

# **Poly(*cis*-1,4-Isopren) Oxygenase A (RoxA):**

Identifizierung, Isolierung, Charakterisierung, Kristallisation und  
Reaktionsmechanismus einer neuartigen extrazellulären Dioxygenase

Von der Fakultät für Geo- und Biowissenschaften der Universität Stuttgart  
zur Erlangung der Würde eines Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)  
genehmigte Abhandlung

Vorgelegt von

**Reinhard Braaz**

aus Schwäbisch Hall

Hauptberichter:	Prof. Dr. D. Jendrossek
Mitberichter:	Prof. Dr. A. Stolz
Mitberichter:	Prof. Dr. J. R. Andreesen
Tag der mündlichen Prüfung:	16.12.2005

Institut für Mikrobiologie der Universität Stuttgart

2005

Die experimentellen Arbeiten für die vorliegende Dissertation wurden unter der Leitung von Prof. Dr. D. Jendrossek am Institut für Mikrobiologie der Universität Stuttgart durchgeführt.

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht.

## Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen .....	4
Abstract .....	5
Kurzfassung .....	7
1. Einführung.....	9
1.1. Vorkommen und Struktur von Naturkautschuk oder Poly( <i>cis</i> -1,4-Isopren).....	9
1.2. Erste Untersuchungen zum mikrobiellen Abbau von Kautschuk – Probleme und Strategien .....	11
1.3. Abbauprodukte von Poly( <i>cis</i> -1,4-Isopren) – Ein hypothetisches Abbauschema .....	14
1.4. Genetische und biochemische Untersuchungen zur enzymatischen Spaltung von Poly( <i>cis</i> -1,4-Isopren).....	17
2. Die Spaltung von Poly( <i>cis</i> -1,4-Isopren) durch die neuartige Oxygenase RoxA aus <i>Xanthomonas</i> sp. 35Y .....	21
2.1. Die Entdeckung und Charakterisierung der Häm-abhängigen „Rubber Oxygenase A“ (RoxA).....	21
2.2. RoxA ist eine Dioxygenase .....	26
2.3. Untersuchungen zum Reaktionsmechanismus von RoxA .....	29
2.4. Kristallisation von RoxA.....	32
2.5. Die genetische Umgebung von <i>roxA</i> .....	34
3. Literatur.....	36
Appendix 1: Novel type of heme-dependent oxygenase catalyzes oxidative cleavage of rubber (poly- <i>cis</i> -1,4-isoprene).....	41
Appendix 2: Heme-dependent rubber oxygenase RoxA of <i>Xanthomonas</i> sp. cleaves the carbon backbone of poly( <i>cis</i> -1,4-isoprene) by a dioxygenase mechanism.....	49
Appendix 3: On the reaction mechanism of heme-dependent rubber dioxygenase RoxA: evidence for polyisoprene radicals as intermediates .....	55
Danksagungen .....	72
Lebenslauf .....	73

## Abkürzungen

ADH	Alkohol Dehydrogenase
CCPs	Cytochrom <i>c</i> Peroxidasen
Da	Dalton
DC	Dünnschichtchromatographie
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
EPR	Elektron-Paramagnet-Resonanz
FPLC	Fast performance liquid chromatographie
GC-MS	Gas Chromatographie, gekoppelt mit Massenspektroskopie
HDTD	12-Hydroxy-4,8-dimethyl-trideca-4,8-dien-1-ol
HPLC	High performance liquid chromatographie
HPLC-MS	High performance liquid chromatographie, gekoppelt mit Massenspektroskopie
IR	Infrarot
MALDI-ToF	Matrix-assisted laser desorption time of flight mass spectroscopy
MW	Molekulargewicht
NHE	Normalwasserstoffelektrode
NMR	Nuklear magnetic resonance spectroscopy
ODTD	12-Oxo-4,8-dimethyl-trideca-4,8-dien-1-al
ORFs	Offene Leserahmen
RoxA	Rubber Oxygenase A
SEM	Scanning electron microscopy
SDS-PAGE	Natrium-Dodecylsulfat Polyacrylamid Gelelektrophorese
U	Einheiten [ $\mu\text{mol min}^{-1}$ ]
UV/Vis	Ultraviolett und sichtbares Lichtspektrum
vs	versus = gegen

## Abstract

Natural rubber, or poly(cis-1,4-isoprene) is under qualitative and quantitative aspects one of the most important biopolymers of our time. Polyisoprene does not accumulate in the environment which indicates that it must be biodegradable. For almost 100 years millions of tons of natural rubber derived products have been produced by mankind per year. However, the biochemical mechanisms of biological rubber degradation are still unknown. The aim of this work was to investigate the biochemical principles of the enzymatic cleavage of polyisoprene with *Xanthomonas* sp. 35Y serving as a model organism.

A protein was purified to homogeneity from 20 liter supernatant of a rubber grown *Xanthomonas* sp. 35Y culture that was capable of cleaving polyisoprene *in vitro*. Therefore this protein was named “rubber oxygenase A” (RoxA). The major degradation product of RoxA induced polyisoprene cleavage was isolated and the structure was determined as 12-oxo-dimethyltrideca-4,8-diene-1-al (ODTD) by <sup>1</sup>H-NMR and HPLC-MS analysis. Beside ODTD there was a homologous series of minor metabolites that differed from ODTD only in the number of repetitive isoprene units between the terminal functions (CHO-CH<sub>2</sub>- and -CH<sub>2</sub>-COCH<sub>3</sub>). Enzymatic cleavage of rubber by RoxA was strictly dependent on the presence of oxygen, required no cofactors or metal ions and was optimal around pH 7.0 and 40 °C. Purified RoxA shows a red colour and strong absorptions bands characteristic for heme-containing proteins at 406 nm, 532 nm, 560 nm and 672 nm in the oxidized and at 418 nm, 522 nm, 549 nm and 554 nm in the reduced state. The existence of two heme-iron-centers was confirmed by different, independent methods, being in agreement with the *roxA* derived aminoacid-sequence, showing two potential heme-binding sites for covalent heme attachment. <sup>18</sup>O<sub>2</sub>-labelling experiments, including the development of a method for stabilization of the isotope label by enzymatic derivatisation, confirmed that RoxA cleaves rubber by a dioxygenase mechanism. Electron-paramagnetic-resonance-spectroscopy (EPR) and optical redox titration experiments showed that RoxA features two different Fe(III)-heme-centers with redoxpotentials of about -65 mV and -145 mV (both *vs* normal hydrogen electrode (NHE)). One Fe(III)-heme-center exclusively existed in the *low spin* state coordinated by two histidine residues. The other Fe(III)-heme-center existed mainly in the *low spin* state coordinated by two histidine residues, with detectable traces of an Fe(III) *high spin* state coordinated by only one histidine residue, resulting in one free coordination site. EPR-measurements of RoxA after prolonged anaerobic incubation with substrate showed

the formation of an organic radical over time. A new, unique reaction mechanism for poly(*cis*-1,4-isoprene) cleavage, based on experimental results was postulated. A crystallization protocol for RoxA was developed and RoxA protein crystals were obtained. Defraction analysis of RoxA crystals showed a resolution of 2 Å. The structure of RoxA is presently solved in cooperation with a crystallographer.

## Kurzfassung

Naturkautschuk, oder Poly(*cis*-1,4-Isopren) ist unter quantitativen und qualitativen Gesichtspunkten eines der bedeutendsten Biopolymere unserer Zeit. Polyisopren häuft sich nicht in der Umwelt an und muss deshalb einem biologischen Abbauprozess unterliegen. Obwohl Produkte aus Naturkautschuk seit ca. 100 Jahren im Millionen-Tonnen Maßstab von Menschen verwendet werden, sind die dem biologischen Abbau zugrunde liegenden biochemischen Mechanismen unbekannt. Aus diesem Grund war es das Ziel dieser Arbeit, die Biochemie der enzymatischen Polyisoprenspaltung mit *Xanthomonas* sp. 35Y als Modellorganismus zu untersuchen.

Aus 20 Litern Kulturüberstand einer auf Latexmilch gewachsenen *Xanthomonas* sp. 35Y Kultur wurde ein extrazelluläres Protein zur Homogenität gereinigt, das *in vitro* zur Spaltung von Polyisopren in der Lage war. Dieses Protein wurde als „rubber oxygenase A“ (RoxA) bezeichnet. Das Hauptabbauprodukt der RoxA katalysierten Spaltungsreaktion wurde isoliert und seine Struktur als 12-Oxo-dimethyltrideca-4,8-diene-1-al (ODTD) durch <sup>1</sup>H-NMR und HPLC-MS Messungen bestimmt. Neben ODTD wurden verwandte Metabolite, die sich nur in der Anzahl der Isopreneinheiten zwischen den terminalen Endgruppen (CHO-CH<sub>2</sub>- und -CH<sub>2</sub>-COCH<sub>3</sub>) unterscheiden, ebenfalls nachgewiesen. Die Reaktion des Enzyms mit Polyisopren war strikt von Sauerstoff abhängig, benötigte keine Kofaktoren oder Metallionen und zeigte einen optimalen Umsatz bei pH 7,0 und 40 °C. Isoliertes RoxA weist eine tiefrote Farbe mit für Hämproteine charakteristischen Absorptionsmaxima bei 406 nm, 532 nm, 560 nm und 672 nm im oxidierten und 418 nm, 522 nm, 549 nm und 554 nm im reduzierten Zustand auf. Das Vorhandensein von zwei Häm-Zentren mit jeweils einem Eisenatom wurde über unabhängige Verfahren nachgewiesen und stimmt mit zwei aus der Aminosäuresequenz von RoxA postulierten Häm-Bindemotiven für kovalente Häm-Bindung überein. Durch <sup>18</sup>O<sub>2</sub>-Markierungsexperimente, für die eine enzymatische Derivatisierung von ODTD zur Stabilisierung der Isotopenmarkierung entwickelt wurde, wurde gezeigt, dass RoxA Polyisopren durch einen Dioxygenasemechanismus spaltet. Durch Elektronen-Paramagnet-Resonanz-Spektroskopie (EPR) und eine spektroskopische Redox Titration konnte gezeigt werden, dass RoxA zwei unterschiedliche Häm-Gruppen mit Redoxpotentialen von -65 mV und -145 mV (beide vs Normalwasserstoffelektrode (NHE)) mit je einem Fe(III) im Zentrum besitzt. Ein Zentrum lag ausschließlich im Fe(III) *low spin* Zustand vor und wurde von zwei Histidinresten

koordiniert. Das andere Zentrum lag zum einen Teil ebenfalls im Fe(III) *low spin* Zustand, von zwei Histidinresten koordiniert, zum anderen Teil aber im Fe(III) *high spin* Zustand, von nur einem Histidinrest koordiniert vor, so dass eine Koordinationsstelle frei bleibt. EPR-Messungen nach unterschiedlich langer anaerober Inkubation von RoxA mit Substrat wiesen auf eine von der Inkubationszeit abhängige Bildung eines organischen Radikals hin. Durch diese experimentellen Befunde wurde erstmals ein neuer, nicht nur auf theoretischen Überlegungen basierender Reaktionsmechanismus für die Spaltung von Poly(*cis*-1,4-Isopren) formuliert. Es wurde ein Kristallisationsprotokoll für RoxA entwickelt und RoxA Proteinkristalle erhalten. Diese Kristalle wurden mittels Röntgenstrukturanalyse untersucht, wobei die Kristalle bis zu einer Auflösung von 2 Å streuten. Derzeit erfolgt die Strukturauflösung von RoxA in Kooperation mit einem Kristallographen.



# 1. Einführung

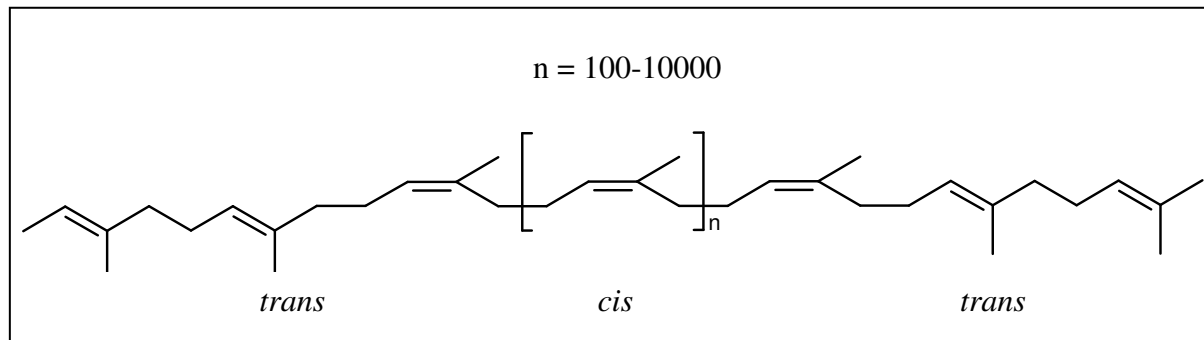
## 1.1. Vorkommen und Struktur von Naturkautschuk oder Poly(*cis*-1,4-Isopren)

„We use rubber in so many ways, it becomes a servant that follows us, literally, from the cradle to the grave...” (Ralph Wolfe, 1964).

Dieser poetische Satz von Ralph Wolfe verdeutlicht eindrucksvoll, dass Gummiprodukte ebenso wenig wie Stahl, Wolle und Mörtel aus unserer modernen Gesellschaft wegzudenken sind. Gummiprodukte umgeben uns tagtäglich - Sicherheit und Komfort technischer Errungenschaften wie Flugzeuge, Autos und Züge hängen von diesen Produkten ab. Gummi kann auf zwei Arten hergestellt werden: von der Natur und künstlich vom Menschen. Naturkautschuk wird von Bäumen (hauptsächlich *Hevea brasiliensis*) gewonnen, die auf Plantagen in Asien und Afrika wachsen, während Synthetikautschuk in Fabriken überall auf der Welt, ausgehend von Petroleum und anderen Mineralölen, vom Menschen synthetisiert wird. Der unbearbeitete Kautschuk ist jedoch, egal ob künstlich oder natürlich hergestellt, wenig brauchbar. Erst durch die Zugabe von Chemikalien erhält der Kautschuk die gewünschten Eigenschaften: So können Kautschukprodukte weich wie ein Schwamm, elastisch wie ein Gummiband oder hart wie eine Bowling-Kugel gemacht werden. Aus diesem Grund umgeben uns tausende Kautschukprodukte mit verschiedensten Elastizitäts- und Härtegraden in unserem täglichen Leben.

Naturkautschuk war den Ureinwohnern Amerikas schon lange vor Ankunft der europäischen Eroberer bekannt. Erste wissenschaftliche Studien über Naturkautschuk wurden bereits 1735 von Charles de la Condamine angefertigt, nachdem er auf einer Reise nach Peru mit Kautschuk in Berührung gekommen war. Die Bezeichnung Kautschuk, oder besser Caoutchouc, für koagulierte oder präzipitierte Latexmilch stammt aus dem indianischen und bedeutet „weinender Baum“ (caa = Tränen; ochu = der Baum; cahuchu = weinender Baum). Die von Pflanzen produzierte Latexmilch dient dem Wundverschluss und beschleunigt die Heilung nach mechanischer Verletzung der Rinde. Da Naturkautschuk einem schnellen Alterungsprozess durch Licht und Wärmeeinwirkung unterliegt, wurde stetig an der Verbesserung und Stabilisierung dieses Materials gearbeitet. 1839 wurde durch die zeitgleiche

Erfindung der Vulkanisation mit Schwefel durch Hancock (England) und Goodyear (USA) die industrielle Herstellung und Nutzung von Kautschukprodukten ermöglicht. Durch die Vulkanisation erfolgt eine Quervernetzung der Polymerstränge mittels Schwefelbrücken (Coran, A. Y. 1978), welche die Stabilität und Haltbarkeit der Kautschukprodukte um ein Vielfaches verbessert. Inzwischen liegt die Weltjahresproduktion von Naturkautschuk bei ca. 6,5 mio t, wovon 70% zur Produktion von Autoreifen verwendet werden.



**Abbildung 1.1.1:** Struktur von Polyisopren aus *H. brasiliensis* nach Eng, A. H. et al. (1994) und Tanaka, Y. et al. (1996).

Naturkautschuk besteht aus einigen hundert bis zu mehreren zehntausend Isopreneinheiten ( $C_5H_8$ ), besitzt ein Molekulargewicht von bis zu  $10^6$  Da und wird von über 2500 Pflanzen und einigen Pilzen synthetisiert. Der bekannteste Vertreter der kautschukbildenden Pflanzen ist der Gummibaum *Hevea brasiliensis*, dessen synthetisiertes Poly(*cis*-1,4-Isopren) an den Enden jeweils zwei *trans*-Isopreneinheiten besitzt (Abbildung 1.1.1 (Eng, A. H. et al. 1994, Tanaka, Y. et al. 1996)). Heutzutage werden 99% des auf dem Weltmarkt gehandelten Naturkautschuks aus *H. brasiliensis* gewonnen (Tanaka, Y. et al. 2001). Dort wird Latex in speziellen Zellen des Phloems, den Laticifers, synthetisiert und häuft sich dort in Tröpfchen mit einer Größe von 3-5  $\mu m$  an (Gomez, J. B. et al. 1989). Diese Latextröpfchen sind von einer membranartigen Hülle aus Lipiden und Proteinen umgeben (Gomez, J. B. et al. 1979), welche die hydrophoben Polymerbestandteile von der hydrophilen Umgebung trennt. Um Latexmilch zu gewinnen, wird die Rinde der Bäume spiralförmig angeritzt („Tapping“) und die durch den Turgor in den Laticifers von selbst austretende Latexmilch in kleinen, mit Ammonium oder anderen Antioxidantien versetzten Gefäßen aufgefangen. Die Zusammensetzung der aus *H. brasiliensis* gewonnenen Latexmilch (siehe Tabelle 1.1.1) variiert je nach Wahl des Klons, Bodenbeschaffenheit und Wetterbedingungen (Subramaniam, A. 1995). Selbst gewaschenes Latex besteht noch bis zu 10% aus Nicht-Gummi-Bestandteilen und einige Proteine aus *H. brasiliensis* besitzen allergisches Potential. Aus diesem Grund wurden verschiedene Methoden entwickelt, um

diese zu entfernen. Beispielsweise wird Latex, das zur Produktion von Handschuhen oder Kondomen benutzt wird, mittels Zentrifugation, Behandlung mit Proteasen und Natriumhydroxid gereinigt, so dass der Proteingehalt auf weniger als 20 µg/g Latex fällt.

**Tabelle 1.1.1:** Zusammensetzung der Latexmilch aus *Hevea brasiliensis* nach Subramaniam, A (1995).

Komponente	Anteil [%]
Polyisopren	25 – 35
Proteine	1 - 1,8
Kohlenhydrate	1 – 2
neutrale Lipide	0,4 - 1,1
polare Lipide	0,5 - 0,6
anorganische Komponenten	0,4 - 0,6
Aminosäuren, Amide etc.	0,4
Wasser	50 - 70

## 1.2. Erste Untersuchungen zum mikrobiellen Abbau von Kautschuk – Probleme und Strategien

Berichte über die Zerstörung kautschukhaltiger Materialien, wie z.B. Gummidichtungen durch mikrobiellen Bewuchs, und die Tatsache, dass sich Naturkautschuk nicht in unserer Biosphäre anreichert, zeigen, dass es einen kontinuierlichen biologischen Abbauprozess geben muss. Somit bringt der biologische Abbau der verschiedenen Kautschukprodukte Probleme, wie Alterungserscheinungen und Zerstörungen, die es zu verhindern gilt, als auch die Chance der umweltgerechten Entsorgung von Kautschukprodukten mit sich. Während der letzten Jahrzehnte wurde jedoch, vor allem wegen der wirtschaftlichen Bedeutung (Zyska, B. J. 1981, Zyska, B. J. 1988), die größere Aufmerksamkeit auf die Verhinderung des biologischen Abbaus gerichtet. Diese Untersuchungen trugen jedoch nicht viel zum Verständnis der dem Kautschukabbau zugrunde liegenden Mechanismen bei. Es ist erstaunlich, wie wenig über die biologischen und chemischen Vorgänge des Kautschukabbaus bis dato bekannt ist. Im Rahmen dieser Arbeit konnten erstmals am Kautschukabbau involvierte Proteine und Gene identifiziert werden (Braaz, R. et al. 2004, Braaz, R. et al. 2005a, Jendrossek, D. et al. 2003).

Die Erforschung des mikrobiellen Abbaus von Polyisopren bringt viele methodische Schwierigkeiten und Probleme mit sich: Der biologische Abbau von Polyisopren ist ein sehr langsamer Prozess, was z.B. an einem sehr langsamen Wachstum der Organismen mit Kautschukmaterialien als einzige Kohlenstoffquelle und daraus resultierenden langen Inkubationszeiten erkennbar wird. Altreifen, die achtlos in die Natur geworfen werden, verwittern daher kaum sichtbar und erst im Laufe von Jahrzehnten. So können Abbauprobe Wochen oder sogar Monate dauern, um genug Zellmaterial oder Abbauprodukte zur Untersuchung zu erhalten. Die gleiche Zeitspanne muss z.B. auch für Versuche mit Negativmutanten berücksichtigt werden, um zu sehen, ob diese auf dem Polymer wachsen oder nicht. Zusätzlich stellen die in Kapitel 1.1 beschriebenen Verunreinigungen (siehe Tab. 1.1.1) von Naturkautschuk ein weiteres Problem dar. Da es kaum möglich ist, alle Verunreinigungen zu entfernen, besteht immer die Gefahr, dass das Wachstum vermeintlich abbauender Mikroorganismen durch die Verunreinigungen und nicht durch den Abbau von Polyisopren erfolgt und somit falsch positive Ergebnisse beobachtet werden. Latexmilch besteht aus Polymeren mit verschiedener Kettenlänge, wodurch es nicht möglich ist, diese als Substrat in molaren Verhältnissen in Wachstumsversuchen oder Aktivitätstests einzusetzen. Synthetische Polymere mit definierter Kettenlänge haben den Nachteil, dass sie wasserunlöslich sind und es somit notwendig ist, eine stabile Suspension herzustellen. Dies erfordert aber wieder die Zugabe von Detergenzien oder Lösungsmitteln, die wiederum das Wachstum oder die Enzymaktivität beeinflussen können. Ein weiteres Problem ist, dass oft neu isolierte Organismen zur Untersuchung des Kautschukabbaus verwendet werden. Für diese Organismen müssen dann erst die entsprechenden genetischen Werkzeuge, wie z.B. „shuttle“-Vektoren oder Transformations- und Konjugations-Protokolle entwickelt werden (Arenskötter, M. et al. 2003, Rose, K. et al. 2005, Banh, Q. et al. 2005, Rose, K. et al. 2002, Arenskötter, M. et al. 2004). Außerdem steht noch keine vollständige Gensequenz eines Polyisopren abbauenden Organismus zur Verfügung.

Bereits 1914 berichteten Söhngen und Fol (Söhngen, N. L. et al. 1914) über den Abbau von Kautschuk durch Mikroorganismen. Sie bedienten sich dabei der so genannten „solution cast“-Technik, bei der ein von Verunreinigungen befreiter Polyisopren-Film als einzige Kohlenstoff-Quelle für Anreicherungskulturen dient. Mit Hilfe dieser Technik gelang ihnen die Isolierung von zwei Actinomyceten (*Actinomyces elastica* und *Actinomyces fuscus*), die auf dem Polyisopren-Film wachsen, diesen angreifen und Löcher unter den Kolonien hervorrufen konnten. Aus der Zunahme der Biomasse und der Veränderung der Viskosität der

eingesetzten Polyisopren-Filme schlossen sie, dass es sich bei diesen Stämmen um Kautschuk abbauende Organismen handeln muss. Einen echten Beweis für die Spaltung des Polyisoprens konnten Söhngen und Fol jedoch nicht liefern. Die Mikroorganismen wurden leider nicht konserviert.

Einige Jahre später entwickelten Spence und van Niel (Spence, D. et al. 1936) eine Technik zur Sterilisation von Latexmilch und eine auf Latex-Agar-Overlay basierende „clear-zone“-Technik. Zur Identifizierung von zum Abbau befähigten Mikroorganismen wird Mineralagar mit einer dünnen Lage aus Latexagar überschichtet. Organismen, die Polyisopren abbauen können, wachsen an und bilden Aufklarungszonen im milchig-trüben Latex-Overlay-Agar. Mit Hilfe dieser Technik konnten die Autoren vier verschiedene Aufklarungszonen bildende Actinomyceten isolieren. In den nachfolgenden Jahren konnten mit der „clear-zone“-Technik viele weitere Kautschuk abbauende Organismen isoliert werden (Borel, M. et al. 1982, Jendrossek, D. et al. 1997, Kalinenko, V. O. 1938, Linos, A. et al. 2000, Rook, J. J. 1955), wobei es sich meist um Gram-positive, myzelbildende Organismen aus der Gruppe der Actinomyceten handelte. Da für diese Versuche jedoch Latexmilch mit all ihren Verunreinigungen benutzt wurde, bereitete es weiterhin Probleme, den tatsächlichen Abbau des Polyisoprens zu beweisen und ein Wachstum und eine Verwertung der Verunreinigungen auszuschließen. Oft wurden sehr ungenaue und indirekte Methoden, wie Gewichtsverlust des Latexmaterials (Spence, D. et al. 1936), Zunahme der Zellmasse (Spence, D. et al. 1936), Sauerstoffverbrauch (ZoBell, C. E. et al. 1942, ZoBell, C. E. et al. 1944) und die Abnahme der Viskosität des Latexmaterials (Söhngen, N. L. et al. 1914) zum Nachweis und zur Charakterisierung des Latexabbaus verwendet. Welche Probleme diese Nachweismethoden mit sich bringen, zeigte sich z.B. in den Arbeiten von Shaposnikov (Shaposnikov, V. N. et al. 1952b, Shaposnikov, V. N. et al. 1952a), der das Wachstum von Pilzen auf Agarplatten mit Latexfilmen untersuchte und einen Gewichtsverlust des Polymers, aber kein Zellwachstum beobachtete.

Ein Nachteil der von Spence und van Niel entwickelten Latex-Overlay-Technik ist, dass sich nicht alle Kautschuk abbauenden Organismen auf diese Art und Weise kultivieren lassen. Auf diesen Nährböden ist lokal relativ wenig Polyisopren verfügbar, wodurch nicht alle zum Kautschukabbau befähigten Organismen Aufklarungszonen bilden. Aus diesem Grund wurden die Kautschuk abbauenden Organismen in zwei Untergruppen aufgeteilt: (1) Aufklarungszonen bildende Organismen und (2) nicht Aufklarungszonen bildende,

adhäsiv wachsende Organismen. Zu den Aufklarungszonen bildenden Organismen gehören die Actinomyceten und als einziger bisher bekannter Gram-negativer Vertreter *Xanthomonas* sp. 35Y. Diese Gruppe scheidet vermutlich Enzyme zum Abbau des Polyisoprens ins Medium aus und zeigt, mit Ausnahme von *Xanthomonas* sp. 35Y, ein relativ schwaches Wachstum und Abbauverhalten auf Polyisopren. Die zweite Gruppe, die auch *Corynebacterium-Nocardia-Mycobacterium* Gruppe genannt wird, bildet keine Aufklarungszone auf Latex-Overlay-Agar-Platten. Sie wachsen nur mit direktem Kontakt zum Substrat und sind die potenteren Kautschukabbauer was Wachstum und Abbauleistung angeht (Linos, A. et al. 1999, Linos, A. et al. 2000, Linos, A. et al. 2002).

Cundell und Mulcock (Cundell, A. M. et al. 1973, Cundell, A. M. et al. 1975, Cundell, A. M. et al. 1976), die sich mit dem Abbau von vulkanisiertem Kautschuk befassten, kombinierten eine Vielzahl von neuen und den vorher genannten älteren Nachweistechiken, um eine Spaltung des Polyisoprens nachzuweisen. Sie bestimmten die Sauerstoffaufnahme, CO<sub>2</sub>-Abgabe, die Veränderung der Zugbelastbarkeit des Kautschuks und untersuchten die Substratoberfläche mit SEM und IR-Spektroskopie. Die SEM Aufnahmen zeigten, dass die Substratoberfläche von Mycelien und Hyphen, wie sie für Actinomyceten (wie z.B. *Streptomyces* und *Nocardia*) typisch sind, durchzogen war. Zusätzlich konnte mit Hilfe der IR-Spektroskopie eine Abnahme der Anzahl an Doppelbindungen gezeigt werden. Die Autoren postulierten daher eine Spaltung des Polymers durch eine Monooxygenase und einen nachfolgenden Abbau der verbleibenden Polyisoprenkette. Da die SEM Studien jedoch nicht mit Reinkulturen und die IR-spektroskopischen Messungen ohne Abtrennung des Zellmaterials vom Substrat durchgeführt wurden, konnten auch diese Experimente keinen eindeutigen Hinweis auf den Mechanismus oder den tatsächlichen Abbau des Polyisoprens liefern. Aus diesem Grund wurde in nachfolgenden Studien (Heisey, R. M. et al. 1995) die Gelpermeationschromatographie verwendet, um eine Reduktion des Molekulargewichts von Polyisopren nachzuweisen (Bode, H. B. et al. 2000, Bode, H. B. et al. 2001, Borel, M. et al. 1982, Tsuchii, A. et al. 1979, Rose, K. et al. 2005).

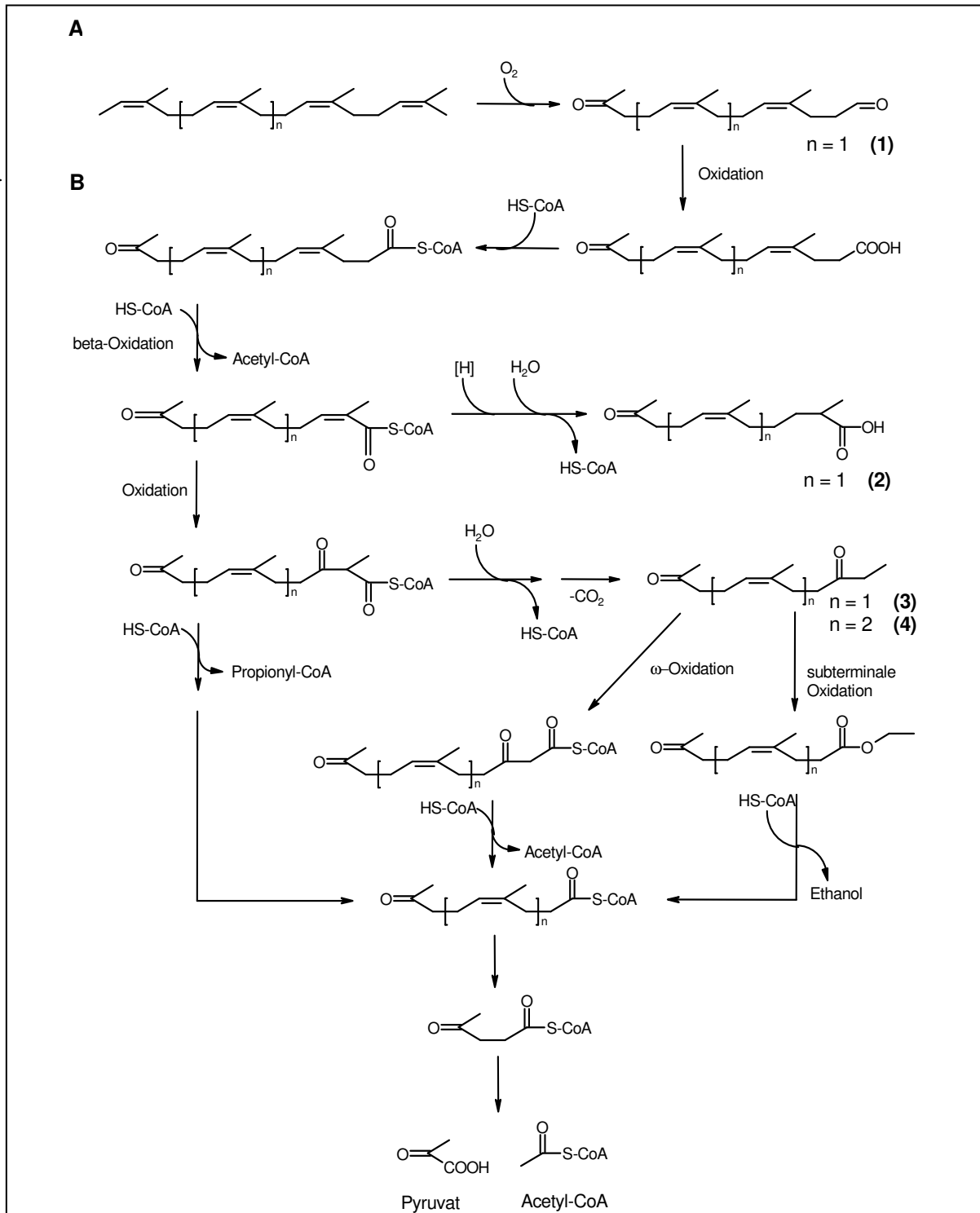
### **1.3. Abbauprodukte von Poly(*cis*-1,4-Isopren) – Ein hypothetisches Abbauschema**

Erste handfeste Beweise für den Abbau von Polyisopren konnten von Tsuchii und Mitarbeitern in den 90er Jahren erbracht werden (Tsuchii, A. et al. 1985, Tsuchii, A. et al.

