of Lcp yield compared to that of our previous expression system in recombinant *Xanthomonas* sp. strain 35Y (17). Specific activities of 1.5 U/mg were determined for freshly purified Lcp<sub>K30</sub> at 23°C using an oxygen consumption assay. Remarkably, a considerably higher specific activity of 4.6 U/mg was determined at 37°C. Purified Strep-Lcp<sub>K30</sub> cleaved poly(*cis*-1,4-isoprene) to a mixture of oligonucleotide-isoprenoids with terminal keto and aldehyde groups (Fig. 1A), as shown previously for native Lcp (17). A melting temperature of 61.5°C was determined for Strep-Lcp<sub>K30</sub> (Fig. 1B); thus, it was remarkably higher than that of RoxA (54.3°C).

SDS-PAGE analysis of a purified Lcp<sub>K30</sub> preparation showed a prominent band at an apparent molecular mass of  $\approx$ 48 kDa that roughly corresponded with the theoretical value of 43.3 kDa for a Strep-tagged version of Lcp<sub>K30</sub> (Fig. 2A). No or only very weak positive staining was detected for the Lcp<sub>K30</sub> band when the SDS-PAGE gel was subjected to heme staining for pseudoperoxidase activity, while RoxA, which was used as a positive control, showed a very strong signal (not shown). Remarkably, a band with positive pseudoperoxidase activity was detected near the bottom of the PAGE gel and indicated the presence of a very small heme com-

Birke et al.

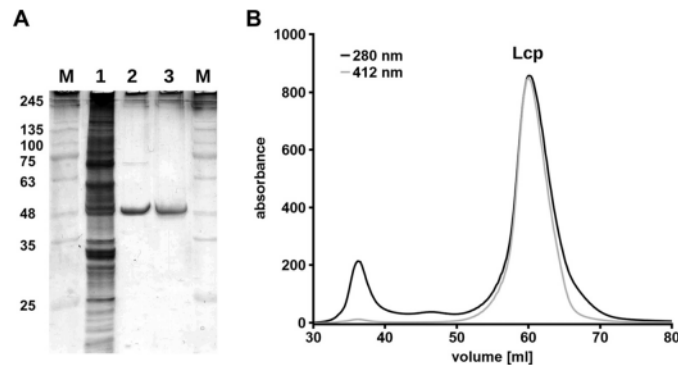


FIG 2 Purification of Strep-Lcp<sub>K30</sub>. (A) Reducing SDS-PAGE of Lcp preparations. M, marker proteins with molecular masses (in kilodaltons) indicated; lane 1, soluble crude extract; lane 2, Lcp pool after affinity chromatography (Strep-Tactin HC); lane 3, Lcp pool after gel filtration on Superdex 200. (B) Coelution of Lcp (A<sub>280</sub>) and heme (A<sub>412</sub>) during gel filtration on Superdex 200.

found. All attempts to remove this molecule from the Lcp<sub>K30</sub> preparation by different chromatography methods (anion exchange, hydrophobic interaction, hydroxyapatite, and gel filtration) failed. In all cases, the Lcp<sub>K30</sub> protein (A<sub>280</sub>) coeluted with a compound having a strong absorption at  $\approx 412$  nm, which is typical for a heme molecule (Fig. 2B). When purified Lcp was run on a native PAGE and subjected to heme staining, a strong pseudoperoxidase-positive band was detected (not shown), suggesting that Lcp has a noncovalently bound heme group. Thus, the absence of positive heme staining in the 48-kDa Lcp band in SDS-PAGE analysis could be explained by removal of the noncovalently bound heme molecule during the denaturation step prior to electrophoresis.

