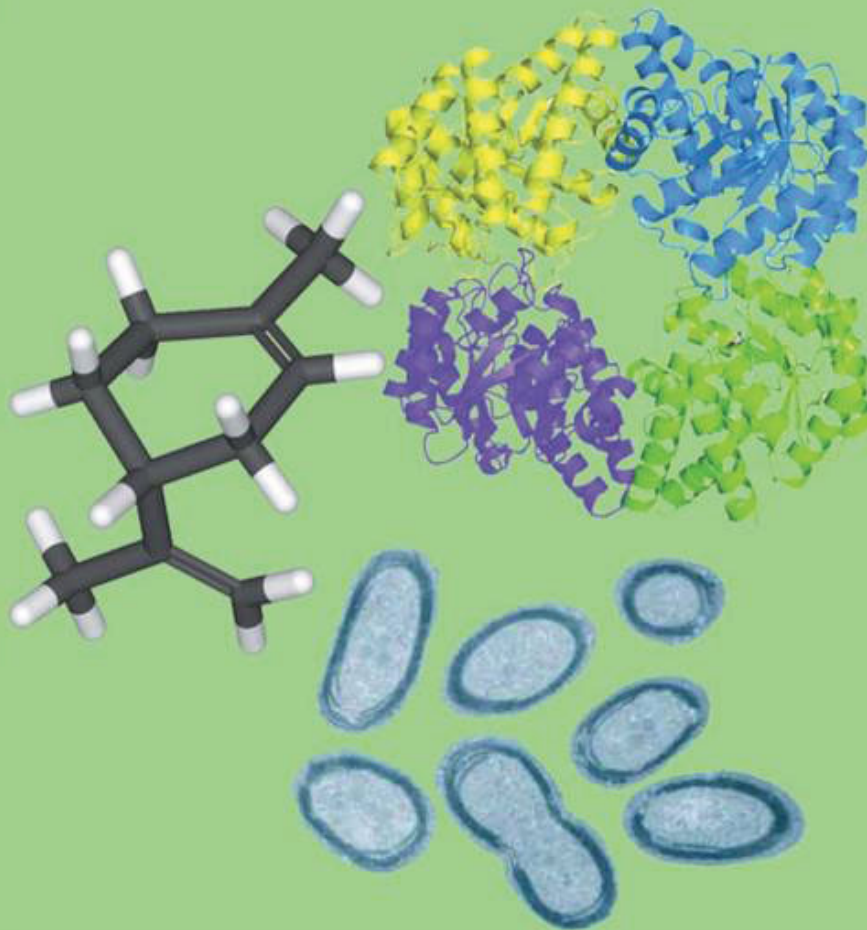


Danny Brodkorb

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



**Cuvillier Verlag Göttingen**  
Internationaler wissenschaftlicher Fachverlag

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

**Dissertation**

zur  
Erlangung des akademischen Grades eines

Doktor der Naturwissenschaft  
- Dr. rer. nat. -

dem Fachbereich Biologie/Chemie  
der Universität Bremen  
vorgelegt von

**Danny Brodkorb**

Bremen 2009

## **Bibliografische Information der Deutschen Nationalbibliothek**

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

1. Aufl. - Göttingen : Cuvillier, 2009

Zugl.: Bremen, Univ. Diss., 2009

978-3-86955-213-2

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

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

Tag des Promotionskolloquiums: 15.12.2009

© CUVILLIER VERLAG, Göttingen 2009

Nonnenstieg 8, 37075 Göttingen

Telefon: 0551-54724-0

Telefax: 0551-54724-21

[www.cuvillier.de](http://www.cuvillier.de)

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

1. Auflage, 2009

Gedruckt auf säurefreiem Papier

978-3-86955-213-2

## Zusammenfassung

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

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

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

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

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

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

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

Inhaltsverzeichnis

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

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

**Abkürzungen**

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





## Teil I Darstellung der Ergebnisse im Gesamtzusammenhang

### A Bisheriger Stand des Wissens

#### 1. Isoprene und Monoterpene

##### 1. 1 Biogenetische Isoprenregel

In der Struktur vieler Naturstoffe kann man Isopren (2-Methyl-1,3-butadien,  $C_5H_8$ ) als chemische Grundeinheit erkennen (Conolly und Hill, 1992; Breitmaier, 2006). Terpenoide oder Isoprenoide sind Verbindungen, die aus Isopren-Einheiten aufgebaut sind (Wallach, 1885). Mit der „Biogenetischen Isoprenregel“ wurde die Annahme formuliert, dass eine Biosynthese aller Isoprenoide universell vom Isopentenylpyrophosphat (IPP) ausgeht (Ruzicka et al., 1953). IPP bildet die biologisch aktive Isopreneinheit (Lynen, 1958; Lynen, 1959; Bloch et al., 1959). Auch wenn es nur wenige Nachweise über den *in vitro*-Einbau von markiertem IPP in pflanzliche Isoprenoide gibt, so ist der Weg der pflanzlichen Isoprenoidbiosynthese von der IPP-Isomerase über die Prenyltransferasen und beispielsweise die Phytoensynthase und weiterer Enzyme der Carotinoidbiosynthese sehr gut dokumentiert (Britton et al., 1998). Die biologischen Isopren-Einheiten können in unterschiedlicher Anzahl linear verknüpft und die isoprenoide Grundstruktur anschließend modifiziert werden, z. B. durch Oxidation oder Wasseranlagerung. Kristallstrukturanalysen lieferten detaillierte Einblicke in die intramolekularen Zyklisierungsreaktionen, auf der die enorme Diversität der Isoprenoid-Ringstrukturen basiert. Die beachtliche Zahl von über 30.000 isoprenoiden Naturstoffen unterscheidet sich hinsichtlich der Anzahl an Isopren-Einheiten im Molekül. Es gibt Hemi- (C5), Mono- (C10), Sesqui- (C15), Di- (C20), Tri- (C30), Tetra- (C40) und Polyterpene (>C40). Ihre große Vielfalt ist in allen drei fundamentalen Domänen des Lebens vertreten. In Pflanzen befinden sich isoprenoide Naturstoffe in den ätherischen Ölen, *Bacteria* enthalten Chinone und *Archaea* charakteristische Etherlipide. Wichtige Strukturbestandteile in der bakteriellen und tierischen Zellmembran sind Hopanoide und Sterole.

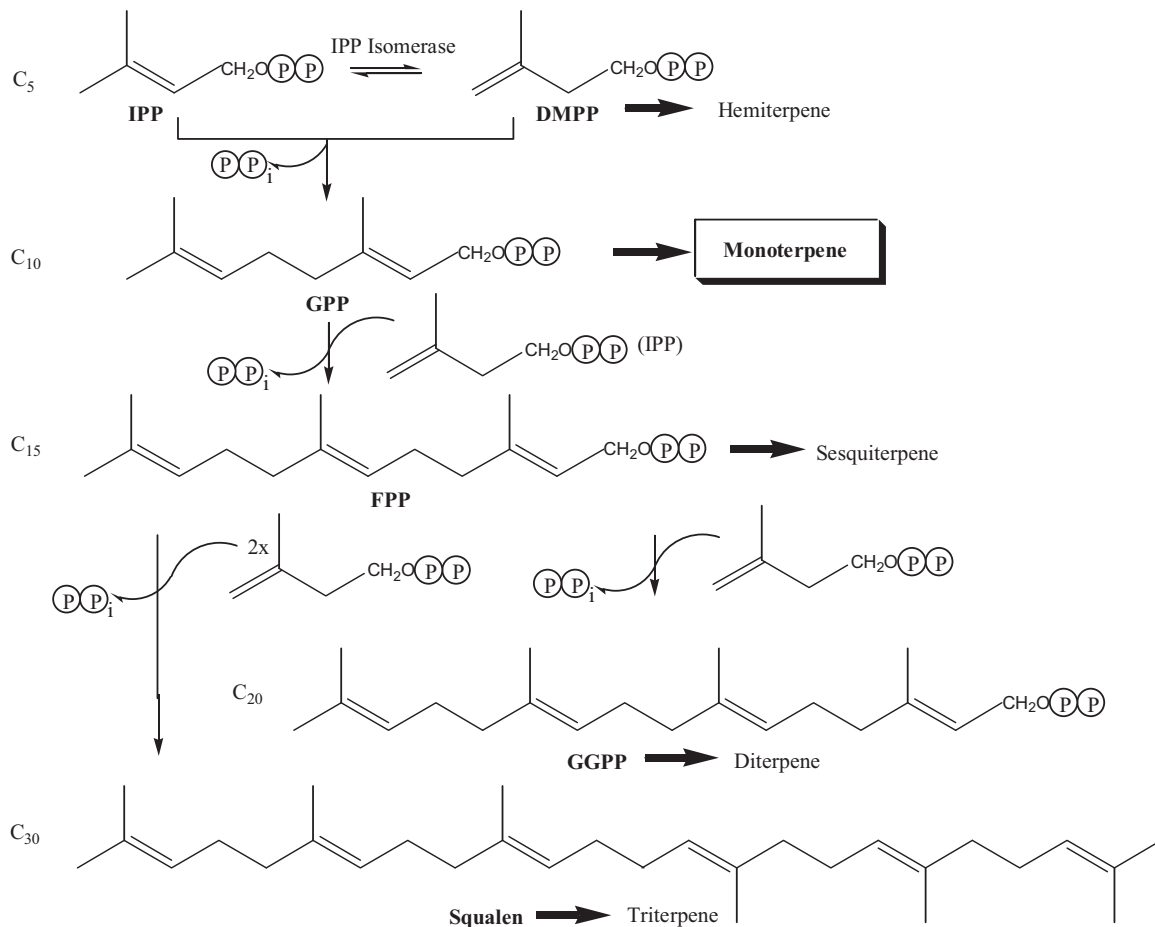


Abb. 1: Synthesewege der höheren Terpene

## 1. 2 Synthese von Isoprenen und Monoterpenen

Aus Isopentenylpyrophosphat (IPP) wird mit Hilfe der IPP-Isomerase das allylische Dimethylallylpyrophosphat (DMAPP) synthetisiert. Dieses ist das Startermolekül für die Bildung von Prenylketten. Hierbei wird zunächst die Diphosphatgruppe des DMAPP abgespalten. Das entstehende allylische Kation addiert an die Doppelbindung eines IPP und nach Eliminierung eines Protons entsteht Geranylpyrophosphat (C<sub>10</sub>, GPP, Dev, 1982). Analog dazu kann das allylische GPP mit IPP zu Farnesylpyrophosphat (C<sub>15</sub>, FPP) und dieses weiter zu Geranylgeranylpyrophosphat (C<sub>20</sub>, GGPP) verlängert werden, wenn höhere Terpene synthetisiert werden (Abb.1). IPP und die isomere Verbindung DMAPP sind die C<sub>5</sub>-Grundbausteine der Isoprenoid-Biosynthese in allen Organismengruppen. Über den Acetat-Mevalonat-Weg wird aus drei Molekülen Acetyl-CoA die Mevalonsäure synthetisiert. Nach zweifacher Phosphorylierung wird unter Abspaltung von CO<sub>2</sub> und Wasser IPP

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

### 1.3 Monoterpene in der Umwelt

Monoterpene werden aufgrund ihrer großen Variabilität primär in azyklische Verbindungen, wie Myrcen und Ocimen, in monozyklische Monoterpene, u. a. Limonen und Phellandren, und in dizyklische Monoterpene, wie Pinen und Sabinen unterteilt (Abb. 2). Letztere können in zweizyklische C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-, C<sub>6</sub>-C<sub>4</sub>- und C<sub>6</sub>-C<sub>5</sub>-Systeme unterschieden werden. Es handelt sich bei allen Monoterpenen um ungesättigte Kohlenwasserstoffe, die als flüchtige organische Substanzen (*volatile organic compounds* [VOC]) klassifiziert werden (Erman, 1985; Gershenzon und Croteau, 1991; van de Werf et al., 1999). Pflanzen emittieren über eine Million Tonnen jährlich in die Atmosphäre (Zimmerman et al., 1978), wo Monoterpene in der Regel durch Photooxidation in kleinere Bestandteile zerlegt werden.

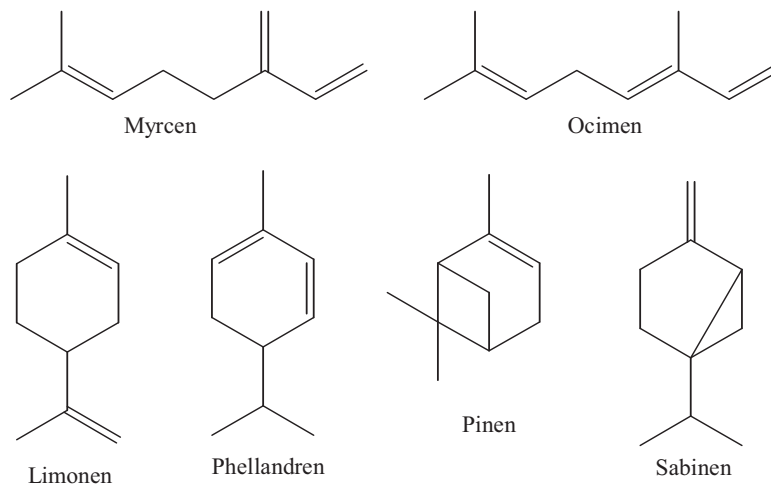


Abb. 2: Strukturformel repräsentativer Monoterpene

Ungefähr ein Viertel der Erdoberfläche wird von Wäldern bedeckt. Mehr als die Hälfte der terrestrischen Primärproduktion und drei Viertel der globalen Emissionen von Monoterpenen und anderen Isoprenen entstehen in Wäldern (Strasburger, 1991). Als häufigste Monoterpen-Quelle wurden Nadelbäume identifiziert, aber auch Laubbäume emittieren Monoterpene (Guenther et al., 1995). Beeindruckende sichtbare Beispiele sind die *Great Smoky Mountains* in Tennessee, USA, und die *Blue Mountains* nahe Sydney, Australien. Koniferen und Eucalyptusbäume emittieren enorme Mengen an Monoterpenen als Verdunstungsschutz, um sich so gegen Hitzestress zu schützen. In der Luft sorgen diese Teilchen für eine Streuung des Sonnenlichts. Das kurzwellige blaue Licht wird dabei besonders stark gestreut. Für das menschliche Auge erscheint die Luft über diesen Wäldern dann in einem intensiven blauen Farbton, was auch zur Namensgebung der genannten Bergregionen führte. Inwiefern die anschließende Photooxidation von Monoterpenen in der Atmosphäre zur Aerosol- und Wolkenbildung beiträgt, ist Gegenstand aktueller globaler klimatischer Studien (Claeys et al., 2004).

Unbekannt ist bisher auch der Grund für eine Halogenierung von Monoterpenen und anderen Isoprenoiden in marinen Systemen, wie z. B. in einigen Algen (Faulkner, 2001). Es könnte eine Reaktion von allylischen Kationen mit Chlorid, dem mit Abstand häufigsten Anion im Meer, spekuliert werden.

Physiologisch nehmen Monoterpene wichtige Funktionen in der pflanzlichen Abwehr gegen Pathogene und Herbivoren ein. Neben einer konstitutiven Synthese dieser Abschreckungswirkstoffe werden einige Monoterpene erst nach einer erfolgten Beschädigung des Pflanzengewebes, etwa durch Einstiche oder Fraßschäden von Insekten, gebildet und vermittelt, dank ihrer Flüchtigkeit, auch eine Form der Kommunikation zwischen benachbarten Pflanzen (Pare et al., 1997).

Monoterpene dienen einigen Tieren ebenso als Pheromone. Der Tannen-Borkenkäfer *Ips curvidens* nimmt Myrcen durch den Verzehr der Rinde auf und wandelt es durch Oxidation im Darm zum Aggregationspheromon Ipsenol um (Seybold et al., 1995). Erst durch die Aussendung dieses Botenstoffes kommt es zum alljährlichen massenhaften Befall vieler Baumbestände.