1990, Tsuchii, A. et al. 1996b, Tsuchii, A. et al. 1996a, Tsuchii, A. et al. 1999). Sie isolierten unter Einsatz verschiedener Kautschukproben, vulkanisiert und nicht vulkanisiert, den Actinomyceten *Nocardia* sp. 835A und den einzigen bekannten Gram-negativen Vertreter *Xanthomonas* sp. 35Y. Latexhandschuhstreifen, die mit *Nocardia* sp. 835A inkubiert wurden, zeigten nach 17 Tagen einen Gewichtsverlust von 90%, wobei die Zellmasse auf der Substratoberfläche stetig zunahm. Um die vorkommenden Abbauprodukte zu isolieren, wurden die verbleibenden Substratreste mit organischen Lösungsmitteln extrahiert und mittels zweidimensionaler Dünnschichtchromatographie und GPC analysiert. Durch Färbung mit Schiff's Reagenz, IR-Spektroskopie,  $^1\text{H-NMR}$ ,  $^{13}\text{C-NMR}$  und GC-MS konnten zwei niedermolekulare Oligoisoprenoide mit je zwei Carbonyl-Gruppen als Abbauprodukte nachgewiesen werden. Anhand dieser Daten postulierten die Autoren eine enzymatische Spaltung der Doppelbindung mit Hilfe von Sauerstoff als ersten Schritt des Polyisoprenabbaus. Mit den gleichen Techniken wurde auch die Reaktion von zellfreiem Kulturüberstand einer auf Polyisopren gewachsenen *Xanthomonas* sp. 35Y Kultur mit Latexmilch untersucht. Diese Experimente zeigten, dass *Xanthomonas* sp. 35Y eine hitzeempfindliche, Kautschuk abbauende Komponente ins Medium sekretiert, die hauptsächlich zur Bildung eines Abbauproduktes führt. Dieses Abbauprodukt wurde als 12-Oxo-4,8-dimethyl-trideca-4,8-dien-1-al (ODTD, siehe Abbildung 1.3.1 A) identifiziert und unterscheidet sich nur in der Anzahl der Polyisopreneinheiten von den in *Nocardia* sp. 835A nachgewiesenen Abbauprodukten. Markierungsexperimente mit  $^{18}\text{O}_2$  zeigten schließlich, dass mindestens ein Sauerstoffatom aus dem Luftsauerstoff in ODTD eingebaut wird, was die Autoren ebenfalls, wie bei *Nocardia* sp. 835A, auf eine Spaltung der Doppelbindung mit Hilfe von Sauerstoff schließen ließ. Aufgrund dieser Ergebnisse postulierten sie ein durch diese Daten gestütztes Abbauschema (siehe Abbildung 1.3.1 A).

Die Autoren sahen das größere Potential zum Abbau von Kautschuk und somit eine Möglichkeit zur biologischen Entsorgung von Kautschukabfällen bei *Nocardia* sp. 835A. Aus diesem Grund wurden die Arbeiten mit diesem Stamm fortgeführt und *Xanthomonas* sp. 35Y nicht weiter bearbeitet. Einige Jahre später führten Jendrossek und Mitarbeiter ähnliche Versuche wie Tsuchii et al. zur Isolierung von Kautschuk-Abbauprodukten mit Streptomyceten durch (Bode, H. B. et al. 2000, Bode, H. B. et al. 2001). Bei den von ihnen isolierten Abbauprodukten handelte es sich ebenfalls um niedermolekulare Oligoisoprenoide, die jedoch kein Aldehyd wie bei Tsuchii et al., sondern andere unterschiedlich weiteroxidierte

Endgruppen enthielten. Mit Hilfe dieser Ergebnisse formulierten sie denkbare Abbauewege, in die die beobachteten Abbauprodukte integriert wurden (siehe Abbildung 1.3.1 B).

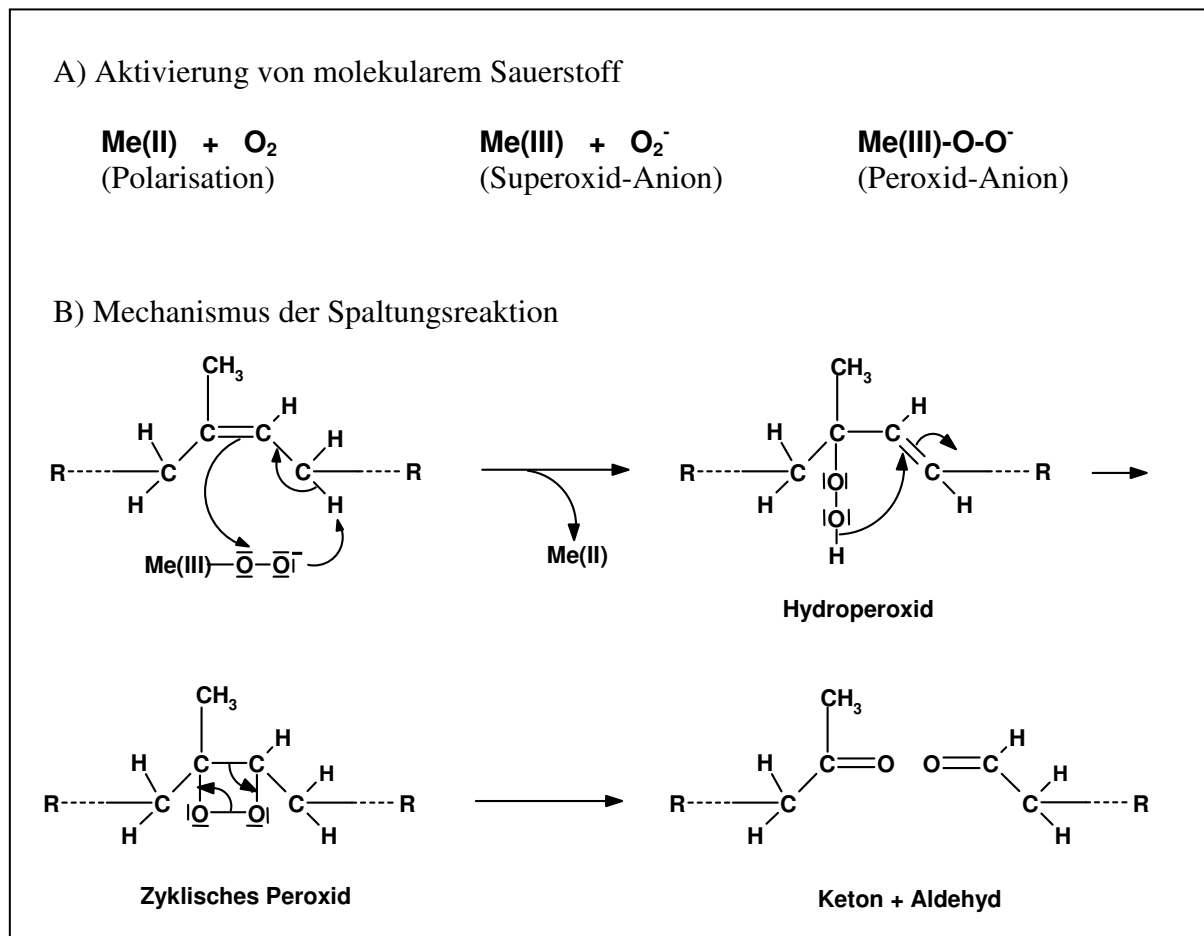


**Abbildung 1.3.1:** Entwicklung eines hypothetischen Abbauschemas von Poly(*cis*-1,4-Isopren). (A) Initialer Abbauschritt nach Tsuchii et al. (1990). (B) Mögliche metabolische Routen zum Abbau von Kautschuk nach Bode et al. (2000). Unterbrochene Pfeile markieren Reaktionen mit mehreren Schritten. Die fett gedruckten Nummern bezeichnen nachgewiesene Abbauprodukte.



#### 1.4. Genetische und biochemische Untersuchungen zur enzymatischen Spaltung von Poly(*cis*-1,4-Isopren)

Nachdem mit Hilfe der Analyse der Abbauprodukte ein hypothetisches Abbauschema erstellt werden konnte (Bode, H. B. et al. 2000), stellte sich nun die Frage, wie und mit welchen Enzymen die Spaltung des Polymers und wie die genetische Regulation der beteiligten Gene erfolgt. Tsuchii et al. fanden bereits erste Hinweise auf ein extrazelluläres Enzym, welches für den Polyisoprenabbau in *Xanthomonas* sp. 35Y verantwortlich sein könnte (Tsuchii, A. et al. 1990, Linos, A. et al. 2001). Eine extrazelluläre Aktivität ist auch zwingend erforderlich, da eine Spaltung des Polymers außerhalb der Zelle oder an der Zellwand erfolgen muss. Aus diesem Grund wurden von Linos et al. (Linus, A. et al. 2001) die extrazellulären Proteinmuster von *G. polyisoprenovorans* VH2 Zellen, die auf Latex gewachsen waren mit den auf anderen C-Quellen gewachsenen verglichen. Im Kulturüberstand des zur *Corynebacterium-Nocardia-Mycobacterium* Gruppe gehörenden *G. polyisoprenovorans* VH2 konnten zwei, nur bei Wachstum auf Latex synthetisierte Proteine nachgewiesen und N-terminal ansequenziert werden. Hierbei zeigte ein Protein Homologien zu dem Lignostilben abbauenden Protein LSD I (Kamoda, S. et al. 1993) und das zweite Protein Homologien zu der extrazellulären Superoxiddismutase GUH-2 (Alcendor, D. J. et al. 1995). LSD I spaltet Lignostilben mittels eines Dioxygenasemechanismus und katalysiert somit eine sehr ähnliche Reaktion, wie sie als Initialschritt für den Polyisoprenabbau postuliert wurde. Die erhöhte Expression eines zur Superoxiddismutase GUH-2 homologen Proteins bei Wachstum auf Kautschuk kann ebenfalls als sinnvoll angesehen werden, obwohl solch ein Protein vermutlich nicht direkt an der Spaltung des Polyisopren-Rückrades beteiligt ist. Denn bei diversen Oxygenasereaktionen kann die Entstehung von Superoxidradikalen beobachtet werden, die durch diese Proteine abgefangen werden. Dadurch wird eine Schädigung der Zelle verhindert (Fridovich, I. 1995). Unter Berücksichtigung dieser Ergebnisse und durch die Tatsache, dass Sauerstoff aufgrund des Spinverbotes nicht direkt mit Kohlenstoff in organischen Verbindungen reagieren kann (Harayama, S. et al. 1992), sondern ein Übergangsmetall als Kofaktor benötigt, wurde ein erster theoretischer Ansatz, wie die enzymatische Spaltung von Poly(*cis*-1,4-Isopren) erfolgen könnte, von Linos und Steinbüchel 2001 (Linus, A. et al. 2001) vorgeschlagen (Abb. 1.4.1).



**Abbildung 1.4.1:** Postulierter Reaktionsmechanismus der enzymatischen Spaltung von Poly(*cis*-1,4-Isopren) durch eine Dioxygenase nach Linos et al. (2001). Me, Übergangsmetall.

Da der von Linos et al. (Linos, A. et al. 2001) verwendete *G. polyisoprenovorans* VH2 zu den Vertretern der nicht Aufklarungszonen bildenden, adhäsiv wachsenden Organismen gehört, bei denen die Spaltung des Polyisoprens vermutlich an der Membran/Zellwand erfolgt und in den Versuchen der zellfreie Kulturüberstand verwendet wurde, bleibt allerdings eine direkte Beteiligung der beschriebenen Proteine am Polyisoprenabbau fraglich.

2003 führten Jendrossek et al. (Jendrossek, D. et al. 2003) ähnliche Untersuchungen mit Kulturüberständen des von Tsuchii et al. isolierten *Xanthomonas* sp. 35Y (Tsuchii, A. et al. 1990) durch. In Anlehnung an die Arbeiten von Tsuchii et al. konnten Fragmente nach tryptischem Verdau eines, nur bei Wachstum auf Latex sekretierten, ca. 70 kDa großen Proteins N-terminal ansequenziert werden (Jendrossek, D. et al. 2003). Mit Hilfe reverser Genetik wurde das dazugehörige Gen kloniert und die daraus resultierende AS-Sequenz analysiert. Hierbei zeigte sich, dass dieses Protein eine N-terminale Erkennungssequenz für die Signalpeptidase, sowie zwei Häm-Bindemotive und ein in Cytochrom *c* Peroxidasen

konserviertes, ca. 20 Aminosäuren umfassendes Motiv besitzt (McGinnity, D. F. et al. 1996). Eine BLAST Analyse bestätigte eine Verwandtschaft zu relativ großen (500 bis 1000 AS), extrazellulären, Häm enthaltenden Oxidasen aus *Paracoccus denitrificans* (Hu, W. et al. 1997) und *Pseudomonas aeruginosa* (Fulop, V. et al. 1995) mit unbekannter Funktion. Aufgrund dieser Ergebnisse vermuteten die Autoren, dass es sich bei dem 70 kDa großen, nur bei Wachstum auf Latex gebildeten extrazellulären Protein aus *Xanthomonas* sp. 35Y um ein Mitglied der di-Häm Cytochrom *c* Oxidasen handeln könnte. Daraus schlossen die Autoren, dass dieses Protein am Kautschukabbau beteiligt sein könnte. Allerdings konnten sie zu diesem Zeitpunkt keine Aktivität des Proteins mit Kautschuk nachweisen. Dies gelang erst in den in Kapitel 2 vorgestellten Arbeiten.

Die Gene für komplexe Abbauege, wie z.B. die für den Abbau von Xenobiotika, werden oft von extrachromosomalen Elementen kodiert (Tan, H. M. 1999). Deshalb wurden drei *Gordonia* Stämme auf das Vorhandensein von Plasmiden untersucht. Diese Untersuchungen zeigten, dass *G. westfalica* Kb1, der zu den nicht Aufklarungszonen bildenden, adhäsiv wachsenden Organismen gehört, ein Megaplasmid besitzt (Bröker, D. et al. 2004). Dieses Megaplasmid (pKB1) wurde komplett sequenziert und die daraus abgeleiteten ORFs auf Homologien zu den in *G. polyisoprenovorans* VH2 und *Xanthomonas* sp. 35Y gefundenen Proteinen untersucht. Es konnten weder Homologien zum Lignostilben abbauenden Protein LSD I, zur Superoxiddismutase GUH-2 noch zu dem 70 kDa Protein aus *Xanthomonas* sp. 35Y gefunden werden. Nach entfernen von pKB1 aus *G. westfalica* Kb1 mittels „heat-curing“ waren die so erhaltenen plasmidfreien Mutanten nicht mehr in der Lage, mit Polyisopren als alleiniger Kohlenstoffquelle zu wachsen. Daraus schlossen die Autoren, dass ein oder mehrere der auf dem Plasmid pKB1 kodierten Gene am Kautschukabbau beteiligt sein müssen. Da drei der aus der DNA-Sequenz abgeleiteten ORFs Ähnlichkeiten zu Proteinen zeigten, die an der Cytochrom *c* Biosynthese beteiligt sind, könnten diese Bereiche eine Rolle beim Abbau von Kautschuk spielen, da ein Enzymsystem mit Übergangsmetall postuliert wurde. Auf dem Plasmid pKB1 befinden sich außerdem zwei ORFs deren hypothetische Genprodukte eine große Ähnlichkeit zu Elektronentransportproteinen bzw. zu einer Epoxid-Hydrolase aufwiesen (Bröker, D. et al. 2004). Da der initiale Abbau von monomerem Isopren in *Rhodococcus* sp. AD45 durch eine Epoxidierung mit Hilfe einer Monooxygenase erfolgt (Hylckama Vlieg, J. E. et al. 2000) und Epoxid-Hydrolasen solch ein Epoxid zu einem Diol hydrolysieren können (Yamada, T. et al. 2000), könnte der erste Schritt des Polyisoprenabbaus in *G. westfalica* Kb1 auf ähnliche Art

und Weise erfolgen. Somit befinden sich auf dem Megaplasmid pKB1 einige ORFs, deren hypothetische Genprodukte am Abbau von Polyisopren beteiligt sein könnten – eine Polyisopren abbauende Aktivität konnte jedoch auch in diesen Studien nicht nachgewiesen werden.

## 2. Die Spaltung von Poly(*cis*-1,4-Isopren) durch die neuartige Oxygenase RoxA aus *Xanthomonas* sp. 35Y

### 2.1. Die Entdeckung und Charakterisierung der Häm-abhängigen „Rubber Oxxygenase A“ (RoxA)

Die dem Kautschukabbau zugrunde liegenden biochemischen und molekularen Mechanismen waren bis zu Beginn der experimentellen Untersuchungen der hier vorliegenden Arbeit kaum verstanden, und weder am Abbau beteiligte Gene noch die dafür verantwortlichen Proteine waren bekannt. Daher war es das Ziel dieser Arbeit, das initiale, den Polyisoprenabbau einleitende Enzym, aus *Xanthomonas* sp. 35Y zu identifizieren und biochemisch zu charakterisieren. Der eben genannte Stamm wurde aus mehreren Gründen ausgewählt: (1) der Stamm gehört zu den Aufklarungszonen bildenden Organismen und greift das Polymer somit vermutlich mit Hilfe eines extrazelluläres Enzyms an; (2) im Vergleich zu anderen Aufklarungszonen bildenden Organismen wächst dieser Stamm recht schnell und baut das Substrat relativ schnell und vollständig ab (Tsuchii, A. et al. 1990); (3) Tsuchii et al. konnten bereits 1990 kleine Polyisoprenabbauprodukte, wie ODTD, mit Keto- und Aldehydenden aus dem Kulturüberstand von auf Latex gewachsenen *Xanthomonas* sp. 35Y Kulturen isolieren und charakterisieren und (4) aus dem Kulturüberstand ein vermutlich Polyisopren spaltendes Enzym mit einem für Protohemoproteine typischen Absorptionsspektrum und einer Größe von ca. 50 kDa partiell aufreinigen (Tsuchii, A. 1999); (5) Jendrossek et al. konnten 2003 ein ca. 70 kDa großes, extrazelluläres Protein, das von *Xanthomonas* sp. 35Y nur bei Wachstum auf Latex gebildet wird, sequenzieren und das zugehörige Gen klonieren (Jendrossek, D. et al. 2003). Die Analyse der aus der Gensequenz abgeleiteten Aminosäuresequenz zeigte zwei Häm-Bindemotive (CXXCH) und Verwandtschaft zu Cytochrom *c* Peroxidasen. Ein direkter Beweis der Beteiligung des „70 kDa Proteins“ am Abbau von Kautschuk war noch nicht erbracht. Dies zu erreichen war das erste Ziel der vorliegenden Arbeit.

Aufgrund der Ergebnisse der genannten Vorarbeiten wurde nun nach einem von *Xanthomonas* sp. 35Y nur bei Wachstum auf Latex gebildeten, extrazellulären, ca. 50-70 kDa großen Protein mit typischem Protohemoprotein-Absorptionsspektrum gesucht. Dazu wurde der Stamm jeweils mit Glukose und Latexmilch als alleiniger Kohlenstoffquelle wachsen

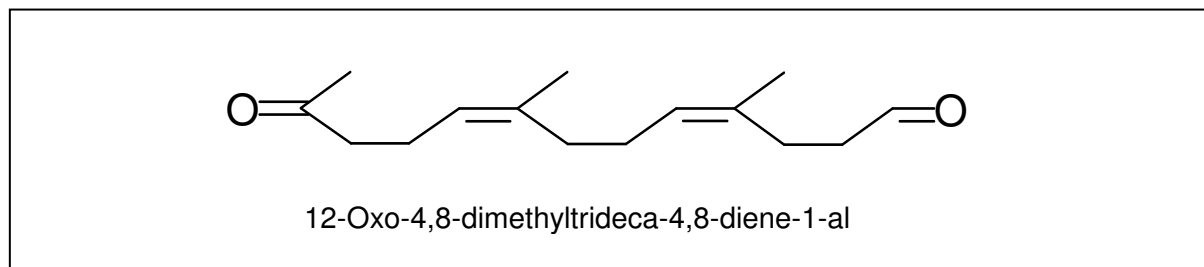
gelassen und täglich die Kulturüberstände mittels UV/Vis-Spektroskopie untersucht. Es zeigte sich, dass *Xanthomonas* sp. 35Y nach mehreren Tagen Wachstum auf Latexmilch eine Komponente ins Medium sekretiert, die ein Absorptionsmaximum bei 406 nm hat. Um mehr über diese Komponente herauszufinden, wurden 20 Liter Minimalmedium (80 mal 250 mL) mit Latexmilch, als einzige Kohlenstoffquelle, mit *Xanthomonas* sp. 35Y angeimpft. Nach zwei Wochen Inkubation wurde der Kulturüberstand gewonnen und ein FPLC-Aufreinigungsprotokoll für die oben genannte Komponente entwickelt. Damit war es möglich, ein Protein bis zur elektrophoretischen Homogenität aufzureinigen, dessen apparentes Molekulargewicht mit 65 kDa bestimmt wurde (Braaz, R. et al. 2004). Im oxidierten Zustand zeigte das aufgereinigte 65 kDa Protein Absorptionsbanden bei 280 nm ( $\gamma$ -Bande), 356 nm und 406 nm (Soret-Bande) und schwächere und breitere Banden bei 532 nm ( $\beta$ -Bande) und 560 bis 565 nm ( $\alpha$ -Bande). Der molare Extinktionskoeffizient bei 406 nm betrug  $1,8 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  und lag damit in der gleichen Größenordnung wie sie für di-Häm Proteine beschrieben wurde (Arciero, D. M. et al. 1994). Das Protein wurde mittels  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$  reduziert, wodurch die Absorptionsbanden nun bei 418 nm (Soret-Bande), 522 ( $\beta$ -Bande), 549 und 553 nm (beide  $\alpha$ -Banden) beobachtet werden konnten. Die Ergebnisse dieser Analysen waren ein starker Hinweis darauf, dass es sich bei diesem Protein um ein *c*-Typ Cytochrom handeln könnte.

Das gereinigte 65 kDa Protein wurde einem tryptischen Verdau unterzogen, die Massen der entstandenen Peptide mittels MALDI-ToF ermittelt und die Aminosäuresequenz von sechs zufällig ausgewählten Peptiden bestimmt. Die erhaltenen Werte und Sequenzen stimmten allesamt mit denen eines in silico tryptisch verdauten Genproduktes des erst kürzlich von Jendrossek et al. (Jendrossek, D. et al. 2003) geklonten Genes aus *Xanthomonas* sp. 35Y überein. Somit war klar, dass es sich bei dem von Jendrossek et al. klonierten Gen um das Strukturgen des aufgereinigten 65 kDa Proteins handeln musste.

Der Häm-Gehalt des aufgereinigten Proteins wurde über den molaren Extinktionskoeffizienten des reduzierten Häm-Cytochroms bei 551 nm bestimmt (Falk, J. E. 1964). Das molare Verhältnis von Häm zu Protein betrug etwa 2:1 (1,9:1 gemessen), was aufgrund der aus der Aminosäuresequenz abgeleiteten zwei *c*-Typ Cytochrom Häm-Bindemotive (CXXCH) zu erwarten war. Da sich die Häm-Gruppen durch Extraktion mit verschiedenen Lösungsmitteln nicht aus dem Protein entfernen ließen, wie es für *a*- und *b*-Typ Cytochrome charakteristisch ist, konnte eine weitere Evidenz für das Vorhandensein

eines *c*-Typ Cytochromes gewonnen werden. Bei dem vorliegenden Protein handelte es sich somit um ein di-Häm *c*-Typ Cytochrom.

Für Polyisopren abbauende Enzyme existierte kein Aktivitätstest und selbst konzentrierte Proteinlösungen des 65 kDa Proteins zeigten keine Aufklärung der Latexmilch. Daher musste ein Enzymtest entwickelt werden, um das aufgereinigte Protein auf Polyisopren abbauende Aktivität hin untersuchen zu können. Reaktionsansätze mit Latexmilch und aufgereinigtem Protein in aktiver und in hitzeinaktivierter Form als Kontrolle wurden mit zweidimensionalen dünnenschichtchromatographischen Methoden untersucht. Dabei zeigte sich, dass im Reaktionsansatz mit aktivem Protein ein deutlich sichtbarer „Spot“ auftauchte, der in der Kontrolle fehlte. Zur Quantifizierung und Identifizierung der so nachgewiesenen Substanz wurde ein HPLC-Trennprotokoll für dieses Abbauprodukt entwickelt. Im Vergleich zur oben erwähnten Kontrolle war im HPLC-Chromatogramm der Positivkontrolle genau ein zusätzlicher „Peak“ mit einer Retentionszeit von 14,8 min zu sehen, der nach DC-Analyse dem zuvor beschriebenen „Spot“ zugeordnet werden konnte. HPLC-MS und <sup>1</sup>H-NMR Analysen zeigten, dass es sich bei der aufgetrennten und detektierten Substanz um 12-Oxo-4,8-dimethyltrideca-4,8-diene-1-al (ODTD) mit einer Masse von 236 Da handelt (Abbildung 2.1.1).



**Abbildung 2.1.1:** Struktur des entstehenden Hauptabbauproduktes von Poly(*cis*-1,4-Isopren) nach Spaltung mit RoxA.

Zusätzlich konnten durch HPLC-MS Messungen weitere Abbauprodukte in geringer Konzentration nachgewiesen werden (Tabelle 2.1.1). Diese Abbauprodukte wiesen jeweils die gleichen Endstrukturen wie ODTD auf und unterschieden sich lediglich in der Anzahl der Isopreneinheiten zwischen den terminalen Aldehyd- und Ketofunktionen und zeigten die erwarteten Unterschiede in den Retentionszeiten der HPLC-Trennung. Die Spaltungsaktivität war nur von Enzym, Puffer, pH-Wert (7,0), Temperatur (40 °C) und Substrat (Latex) abhängig und benötigte keinerlei Kofaktoren. Somit konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass ein einzelnes Enzym Poly(*cis*-1,4-Isopren) *in vitro* spalten kann und dass dabei ein

Hauptabbauprodukt, ODTD, entsteht. Daher wurde das aufgereinigte di-Häm Protein und das zugehörige Gen „Rubber Oxygenase A“ (RoxA bzw. *roxA*) genannt.

**Tabelle 2.1.1:** Quasimolekulare Ionen (M-H)<sup>-</sup> des Hauptabbauproduktes (ODTD) und der Nebenabbauprodukte von Poly(*cis*-1,4-Isopren) nach HPLC-MS (ESI) Analyse

(M-H) m/z	Anzahl vollständige Isopreneinheiten	Retentionszeit [min]	Relative Intensität [%]*
439	5	22,03	0,21
371	4	20,73	5,0
303	3	18,66	11
<b>235</b>	<b>2</b>	<b>14,82</b>	<b>100</b>
167	1	10,95	0,24

\* 100 % =  $1,62 \cdot 10^8$  Ionen

Um die Reaktion von RoxA mit Polyisopren biochemisch charakterisieren zu können, wurde ein Aktivitätstest entwickelt und die spezifische Aktivität von RoxA bestimmt. Hierzu wurde ein quantitativer Nachweis der Abbauprodukte durch Hydrazon-Derivatisierung der Carbonyl-Gruppen durchgeführt (Katz, I. et al. 1966). Im Bereich von 0,5 bis 2,5 µg RoxA/mL Reaktionsansatz zeigte sich eine lineare Abhängigkeit der Hydrazon Konzentration zur eingesetzten Enzymmenge, während bei höheren Enzymkonzentrationen eine Sättigungskinetik beobachtet werden konnte. Anschließend wurde das Temperaturoptimum (40 °C) und das pH-Optimum (pH 7,0) von RoxA ermittelt. Durch die Kenntnis all dieser Parameter konnte nun die spezifische Aktivität von RoxA bestimmt werden. Diese beträgt 300 mU/mg, wobei eine Unit als die Entstehung von 1 µmol Carbonyl-Gruppen pro Minute definiert wurde. Da die Peakfläche von ODTD im HPLC-Chromatogramm in linearer Abhängigkeit zur ermittelten Hydrazon Konzentration steht, wurde die spezifische Aktivität in nachfolgenden Experimenten stets über die Peakfläche berechnet, da die HPLC-Methodik weniger fehleranfällig und einfacher durchzuführen ist.

Durch die Kenntnis der optimalen Reaktionsbedingungen und der spezifischen Aktivität von RoxA, konnten nun weitergehende biochemische Untersuchungen durchgeführt werden. Zunächst konnte eine Abhängigkeit der Reaktion von Luftsauerstoff nachgewiesen werden, da bei Reaktion unter einer Stickstoffatmosphäre kein Abbauprodukt detektiert werden konnte. Dies ist nahe liegend, da Polyisopren im Gegensatz zu ODTD keinen



Sauerstoff enthält, und der eingebaute Sauerstoff nur aus der Atmosphäre, oder der wässrigen Phase stammen kann.

Bei RoxA handelt es sich um ein di-Häm *c*-Typ Cytochrom. Enzyme dieser Gruppe können meist mit Cyanid und Kohlenmonoxid gehemmt werden. Daher wurde der Einfluss von CO und CN auf die Aktivität von RoxA untersucht. Bei beiden Verbindungen konnte eine vollständige Hemmung, und über UV/Vis-Differenzspektroskopie jeweils die Bindung an die Häm-Gruppen von RoxA nachgewiesen werden.

Aufgrund der Homologien von RoxA zu Cytochrom *c* Peroxidasen (CCP) (Jendrossek, D. et al. 2003) sollten weitere Experimente klären, ob es sich bei RoxA tatsächlich um eine CCP handelt. In einem Peroxidase-Aktivitätstest nach Mason et al. zeigte RoxA, im Gegensatz zu „Horseradish“-Peroxidase, die als Positivkontrolle diente, keine Peroxidaseaktivität (Mason, M. G. et al. 2001). Zusätzlich wurden RoxA Aktivitätstest mit verschiedenen Konzentrationen Katalase versetzt, um das für Peroxidase-Reaktionen essentielle Wasserstoffperoxid abzufangen. Hierbei zeigte sich keinerlei Beeinträchtigung der Aktivität von RoxA. So konnte aus beiden Experimenten der Schluß gezogen werden, dass es sich bei RoxA, trotz der Homologien zu CCPs, vermutlich nicht um eine Peroxidase handeln kann.

Die Substratspezifität von RoxA wurde durch Aktivitätstest mit Latexmilch, einem chemosynthetischen Oligo(*cis*-1,4-Isopren) mit 5 bis 15 Isopreneinheiten (PSS, Mainz), Squalen (ein *trans*-1,4-Isopren Oligomer), Toluol und Benzol untersucht. RoxA konnte nur *cis*-1,4-Isopren Verbindungen, jedoch keine *trans*-1,4-Isopren oder aromatischen Verbindungen umsetzen. Diese Ergebnisse zeigten, dass RoxA eine hohe Spezifität für *cis*-1,4-Isopren Verbindungen hat und es sich bei dieser nicht um eine Nebenaktivität, sondern offenbar um die Hauptaktivität dieses Enzyms handelt.

Um herauszufinden, ob RoxA essentielle Schwefelbrücken besitzt, oder ob die An- oder Abwesenheit bestimmter Ionen die Aktivität dieses Enzyms beeinflusst, wurden Reaktionsansätze mit alkylierenden Substanzen wie *p*-Chloromercurobenzoat und *N*-Ethylmaleimide, mit SH-reduzierenden Substanzen wie DTT und  $\beta$ -Mercaptoethanol und Chelatbildnern wie  $\alpha,\alpha$ -Bipyridyl, Tiron und EDTA versetzt. Alkylierende Substanzen zeigten nur eine schwache, SH-reduzierende Substanzen eine starke Hemmung. Dies deutet

darauf hin, dass es in RoxA essentielle Schwefelbrücken geben könnte. Von den Chelatbildnern zeigte nur  $\alpha,\alpha$ -Bipyridyl eine starke Hemmung bei hohen Konzentrationen, was aber auch an der Hydrophobizität dieser Verbindung und einer somit erfolgenden Blockade des aktiven Zentrums liegen kann. Da EDTA selbst bei einer Konzentration von 10 mM keine signifikante Hemmung zeigte, kann ein zwingendes Vorhandensein von divalenten Kationen wie z.B. Calciumionen ausgeschlossen werden.