**Lcp<sub>K30</sub> is an Fe-containing protein.** As pointed out in Introduction, controversial reports were published on the metal content of Lcp protein in *Streptomyces* sp. strain K30 and in *Gordonia polyisoprenivorans* (17, 19). Therefore, it was necessary to repeat the metal analysis of purified Lcp at higher sensitivity. Two Lcp<sub>K30</sub> preparations were subjected to metal analysis by inductively coupled plasma-MS (ICP-MS) analysis. Substantial amounts of Fe and trace amounts of Ni were identified in both preparations. The ratio of metal atoms per molecule of Lcp was 1.16 mol Fe and 0.12 mol Ni in one sample or 1.04 mol Fe and 0.05 mol Ni in the second Lcp sample. Copper was identified at a very low concentration of 0.056 mol Cu/mol Lcp<sub>K30</sub> in only one sample but was below the detection limit in the other sample ( $<0.01$  mol Cu per mol Lcp<sub>K30</sub>). No other metals (vanadium to zinc were tested) were detected. We conclude that Lcp<sub>K30</sub> is an iron-containing protein and apparently harbors one atom of Fe per molecule of Lcp<sub>K30</sub> peptide. The traces of nickel in both preparations and of copper in one Lcp preparation are far below stoichiometric amounts and presumably represent contaminations. We have no plausible explanation for the detection of copper in Lcp1<sub>VH2</sub> of *G. polyisoprenivorans*, except that copper ions could have artificially bound to the hexa-His tag (19). However, in this case one would have expected the presence of other heavy metals in the Lcp preparation as well. Because of substantial amino acid similarity of Lcp<sub>VH1</sub> and Lcp<sub>K30</sub> (52% identity/69% similarity, 99% overlap), the presence of different metals as cofactors in the two related Lcps is unlikely.

**UV-vis spectroscopy of Lcp<sub>K30</sub>.** A concentrated Lcp<sub>K30</sub> ( $>2$  mg/ml) preparation showed a red color, and this is in agreement with the presence of a heme group in Lcp<sub>K30</sub>. UV-vis spectroscopy of purified Lcp<sub>K30</sub>, as isolated, revealed a strong absorption band at 412 nm that corresponds roughly with the absorption maximum at  $\approx 420$  nm published for Lcp1<sub>VH2</sub> (19). Reduction of Lcp<sub>K30</sub> by the addition of sodium dithionite resulted in a red shift of the absorption band to 430 nm and in the appearance of new absorption bands at 532 and 562 nm (Fig. 3). The presence of one absorption band around 412 nm in the as-isolated state and the presence of three absorption bands ( $\alpha$ -band,  $\beta$ -band, and  $\gamma$  [Soret]-band) in the visible spectrum after chemical reduction is typical for heme-containing proteins of the cytochrome family. To determine the cytochrome subgroup type, the hemochrome pyridine assay according to Berry and Trumpower (22) was used. To

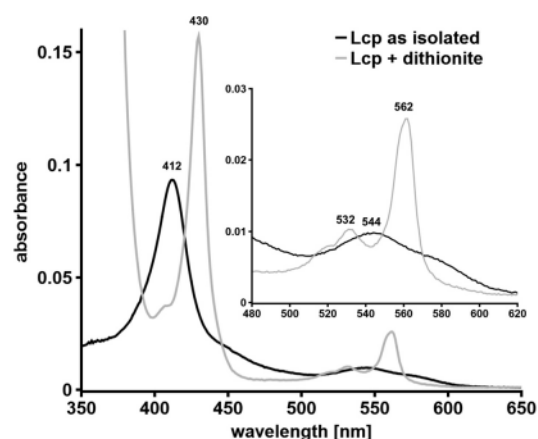


FIG 3 UV-vis spectroscopy of Strep-Lcp<sub>K30</sub> as isolated and after chemical reduction with dithionite. Wavelength absorption maxima are indicated above each peak.