Zudem beeinflussen Monoterpene den Stickstoff- und Kohlenstoff-Zyklus in Waldböden (White, 1994). Sie haben eine inhibierende Wirkung auf die aerobe Oxidation von Methan und Ammonium. Man vermutet eine Inhibition der initialen Enzyme: der Methan- und Ammonium-Monooxygenasen (Ward et al., 1997; Amaral et al., 1998; White, 1988). Andrews et al. (1980) schilderte den inhibitorischen Effekt von  $\alpha$ -Pinen, Limonen, Camphen und Isobornylacetat auf das Wachstum von Mikroorganismen. In ihrer Studie verwendeten die Autoren in etwa Konzentrationen, wie sie in Tannennadeln vorkommen. Im Gegensatz dazu kann allein die Präsenz von Monoterpenen auch einen positiven Effekt auf das Wachstum anderer *Bakteria* und *Mycota* haben (Vokou, 1988). Die Tatsache, dass das Wachstum von Mikroorganismen selektiv beeinflusst werden kann, macht Monoterpene zu einem potenziellen Kontrollfaktor für mikrobielle Prozesse in der Umwelt (Wilt et al., 1993).

Der antimikrobielle Effekt vieler Monoterpene findet in der Volksmedizin seit langem Anwendung. Beispielsweise enthalten Hustenbonbons oft Menthol oder Eukalyptol. Die heilende Wirkung dieser Sauerstoff-enthaltenden Monoterpenoide, oft im Gemisch mit anderen Monoterpenen (ätherischen Ölen), wird den antibiotischen Eigenschaften dieser Naturstoffe zugeschrieben. Welche physiologischen Effekte für die Inhibierung einzelner Mikroorganismen verantwortlich sind, war bereits Gegenstand vieler toxikologischer Studien. Liposom-Modellstudien bestätigten eine Akkumulation der Monoterpene in der Zellmembran (Sikkema et al., 1995; Heider, J., 2007). Neben dem Verlust der Membranintegrität kommt es zur Entkopplung der Protonen-motorischen Kraft (Sikkema et al.,

1994). Molekular-physiologische Studien zeigten, dass  $\alpha$ - und  $\beta$ -Pinen sowohl die Atmungskette von intakten *Saccharomyces cerevisiae*-Zellen, als auch die Atmungskette von isolierten Mitochondrien der Hefezellen hemmen (Uribe und Pena, 1990). Die Zugabe von  $\beta$ -Pinen resultierte in einer Störung des Protonen- und Kaliumionentransports über die Membran. Der passive Efflux von Kaliumionen wurde aktiviert, wobei auch hier das Transmembranpotential stark absank. Die Entkopplung führte darüber hinaus spontan zu einer Erhöhung der ATPase-Aktivität (Uribe et al., 1984).

## **2. Biologischer Abbau von Kohlenwasserstoffen**

Generell werden Alkane, Alkene und Aromaten aufgrund ihrer physikalischen und chemischen Eigenschaften nur relativ langsam abgebaut. Mikroorganismen sind in der Lage, Kohlenwasserstoffe unter oxidischen und anoxischen Bedingungen als Kohlenstoffquelle und Elektronendonator zu nutzen bzw. co-metabolisch umzuwandeln.

### **2.1 Aerober Abbau von Kohlenwasserstoffen**

Der aerobe Abbau von Kohlenwasserstoffen durch Mikroorganismen ist seit langer Zeit bekannt und wurde intensiv untersucht. Die chemisch inerten Kohlenwasserstoffe können mit Hilfe von molekularem Sauerstoff aktiviert und komplett zu  $\text{CO}_2$  mineralisiert werden. Dabei dient Sauerstoff als Co-Substrat für den primären enzymatischen Angriff. Diese Form der initialen Aktivierung wird von Mono- oder Dioxygenasen katalysiert. Monoxygenasen benutzen molekularen Sauerstoff, um ein Sauerstoffatom in das Substrat einzubauen, während das zweite Sauerstoffatom mit Elektronen aus NADH oder NADPH zu Wasser reduziert wird. Dioxygenasen katalysieren den regio- und stereoselektiven Einbau von zwei Sauerstoffatomen ins Substrat (Li et al., 2002). Die Aktivierung kurzkettiger Alkane ( $\text{C}_2$ - $\text{C}_4$ ) erfolgt über terminale oder subterminale Oxidation durch Monooxygenasen (Arp, 1999; Van Ginkel et al., 1987; Hamamura und Arp, 2000). Längere *n*-Alkane werden am häufigsten durch spezifische Monooxygenasen an einer Methylgruppe aktiviert. Dadurch entsteht ein primärer Alkohol, der über das entsprechende Aldehyd zur Carbonsäure oxidiert wird. Die Aktivierung aromatischer Kohlenwasserstoffe erfolgt ebenfalls mit Hilfe von Mono- oder Dioxygenasen, abhängig von den vorhandenen Seitenketten und dem involvierten Mikroorganismus. Als zentrale Intermediate sind haupt-

sächlich Catechol, Protocatechuat oder Gentisat identifiziert worden. Dioxygenasen katalysieren anschließend eine Ring-Öffnung (Smith, 1994; Harayama und Timmis, 1992).

## 2.2 Anaerober Abbau von Kohlenwasserstoffen

Anaerobe Abbau-Prozesse werden bedeutsam, sobald die Sauerstoffkonzentration nicht mehr ausreicht, um thermodynamisch die Mineralisation von organischem Material für die Energiekonservierung zu nutzen. Dieser Sauerstoff-Grenzwert kann stark variieren, die Cytochrom-c-Oxidase beispielsweise verfügt über ein höheres unteres O<sub>2</sub>-Limit als Oxidasen, die Ubichinon als Elektronendonator nutzen. Mikroorganismen, die unter anoxischen Bedingungen leben, werden unterteilt in fakultative und obligate Anaerobier. Im Fall der fakultative Organismen handelt es sich um Nitrat-, Chlorat-, Mangan(IV)- oder Eisen(III)-reduzierende Organismen, die mit einem leicht positiven Redoxpotential und mit Spuren von molekularem Sauerstoff in einem dynamisch-offenen System leben. Auf der anderen Seite handelt es sich bei den obligaten Anaerobiern hauptsächlich um Fermentierer, Sulfatreduzierer und methanogene Organismen, die in vollständiger Abwesenheit von O<sub>2</sub> und mit einem negativen Redoxpotential von ca. -200 mV existieren können. Anaerobe Aktivierungsreaktionen von Kohlenwasserstoffen sind wenig beschrieben. Weil obligate anaerobe Kohlenwasserstoffabbauer einen vergleichsweise niedrigen Biomasse-Ertrag aufweisen, werden vorrangig fakultative Anaerobier zur Untersuchung von O<sub>2</sub>-unabhängigen Abbauwegen erforscht (Harder, 1997). Obwohl Chiang et al. (2008) zeigen konnten, dass ein identisches Proteinexpressionsmuster sowohl im anaeroben wie auch im aeroben Cholesterinabbau zu finden ist, ergeben sich in der Regel deutliche Unterschiede in der Biochemie dieser Prozesse.

Vor genau 20 Jahren gelang der eindeutige Nachweis, dass eine mikrobielle Umsetzung von aromatischen Kohlenwasserstoffen in Abwesenheit von Sauerstoff möglich ist (Lovley et al., 1989). Seitdem folgten weitere Isolierungen von Bakterien, die Kohlenwasserstoffe unter anoxischen Bedingungen als Kohlenstoffquelle und Elektronendonator nutzen können (Lovley und Lonergan, 1990; Aeckersberg et al., 1991; Schocher et al., 1991; Rabus et al., 1993; Rueter et al., 1994; Beller et al., 1996; Foss et al., 1998; So und Young, 1999; Ehrenreich et al., 2000). Alkane, z. B. *n*-Hexan, und aromatische Kohlenwasserstoffe mit Alkylsubstituenten, wie Toluol, werden anaerob mittels eines Glycinradikalenzym aktiviert. Dabei wird das entstandene Substratradikal an Fumarat addiert, was zur Bildung



von Methylalkylsuccinat bzw. von Benzylsuccinat führt (Evans et al., 1992; Rabus et al., 2001; Heider, 2007). Die Benzylsuccinat-Synthase wurde mehrfach als verantwortliches Enzym im anaeroben Toluol-Aktivierungsschritt identifiziert (Biegert et al., 1996; Coschigano et al., 1998; Leuthner et al., 1998; Beller und Spormann, 1999). Des Weiteren hydroxylieren verschiedene Molybdän-Enzyme anaerob Ethylbenzol (Kloer et al., 2006) und Cholesterin (Chiang et al., 2007). Die Ethylbenzol-Dehydrogenase katalysiert die O<sub>2</sub>-unabhängige und stereospezifische Hydroxylierung des Ethylbenzol zu 1-Phenylethanol, welches weiter zu Acetophenon oxidiert wird (Kniemeyer und Heider, 2001; Johnson et al., 2001). Auch für Cholesterin wird eine O<sub>2</sub>-unabhängige Hydroxylierungsreaktion vorgeschlagen. Hier könnte die Aktivierung am endständigen, tertiären C-Atom erfolgen. Ein weiteres Beispiel für anaerobe Aktivierungsreaktionen von Kohlenwasserstoffen lieferte der sulfatreduzierende Stamm NaphS2. Dieser ist fähig, den polyaromatischen Kohlenwasserstoff Naphthalin komplett zu CO<sub>2</sub> zu mineralisieren. Erste Ergebnisse zum initialen Reaktionsmechanismus weisen auf eine anaerobe Aktivierung von Naphthalin durch Carboxylierung hin (Galushko et al., 1999; Musat et al., 2009). Auch der anaerobe Abbau von Alkenen wurde bereits untersucht. In methanogenen Anreicherungskulturen wurde der Abbau von *n*-Hexadecen nachgewiesen (Schink, 1985). Der Autor schlug eine Hydratisierung der endständigen Doppelbindung zum korrespondierenden primären Alkohol als Initialreaktion des sauerstoffunabhängigen Abbaus von Alkenen vor. Auch ein denitrifizierendes, marines Bakterium wurde mit *n*-Heptadecen als Elektronendonator und Kohlenstoffquelle bereits isoliert (Gilewicz et al., 1991).

### **2.3 Abbau von Monoterpenen**

Monoterpene besitzen in hohen Konzentrationen toxische Eigenschaften. Welche physiologischen Effekte hierfür verantwortlich sein können, wurde in Abschnitt 1.3 beschrieben. Generell sind Monoterpenoide toxischer als nicht-oxygenierte Monoterpene, der Grund dafür sind die reaktiveren Keto- und Aldehydgruppen (Harder et al., 2000). Unterhalb der toxischen Konzentrationen können Monoterpene von Aerobiern und denitrifizierenden Mikroorganismen mineralisiert werden (Harder und Probian, 1995; Harder et al., 2000). Die aerobe Mineralisation von Monoterpenen wurde bisher detailliert in *Pseudomonas* Spezies untersucht (Seubert, 1960; Seubert und Remberger, 1963; Seubert et al., 1963; Trudgill, 1986; Förster-Fromme und Jendrossek, 2008). Auch hier sind Oxygenasen

involviert, die Hydroxylierungsreaktionen katalysieren und Sauerstoff als Co-Substrat verwenden (Hartmans et al., 1991; van der Werf et al., 1999). Der weitere Abbau der entstandenen Säuren weist hohe Ähnlichkeiten zum Leucin-Abbaupfad auf. Die Biochemie und Genetik der Operone für den Abbau zyklischer Terpene (*atu*) und der Leucin/Isovalerat Mineralisation (*liu*) wird zur Zeit intensiv für *Pseudomonas citronellolis* und *P. aeruginosa* untersucht (Aguilar et al., 2006; Förster-Fromme et al., 2008).

Die anaerobe Mineralisation von Monoterpenen wurde zuerst in denitrifizierenden Anreicherungen beschrieben (Harder und Probian, 1995). In weiteren Arbeiten führten Anreicherungskulturen zur Identifikation der Species *Alcaligenes defragrans* (Foss et al., 1998) und *Thauera terpenica* (Foss und Harder, 1998). In späteren taxonomischen Studien kam es zur Neugruppierung von *A. defragrans* in den kürzlich definierten Genus *Castellaniella* als *C. defragrans* (Kämpfer et al., 2006). Erste Metabolitstudien zum potenziellen Abbaupfad wiesen Isoterpinolen als nicht weiter abbaubares Metabolit nach (Heyen und Harder, 1998). In den isolierten Stämmen *Thauera terpenica* und *T. linaloolentis* zeigten erste Experimente eine neuartige Allylalkohol-Isomerase-Aktivität (Foss und Harder, 1997; Foss und Harder, 1998). Geraniumsäure wurde als erstes ionisches Intermediat in Nitrat-veratmenden Zellen nachgewiesen, die auf azyklischen oder zyklischen Monoterpenen, wie Myrcen bzw. Limonen wuchsen (Heyen und Harder, 2000). Geraniol diente in geringer Konzentration ( $\leq 2$  mM) als Wachstumssubstrat für *C. defragrans* und wurde weiter zu Geranial oxidiert (M. Timke, 2000). Postuliert wurde daraufhin eine Oxidation des Alkohols über das Aldehyd zur Geraniumsäure. Die Geraniol-Dehydrogenase katalysiert den ersten Oxidationsschritt und wurde bereits isoliert. Mittels N-terminaler Proteinsequenzierung konnte das korrespondierende Gen identifiziert werden. Darüber hinaus konnte im zellfreien dialysierten Extrakt gezeigt werden, dass ohne verfügbaren Elektronenakzeptor, wie  $\text{NAD}^+$  oder  $\text{NADP}^+$ , Geraniol erst zu Linalool und wenig später weiter zu Myrcen umgesetzt wird. Beide Verbindungen konnten mittels Gaschromatographie und GC-Massenspektrometrie nachgewiesen werden (Harder, unveröffentlichte Ergebnisse). Diese Resultate führten zum postulierten anaeroben Myrcenmetabolismus (Abb. 3).

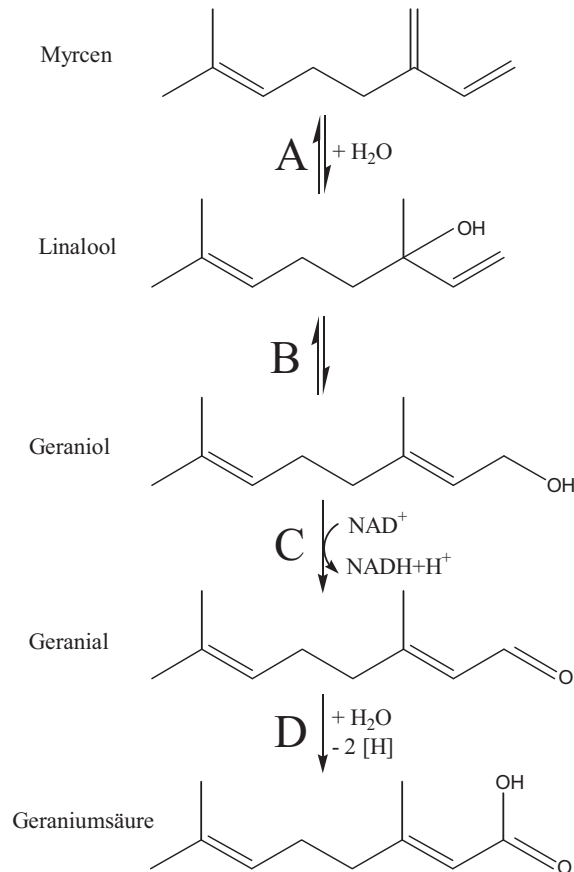


Abb. 3: Postulierter anaerober Metabolismus von Myrcen in *C. defragrans*.  
 A Linalool-Dehydratase, B Geraniol-Isomerase, C Geraniol-Dehydrogenase und D Geranial-Dehydrogenase. Die gebildete Geraniumsäure wird durch  $\beta$ -Oxidation weiter abgebaut.