## 2.2. RoxA ist eine Dioxygenase

Wie die in Kapitel 2.1 beschriebenen Versuche zeigten, ist die Spaltung von Polyisopren durch RoxA von Luftsauerstoff abhängig. Dieser Umstand, und die Tatsache, dass Polyisopren im Gegensatz zu den beim Abbau durch RoxA entstehenden Abbauprodukten keine Sauerstoffatome enthält, lassen den Schluß zu, dass es sich bei RoxA um eine Mono- oder Dioxygenase handeln muss. Um herauszufinden, um welchen Oxygenasetyp es sich bei RoxA handelt, wurde die Spaltungsreaktion von Polyisopren durch RoxA mittels  $^{18}\text{O}_2$ -Markierungsexperimenten untersucht.

Die Sauerstoffmoleküle, die während der Spaltung des Polyisoprens durch RoxA in das Abbauprodukt ODTD eingebaut werden, können aus molekularem Sauerstoff oder/und Wasser kommen. Daher wurde eine Reaktion von RoxA mit Latexmilch unter einer  $^{18}\text{O}_2$ -Atmosphäre durchgeführt. Eine anschließende Massenanalyse des entstandenen ODTD mittels HPLC-MS zeigte eine Erhöhung der molekularen Masse um 2 Da gegenüber dem unter einer  $^{16}\text{O}_2$ -Atmosphäre gemachten Versuch. Außerdem konnte durch die im Massenspektrometer entstehende Defragmentierung die Abspaltung eines 20 Da schweren Fragments, was einem  $\text{H}_2^{18}\text{O}$  entsprechen würde, nachgewiesen werden. Dies bedeutet, dass offenbar nur ein Sauerstoffatom aus  $^{18}\text{O}_2$  in ODTD eingebaut wurde und es sich bei RoxA somit um eine Monooxygenase handeln könnte. Wäre dies der Fall, so müsste das zweite Sauerstoffatom aus Wasser eingebaut werden. Ein ähnlicher Mechanismus wurde auch schon für die  $\beta$ -Karotin-15,15'-Monooxygenase beschrieben und wäre somit denkbar.

Zur Verifizierung eines Monooxygenase-Mechanismus, in dessen Ablauf ein Sauerstoffatom aus Wasser in das entstehende Abbauprodukt eingebaut wird, wurde die Reaktion von RoxA mit Latexmilch unter einer  $^{16}\text{O}_2$ -Atmosphäre in  $\text{H}_2^{18}\text{O}$  durchgeführt. Die HPLC-MS Analyse des entstandenen ODTD zeigte, dass in ein Großteil der Moleküle ein

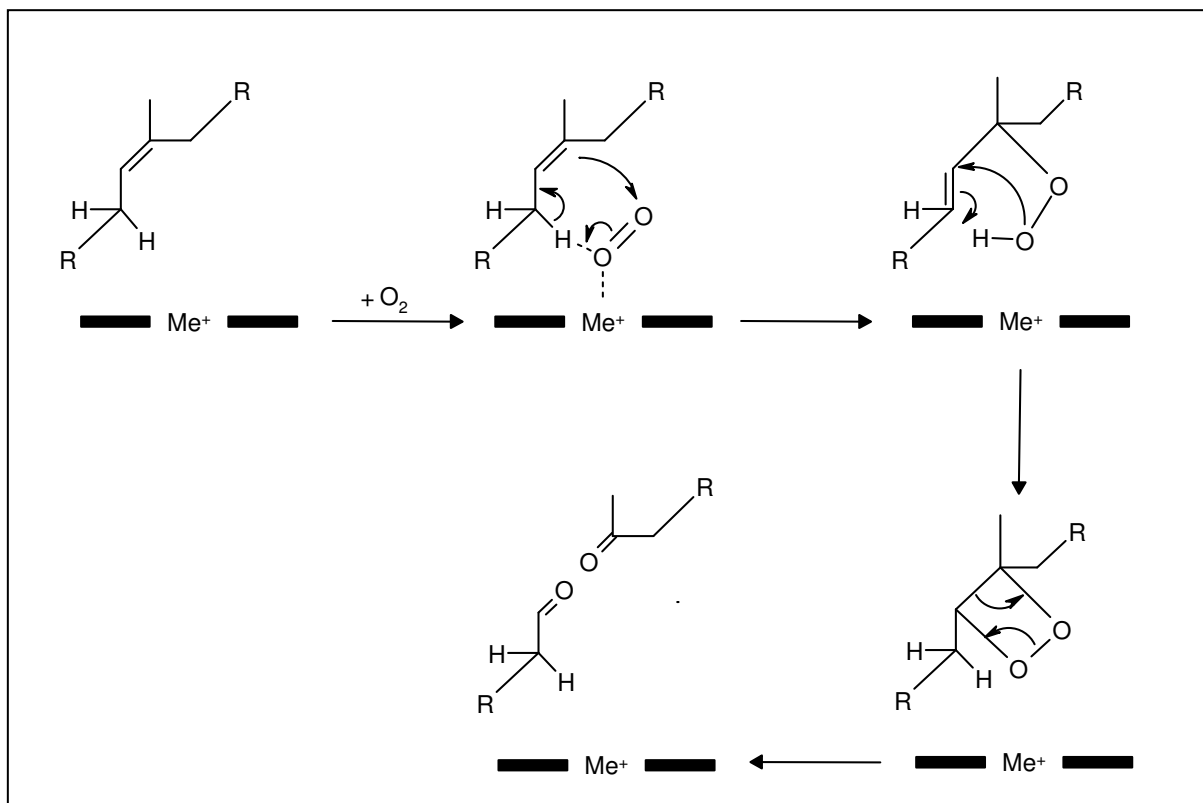
$^{18}\text{O}$ -Atom und in einen kleineren, aber eindeutig detektierbaren Teil zwei  $^{18}\text{O}$ -Atome eingebaut wurden. Das zweifach mit  $^{18}\text{O}$  markierte ODTD kann allerdings nicht durch einen Monooxygenase-Mechanismus erklärt werden, was zu der Vermutung führte, dass eventuell eine Veränderung der  $^{18}\text{O}$ -Markierung der Grund für die beobachteten Ergebnisse ist. Da die Sauerstoffatome der Aldehyd- und Ketogruppen, die ja am ODTD vorhanden sind, potentiell gegen Sauerstoffatome aus Wasser ausgetauscht werden können (Devery, J. et al. 1994, Retey, J. et al. 1966), könnte es sich somit bei den bis jetzt erhaltenen Ergebnissen um Artefakte handeln, die durch den Verlust bzw. durch ein Hinzukommen einer Markierung entstehen. Daher wurde ODTD mit Hilfe einer Silikagelsäule isoliert, *in vitro* mit  $\text{H}_2^{18}\text{O}$  inkubiert und einer HPLC-MS Analyse unterzogen. Hierbei zeigte sich, dass tatsächlich ein Austausch der Sauerstoffatome im ODTD mit den im Wasser vorkommenden Sauerstoffatomen stattfindet. Durch nachfolgende GC-MS Analysen konnte zusätzlich gezeigt werden, dass das Sauerstoffatom des Aldehyds in ODTD einem schnelleren Austausch unterliegt als das Sauerstoffatom des Ketons.

Die eben beschriebenen Austauschreaktionen führten schon in der Vergangenheit zu falschen Klassifizierungen von Oxygenasen (Woggon, W. D. 2002). Daher musste ein Weg gefunden werden, um den Austausch der Markierung zu verhindern. In Anlehnung an die von Woggon et al. (Woggon, W. D. 2002) verwendete Methode wurde ein mit Alkoholdehydrogenase (ADH) gekoppelter Enzymtest für RoxA entwickelt. Hierbei findet die Reaktion von RoxA mit Latexmilch unter schwach reduzierenden Bedingungen und in Anwesenheit von ADH statt. Dadurch wird das entstehende ODTD durch die ADH direkt in den entsprechenden di-Alkohol umgesetzt. Die so entstandenen Alkoholfunktionen tauschen ihre Sauerstoffatome nicht (bzw. um Größenordnungen langsamer) mit dem umgebenden Wasser aus, was eine Veränderung der Markierung mit  $^{18}\text{O}$  verhindert. HPLC-MS Analysen dieses gekoppelten Enzymtests zeigten, dass sowohl die Aldehyd- als auch die Keto-Gruppe unter den gewählten Bedingungen komplett zu den entsprechenden Alkoholen umgesetzt werden, so dass das bei diesem Enzymtest entstehende Produkt als 12-Hydroxy-4,8-dimethyltrideca-4,8-diene-1-ol (HDTD) identifiziert werden konnte.

Der mit ADH gekoppelte Enzymtest wurde nun unter einer  $^{18}\text{O}_2$ -Atmosphäre durchgeführt und die molekulare Masse des entstandenen HDTD mittels HPLC-MS untersucht. Es konnte eine Vergrößerung der molekularen Masse von HDTD um 4 Da nachgewiesen werden, was einem Einbau von zwei  $^{18}\text{O}$ -Atomen in HDTD entsprechen würde.

Die durch die Defragmentierung bedingte Abspaltung von zwei 20 Da schweren Fragmenten (vermutlich  $\text{H}_2^{18}\text{O}$ ) aus HDTD zeigte, dass beide Hydroxygruppen mit  $^{18}\text{O}$  markiert worden waren. Durch die aus dieser Messung erhaltenen Daten konnte somit einwandfrei nachgewiesen werden, dass RoxA Polyisopren mittels eines Dioxygenasemechanismus spaltet (Braaz, R. et al. 2005a).

Aus den von Linos et al. (Linos, A. et al. 2001) publizierten Vermutungen zum Reaktionsmechanismus der Polyisoprenspaltung und den Ergebnissen der mit RoxA durchgeführten Experimente, wurde ein neues Reaktionsschema entwickelt (Abb. 2.2.1). Die wesentlichen Unterschiede der beiden Modelle sind die Reihenfolge, in der Substrat- und Sauerstoffbindung erfolgt und der Redoxzustand des polyisoprenspaltenden Enzyms. Linos et al. gingen davon aus, dass das Enzym im reduzierten Zustand vorliegt, dann durch Sauerstoff oxidiert wird und letztendlich das dabei entstandene Peroxid anion die Doppelbindung des Polyisoprens angreift (Abb. 1.4.1). Da RoxA jedoch im oxidierten Zustand vorliegt und nach Substratzugabe eine schwache Veränderung der Soret-Bande in Richtung des reduzierten Spektrums beobachtet werden konnte, ist es sehr wahrscheinlich, dass erst die Bindung des Substrates und dann die Bindung des Sauerstoffs erfolgt.



**Abbildung 2.2.1:** Vorgeschlagener Reaktionsmechanismus für die Spaltung von Polyisopren durch die „Rubber Oxygenase A“ (RoxA) nach Braaz et al. (2005a). Schwarze Balken und  $\text{Me}^+$  (Metall) symbolisieren das Häm-Reaktionszentrum.

### 2.3. Untersuchungen zum Reaktionsmechanismus von RoxA

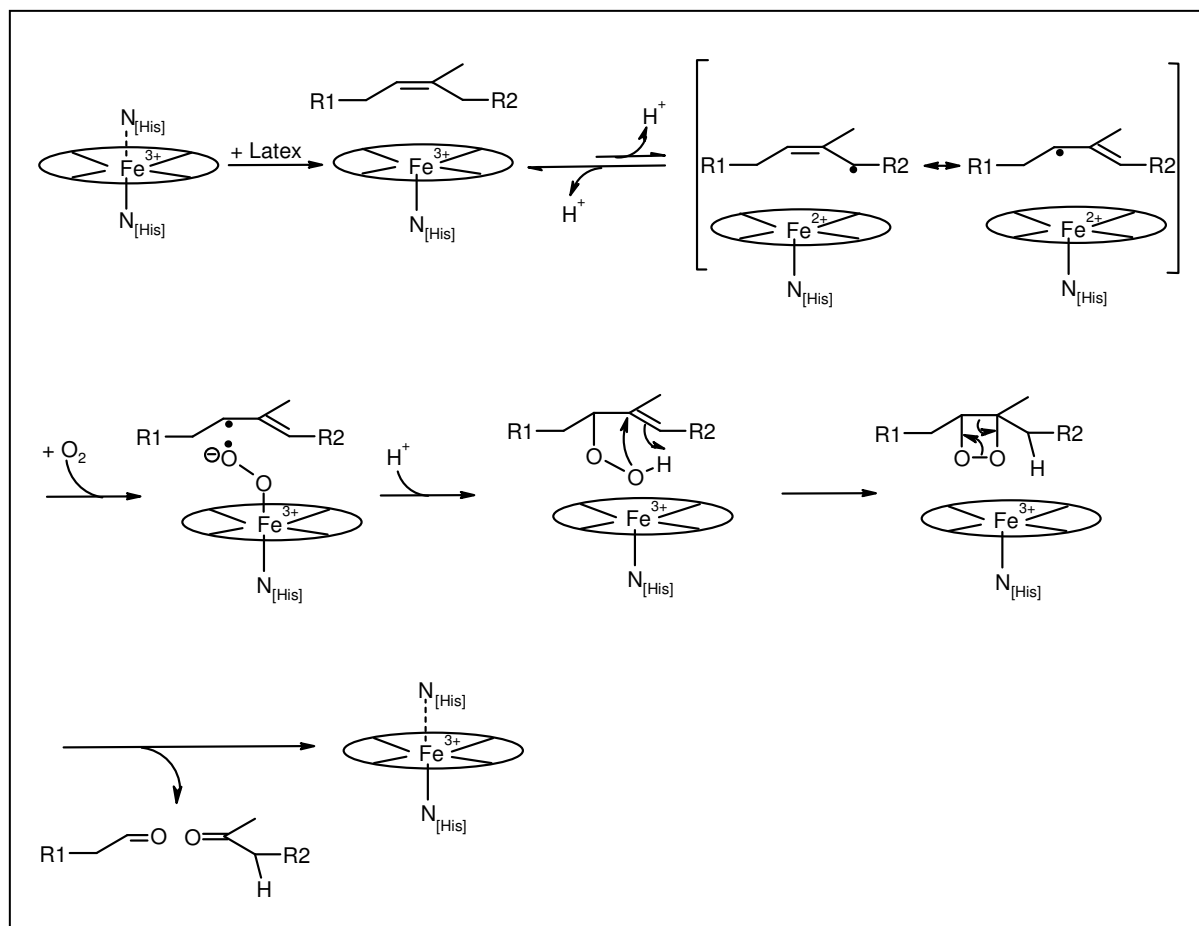
Die zwei in RoxA beschriebenen Häm-Zentren spielen vermutlich eine wichtige Rolle bei der Katalyse der Spaltungsreaktion von Polyisopren und wurden aus diesem Grund genauer untersucht. Zunächst wurde eine Elementaranalyse von RoxA durchgeführt, und die Art und die Konzentration der in den Häm-Gruppen vorkommenden Metallatome bestimmt. Es konnten 2 (2,3 gemessen) Eisenatome pro Molekül RoxA nachgewiesen werden. Somit stand fest, dass es sich bei RoxA um ein di-Häm *c*-Typ Cytochrom Eisenenzym handelt.

Die Eisen-Häm-Zentren wurden mittels „electron paramagnetic resonance spectroscopy“ (EPR-Spektroskopie) auf die vorliegenden Spin-Zustände und Liganden hin untersucht (Kooperation mit Prof. Dr. Kroneck, Konstanz). Es zeigte sich, dass die zwei Häm-Zentren in frisch isoliertem RoxA zu den größten Teilen als Fe(III) *low spin* bis-Histidin Komplexe vorliegen, wobei die Imidazolebenen bei einem der beiden Häm-Zentren parallel und im anderen rechtwinklig zueinander angeordnet sind. Zusätzlich wurde je nach „Batch“ noch ein relativ kleines Fe(III) *high spin* Signal detektiert. Normalerweise sind Fe(III) *high spin* Zentren fünffach koordiniert (Einsle, O. et al. 1999, Einsle, O. et al. 2000), was bedeutet, dass eine freie Bindestelle existiert. Diese freie Bindestelle erscheint notwendig, damit Substrat oder Sauerstoff im aktiven Zentrum von RoxA überhaupt binden kann. Eines der beiden Häm-Zentren scheint somit in der Lage zu sein, vom Fe(III) *low spin* in den Fe(III) *high spin* Zustand, z.B. durch zur Seite drehen eines Histidins an der sechsten Koordinationsstelle, zu wechseln. Daher müssen sich die beiden Häm-Zentren voneinander unterscheiden. In der Tat wurden zwei verschiedene Umschlagpunkte im Rahmen einer photospektrometrischen Redox Titration nachgewiesen: eine Häm-Gruppe zeigte ein Redoxpotential von -65 mV vs NHE und die andere eines von -145 mV vs NHE.

Nachdem nachgewiesen werden konnte, dass RoxA zwei unterschiedliche Häm-Zentren besitzt, stellte sich die Frage, ob diese Häm-Gruppen untereinander Elektronen austauschen können und somit zu einem „heme cross-talk“ befähigt sind oder nicht. BLAST-Analysen der aus dem Gen abgeleiteten Aminosäuresequenz von RoxA zeigten einen hoch konservierten Histidinrest (H<sub>517</sub>) (Jendrossek, D. et al. 2003) und Homologien zu einem Histidinrest, der für die Aktivität der CCP von *P. denitrificans* notwendig ist (McGinnity, D. F. et al. 1996) und zwischen den Häm-Gruppen Elektronen verschieben kann. Daher wurden die Histidinreste in RoxA mit Diethylpyrocarbonat (DEPC) derivatisiert, was eine

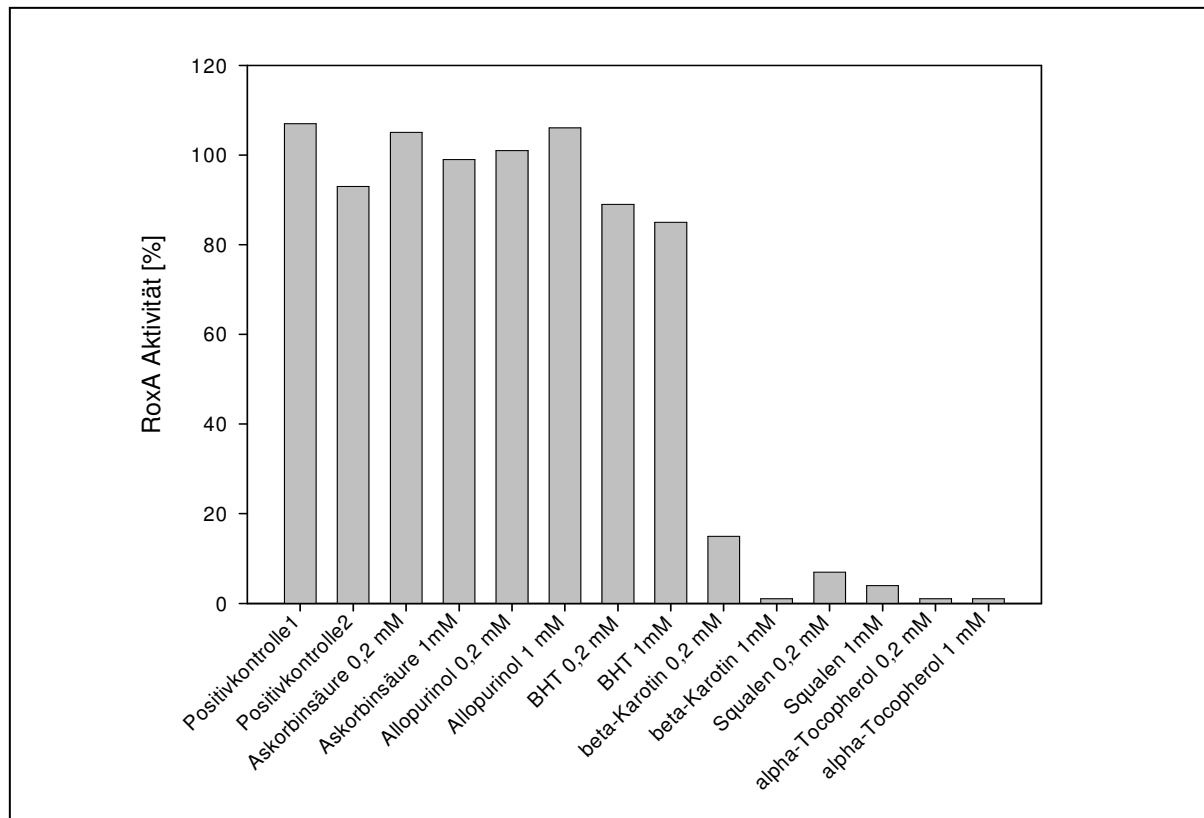
Elektronenaufnahme dieser Reste verhindert, die Anzahl der veränderten Histidinreste bestimmt und die Aktivität gemessen. Von den 11 in RoxA vorhandenen Histidinresten konnten 8 mit Hilfe von DEPC verändert werden. Dies unterstützt die mittels EPR-Spektroskopie erhaltenen Daten, dass ein Häm-Zentrum von zwei Histidinen und ein Häm-Zentrum von einem Histidin koordiniert wird, da diese für DEPC nicht zugänglich sind. Die Enzymaktivität von RoxA blieb durch die Reaktion mit DEPC unverändert, was darauf hindeutet, dass kein „cross talk“ zwischen den beiden Häm-Zentren stattfindet. Zusätzlich wurde RoxA mittels EPR X-Band Messungen im Parallel-Modus untersucht. Auch mit diesem Verfahren konnte kein „heme cross-talk“ nachgewiesen werden. Der konservierte Histidinrest H<sub>517</sub> scheint somit in RoxA keine Elektronen zwischen den beiden Häm-Zentren zu verschieben.

Die Spaltung von Polyisopren durch RoxA läuft in Abwesenheit von externen Kofaktoren wie z.B. NADH<sub>2</sub> ab. Daher deuten die Ergebnisse der EPR-Messungen, die einen geringen Anteil eines Häm-Zentrums im fünffach koordinierten Fe(III) *high spin* Zustand zeigen, möglicherweise auf eine Interaktion dieses Häm-Zentrums von RoxA mit dem Substrat hin, da eine Reaktion von Sauerstoff mit Fe(III) sehr unwahrscheinlich ist. So könnte Polyisopren an die freie sechste Koordinationsstelle des Fe(III) *high spin* Komplexes binden und das vorliegende Fe(III) zu Fe(II) reduzieren, wobei ein resonanzstabilisiertes Allylradikal am Polyisopren entstehen würde (Abb. 2.3.1). Um experimentelle Hinweise auf solch einen Radikalmechanismus zu erhalten, wurde RoxA mit Substrat (Latexmilch oder synthetisches Oligoisopren) in Abwesenheit von Sauerstoff bei 40 °C inkubiert, nach 0, 10 und 100 min Proben genommen und diese mittels EPR-Spektroskopie analysiert. Anaerobisiertes RoxA zeigte ein schwaches Radikalsignal, das bei anaerober Inkubation mit Substrat signifikant und reproduzierbar über die Zeit größer wurde. Negativkontrollen bestätigten, dass die Substrate alleine kein Radikalsignal zeigen. Daher sprechen die so erhaltenen Ergebnisse für einen Radikalmechanismus, bei dem erst das Substrat an das aktive Zentrum bindet und wie oben beschrieben das Eisen reduziert. Das entstandene Fe(II) könnte dann mit Sauerstoff reagieren, wobei dieser zum Radikal würde und mit dem Allylradikal weiterreagieren könnte (Abb. 2.3.1).



**Abbildung 2.3.1:** Vorgeschlagener Radikal-Reaktionsmechanismus für die Spaltung von Polyisopren durch die „Rubber Oxygenase A“ (RoxA) nach Braaz et al. (2005b)

Geht man von einem Radikal als Zwischenstufe der Spaltungsreaktion aus, so müsste man die Reaktion von RoxA mit Polyisopren mit Radikalinhibitoren unterbinden können. Daher wurden Aktivitätstests mit verschiedenen Radikalinhibitoren durchgeführt (Abb. 2.3.2). Es zeigte sich, dass nur Radikalinhibitoren, wie  $\alpha$ -Tocopherol und  $\beta$ -Karotin, die gleichzeitig auch Strukturanaloga zu Poly(*cis*-1,4-Isopren) darstellen, die Aktivität von RoxA beeinflussten. Squalen, das nur ein Substratanalogen und kein Radikalinhibitor ist, hemmte die Aktivität von RoxA ebenfalls stark. Daher bleibt es offen, ob die Eigenschaften der Moleküle als Radikalinhibitor oder die Eigenschaften als Strukturanalogen für die beobachtete Hemmung von RoxA verantwortlich sind. Die erhaltenen Ergebnisse konnten somit keinen Beweis für eine Radikalreaktion liefern. Andererseits gilt es zu bedenken, dass die durch RoxA generierten Radikale nur eine kurze Halbwertszeit haben und außerdem tief im Enzym gebunden sind, so dass die Radikalinhibitoren eventuell nicht bis dorthin gelangen können. Somit schließen die erhaltenen Ergebnisse einen Radikalmechanismus auch nicht aus.



**Abbildung 2.3.2:** Hemmung der Aktivität von RoxA durch Radikalinhibitoren und Strukturanaloga. BHT, butyliertes Hydroxytoluol.

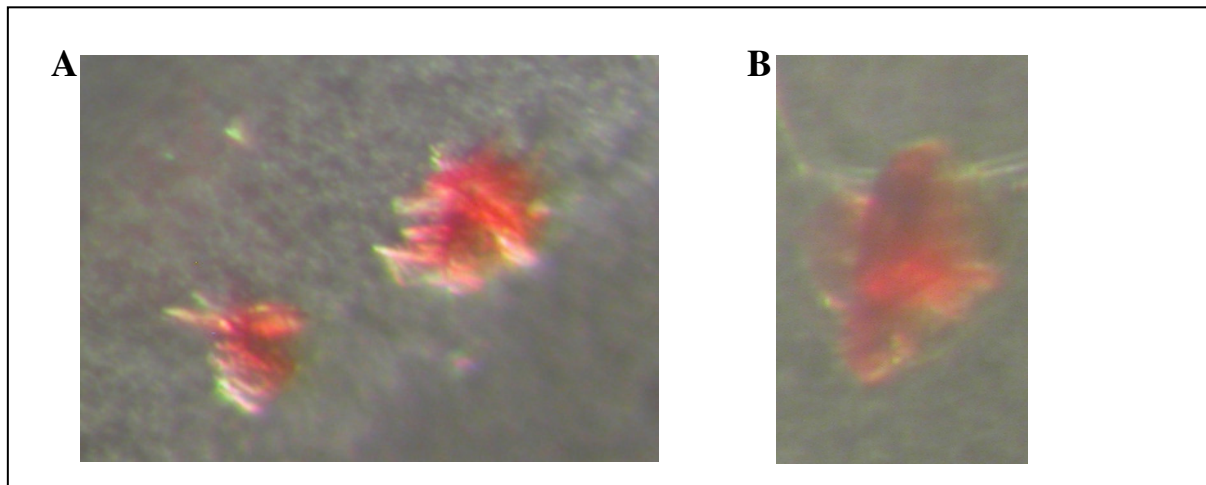
## 2.4. Kristallisation von RoxA

RoxA ist bis jetzt das einzige biochemisch charakterisierte Polyisopren abbauende Enzym. Da RoxA jedoch nur wenig Homologien zu bereits charakterisierten und kristallisierten Proteinen aufweist, und der Reaktionsmechanismus nicht vollständig durch EPR-spektroskopische Messungen aufgeklärt werden konnte, sollte RoxA kristallisiert und die Struktur durch einen Kooperationspartner gelöst werden.

Um genügend Protein zur Kristallisation zur Verfügung zu haben, wurden mehrere 20 Liter Anzuchten von *Xanthomonas* sp. 35Y auf Latex durchgeführt und RoxA aus dem Kulturüberstand aufgereinigt. Da bei starker Aufkonzentrierung von gereinigtem RoxA ab einer Konzentration von ca. 1 mg/mL immer wieder eine Trübung der Proteinlösung beobachtet werden konnte, und es sich dabei um präzipitiertes Protein in Form von Flocken oder eventuell sogar Kristallen handeln könnte, wurde diese trübe Proteinlösung mit einem Mikroskop untersucht. Es zeigte sich, dass sich durch die Aufkonzentrierung kleine Proteinkristalle gebildet hatten. Dies ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass RoxA ein hydrophobes Polymer als Substrat hat und das Protein somit selbst eine hydrophobe

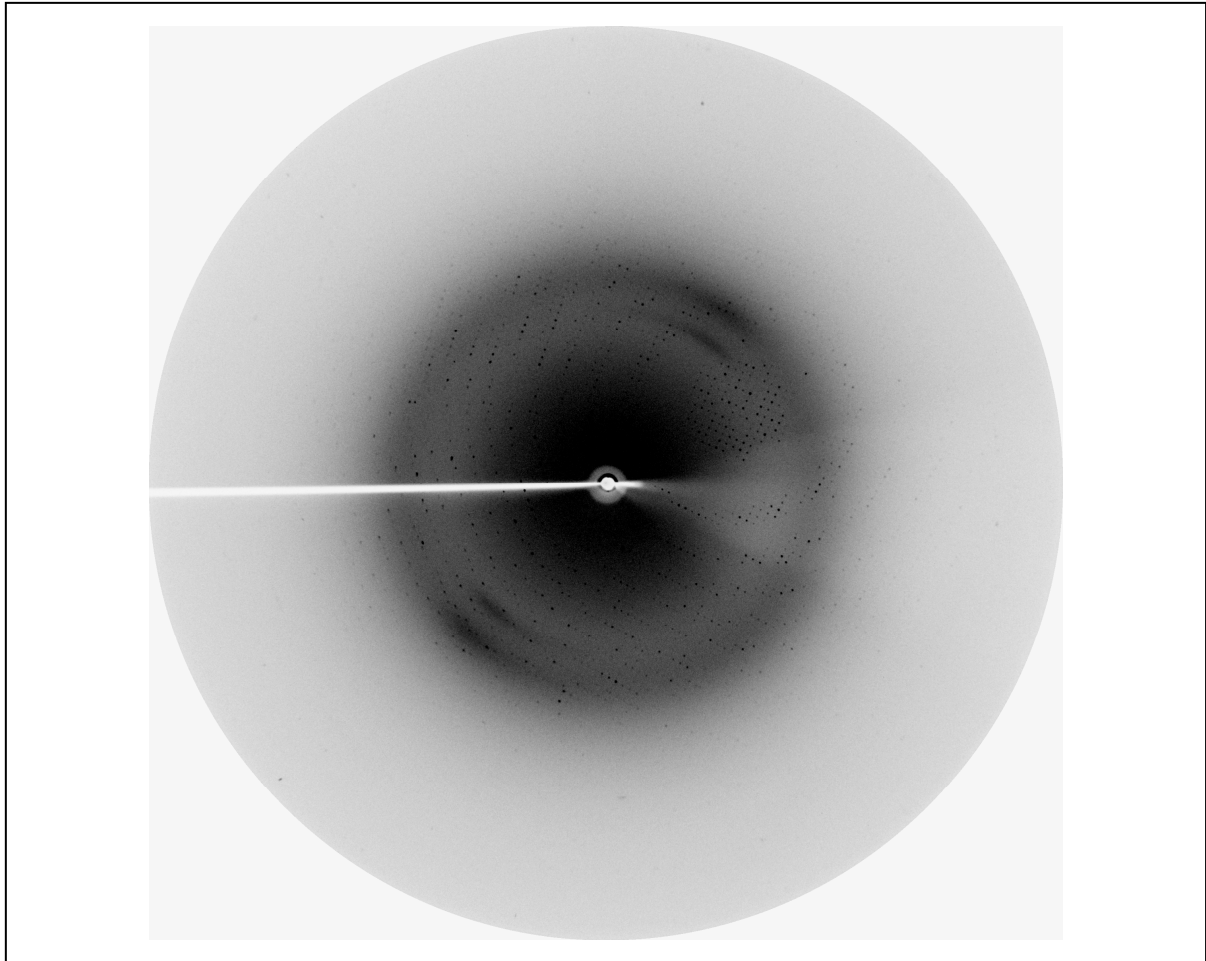


Bindedomäne benötigt. Bei starker Aufkonzentrierung kann es dann zu einer Aggregation und zur Bildung von Kristallen kommen. Die beobachteten Kristalle waren jedoch nicht groß genug, um sie zur Strukturaufklärung mittels Röntgenbeugung benutzen zu können. Aus diesem Grund wurden die Kristallisationsbedingungen im „sitting-drop“ Verfahren nach einer screening Methode von Jancarik und Kim (Jancarik, J. et al. 1991) bei zwei verschiedenen Temperaturen (6°C und 18°C) optimiert. Von 50 getesteten Bedingungen erwiesen sich 0,1 M Tris/HCl, pH 8,5 und 8% PEG 8000 als viel versprechend und es konnten bei beiden Temperaturen nach 14 (6°C) bzw. 3 (18°C) Tagen Kristalle beobachtet werden (Abb.2.4.1).