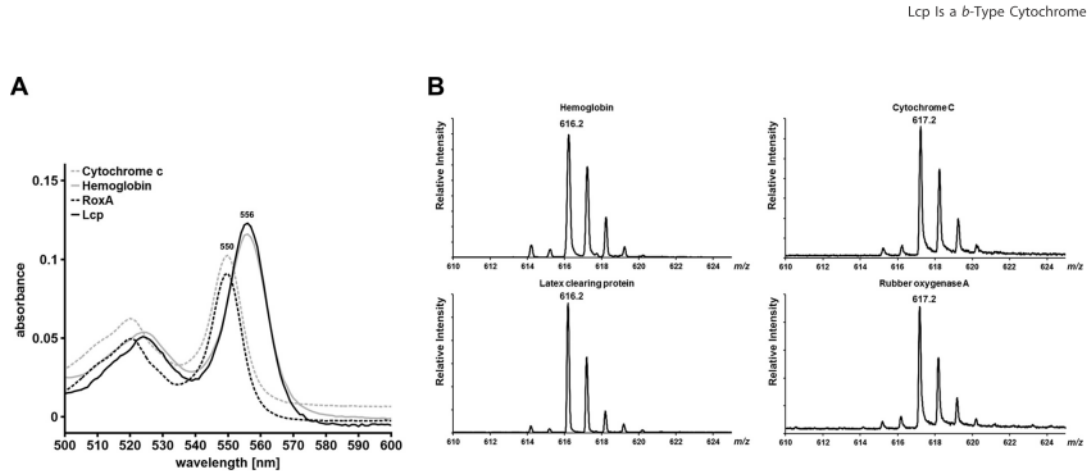


FIG 4 Determination of heme subgroup by bipyrindyl assay (A) and MALDI-TOF MS analysis (B). Cytochrome *c*, hemoglobin, and RoxA were used as controls with known subgroup types. Lcp gave essentially the same results as those obtained for *b*-cytochrome hemoglobin both in bipyrindyl assay and in MALDI-TOF MS analysis.

this end, purified Lcp<sub>K30</sub> was incubated in 0.1 M NaOH in the presence of 20% (vol/vol) pyridine, and the absorption spectrum of the formed bipyrindyl-hemochromes was recorded after reduction by dithionite (Fig. 4A). RoxA and cytochrome *c* (both *c*-type cytochromes) as well as hemoglobin (*b*-cytochrome) were used as controls. The absorption maxima of the resulting  $\alpha$ -bands of the bipyrindyl-heme complexes are characteristic for *a*-type (584 to 588 nm), *b*-type (556 nm), and *c*-type (550 nm) cytochromes. The absorption spectra of the hemochromes of the three controls were identical to those reported in the literature (22). The absorption spectrum of the Lcp<sub>K30</sub> bipyrindyl-heme complex was identical to that of hemoglobin with a maximum at 556 nm (Fig. 4A), and this indicated that Lcp<sub>K30</sub> is a member of the *b*-type cytochrome family.

**Heme is not covalently bound to Lcp.** In contrast to *c*-type cytochromes, in which the heme is covalently attached to sulfur atoms of cysteines of so-called heme binding motifs in the polypeptide chain of the respective protein (e.g., C<sub>191</sub>SAC<sub>194</sub>H in the case of N-terminal heme of RoxA), *b*-type cytochromes have non-covalently bound heme groups. Therefore, heme groups of *b*-cytochromes can be released from the protein by precipitation or denaturation of the protein. To test Lcp for the presence of non-covalently bound heme, purified Lcp<sub>K30</sub> was extracted with acidic acetone. The same procedure was performed with commercial hemoglobin (bovine; Sigma, St. Louis, MO), with purified RoxA (*c*-type cytochrome), and with commercial cytochrome *c* (horseheart, type III; Sigma, St. Louis, MO). The supernatants of Lcp and of hemoglobin were red and indicated the liberation of heme groups from the proteins. Accordingly, a typical heme spectrum was detectable for the supernatants of acetone-extracted Lcp and hemoglobin and confirmed that heme was liberated by the acidic extraction procedure. In contrast, the supernatants of RoxA and cytochrome *c* were pale, and no heme spectrum could be detected; instead, the precipitates were red and indicated that the heme groups had coprecipitated with the polypeptide moiety. These results are in agreement with a covalent attachment of heme to RoxA and cytochrome *c* and with a noncovalent attachment of heme in Lcp and hemoglobin.

The molecular masses of the heme groups of hemoglobin, Lcp,

RoxA, and cytochrome *c* were determined by MALDI-TOF MS analysis as described in Materials and Methods. 4-Hydroxycinnamic acid (HCCA) was used as the matrix and led to good cocrystallization, laser desorption, and flying properties. According to a detailed mass-spectrometric characterization of *b*- and *c*-type hemes, the main peaks of *b*- and *c*-type heme groups have different heme-type characteristic  $m/z$  values of 616 and 617, respectively (24). Figure 4B shows the results of a MALDI-TOF MS analysis of hemoglobin, Lcp, cytochrome *c*, and RoxA. While RoxA and cytochrome *c* gave main peaks at  $m/z$  values of 617, the  $m/z$  value of Lcp and hemoglobin was 616. These results confirmed that cytochrome *c* and RoxA both have a *c*-type heme and that hemoglobin and Lcp are members of the *b*-type cytochrome family. The same results were obtained when trypsin-digested protein samples were used in MALDI-TOF analysis, and the presence of heme *b* in the acidic acetone extract of Lcp<sub>K30</sub> and hemoglobin was shown as well (data not shown). In summary, multiple and independent pieces of evidence show that Lcp<sub>K30</sub> is a member of the *b*-type cytochrome family.