Als initiale Reaktion im Abbauweg wird eine Hydratisierung des Myrcens vorgeschlagen. Dabei wird die Hydroxylgruppe des Wassers an die nicht-polarisierte Doppelbindung des C3-Atoms vom Myrcen (7-Methyl-3-methylene-1,6-octadien) addiert. Es entsteht der tertiäre Alkohol Linalool (3,7-Dimethyl-1,6-octadien-3-ol), der mittels einer Isomerase-Reaktion zum Allylalkoholstereoisomer Geraniol (3,7-Dimethyl-octa-2,6-dien-1-ol) umgesetzt wird. Vergleichbare Hydratisierungsreaktionen wurden bereits für die Hydroxyneurosporen-Hydratase aus *Rhodobacter capsulatus* (Armstrong et al., 1989), für die  $\alpha$ -Terpineol-Dehydratase von *Burkholderia* (ex. *Pseudomonas*) *gladioli* (Cadwallader et al., 1992) und für die Carotinoid-1,2-Hydratase aus *Rubrivivax gelatinosus* (Steiger et al., 2002 und 2003) beschrieben. Seit kurzem wird für die Biosynthese des Carotinoids Isorenieraten ein vergleichbarer Mechanismus vorgeschlagen (Maresca et al., 2008). Eine weitere

re Besonderheit der postulierten Hydratisierung wird durch die chemische Beschaffenheit des Substrats deutlich. Bevor Dehydratasen in reversiblen Eliminierungsreaktionen  $\alpha$ -Hydroxygruppen in Substrate einfügen oder entfernen, werden die  $\beta$ -Hydroxysäuren an CoASH oder ACP verestert (Buckel et al., 2005). Nicht alle Hydratase/Dehydratase-Substrate verfügen über solche CoA- oder ACP-Reste. Die Diol-Dehydratase benötigt keine aktivierten Substrate, sie katalysiert die Wasserspaltung über radikalische Zwischenstufen.

Myrcen verfügt hingegen weder über Gruppen, die induktive bzw. mesomere Effekte bewirken könnten, noch ist eine Aktivierung über einen Thioester möglich. Die Polarität im Molekül wird demnach ausschließlich von den Methylengruppen bzw. den  $\pi$ -Doppelbindungen zwischen den Kohlenstoff-Atomen hervorgerufen.

## **B Aufgabenstellung der Arbeit**

Im Mittelpunkt dieses Promotionsvorhabens standen die Umsetzungen von Geraniol und Linalool durch nitratreduzierende Bakterien. Erste Reinigungsversuche durch Jens Harder (persönliche Mitteilung) und Frauke Germer (2006) hatten eine Stabilität der Enzymaktivitäten Linalool-Dehydratase und Geraniol-Isomerase aus *C. deffragrans* 65Phen aufgezeigt. Aufbauend auf der Massenzucht im Fermenter (Heyen und Harder, 2000) sollte die Linalool-Dehydratase homogen gereinigt werden und das Gen oder die Gene für die Enzymaktivität kloniert und sequenziert werden. Als zweites Ziel wurde die Reinigung der Geraniol-Isomerase und die Klonierung des Gens angestrebt. Die gereinigten Enzyme sollten umfangreich biochemisch charakterisiert werden. Im Rahmen der Arbeit waren erste Versuche zum Geraniol- und Linalool-Metabolismus in anderen Monoterpenabbauenden Stämmen erwünscht.

## C Ergebnisse und Diskussion

### 1. Enzymaktivitäten im Rohextrakt

Der lösliche und zellfreie Rohextrakt von *C. defragrans* 65Phen ist fähig, den Allylalkohol Geraniol in zwei Richtungen zu transformieren. In Gegenwart von  $\text{NAD}^+$  wurde NADH gebildet, was auf das Vorhandensein einer Geraniol-Dehydrogenase hindeutet. Das Enzym wurde gereinigt und die genomische Umgebung der Geraniol-Dehydrogenase aus Fosmidklonen sequenziert (Harder, persönliche Mitteilung; Timke, 2000; Germer, 2006). Enthält der dialysierte Rohextrakt keinen Elektronenakzeptor, findet eine Isomerisierung des Geraniols zum tertiären Alkohol Linalool statt. Erreicht Linalool eine bestimmte Konzentration, wird nach einiger Zeit auch das nicht-funktionalisierte Myrcen gebildet. Beide Verbindungen wurden mittels Gaschromatographie und GC-Massenspektrometrie (GC-MS) identifiziert. Ausgehend vom Linalool wird das Monoterpene ausschließlich zu Myrcen dehydratisiert.

Für detailliertere Beschreibungen der Enzymaktivitäten mussten die Enzyme jedoch erst isoliert werden. Beide Enzymaktivitäten wurden aus dem zellfreien Rohextrakt gereinigt. Neben einer Dehydratase-Aktivität von  $7,6 \text{ mU mg}^{-1}$  im cytosolischen Rohextrakt wurde ein geringer Umsatz ( $0,2 \text{ mU mg}^{-1}$ ) auch in solubilisierten Membranfraktionen nachgewiesen.

### 2. Reinigung der Linalool-Dehydratase und der Geraniol-Isomerase

Die Reinigung der Linalool-Dehydratase ergab zunächst trotz wechselnder pH- und Pufferbedingungen und einer Variation des verwendeten Säulenmaterials eine aktive Proteinfraktion mit mehreren Proteinen. SDS-PAGE-Analysen zeigten drei dominante Proteine mit einer Molekularmasse von 55, 40 und 28 kDa (Abb. 4). Eine Trennung dieser Proteine gelang nicht, sie eluierten immer gemeinsam von der jeweiligen Reinigungssäule. Daher wurden alle drei Proteine N-terminal sequenziert. Interne Sequenzen wurden zusätzlich von dem 55 kDa und 28 kDa-Protein bestimmt (Tab. 1).

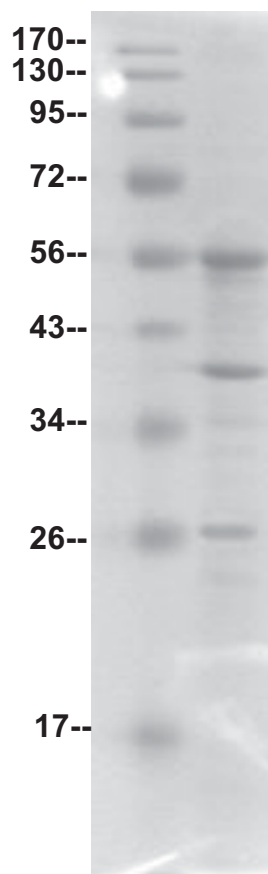


Abb. 4: Ergebnis der ersten Reinigungsversuche der Linalool-Dehydrogenase-Aktivität. Die drei dominanten Peptide (55, 40 und 28 kDa) wurden auf eine PVDF-Membran geblottet (Bio-Rad, Semiplot). Die linke Bahn zeigt einen Proteinmarker (PageRuler Plus, Fermentas).

Tab. 1: N-terminale und interne Sequenzen der drei Proteine

Peptide	N-terminale Sequenzen	interne Sequenzen
55 kDa	SDIPRVPLLIGG	QIMVDFAQLLR
40 kDa	AELPPGRLATTE	nicht bestimmt
28 kDa	PEAASAPGSGN	TGSVEELIQAFIK

Ein signifikanter Fortschritt in der Reinigung gelang, als bei Anwendung einer hydrophoben-Interaktionschromatographie mit Butylsepharose als Säulenmaterial in der Regenerierungsfraction (6 M Harnstoff) nach Dialyse Enzymaktivität gefunden wurde. Die Reinigung an der Butylsepharose ermöglichte einen Zugang zum homogen-gereinigten Enzym

(Abb. 5). Die Wiederherstellung der vollen Enzymaktivität nach der Elution mit 6 M Harnstoff und einer Dialyse gegen 80 mM Tris-HCl, pH 8.0, veranlasste ein Studium der Entfaltung und Faltung des Enzyms.

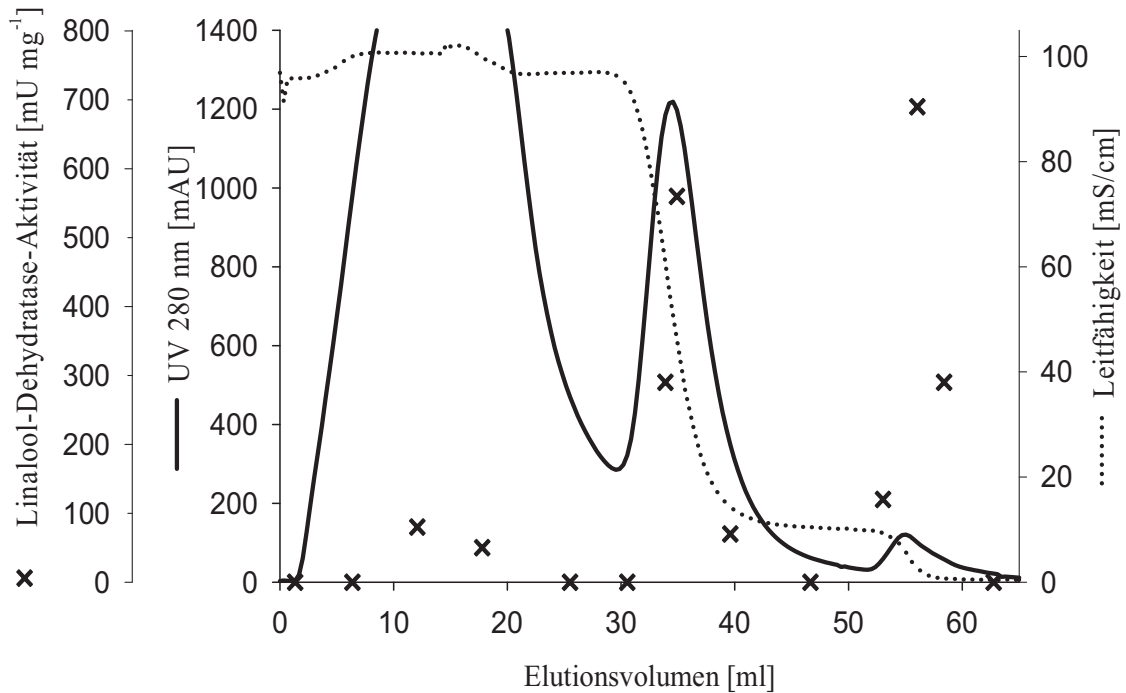


Abb. 5: Reinigung der Linalool-Dehydratase durch hydrophobe-Interaktionschromatographie an Butylsepharose. Die spezifischen Enzymaktivitäten waren nach Dialyse in den Fraktionen 30-40 ml (Elution mit 80 mM Tris-HCl, pH 8.0) 585 mU mg<sup>-1</sup> und in den Fraktionen 52-58 ml (Elution mit 6 M Harnstoff) 695 mU mg<sup>-1</sup>.

Das durch diesen Schritt optimierte fünfstufige Reinigungsprotokoll ergab eine aktive Proteinfraction mit einer einzigen Proteinbande von 40 kDa (Manuskript 1, Fig. 2 B). Durch Gelfiltration auf einer Superdex<sup>TM</sup>200-pg-Säule (GE Healthcare) und mittels Kalibrierung durch Standardproteine wurde eine native Molekularmasse des Holoenzym von 160 kDa bestimmt. Die Linalool-Dehydratase ist dementsprechend als Homotetramer aktiv und besitzt eine  $\alpha_4$ -Proteinkonformation.

Im ersten Schritt zur Reinigung der Geraniol-Isomerase wurden alle Fraktionen auf Geraniol-Isomerase-Aktivität überprüft. Während der gesamten Reinigung zeigte sich eine Koexistenz beider Aktivitäten (Manuskript 1, Fig. 4). Auch die Proteinfraction, die laut



SDS-PAGE aus nur einem Protein bestand, wies im Assay beide Enzymaktivitäten auf. Daher wurde als Name für das Enzym „Linalool-Dehydratase-Isomerase“ gewählt.

### **3. Klonierung der Gene und Sequenzanalyse der Linalool-Dehydratase-Isomerase und co-gereinigter Enzyme**

Zur Identifizierung der korrespondierenden Gene in der genomischen DNA-Sequenz von *C. defragrans* wurden die gereinigten Proteine (Abb. 4) auf Membranen geblottet. Die Proteinbanden wurden ausgeschnitten und mittels Edman-Abbau (Edman, 1950) N-terminal sequenziert (Toplab GmbH, Martinsried). Von den 28 und 55 kDa-Proteinen wurden zusätzlich interne Sequenzen nach einem Proteinverdau mit Trypsin gewonnen (Tab. 1). Während das Leseraster des 40 kDa Proteins, also der Linalool-Dehydratase-Isomerase, auf einer existierenden 50 kb-Contigsequenz vorhanden war (Germer, 2006), wurden die anderen Gene kloniert. Aus den Proteinsequenzen wurden unter Berücksichtigung des Codongebrauchs von *C. defragrans* degenerierte Primer (max. 124fach degeneriert) für den N-terminus und die interne Proteinsequenz erstellt. Das erhaltene PCR-Amplicon stellte allerdings nur einen Teil des Gens dar, daher wurde es in *E. coli* kloniert und sequenziert. Aus der Sequenz wurden spezifische Primer abgeleitet, mit denen in einer bestehenden *C. defragrans*-Fosmid-Klonbank durch PCR-Screening die Klone mit den gesuchten Sequenzen identifiziert wurden. Die Sequenzierung der Fosmid-Enden zeigte eine Überlappung der Klone für das 28 kDa-Protein mit dem 50 kb-Fragment, dass neben der Geraniol-Dehydrogenase auch die Linalool-Dehydratase-Isomerase beinhaltet. Die Fosmid-DNA wurde isoliert und mittels Endonuklease-Verdau einer Größenbestimmung unterzogen. Eine anschließende Sequenzanalyse der Fosmide erfolgte im Max-Planck-Institut für Molekulare Genetik, Berlin.

Die N-terminale Proteinsequenz der Linalool-Dehydratase-Isomerase stimmt mit der internen Sequenz eines Gens für ein bislang unbekanntes Protein in einer bereits annotierten 50 kb-Contigsequenz von *C. defragrans* überein. Das Contig beinhaltet einige Gene, die erst durch das Zellwachstum auf Monoterpenen zur Proteinbiosynthese genutzt werden (Germer, 2006). SignalP 3.0 (Bendtsen et al., 2004) interpretierte das Gen der Linalool-Dehydratase-Isomerase als ein Vorläufer-Protein mit dem N-terminalen Signalpeptid: MRFTLKTTAIVSAAALLAGFGPPPR~~AA~~. Das hervorgehobene Alanin-Paar stellt die

Spaltstelle dar, an der Signalpeptid und reifes Protein getrennt werden. Diese Vorhersage deckt sich mit dem experimentell bestimmten N-Terminus des reifen Proteins (Tab. 1). Dieser beginnt exakt mit dem zweiten Alanin-Rest der Spaltstelle. Die Leader-Sequenz wird für die Translokation eines ungefalteten Proteins über die innere Membran benötigt. Dabei könnte es sich um einen Sec-abhängigen Translokationsmechanismus handeln (von Heijne, 1983). Innerhalb dieses komplexen enzymatischen Vorgangs interagieren verschiedene Transportproteine und Chaperon-Faltungshelfer miteinander. Das im Reinigungsprotokoll isolierte und 40 kDa große Protein stellt somit das aktive bzw. reife Enzym dar. In einem modifizierten Reinigungsschema war es möglich, sowohl das aktive Protein als auch ein um 3 kDa größeres Protein zu erhalten. Letzteres könnte das Vorläufer-Protein sein. Die durch SDS-PAGE-Analyse gewonnenen Molekulargrößen stimmten exakt mit den *in silico* berechneten Massen überein. Eine physiologische Erklärung für den Export eines Kohlenwasserstoff-transformierenden Enzyms liegt möglicherweise in der toxischen Wirkung der Substrate (Abschnitt 1.2). Die verwertbaren Monoterpene der Linalool-Dehydratase-Isomerase besitzen aufgrund ihres stark lipophilen Charakters eine hohe Toxizität. Eine Umwandlung von Myrcen in das toxischere, aber abbaubare und weniger in der Membran gelöste Geraniol außerhalb der energetisierten inneren Membran ist ein Beitrag zur Toleranz der Zelle gegenüber Monoterpenen. Die periplasmatische Lokalisation konnte bereits für die Oxidation von Ethylbenzol zu (*S*)-1-Phenylethanol im denitrifizierenden Stamm *Azoarcus sp.* EbN1 (*Aromatoleum aromaticum* EbN1) gezeigt werden. Die Datenbank-Recherchen ergaben für das Gen der Linalool-Dehydratase-Isomerase nur Übereinstimmungen mit uncharakterisierten und hypothetischen Leserastern (ORFs). Höchste, aber immer noch unsignifikante, Übereinstimmung wies ein hypothetisches partielles mRNA-Protein des Ascomyceten *Aspergillus oryzae* auf (E-Wert: 2e-08). Auch direkte Alignments mit den zu Anfang vorgestellten Carotinoidhydratasen und Hydroxyneurosporensynthasen zeigten keine nähere Verwandtschaft. Somit wird auch auf Basis der DNA-Sequenz die Neuartigkeit dieses Enzyms deutlich.