**Abb. 2.4.1:** RoxA Kristalle in 0,1 M Tris/HCl pH 8,5, 8% PEG 8000. (A) Ansatz bei 18 °C. (B) Ansatz bei 6°C. Vergrößerung ca. 50-fach.

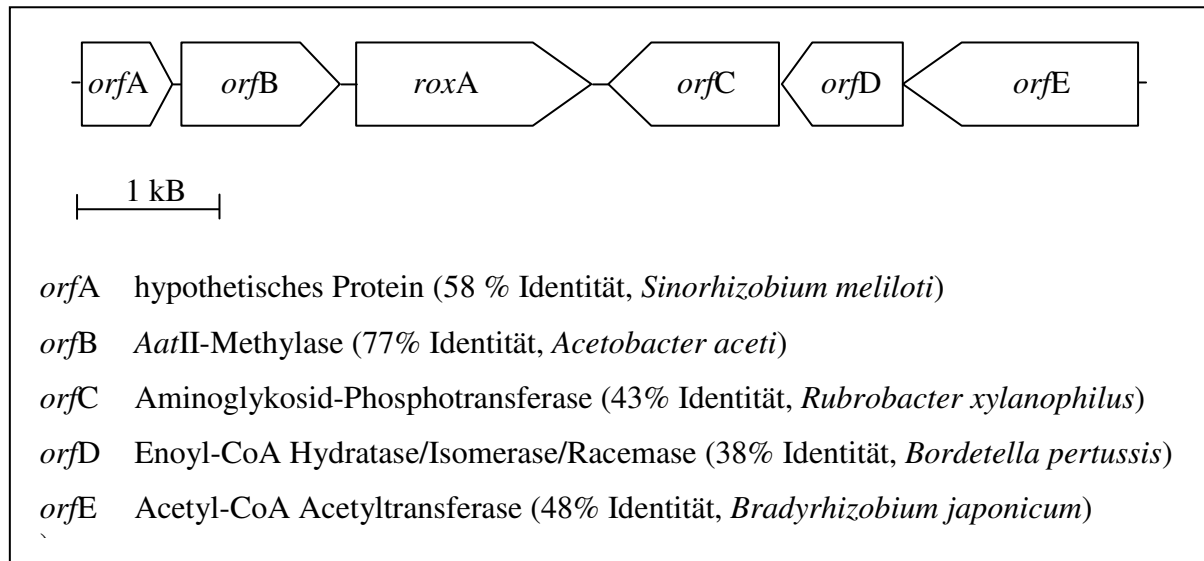
Je nach Temperatur unterschied sich die Form der Kristalle. Bei niedriger Temperatur und langsamem Wachstum zeigten sich große, flächige Kristalle (B), bei höherer Temperatur und schnellerem Wachstum zeigten sich kleinere, sternförmige Kristalle (A). Sowohl diese Ergebnisse, als auch die zugehörige Proteinprobe wurden dann an die AG von Prof. Dr. O. Einsle nach Göttingen gesendet. Dort wurden die Kristallisationsbedingungen inzwischen weiter optimiert und ein vollständiger Datensatz mit einer Auflösung von 2 Å erhalten (Abb. 2.4.2).



**Abbildung 2.4.2:** Röntgenbeugungsmuster von RoxA. (Mit freundlicher Genehmigung von Prof. Dr. O. Einsle, Universität Göttingen)

## 2.5. Die genetische Umgebung von *roxA*

Nachdem gezeigt werden konnte, dass es sich bei RoxA um eine der Komponenten handelt, die *Xanthomonas* sp. 35Y zum Abbau von Polyisopren befähigen, sollten weitere Informationen über das am Kautschukabbau beteiligte Gesamtsystem auf genetischer Ebene gewonnen werden. Im Fall des von Rose et al. beschriebenen „latex clearing protein“ (Lcp) wurden in gleicher Transkriptionsrichtung zwei, direkt an das *lcp*-Gen anschließende, ORFs gefunden, deren potentielle Genprodukte für eine heterodimere Aldehyd-Dehydrogenase kodieren könnten. Diese könnte dann, die beim Polyisoprenabbau entstehenden Keto- und Aldehydenden zu den entsprechenden Säuren weiteroxidieren und den anschließenden Abbau durch  $\beta$ -Oxidation ermöglichen (Rose, K. et al. 2005). Um herauszufinden, ob sich in der genetischen Umgebung von *roxA* ähnliche ORFs oder andere Gene, deren Funktion eine Beteiligung am Polyisoprenabbau nahelegen befinden, wurde ein 7,6 kB großer Bereich um *roxA* sequenziert und analysiert (Abb. 2.5.1).



**Abb. 2.5.1:** Schematische Darstellung der genetischen Umgebung von *roxA*, basierend auf BLAST-Analyse der aus der Gensequenz abgeleiteten Aminosäuresequenzen.

Wie Abbildung 2.5.1 zeigt, konnten stromaufwärts von *roxA* zwei ORFs identifiziert werden, deren abgeleitete Genprodukte signifikante Ähnlichkeiten zu einem hypothetischen Protein mit unbekannter Funktion und einer cysteinreichen unbekanntem Domäne (*orfA*) und zu einer *AatII*-Methylase (*orfB*) zeigten. Eine Methylase könnte unter Umständen eine Rolle in der Regulation der zum Polyisoprenabbau benötigten Gene spielen. Stromabwärts von *roxA* wurden drei ORFs in der entgegengesetzten Richtung gefunden (*orfC*, *orfD*, *orfE*). Hierbei könnte lediglich *orfD*, der Ähnlichkeiten zu einer Enoyl-CoA Hydratase/Isomerase/Racemase zeigt, am Polyisoprenabbau beteiligt sein, da bereits eine Involvierung dieser Proteinklasse und der zugehörigen Gene am Abbau von methylverzweigten Alkanen gezeigt werden konnte (Banh, Q. et al. 2005, Sakai, Y. et al. 2004). Da diese Ergebnisse jedoch lediglich auf Ähnlichkeiten nach BLAST-Analyse der aus den ORFs abgeleiteten Aminosäuresequenzen basieren, kann ein direkter Beweis über eine vorhandene oder nicht vorhandene Beteiligung dieser ORFs am Polyisoprenabbau nur durch gezieltes Ausschalten dieser Strukturen und nachfolgender Analyse des Phänotyps erfolgen.

### 3. Literatur

- Alcendor, D. J., G. D. Chapman, and B. L. Beaman.** 1995. Isolation, sequencing and expression of the superoxide dismutase-encoding gene (*sod*) of *Nocardia asteroides* strain GUH-2. *Gene* **164**:143-147.
- Arciero, D. M. and A. B. Hooper.** 1994. A di-heme cytochrome *c* peroxidase from *Nitrosomonas europaea* catalytically active in both the oxidized and half-reduced states. *J.Biol.Chem.* **269**:11878-11886.
- Arenskötter, M., D. Baumeister, R. Kalscheuer, and A. Steinbüchel.** 2003. Identification and application of plasmids suitable for transfer of foreign DNA to members of the genus *Gordonia*. *Appl.Environ.Microbiol.* **69**:4971-4974.
- Arenskötter, M., D. Bröker, and A. Steinbüchel.** 2004. Biology of the metabolically diverse genus *Gordonia*. *Appl.Environ.Microbiol.* **70**:3195-3204.
- Banh, Q., M. Arenskötter, and A. Steinbüchel.** 2005. Establishment of Tn5096-based transposon mutagenesis in *Gordonia polyisoprenivorans*. *Appl.Environ.Microbiol.* **71**:5077-5084.
- Bode, H. B., K. Kerkhoff, and D. Jendrossek.** 2001. Bacterial degradation of natural and synthetic rubber. *Biomacromolecules.* **2**:295-303.
- Bode, H. B., A. Zeeck, K. Plückhahn, and D. Jendrossek.** 2000. Physiological and chemical investigations into microbial degradation of synthetic poly(*cis*-1,4-isoprene). *Appl.Environ.Microbiol.* **66**:3680-3685.
- Borel, M., A. Kergomard, and M. F. Renard.** 1982. Degradation of natural rubber by *Fungi imperfecti*. *Agric.Biol.Chem.* **46**:877-881.
- Braaz, R., W. Armbruster, and D. Jendrossek.** 2005a. 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.
- Braaz, R., P. Fischer, and D. Jendrossek.** 2004. Novel type of heme-dependent oxygenase catalyzes oxidative cleavage of rubber poly(*cis*-1,4-isoprene). *Appl.Environ.Microbiol.* **70**:7388-7395.
- Braaz, R., M. Rudolf, P. M. Kroneck, and D. Jendrossek.** 2005b. On the reaction mechanism of heme-dependent rubber dioxygenase RoxA: evidence for polyisoprene radicals as intermediates. submitted to *Appl.Environ.Microbiol.*
- Bröker, D., M. Arenskötter, A. Legatzki, D. H. Nies, and A. Steinbüchel.** 2004. Characterization of the 101-kilobase-pair megaplasmid pKB1, isolated from the rubber-degrading bacterium *Gordonia westfalica* Kb1. *J.Bacteriol.* **186**:212-225.
- Coran, A. Y.** 1978. Vulcanization, p. 291-338. *In* F. R. Eirich (ed.), Science and technology of rubber. Academic Press New York, New York.

- Cundell, A. M. and A. P. Mulcock.** 1973. The measurement of the microbiological deterioration in vulcanized rubber. *Mat.Org.* **8**:1-15.
- Cundell, A. M. and A. P. Mulcock.** 1975. The biodegradation of vulcanized rubber. *Dev.Ind.Microbiol.* **16**:88-96.
- Cundell, A. M. and A. P. Mulcock.** 1976. The biodeterioration of natural rubber pipe-joint rings in sewer mains, p. 659-664. *In* J. M. Sharpley and A. M. Kaplan (eds.), Proceedings of the third international biodegradation symposium. Applied Science Publishers, London.
- Devery, J. and B. V. Milborrow.** 1994. beta-Carotene-15,15'-dioxygenase (EC 1.13.11.21) isolation reaction mechanism and an improved assay procedure. *Br.J.Nutr.* **72**:397-414.
- Einsle, O., A. Messerschmidt, P. Stach, G. P. Bourenkov, H. D. Bartunik, R. Huber, and P. M. Kroneck.** 1999. Structure of cytochrome *c* nitrite reductase. *Nature* **400**:476-480.
- Einsle, O., P. Stach, A. Messerschmidt, J. Simon, A. Kroger, R. Huber, and P. M. Kroneck.** 2000. Cytochrome *c* nitrite reductase from *Wolinella succinogenes*. Structure at 1.6 Å resolution, inhibitor binding, and heme-packing motifs. *J.Biol.Chem.* **275**:39608-39616.
- Eng, A. H., S. Kawahara, and Y. Tanaka.** 1994. *Trans*-isoprene units in natural rubber. *Rubb.Chem.Technol.* **67**:159-168.
- Falk, J. E.** 1964. Porphyrins and metalloporphyrins. Elsevier, Amsterdam.
- Fridovich, I.** 1995. Superoxide radical and superoxide dismutases. *Annu.Rev.Biochem.* **64**:97-112.
- Fulop, V., C. J. Ridout, C. Greenwood, and J. Hajdu.** 1995. Crystal structure of the di-haem cytochrome *c* peroxidase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Structure.* **3**:1225-1233.
- Gomez, J. B. and S. Hamzah.** 1989. Particle size distribution in *Hevea* latex - some observations on the electron microscopic method. *J.Nat.Rubb.Res.* **4**:204-211.
- Gomez, J. B. and G. F. J. Moir.** 1979. The ultracytology of latex vessels in *Hevea brasiliensis*. *Malays.Rubber Res.Dev.Bd.Monogr.Kuala Lumpur* **4**:1-11.
- Harayama, S., M. Kok, and E. L. Neidle.** 1992. Functional and evolutionary relationships among diverse oxygenases. *Annu.Rev.Microbiol.* **46**:565-601.
- Heisey, R. M. and S. Papadatos.** 1995. Isolation of microorganisms able to metabolize purified rubber. *Appl.Environ.Microbiol.* **61**:3092-3097.
- Hu, W., G. Van Driessche, B. Devreese, C. F. Goodhew, D. F. McGinnity, N. Saunders, V. Fulop, G. W. Pettigrew, and J. J. Van Beeumen.** 1997. Structural characterization of *Paracoccus denitrificans* cytochrome *c* peroxidase and assignment of the low and high potential heme sites. *Biochemistry* **36**:7958-7966.
- Hylckama Vlieg, J. E., H. Leemhuis, J. H. Spelberg, and D. B. Janssen.** 2000. Characterization of the gene cluster involved in isoprene metabolism in *Rhodococcus* sp. strain AD45. *J.Bacteriol.* **182**:1956-1963.

- Jancarik, J. and S.-H. Kim.** 1991. Sparse matrix sampling: a screening method for crystallization of proteins. *J.Appl.Cryst.* **24**:409-411.
- Jendrossek, D. and S. Reinhardt.** 2003. Sequence analysis of a gene product synthesized by *Xanthomonas* sp. during growth on natural rubber latex. *FEMS Microbiol.Lett.* **224**:61-65.
- Jendrossek, D., G. Tomasi, and R. M. Kroppenstedt.** 1997. Bacterial degradation of natural rubber: a privilege of actinomycetes? *FEMS Microbiol.Lett.* **150**:179-188.
- Kalinenko, V. O.** 1938. The role of *Actinomyces* and bacteria in decomposing rubber. *Mikrobiologiya (Moscow)* **17**:119-128.
- Kamoda, S. and Y. Saburi.** 1993. Structural and enzymatical comparison of lignostilbene-alpha, beta-dioxygenase isozymes, I, II, and III, from *Pseudomonas paucimobilis* TMY1009. *Biosci.Biotechnol.Biochem.* **57**:931-934.
- Katz, I. and M. Keeney.** 1966. Quantitative micro determination and isolation of plasmalogen aldehydes as 2,4-dinitrohydrazones. *J.Lipid Res.* **7**:170-174.
- Linos, A., M. M. Berekaa, R. Reichelt, U. Keller, J. Schmitt, H. C. Flemming, R. M. Kroppenstedt, and A. Steinbüchel.** 2000. Biodegradation of *cis*-1,4-polyisoprene rubbers by distinct actinomycetes: microbial strategies and detailed surface analysis. *Appl.Environ.Microbiol.* **66**:1639-1645.
- Linos, A., M. M. Berekaa, A. Steinbüchel, K. K. Kim, C. Sproer, and R. M. Kroppenstedt.** 2002. *Gordonia westfalica* sp. nov., a novel rubber-degrading actinomycete. *Int.J.Syst.Evol.Microbiol.* **52**:1133-1139.
- Linos, A. and A. Steinbüchel.** 2001. Biodegradation of natural and synthetic rubber, p. 321-359. *In* T. Koyama and A. Steinbüchel (eds.), *Biopolymers*, vol. 2 Polyisoprenoids. Wiley-VCH, Weinheim.
- Linos, A., A. Steinbüchel, C. Sproer, and R. M. Kroppenstedt.** 1999. *Gordonia polyisoprenivorans* sp. nov., a rubber-degrading actinomycete isolated from an automobile tyre. *Int.J.Syst.Bacteriol.* **49 Pt 4**:1785-1791.
- Mason, M. G., A. S. Ball, B. J. Reeder, G. Silkstone, P. Nicholls, and M. T. Wilson.** 2001. Extracellular heme peroxidases in actinomycetes: a case of mistaken identity. *Appl.Environ.Microbiol.* **67**:4512-4519.
- McGinnity, D. F., B. Devreese, S. Prazeres, J. Van Beeumen, I. Moura, J. J. Moura, and G. W. Pettigrew.** 1996. A single histidine is required for activity of cytochrome *c* peroxidase from *Paracoccus denitrificans*. *J.Biol.Chem.* **271**:11126-11133.
- Retey, J., A. Umani-Ronchi, J. Sebl, and D. Arigoni.** 1966. On the mechanism of the propanediol dehydrase reaction. *Experientia* **22**:502-503.
- Rook, J. J.** 1955. Microbiological deterioration of vulcanized rubber. *Appl.Microbiol.* **3**:302-309.
- Rose, K. and A. Steinbüchel.** 2002. Construction and intergeneric conjugative transfer of a pSG5-based cosmid vector from *Escherichia coli* to the polyisoprene rubber degrading strain *Micromonospora aurantiaca* W2b. *FEMS Microbiol.Lett.* **211**:129-132.

- Rose, K., K. B. Tenberge, and A. Steinbüchel.** 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.
- Sakai, Y., H. Takahashi, Y. Wakasa, T. Kotani, H. Yurimoto, N. Miyachi, P. P. Van Veldhoven, and N. Kato.** 2004. Role of  $\alpha$ -methylacyl coenzyme A racemase in the degradation of methyl-branched alkanes by *Mycobacterium* sp. strain P101. *J.Bacteriol.* **186**:7214-7220.
- Shaposnikov, V. N., I. A. Rabotnova, G. A. Jarmola, and V. M. Kuznetsova.** 1952a. On growth of moulds on natural rubber. *Microbiologiya (Moscow)* **21**:280-282.
- Shaposnikov, V. N., I. A. Rabotnova, G. A. Jarmola, V. M. Kuznetsova, and N. N. Mazokhina-Porshnykova.** 1952b. On growth of bacteria on natural rubber. *Microbiologiya (Moscow)* **21**:146-154.
- Söhngen, N. L. and J. G. Fol.** 1914. Die Zersetzung des Kautschuks durch Mikroben. *Zbl.Bakt.II Abt.* **40**:87-98.
- Spence, D. and C. B. van Niel.** 1936. Bacterial decomposition of the rubber in *Hevea* latex. *Ind.Eng.Chem.* **28**:847-850.
- Subramaniam, A.** 1995. The chemistry of natural rubber latex. *Immunol.Allergy Clin.N.Am.* **15**:1-20.
- Tan, H. M.** 1999. Bacterial catabolic transposons. *Appl.Microbiol.Biotechnol.* **51**:1-12.
- Tanaka, Y., A. H. Eng, N. Ohya, J. Tangpakdee, S. Kawahara, and R. Wititsuwannakul.** 1996. Initiation of rubber biosynthesis in *Hevea brasiliensis*: characterization of initiating species by structural analysis. *Phytochemistry* **41**:1501-1505.
- Tanaka, Y. and J. T. Sakdapipanich.** 2001. Chemical structure and occurrence of natural polyisoprenes, p. 1-25. *In* T. Koyama and A. Steinbüchel (eds.), *Biopolymers*, vol. 2 Polyisoprenoids. Wiley-VCH, Weinheim, Germany.
- Tsuchii, A.** 1999. Microbial degradation of natural rubber, p. 258-264. *In* A. Steinbüchel (ed.), *Biochemical principles and mechanisms of biosynthesis and biodegradation of polymers*. Wiley-VCH, Weinheim.
- Tsuchii, A., T. Suzuki, and Y. Takahara.** 1979. Microbial degradation of *cis*-1,4-polyisoprene. *Agric.Biol.Chem.* **43**:2441-2446.
- Tsuchii, A., T. Suzuki, and K. Takeda.** 1985. Microbial degradation of natural rubber vulcanisates. *Appl.Environ.Microbiol.* **50**:965-970.
- Tsuchii, A. and K. Takeda.** 1990. Rubber-degrading enzyme from a bacterial culture. *Appl.Environ.Microbiol.* **56**:269-274.
- Tsuchii, A., K. Takeda, and Y. Tokiwa.** 1996a. Colonization and degradation of rubber pieces by *Nocardia* sp. *Biodegradation* **7**:41-48.
- Tsuchii, A., K. Takeda, and Y. Tokiwa.** 1996b. Degradation of the rubber in truck tires by a strain of *Nocardia*. *Biodegradation*. **7**:405-413.

- Tsuchii, A. and Y. Tokiwa.** 1999. Colonization and disintegration of tire rubber by a colonial mutant of *Nocardia*. *J.Biosc.Bioeng.* **87**:542-544.
- Woggon, W. D.** 2002. Oxidative cleavage of carotenoids catalyzed by enzyme models and beta-carotene 15,15'-monooxygenase. *Pure Appl.Chem.* **74**:1397-1408.
- Yamada, T., C. Morisseau, J. E. Maxwell, M. A. Argiriadi, D. W. Christianson, and B. D. Hammock.** 2000. Biochemical evidence for the involvement of tyrosine in epoxide activation during the catalytic cycle of epoxide hydrolase. *J.Biol.Chem.* **275**:23082-23088.
- ZoBell, C. E. and J. D. Beckwith.** 1944. The deterioration of rubber products by microorganisms. *J.Am.Water Works Assoc.* **36**:439-453.
- ZoBell, C. E. and C. W. Grant.** 1942. The bacterial oxidation of rubber. *Science* **96**:379-380.
- Zyska, B. J.** 1981. Rubber, p. 323-385. *In* A. H. Rose (ed.), *Microbial Biodeterioration, Economic Microbiology Vol. 6.* Academic Press, London, London.
- Zyska, B. J.** 1988. Microbial deterioration of rubber, p. 535-552. *In* D. R. Houghton, R. N. Smith, and H. O. W. Egging (eds.), *Biodeterioration 7.* Elsevier Applied Science, London.



## Appendix 1

# Novel Type of Heme-Dependent Oxygenase Catalyzes Oxidative Cleavage of Rubber (Poly-*cis*-1,4-Isoprene)

Reinhard Braaz,<sup>1</sup> Peter Fischer,<sup>2</sup> and Dieter Jendrossek<sup>1\*</sup>

*Institut für Mikrobiologie*<sup>1</sup> and *Institut für Organische Chemie und Isotopenforschung*,<sup>2</sup>  
*Universität Stuttgart, Stuttgart, Germany*

Received 4 June 2004/Accepted 31 July 2004

An extracellular protein with strong absorption at 406 nm was purified from cell-free culture fluid of latex-grown *Xanthomonas* sp. strain 35Y. This protein was identical to the gene product of a recently characterized gene cloned from *Xanthomonas* sp., as revealed by determination of *m/z* values and sequencing of selected isolated peptides obtained after trypsin fingerprint analysis. The purified protein degraded both natural rubber latex and chemosynthetic poly(*cis*-1,4-isoprene) in vitro by oxidative cleavage of the double bonds of poly(*cis*-1,4-isoprene). 12-Oxo-4,8-dimethyltrideca-4,8-diene-1-al (*m/z* 236) was identified and unequivocally characterized as the major cleavage product, and there was a homologous series of minor metabolites that differed from the major degradation product only in the number of repetitive isoprene units between terminal functions, CHO-CH<sub>2</sub>— and —CH<sub>2</sub>-COCH<sub>3</sub>. An in vitro enzyme assay for oxidative rubber degradation was developed based on high-performance liquid chromatography analysis and spectroscopic detection of product carbonyl functions after derivatization with dinitrophenylhydrazine. Enzymatic cleavage of rubber by the purified protein was strictly dependent on the presence of oxygen; it did not require addition of any soluble cofactors or metal ions and was optimal around pH 7.0 at 40°C. Carbon monoxide and cyanide inhibited the reaction; addition of catalase had no effect, and peroxidase activity could not be detected. The purified protein was specific for natural rubber latex and chemosynthetic poly(*cis*-1,4-isoprene). Analysis of the amino acid sequence deduced from the cloned gene (*roxA* [rubber oxygenase]) revealed the presence of two heme-binding motifs (CXXCH) for covalent attachment of heme to the protein. Spectroscopic analysis confirmed the presence of heme, and approximately 2 mol of heme per mol of RoxA was found.

Natural rubber (NR) is a biopolymer that is synthesized by many plants and some fungi. This polymer has been commercially exploited for more than 100 years by cultivating and tapping the rubber tree (*Hevea brasiliensis*). NR is a polymer of many isoprene units [poly(*cis*-1,4-isoprene)] that, after cross-linking of the linear polymer chains by sulfur bridges (vulcanization), has superior physical properties. Despite the development of chemosynthetic rubbers, NR is still a necessary raw material for products such as tires, latex gloves, condoms, and seals.

NR does not accumulate in the environment. Many reports on the biodegradability of rubbers were published during the last century (for recent studies see references 2, 9, 11, 12, and 18 and references therein). Even chemically cross-linked (vulcanized) rubbers have been shown to be biodegradable (3, 7, 17). Two biological strategies for microbial NR degradation have been described so far. (i) A large number of bacteria, most of which belong to the actinomycetes, are able to grow and to produce clearing zones on agar media containing NR latex in the form of a milky opaque emulsion as a carbon source (9). So far, *Xanthomonas* sp. strain 35Y is the only known gram-negative NR-degrading bacterium belonging to this group (18). (ii) The members of the other group of NR-utilizing bacteria do not produce clearing zones on NR latex agar; rather, they are able to solubilize solid pieces of NR and to use the resulting emulsion as a carbon source.

*Gordonia polyisoprenivorans* and *Gordonia westfalica* belong to this class of bacteria (11, 13).

The basic molecular mechanism by which rubber is degraded is not known. Tsuchi and coworkers were the first researchers to isolate and identify low-molecular-mass oligo(*cis*-1,4-isoprene) derivatives with aldehyde and keto end groups from rubber-grown cultures of *Xanthomonas* and *Nocardia* species (17, 18). It is assumed that degradation of the polymer backbone is initiated by statistical oxidative cleavage of one double bond in the polymer chain. The resulting low-molecular-mass oligo(*cis*-1,4-isoprene) derivatives then are further degraded, presumably by  $\beta$ -oxidation. Analysis of NR degradation products produced by *Streptomyces coelicolor* 1A and *Streptomyces griseus* 1D after 70 days of growth on latex gloves revealed an oligomer pattern similar to that observed for *Xanthomonas* sp. However, products with different end groups were detected (2, 3). Since all these studies were performed with undefined culture broth, it is not known whether the products identified were formed in one or more enzymatic steps. To our knowledge, no enzyme involved in rubber degradation has been isolated in an active form or described. Recently, a gene of *Xanthomonas* sp. whose gene product could be involved in rubber degradation was cloned (8), but a particular function could not be assigned to the gene. In this study we succeeded in purifying an extracellular protein with polyisoprene oxygenase activity and in characterizing the cleavage reaction.

### MATERIALS AND METHODS

**Bacteria, media, and culture conditions.** *Xanthomonas* sp. was grown in nutrient broth or in a mineral salts medium described by Tsuchii and Takeda (18) with 0.5% glucose or 0.2% purified rubber latex at 30°C. Latex cultures also

\* Corresponding author. Mailing address: Institut für Mikrobiologie, Universität Stuttgart, Allmandring 31, 70550 Stuttgart, Germany. Phone: 49-711-685-5483. Fax: 49-711-685-5725. E-mail: dieter.jendrossek@imb.uni-stuttgart.de.

contained 0.002% Tween 80 and sometimes contained 0.05% yeast extract. Solid media contained 1.5% agar. Latex agar was prepared by the overlay technique; a bottom layer (~30 ml) of mineral salts agar in a petri disk was overlaid with the same agar supplemented with 0.2% purified latex from *H. brasiliensis* (percentage of solid rubber) with or without 0.05% yeast extract, which resulted in an opaque overlay. Colonies of *Xanthomonas* sp. produced translucent clearing zones upon incubation at 30°C within 2 to 4 days, indicating utilization of the latex.

**Rubbers.** Rubber latex was prepared from freshly tapped *H. brasiliensis*. Crude latex contains approximately 35% rubber and 1 to 1.5% proteins. Latex was purified from soluble proteins by repeated (three times) centrifugation and washing with 0.002% Tween 80. The top layer (cream) from each centrifugation step was used for the next centrifugation step, while the bottom fractions were discarded. Latex was heat sterilized and stored at 4°C. Purified latex was a gift from the Rubber Research Institute of Malaysia.

**Purification of rubber oxygenase (RoxA).** Rubber oxygenase was purified at 5°C by using a fast-performance liquid chromatography system consisting of an LCC 500 controller, a 500 pump, a UV-1 monitor, a Rec-482 recorder, and an FRAC autosampler (Pharmacia, Uppsala, Sweden). Cell-free supernatant of latex-grown *Xanthomonas* sp. cells was concentrated by ultrafiltration (30-kDa cutoff) and passed through a Q-Sepharose column (HP HR16/10; Pharmacia) that was pre-equilibrated with basic buffer (20 mM ethanolamine-HCl [pH 9.5]) at a flow rate of 1 ml min<sup>-1</sup>. RoxA was eluted from the column with a linear gradient of 0 to 0.15 M NaCl in basic buffer at a concentration of approximately 15 mM. Fractions showing the characteristic absorption spectrum of RoxA were pooled and, after desalting and changing of the buffer by diafiltration (30-kDa cutoff), were applied to a MonoP column (HR 5/5; Pharmacia) that was pre-equilibrated with 20 mM 1,3-diaminopropane-HCl (pH 11.0) at a flow rate of 0.5 ml min<sup>-1</sup>. During elution with a linear pH gradient (Pharmalyte HCl [pH 8.5] 1:60; Pharmacia) peaks with the characteristic spectrum of RoxA were observed. These fractions were pooled and passed through a Superdex 200 column (Superdex 200 Prep-grade; Pharmacia) and eluted with 20 mM phosphate buffer (pH 7.0).

**Protein determination.** Routinely, protein determinations were performed by the method of Bradford (4). For determination of the heme content, the concentration of purified RoxA was also determined by the biconchonic acid assay at 562 nm by using a commercial kit (Perbio Science, Erembodegem, Belgium) and by determining the absorption at 280 nm with a specific molar absorption coefficient of 153,160 M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>, which was calculated from the amino acid composition as described by Gill and Hippel (6).

**Determination of heme content.** The heme content of purified RoxA was determined by the pyridine ferrohemochromogen test (5). Six hundred microliters of purified RoxA (15 µg/ml, as determined by the biconchonic acid assay and by the Gill-Hippel assay [6]) was added to an aqueous solution of alkaline pyridine (final concentrations, 7.5 mM NaOH and 25% pyridine; final volume, 800 µl) and reduced by adding a few crystals of sodium dithionite. The heme content was calculated from the absorption at 551 nm ( $\epsilon$ , 29.1 mM<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>).

**Determination of carbonyl content.** The carbonyl content of rubber degradation products was determined after formation of 2,4-dinitrophenyl hydrazones (in hexane) as described by Katz and Keeney (10) by using a molar absorbance coefficient of 21,500 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> at 338 nm.

**RoxA assay and peroxidase assay.** The following conditions were used for product analysis after RoxA-catalyzed rubber degradation by thin-layer chromatography (TLC), carbonyl content determination, and high-performance liquid chromatography (HPLC). The reaction mixture (total volume, 1 ml) contained 100 µl of purified RoxA (10 to 15 µg/ml), rubber latex (4 µl of a 35% emulsion), and bis-Tris buffer (200 mM; pH 7.0). The reaction was carried out at 40°C for 3 or 4 h in a test tube closed with Parafilm. The mixture was extracted with ethyl acetate or diethyl ether, dried, dissolved in 100 to 200 µl of methanol, and then subjected to TLC, carbonyl content determination, or HPLC analysis. Mixtures without RoxA and with heat-inactivated RoxA (10 min, 95°C) were used as negative controls. One unit of activity corresponded to 1 µmol of generated carbonyl function per min. Peroxidase activity was assayed at 510 nm as described by Mason et al. (14); RoxA was incubated in 100 mM sodium phosphate buffer (pH 7) containing 5 mM 2,4-dichlorophenol, 3.2 mM 4-aminoantipyrene, and 1 mM hydrogen peroxide. Horseradish peroxidase was used as a positive control.

**Analysis of rubber degradation products by two-dimensional TLC.** Ethyl acetate extracts dissolved in methanol were spotted onto TLC plates (Kieselgel 60F254; Merck & Co., Inc.), and each plate was developed with benzene-acetone (20:1) in the first dimension and with chloroform-methanol (9:1) in the second dimension. After evaporation of the solvent the plates were developed with anisaldehyde-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> spray reagent.