**Inhibitor studies.** The effect of metal chelators and other compounds that could act as inhibitors was studied for purified Lcp. In contrast to our previous study, in which we had added the inhibitor at a final concentration of 1 mM to the latex assay solution and had started the reaction by the addition of Lcp, in this study we preincubated Lcp with a 10-fold concentration (10 mM) of the inhibitor for 30 min before the Lcp-inhibitor mixtures were added to the assay solution. We used the direct product assay (HPLC-based detection of polyisoprene cleavage products) instead of the indirect oxygen consumption assay. Remarkably, except for diethyl-thiocarbamate (56% inhibition), none of the chelators (disodium 4,5-dihydroxy-1,3-benzenedisulfonate [Tiron], potassium ethyl-xanthogenate, or phenanthroline) had a remarkable effect on Lcp-catalyzed cleavage of polyisoprene (Table 2). This result was in agreement with our previous analysis (17) and showed that even preincubation of the enzyme with a high inhibitor concentration was not able to substantially inhibit the activity of the enzyme. This result is surprising and suggests that the heme group, with its central Fe ion, must be deeply buried in the protein so that none of the chelators, with the exception of diethyl-dithiocarbamate, could affect Lcp activity. Remarkably, after addition of

Birke et al.

TABLE 2 Sensitivity of Lcp to potential inhibitors

Compound	Relative activity <sup>a</sup> (%)
None (control)	100
Dithionite	85
Disodium 4,5-dihydroxy-1,3-benzenedisulfonate (Tiron)	110
Ethyl xanthogenate	93
Diethyl-dithiocarbamate	44
Imidazole	52
Phenanthroline	80

<sup>a</sup> Activity was determined using the HPLC-based detection of cleavage products after 2 h of incubation of polyisoprene latex with Lcp and subsequent solvent extraction of the products. Lcp was preincubated with the inhibitor (10 mM) for 30 min at room temperature before the Lcp-inhibitor mixture was added to the assay solution. The final concentration of inhibitors was 1 mM. The 100% value corresponds to the area of the C<sub>30</sub> product peak (Fig. 1A) (17). All data show representative means from a duplicate experiment.

diethyl-dithiocarbamate to Lcp, no decrease of the Soret band or other changes could be observed in the UV-vis spectrum (not shown). This indicates that diethyl-dithiocarbamate does not bind to Lcp-iron and, moreover, is not able to remove the iron ion from the heme center. Thus, it is possible that diethyl-dithiocarbamate is able to inhibit the enzyme by another (unknown) mechanism. Surprisingly, the reductant dithionite had only a minor effect on the polyisoprene cleaving activity of Lcp. UV-vis-spectroscopic analysis clearly showed that 10 mM dithionite completely reduced Lcp and also removed dioxygen from an aqueous solution. However, determination of the oxygen concentration in our reaction chamber filled with Lcp assay solution showed that dissolved oxygen reappears about 20 to 30 min after the addition of dithionite. Since our Lcp activity assay for inhibitors takes 120 min and must be performed in an oxic atmosphere (dioxygen is a cosubstrate), the small effect of dithionite on Lcp activity can be explained by an inhibition of the reaction only in the first 20 to 30 min.

**The oxidation states of Fe in Lcp and RoxA are different.** Previous structural and biophysical analysis had revealed that the heme group of the RoxA active site has a dioxygen molecule bound to the heme iron atom of the active heme site (11, 13). Because of the strong