Die Leseraster der in der ersten Reinigung mitgereinigten Proteine wurden in den Fosmidsequenzen identifiziert. Die Fosmidsequenzen tragen neben den Genen für die beiden gereinigten Proteine auch große flankierende Bereiche des unbekanntes *C. defragrans*-Genoms. Das 33 kb-Fosmid mit dem Gen des 55 kDa-Proteins und das 35 kb-Fosmid mit

dem Gen des 28 kDa-Proteins werden zur Zeit in der Arbeitsgruppe annotiert und auf weitere putative Enzyme im anaeroben Monoterpen-Abbau untersucht.

BLASTP-Analysen ergaben für das 28 kDa-Protein eine hohe Ähnlichkeit zur Naphthoatsynthase von *Ralstonia eutropha* H16 mit einem E-Wert von  $2e-73$  und einer Übereinstimmung von 76%. Ein weiterer signifikanter Treffer war die Hydroxycyclohexancarboxyl-CoA-Dehydrogenase von *Leptothrix cholodnii* SP-6 mit einem E-Wert von  $1e-70$  und einer Identität von 73%. Die Naphthoatsynthase bzw. Dihydroxynaphthoatsynthetase (EC: 4.1.3.36) besitzt eine Masse von ca. 185 kDa. Sie ist als trimeres Enzym aktiv (Johnston et al., 2005) und katalysiert die Aktivierung von 1,4-Dihydroxy-2-naphthoat mit CoASH zum Succinylbenzoyl-CoA-Thioester. Es handelt sich um ein ausschließlich in Bakterien vorkommendes Enzym, welches in die Menaquinon-Biosynthese involviert ist. Menaquinon (Vitamin K) ist ein wesentlicher Elektronentransporter in der Elektronentransfer-Kette während des anaeroben Wachstums.

BLASTP-Analysen mit dem Gen des 55 kDa-großen Proteins ergaben eine sehr hohe Ähnlichkeit zu putativen Oxidoreduktasen mehrerer *Bordetella*-Spezies mit E-Werten von  $\geq 0$  und einer Identität von 82%. Dieses Genus steht *Castellaniella* taxonomisch sehr nahe und lässt einen homologen Ursprung des Proteins vermuten. Ähnlich hohe Werte (E-Werte von  $\geq 0$ , Identität von 80%) wurden in einer Sequenz des Betaproteobakteriums *Methylibium petroleiphilum* PM1 (Lechner et al., 2007) gefunden. Das Bakterium mineralisiert aerob tertiäre Kohlenwasserstoffe, z. B. Methyl-tert-butylether. Das gefundene Gen kodiert für eine Methylmalonat-Semialdehyd-Dehydrogenase (EC: 1.2.1.27). Dieses tetramere und 220 kDa große Protein kommt ausschließlich in bakteriellen Zellen und Säugetierzellen vor und ist im späteren Valin-Katabolismus involviert. Dort katalysiert es die Oxidation verschiedener aliphatischer und aromatischer Aldehyde. Der Semialdehyd von S-Methylmalonat wird decarboxyliert und unter  $\text{NAD}^+$ -Reduktion und CoA-Aktivierung zum Propionyl-CoA oxidiert.

Sowohl das Gen des 55 kDa Proteins als auch das Gen des 28 kDa-großen Proteins zeigen typische Sequenzmuster der Crotonase-Superfamilie, zu der auch die meisten Hydratasen/Dehydratasen, wie etwa die Enoyl-Dehydratasen gehören. Die DNA-Sequenz des 28 kDa Proteins besitzt darüber hinaus eine charakteristische Enoyl-CoA-Hydratase/Isoomerase-Konsensussequenz (Pfam-Proteinfamilien Datenbank, Banfield et al., 1998):

[LIVM]-[STAG]-x-[LIVM]-[DENQRHSTA]-G-x(3)-[AG](3)-x(4)-[LIVMST]-x-[CSTA]-[DQHP]-[LIVMFYA]. Die unterstrichenen Aminosäure-Reste wurden in der *C. defragrans* Sequenz gefunden.

#### 4. Charakterisierung der gereinigten Enzymaktivitäten

##### 4.1 Bestimmung der Reaktionsgeschwindigkeit und Substrataffinität

Die geringe Wasserlöslichkeit der Substrate der Linalool-Dehydratase-Isomerase bedeutet gleichzeitig eine große Schwierigkeit für die Messung der Aktivität. Ein lösliches Protein des löslichen Extraktes katalysiert Reaktionen an stark hydrophoben Substraten. Die Löslichkeit der Monoterpene ist in der wässrigen Phase sehr gering. Myrcen besitzt eine Wasserlöslichkeit von nur 43  $\mu\text{M}$  und mit einem  $\log P$ -Wert von 4,5 einen relativ hohen Octanol/Wasser-Verteilungskoeffizienten (Fichan et al., 1999). Im Verhältnis dazu verfügen die Monoterpen-Alkohole Geraniol und Linalool mit 12,3 mM über eine weitaus höhere Wasserlöslichkeit (van der Werf et al., 1997).

Zur Bestimmung der Enzymaktivität hatte sich ein Zwei-Phasen-Assay als geeignet erwiesen. In diesem Reaktionsansatz befindet sich oberhalb der wässrigen Proteinpuffer-Lösung eine aus 2,2,4,4,6,8,8-Heptamethylnonan bestehende organische Trägerphase. Diese Phase bildet ein Reservoir für Myrcen und die Monoterpenoide und hält somit die Konzentration in der wässrigen Phase stets im Gleichgewicht. Im Gegensatz zu den später durchgeführten kinetischen Messungen wurde im Zwei-Phasen-Assay ein längerer Reaktionszeitraum bemessen (12-20 h) und ausschließlich die HMN-Phase gaschromatographisch analysiert. Thermodynamisch wird eine Dehydratisierung des Linalools gegenüber der Hydratisierung des Myrcens begünstigt. Im enzymatischen Assay mit Linalool als Substrat wurde eine Akkumulation von Myrcen mit einem Linalool:Myrcen-Verhältnis von 1:19 beobachtet. In Anbetracht der Löslichkeitswerte von Linalool und Myrcen (Fichan et al., 1999) und den Ergebnissen der Aktivitätsbestimmung besitzt Myrcen eine um  $7,5 \text{ kJ mol}^{-1}$  höhere Stabilität als Linalool. Eine Myrcen-Hydratisierung konnte nur gezeigt werden durch die Etablierung einer myrcengesättigten wässrigen Phase, welche mit einer reinen organischen Myrcenphase überschichtet wurde. Die Aktivitätsrate war unter diesen Bedingungen mit  $8,1 \text{ mU mg}^{-1}$  für die Myrcen-Hydratisierung jedoch relativ gering. In diesem Ansatz stellte sich ein Linalool:Myrcen-Verhältnis von 1:51 ein, entsprechend wurde eine um

10,1 kJ mol<sup>-1</sup> höhere Stabilität des Myrcens bestimmt. Allerdings wurde die höchste Linaloolkonzentration nicht erreicht, da Linalool im Reaktionsansatz mit einem Umsatz von 8,4 mU mg<sup>-1</sup> weiter zu Geraniol isomerisiert wurde.

Für kinetische Enzymmessungen konnte die relativ geringe Löslichkeit der Substrate im 80 mM Tris-HCl-Puffer, pH 9.0 durch die Zugabe von 10% (v/v) DMSO um den Faktor fünf erhöht werden. Erst durch diese Veränderungen im Versuchsaufbau konnten Reaktionsprodukte im Gaschromatographen bereits fünf Minuten nach der Substratzugabe nachgewiesen werden. Beide Enzymaktivitäten, die Linalool-Dehydratase und die Geraniol-Isomerase, zeigten eine typische Michaelis-Menten-Enzymkinetik mit  $V_{\max}$ -Werten von 8,4 bzw. 24,6 U mg<sup>-1</sup>. Die Michaelis-Menten-Konstante ( $K_m$ ) gibt Aufschluss über die Substrataffinität eines Enzyms. Sie steht für eine Substratkonzentration, die einer halbmaximalen Enzymrate entspricht. Bei einer typischen Michaelis-Menten-Enzymkinetik sind mit dieser Substratkonzentration 50% aller aktiven Zentren eine Bindung mit dem Substrat eingegangen. Die ermittelten Werte zeigen eine etwas höhere Bindungsaffinität zu Geraniol (500  $\mu$ M) im Vergleich mit Linalool (750  $\mu$ M). Andere zyklische und azyklische Monoterpene konnten bisher nicht als Substrate der Linalool-Dehydratase-Isomerase identifiziert werden. Weder  $\alpha$ - und  $\beta$ -Ocimen noch die Monoterpenoide Citronellol und Nerol wurden transformiert. Bei Ocimen handelt es sich um ein Stereoisomer des Myrcens, dem jedoch die Methylengruppe an der C3-Position fehlt. Citronellol besitzt hingegen keine Doppelbindung am C2-Atom. Nerol stellt das Trans-Isomer von Geraniol dar. Es kann davon ausgegangen werden, dass neben einer cis-Isomerkonfiguration die Methylengruppe in der C3-Position bzw. die Doppelbindung am C2-Atom notwendige Voraussetzungen für die Aktivität sind.

#### **4. 2 Einfluss von Cofaktoren und anderen Chemikalien**

Die anfängliche Annahme von zwei unabhängigen Enzymen im anaeroben Metabolismus von Myrcen wich der Hypothese eines bifunktionalen Enzyms. Die Wasseraddition an Myrcen, die zu Linalool führt und die anschließende Isomerisierung zu Geraniol wird von der Linalool-Dehydratase-Isomerase katalysiert. Das UV/VIS-Absorptionsspektrum zeigte keine Absorptionsmaxima zwischen 300 und 850 nm. Darüber hinaus hatte die Zugabe des Metall-Komplexierungsmoleküls EDTA (5 mM) im Assay keinen Einfluss auf die Enzymaktivität (Tab. 2). Während der Proteinreinigung befand sich das Protein in Ge-

genwart von 6 M Harnstoff. Noch zu beschreibende Experimente zeigten eine Entfaltung des Enzyms bei diesem Harnstoffgehalt. Die Aktivität konnte jedoch durch das anschließende Entfernen des Harnstoffs und ohne die Zugabe von Zusätzen wieder vollständig hergestellt werden. Somit scheinen weder prosthetische Gruppen noch Metallionen für die Enzymaktivität eine Rolle zu spielen. Demnach katalysiert die Linalool-Dehydratase-Isomerase eine cofaktorunabhängige Reaktion. Einige Zusätzen, wie DTT und molekularer Sauerstoff, beeinflussten beide Enzymaktivitäten (Tab. 2). Coenzym B<sub>12</sub> und Pyridoxalphosphat hingegen wirkten ausschließlich stimulierend bzw. hemmend auf die Linalool-Dehydratase-Aktivität.

Tab. 2: Enzymaktivität in An- und Abwesenheit von verschiedenen Effektormolekülen. Der vollständige Assay enthielt 150 µl 100 mM Monoterpen gelöst in HMN und 150 µl Proteinlösung (0.05-5 mg/ml) inklusive 2 mM DTT. Unter anoxischen Bedingungen wurde schüttelnd und bei 35°C inkubiert.

Effektor	Konzentration	Relative Linalool-Dehydratase-Aktivität [%]	Relative Geraniol-Isomerase-Aktivität [%]
Standard-Enzymassay		100	100
Coenzym B <sub>12</sub>	8 µM	190	100
Vitamin B <sub>12</sub>	8 µM	100	100
ATP/MgSO <sub>4</sub>	je 3 mM	100	120
Coenzym A	8 µM	100	100
ohne DTT	- 2 mM	10	10
Ti(III)-Citrat	1 mM	0	0
O <sub>2</sub>	0,1% (v/v)	100	100
	0,5% (v/v)	110	110
	1% (v/v)	90	90
	20% (v/v)	5	5
	99.9% (v/v)	0	0
Pyridoxalphosphat, pH 7.0	1 mM	65	100
<i>S</i> '-Adenosylmethionin	40 mM	20	500
KNO <sub>3</sub>	20 mM	100	100
KNO <sub>2</sub>	20 mM	100	100
DMSO	10% (v/v)	100	100
EDTA	5 mM	100	100

Die Annahme, es handelt sich um ein bifunktionales Enzym wird auch durch die Reaktion nach Zugabe von *S*-Adenosylmethionin (SAM) bestätigt. Parallel zur Hemmung der Linalool-Dehydratase-Aktivität wurde die Geraniol-Isomerase-Aktivität erhöht. Das Coenzym

B<sub>12</sub> verfügt, ähnlich dem SAM, über einen Adenosylrest. Dieser könnte allosterisch mit dem Enzym interagieren und im Falle des Coenzym B<sub>12</sub> die Enzymaktivität erhöhen. SAM könnte diese Bindungstasche ebenfalls besetzen, was zu einer verminderten Coenzym B<sub>12</sub>-Enzym-Wechselwirkung und somit zu einer geringeren Linalool-Dehydratase-Aktivität führen würde. Diese Annahme wurde durch die Zugabe von Vitamin B<sub>12</sub>, das statt des 5'-Adenosylrestes eine Cyanogruppe trägt und keinen Einfluss auf die Enzymaktivität besaß, bestätigt.

Im Allgemeinen katalysieren Coenzym B<sub>12</sub>-abhängige Enzyme Isomerisierungsreaktionen im Kohlenstoffgerüst ihrer Substrate. Dabei kommt es in der Regel zu intramolekularen Umlagerungen zwischen den C2- und C3-Atomen (Brown, 2005). Einige besonders gut untersuchte Vertreter sind die Glutamat-Mutase, die Methylenglutarat-Mutase und die Methylmalonyl-CoA-Mutase (Banerjee, 2003). Diese Enzyme katalysieren in Bakterien zentrale Stoffwechselwege, u. a. im Metabolismus von organischen Säuren.

Die Ursache für den stimulierenden Effekt des Coenzym B<sub>12</sub> und den kompetitiven oder nicht-kompetitiven Effekt von SAM auf die Linalool-Dehydratase-Aktivität ist gegenwärtig unklar und bedarf weiterer Untersuchungen. Coenzym B<sub>12</sub> könnte einen Aktivierungs- bzw. Reparaturmechanismus auslösen, der die Umsetzungsrate und Langlebigkeit des Enzyms erhöht. Ähnliche Reaktivierungsmechanismen sind z. B. für B<sub>12</sub>-abhängige Ethanolamin-Ammonium-Lyasen beschrieben (Mori et al., 2004). In diesem speziellen Fall ist die Zugabe von ATP und divalenten Kationen jedoch zwingend notwendig. Ein ähnlicher Reaktivierungsmechanismus wurde auch für die Glycerol-Dehydratase und Diol-Dehydratase beobachtet (Honda et al., 1980). Allerdings handelt es sich hier um Enzyme, für deren Aktivität Coenzym B<sub>12</sub> als Cofaktor essenziell ist.

### **4. 3 Einfluss von redoxaktiven Thiolgruppen**

Die gereinigte Linalool-Dehydratase-Isomerase benötigt ausschließlich DTT als Reduktionsmittel und eine O<sub>2</sub>-freie Umgebung (<1% v/v) für die Dehydratase-Isomerase-Reaktion. Diese beiden Moleküle könnten redoxaktive Thiolgruppen verändern, die für ein funktionales Enzym entscheidend sind. Interessanterweise wird durch die Zugabe von 1 mM Titan(III)-Citrat die katalytische Aktivität des Enzyms vollständig gehemmt. Ti(III)-Citrat besitzt ein um 150 mV niedrigeres Redoxpotenzial als DTT und mit -480 mV gehört es zu einem der stärkeren Reduktionsmittel in der anorganischen Chemie, das

auch in der Mikrobiologie Anwendung findet (Zehnder und Wuhrmann, 1976). Anfällig für derartige reversible Redoxreaktionen sind v. a. die Thiolgruppen der Cysteine. Für die Enzymaktivität ist es oft von entscheidender Bedeutung, in welchem Redoxzustand sie sich befinden. In Abhängigkeit der herrschenden Redox-Bedingungen können diese Sulfhydrylgruppen zu Sulfensäuren oder Disulfiden oxidiert werden. Die Linalool-Dehydratase-Isomerase scheint ein Redox-sensitives Protein zu sein. Es besitzt vier Cysteinreste an den Aminosäurepositionen 74, 127, 196 und 205, die zwei redox-aktive Disulfide im aktiven Zentrum bilden bzw. von entscheidender Bedeutung für die Proteinkonformation sein könnten. Diese Thiolgruppen könnten auch direkt im Reaktionsmechanismus für die Transformation von Linalool zu Geraniol beteiligt sein, in dem sie durch ihre verschiedenen Redoxzustände die Isomerisierungsreaktion der Hydroxylgruppe durch Stabilisierung der Zwischenstufen ermöglichen. Die bereits beschriebene Zugabe eines starken Reduktionsmittels, wie Ti(III)-Citrat, oder eine vollständige Oxidation der Cystin-Bindungen durch molekularen Sauerstoff könnte diese Thiolgruppen-abhängige Katalyse folgeschwer stören.