**Analysis of reaction products by HPLC and HPLC-mass spectrometry (MS).**

Degradation products were detected at 210 nm by HPLC analysis (Chromeleon Chromatography Data Systems 4.38 equipped with a Dionex UV7Vis detector, a UVD 170S/340S, a Dionex P 580 pump, and a Dionex Gina 50 autosampler; Dionex, Isstein, Germany) with a Grom-Sil 100 RP-8 column (125 by 4 mm; particle size, 5 µm; Grom, Herrenberg, Germany). The mobile phase consisted of 50% (vol/vol) aqueous methanol, and separation of the samples was carried out with a gradient to 100% (vol/vol) methanol. Liquid chromatography mass spectra were obtained in the negative and positive electrospray ionization (ESI) mode with an HP1100 HPLC system (Hewlett-Packard, Waldbronn, Germany) coupled to a VG Platform II quadrupole mass spectrometer (Micromass, Manchester, United Kingdom). Samples were resolved with the column and mobile phase described above.

**Spectral analysis.** Proton nuclear magnetic resonance (<sup>1</sup>H-NMR) spectra were obtained with an ARX 500 spectrometer (Bruker, Rheinstetten, Germany) at a nominal frequency of 500.15 MHz. Samples were dissolved in CDCl<sub>3</sub>. Chemical shifts ( $\delta$ ) were expressed in parts per million relative to tetramethylsilane as an internal standard.

## RESULTS

**Purification and properties of rubber oxygenase (RoxA).** *Xanthomonas* sp. produces clearing zones during growth on opaque mineral salts agar with latex as a carbon source. Apparently, *Xanthomonas* sp. secretes an activity that is able to degrade latex to water-soluble products (Fig. 1A). In order to establish an in vitro assay for latex degradation and to analyze the latex-degrading activity, *Xanthomonas* sp. was grown on mineral salts medium with purified latex. After 7 to 9 days of incubation the latex was visibly degraded and/or coagulated. The culture fluid was separated from the cells and remaining latex particles by successive centrifugation and filtration (pore size, 0.2 µm). Macromolecular components were concentrated about 20-fold by ultrafiltration (30-kDa cutoff). When aliquots of fresh latex were added to the cell-free concentrated culture fluid and incubated at 30°C, latex was again visibly coagulated or degraded within 2 days; the control, with buffer instead of culture fluid, remained milky. When the same experiment was repeated with either the flowthrough from the 30-kDa filtration step or the concentrated culture fluid that had been heated to 95°C for 10 min before latex was added, no coagulation or degradation was observed. We concluded that the compound responsible for coagulation or degradation of the latex is a heat-sensitive macromolecule, presumably an enzyme. It was noticed that the concentrate had a light reddish color that did not appear to the same extent in glucose-grown cultures. The concentrate had a single absorption maximum around 406 nm (the range from 400 to 600 nm was tested) that could be shifted upon reduction to ~418 and ~550 nm (data not shown). These results are characteristic for heme-containing proteins, and we speculated that a heme-containing protein was responsible for latex degradation. Using 2 liters of cell-free culture fluid of NR-grown *Xanthomonas* sp. as the starting material, we were able to purify a protein (apparent molecular mass after sodium dodecyl sulfate [SDS]-polyacrylamide gel electrophoresis, 65 ± 7 kDa) to apparent electrophoretic homogeneity by diafiltration and subsequent chromatography on Q-Sepharose and MonoP (chromatofocusing). The purified 65-kDa protein showed the same strong absorption at 406 nm as the concentrated culture fluid (Fig. 1B and C); the oxidized protein had absorption bands at 280 nm ( $\gamma$  band), 356 nm, and 406 nm (Soret band) and weaker and broader bands at 532 nm ( $\beta$  band), 560 to 565 nm ( $\alpha$  band), and 672 nm. A molar extinction coefficient of 1.8 × 10<sup>5</sup> M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> was determined

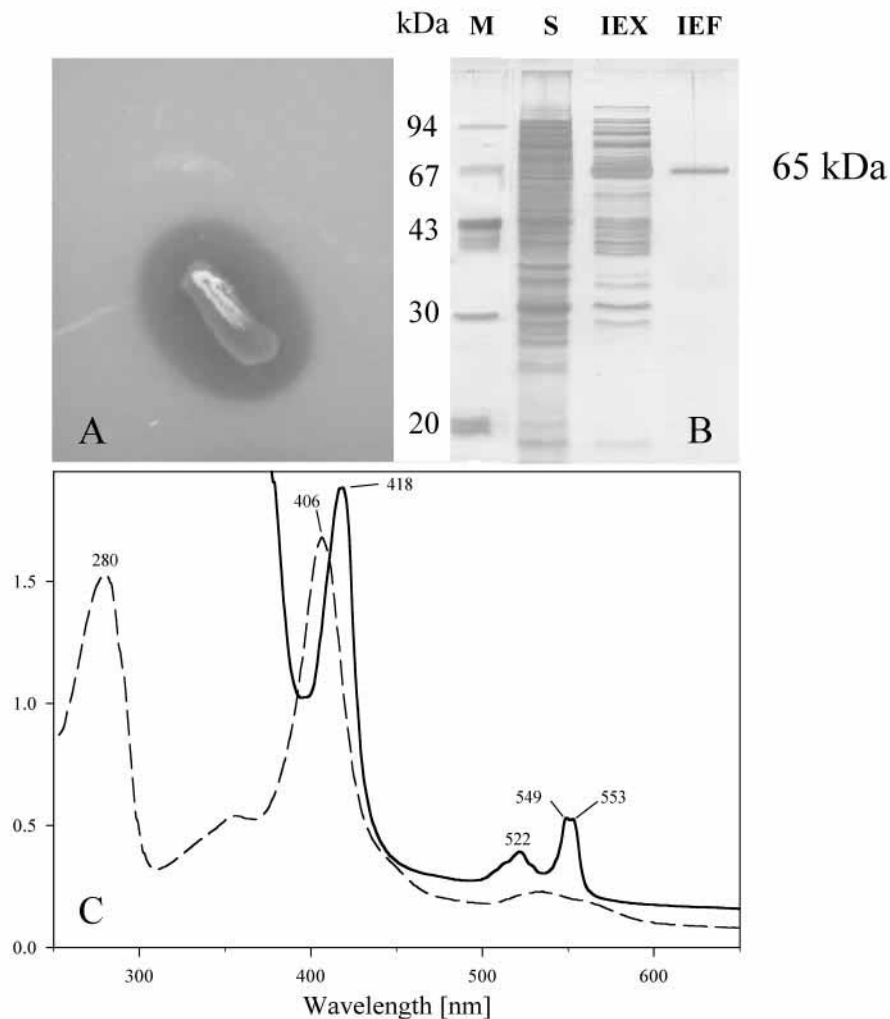


FIG. 1. (A) Clearing zone formation for *Xanthomonas* sp. after 4 days of incubation at 30°C on opaque latex agar. (B) SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of the 65-kDa protein (RoxA) at various stages of purification. Lane M, marker proteins; lane S, concentrated cell-free culture fluid; lane IEX, pool after ion-exchange chromatography on Q-Sepharose; lane IEF, pool after isoelectric focusing on MonoP. (C) Spectra of purified RoxA before (dashed line) and after (solid line) reduction by dithionite. The numbers indicate the observed maxima of the spectra.

for the absorption at 406 nm, which was similar to the coefficients of diheme enzymes (1). The  $\lambda_{406}/\lambda_{280}$  value, which reflected the purity and spectral characteristics of RoxA, was 1.17 in 20 mM phosphate buffer (pH 6.8). When the purified 65-kDa protein was reduced by  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ , absorption bands appeared at 418 nm (Soret band), 522 nm ( $\beta$  band), and 549 and 553 nm (both  $\alpha$  bands), which corresponded to a heme-pyridine complex. These data are indicative of a hemoprotein belonging to the cytochrome *c* group (15). Addition of synthetic oligo(1,4-*cis*-isoprene) to purified RoxA resulted in a shift of the Soret band from 406 to 409 nm, indicating that the substrate binds to the enzyme at the heme site(s). The optical spectra of purified RoxA did not exhibit an absorption band at 695 nm which would be expected for a heme iron-methionine bond.

A trypsin fingerprint analysis of the isolated 65-kDa protein was performed, and the masses of the peptides generated were determined by matrix-assisted laser desorption ionization—time of flight analysis (data not shown). The values obtained

for six randomly isolated peptides were in agreement with the values obtained for an *in silico* trypsin digest of a gene product encoded by a recently cloned gene of *Xanthomonas* sp. (8). The cloned gene was assumed to be involved in rubber degradation, but the biochemical function of the protein was not known. Determination of the amino acid sequences of these six peptides confirmed that the 65-kDa protein was identical to the gene product mentioned above (peptide 1,  $\text{NH}_2$ -YGLYP APFR; peptide 2,  $\text{NH}_2$ -TTPITALGNLLPLPWSTGR; peptide 3,  $\text{NH}_2$ -GLEDEFEDINNFLISLSPATYPK; peptide 4,  $\text{NH}_2$ -GVAAVVTPIETIR; peptide 5,  $\text{NH}_2$ -AWNSGWWAYNNLS PSWTGYPSDNIVASELR; peptide 6,  $\text{NH}_2$ -WALIEYIK). The deduced amino acid sequence of the cloned gene contained two heme-binding motifs (CXXCH) typical for covalently bound heme. Calculation of the heme content of the purified 65-kDa protein by using the molar absorption coefficient of heme-cytochromes ( $\epsilon$ ,  $29.1 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  at 551 nm [5]) and three independent methods for protein determination revealed heme and protein concentrations of 16.7 and 9  $\mu\text{M}$ , respectively.

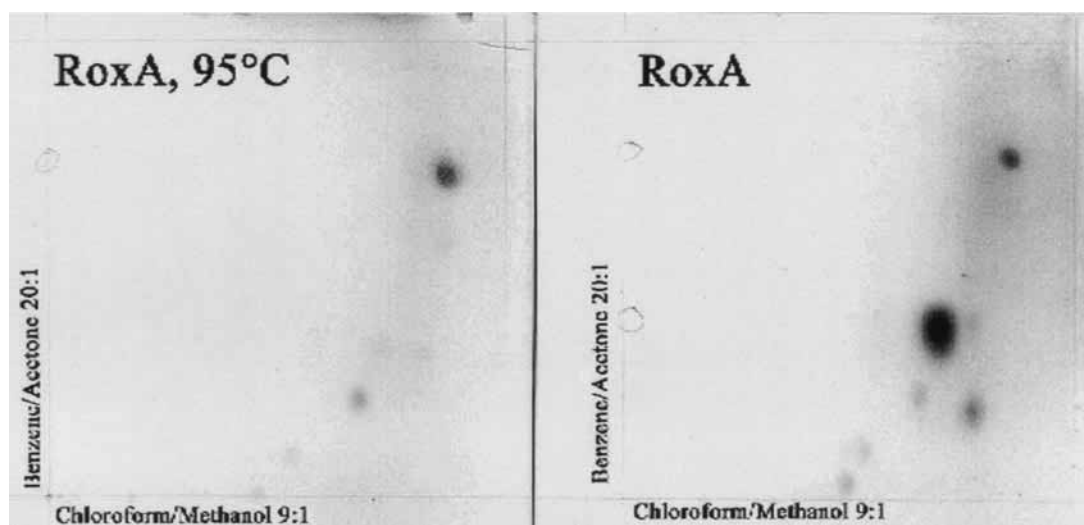


FIG. 2. Two-dimensional thin-layer chromatography of degradation products produced from latex by purified RoxA. Latex was allowed to react with purified RoxA before products were extracted with ethyl acetate, dried, and resolved with methanol. Aliquots were spotted onto TLC plates, separated with benzene-acetone (20:1) in the first dimension and with chloroform-methanol (9:1; 90°) in the second dimension, and developed with anisaldehyde- $\text{H}_2\text{SO}_4$  at 100°C.

These values correspond to a heme content of 1.9 mol of heme per mol of the 65-kDa protein and are in good agreement with the gene sequence analysis that predicted two heme-binding sites. An apparent molecular mass of 54 kDa for the purified native protein was determined by gel filtration (Sephadex G-200). Apparently, the protein has a monomeric subunit structure. In most experiments, the SDS-denatured (reduced) protein migrated at values corresponding to an apparent molecular mass of 55 to 65 kDa, which were significantly lower than the theoretical molecular mass of the mature protein (72.9 kDa) deduced from the gene sequence. The reason for the discrepancy in apparent molecular masses is not known. To test whether the purified protein was responsible for the observed latex-coagulating and -degrading activity, it was added to diluted latex and incubated at 30°C. After incubation for 24 h, controls without enzyme or with boiled enzyme were not changed, but clearing and coagulation of the latex were visible upon incubation with the active enzyme, confirming that the purified 65-kDa protein was responsible for the latex-degrading and -coagulating activity.

**Isolation and identification of the main cleavage product of enzymatic rubber degradation.** In order to determine whether the purified protein cleaved the carbon backbone of the polymer or whether it only affected the integrity of the latex emulsion (i.e., the diameter-to-volume ratio of the latex particles), we investigated the presence of low-molecular-mass degradation products in the cleared and coagulated latex. Latex was incubated with the purified 65-kDa protein for several hours at 30°C and subsequently extracted with ethyl acetate; the extracts were analyzed by two-dimensional TLC. One major dark spot became visible when the TLC plate was developed with anisaldehyde, and this spot was absent in controls with either no enzyme or heat-inactivated enzyme (Fig. 2). A few minor low-intensity spots of different color also appeared in some experiments. HPLC analysis of the same ethyl acetate extract revealed only one major peak (at a retention time of 14.8 min)

that was missing in control experiments (Fig. 3). The identity of the 14.8-min HPLC fraction that produced the large spot in TLC analysis was established by collecting the corresponding HPLC fraction; subsequent two-dimensional TLC analysis revealed only one spot with the same  $R_f$  value (data not shown).

The compound which appeared as large dark spot in TLC and as the only prominent peak at 14.8 min in the HPLC analysis thus apparently represented the principal enzymatic rubber degradation product. In a coupled HPLC-MS analysis in the negative ESI mode, the mass spectrum of the 14.8-min fraction showed an  $[\text{M}-\text{H}]^-$  peak at  $m/z$  235 (Fig. 4). When the total ion chromatogram from HPLC was analyzed for addi-

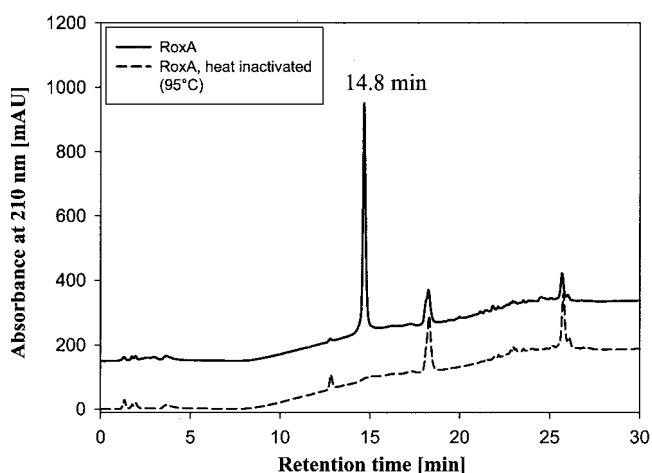


FIG. 3. Separation of polyisoprene degradation products by HPLC. Latex was incubated with purified RoxA for 3 h at 40°C and pH 7. Ethyl acetate-extracted products were loaded on a  $\text{C}_8$  reverse-phase HPLC column as described in Materials and Methods. Heat-inactivated RoxA served as a negative control. mAU, milli absorbance units.

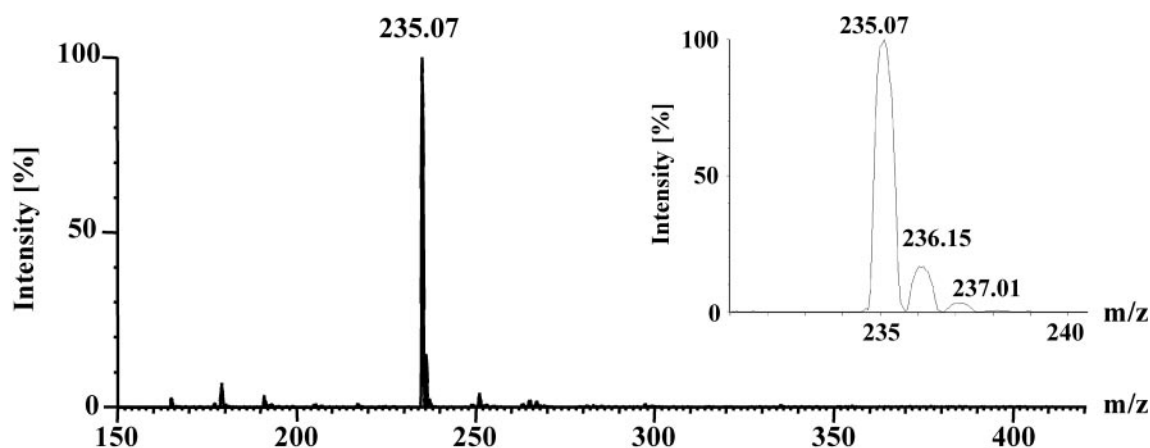


FIG. 4. HPLC-ESI-MS analysis of latex degradation products. Latex degradation products were prepared and separated by HPLC as described in the legend to Fig. 3, and the eluate was monitored by negative ESI-MS. The graph shows the average mass spectrum summed across the 14.8-min peak (seven scans). The relative intensity of the  $(M+1)^{-13}\text{C}$  isotope peak ( $m/z$  236) corresponds to a  $\text{C}_{15}$  molecular formula.

tional signals at  $m/z$  values that differed from  $m/z$  235 by  $n$  isoprene units (i.e.,  $\Delta m/z$  68), additional  $[\text{M}-\text{H}]^-$  peaks were detected in the  $m/z$  167, 303, 371, and 439 ion chromatograms (Table 1). The levels of these minor metabolites apparently were below the detection limit of the UV diode array in the HPLC analysis. They represent a series of homologous degradation products with one isoprene unit less or one to three isoprene units more than the major metabolite (236 Da).

The positive ESI mass spectrum of the major metabolite showed an  $[\text{MH}]^+$  peak at  $m/z$  237, as well as the regular adduct ions  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  and  $[\text{M}+\text{K}]^+$  and the corresponding cluster ions with methanol ( $m/z$  259, 275, 291, and 307). Two intense peaks at  $m/z$  219 and 201 represented the loss of one or two water molecules from the quasimolecular ion  $\text{MH}^+$ , which definitively established the incorporation of two oxygen atoms in the metabolite (data not shown).

When the isolated 236-Da compound was reacted with dinitrophenylhydrazine, a yellow product was obtained, indicating the presence of carbonyl functions in the molecule. Additional structural information was obtained by  $^1\text{H}$ -NMR spectroscopy of the isolated compound; the individual resonance signals are shown in Table 2 together with the first-order multiplicity and the corresponding assignments. For the resonance at the lowest field, the chemical shift ( $\delta$  9.78 ppm), relative intensity 1H, and vicinal coupling constant to the  $\alpha$ -methylene protons ( $^{\alpha}\text{CH}_2$ , 1.75 Hz) are characteristic of an

aldehyde proton. The sharp singlet at 2.14 ppm (relative intensity 3H), on the other hand, is indicative of a nonconjugated acetyl group. Thus, the two ends of the main metabolite can be definitively identified as  $\text{CHO}-\text{CH}_2-$  and  $-\text{CH}_2-\text{CO}-\text{CH}_3$ , with a combined mass contribution of 100 Da. Since the overall molecular mass is 236 Da, this leaves 136 Da for the core of the metabolite, corresponding to two isoprene moieties [ $-\text{CH}_2-\text{C}(\text{CH}_3)=\text{CH}-\text{CH}_2-$ ; 68 Da each]. The two expected olefinic proton signals for the main metabolite ( $n = 2$ ) (Fig. 5) were observed at  $\delta$  5.17 and 5.13 ppm. We concluded that 12-oxo-4,8-dimethyltrideca-4,8-diene-1-al (ODTD) ( $m/z$  236) is the formula of the isolated degradation product with a retention time of 14.8 min in HPLC analysis. The experiments described above showed for the first time that in vitro a single enzyme is capable of cleaving the carbon backbone of rubber, yielding 12-oxo-4,8-dimethyltrideca-4,8-diene-1-al as the major degradation product. The purified protein and its corresponding gene were designated rubber oxygenase A (RoxA) and *roxA*, respectively.

**Biochemical characterization of the NR cleavage reaction with rubber oxygenase (RoxA).** An assay for determination of RoxA activity was developed as follows. The standard assay was performed (see Materials and Methods), and the ethyl acetate-extracted products were separated by HPLC. The

TABLE 1. Quasimolecular ions  $(\text{M}-\text{H})^-$  of the major and minor rubber degradation products, obtained from HPLC-negative ESI-MS analysis

(M-H) $m/z$	No. of complete isoprene units	Retention time (min)	Relative intensity (%) <sup>a</sup>
167	1	10.95	0.2
235	2	14.82	100
303	3	18.66	11
371	4	20.73	5
439	5	22.03	0.2

<sup>a</sup> 100% =  $1.62 \times 10^8$  ion counts.

TABLE 2. Assignment of  $^1\text{H}$ -NMR signals for the major metabolite (14.8-min fraction)

$\delta$ (ppm) <sup>b</sup>	Assignment <sup>a</sup>
9.78 (t)	$\text{CHO}$ , $^3J$ ( $\text{CHO}$ , $^{\alpha}\text{CH}_2$ ) 1.75 Hz
5.17 (t)	$\delta^{\text{H}}$
5.13 (mf)	$\gamma^{\text{H}}$
2.49 (td), 2.44 (t)	$\beta^{\text{H}}$ , $\alpha^{\text{H}}$
2.35 (t), 2.24 (td)	$\beta^{\text{H}}$ , $\alpha^{\text{H}}$
2.14 (s)	
2.05 (br)	
1.68 (t)	
1.67 (q)	

<sup>a</sup> Assignments according to the formula shown in Fig. 5A.

<sup>b</sup> s, singlet; d, doublet; t, triplet; q, quartet; mf, multiplet with fine structure; br, broad resonance.

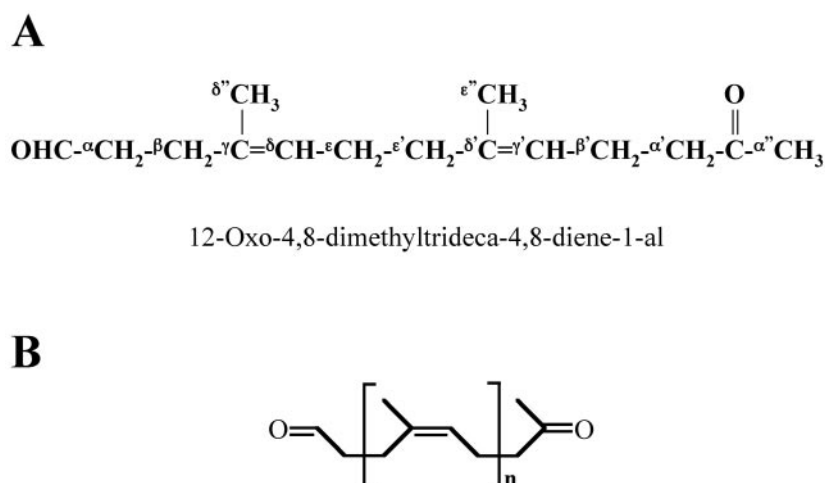


FIG. 5. Proposed structure of the latex degradation products produced by RoxA. (A) Molecular structure of the main metabolite at 14.8 min in the HPLC analysis (12-oxo-4,8-dimethyltrideca-4,8-diene-1-al), including the assignments of the  $^1\text{H-NMR}$  signals (Table 2). (B) General structure of the unequivocally characterized major and minor degradation products, with  $n = 1$  to 5.

RoxA activity was calculated from the peak area at 14.8 min. At low concentrations of RoxA (0.01 to 2  $\mu\text{g/ml}$  of assay mixture) a linear relationship between the area of the 14.8-min peak and the RoxA concentration was found (data not shown). The optimum pH and temperature of purified RoxA were determined to be around pH 7 and 40°C, respectively (Fig. 6). The reaction was strictly dependent on the presence of oxygen, and no rubber degradation product was detected in a nitrogen atmosphere. Addition of potassium cyanide (20 mM) to the assay mixture completely inhibited the reaction. Carbon monoxide also inhibited the reaction if RoxA had been reduced by dithionite before the assay was started in the presence of oxygen (Fig. 7). The results described above are in agreement with the presence of an essential heme(s) in the enzyme. Addition of catalase at various concentrations to the assay system did not affect the reaction at all. Peroxidase activity was not detected even after a prolonged incubation time or if high con-

centrations of RoxA were used, while a positive control (horse-radish peroxidase) reacted within seconds. Alkylation agents, such as *N*-ethylmaleimide and *p*-chlorobenzoate, and chelators (bispyridyl, tiron) partially inhibited the reaction. However, EDTA had no significant effect on the activity. Reducing agents and all of the detergents tested (except cholate) strongly inhibited the reaction (Table 3).

RoxA appeared to be specific for oligomers and polymers of 1,4-isoprene. Natural latex and chemosynthetic poly(*cis*-1,4-isoprene) were significantly cleaved by purified RoxA. When a mixture of chemosynthetic rubber [oligo(*cis*-1,4-isoprene) with 5 to 15 isoprene units ( $M_w$ , 790;  $M_n$ , 707;  $M_w/M_n$ , 1.12)] was incubated with RoxA, a peak at 14.8 min appeared as a degradation product in HPLC, and the composition of the remaining oligomer mixture was shifted to low-molecular-weight products (data not shown). Oligomers of *trans*-1,4-isoprene, such as squalene, were hardly cleaved by RoxA, and only small

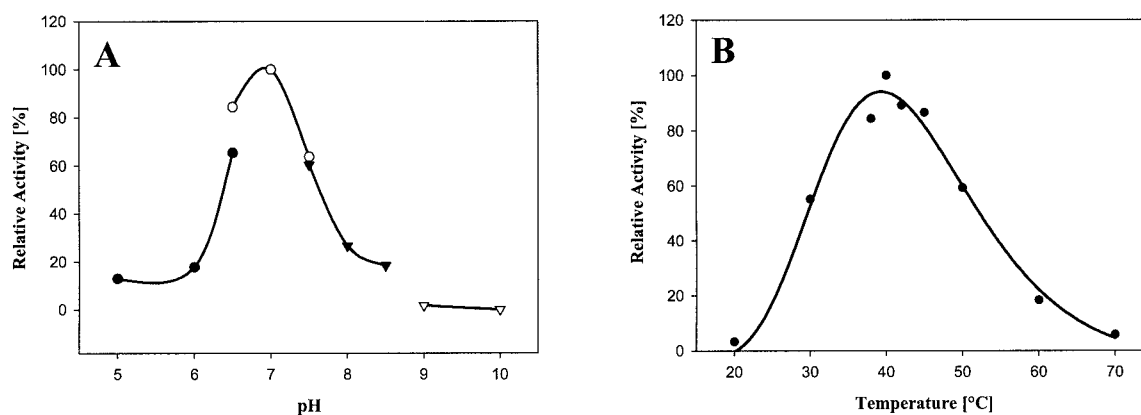


FIG. 6. Optimum pH (A) and temperature (B) of purified RoxA. Latex was incubated with purified RoxA (1  $\mu\text{g}$ ) at different pH values or temperatures for 3 h, and ethyl acetate extracts were separated by HPLC. The area of the peak obtained at 14.8 min was used to calculate the relative amount of degradation product produced. A linear relationship between the amount of RoxA and the peak area was obtained in the range from 10 ng to 2  $\mu\text{g}$  of RoxA per assay mixture. Symbols: ●, 0.2 M piperazine-HCl; ○, 0.2 M bis-Tris-HCl; ▼, 0.2 M Tris-HCl; ▽, 0.2 M ethanolamine-HCl.

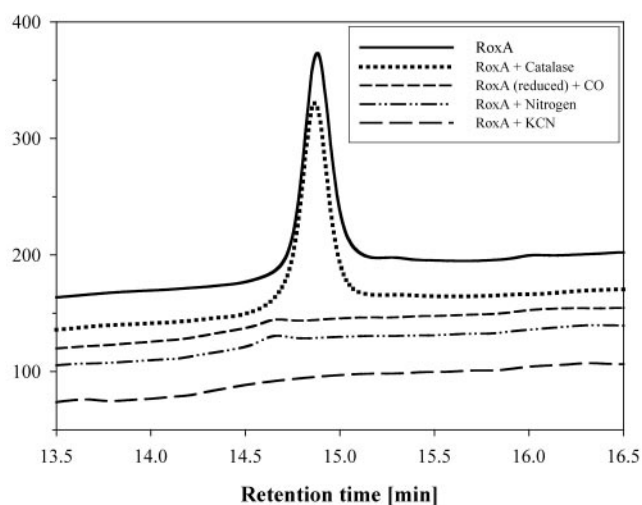


FIG. 7. Dependence of RoxA activity on oxygen and effects of cyanide, carbon monoxide, and catalase. One microgram of purified RoxA was allowed to react with latex in the presence of different compounds. Ethyl acetate extracts were analyzed to determine the area of the peak at 14.8 min by HPLC. Treatments: control (air with 21% oxygen) (RoxA); catalase (1 mM); carbon monoxide (first the atmosphere was replaced by  $N_2$  before  $N_2$  was replaced by CO, and the assay was subsequently performed under normal air with ~21% oxygen); air replaced by  $N_2$ ; addition of 20 mM potassium cyanide.

amounts of carbonyl-containing compounds, which were slightly above the detection limit, were detected. When toluene was tested as a substrate, only background activity was obtained. Benzene did not react at all.

## DISCUSSION

Biosynthetic natural rubber and chemosynthetic rubber have been used by humans at a level of about  $10^6$  tons/year for about a century. The intrinsic biodegradability of polyisoprene by microorganisms in the environment has been known since the first publication of Söhngen and Fol in 1914 (16). Many other reports on biodegradation of polyisoprene have appeared during the last few decades. In particular, the number of isolated rubber-degrading microorganisms has increased during the last 10 years (7, 9, 11, 13, 17, 18). The biochemical mechanism by which the rubber backbone is cleaved is only poorly understood, however, and until now not one enzyme involved in rubber degradation has been isolated.

In this study we purified an extracellular protein from polyisoprene-grown *Xanthomonas* sp. cultures (RoxA) that has the ability to cleave the carbon backbone of polyisoprene in vitro, and we characterized its biochemical properties. A low-molecular-mass compound derived from a three-isoprene-unit backbone (12-oxo-4,8-dimethyltrideca-4,8-diene-1-ol;  $m/z$  236) was identified as the major degradation end product of in vitro rubber degradation by purified RoxA. Four additional minor products that differed by a mass increment of  $\Delta m/z n \times 68$  from the main metabolite ( $m/z$  236) were characterized in the corresponding ion chromatograms by HPLC-negative ESI-MS analysis. Since the repetitive unit in polyisoprene has a molecular mass of 68 Da, it can be safely assumed that the minor

products have the same functional groups as the main metabolite ( $m/z$  236) and that the only structural difference is the number of isoprene units,  $-\text{CH}_2-\text{C}(\text{CH}_3)=\text{CH}-\text{CH}_2-$ , incorporated between the terminal functional groups. The concentration of these oligomers was 1 to 2 orders of magnitude lower than that of ODTD. ODTD thus apparently is the principal end product of the RoxA-catalyzed cleavage of polyisoprene. These findings are consistent with the assumption that RoxA cleaves polyisoprene oxidatively at regular intervals, cutting off three isoprene units per step. Our results are in good agreement with previous findings of Tsuchii and coworkers, who identified a whole range of related oligomers with more than 100 isoprene units in addition to ODTD (17, 18). However, these results were obtained with undefined culture fluid, and it was not known how many enzymes were involved. Presumably, the concentration and/or activity of RoxA in the culture fluid in the experiments of Tsuchii et al. was not high enough to allow complete degradation of polyisoprene.

Trypsin fingerprint analysis of RoxA confirmed that RoxA is identical to the product of a recently cloned gene assumed to be involved in rubber degradation (8). The presence of a functional signal sequence in the cloned gene was in agreement with the extracellular localization of RoxA. Comparison of the amino acid sequence of RoxA deduced from the gene with the database revealed the presence of several related amino acid sequences of hypothetical proteins. In addition to related sequences found previously (8), sequences coding for a hypothetical protein of *Pirellula* sp. (gi32473529), hypothetical protein

TABLE 3. Inhibitors of RoxA<sup>a</sup>

Substance	Concn	Relative activity (%)
None		100
Reducing SH reagent		
Dithiothreitol	5 mM	6
$\beta$ -Mercaptoethanol	5 mM	<2
Alkylating reagents		
<i>N</i> -Ethylmaleimide	10 mM	31
<i>N</i> -Ethylmaleimide	1 mM	47
<p><i>p</i>-Chloromercurobenzoate</p>	10 mM	74
	1 mM	90
Chelators		
$\alpha,\alpha$ -Bipyridyl	10 mM	15
Tiron	10 mM	73
Tiron	1 mM	79
EDTA	10 mM	110
EDTA	5 mM	98
Detergents:		
SDS	0.5%	<2
Tween 80	0.5%	<2
Sodium cholate	0.5%	32
Triton X-100	0.5%	<2
Plysurf A210G	0.5%	<2
CHAPS <sup>b</sup>	0.5%	<2
1- <i>S</i> -Octyl- $\beta$ -D-thioglucopyranoside	0.5%	<2
Octyl- $\beta$ -glucoside	0.5%	<2

<sup>a</sup> Activities were calculated from the areas of the 14.8-min peak in the HPLC analysis (for details see the legend to Fig. 6). For inhibition of RoxA by cyanide,  $N_2$ , CO, and catalase see Fig. 7.