electronegativity of oxygen, one electron of the Fe<sup>2+</sup> ion is relocated to the dioxygen molecule, resulting in an Fe<sup>3+</sup>-O<sub>2</sub><sup>-</sup> state. This is the reason why the UV-vis spectrum of RoxA as isolated gives a typical oxidized heme spectrum. However, application of anoxic conditions (N<sub>2</sub>-atmosphere) or removal of dioxygen from RoxA by chemicals (e.g., pyrogallol) resulted in increases of the  $\alpha$ -band at 549 nm and in other changes of the UV-vis spectrum that were characteristic for the removal of previously heme-bound dioxygen (11). This showed that the Fe atom of the active-site heme is in a reduced form (Fe<sup>2+</sup>) in the absence of bound oxygen. To determine the oxidation state of the heme in Lcp, spectral analysis of purified Lcp as isolated was performed and gave a typical oxidized spectrum similar to that of RoxA (Fig. 3). However, application of anoxic conditions (N<sub>2</sub>-atmosphere) did not result in the detection of an  $\alpha$ -band in Lcp. In agreement with this, chemical reduction by dithionite and anaerobic reoxidation of Lcp did not result in the appearance of absorption maxima around 539 and 573 nm, as in RoxA, that would have indicated the removal of a previously bound dioxygen molecule (data not shown).

Addition of 1 mM imidazole to Lcp had a weak effect on the UV-vis spectrum of Lcp (Fig. 5A). The UV-vis spectrum of RoxA, however, showed a prominent increase of the  $\alpha$ -band of the active-site heme group upon the addition of imidazole that was not observed for Lcp (Fig. 5B). In the case of RoxA, the bound dioxygen is replaced by imidazole, leading to an Fe<sup>2+</sup>-imidazole state that can be observed in the UV-vis spectrum. The weak changes in the UV-vis spectrum for Lcp are consistent with the interaction of the heme group with imidazole, but the reduction bands that can be seen for RoxA are missing, suggesting an oxidized (Fe<sup>3+</sup>) state without bound dioxygen. Another indication for this state was determined when carbon monoxide was added to RoxA and Lcp: no change of the visible spectrum was detected for Lcp<sub>K30</sub>, whereas a prominent new absorption maximum at 415 nm and two minor signals at 521 nm and 550 nm appeared in the spectrum of RoxA in the presence of CO (Fig. 6). It is known that CO efficiently binds to a reduced Fe<sup>2+</sup>-heme species but is unable to bind to Fe<sup>3+</sup> (25–27). These results support our conclusion that the oxidation states of the heme groups in RoxA and Lcp are different.

In summary, we have clarified that Lcp is a copper-free but

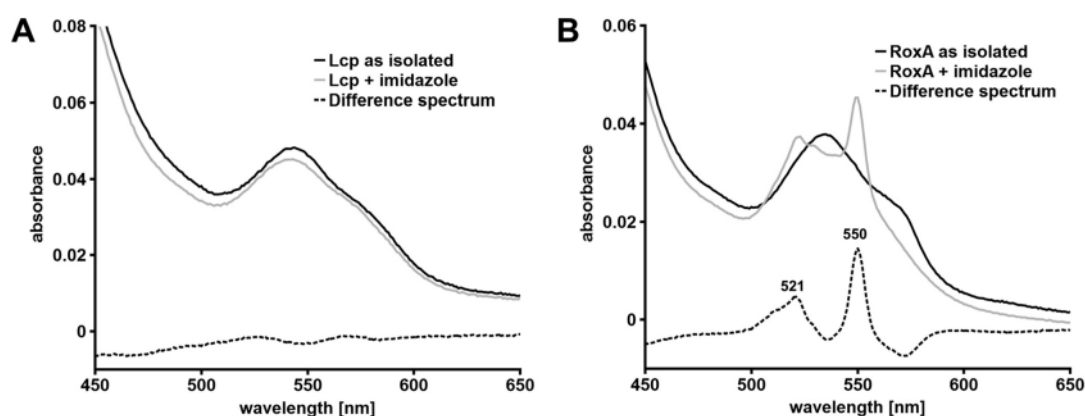


FIG 5 Effect of imidazole on UV-vis spectra of Lcp and RoxA. The UV-vis spectra of Lcp (A) and RoxA (B), as isolated, were recorded in the absence and presence of 1 mM imidazole. The respective difference spectra are indicated by the dotted lines. Only a part of the spectra (450 to 650 nm) is shown.