## 5. Enantiomeraselektivität im anaeroben Monoterpen-Abbau

Enzym-katalysierte Allyl-Umlagerungen spielen in der Biochemie eine entscheidende Rolle (Schwab, 1990). Sehr gut untersuchte Vertreter sind die Chorismatmutase, die essenziell ist für die Biosynthese der Aminosäuren Tyrosin und Phenylalanin, und die Pyridoxalphosphat-abhängige Transaminase, welche Alanin aus dem Endprodukt der Glykolyse, dem Pyruvat, synthetisiert. Besonders im Vergleich zur chemischen Isomerisation von Allylalkoholen bietet die Biotransformation mit gereinigten Proteinen höhere Raten, exzellente Chemo-, Regio- und Enantiomeraselektivität und einen Prozessablauf unter relativ milden physikalischen Bedingungen. In der Natur ist die Chiralität einer Verbindung von entscheidender Bedeutung. Oft verfügt nur eines der Enantiomere über eine biologische Aktivität, während das andere biologisch inaktiv ist oder sogar eine toxische Wirkung auf den lebenden Organismus ausübt. Ein bekanntes Beispiel sind die D-Enantiomere der Glukose und anderer Kohlenhydrate. Das L-Enantiomer kommt in der Natur nicht vor. Im Gegensatz dazu werden in den natürlichen Proteinen einzig die L-Aminosäuren eingebaut. Ein folgeschweres Unterschätzen der enantiomeraselektiven Wirkung



eines Wirkstoffes ereignete sich in den späten 1950er Jahren in der Bundesrepublik, was später als s. g. Contagan-Affäre weltweit Schlagzeilen machte. Der Wirkstoff Thalidomid ist als (*R*)-Enantiomer ein leichtes Sedativum, das auch Schwangeren verabreicht wurde. Verunreinigungen mit (*S*)-Thalidomid haben jedoch verheerende Auswirkungen auf das ungeborene Kind. Die teratogene Wirkung ist dabei ausschließlich auf das (*S*)-Enantiomer zurückzuführen.

Generell jedoch sind Enantiomer-reine Verbindungen, wie z. B. tertiäre Allylalkohole mit einem chiralen und somit optisch aktiven C-Atom Vorläufer vieler wirtschaftlich wertvoller Chemikalien (O'Hagan et al., 1993). Unter ihnen bilden der Monoterpen-Alkohol Linalool und seine Derivate wichtige Bausteine in der organischen Synthese, nicht zuletzt weil beide Linalool-Enantiomere einen unterschiedlichen Duft aufweisen (Bratsch et al., 2008). Diese Form der unterschiedlichen olfaktorischen Wahrnehmung von Monoterpen-Enantiomeren wurde bereits vielfach beschrieben (Tab. 3). Wüst und Mosandl (1999) demonstrierten in ihren Versuchen mittels Enantiomer-GC-Olfaktometrie eine umfangreiche Analyse der verschiedenen Stereo- und Enantiomerisomere.

Tab. 3: Olfaktorische Wahrnehmung von Monoterpen-Enantiomeren (van der Werf et al., 1997; de Carvalho und de Fonseca, 2006)

Chirales Monoterpen	Enantiomer	Duft/Aroma
Carvon	<i>S</i> -(+)	Pfefferminz
	<i>R</i> -(-)	Kümmel
Limonen	<i>S</i> -(-)	Terpentin
	<i>R</i> -(+)	Orange
Linalool	<i>S</i> -(+)	Bitterorange
	<i>R</i> -(-)	Lavendel
$\alpha$ -Pinen	1 <i>S</i> ,5 <i>S</i> -(-)	Kiefernnadel
	1 <i>R</i> ,5 <i>R</i> -(+)	Minze
Menthol	1 <i>S</i> ,3 <i>S</i> ,4 <i>R</i> -(+)	Phenolharz
	1 <i>R</i> ,3 <i>R</i> ,4 <i>S</i> -(-)	Minze
$\alpha$ -Terpineol	<i>S</i> -(-)	Kiefernnadel
	<i>R</i> -(+)	Flieder

Das (*R*)-(-)-Enantiomer des Linalools (Licareol) bildet einen Hauptbestandteil des pflanzlichen Extraktes von *Cinnamomum camphora* und *Cayenne linaloe*. Es besitzt einen holzartigen und an Lavendel erinnernden Duft. Das (*S*)-(+)-Enantiomer, Coriandrol, findet man v. a. im Korianderöl. Es verfügt über einen blumigen und an Orangen erinnernden Duft (van der Werf et al., 1997; de Carvalho und de Fonseca, 2006). Wie bereits in Abschnitt 1. 2 erwähnt, werden in höheren Pflanzen Monoterpenoide, wie Linalool, aus dem universellen Vorläufer IPP synthetisiert. Das anschließend gebildete GPP wird dann mittels einer membranassoziierten und spezifischen Monoterpen-Synthase zum entsprechenden Enantiomer weiter umgesetzt. Eine (*S*)-(+)-Linalool-spezifische Synthase konnte bereits in verschiedenen pflanzlichen Geweben nachgewiesen werden (Dudareva et al., 1996; Lewinshon et al., 2001).

Trotz der Bemühungen um eine chemische Synthese konnte eine kommerzielle Produktion des (*S*)-(+)-Linalool bisher nicht verwirklicht werden. Ursache dafür scheint die umständliche Vorsynthese der Edukte und die daraus resultierende mehrstufige Synthese zu sein. Ohwa et al. (1986) zeigten beispielsweise eine mehrstufige und enantiomerspezifische Linalool-Bildung mit Oxathian als chirales Template. Eine andere Synthese zeigten Uenishi und Kubo (1994) auf: ausgehend vom Geraniol wurde mittels der Desulfurisation von Thiiran und (+)- bzw. (-)-Diethyl-Tartrat als chirales Template, (*S*)-(+)- oder (*R*)-(-)-Linalool synthetisiert. Ein Enantiomerüberschuss von 84% und 47% konnte dabei erzielt werden.

In Zukunft könnte eine Synthese aber auch auf einem biokatalytischen und somit ressourcen- und umweltschonenden Weg realisiert werden. Dazu müssen zuerst praktikable Enzyme identifiziert werden. Die o. g. Monoterpen-Synthasen scheinen vorerst ungeeignet, da das Substrat IPP weder in großen Mengen verfügbar ist, noch kostengünstig gewonnen werden kann. Eine enantiomeraselektive Transformation von (*S*)-(+)-Linalool konnte in *Aspergillus niger* beobachtet werden (Demyttenaere et al., 2001). Die Autoren bestimmten einen höheren Umsatz von (*S*)-(+)-Linalool zu Furanoid- und Pyranoidlinalooloxid im Vergleich zum (*R*)-Enantiomer. Oritani und Yamashita (1973) detektierten in *Bacillus subtilis* und Osprian et al. (1996) in *Rhodococcus rubber* eine enantiomeraselektive Konversion des Linalool-Acetatester mit einem Enantiomerüberschuss von 65% bzw. 58%. *Castellaniella defragrans* 65Phen stellt einen weiteren biokatalytisch-aktiven Stamm dar.

Das aktivierende Enzym im anaeroben Monoterpen-Abbau, die Linalool-Dehydratase-Isomerase, verfügt über eine hohe Stereospezifität. In Experimenten mit gereinigtem Enzym zeigte sich darüber hinaus eine hohe Enantiomerelektivität. Mittels einer chiralen gaschromatographischen Analyse wurde eine enantiomerelektive Biotransformation von Geraniol über (*S*)-(+)-Linalool zu Myrcen gezeigt. Im enzymatischen Assay mit gereinigtem Enzym kam es zur transienten Bildung des (*S*)-Enantiomers, welches durch die zweite Enzymaktivität der bifunktionalen Linalool-Dehydratase-Isomerase weiter zum Myrcen dehydratisiert wurde (Abb. 6).

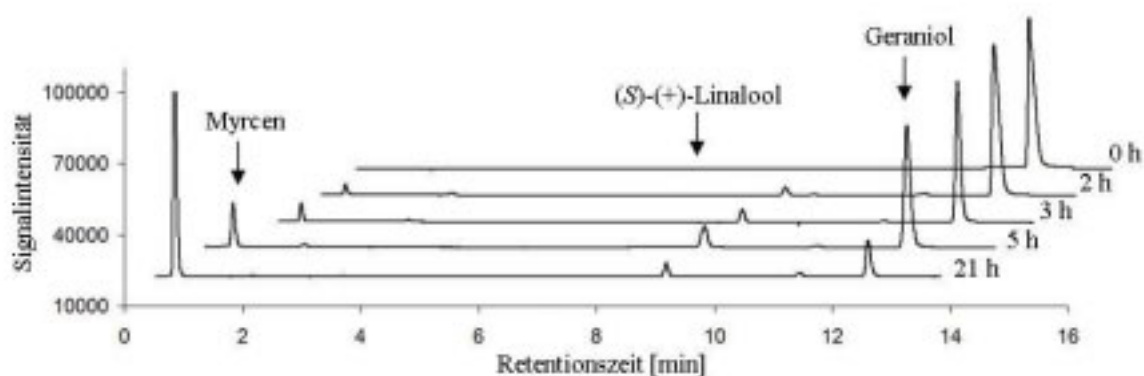


Abb. 6: Zeitlicher Verlauf der Linalool-Dehydratase-Isomerase katalysierten Biotransformation von Geraniol über (*S*)-(+)-Linalool zu Myrcen

Der Enantiomerüberschuss der Geraniol-Isomerase-Aktivität weist einen Wert von  $\geq 99\%$  auf. Setzt man das Racemat (*R,S*)-( $\pm$ )-Linalool als Substrat im Enzymaktivitätsassay ein, kommt es zu einer spezifischen Dehydrierung von (*S*)-(+)-Linalool zum Myrcen, die Konzentration von (*R*)-(-)-Linalool hingegen bleibt über den Versuchszeitraum nahezu konstant (Manuskript 2, Fig. 3). Auch für die Linalool-Dehydratase-Aktivität resultiert daraus ein Enantiomerüberschuss (enantiomeric excess [*ee*]) von  $\geq 99\%$ .

Das Enzym verfügt über die Fähigkeit zwischen Licareol und Coriandrol, den Enantiomeren des Linalools, zu diskriminieren. Dieses Phänomen ist eine Entdeckung mit einem Potenzial zur enantiomerelektiven Synthese.

Zusätzlich wurden verwandte Betaproteobakterien von *Castellaniella defragrans* 65Phen untersucht. *Thauera linaloolentis* 47Lol, ein Vertreter des Azoarcus-Clusters, ist nicht in der Lage, (*R,S*)-( $\pm$ )-Linalool zu Myrcen zu dehydratisieren. Stattdessen werden im Rohextrakt beide Enantiomere mit  $1,3 \text{ mU mg}^{-1}$  und ohne einen Enantiomerüberschuss ( $\geq 0\%$ ) zu

Geraniol isomerisiert. Ähnliches wurde bereits von Foss und Harder (1997) gezeigt. Ein weiterer Aktivitätstest zeigte die Umsetzung von Geraniol zu beiden Isomeren, (*S*)-(+)-Linalool und (*R*)-(-)-Linalool, im gleichen Verhältnis zueinander (Manuskript 2, Fig. 4). Das Fehlen einer Linalool-Dehydratase-Aktivität in *T. linaloolentis* 47Lol bestätigt die Existenz weiterer Geraniol-isomerisierender Enzyme in den natürlichen Abbauprozessen. Diese Resultate sind übereinstimmend mit den Ergebnissen von Foss und Harder (1998). *T. linaloolentis* 47Lol kann trotz des relativ breiten Wachstumssubstratspektrums Myrcen nicht als Kohlenstoffquelle nutzen. Eine andere Spezies des Genus *Thauera* ist der monoterpenabbauende und denitrifizierende Stamm *T. terpenica* 58Eu. Dieser Organismus scheint weder über eine Linalool-Dehydratase- noch über eine Geraniol-Isomerase-Aktivität zu verfügen, wenn Zellen auf dem zyklischen Monoterpen-Alkohol Eucalyptol kultiviert werden. Eine geringe Myrcenbildung, jedoch ohne eine transiente Bildung von Linalool, wurde mit Geraniol als Substrat im Rohextrakt-Assay beobachtet, wenn Zellen auf Limonen kultiviert wurden. Limonen ist ein Vertreter der zyklischen Monoterpene, die keine funktionellen Carbonylgruppen tragen. Neben der Existenz mehrerer Abbauewege scheint die Expression der für den Abbaueweg relevanten Enzyme erst durch die entsprechenden Substrate induziert zu werden. Analog dazu kann man in Acetat-gewachsenen *C. defragrans*-Zellen ebenfalls keine Linalool-Dehydratase-Isomerase-Aktivität beobachten. In Zukunft könnten in vergleichenden molekularbiologischen Studien die experimentellen Unterschiede auch auf Ebene der Nukleotid- und Aminosäure-Sequenz untersucht werden.

## 6. Umsatz von Myrcen im enzymgekoppelten Assay

Aktivitätsmessungen der einzelnen enzymkatalysierten Reaktionsschritte des postulierten Myrcen-Abbaueweges (Abb. 3) zeigen ein thermodynamisches Reaktionsgleichgewicht auf Seiten des Myrcens. Die Vorwärtsreaktion konnte nur in einer mit Myrcen gesättigten wässrigen Phase und mit niedrigen Raten beobachtet. Würde das Produkt Geraniol weiter umgesetzt werden, könnte die Gesamtreaktion *in vitro* durch NADH-Bildung gemessen werden. Die postulierte Oxidation des Geraniols zur Geraniumsäure, mit NAD als Elektronenakzeptor und unter Verzicht auf eine Energiekonservierung, liegt thermodynamisch weit auf der Seite der freien Säure. Die Rückreaktion, eine Reduktion zum Aldehyd, findet faktisch nicht statt. Diese Reaktion kann daher als irreversibel angesehen werden. In ei-

nem gekoppelten Mehrfach-Enzymassay, der alle notwendigen Enzyme enthält, die zur Transformation des Myrcens bis zur Geraniumsäure nötig sind, könnte diese Reaktionsfolge realisiert werden. Sie ist allerdings noch immer bedeutend langsamer als die Linalool-Dehydratase-Aktivität.

Erste Versuche mit der gereinigten Linalool-Dehydratase-Isomerase und der heterolog überexprimierten *C. defragrans*-Enzym Geraniol-Dehydrogenase (Dikfidan, 2008) zeigten eine NADH-Bildung. Der Rohextrakt hatte eine NAD-abhängige Geraniol-Dehydrogenase-Aktivität von  $823 \text{ mU mg}^{-1}$ . In Gegenwart von Myrcen erfolgte keine signifikante NADH-Bildung ( $0,09 \text{ mU mg}^{-1}$ ). Die Zugabe der gereinigten Linalool-Dehydratase-Isomerase erzielte eine Umsatzsteigerung auf  $187 \text{ mU mg}^{-1}$  bzw.  $374 \text{ mU (mg Linalool-Dehydratase-Isomerase)}^{-1}$ . Damit kann im gekoppelten Assay die Myrcen-Hydratase in ihrer Geschwindigkeit gegenüber dem ungekoppelten Assay um den Faktor 46 gesteigert werden.

## 7. Ausblick

Viele der dargestellten Ergebnisse eröffnen weitere spannende Fragestellungen, die in späteren Experimenten geklärt werden sollten.

Inwiefern eine Linalool-Dehydratase-Isomerase-Aktivität ausschließlich im Periplasma stattfindet, kann beispielsweise durch eine Protoplastierung der Zellen mit nachfolgender Aktivitätsbestimmung im Überstand und in den Protoplasten überprüft werden.

Die postulierte Translokation des Vorläufer-Proteins in den periplasmatischen Raum könnte mittels Metall-Markierung oder spezifischen Antikörpern auch spektroskopisch untersucht werden.