<sup>b</sup> CHAPS, 3-[(3-cholamidopropyl)-dimethylammonia]-1-propanesulfonate.

Bd3821 of *Bdellovibrio bacteriovorus* (gi42525145), and some hypothetical proteins deduced from sequences of environmental samples were found. A function has not been identified for any of the related proteins; however, the RoxA sequence and the most closely related sequences found in the database contain a conserved sequence motif, MauG of cytochrome *c* peroxidases, which is consistent with the oxidative function of RoxA in *Xanthomonas* sp. RoxA contained approximately 2 mol of heme per mol of protein. This result is in agreement with data for the corresponding gene *roxA* that postulate the presence of two covalently bound heme molecules per molecule of RoxA (8). Experiments to extract heme with solvents (acid ethyl acetate or acid methyl ethyl ketone) from purified RoxA were not successful (unpublished observations), confirming the covalent binding of heme to the protein. The inhibition of RoxA by cyanide and carbon monoxide and the shift of the Soret band (406 nm) upon reduction with dithionite (418 nm) or upon incubation with synthetic rubber (409 nm) are in agreement with the involvement of heme in the reaction. Interestingly, addition of catalase did not inhibit RoxA-catalyzed cleavage of NR, suggesting that (free) hydrogen peroxide is not involved in the reaction. The negative results for RoxA in the peroxidase assay are in agreement with the latter finding. Cleavage of polyisoprene by purified RoxA was strictly dependent on the presence of molecular oxygen. In conclusion, RoxA is a novel type of oxygenase. Future experiments will address the function of heme in the reaction mechanism.

#### ACKNOWLEDGMENTS

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

We gratefully acknowledge J. Armbruster (Universität Stuttgart-Hohenheim) for assistance with the HPLC-MS and gas chromatography-MS techniques and for helpful discussions. We also thank M. Priemer and A. Nordheim (Universität Tübingen) for the trypsin fingerprint, matrix-assisted laser desorption ionization—time of flight, and HPLC-MS analyses of RoxA, as well as E. Chua, A. Ikram, and H. Y. Yeang (Rubber Research Institute of Malaysia) for providing purified *Hevea* latex.

#### REFERENCES

1. Arciero, D. M., and A. B. Hopper. 1994. A di-heme cytochrome *c* peroxidase from *Nitrosomonas europaea* catalytically active in both the oxidized and half-reduced states. *J. Biol. Chem.* **269**:11878–11886.
2. Bode, H., K. Kerkhoff, and D. Jendrossek. 2001. Bacterial degradation of natural and synthetic rubber. *Biomacromolecules* **2**:295–303.
3. Bode, H. B., A. Zecek, K. Plüchhahn, and D. Jendrossek. 2000. Physiological and chemical investigations on microbial degradation of synthetic poly(*cis*-1,4-isoprene). *Appl. Environ. Microbiol.* **66**:3680–3685.
4. Bradford, M. M. 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.
5. Falk, J. E. 1964. *Porphyryns and metalloporphyryns*. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands.
6. Gill, S. C., and P. H. Hippel. 1989. Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data. *Anal. Biochem.* **182**:319–326.
7. Heisey, R. M., and S. Papadatos. 1995. Isolation of microorganisms able to metabolize purified rubber. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**:3092–3097.
8. Jendrossek, D., and S. Reinhardt. 2003. Sequence analysis of a gene product synthesized by *Xanthomonas* sp. during growth on natural rubber latex. *FEMS Microbiol. Lett.* **224**:61–65.
9. Jendrossek, D., G. Tomasi, and R. M. Kroppenstedt. 1997. Bacterial degradation of natural rubber: a privilege of actinomycetes? *FEMS Microbiol. Lett.* **150**:179–188.
10. Katz, I., and M. Keeney. 1966. Quantitative micro determination and isolation of plasmalogen aldehydes as 2,4-dinitrohydrazones. *J. Lipid Res.* **7**:170–174.
11. Linos, A., M. M. Berekka, A. Steinbüchel, K. K. Kim, and R. M. Kroppenstedt. 2002. *Gordonia westfalica* sp. nov., a novel rubber-degrading actinomycete. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **52**:1133–1139.
12. Linos, A., and A. Steinbüchel. 2001. Biodegradation of natural and synthetic rubbers, p. 321–359. *In* T. Koyama and A. Steinbüchel (ed.), *Biopolymers*, vol. 2. Isoprenoids. Wiley-VCH, Weinheim, Germany.
13. Linos, A., A. Steinbüchel, C. Sproer, and R. M. Kroppenstedt. 1999. *Gordonia polyisoprenivorans* sp. nov., a rubber-degrading actinomycete isolated from an automobile tire. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **49**:1785–1791.
14. Mason, M. G., A. S. Ball, B. J. Reeder, G. Silkstone, P. Nicholls, and M. T. Wilson. 2001. Extracellular heme peroxidases in actinomycetes: a case of mistaken identity. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**:4512–4519.
15. Pettigrew, G. W., and G. R. Moore. 1987. *Cytochromes c: biological aspects*. Springer Verlag, Berlin, Germany.
16. Söhngen, N. L., and J. G. Fol. 1914. Die Zersetzung des Kautschuks durch Mikroben. *Zentbl. Bakteriol. Parasitenkd. Infektkrankh. Hyg. Abt. I Orig.* **40**:87–98.
17. Tsuchii, A., T. Suzuki, and K. Takeda. 1985. Microbial degradation of natural rubber vulcanisates. *Appl. Environ. Microbiol.* **50**:965–970.
18. Tsuchii, A., and K. Takeda. 1990. Rubber-degrading enzyme from a bacterial culture. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**:269–274.



## Appendix 2

# Heme-Dependent Rubber Oxygenase RoxA of *Xanthomonas* sp. Cleaves the Carbon Backbone of Poly(*cis*-1,4-Isoprene) by a Dioxygenase Mechanism

Reinhard Braaz,<sup>1</sup> Wolfgang Armbruster,<sup>2</sup> and Dieter Jendrossek<sup>1\*</sup>

*Institut für Mikrobiologie, Universität Stuttgart,<sup>1</sup> and Institut für Lebensmittelchemie, Universität Hohenheim,<sup>2</sup> Stuttgart, Germany*

Received 29 November 2004/Accepted 2 December 2004

Oxidative cleavage of poly(*cis*-1,4-isoprene) by rubber oxygenase RoxA purified from *Xanthomonas* sp. was investigated in the presence of different combinations of  $^{16}\text{O}_2$ ,  $^{18}\text{O}_2$ ,  $\text{H}_2^{16}\text{O}$ , and  $\text{H}_2^{18}\text{O}$ . 12-Oxo-4,8-dimethyltrideca-4,8-diene-1-al (ODTD;  $m/z$  236) was the main cleavage product in the absence of  $^{18}\text{O}$ -compounds. Incorporation of one  $^{18}\text{O}$  atom in ODTD was found if the cleavage reaction was performed in the presence of  $^{18}\text{O}_2$  and  $\text{H}_2^{16}\text{O}$ . Incubation of poly(*cis*-1,4-isoprene) (with RoxA) or of isolated unlabeled ODTD (without RoxA) with  $\text{H}_2^{18}\text{O}$  in the presence of  $^{16}\text{O}_2$  indicated that the carbonyl oxygen atoms of ODTD significantly exchanged with oxygen atoms derived from water. The isotope exchange was avoided by simultaneous enzymatic reduction of both carbonyl functions of ODTD to the corresponding dialcohol (12-hydroxy-4,8-dimethyltrideca-4,8-diene-1-ol (HDTD;  $m/z$  240) during RoxA-mediated *in vitro* cleavage of poly(*cis*-1,4-isoprene). In the presence of  $^{18}\text{O}_2$ ,  $\text{H}_2^{16}\text{O}$ , and alcohol dehydrogenase/NADH, incorporation of two atoms of  $^{18}\text{O}$  into the reduced metabolite HDTD was found ( $m/z$  244), revealing that RoxA cleaves rubber by a dioxygenase mechanism. Based on the labeling results and the presence of two hemes in RoxA, a model of the enzymatic cleavage mechanism of poly(*cis*-1,4-isoprene) is proposed.

Natural rubber (NR) is a biopolymer that can be synthesized by many plants and some fungi. The most widespread source of natural rubber is the rubber tree (*Hevea brasiliensis*) that has been commercially exploited for more than 100 years by cultivating and tapping rubber trees. Molecules of NR (*H. brasiliensis*) consist of three *trans*-isoprene and several hundred to thousands of *cis*-isoprene units. Despite the development of chemosynthetic rubbers, NR is still a necessary raw material for products such as tires, latex gloves, condoms, seals, and many other things.

Many reports on the isolation and characterization of rubber-degrading microorganisms have been published (4, 6, 8, 12, and references cited therein), but the basic molecular mechanism by which poly(*cis*-1,4-isoprene) is degraded is unknown. Recently, we initiated analysis of rubber degradation by *Xanthomonas* sp. This bacterium produces translucent clearing zones during growth on solid media containing opaque latex fluid as the carbon source (12). We purified an extracellular heme-containing protein from latex-grown culture fluid of *Xanthomonas* sp. and characterized its gene (rubber oxygenase, *roxA*) (5). Purified RoxA was able to cleave poly(*cis*-1,4-isoprene) *in vitro* to 12-oxo-4,8-dimethyltrideca-4,8-diene-1-al (ODTD) as the major cleavage product and a series of related low-molecular-weight products differing from ODTD only by the number of isoprene units as minor metabolites (2). In this contribution, we continued our studies on RoxA and analyzed the oxidative cleavage reaction of RoxA by  $^{18}\text{O}$ -labeling experiments.

\* Corresponding author. Mailing address: Institut für Mikrobiologie, Universität Stuttgart, Allmandring 31, 70550 Stuttgart, Germany. Phone: 49-711-685-5483. Fax: 49-711-685-5725. E-mail: dieter.jendrossek@imb.uni-stuttgart.de.

## MATERIALS AND METHODS

**Bacteria, media, and culture conditions.** *Xanthomonas* sp. (12) was grown at 30°C in nutrient broth or in a mineral salts medium with 0.2% purified rubber latex as recently described (2). For isolation of RoxA, 24 250-ml cultures were grown for 9 days at 30°C. Purification of RoxA was performed from the combined cell-free culture fluid.

**Purification of rubber oxygenase (RoxA).** The enzyme was purified at 5°C using a fast-performance liquid chromatography system consisting of an LCC 500 controller, a 500 pump, a UV-1 monitor, a Rec-482 recorder, and a FRAC autosampler (Pharmacia, Uppsala, Sweden). Cell-free supernatant of latex-grown *Xanthomonas* sp. cells was concentrated by ultrafiltration (30-kDa cutoff) and passed through a Q-Sepharose column (HP HR16/10; Pharmacia) pre-equilibrated with basic buffer (20 mM 1,3-diaminopropane/HCl [pH = 10.5]) at a flow rate of 1 ml min<sup>-1</sup>. RoxA was eluted from the column with a linear gradient of 0 to 0.5 M NaCl in basic buffer at approximately 250 mM. Fractions showing the characteristic absorption spectrum of RoxA (2) were pooled and, after desalting and changing the buffer by diafiltration (30-kDa cutoff), applied to a hydroxyapatite column (CHT 5-I; Bio-Rad) pre-equilibrated with 5 mM phosphate buffer (pH = 6.8) at a flow rate of 2.0 ml min<sup>-1</sup>. During elution with a linear phosphate buffer gradient up to 500 mM fractions with the characteristic spectrum of RoxA were eluted at approximately 20 mM. These fractions were pooled and passed through a Superdex 200 column (Superdex 200 Prep-grade; Pharmacia) and eluted with phosphate buffer (20 mM, pH = 7.0). Purified RoxA was stored at -20°C.

**Assay of RoxA.** The following conditions were used for product high-performance liquid chromatography (HPLC) analysis of RoxA-catalyzed rubber degradation. The reaction mixture contained 100 µl of purified RoxA (10 to 15 µg/ml), rubber latex (4 µl of a 35% [wt/vol] emulsion), and bis-Tris buffer (200 mM, pH 7.0) in a total volume of 1 ml. The reaction was carried out at 40°C for 3 or 4 h in a test tube closed with Parafilm. The mixture was extracted with ethyl acetate or diethyl ether, dried, dissolved in 100 to 200 µl of methanol, and then subjected to HPLC analysis and/or to carbonyl content determination. Mixtures without RoxA and with heat-inactivated RoxA (10 min, 95°C) served as negative controls. One unit of RoxA activity corresponds to 1 µmol of generated carbonyl function per min.

**Determination of carbonyl content.** The carbonyl content of rubber degradation products was determined after formation of 2,4-dinitrophenylhydrazones (in hexane) as described in reference 7 using a molar absorptance coefficient of 21,500 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> at 338 nm.

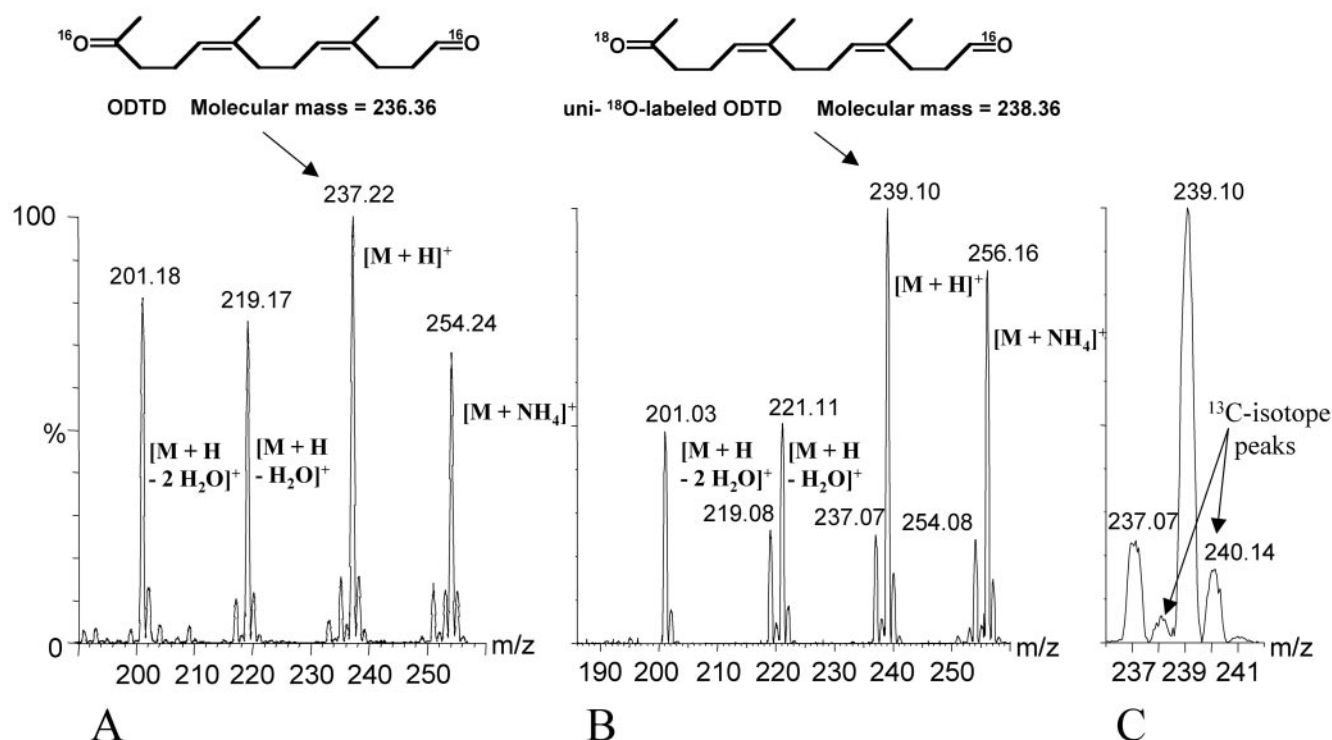


FIG. 1. HPLC-ESI<sup>+</sup>-MS analysis of latex degradation products formed by reaction with RoxA in <sup>16</sup>O<sub>2</sub> (A) and <sup>18</sup>O<sub>2</sub> (B, C) atmospheres. (A) RoxA was incubated with latex for 3 h at 40°C, pH 7.0, in a <sup>16</sup>O<sub>2</sub> atmosphere and in H<sub>2</sub><sup>16</sup>O buffer. Degradation products were extracted with ethyl acetate, dried, evaporated, dissolved in methanol, and loaded onto a C<sub>8</sub> reverse-phase HPLC column. The eluate was monitored by ESI<sup>+</sup>-MS, and the figure shows the average mass spectrum summed across the 14.8-min peak representing ODTD (eight scans). (B) The same experiment as described for panel A was performed, except that the reaction was carried out in an <sup>18</sup>O<sub>2</sub> atmosphere and in H<sub>2</sub><sup>16</sup>O. (C) Enlargement of panel B around *m/z* 239. Arrows in the enlargement indicate the respective <sup>13</sup>C isotope ions.

**Labeling experiments with <sup>18</sup>O<sub>2</sub> and H<sub>2</sub><sup>18</sup>O.** Isotope-labeling experiments were performed using <sup>18</sup>O<sub>2</sub> (97%; Sigma-Aldrich, Schnellendorf, Germany) and H<sub>2</sub><sup>18</sup>O (95%; Euriso-top, Saarbrücken, Germany). For the <sup>18</sup>O<sub>2</sub>-labeling experiment, rubber latex (4 μl of a 35% [wt/vol] emulsion) in bis-Tris buffer (896 μl, 200 mM, pH 7.0) and purified RoxA (100 μl, 10 to 15 μg/ml) were transferred into separate 10-ml glass tubes and sealed with rubber stoppers. Oxygen was removed by repeated evacuation and flushing with nitrogen gas. The two anaerobic samples were combined under anaerobic conditions, and <sup>18</sup>O<sub>2</sub> was added to a final concentration of about 20% (vol/vol). The reaction mixture was incubated at 40°C for 3 h, and the degradation products were extracted and analyzed as described above. For H<sub>2</sub><sup>18</sup>O-labeling experiments 100 μl of purified RoxA (10 to 15 μg/ml in H<sub>2</sub><sup>16</sup>O-buffer), rubber latex (4 μl of a 35% [wt/vol] emulsion in H<sub>2</sub><sup>16</sup>O), and 896 μl of H<sub>2</sub><sup>18</sup>O-bis-Tris buffer (200 mM, pH 7.0) were combined (the final volume ratio of H<sub>2</sub><sup>18</sup>O to H<sub>2</sub><sup>16</sup>O was ~85 to 15), incubated for 3 h at 40°C, extracted with ethyl acetate, and analyzed as described above. To assay the isotope exchange of (<sup>16</sup>O)-ODTD with water (H<sub>2</sub><sup>18</sup>O), HPLC-purified ODTD was dried with a rotary evaporator and dissolved in water (H<sub>2</sub><sup>18</sup>O/H<sub>2</sub><sup>16</sup>O ratio = 85:15). After incubation for 3 h at 40°C, the sample was extracted and analyzed as described above.

**Enzymatic reduction of ODTD to 12-hydroxy-4,8-dimethyl-trideca-4,8-diene-1-ol (HDTD).** The reaction mixture for enzymatic reduction of ODTD contained 450 μl of purified RoxA (10 to 15 μg/ml), rubber latex (18 μl of a 35% [wt/vol] emulsion), glutathione (12 mg; reduced), NADH (50 mg), horse liver alcohol dehydrogenase (HL-ADH; 80 μl, 10 mg/ml, 2.8 U/mg), and bis-Tris buffer (200 mM, pH 7.0) in a total volume of 4.5 ml. The reaction was carried out at 40°C for 3 h in a test tube closed with Parafilm, extracted, and analyzed as described above. For the combined <sup>18</sup>O<sub>2</sub>-labeling and reduction reaction, HL-ADH, RoxA, and the other components were transferred to two separate 10-ml glass tubes and sealed with rubber stoppers. Oxygen was removed by repeated evacuation and flushing with nitrogen gas. The two anaerobic samples were combined in the absence of oxygen, and <sup>18</sup>O<sub>2</sub> gas was added to about 20% (vol/vol).

**Analysis of reaction products by HPLC and HPLC-MS.** Degradation products were separated by HPLC analysis and detected at 210 nm (Chromeleon Chro-

matography Data Systems 4.38 equipped with Dionex UV-Vis detector UVD 170S/340S, Dionex pump P 580, and Dionex autosampler Gina 50; Dionex, Isstein, Germany). Chromatographic conditions were as follows: column, Grom-Sil 100 RP-8 (125 by 4 mm; particle size, 5 μm; Grom, Herrenberg, Germany); column temperature, 25°C; flow rate, 0.7 ml/min; injection volume, 20 μl; eluent A, anhydrous methanol-H<sub>2</sub>O (50/50, vol/vol); eluent B, anhydrous methanol; gradient, % B (*t* [min]) 0(0) - 0(5) - 100(20). Liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) was run on an HP1100 HPLC system (Hewlett Packard, Waldbronn, Germany) comprising an HP1100 autosampler, an HP1100 gradient pump, an HP1100 column thermoregulator, and an HP1100 diode array detector module coupled to a Micromass VG Platform II quadrupole mass spectrometer (Micromass, Manchester, United Kingdom) equipped with an electrospray ionization (ESI) interface. ESI<sup>+</sup>-MS parameters were as follows: source temperature, 120°C; capillary, 3.5 V; HV lens, 0.5 kV; cone, 30 V; full scan range, *m/z* 120 to 450. Samples were resolved with the same column and mobile phase as described above. The eluent was split 10:1 before being introduced into the ion source.

## RESULTS

*Xanthomonas* sp. was grown on latex for 9 days at 30°C, and extracellular rubber oxygenase RoxA was purified using a purification protocol that had been optimized compared to our previous procedure (2). Five milligrams of purified RoxA was obtained from ~6 liters of culture. RoxA after hydroxyapatite chromatography was homogeneous as revealed by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis analysis (not shown). In some experiments it was necessary to include an additional purification step on Superdex 200. A solution of concentrated RoxA had a strong reddish color, and the char-

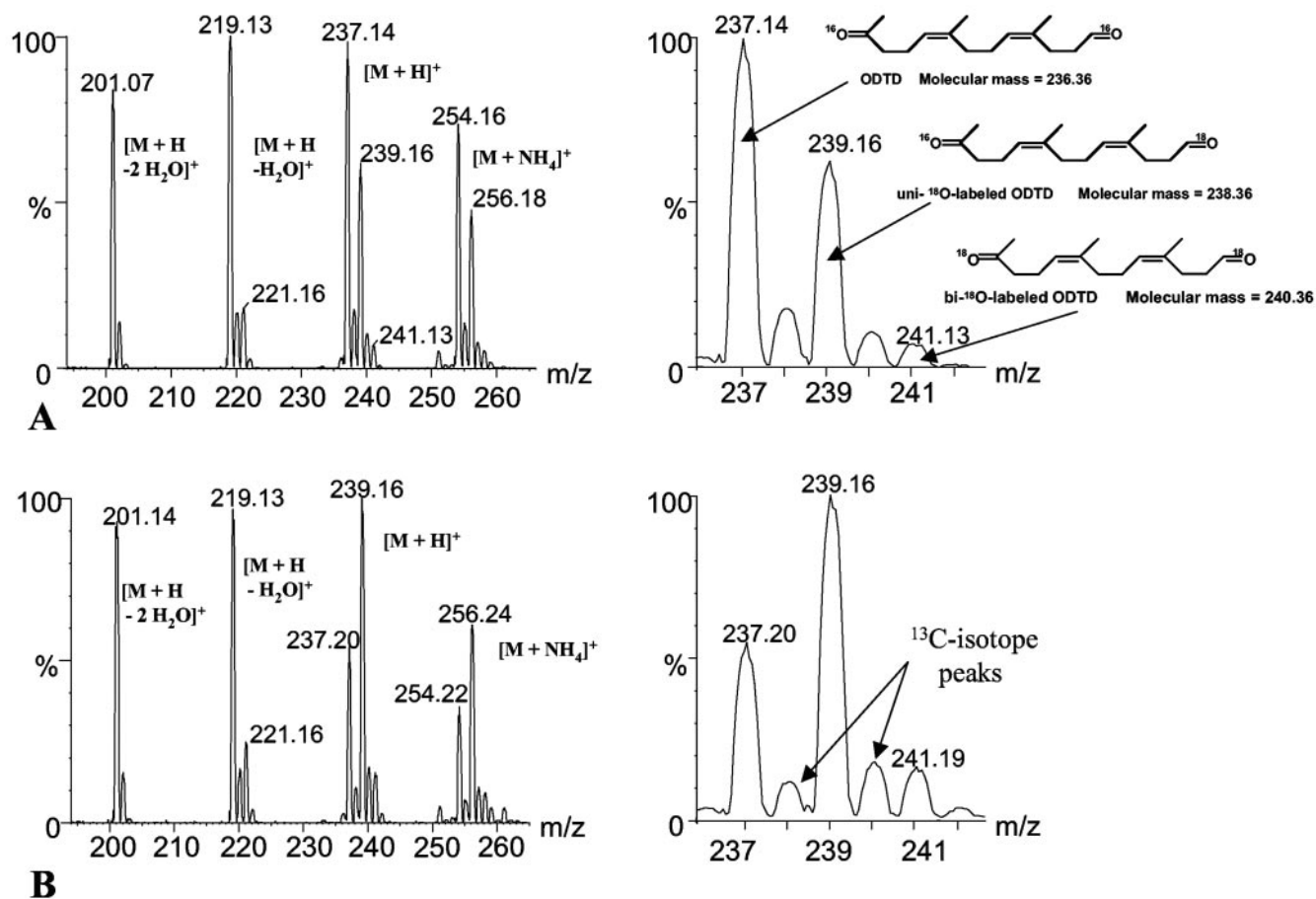


FIG. 2. HPLC-ESI<sup>+</sup>-MS analysis of latex degradation products formed by reaction with RoxA in  $\text{H}_2^{18}\text{O}-^{16}\text{O}_2$  (A) and HPLC-ESI<sup>+</sup>-MS analysis of purified ODTD after incubation in  $\text{H}_2^{18}\text{O}-^{16}\text{O}_2$  (B). Degradation products were prepared and separated by HPLC as described in the legend to Fig. 1. The average mass spectrum of the 14.8-min peak (ODTD) is shown (A). Unlabeled ODTD was purified by HPLC and incubated with  $\text{H}_2^{18}\text{O}-\text{H}_2^{16}\text{O}$  (85:15, vol/vol) for 3 h at 40°C and then prepared and separated by HPLC as described in the legend to Fig. 1. The average mass spectrum of the 14.8-min peak (ODTD) is shown (B). The right parts of the figures are enlargements of the respective  $^{13}\text{C}$  isotope ions.

acteristic absorption peaks for heme were present as described recently (2). To determine the specific activity of purified RoxA, a quantitative assay of poly(*cis*-1,4-isoprene) cleavage products was performed by hydrazone derivatization. A linear dependence of the resulting hydrazone concentration on the amount of RoxA was found in the range of 0.5 to 2.5  $\mu\text{g}$  of purified RoxA/ml. At higher concentrations of RoxA, a saturation kinetic was observed (not shown). A specific activity of 300 mU/mg was determined for purified RoxA by this method.

A standard experiment was set up that was used for all experiments described below. About 1  $\mu\text{g}$  of purified RoxA was inoculated with latex in buffer for 3 h at 40°C (for details, see Materials and Methods). The resulting low-molecular-weight products were extracted with ethyl acetate and separated by HPLC using a  $\text{C}_8$  reverse-phase column. One major peak at 14.8 min was obtained in all experiments and subjected to ESI-MS. Using  $^{16}\text{O}_2$  and  $\text{H}_2^{16}\text{O}$ , ODTD ( $m/z$  236) was obtained as the main product. In ESI<sup>+</sup> mode, unmodified ODTD shows characteristic mass peaks for the quasimolecular ion  $[\text{M} + \text{H}]^+$   $m/z$  237 and the corresponding ammonium adduct  $[\text{M} + \text{NH}_4]^+$   $m/z$  254 and signals for the loss of one and

two water molecules ( $[\text{M} + \text{H} - \text{H}_2^{16}\text{O}]^+$   $m/z$  219,  $[\text{M} + \text{H} - 2 \text{H}_2^{16}\text{O}]^+$   $m/z$  201), respectively (Fig. 1A).

**Cleavage of poly(*cis*-1,4-isoprene) in the presence of  $^{18}\text{O}_2$  and  $\text{H}_2^{16}\text{O}$ .** Latex was cleaved by RoxA in the presence of  $^{18}\text{O}_2$  and  $\text{H}_2^{16}\text{O}$  for 3 h at 40°C, and ODTD was isolated by extraction with ethyl acetate and HPLC. When ODTD of the  $^{18}\text{O}_2$  experiment was analyzed by ESI<sup>+</sup>-MS (Fig. 1B), the same mass peaks as in the  $^{16}\text{O}_2/\text{H}_2^{16}\text{O}$  experiments at  $m/z$  values of 237, 254, 219, and 201 were found. However, additional signals with higher intensity appeared at  $m/z$  239, 256, and 221, respectively, i.e., 2 Da higher than the previous signals for the ODTD ions  $[\text{M} + \text{H}]^+$ ,  $[\text{M} + \text{NH}_4]^+$ , and  $[\text{M} + \text{H} - \text{H}_2\text{O}]^+$ . Apparently, these mass peaks corresponded to ODTD or its respective variant ions in which one  $^{16}\text{O}$  atom had been replaced by an  $^{18}\text{O}$  atom. Since the  $[\text{M} + \text{H} - 2 \text{H}_2\text{O}]^+$  ions of ODTD did not contain any oxygen anymore, only the peak at  $m/z$  of 201 appeared. No evidence for the incorporation of two oxygen atoms ( $m/z$  values of 241) was obtained even if the exposure time of latex to RoxA in the presence of  $^{18}\text{O}_2$  was varied from 1 to 5 h (expansion in Fig. 1C). The experiments described above suggest that only one atom of oxygen is incorporated

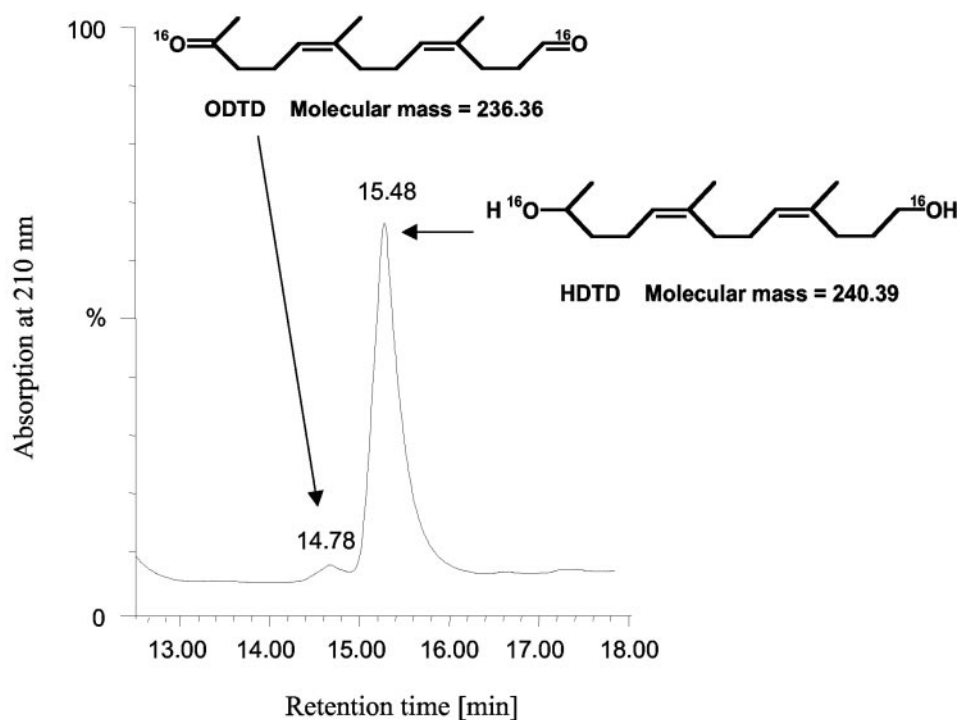


FIG. 3. HPLC analysis of HL-ADH/NADH-reduced latex degradation products formed by reaction with RoxA in an  $^{16}\text{O}_2$  atmosphere. Degradation products were prepared in the presence of HL-ADH and NADH as described in Materials and Methods and separated by HPLC as described in the legend to Fig. 1. The structural formulas corresponding to the 14.8- and 15.5-min peaks as revealed by ESI<sup>+</sup>-MS (see Fig. 4) are indicated.

from  $^{18}\text{O}_2$  into the metabolite ODTD and that the other oxygen atom may be derived from water.