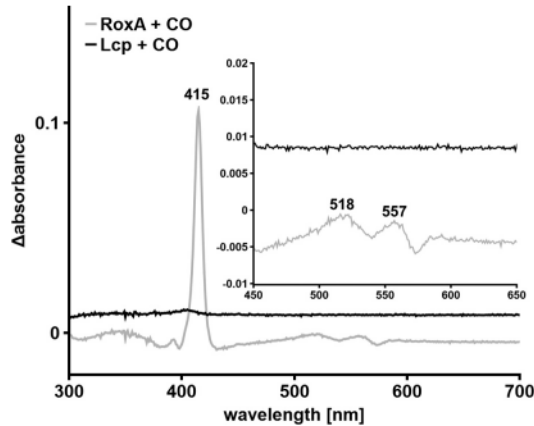


FIG 6 Effect of carbon monoxide (CO) on the UV-vis spectrum of RoxA and Strep-Lcp<sub>K30</sub>. The UV-vis difference spectra of RoxA and Lcp, as isolated, in the absence and presence of CO-saturated buffer were recorded. A strong reaction is detectable for RoxA compared to no change of the spectrum in the case of Strep-Lcp<sub>K30</sub>.

iron-containing *b*-type cytochrome. In contrast to the active heme site of RoxA, the heme group of Lcp is in the oxidized state (Fe<sup>3+</sup>), and this explains the absence of heme-bound dioxygen in Lcp.

#### ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by a grant of the Deutsche Forschungsgemeinschaft to D.J.

We thank Weber and Schaer Company for providing polyisoprene. The help of T. Jurkowski and of S. Kudithipudi (Institute of Biochemistry, University Stuttgart) in MALDI-MS and CD analysis is greatly acknowledged.

#### REFERENCES

- Heisey RM, Papadatos S. 1995. Isolation of microorganisms able to metabolize purified natural rubber. *Appl Environ Microbiol* 61:3092–3097.
- Jendrossek D, Tomasi G, Kroppenstedt RM. 1997. Bacterial degradation of natural rubber: a privilege of actinomycetes? *FEMS Microbiol Lett* 150:179–188. [http://dx.doi.org/10.1016/S0378-1097\(97\)00072-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0378-1097(97)00072-4).
- Linós A, Berekaa MM, Reichelt R, Keller U, Schmitt J, Flemming HC, Kroppenstedt RM, Steinbüchel A. 2000. Biodegradation of *cis*-1,4-polyisoprene rubbers by distinct actinomycetes: microbial strategies and detailed surface analysis. *Appl Environ Microbiol* 66:1639–1645. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.66.4.1639-1645.2000>.
- Rose K, Steinbüchel A. 2005. Biodegradation of natural rubber and related compounds: recent insights into a hardly understood catabolic capability of microorganisms. *Appl Environ Microbiol* 71:2803–2812. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.71.6.2803-2812.2005>.
- Imai S, Ichikawa K, Muramatsu Y, Kasai D, Masai E, Fukuda M. 2011. Isolation and characterization of *Streptomyces*, *Actinoplanes*, and *Methylithium* strains that are involved in degradation of natural rubber and synthetic poly(*cis*-1,4-isoprene). *Enzyme Microb Technol* 49:526–531. <http://dx.doi.org/10.1016/j.enzmictec.2011.05.014>.
- Yikmis M, Steinbüchel A. 2012. Historical and recent achievements in the field of microbial degradation of natural and synthetic rubber. *Appl Environ Microbiol* 78:4543–4551. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.00001-12>.
- Imai S, Yoshida R, Endo Y, Fukunaga Y, Yamazoe A, Kasai D, Masai E, Fukuda M. 2013. *Rhizobacter gummiphilus* sp. nov., a rubber-degrading bacterium isolated from the soil of a botanical garden in Japan. *J Gen Appl Microbiol* 59:199–205. <http://dx.doi.org/10.2323/jgam.59.199>.
- Chia KH, Nanthini J, Thottathil GP, Najimudin N, Haris MRHM, Sudesh K. 2014. Identification of new rubber-degrading bacterial strains