Um zu überprüfen, ob der vorgeschlagene Katalysemechanismus Thiolgruppen-abhängig verläuft, sollten durch Verwendung spezifischer Reagenzien Redox-sensitive Cysteine markiert und in einer anschließenden massenspektroskopischen Sequenzanalyse identifiziert werden (Leichert et al., 2008). Redox-regulierte Proteine ändern in Abhängigkeit des Redoxzustandes ihrer Cysteinreste ihre Aktivität. Rreduzierte Thiole könnten beispielsweise durch Cystein-spezifische Modifizierungen (z. B. Alkylierung durch Iodacetamid)

und oxidiertes Thiole nach der Verwendung eines Reduktionsmittel durch  $^{13}\text{C}$  markierte Cystein-spezifische Modifizierungen, differenziell markiert werden und so deren Einfluss auf beide Enzymaktivitäten der Linalool-Dehydratase-Isomerase im Assay deutlich machen.

Die Untersuchungen zur enantiomeraselektiven Biotransformation von Geraniol zu Myrcen haben gezeigt, dass verschiedene Enzyme im anaeroben Abbauweg der Monoterpene in der Natur existieren. In vergleichenden molekularbiologischen Studien könnten die hier experimentell gezeigten Unterschiede auch auf Ebene der Nukleotid- und Aminosäure-Sequenz untersucht werden.

Für weitere Experimente mit gereinigtem Enzym, etwa für ausgedehnte Substratstudien oder für die Produktion spezifischer Antikörper, wird eine heterologe Überexpression in *E.coli* empfohlen. Dann könnte eine höhere Enzymausbeute gegenüber der auch relativ aufwendigen konventionellen Proteinreinigung erreicht werden. Nach ersten Klonierungsversuchen konnten beide Enzymaktivitäten auch im *E. coli*-Rohextrakt nachgewiesen werden (Marmulla, persönliche Mitteilung).

Intensive Sequenz-Datenbankrecherchen ergaben keine signifikanten Treffer zu homologen Sequenzen. Um dennoch Sequenzinformationen und Funktion, also Enzymaktivität, zu vergleichen, könnten mit Hilfe von Mutationsstudien katalytisch relevante Sequenzbereiche analysiert werden. Beispielsweise durch die gezielte Inaktivierung einer der beiden Enzymaktivitäten mittels punktgerichteter Mutagenese.

In einer denaturierenden Gradientengelelektrophorese konnte die separate Entfaltung verschiedener Proteindomänen beobachtet werden. In Aktivitätsstudien sollte der Einfluss der verschiedenen Harnstoffkonzentrationen auf die Enzymaktivitäten untersucht werden. Dadurch könnte die mögliche Korrelation zwischen der Entfaltung einzelner Domänen mit Abnahme der Enzymaktivitäten detektiert werden.



## 8. Literatur

- Aeckersberg, F., Bak, F. and Widdel, F. (1991). Anaerobic oxidation of saturated hydrocarbons to CO<sub>2</sub> by a new type of sulfate-reducing bacterium. *Arch. Microbiol.* **156**: 5-14.
- Aguilar, J. A., Zavala, A. N., Diaz-Perez, C., Cervantes, C., Diaz-Perez, A. L. and Campos-Garcia, J. (2006). The *atu* and *liu* clusters are involved in the catabolic pathways for acyclic monoterpenes and leucine in *Pseudomonas aeruginosa*. *App. Environ. Microbiol.* **72**: 2070-2079.
- Amaral, J. A., Ekins, A., Richards, S. R. and Knowles, R. (1998). Effect of selected monoterpenes on methane oxidation, denitrification, and aerobic metabolism by bacteria in pure culture. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**: 520-525.
- Andrews, R. E., Parks, L. W. and Spence, K. D. (1980). Some effects of douglas fir terpenes on certain microorganisms. *Appl. Environ. Microbiol.* **40**: 301-304.
- Armstrong, G. A., Alberti, M., Leach, F. and Hearst, J. E. (1989). Nucleotide sequence, organization, and nature of the protein products of the carotenoid biosynthesis gene cluster of *Rhodobacter capsulatus*. *Mol. Gen. Genet.* **216**: 254-268.
- Arp, D. J. (1999). Butane metabolism by butane-grown *Pseudomonas butanovora*. *Microbiology* **145**: 1173-1180.
- Bach, T. J. and Lichtenthaler, H. K. (1983). Inhibition by mevinolin of plant growth, sterol formation and pigment accumulation. *Physiol. Plant.* **59**: 50-60.
- Bach, T. J. and Lichtenthaler, H. K. (1987). Plant growth regulation by mevinolin and other sterol biosynthesis inhibitors. *Ecology and metabolism of plant lipids*. G. Fuller, Nes, W. D. Washington DC, American Chemical Society: 109-139
- Banerjee, R. (2003). Radical carbon skeleton rearrangements: catalysis by coenzyme B<sub>12</sub>-dependent Mutases. *Chem. Rev.* **103**: 2083-2094.
- Banfield, M. J., Barker, J. J., Perry, A. C. and Brady, R. L. (1998). Function from structure? The crystal structure of human phosphatidylethanolamine-binding protein suggests a role in membrane signal transduction. *Structure* **6**: 1245-1254.
- Bartsch, S., Kourist, R. and Bornscheuer, U. T. (2008). Complete inversion of enantioselectivity towards acetylated tertiary alcohols by a double mutant of a *Bacillus subtilis* esterase. *Angew. Chem. Int. Ed.* **47**: 1508-1511.
- Beller, H. R. and Spormann, A. M. (1999). Substrate range of benzylsuccinate synthase from *Azoarcus* sp. Strain T. *FEMS Microbiol. Lett.* **178**: 147-153.



- Beller, H. R., Spormann, A. M., Sharma, P. K., Cole, J. R. and Reinhard, M. (1996). Isolation and characterization of a novel toluene-degrading, sulfate-reducing bacterium. *App. Environ. Microbiol.* **62**: 1188-1196.
- Bendtsen, J. D., Nielsen, H., von Heijne, G. and Brunak, S. (2004). Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0. *J. Mol. Biol.* **340**: 783-795.
- Biegert, T., Fuchs, G. and Heider, J. (1996). Evidence that anaerobic oxidation of toluene in the denitrifying bacterium *Thauera aromatica* is initiated by formation of benzylsuccinate from toluene and fumarate. *Eur. J. Biochem.* **238**: 661-668.
- Bloch, K., Chaykin, S., Phillips, A. H. and De Waard, A. (1959). Mevalonic acid-pyrophosphate and isopentenylpyrophosphate. *J. Biol. Chem.* **234**: 2595-2604.
- Boucher, y. and Doolittle, W. F. (2000). The role of lateral gene transfer in the evolution of isoprenoid biosynthesis pathways. *Mol. Microbiol.* **37**: 703-716.
- Breitmaier, E. (2006). Terpenes: flavor, fragrans, pharmaca, pheromones. Weinheim, Wiley.
- Britton, G., Liaaen-Jensen, S. and Pfander, H. (1998). Biosynthesis and metabolism. Basel, Birkhäuser Verlag.
- Broes, S. T. J. (1994). Über die frühen Stufen der Biosynthese von Isoprenoiden in *E. coli*. Dissertation, Eidgenössische Technische Hochschule, Zürich.
- Brown, K. L. (2005). Chemistry and enzymology of vitamin B<sub>12</sub>. *Chem. Rev.* **105**: 2075-2149.
- Buckel, W., Martins, B. M., Messerschmidt, A. and Golding, B. T. (2005). Radical-mediated dehydration reactions in anaerobic bacteria. *Biol. Chem.* **386**: 951-959.
- Cadwallader, K. R., Bradock, R. J. and Parish, M. E. (1992). Isolation of  $\alpha$ -terpineol dehydratase from *Pseudomonas gladioli*. *J. Food. Sci.* **57**: 241-244.
- Chiang, Y., Ismail, W., Mueller, M. and Fuchs, G. (2007). Initial steps in the anoxic metabolism of cholesterol by the denitrifying *Sterolibacterium denitrificans*. *J. Biol. Chem.* **282**: 13240-13249.
- Claeys, M., Graham, B., Vas, G., Wang, W., Vermeylen, R., Pashynska, V., Cafmeyer, J., Guyon, P., Andreae, M. M., Artaxo, P. and Maenhaut, W. (2004). Formation of secondary organic aerosols through photooxidation of isoprene. *Science* **303**: 1173-76.
- Connolly, J. D. and Hill, R. A. (1992). Dictionary of terpinods New York, Chapman & Hall.
- Coschigano, P. W., Wehrman, T. S. and Young, L. Y. (1998). Identifikation and analysis of genes involved in anaerobic toluene metabolism by strain T1: putative role of a glycine free radical. *App. Environ. Microbiol.* **64**: 160-165.

- de Carvalho, C. and de Fonseca, M. (2006). Biotransformation of terpenes. *Biotech. Adv.* **24**: 134-142.
- Demyttenaere, J. C. R., Adams, A., Vanoverschelde, J. and De Kimpe, N. (2001). Biotransformation of (*S*)-(+)-linalool by *Aspergillus niger*: A investigation of the culture conditions. *J. Agric. Food Chem.* **49**: 5895-5901.
- Dev, S. (1982). *Handbook of terpenoids: Monoterpenoids* Boca Racon, CRC Press.
- Dikfidan, A. (2008). Etablierung eines genetischen Systems in *Castellaniella defragrans* Stamm 65Phen. Diplomarbeit, Universität Bremen.
- Dudareva, N., Cseke, L., Blanc, V. M. and Pichersky, E. (1996). Evolution of floral scent in *Clarkia*: novel patterns of *S*-linalool synthase gene expression in the *C. breweri* flower. *Plant Cell* **8**: 1137-1148.
- Edman (1950). Preparation of phenyl thiodantoins from some natural amino acids. *Acta Chem. Scand.* **4**: 283-288.
- Ehrenreich, P., Behrends, A., Harder, J. and Widdel, F. (2000). Anaerobic oxidation of alkanes by newly isolated denitrifying bacteria. *Arch. Microbiol.* **173**: 58-64.
- Erman, W. F. (1985). Chemistry of the monoterpenes: an encyclopedic handbook. *Studies in organic chemistry*. P. G. Gassman. New York, Marcel Dekker. A, B.
- Evans, P. J., Ling, W., Goldschmidt, B., Ritter, E. R. and Young, L. Y. (1992). Metabolites formed during anaerobic transformation of toluene and o-xylene and their proposed relationship to the initial steps of toluene mineralization. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**: 496-501.
- Faulkner, D. J. (2001). Marine natural products. *Nat. Prod. Rep.* **18**: 1-49.
- Fichan, I., C. Larroche and Gros, J. B. (1998). Water solubility, vapor pressure, and activity coefficients of terpenes and terpenoids. *J. Chem. Eng. Data* **44**: 56-62.
- Förster-Fromme, K. and Jendrossek, D. (2008). Biochemical characterization of isovaleryl-CoA dehydrogenase (LiuA) of *Pseudomonas aeruginosa* and the importance of *liu* genes for a functional catabolic pathway of methyl-branched compounds. *FEMS Microbiol. Lett.* **286**: 78-84.
- Foss, S. and Harder, J. (1997). Microbial transformation of a tertiary allyl alcohol: regioselective isomerisation of linalool to geraniol without nerol formation. *FEMS Microbiol. Lett.* **149**: 71-75.
- Foss, S. and Harder, J. (1998). *Thauera linaloolentis* sp. nov. and *Thauera terpenica* sp. nov., isolated on oxygen-containing monoterpenes (linalool, menthol and eucalyptol) and nitrate. *System. Appl. Microbiol.* **21**: 365-373.

- Foss, S., Heyen, U. and Harder, J. (1998). *Alcaligenes defragrans* sp. nov., description of four strains isolated on alkenoic monoterpenes ((+)-menthene,  $\alpha$ -pinene, 2-carene, and  $\alpha$ -phellandrene) and nitrate. *System. Appl. Microbiol.* **21**: 237 - 244.
- Galushko, A. S., Kiesele-Lang, U. and Kappler, A. (2003). Degradation of 2-methylnaphthalene by a sulfate-reducing enrichment culture of mesophilic freshwater bacteria. *Polycyclic. Aromat. Compd.* **23**: 207-218.
- Germer, F. (2006). Charakterisierung eines DNA-Abschnitts des anaeroben Myrcenabbaus und Versuche zur Isolierung der Linalool-Dehydratase aus *Castellaniella* (ex. *Alcaligenes*) *defragrans* 65Phen. Diplomarbeit, Universität Bremen.
- Gershenzon, J. and Croteau, R. B. (1993). Terpenoid biosynthesis: The basic pathway and formation of monoterpenes, sesquiterpenes and diterpenes. *Lipid metabolism in plants*. J. Gershenzon and R. B. Croteau. Boca Raton, CRC Press: 339-388
- Gilewicz, M., Moppert, G., Acquaviva, M., Mille, G. and Bertrand, J. C. (1991). Anaerobic oxidation of 1-*n*-heptadecene by a marine denitrifying bacterium. *App. Microbiol. Biotechnol.* **36**: 252-256.
- Goodwin, T. W. (1977). The prenyl lipids of the membranes of higher plants. *Lipids and lipid polymers in higher plants*. M. Tevini and H. K. Lichtenthaler. Berlin, Springer-Verlag: 29-47.
- Guenther, A., Hewitt, C. N., Erickson, D., Fall, R., Geron, C., Graedel, T., Harley, P., Klinger, L., Lerdau, M., McKay, W. A. P., Pierce, T., Scholes, B., Steinbrecher, R., Tallamraju, R., Taylor, J. and Zimmerman, P. (1995). A global model of natural volatile organic compound emissions. *J. Geophys. Res.* **100**: 8873–8892.
- Hamamura, N. and Arp, D. J. (2000). Isolation and characterization of alkane-utilizing *Nocardioides* sp. strain CF8. *FEMS Microbiol. Lett.* **186**: 21-26.
- Harayama, S. and Timmis, K. N. (1992). Aerobic biodegradation of aromatic hydrocarbons. *Degradation of environmental pollutants by microorganisms and their metalloenzymes*. H. Sigel and A. Sigel. New York, Dekker. 99-156.
- Harder, J. (1997). Anaerobic degradation of cyclohexane-1,2-diol by a new *Azoarcus* species. *Arch. Microbiol.* **168**: 199-204.
- Harder, J., Heyen, U., Probian, C. and Foß, S. (2000). Anaerobic utilization of essential oils by denitrifying bacteria. *Biodegradation* **11**: 55-63.
- Harder, J. and Probian, C. (1995). Microbial degradation of monoterpenes in the absence of molecular oxygen. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**: 3804-3808.
- Hartmans, S., Weber, F. J., Somhorst, D. P. M. and de Bont, J. A. M. (1991). Alkene monooxygenase from *Mycobacterium*: a multicomponent enzyme. *J. Gen. Microbiol.* **137**: 2555-2560.

- Heider, J. (2007). Adding handles to unhandy substrates: anaerobic hydrocarbon activation mechanisms. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **11**: 188-194.
- Heyen, U. and Harder, J. (1998). Cometabolic isoterpinolene formation from isolimonene by nitrifying *Alcaligenes defragrans*. *FEMS Microbiol. Lett.* **169**: 67-71.
- Heyen, U. and Harder, J. (2000). Geranic acid formation, an initial reaction of anaerobic monoterpene metabolism in denitrifying *Alcaligenes defragrans*. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**: 3004-3009.
- Honda, S., Toraya, T. and Fukui, S. (1980). In-situ reactivation of glycerol-inactivated coenzyme B<sub>12</sub>-dependent enzymes, glycerol dehydrogenase and diol dehydratase. *J. Bacteriol.* **143**: 1458-1465.
- Hunter, W. N. (2007). The non-mevalonate pathway of isoprenoid precursor biosynthesis. *J. Biol. Chem.* **282**: 21573-21577.
- Johnson, H. A., Pelletier, D. A. and Spormann, A. M. (2001). Isolation and characterization of anaerobic ethylbenzene dehydrogenase, a novel Mo-Fe-S enzyme. *J. Bacteriol.* **183**: 4536-4542.
- Johnston, J. M., Arcus, V. L. and Baker, E. N. (2005). Structure of naphthoate synthase (MenB) from *Mycobacterium tuberculosis* in both native and product-bound forms. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **61**: 1199-1206.
- Kämpfer, P., Denger, K., Cook, A. M., Lee, S. T., Jäckel, U., Denner, E. B. M. and Busse, H. J. (2006). *Castellaniella* gen. nov., to accommodate the phylogenetic lineage of *Alcaligenes defragrans*, and proposal of *Castellaniella defragrans* gen. nov., comb. nov. and *Castellaniella denitrificans* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **56**: 815-819.
- Kloer, D. P., Hagel, C., Heider, J. and Schulz, G. E. (2006). Crystal structure of ethylbenzene dehydrogenase from *Aromatoleum aromaticum*. *Structure* **14**: 1377-1388.
- Kniemeyer, O. and Heider, J. (2001). Ethylbenzene dehydrogenase, a novel hydrocarbon-oxidizing molybdenum/iron-sulfur/heme enzyme. *J. Biol. Chem.* **276**: 21381-86.
- Lechner, U., Brodkorb, D., Geyer, R., Hause, G., Härtig, C., Auling, G., Fayolle-Guichard, F., Piveteau, P., Müller, R. H. and Rohwerder, T. (2007). *Aquincola tertiari-carbonis* gen. nov., sp. nov., a tertiary butyl moiety-degrading bacterium *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **57**: 1295-1303
- Leichert, L. I., Gehrke, F., Gudiseva, H. V., Blackwell, T., Ilbert, M., Walker, A. K., Strahler, J. R., Andrews, P. C. and Jakob, U. (2008). Reactive oxygen species special feature: Quantifying changes in the thiol redox proteome upon oxidative stress *in vivo*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **105**: 8197-8202.