**Cleavage of poly(*cis*-1,4-isoprene) in the presence of  $^{16}\text{O}_2$  and  $\text{H}_2^{18}\text{O}$ .** The same experiment as described above was performed in normal air ( $^{16}\text{O}_2$ ) but in the presence of  $\text{H}_2^{18}\text{O}$ . Since RoxA had been purified in  $\text{H}_2^{16}\text{O}$ -containing buffer, the final ratio of  $\text{H}_2^{18}\text{O}$  to  $\text{H}_2^{16}\text{O}$  in the complete assay mixture was about 85 to 15. If water is added during the cleavage reaction, one would expect ODTD-specific signals at  $m/z$  239 corresponding to  $\text{H}_2^{18}\text{O}$  added and at  $m/z$  237 corresponding to the addition of  $\text{H}_2^{16}\text{O}$ . No signal should occur at  $m/z$  241. When the  $m/z$  values for the isolated 14.8-min HPLC peak (ODTD) were determined, two major peaks at  $m/z$  237 and 239 but also a clearly detectable minor peak at  $m/z$  241 were found. Additionally, the respective variant ions (loss of one or two water molecules, ammonium adduct ion) were obtained, all of which corresponded to unlabeled, uni- $^{18}\text{O}$ -labeled and bi- $^{18}\text{O}$ -labeled ODTD ( $[\text{M} + \text{H}]^+$ ), respectively (Fig. 2A).

**Assay of isotope ( $^{16}\text{O}$ ) exchange of isolated ODTD with water ( $\text{H}_2^{18}\text{O}$ ).** The unexpected detection of ODTD ions at  $m/z$  241 in addition to ions at  $m/z$  237 and 239 after cleavage of poly(*cis*-1,4-isoprene) in the presence of  $^{16}\text{O}_2/\text{H}_2^{18}\text{O}$  can be explained if one assumes that carbonyl atoms of ODTD are able to exchange oxygen with oxygen from solvent water. To find definite proof for this exchange, unlabeled  $^{16}\text{O}$ -ODTD was isolated by HPLC after RoxA-mediated cleavage of poly(*cis*-1,4-isoprene) and was incubated for 3 h in the absence of RoxA but in the presence of  $^{18}\text{O}$ -labeled water ( $\text{H}_2^{18}\text{O}/\text{H}_2^{16}\text{O}$  ratio = 85:15) and analyzed by ESI-MS. As shown in Fig. 2B,

the typical mass peaks of unlabeled and uni- $^{18}\text{O}$ -labeled ODTD and traces of bi- $^{18}\text{O}$ -labeled ODTD ( $[\text{M} + \text{H}]^+$ ,  $[\text{M} + \text{NH}_4]^+$ ,  $[\text{M} + \text{H} - \text{H}_2\text{O}]^+$ , and  $[\text{M} + \text{H} - 2\text{H}_2\text{O}]^+$  ions) appeared in the ESI<sup>+</sup> mass spectrum. Apparently, one oxygen atom of ODTD rapidly exchanged with oxygen of water (major peak at  $m/z$  239) while the other oxygen atom slowly exchanged with water (minor peak at  $m/z$  241). These results indicate that the interpretation of the  $^{18}\text{O}_2/\text{H}_2^{16}\text{O}$  experiment (Fig. 1B and C), which suggested that only one oxygen atom of  $^{18}\text{O}_2$  was incorporated into ODTD, apparently is not correct because of a rapid exchange of at least one  $^{18}\text{O}$  atom with water, as shown in the control experiment.

**Cleavage of poly(*cis*-1,4-isoprene) in the presence of  $^{18}\text{O}_2$  and  $\text{H}_2^{16}\text{O}$  and fixation of isotope label by in situ reduction of ODTD to HDTD.** To overcome the putative artifacts by isotope exchange, it was necessary to convert the carbonyl oxygen atoms of ODTD immediately after cleavage of poly(*cis*-1,4-isoprene) into a more stable form that does not undergo isotope exchange. Alcohol functions are much more stable with respect to isotope exchange than carbonyl functions (3, 10). We therefore attempted to convert ODTD to the corresponding dialcohol (HDTD). This was achieved by the addition of NADH and HL-ADH directly to the cleavage reaction of poly(*cis*-1,4-isoprene) by RoxA (see Materials and Methods). When the products of RoxA-mediated cleavage of poly(*cis*-1,4-isoprene) in the presence of  $^{16}\text{O}_2$ ,  $\text{H}_2^{16}\text{O}$ , and NADH/HL-ADH were separated by HPLC, the typical ODTD peak at 14.8 min was strongly reduced and one additional peak at 15.5 min appeared (Fig. 3). These peaks did not appear in the absence

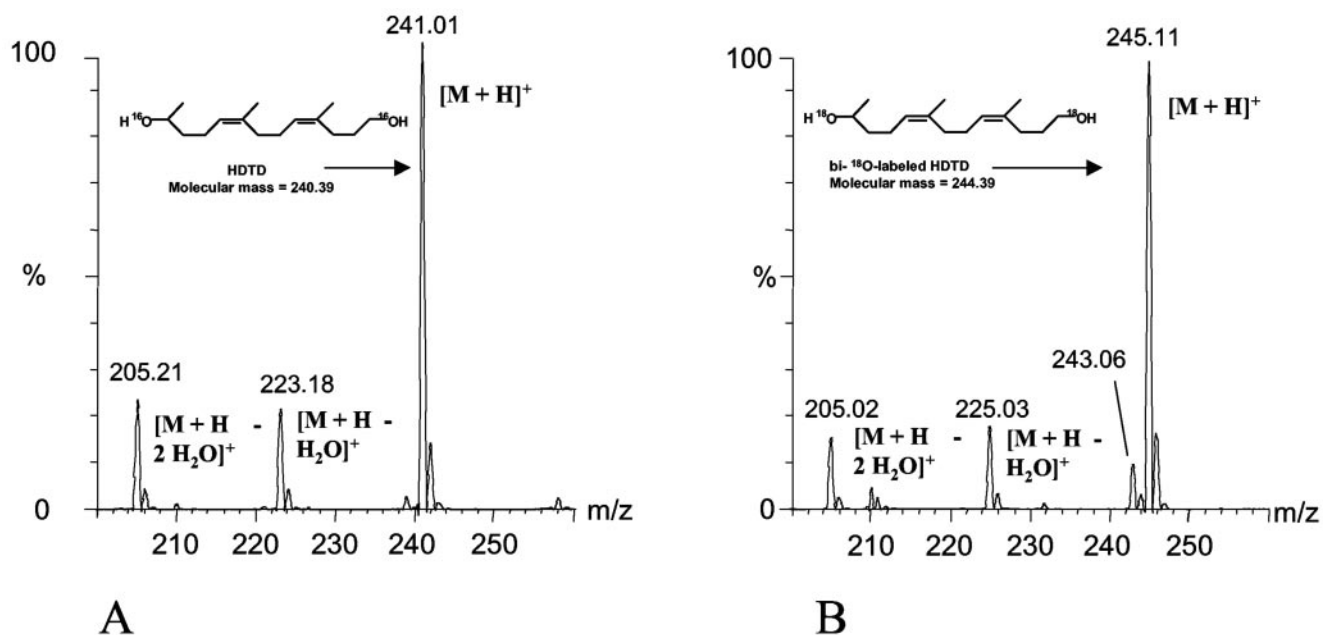


FIG. 4. HPLC-ESI<sup>+</sup>-MS analysis of HL-ADH/NADH-reduced latex degradation products formed by reaction with RoxA in an <sup>16</sup>O<sub>2</sub> or an <sup>18</sup>O<sub>2</sub> atmosphere. Degradation products were prepared and separated by HPLC as described in the legend to Fig. 1. (A) Average mass spectrum of the 15.5-min peak of HDTD generated in a <sup>16</sup>O<sub>2</sub> atmosphere-H<sub>2</sub><sup>16</sup>O. (B) Average mass spectrum of the 15.5-min peak HDTD generated in an <sup>18</sup>O<sub>2</sub> atmosphere-H<sub>2</sub><sup>16</sup>O.

of RoxA. ESI<sup>+</sup>-MS analysis of the 14.8-min peak revealed *m/z* values undistinguishable from ODTD (*m/z* 237 plus the respective fragment and adduct ions; data not shown). ESI<sup>+</sup>-MS analysis of the 15.5-min peak showed *m/z* values of 241, 223, and 205 that correspond well to the calculated *m/z* values of protonated HDTD [M + H]<sup>+</sup> and the corresponding [M + H - H<sub>2</sub><sup>16</sup>O]<sup>+</sup> and [M + H - 2 H<sub>2</sub><sup>16</sup>O]<sup>+</sup> ions (Fig. 4A). The ammonium adduct ions [M + NH<sub>4</sub>]<sup>+</sup> were present only at very low intensities. We concluded that the majority of RoxA-catalyzed cleavage product ODTD is converted to HDTD in the presence of HL-ADH and NADH.

The RoxA-mediated cleavage reaction of poly(*cis*-1,4-isoprene) was repeated in the presence of <sup>18</sup>O<sub>2</sub>/NADH/HL-ADH/H<sub>2</sub><sup>16</sup>O, and the isolated 15.5-min HPLC peak corresponding to the double-reduced metabolite (HDTD) was subjected to ESI<sup>+</sup>-MS analysis. Three major mass peaks at *m/z* 245, 225, and 205 and a minor peak at *m/z* 243 were obtained (Fig. 4B). These peaks perfectly correspond to the <sup>18</sup>O-bilabeled HDTD ([M + H]<sup>+</sup>) and the corresponding [M + H - H<sub>2</sub><sup>18</sup>O]<sup>+</sup> and [M + H - 2 H<sub>2</sub><sup>18</sup>O]<sup>+</sup> ions. The minor peak at *m/z* 243 apparently corresponds to traces of uni-<sup>18</sup>O-labeled protonated HDTD. In conclusion, both oxygen atoms of molecular oxygen are incorporated into the product of RoxA-catalyzed cleavage of poly(*cis*-1,4-isoprene).

## DISCUSSION

The recently described rubber-oxidizing enzyme RoxA cleaves poly(*cis*-1,4-isoprene) to ODTD as the principal degradation product by an unknown oxidative reaction mechanism (2, 5). Since the double bonds of poly(*cis*-1,4-isoprene) are cleaved by incorporation of oxygen, a monooxygenase- or di-

oxygenase-based reaction mechanism is possible. In chickens, cleavage of β-carotene, yielding two aldehydes, is catalyzed by a monooxygenase (13) whereas the same compound is cleaved by a dioxygenase in *Arabidopsis* sp. (1). Tsuchii and Takeda (12) suggested a dioxygenase cleavage mechanism of poly(*cis*-1,4-isoprene) based on preliminary experiments using cell-free culture fluid of *Xanthomonas* sp. Linos and Steinbüchel (9) assumed a common oxidative cleavage mechanism for all types of rubber-degrading organisms and proposed a metal-dependent dioxygenase mechanism; the basis of this assumption was the experiments of Tsuchii and coworkers. Recently, a gene coding for a "latex clearing protein, *lcp*," was found to be involved in rubber utilization by *Streptomyces* sp. (11).

A monooxygenase-based mechanism of poly(*cis*-1,4-isoprene) cleavage appears not very likely since RoxA is an extracellular enzyme and functions in vitro without any cofactors such as NADH or related compounds. However, experimental data that confirmed the presence of a dioxygenase mechanism or excluded a monooxygenase mechanism did not exist. Due to possible exchange of carbonyl oxygen atoms in the presence of water, care has to be taken to avoid misinterpretation of labeling data (3, 10). Indeed, experiments in which we show the incorporation of <sup>18</sup>O from H<sub>2</sub><sup>18</sup>O into isolated ODTD (Fig. 2B) confirm that a rapid exchange of at least one oxygen atom (probably the aldehyde oxygen atom of ODTD) with solvent water occurs. Therefore, it was necessary to develop a combined enzyme assay for RoxA-mediated cleavage of poly(*cis*-1,4-isoprene) in the presence of HL-ADH to reduce ODTD to the corresponding dialcohol (HDTD [*m/z* 240 Da]) immediately after release of ODTD from the polymer. The principal suitability of the combined assay was confirmed by identifica-

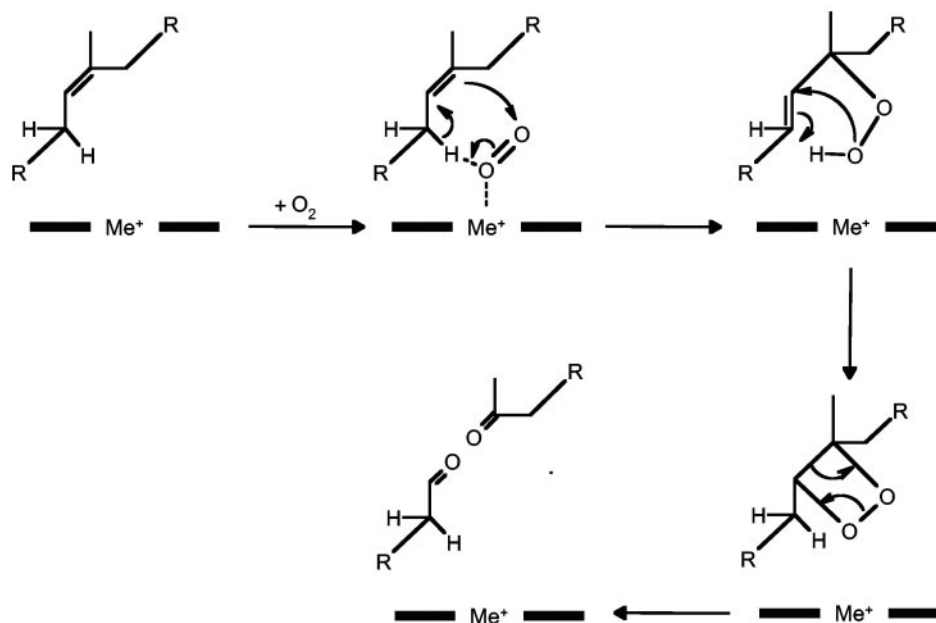


FIG. 5. Proposed dioxygenase reaction mechanism for cleavage of natural rubber by rubber oxygenase (RoxA). Black bars and  $\text{Me}^+$  (metal) indicate the heme reaction center of RoxA.

tion of protonated HDTD in the 15.5-min HPLC peak by ESI<sup>+</sup>-MS ( $m/z$  241). When the combined experiment was performed in the presence of  $^{18}\text{O}_2$  and  $\text{H}_2^{16}\text{O}$ , a mass shift of  $m/z$  by 4 ( $m/z$  245) for the protonated HDTD molecules confirmed that both oxygen atoms of  $^{18}\text{O}_2$  were incorporated into the cleavage product (Fig. 4B). The results are in full agreement with a dioxygenase mechanism of poly(*cis*-1,4-isoprene) cleavage. Based on the presence of covalently bound heme in RoxA (2) and the findings of the present study, we propose a cleavage mechanism of poly(*cis*-1,4-isoprene) as shown in Fig. 5.

#### ACKNOWLEDGMENTS

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

We thank E. Chua, A. Ikram, and H. Y. Yeang (RRIM) for providing purified *Hevea* latex.

#### REFERENCES

- Booker, J., M. Auldridge, S. Wills, D. McCarty, H. Klee, and O. Leyser. 2004. MAX3/CCD7 is a carotenoid cleavage dioxygenase required for the synthesis of a novel plant signaling molecule. *Curr. Biol.* **14**:1232–1238.
- Braaz, R., P. Fischer, and D. Jendrossek. 2004. A novel type of heme-dependent oxygenase catalyzes oxidative cleavage of rubber (poly-*cis*-1,4-isoprene). *Appl. Environ. Microbiol.* **70**:7388–7395.
- Devery, J., and B. V. Milborrow. 1994. Beta-carotene-15,15'-dioxygenase (EC 1.13.11.21) isolation reaction mechanism and an improved assay procedure. *Br. J. Nutr.* **72**:397–414.
- Heisey, R. M., and S. Papadatos. 1995. Isolation of microorganisms able to metabolize purified rubber. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**:3092–3097.
- Jendrossek, D., and S. Reinhardt. 2003. Sequence analysis of a gene product synthesized by *Xanthomonas* sp. during growth on natural rubber latex. *FEMS Microbiol. Lett.* **224**:61–65.
- Jendrossek, D., G. Tomasi, and R. M. Kroppenstedt. 1997. Bacterial degradation of natural rubber: a privilege of actinomycetes? *FEMS Microbiol. Lett.* **150**:179–188.
- Katz, I., and M. Keeney. 1966. Quantitative micro determination and isolation of plasmalogen aldehydes as 2,4-dinitrohydrazones. *J. Lipid Res.* **7**:170–174.
- Linos, A., M. M. Berekaa, A. Steinbüchel, K. K. Kim, C. Sproer, and R. M. Kroppenstedt. 2002. *Gordonia westfalica* sp. nov., a novel rubber-degrading actinomycete. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **52**:1133–1139.
- Linos, A., and A. Steinbüchel. 2001. Biodegradation of natural and synthetic rubber, p. 321–359. In T. Koyama and A. Steinbüchel (ed.), *Biopolymers*. Wiley-VCH, Weinheim, Germany.
- Retey, J., A. Umani-Ronchi, J. Sebl, and D. Arigoni. 1966. On the mechanism of the propanediol dehydrase reaction. *Experientia* **22**:502–503.
- Rose, K., K. B. Tenberge, and A. Steinbüchel. 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.
- Tsuchii, A., and K. Takeda. 1990. Rubber-degrading enzyme from a bacterial culture. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**:269–274.
- Woggon, W. D. 2002. Oxidative cleavage of carotenoids catalyzed by enzyme models and beta-carotene 15,15'-monooxygenase. *Pure Appl. Chem.* **74**:1397–1408.

## Appendix 3

Submitted to Applied and Environmental Microbiology (October, 2005)

### On the Reaction Mechanism of Heme-dependent Rubber Dioxygenase RoxA: Evidence for Polyisoprene Radicals as Intermediates

**Reinhard Braaz<sup>1</sup>, Dieter Jendrossek<sup>1\*</sup>,  
Marc Rudolf<sup>2</sup>, Peter M. H. Kroneck<sup>2</sup>,**

<sup>1</sup>*Institut für Mikrobiologie, Universität Stuttgart, Germany*

<sup>2</sup>*Fachbereich für Biologie, Universität Konstanz, Germany*

**Key words:** natural rubber, polyisoprene-dioxygenase, RoxA, c-type cytochrome, EPR, redox potential

\*Correspondent footnote: Dieter Jendrossek  
Institut für Mikrobiologie  
Universität Stuttgart  
Allmandring 31  
70550 Stuttgart  
Germany  
Tel.: +49-711-685-5483  
Fax: +49-711-685-5725  
E-mail: [dieter.jendrossek@imb.uni-stuttgart.de](mailto:dieter.jendrossek@imb.uni-stuttgart.de)

## Summary

Oxidative cleavage of polyisoprene by the diheme dioxygenase RoxA isolated from *Xanthomonas* sp. was investigated biochemically and by electron paramagnetic resonance (EPR) spectroscopy. Approximately 2 Fe atoms/RoxA molecule were determined by inductively coupled plasma mass spectrometry. Potentiometric titrations of purified RoxA monitored at 554 nm revealed the presence of two redox potentials at  $-145$  and  $-65$  mV. EPR spectra of RoxA as isolated showed two *low spin* Fe(III) heme centres with apparent  $g$  values at 3.39, 3.09, 2.23, 1.92, and 1.50. A minor signal in the  $g = 6$  region resulting from a Fe(III) heme centre in the *high spin* state was also found in preparation-dependent intensity. Most likely this centre represents the substrate-binding site. EPR spectra also showed a narrow signal around  $g = 2$  typical for an organic radical. The intensity of the radical signal increased upon incubation of RoxA with polyisoprene latex or with synthetic oligoisoprene at  $40^{\circ}\text{C}$  suggesting that the cleavage reaction of polyisoprene goes through radical intermediates. The increase of the radical signal was dependent on the presence of polyisoprene or oligoisoprene but was independent on the presence of oxygen. Scavengers with a molecular structure related to polyisoprene such as  $\beta$ -carotene and  $\alpha$ -tocopherol completely inhibited the reaction. In summary our experimental findings suggest that in the first step of the cleavage reaction the high spin Fe(III) heme centre of RoxA triggers the formation of a polyisoprene radical. In a consecutive step, Fe(II) binds dioxygen leading to a cyclic peroxide intermediate. An experimental-based enzymatic cleavage mechanism of natural rubber that is different from previous theoretical considerations is provided for the first time.



## Introduction

Natural rubber (NR) or caoutchouc refers to a biopolymer that is synthesized by many plant species and by some fungi. NR has been commercially exploited for more than 100 years by cultivating and tapping the rubber tree (*Hevea brasiliensis*) at a level of several million tons per year. The natural polymer has an average molecular weight of about a million and is composed of two *trans* isoprene units at one end of the molecule followed by several hundreds to thousands of *cis*-1,4-isoprene units. The linear, non-branched polymer chains can be cross-linked by treatment with sulfur and heat (vulcanization) generating a material with superior physical and mechanical properties. Despite the development of chemosynthetic rubbers, the natural polymer is still necessary as a basic material for tires, latex gloves, condoms, sealings and many other things.

Naturally occurring NR is subjected to the biological mineralization cycles and many reports on the isolation and characterization of rubber-degrading microorganisms have been published [for overview see ]. At least two different types of rubber-degrading phenotypes have been described so far: a large number of bacteria is able to produce clearing zones during growth on NR-latex-containing opaque agar media. Many actinomycetes belong to this group (6) and *Xanthomonas* sp. currently is the only known Gram-negative exception (16). The second group is not able to produce clearing zones on solid agar media with NR-latex as carbon source. Members of this group apparently need a direct contact to the polymer. Examples for the second group are *Gordonia polyisoprenivorans* or *Gordonia westfalica* (8, 9). Based on intermediates (2, 15, 16) isolated from several NR-grown bacterial cultures a biochemical degradation route has been proposed for rubber degradation (1, 13).

The basic molecular mechanism by which the carbon back bone of rubber is cleaved has been investigated in *Streptomyces* sp. and in *Xanthomonas* sp. 35Y. Rose *et al.* found *lcp* (latex clearing protein) in *Streptomyces* sp. K30 to be essential for rubber degradation (14). Based on mutant analysis the authors concluded that Lcp represents the polyisoprene-cleaving protein of this bacterium but NR-cleaving activity of isolated Lcp has not been demonstrated so far. In *Xanthomonas* sp., an extracellular rubber oxygenase (RoxA) has been isolated from latex-grown culture fluid and biochemically characterized (5). RoxA is a diheme oxygenase releasing low molecular oligoisoprene units as products. 12-Oxo-4,8-dimethyltrideca-4,8-diene-1-al (ODTD) was identified as the major product under *in vitro* conditions together

with a homologous series of minor metabolites differing from the major degradation product only in the number of repetitive isoprene units between terminal functions, CHO-CH<sub>2</sub>- and -CH<sub>2</sub>-COCH<sub>3</sub> (4). Isotope labelling experiments clearly showed that RoxA is a dioxygenase (3). To get further insight about the reaction mechanism of RoxA at the molecular level and about the catalytic role of the two heme centres we carried out UV/vis monitored potentiometric titrations and EPR spectroscopic studies. Furthermore, the EPR technique was also employed to investigate interaction of RoxA with various substrates in the absence and presence of dioxygen.

## Materials and Methods

**Bacteria, media, and culture conditions and purification of rubber oxygenase (RoxA).** *Xanthomonas* sp. (Tsuchii, A. et al. 1990) was grown in nutrient broth (NB) or in a mineral salts medium (MSM) with 0.2% of purified rubber latex at 30°C as described, recently (3). For isolation of RoxA 24 x 250 ml cultures were grown for 11 days at 30°C. Purification of RoxA was performed from the combined cell-free culture fluid as described recently (3).

**Elementary analysis of purified RoxA.** Inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) was performed by Spuren-analytisches Laboratorium Dr. Baumann (Maxhütte-Haidhof, Germany). The concentration of iron was determined by ICP-MS from samples containing purified RoxA of *Xanthomonas* sp.

**Redox titration.** Redox titrations were performed under the exclusion of dioxygen (Argon) in a Thunberg cell. All experiments were conducted at pH 7.0 and 25°C in 5 mM potassium-phosphate buffer containing 8 µM RoxA and 1 µM of the following redox mediators: NNN'N'-tetramethyl phenylenediamine ( $E^{\circ} = +260$  mV), 2,6-dichlorophenolindophenol ( $E^{\circ} = +217$  mV), phenanzinmethosulfate ( $E^{\circ} = +80$  mV), indigo trisulfonate ( $E^{\circ} = -70$  mV), indigo disulfonate ( $E^{\circ} = -125$  mV), 2-hydroxy-1,4-naphtochinone ( $E^{\circ} = -152$  mV), anthraquinone-2-sulfonate ( $E^{\circ} = -225$  mV), phenosafranine ( $E^{\circ} = -252$  mV), methylviologen ( $E^{\circ} = -440$  mV). RoxA was titrated by stepwise addition of sodium dithionite or ferricyanide, respectively. All solutions were made anoxic through several cycles of argon and vacuum. The potential was read on the instrument when it changed by less than  $\pm 2$  mV within 5 min. The recorded UV-visible spectra were corrected for turbidity and for contributions of the redox mediators. All reduction potentials are quoted vs the standard hydrogen electrode (SHE).

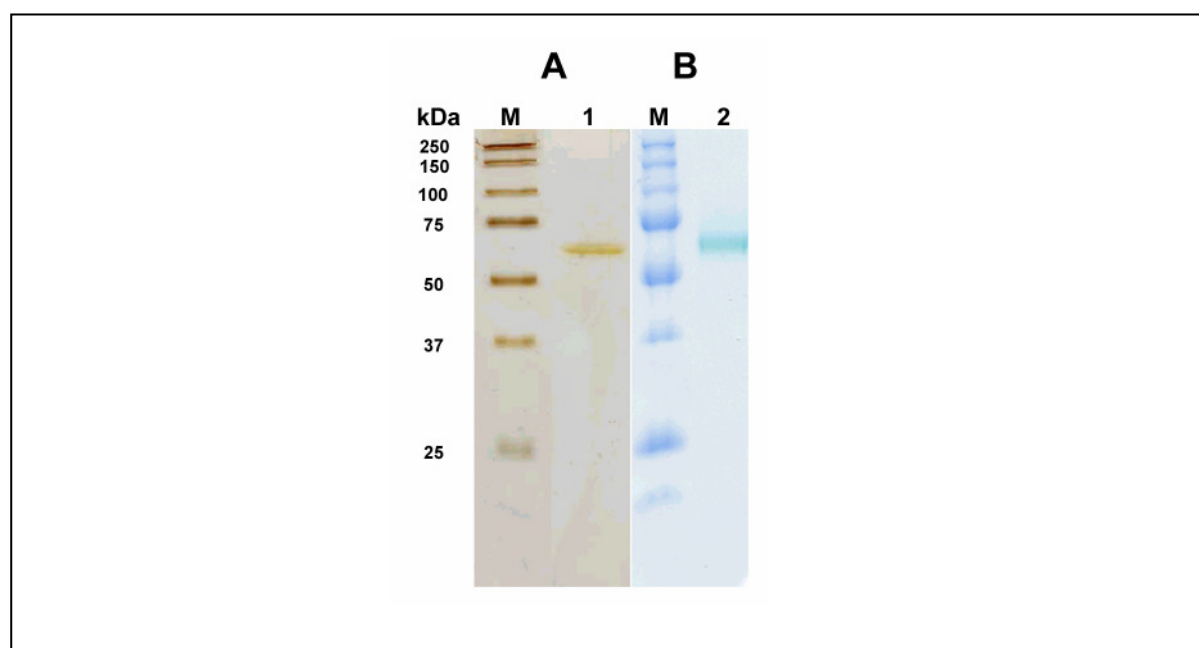
**Assay of RoxA.** The following conditions were used for product analysis of RoxA-catalyzed rubber degradation by HPLC analysis: the reaction mixture contained 100 µl purified RoxA (10-15 µg/ml), rubber latex (4 µl of a 35% [w/v] emulsion) and bis-Tris buffer (100 mM; pH 7.0) in a total volume of 1 ml. The reaction was carried out at 40°C for 3 hours in a test tube closed with parafilm. The mixture was extracted with ethylacetate or diethylether, dried, dissolved in 100-200 µl methanol and then subjected to HPLC analysis

and/or to carbonyl content determination (7). Mixtures without RoxA and with heat-inactivated RoxA (10 min 95°C) served as negative controls. 1 unit (U) of RoxA activity corresponds to 1 nmol generated carbonyl functions per minute.

**EPR measurements.** Perpendicular mode X-band EPR spectra were recorded on a Bruker Elexsys 500 with an ER 049 X microwave bridge. The system was equipped with an Oxford Instruments ESR 900 helium cryostat controlled by the ITC 503 temperature device. The modulation frequency was 100 kHz and the modulation amplitude was typically 1 mT. The measurements were performed with a Bruker 4122 SHQE cavity at  $\approx 9.38$  GHz, in 4mm quartz tubes (705-PQ-9.50, Wilmad); the sample volume was 250  $\mu$ l. EPR spectra were simulated with the program WEPR (11).

## Results

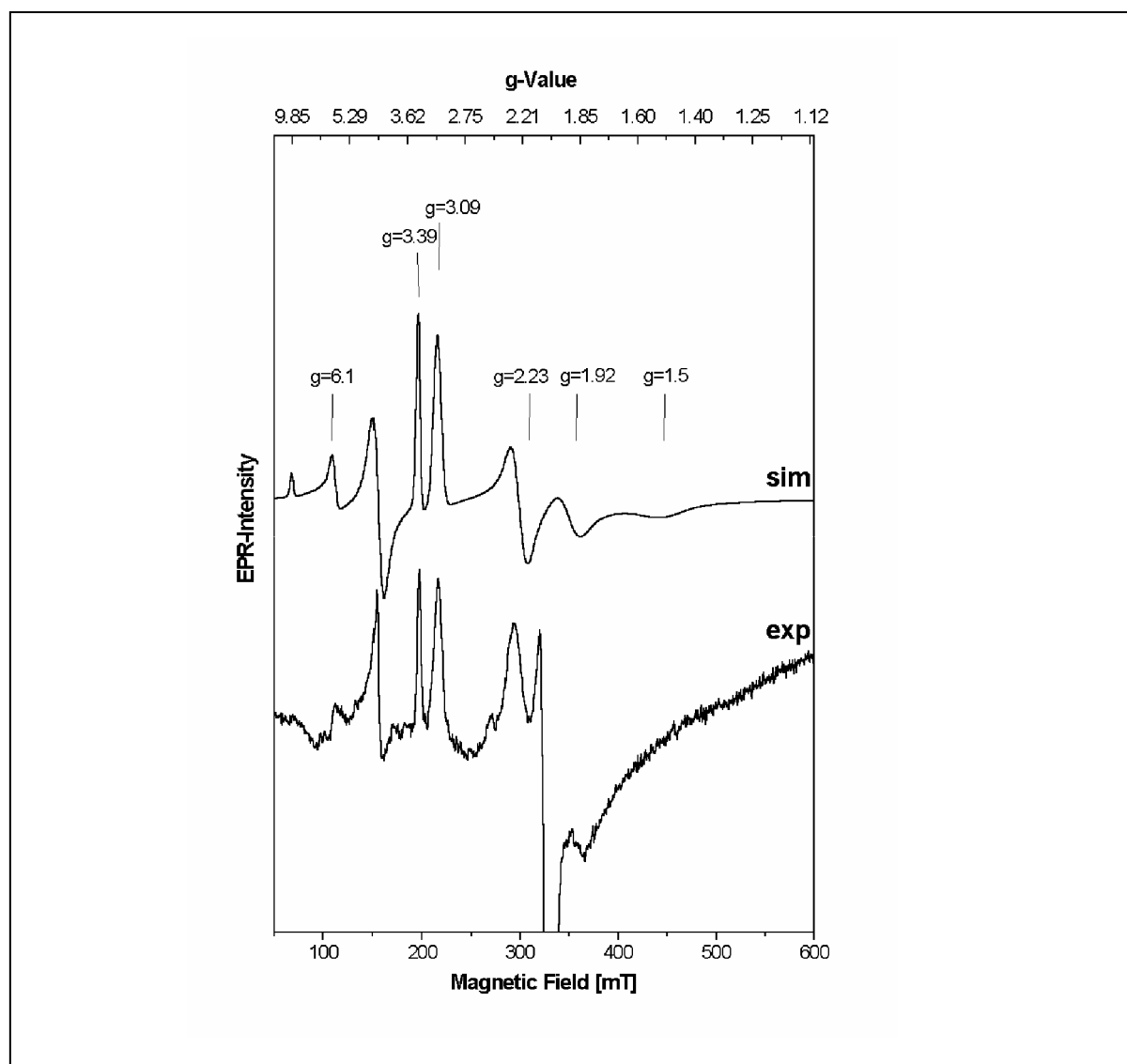
*Xanthomonas* sp. was grown on latex for 11 days at 30°C and extracellular rubber dioxygenase RoxA was purified to homogeneity according to SDS polyacrylamide gel electrophoresis (**Figure 1**). On the average, 10 mg pure RoxA were obtained from a 20 l culture. RoxA as isolated contained approximately 2 (experimental 1.8) hemes per mol RoxA ( $M_r$ , 72,8 kDa) as judged from the molar extinction coefficient of the heme pyridine complex at 551 nm ( $29 \text{ mmol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ). Specific activity (300 U/mg) and UV-vis absorption properties were more or less identical to those described previously (3, 4). Strong reducing agents, such as dithiothreitol or 2-mercaptoethanol, inhibited the cleavage reaction completely indicating the presence of essential disulfide bond(s) in RoxA. Approximately 2.3 iron atoms/RoxA per molecule were determined by ICP-MS in agreement with the assumption of two heme centres.