- from aged latex. *Polym Deg Stab* 109:354–361. <http://dx.doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2014.07.027>.
- Braaz R, Fischer P, Jendrossek D. 2004. Novel type of heme-dependent oxygenase catalyzes oxidative cleavage of rubber (poly-*cis*-1,4-isoprene). *Appl Environ Microbiol* 70:7388–7395. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.70.12.7388-7395.2004>.
- Braaz R, Armbruster W, Jendrossek D. 2005. Heme-dependent rubber oxygenase RoxA of *Xanthomonas* sp. cleaves the carbon backbone of poly(*cis*-1,4-isoprene) by a dioxygenase mechanism. *Appl Environ Microbiol* 71:2473–2478. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.71.5.2473-2478.2005>.
- Schmitt G, Seiffert G, Kroneck PMH, Braaz R, Jendrossek D. 2010. Spectroscopic properties of rubber oxygenase RoxA from *Xanthomonas* sp., a new type of dihaem dioxygenase. *Microbiology* 156:2537–2548. <http://dx.doi.org/10.1099/mic.0.038992-0>.
- Birke J, Hamsch N, Schmitt G, Altenbuchner J, Jendrossek D. 2012. Phe317 is essential for rubber oxygenase RoxA activity. *Appl Environ Microbiol* 78:7876–7883. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.02385-12>.
- Seidel J, Schmitt G, Hoffmann M, Jendrossek D, Einsle O. 2013. Structure of the processive rubber oxygenase RoxA from *Xanthomonas* sp. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110:13833–13838. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1305560110>.
- Birke J, Röther W, Schmitt G, Jendrossek D. 2013. Functional identification of rubber oxygenase (RoxA) in soil and marine myxobacteria. *Appl Environ Microbiol* 79:6391–6399. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.02194-13>.
- Rose K, Tenberge KB, Steinbüchel A. 2005. Identification and characterization of genes from *Streptomyces* sp. strain K30 responsible for clear zone formation on natural rubber latex and poly(*cis*-1,4-isoprene) rubber degradation. *Biomacromolecules* 6:180–188. <http://dx.doi.org/10.1021/bm0496110>.
- Yikmis M, Steinbüchel A. 2012. Importance of the latex-clearing protein (Lcp) for poly(*cis*-1,4-isoprene) rubber cleavage in *Streptomyces* sp. K30. *Microbiologopen* 1:13–24. <http://dx.doi.org/10.1002/mbo3.3>.
- Birke J, Jendrossek D. 2014. Rubber oxygenase (RoxA) and latex clearing protein (Lcp) cleave rubber to different products and use different cleavage mechanisms. *Appl Environ Microbiol* 80:5012–5020. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.01271-14>.
- Hiessl S, Schuldes J, Thürmer A, Halbuth T, Broker D, Angelov A, Liebl W, Daniel R, Steinbüchel A. 2012. Involvement of two latex-clearing proteins during rubber degradation and insights into the subsequent degradation pathway revealed by the genome sequence of *Gordonia polyisoprenivorans* strain VH2. *Appl Environ Microbiol* 78:2874–2887. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.07969-11>.
- Hiessl S, Böse D, Oettermann S, Eggers J, Pietruszka J, Steinbüchel A. 2014. Latex clearing protein—an oxygenase cleaving poly(*cis*-1,4-isoprene) rubber at the *cis* double bonds. *Appl Environ Microbiol* 80:5231–5240. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.01502-14>.
- Yikmis M, Arenskotter M, Rose K, Lange N, Wernsmann H, Wiefel L, Steinbüchel A. 2008. Secretion and transcriptional regulation of the latex-clearing protein, Lcp, by the rubber-degrading bacterium *Streptomyces* sp. strain K30. *Appl Environ Microbiol* 74:5373–5382. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.01001-08>.
- Hamsch N, Schmitt G, Jendrossek D. 2010. Development of a homologous expression system for rubber oxygenase RoxA from *Xanthomonas* sp. *J Appl Microbiol* 109:1067–1075. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2672.2010.04732.x>.
- Berry EA, Trumpower BL. 1987. Simultaneous determination of hemes a, b, and c from pyridine hemochrom spectra. *Anal Biochem* 161:1–15. [http://dx.doi.org/10.1016/0003-2697\(87\)90643-9](http://dx.doi.org/10.1016/0003-2697(87)90643-9).
- Morrison M, Horie S. 1965. Determination of heme *a* concentration in cytochrome preparations by hemochromogen method. *Anal Biochem* 12:77–82. [http://dx.doi.org/10.1016/0003-2697\(65\)90144-2](http://dx.doi.org/10.1016/0003-2697(65)90144-2).
- Yang HJ, Park KH, Sin S, Lee J, Park S, Kim HS, Kim J. 2013. Characterization of heme ions using MALDI-TOF MS and MALDI FT-ICR MS. *Int J Mass Spectrom* 343-344:37–44. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijms.2013.03.014>.
- Yoshioka S, Kobayashi K, Yoshimura H, Uchida T, Kitagawa T, Aono S. 2005. Biophysical properties of a *c*-type heme in chemotaxis signal transducer protein Dcra. *Biochemistry* 44:15406–15413. <http://dx.doi.org/10.1021/bi0513352>.
- Cooper CE. 1999. Nitric oxide and iron proteins. *Biochim Biophys Acta* 1411:290–309. [http://dx.doi.org/10.1016/S0005-2728\(99\)00021-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0005-2728(99)00021-3).
- Hirata F, Ohnishi T, Hayaishi O. 1977. Indoleamine 2,3-dioxygenase. Characterization and properties of enzyme O<sub>2</sub><sup>-</sup> complex. *J Biol Chem* 252:4637–4642.