- Leuthner, B., Leutwein, C., Schulz, H., North, P., Haehnel, W., Schiltz, E., Schägger, H. and Heider, J. (1998). Biochemical and genetic characterization of benzylsuccinate synthase from *Thauera aromatica*: a new glycyl radical enzyme catalysing the first step in anaerobic toluene metabolism. *J. Mol. Microbiol.* **28**: 615-628.
- Lewinshon, E., Schalechet, F., Wilkinson, J., Matsui, K., Tadmor, Y., Nam, K., Amar, O., Lastochkin, E., Larkov, O., Ravid, U., Hiatt, W., Gepstein, S. and Pichersky, E. (2001). Enhanced levels of the aroma and flavor compound *S*-linalool by metabolic engineering of the terpenoid pathway in tomato fruits. *Plant Physiol.* **127**: 1256-1265.
- Li, Z., van Beilen, J. B., Duetz, W. A., Schmid, A., de Raadt, A., Griengl, H. and Witholt, B. (2002). Oxidative biotransformations using oxygenases. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **6**: 136-144.
- Lichtenthaler, H. K., Schwender, J., Disch, A. and Rohmer, M. (1997). Biosynthesis of isoprenoids in higher plant chloroplasts proceeds via a mevalonate-independent pathway. *FEBS Lett.* **400**: 271-274.
- Lovley, D. R., Baedeker, M. J., Lonergan, D. J., Cozzarelli, I. M., Phillips, E. J. P. and Siegel, D. I. (1989). Oxidation of aromatic contaminants coupled to microbial iron reduction. *Nature* **339**: 297-300.
- Lovley, D. R. and Lonergan, D. J. (1990). Anaerobic oxidation of toluene, phenol, and *p*-cresol by the dissimilatory iron-reducing organism, GS-15. *App. Environ. Microbiol.* **56**: 1858-1864.
- Lynen, F. (1959). New aspects of acetate incorporation into isoprenoid precursors. *Biosynthesis of terpenes and sterols*. G. E. W. Wolstenholme and M. O'Conner. London, J. & A. Churchill Ltd. : 95-116.
- Lynen, F., Eggener, H., Henning, U. and Kessel, I. (1958). Farnesyl Pyrophosphat und 3-Methyl $\Delta^3$ -butenyl-1-pyrophosphat, die biologische Vorstufe des Squalens. *Angew. Chem.* **70**: 738-744.
- Maresca, J. A., Romberger, S. P. and Bryant, D. A. (2008). Isorenieratene biosynthesis in green sulfur bacteria requires the cooperative actions of two carotenoid cyclases. *J. Bacteriol.* **190**: 6384-6391.
- Mori, K., Bando, R., Hieda, N. and Toraya, T. (2004). Identification of a reactivating factor for adenosylcobalamin-dependent ethanolamine ammonium lyase. *J. Bacteriol.* **186**: 6845-6854.
- Musat, F., Galushko, A. S., Jacob, J., Widdel, F., Kube, M., Reinhardt, R., Wilkes, H., Schink, B. and Rabus, R. (2009). Anaerobic degradation of naphthalene and 2-methylnaphthalene by strains of marine sulfate-reducing bacteria. *Environ. Microbiol.* **11**: 209-219

- O'Hagan, D., Zaidia, N. A. and Lamont, R. B. (1993). The synthesis of (R)- $\gamma$ -phenyl- $\gamma$ -(trifluoromethyl)-butyrolactone and (2R,3S)-1,1,1-trifluoro-2-methoxy-2-phenyl-3,4-epoxybutane in homochiral forms. *Tetrahedron: Asymmetry* **4**: 1703-1708.
- Ohwa, M., Kogure, T. and Eliel, E. L. (1986). An asymmetric synthesis of enantiomerically pure (S)-(+)-linalool (3,7-dimethyl-1,6-octadien-3-ol) and a formal synthesis of (R)-(-)-linalool. *J. Org. Chem.* **51**: 2599-2601.
- Oritani, T. and Yamashita, K. (1973). Microbial resolution of ( $\pm$ )-acyclic alcohols. *Agric. Biol. Chem.* **37**: 1923-1928.
- Osprian, I., Steinreiber, A., Mischitz, M. and Faber, K. (1996). Novel bacterial isolates for the resolution of esters of tertiary alcohols. *Biotechnol. Lett.* **18**: 1331-1334.
- Pare, P. W. and Tumlinson, J. H. (1997). Induced synthesis of plant volatiles. *Nature* **385**: 30-31.
- Rabus, R., Nordhaus, R. L. W. and Widdel, F. (1993). Complete oxidation of toluene under strictly anoxic conditions by a new sulfate-reducing bacterium. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**: 1444-1451.
- Rabus, R., Wilkes, H., Behrends, A., Armstroff, A., Fischer, T., Pierik, A. J. and Widdel, F. (2001). Anaerobic initial reaction of *n*-alkanes in a denitrifying bacterium: Evidence for (1-methylpentyl)succinate as initial product and for involvement of an organic radical in *n*-hexane metabolism. *J. Bacteriol.* **183**: 1707-1715.
- Rueter, P., Rabus, R., Wilkes, H., F., A., Rainey, F. A., Jannasch, H. W. and Widdel, F. (1994). Anaerobic oxidation of hydrocarbons in crude oil by new types of sulphate reducing bacteria. *Nature* **372**: 455-458.
- Ruzicka, L., Eschenmoser, A., Heusser, H. T. and compounds. (1953). The isoprene rule and the biogenesis of isoprenoid compounds. *Experientia* **9**: 357-396.
- Schink, B. (1985). Degradation of unsaturated hydrocarbons by methanogenic enrichment cultures. *FEMS Microbiol. Ecol.* **31**: 67-77.
- Schmid, C., Steinbrecher, R. and Ziegler, H. (1992). Partition coefficients of plant cuticles for monoterpenes. *Trees* **6**: 32-36.
- Schocher, R. J., Seyfried, B., Vazquez, F. and Zeyer, J. (1991). Anaerobic degradation of toluene by pure cultures of denitrifying bacteria. *Arch. Microbiol.* **157**: 7-12.
- Schwab, J. M. and Henderson, B. S. (1990). Enzyme-catalysed allylic rearrangements. *Chem. Rev.* **90**: 1203-1245.
- Schwender, J., Zeidler, J., Gröner, R., Müller, C., Focke, M., Braun, S., Lichtenthaler, F. W. and Lichtenthaler, H. K. (1997). Incorporation of 1-deoxy-D-xylulose into isoprene and phytol by higher plants and algae *FEBS Lett.* **414**: 129-134.

- Seubert, W. (1960). Degradation of isoprenoid compounds by microorganisms I. *Pseudomonas citronellolis* n. sp. Isolation and characterization of an isoprenoid-degrading bacterium. *J. Bacteriol.* **79**: 26–434.
- Seubert, W., Fass, E. and Remberger, U. (1963). Untersuchungen über den bakteriellen Abbau von Isoprenoiden. III: Reinigung und Eigenschaften der Geranylcarboxylase. *Biochem. Z.* **338**: 265-275.
- Seubert, W. and Remberger, U. (1963). Untersuchungen über den bakteriellen Abbau von Isoprenoiden. II. Die Rolle der Kohlensäure. *Biochem. Z.* **338**: 245-264.
- Seybold, S. J., Quilici, D. R., Tillman, J. A., Vanderwel, D., Wood, D. L. and Blomquist, G. J. (1995). *De novo* biosynthesis of the aggregation pheromone components ipsenol and ipsdienol by the pine bark beetles *Ips paraconfusus* Lanier and *Ips pini* (Say) (Coleoptera: Scolytidae). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**: 8393–8397.
- Sikkema, J., de Bont, J. A. and Poolman, B. (1994). Interactions of cyclic hydrocarbons with biological membranes. *J. Biol. Chem.* **269**: 8022-8028.
- Sikkema, J., de Bont, J. A. and Poolman, B. (1995). Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. *Microbiol. Rev.* **59**: 201–222.
- Smith, M. R. (1994). The physiology of hydrocarbon degrading bacteria. *Biochemistry of microbial degradation*. C. Ratledge. Dordrecht, Kluwer Academic Publisher: 347-378.
- So, C. M. and Young, L. Y. (1999). Initial reactions in anaerobic alkane degradation by a sulfate reducer, strain AK-01. *App. Environ. Microbiol.* **65**: 5532-5540.
- Steiger, S., Mazet, A. and Sandmann, G. (2003). Heterologous expression, purification and enzymatic characterization of the acyclic carotenoid 1,2-hydrotase from *Rubrivivax gelatinosus*. *Arch. Biochem. Biophys.* **1**: 51-58.
- Steiger, S., Takaichi, S. and Sandmann, G. (2002). Heterologous production of two unusual acyclic carotenoids, 1,1'-dihydroxy-3,4-didehydrolycopene and 1-hydroxy-3,4,3',4'-tetrahydrolycopene by combination of the *crtC* and *crtD* genes from *Rhodobacter* and *Rubrivivax*. *J. Biotechnol.* **97**: 51-58.
- Strasburger, E. (1991). *Lehrbuch der Botanik* Stuttgart, Gustav Fischer Verlag.
- Timke, M. (2000). *Initiale Reaktionen im Monoterpenstoffwechsel von *Alcaligenes defragrans**. Diplomarbeit, Universität Bremen.
- Trudgill, P. W. (1986). Terpenoid metabolism by *Pseudomonas*. *The bacteria: a treatise on structure and function*. I. C. Gunsalus. New York, Academic press. 10: 483-528.

- Uenishi, J. and Kubo, Y. (1994). An extremely mild desulfurization of thiiranes; an efficient transformation from geraniol to (+)- and (-)-linalool. *Tetrahedron Lett.* **35**: 6697-6700.
- Uribe, S., Alvarez, R. and Peña, A. (1984). Effects of  $\beta$ -pinene, a nonsubstituted monoterpene, on rat liver mitochondria. *Pestic. Biochem. Physiol.* **22**: 43-50.
- Uribe, S. and Pena, A. (1990). Toxicity of allelopathic monoterpene suspensions on yeast dependence on droplet size. *J. Chem. Ecol.* **16**: 1399-1408.
- van der Werf, M. J., de Bont, J. A. M. and Leak, D. J. (1997). Opportunities in microbial biotransformation of monoterpenes. *Biotechnology of aroma compounds*. T. Schleper and B. G. Gerger. Berlin, Springer. 55: 147-177.
- van der Werf, M. J., Swarts, H. J. and de Bont, J. A. M. (1999). *Rhodococcus erythropolis* DCL14 contains a novel degradation pathway for limonene. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 2092-2102.
- van Ginkel, C. G., Welten, H. G. J. and De Bont, J. A. M. (1987). Oxidation of gaseous and volatile hydrocarbons by selected alkene-utilizing bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**: 2903-2907.
- Vokou, D. and Margaris, N. S. (1988). Decomposition of terpenes by soil microorganisms. *Pedobiologia* **31**: 413-419.
- von Heijne, G. (1983). Patterns of amino acids near signal-sequence cleavage sites. *Eur. J. Biochem.* **133**: 17-21.
- Wallach, O. (1885). Zur Kenntnis der Terpene und der ätherischen Oele. *Liebigs Ann. der Chemie* **227**: 277-302
- Ward, B. B., Courtney, K. J. and Langenheim, J. H. (1997). Inhibition of *Nitrosomonas europaea* by monoterpenes from coastal redwood (*Sequoia sempervirens*) in whole-cell studies. *J. Chem. Ecol.* **23**: 2583-2598.
- White, C. S. (1988). Nitrification inhibition by monoterpenoids: Theoretical mode of action based on molecular structures. *Ecology* **69**: 1631-1633.
- White, C. S. (1994). Monoterpenes: Their effects on ecosystem nutrient cycling. *J. Chem. Ecol.* **20**: 1381-1406.
- Wilt, F. M., Miller, G. C., L., E. R. and Hackett, M. (1993). Monoterpene concentrations in fresh, senescent, and decaying foliage of single leaf pinyon (*Pinus monophylla* Torr. & Frem.: *Pinaceae*) from the western Great Basin. *J. Chem. Ecol.* **19**: 185-194.
- Wüst, M. and Mosandl, A. (1999). Important chiral monoterpene ethers in flavours and essential oils- nantioselective analysis and biogenesis. *Eur. Food. Res. Technol.* **209** 3-11.



Zehnder, A. J. B. and Wuhrmann, K. (1976). Titanium(III) citrate as a nontoxic oxidation-reduction buffering system for the culture of obligate anaerobes. *Science* **194**: 1165-66.

Zeidler, J. G., Lichtenthaler, H. K., May, H. U. and Lichtenthaler, F. W. (1997). Is isoprene emitted by plants synthesized via the novel isopentenyl pyrophosphate pathway? *Z. Naturf.* **52**: 15-23.

Zimmerman, P. R., Chatfield, R. B., Fishman, J., Crutzen, P. J. and Hanst, P. L. (1978). Estimates on the production of CO and H<sub>2</sub> from the oxidation of hydrocarbon emissions from vegetation. *Geophys. Res. Lett.* **5**: 679-682.

## **Teil II Manuskripte**

### **A Liste der Manuskripte und Erläuterungen**

Die Dissertation beruht zu einem großen Teil auf den folgenden Manuskripten, von denen eines bereits eingereicht wurde. Neben der Versuchsplanung und dem überwiegenden Teil der Durchführung aller Experimente übernahm ich die Auswertung der Messdaten. Unterstützung bei einigen Experimenten erhielt ich von zwei Mitarbeitern, deren jeweiliger Beitrag dargestellt wird. Die Manuskripte wurden in Zusammenarbeit mit Herrn PD Dr. Jens Harder erstellt.

#### **1. Linalool dehydratase-isomerase, a bifunctional enzyme in the anaerobic degradation of monoterpenes**

Danny Brodkorb, Matthias Gottschall and Jens Harder

Matthias Gottschall trug zum Manuskript eine verbesserte Reinigung bei.

#### **2. Enantioselective isomerization of geraniol to the tertiary monoterpene alcohol (*S*)-(+)-linalool**

Danny Brodkorb, Robert Marmulla and Jens Harder

Robert Marmulla trug zu dieser Arbeit die Wachstumversuche auf beiden Limonen-Enantiomeren bei.