**Figure 1:** SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of purified RoxA. (A) silver-stained SDS-PAGE: lane M, marker proteins; lane 1 purified RoxA. (B) heme-stained SDS-PAGE: lane M, prestained marker proteins; lane 2 purified RoxA.

Next to UV-vis spectrophotometry electron paramagnetic resonance proved to be an extremely valuable tool to characterize heme proteins and their spin states. The low temperature EPR spectrum of RoxA (as isolated) recorded at X-band (**Figure 2**) showed major resonances at  $g = 3.09$ ,  $2.23$ , and  $\approx 1.50$  which are typical for *low-spin* Fe(III) heme centres (12), with histidine as 5<sup>th</sup> and 6<sup>th</sup> ligands to the iron, having nearly parallel imidazole planes similar to other *c*-type cytochromes. A second set of resonances was found at  $g = 3.39$

and  $g = 1.92$  originating from a second *low-spin* Fe(III) center with the imidazole planes of the axial histidine ligands being nearly perpendicular (17). The  $g$ -value of this centre at high magnetic field is extremely broad and hard to detect. The complete set of resonances was assigned to two magnetically isolated heme centres since their  $g$ -values appeared to be frequency-independent and there was no signal detected in the parallel-mode X-band spectrum indicating the presence of an integer spin system (data not shown).



**Figure 2:** Experimental and simulated perpendicular mode X-band EPR spectrum of RoxA (as isolated) from *Xanthomonas* sp. at 9.38 GHz, 10 K, 2 mW. Protein was 0.03 mM in 5 mM 1,3-diaminopropane, pH 8.0.

Spin quantitation ( $\text{CuSO}_4$  standard) of the former signal yielded 0.8 *low-spin* Fe(III) heme centre. There was a third signal in the EPR spectrum of RoxA as isolated around  $g = 6.1$  indicative of *high-spin* Fe(III). The relative intensities of the signals at low and high magnetic field varied depending on the preparation of RoxA. We assume that the *high-spin*

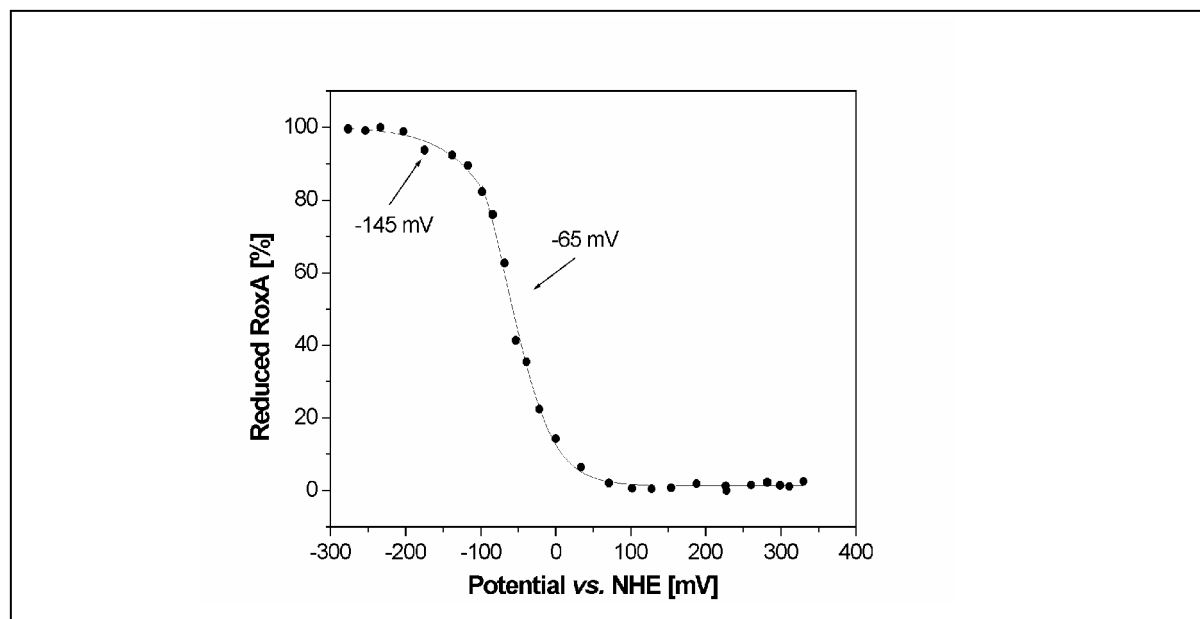
Fe(III) centre represents the active site iron. Computer simulations showed that there were roughly equal amounts of the *high-spin* and *low-spin* Fe(III) species. The signal at  $g = 4.3$  was assigned to non-specifically bound iron. The simulated spectrum (**Figure 2**) represents the sum of three heme species (two low-spin Fe(III), with  $g = 3.39, 3.09, 2.23, 1.92,$  and  $1.5$ ; one high-spin Fe(III), with  $g = 6.1$ ), with the simulation parameters compiled in **Table 1**.

**Table 1:** Simulation parameters of X-band EPR spectrum of RoxA. Microwave frequency: 9.3788 GHz.

Species	Spin	Parameter		
Fe(III) l.s. (parallel imidazole planes)	1/2	$g_x=3.09$ $W_x=200$	$g_y=2.23$ $W_y=250$	$g_z=1.50$ $W_z=500$
Fe(III) l.s. (perpendicular imidazole planes)	1/2	$g_x=3.39$ $W_x=100$	$g_y=1.92$ $W_y=300$	$g_z=1.4$ $W_z=1000$
Fe(III) h.s.	5/2	$g=2.0$ $W_x=4000$	$E/D=0$ $W_y=250$	$D=4$ $W_z=400$
Fe(III) h.s. (unspecific bound iron)	5/2	$g=2.0$ $W_x=1500$	$E/D=0.33333$ $W_y=250$	$D=4$ $W_z=400$

The results described here indicate that the two heme centres of RoxA are not completely identical. This assumption was supported by their redox properties. UV-vis monitored potentiometric titrations of RoxA were carried out both under reducing (dithionite) and oxidizing (ferricyanide) conditions showing fully reversible behavior of the heme centres in RoxA (**Figure 3**). The average percentage of reduced RoxA was calculated by comparing the intensity of the  $\alpha$ -band at 554 nm and was normalized with an isosbestic point at the wavelength of 542 nm. The redox mediators used in the titrations did not interfere significantly with the absorption spectra of RoxA. Two Nernst equations with separately variable midpoint potentials were used to model the observed potential curve. The two heme groups of RoxA showed potentials of  $-65$  mV and  $-145$  mV at pH 7.0. We assume that the heme group with the more positive potential of  $-65$  mV is responsible for the oxidation of the substrate.

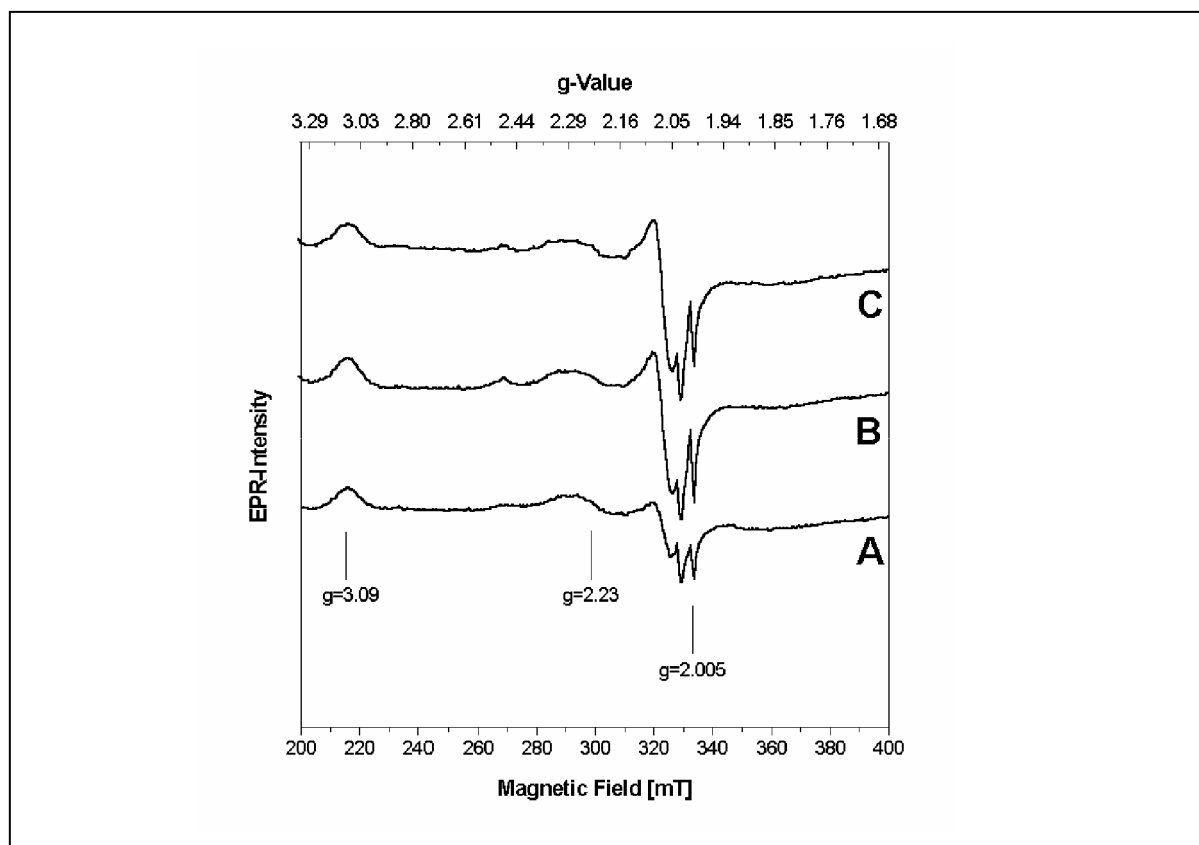
Reaction of RoxA with sodium dithionite led to the disappearance of all EPR signals. The reduction of Fe(III) by dithionite was reversible by addition of oxygen. The EPR spectrum of RoxA in the absence of dioxygen (argon) was the same as that of RoxA exposed to air (data not shown). Thus, removal of dioxygen was not sufficient to convert RoxA from the oxidized to the reduced state.



**Figure 3:** Potentiometric titration of RoxA at pH 7.0, monitored by UV-vis spectroscopy at 554 nm. Mid point potentials were estimated by fitting two single electron Nernst equations with potentials of -65 mV and -145 mV vs the normal hydrogen electrode.

The cleavage of polyisoprene by RoxA does not depend on any external cofactors such as reduced nicotinamide, NADH. Note that for the *in vitro* cleavage of poly(*cis*-1,4 isoprene) in the presence of dioxygen just the organic substrate and RoxA are required. The presence of a *high spin* Fe(III) heme of varying intensity in preparations of RoxA suggests that this heme might be the catalytic centre which interacts with the substrate. Since Fe(III) is unlikely to react with O<sub>2</sub>, the second substrate of the reaction, polyisoprene, could bind to the *high-spin* Fe(III) heme centre. A possible mode of reaction would include the reduction of the Fe(III) site and a concomitant single-electron oxidation of a RoxA-bound substrate creating a polyisoprenyl radical. To test this hypothesis RoxA was incubated in the absence of dioxygen with either natural polyisoprene or synthetic oligoisoprene. As documented in **Figure 4** the narrow signal at  $g = 2.005$  found in RoxA in the absence of dioxygen which exhibited the spectral features of an organic radical, increased significantly and reproducibly upon incubation with natural poly(*cis*-1,4-isoprene) latex or synthetic oligo(*cis*-1,4-isoprene) for 10 min at 40°C. Longer incubation times (up to 100 min) did not lead to a further increase of the radical signal. Under these conditions, both polyisoprene latex and oligoisoprene did not give significant EPR signals at all (data not shown). When RoxA was incubated (40°C) in the presence of dioxygen with latex the intensity of the radical signal increased again in comparison to the radical observed in the spectrum of RoxA as isolated (**Figure 4**). These results lend support to the idea of a radical-induced cleavage mechanism.

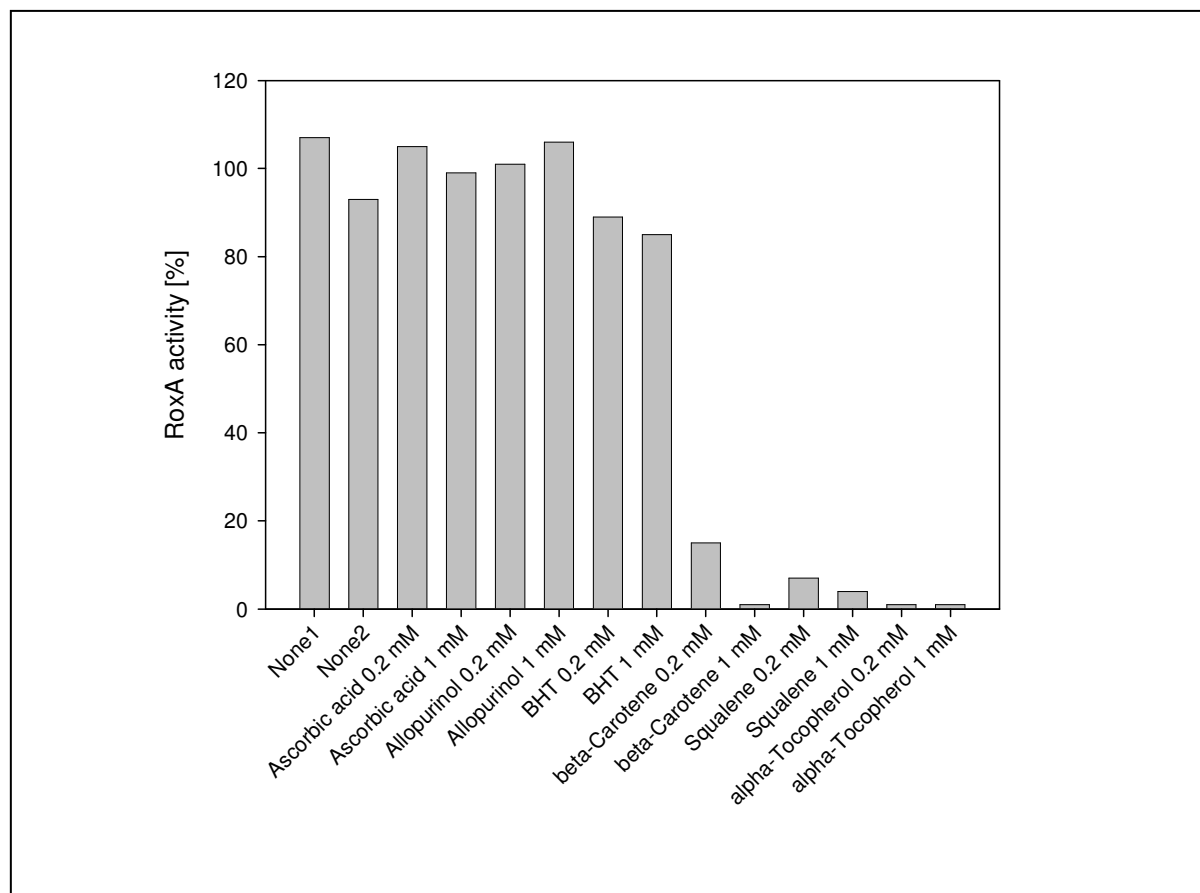




**Figure 4:** Perpendicular mode X-band EPR spectrum of RoxA from *Xanthomonas* sp. at 9.38 GHz, 10 K, 2 mW as isolated (**A**), after incubation with an excess of oligo(*cis* 1,4-isoprene) for 10 minutes at 40°C (**B**), and after incubation for 100 minutes at 40°C (**C**). Protein was 0.03 mM in 5 mM 1,3-diaminopropane, pH 8.0.

If polyisoprene radicals play a role in the cleavage reaction one would assume that radical scavengers will inhibit the reaction. Therefore we tested typical scavenger compounds for their effects on RoxA-mediated cleavage of polyisoprene. Ascorbic acid and allopurinol did not inhibit at all the reaction at concentrations of 0.2 or 1 mM (**Figure 5**). Di-*t*-butyl-*p*-hydroxytoluene (BHT) inhibited the reaction by less than 20% and a concentration-dependent inhibition was not observed. These experimental observations do not favour the postulated radical mechanism. On the other hand, mostlikely the RoxA-generated substrate radicals will have a very short half life, besides they might be buried in a substrate-binding pocket within the large enzyme (72 kDa subunit size) to which these radical scavengers might have only limited access. Thus, we investigated the effect of compounds that could react as scavengers and that have a structure more similar to polyisoprene.  $\beta$ -Carotene and  $\alpha$ -tocopherol completely inhibited the reaction at 0.2 and 1 mM (**Figure 5**). These results support the idea that a radical mechanism could be involved in RoxA-mediated cleavage of polyisoprene. However, squalene, a low molecular oligoisoprene with *trans* configuration but without significant properties as scavenger, also inhibited RoxA by about 95%. It is therefore difficult

to distinguish between the properties of the tested compounds as scavengers and as substrate analogues.



**Figure 5:** Inhibitors of RoxA. Relative activities were calculated from the areas of the 14.8 min peak (ODTD) in the HPLC analysis.

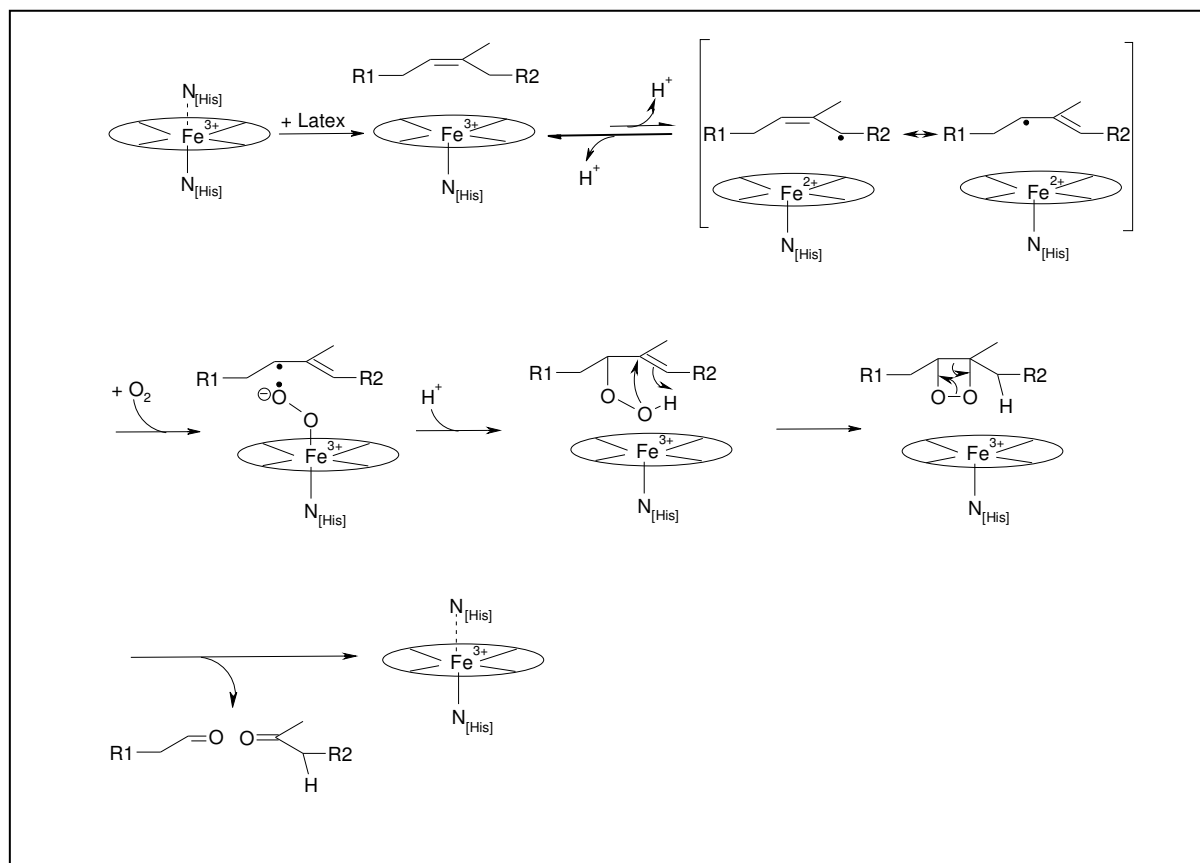
## Discussion

The recently described rubber oxidizing enzyme RoxA cleaves poly(*cis*-1,4-isoprene) to yield 12-oxo-4,8-dimethyltrideca-4,8-diene-1-al (ODTD) as the major degradation product by a not known reaction mechanism. The amino acid sequence of RoxA has no significant similarity to any protein of the data base with identified function except for short sequences with similarities to the heme binding motifs of cytochrome *c* peroxidases (5). However, peroxidase activity of RoxA could not be demonstrated (4). RoxA is also unrelated in amino acid sequence to Lcp, a protein that somehow is involved in rubber degradation of *Streptomyces* sp. K30 (14). Mutants in *lcp* have lost the ability to produce clearing zones on opaque latex agar and it has been proposed that Lcp could be the polyisoprene-cleaving pendent to RoxA in *Streptomyces* sp. K30.

It is generally accepted that the primary attack of a polyisoprene molecule proceeds via oxidative cleavage of the polyisoprene double bond releasing end structures of the keto and aldehyde types such as ODTD (4, 13, 16). It has been proposed that the reaction is initiated by a dioxygen molecule that had been activated by an enzyme-bound metal atom to the superoxide anion,  $O_2^-$  (Fig. 8 of (10), Fig. 5 of (3)). Activation of dioxygen to the superoxide radical would require a reduced metal ion such as Fe(II). However, EPR results in this study clearly showed that the iron atoms of the two heme centres of purified RoxA were in the oxidized Fe(III) form. Consequently, it is not very likely that initiation of the cleavage reaction is the formation of a superoxide ion at least for RoxA-mediated cleavage.

Alternatively, as the heme iron is in the Fe(III) redox state it appears reasonable to assume that Fe(III) first binds its substrate polyisoprene and then attacks a C-H bond followed by reduction of the metal centre. A candidate would be the C-H bond close to the double bond of an isoprene unit in the polymer. Thus, the Fe(III) site gets reduced to Fe(II) accompanied by the formation of a carbon centered radical in the coordination sphere of the metal (**Figure 6**). The Fe(II) centre can now bind a dioxygen molecule. Hereafter, the activated dioxygen molecule is able to combine with the polyisoprene radical under formation of a C-O bond leading to a cyclic peroxide. Subsequently, the carbon-carbon bond and the O-O-bond of the cyclic peroxide will be cleaved thus generating the observed aldehyde and ketone products. Finally, the Fe(II) centre becomes reoxidized to Fe(III) during this process.

To our knowledge this is the first report in which a mechanism is proposed for the enzymatic cleavage of polyisoprene based on experimental data (**Figure 6**). Our proposal is supported by three experimental findings: (i) the existence of two different *low-spin* heme Fe(III) centres in RoxA as isolated, (ii) part of the heme centres can be in the *high-spin* state thus can interact with the substrate, (iii) the presence of an organic radical in RoxA the concentration of which increased upon incubation with substrates.



**Figure 6:** Postulated mechanism of the RoxA-catalyzed cleavage of poly(*cis*-1,4-isoprene).

The RoxA-catalyzed cleavage of polyisoprene is a relatively slow process. The specific activity of purified RoxA has been calculated to as low as 300 nmol/min mg<sup>-1</sup> (3). Accordingly, cultivation of *Xanthomonas* sp. on NR latex takes about 11-12 days until most of the substrate has been consumed. We assume that the rate-limiting step of the reaction is the Fe(III)-induced radical formation of a polyisoprenyl radical induced by interaction of the substrate with the *high-spin* Fe(III) heme centre of RoxA. Currently it is not clear what causes the formation of the *high-spin* Fe(III) heme site. Perhaps a conformational change occurs upon binding of the substrate to the RoxA molecule. It is plausible to assume that the equilibrium of this part of the reaction, i.e. binding and/or radical formation, is far in favour of the educts. However, once a polyisoprenyl radical and Fe(II) has been formed the reaction

with dioxygen and cleavage of the carbon back bone can be relatively fast. Otherwise, a significant reduction in EPR signal intensity at least of one heme centre would have been expected. This was not the case.

### **Acknowledgments**

The financial support by Deutsche Forschungsgemeinschaft (Je 152/7-5.; Kr 451/32-3 and 35-1) is gratefully acknowledged.

## References

1. **Bode, H. B., K. Kerkhoff, and D. Jendrossek.** 2001. Bacterial degradation of natural and synthetic rubber. *Biomacromolecules* **2**:295-303.
2. **Bode, H. B., A. Zeeck, K. Pluckhahn, and D. Jendrossek.** 2000. Physiological and chemical investigations into microbial degradation of synthetic Poly(*cis*-1,4-isoprene). *Appl Environ Microbiol* **66**:3680-5.
3. **Braaz, R., W. Armbruster, and D. Jendrossek.** 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**:2473-8.
4. **Braaz, R., P. Fischer, and D. Jendrossek.** 2004. Novel type of heme-dependent oxygenase catalyzes oxidative cleavage of rubber (poly-*cis*-1,4-isoprene). *Appl Environ Microbiol* **70**:7388-95.
5. **Jendrossek, D., and S. Reinhardt.** 2003. Sequence analysis of a gene product synthesized by *Xanthomonas* sp. during growth on natural rubber latex. *FEMS Microbiol Lett* **224**:61-5.
6. **Jendrossek, D., G. Tomasi, and R. M. Kroppenstedt.** 1997. Bacterial degradation of natural rubber: a privilege of actinomycetes? *FEMS Microbiol Lett* **150**:179-88.
7. **Katz, I., and M. Keeney.** 1966. Quantitative micro determination and isolation of plasmalogen aldehydes as 2,4-dinitrophenylhydrazones. *J Lipid Res* **7**:170-4.
8. **Linos, A., M. M. Berekaa, A. Steinbüchel, K. K. Kim, C. Sproer, and R. M. Kroppenstedt.** 2002. *Gordonia westfalica* sp. nov., a novel rubber-degrading actinomycete. *Int J Syst Evol Microbiol* **52**:1133-9.

9. **Linos, A., A. Steinbüchel, C. Sproer, and R. M. Kroppenstedt.** 1999. *Gordonia polyisoprenivorans* sp. nov., a rubber-degrading actinomycete isolated from an automobile tyre. *Int J Syst Bacteriol* **49 Pt 4**:1785-91.
10. **Linos, A., and A. Steinbüchel.** 2001. Biodegradation of natural and synthetic rubbers, p. 321-359. *In* A. Steinbüchel (ed.), *Polyisoprenoids*, vol. 2. Wiley-VCH, Weinheim.
11. **Neese, F.** 1995. The program EPR, Quantum chemistry program exchange. *Bulletin* **15**:5.
12. **Palmer, G.** 1983. *Electron paramagnetic resonance of hemoproteins*. Addison-Wesley Publishing Company.
13. **Rose, K., and A. Steinbüchel.** 2005. Biodegradation of natural rubber and related compounds: recent insights into a hardly understood catabolic capability of microorganisms. *Appl Environ Microbiol* **71**:2803-12.
14. **Rose, K., K. B. Tenberge, and A. Steinbüchel.** 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**:180-8.
15. **Tsuchii, A., T. Suzuki, and K. Takeda.** 1985. Microbial degradation of natural rubber vulcanisates. *Appl Environ Microbiol* **50**:965-970.
16. **Tsuchii, A., and K. Takeda.** 1990. Rubber-degrading enzyme from bacterial culture. *Appl Environ Microbiol* **56**:269-274.
17. **Walker, F. A.** 1999. Magnetic spectroscopy (EPR, ESEEM, Mössbauer, MCD, and NMR) studies of low-spin ferriheme centers and their corresponding heme proteins. *Coord. Chem. Rev.* **185-186**:471-534.

## Danksagungen

In erster Linie bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. D. Jendrossek, der mir viel Freiraum zur Entwicklung eigener Ideen und Lösungsansätze ließ und durch die zahlreichen Anregungen, Diskussionen sowie seine engagierte Betreuung wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat. Des weiteren bedanke ich mich bei ihm für die Möglichkeit, am Aufbau eines mikrobiologischen Praktikums an der German University in Cairo mitzuwirken.

Herrn Prof. Dr. A. Stolz danke ich für die Übernahme des Koreferates.

Bei Dr. P. Fischer (Universität Stuttgart, NMR), Dr. W. Armbruster (Universität Hohenheim, HPLC-MS, GC-MS), Prof Dr. P. Kroneck und Dr. M. Rudolf (beide Universität Konstanz, EPR), M. Priemer (Universität Tübingen, MALDI-ToF), Simone Reinhardt (Universität Stuttgart, DNA-Sequenzierung) und Prof. Dr. O. Einsle (Universität Göttingen, Röntgenstrukturanalyse) bedanke ich mich für Ihre Hilfe, Diskussionen, Anregungen und Messzeit.

Ich bedanke mich ganz herzlich bei allen Mitarbeitern in Labor 2 für viele anregende, fachliche und nicht fachliche Gespräche, sowie das gute Arbeitsklima, und bei allen Mitarbeitern des Instituts für Mikrobiologie für die gute Zusammenarbeit und für den vielen Spaß innerhalb und außerhalb des Labors.

Bei meinen Eltern möchte ich mich für die Ermöglichung des Studiums und die familiäre und finanzielle Unterstützung bedanken.

Nicht zuletzt bedanke ich mich bei meiner Frau Régine für ihr vieles Verständnis, die Korrekturen und die Kraft, die sie mir gegeben hat.



## Lebenslauf

Reinhard Braaz

Geboren am 02.11.1975 in Schwäbisch Hall

- |                   |   |
|-------------------|---|
| 1986 – 1995       | Erasmus-Widmann-Gymnasium Schwäbisch Hall   |
| 05/1995           | Abitur  |
| 07/1995 – 08/1996 | Zivildienst beim Deutschen Roten Kreuz in Schwäbisch Hall   |
| 10/1996 – 10/2002 | Studium der Technischen Biologie (Diplom) an der Universität Stuttgart  |
| 10/2002           | Diplom Technische Biologie  |
| 10/2001 – 10/2002 | Diplomarbeit bei Prof. Dr. D. Jendrossek, Institut für Mikrobiologie, Universität Stuttgart,<br>Thema: „Charakterisierung des katalytischen Zentrums einer neu entdeckten Hydrolase aus <i>Paucimonas lemoignei</i> “ |
| 11/2002           | Beginn der experimentellen Untersuchungen zur vorliegenden Arbeit bei Prof. Dr. D. Jendrossek am Institut für Mikrobiologie an der Universität Stuttgart  |