## **Erklärung**

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig verfasst und alle verwendeten Quellen und Hilfsmittel angegeben habe.

Stuttgart, den 25.05.2015

## Danksagung

An erster Stelle gilt mein besonderer Dank Herrn Professor Dr. Dieter Jendrossek für seine engagierte Betreuung. Seine Hilfs- und Diskussionsbereitschaft bei der Gestaltung des Promotionsthemas und der mir dabei gewährte Freiraum waren für mich von großer Bedeutung.

Ein weiterer Dank gilt Herrn Professor Dr. Georg Sprenger für die Rückmeldung im Rahmen der Halbjahresgespräche. Viele Ideen und Problemlösungen für das weitere Vorgehen in der Arbeit fanden hier ihren Anfang.

Besonders bedanken möchte ich mich bei allen Mitarbeitern, mit denen ich im Laufe der Zeit am Thema „Latexabbau“ gearbeitet habe: Dr. Georg Schmitt war für die native Reinigung von Proteinen und für die Interpretation verschiedenster Spektren ein wichtiger und guter Lehrer und Freund. Außerdem engagierten sich Nadja Hamsch, Tobias Gassner, Wolf Röther, Sirimaporn Watcharakul und Agata Krygowska ebenfalls im „Gummikampf“ und trugen zum Gelingen dieser Arbeit bei. Neben den bereits Genannten möchte ich mich bei der gesamten Arbeitsgruppe bedanken. Durch das sehr gute Arbeitsklima und die vorhandene Hilfsbereitschaft fühlte ich mich sowohl im Laboralltag als auch bei den gemeinsamen Aktivitäten außerhalb der Universität sehr wohl.

Mein Dank gilt auch Herrn Professor Dr. Oliver Einsle, Dr. Julian Seidel und Lorena Ilcu, unserer Kooperationsgruppe in Freiburg. Die hier durchgeführte EPR-Spektroskopie und die strukturelle Aufklärung von RoxA waren für diese Arbeit essentiell.

Für die Möglichkeit der Durchführung und für die Hilfestellung bei den entsprechenden Methoden möchte ich mich bei Dr. Bernd Nebel (LC-MS, Institut für Technische Biochemie) und Dr. Tomasz Jurkowski (MALDI-TOF, Institut für Biochemie) bedanken.

Meinen Eltern und Miriam Ziegler danke ich von Herzen für die familiäre Unterstützung und die bereichernden Pausen während der Promotionszeit.

## Lebenslauf

### Jakob Birke

Geburtsdatum: 10.12.1981, Mühlacker

### Ausbildung

1988 - 1992	Grundschule, Wurmberg
1992 - 1994	Hauptschule, Wiernsheim
1994 - 1999	Realschule, Heimsheim, Realschulabschluss.
1999 - 2002	Technisches Gymnasium (Heinrich-Wieland-Schule), Pforzheim, Abschluss: Fachgebundene Hochschulreife.
2002 - 2003	Zivildienst: AWO Soziale Dienste, Pforzheim
10 / 2003 - 11 / 2009	Studium der Technischen Biologie, Universität Stuttgart
12 / 2009 - 11 / 2010	Diplomarbeit am Institut für Mikrobiologie, Universität Stuttgart; Thema: "Überexpression von RoxA (Rubber oxygenase A) in <i>E. coli</i> , <i>B. subtilis</i> und im natürlichen Wirt <i>Xanthomonas</i> sp. 35Y"
02 / 2011 - 05 / 2015	Durchführung experimenteller Arbeiten in der AG von Prof. Jendrossek am Institut für Mikrobiologie der Universität Stuttgart im Rahmen der vorliegenden Dissertationsschrift zur Charakterisierung von RoxA und Lcp