#### **3. Linalool dehydratase-isomerase undergoes reversible unfolding in the presence of the denaturant agent urea**

Danny Brodkorb and Jens Harder



**1**

**Linalool dehydratase-isomerase, a bifunctional enzyme in the anaerobic degradation of monoterpenes**

Danny Brodkorb, Mathias Gottschall and Jens Harder

Department of Microbiology, Max Planck Institute for Marine Microbiology,  
Bremen, Germany

Paper submitted

Address correspondence to: Department of Microbiology, Max Planck Institute for Marine Microbiology, Celsiusstrasse 1, 28359 Bremen, Germany, phone:+49 421 2028-750, fax: +49 421 2028-580, e-mail: [jharder@mpi-bremen.de](mailto:jharder@mpi-bremen.de)

## Summary

*Castellaniella* (ex *Alcaligenes*) *defragrans* strain 65Phen mineralizes monoterpenes in the absence of oxygen. Soluble cell extracts catalyzed anaerobically the isomerization of geraniol to linalool and the dehydration of linalool to myrcene. The novel linalool dehydratase was present in cells grown on monoterpenes and was purified approximately 1800-fold to complete homogeneity. The native enzyme had a molecular mass of 160 kDa. Denaturing gel electrophoresis revealed one single protein band with a molecular weight of 40 kDa, indicating an  $\alpha_4$ -composition as the active protein conformation. The aerobically purified enzyme was anaerobically activated in the presence of 2 mM DTT. The linalool dehydratase catalyzed *in vitro* two reversible reactions: a water elimination from the tertiary alcohol linalool to the corresponding acyclic monoterpene myrcene and an isomerization of the primary allyl alcohol geraniol in its stereoisomer linalool. The specific activities ( $V_{\max}$ ) were 8.4 U mg<sup>-1</sup> for the linalool dehydratase and 24.6 U mg<sup>-1</sup> for the geraniol isomerase, with apparent  $K_M$  values of 750  $\mu$ M and 500  $\mu$ M, respectively. The corresponding open reading frame was identified and revealed a precursor protein with a signal peptide for a periplasmatic location. The amino acid sequence did not affiliate with described enzymes. According to the bifunctionality, we suggest to name it linalool dehydratase-isomerase and to place it as member of a new protein family within the hydro-lyases (E.C.4.2.1.X).

## Introduction

Monoterpenes constitute a large and an extremely diverse group of natural compounds within the isoprenoids (Erman, 1985; Guenther et al., 1995; van der Werf et al., 1999). They are synthesized from two five-carbon units of isopentenyl pyrophosphate (IPP), a derivative of isoprene. This central intermediate is formed in two alternative pathways. In the mevalonate-dependent route IPP is synthesized from acetyl-CoA via mevalonic acid. It represents an important cellular metabolic pathway in all higher eukaryotes, *Archaea* and many *Bacteria*. (*E*)-4-Hydroxy-3-methyl-but-2-enyl pyrophosphate is the central precursor in the non-mevalonate pathway utilized by *Algae*, the plastids of higher plants and some *Bacteria* (Boucher and Doolittle, 2000; Hunter, 2007).

The monoterpenes are divided into acyclic compounds, such as myrcene and ocimene, monocyclic monoterpenes, e. g. limonene and phellandrene, and dicyclic monoterpenes, e. g. pinene and sabinene. These unsaturated hydrocarbons are classified as highly volatile organic compounds. Plants as major producer emit more than one millions tons per year to the atmosphere (Zimmerman et al., 1978) where they are photooxidized and contribute to aerosol formation (Kamens et al., 1999; Kiendler-Scharr et al., 2009). A physiological function is the defence against herbivores: plants induce the synthesis of monoterpenes as repellents upon insect damage (Pare and Tumlinson, 1997).

The mineralization of monoterpenes by aerobic microorganisms has been studied detailed with *Pseudomonas* species (Trudgill, 1986; Förster-Fromme and Jendrossek, 2008). The aerobic metabolism depends on oxygenases which catalyze hydroxylation reactions with molecular oxygen as co-substrate (Hartmans et al., 1991). Consequently, in the absence of oxygen, anaerobic bacteria have to use a totally different biochemistry. Alkanes, e. g. *n*-hexane, and aromatic hydrocarbons with alkyl substituents, e. g. toluene, are activated anaerobically by glycine radical enzymes and the radical intermediates add to fumarate, yielding methylalkylsuccinate and benzylsuccinate, respectively (Evans et al., 1992; Rabus et al., 2001; Heider, 2007). Molybdenum-containing enzymes hydroxylate anaerobically ethylbenzene (Kloer et al., 2006) and cholesterol (Chiang et al., 2007). The anaerobic mineralization of monoterpenes is frequently present in denitrifying bacteria (Harder et al., 2000). Enrichment cultures (Harder and Probian, 1995) yielded strains of *Alcaligenes defragrans* (Foss et al., 1998) and *Thauera terpenica* (Foss and Harder, 1998).

Progress in taxonomy grouped *A. defragrans* in the newly defined genus *Castellaniella*, as *C. defragrans* (Kämpfer et al., 2006). Initial studies on potential metabolites of the degradation pathway yielded isoterpinolene as a dead-end metabolite (Heyen and Harder, 1998) and geranic acid as ionic intermediate in nitrate-respiring cells which were grown on acyclic or cyclic monoterpenes, e. g. myrcene or limonene (Heyen and Harder, 2000). To elucidate details of the pathway, we initiated biotransformation studies with soluble extracts of *C. defragrans*. In this article we report the detection of novel enzyme activities and the isolation and characterization of an anaerobic linalool dehydratase-isomerase, a bifunctional enzyme which catalyzes the reversible dehydration and isomerization of linalool (3,7-dimethyl-1,6-octadien-3-ol) (Fig.1).

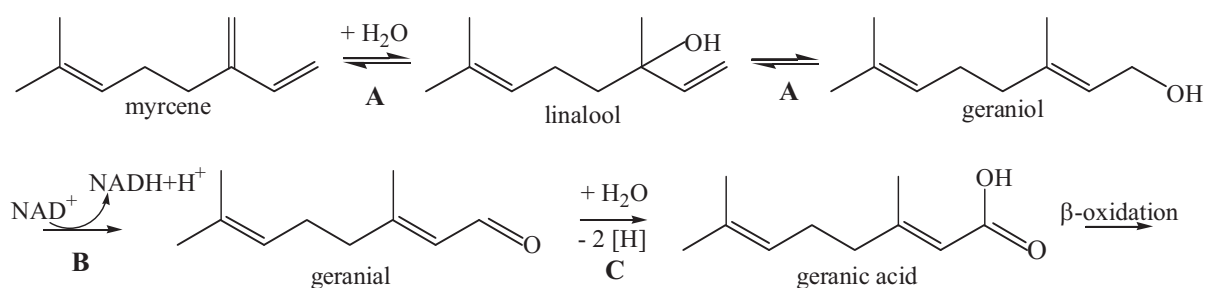


Fig. 1: Proposed anaerobic degradation pathway of myrcene in *C. defragrans*. A linalool dehydratase-isomerase, B geraniol dehydrogenase and C geranial dehydrogenase. Geranic acid is further degraded via  $\beta$ -oxidation.

## Experimental procedures

*Reagents*—R-Limonene (95%), myrcene (90%), linalool (99%) and geraniol (98%) were purchased from Sigma-Aldrich (Darmstadt, Germany). All other chemicals used were of the highest available purity and were purchased from Aldrich (Steinheim, Germany), Boehringer (Mannheim, Germany), Fluka (Neu-Ulm, Germany), Merck (Darmstadt, Germany), Sigma (Deisenhofen, Germany) and Bio-Rad (Bio-Rad Laboratories, München, Germany). Gases (CO<sub>2</sub> grade 4.8, N<sub>2</sub> grade 5.0, and O<sub>2</sub> grade 2.0) were supplied by Air Liquide (Düsseldorf, Germany). Chromatography media and instruments were from GE Healthcare (Freiburg, Germany).

*Cell Growth and preparation of soluble extracts*—*C. defragrans* strain 65Phen was maintained as described (Foss et al., 1998). For biomass production, the strain was cultivated on 30 mM limonene and 100 mM nitrate (Heyen and Harder, 2000). A 1 litre pre-culture was inoculated in a 10 l vessel of carbonate buffered mineral salt medium at pH 7.0. Filter-sterilized limonene and vitamins (Aeckersberg et al., 1991) were added after cooling and the culture was incubated for 6-7 days with a CO<sub>2</sub>/N<sub>2</sub> (10/90 (v/v)) gas stream of 24 ml h<sup>-1</sup> at 28°C. The stirrer frequency was initially 150 rpm and was increased during exponential growth phase of *C. defragrans* up to 250 rpm to ensure optimal substrate availability.

Cell harvest started with the addition of reducing agents, finally 50 µM of Fe(II)Cl<sub>2</sub> and 2 mM of DTT. Cells in the late exponential growth phase (OD<sub>600</sub> ≈ 3) were transferred by gas pressure to centrifuge tubes and then collected by centrifugation for 15 min at 9000x *g* at 4°C. For the preparation of the soluble proteins, 40 g wet or frozen cells were suspended in 60 ml of 25 mM sodium phosphate buffer pH 8.0 containing 2 mM DTT and disintegrated in two passages through a French Pressure cell press (Amincon, Rochester, N.Y., USA) at 10.3 MPa. The soluble fraction was obtained by ultra centrifugation for 90 min at 150000x *g* to remove cell debris, unbroken cells and membrane proteins.

*Assays for geraniol isomerization and linalool dehydration*—Salt containing linalool dehydratase fractions were dialysed three times against a 1000-fold volume of 80 mM Tris-



HCl buffer, pH 9.0, for 20 min at 4°C and under magnetic stirring. Purified and dialysed linalool dehydratase fractions were stored under an anoxic gas phase at 4°C.

Geraniol isomerization and linalool dehydration were assayed routinely in a two-phase system. Anoxic protein solution was transferred into test tubes (17 x 38 mm shorty vials, Zinsser Analytic, Frankfurt, Germany) and DTT was added to 2 mM. The shorty vials had been pre-warmed at 35°C. They were sealed with a butyl septum and the headspace was flushed with CO<sub>2</sub>/N<sub>2</sub> (10/90 (v/v)). The reaction was started by adding a distinct linalool or geraniol concentration to investigate the reaction to myrcene. 10-100 mM of the organic substrate was dissolved in 2,2,4,4,6,8,8-heptamethyl-nonane (HMN). The organic phase was added in a 1:1 ratio to the aqueous protein solution. Kinetic parameters were determined in a one-phase system with 10% (v/v) DMSO. The reaction was started by adding monoterpene (0.1–10 mM) that was dissolved in anoxic 80 mM Tris-HCl buffer, pH 9.0, with 10% DMSO. In a third assay system, a pure myrcene phase (1/2 (v/v) myrcene/Tris buffer) was applied for measuring linalool and subsequently geraniol formation. The tubes were immediately transferred into a 35°C shaking incubator. For kinetic analyses and the myrcene turnover, aqueous samples were taken at different time points and directly injected into the GC. In the two-phase system, one µl of the organic HMN carrier phase was injected for determination of the substrate and product concentration. One unit is defined as the amount of substrate in µmol that is interconverted by one mg of protein into product within one minute. To estimate the effect of temperature on linalool dehydratase activity, the two-phase assay was performed at temperatures between 4°C and 45°C. The pH optimum was tested by varying the buffer systems with pH values near the specific pK<sub>A</sub> values at 35°C. The two-phase assay was also used to determine the influence of different effectors on enzyme activities.

The concentrations of the monoterpenes were analyzed by gas chromatography (Perkin Elmer Auto System XL, Überlingen, Germany) equipped with an Optima® -5 (0,25 µm, 50 m x 0,32 mm ID, Macherey-Nagel, Düren, Germany) column and an FID. The following temperature program was applied: injection port temperature: 250°C, column start temperature: 85°C for 1 min, increasing to 120°C at a rate of 5°C min<sup>-1</sup>, 120°C for 0,1 min, increasing to 290°C at a rate of 45°C min<sup>-1</sup>, 290°C for 1 min, detection temperature: 350°C. The split ratio was set to 1:25.

*Purification of the linalool dehydratase*—The purification was performed with an Äkta system (GE Healthcare, Freiburg, Germany). All purification procedures were carried out at 4°C with filtered (0.2 µm) and degassed buffers. 100 ml soluble extract obtained from cells grown on limonene was applied to a Source 30 Q column (5 x 30 cm) equilibrated in 50 mM sodium phosphate, pH 8.0. The enzyme eluted at 200 mM NaCl in the aforementioned buffer during a stepwise gradient performed with 3.5 ml min<sup>-1</sup>. Fractions containing linalool dehydratase were pooled and saturated ammonium sulfate solution was added to a final concentration of 15% (v/v). The protein solution was applied to a butyl sepharose FF column (4.7 ml) pre-equilibrated with 15% (v/v) saturated ammonium sulfate in 80 mM Tris-HCl, pH 8.0. After a first elution with 80 mM Tris-HCl, pH 8.0, the target enzyme was eluted with 6 M urea. The urea fraction, typically 20 ml, was mixed with saturated ammonium sulfate solution to a final concentration of 40% (v/v). After centrifugation for 10 min at 20000x g and 20°C, the supernatant was withdrawn and the pellet was solved in 2 ml 100 mM Tris-HCl, pH 8.0. The concentrated solution was passed through a Superdex 200-pg column (120 ml) equilibrated with 10 mM Tris-HCl, pH 9.0. The active fractions from the gel filtration were applied to a second anion exchange chromatography with a different column material (ResourceQ, 1ml) that was pre-equilibrated with 10 mM Tris-HCl, pH 7.0. The enzyme eluted at 120 mM NaCl in a step gradient performed with 2 ml min<sup>-1</sup>.

*Purification of the precursor protein*—The purification was comparable to the aforementioned scheme with two differences: after the first anion exchange chromatography linalool dehydratase containing fractions were pooled and saturated ammonium sulfate solution was added to a final concentration of 15% (v/v). The protein solution was applied to a phenyl sepharose FF column (25 ml) pre-equilibrated with 15% (v/v) saturated ammonium sulfate in 50 mM sodium phosphate, pH 8.0. After a first elution with 4,5% (v/v) (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> in 50 mM sodium phosphate, pH 8.0, proteins of interest were eluted with pure MilliQ-water. After the ammonium sulphate precipitation and size exclusion chromatography aforementioned, the active fractions from the gel filtration were applied to the second anion exchange chromatography (ResourceQ, 1ml) that was pre-equilibrated 50 mM sodium phosphate, 8.0. The enzyme eluted at 180 mM NaCl in a step gradient performed with 2 ml min<sup>-1</sup>.

*Determination of relative molecular mass*—The apparent relative molecular mass of the native enzyme was determined by gel filtration on a Superdex<sup>TM</sup>200-pg column (120 ml). The standard proteins (in kDa) were catalase (232), aldolase (158), bovine serum albumin (67), ovalbumin (43) and chymotrypsinogen A (25). The molecular mass of the monomeric enzyme was determined using a 12% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel stained with Coomassie Blue R250 (Laemmli, 1970). The protein ladder (Fermentas, St. Leon-Rot) covered a wide range molecular weights from 10 to 170 kDa.

*UV-visible Spectroscopy*—Standards and purified linalool dehydratase fractions were dissolved in 80 mM Tris-HCl, pH 8.0 in the range between 10–100  $\mu\text{g ml}^{-1}$ . UV absorption spectra were obtained by using a DU 600 UV/VIS spectrophotometer (Beckman Coulter, Krefeld, Germany).

*Protein determination*—The protein content was measured by coomassie blue R250 protein assay (Bradford, 1976) and by using bovine serum albumin as the standard.

*N-terminal amino acid sequence analysis*—Purified linalool dehydratase was separated by 12%-SDS-PAGE and electroblotted on a PVDF membranes (Sequi-Blot, Bio-Rad, München, Germany) according to the method (Towbin et al., 1979). The membrane was washed for 1 min with distilled water and stained with staining coomassie blue R250 (0.025% (v/v) Coomassie in 40% (v/v) Methanol) for 30 s before destaining with a water-methanol-acetic acid mixture (50/45/5, v/v/v). The PVDF-membrane was washed with distilled water and allowed to dry for six hours. The protein was excised from the membrane and Edman degradation of the N-terminal amino acid residues was performed by Toplab GmbH (Martinsried, Germany). The gene and the protein sequence were deposited at Genbank under accession nr. xxx xxx.

## Results

Soluble extracts of *C. defragrans* catalyzed the transformation of geraniol in two directions. A  $\text{NAD}^+$ -reducing activity showed the presence of a geraniol dehydrogenase (Harder, unpublished results). In the absence of an electron acceptor, the dialysed soluble extract formed initially linalool and, after a certain linalool concentration was reached, myrcene appeared. Both compounds were detected and identified by gas chromatography and GC-MS (data not shown). Linalool was transformed to myrcene. We initiated the purification of the linalool dehydratase.

Biomass yields were lower on myrcene than on limonene. Hence we grew *C. defragrans* on limonene. The crude extracts showed comparable specific linalool dehydratase activities.

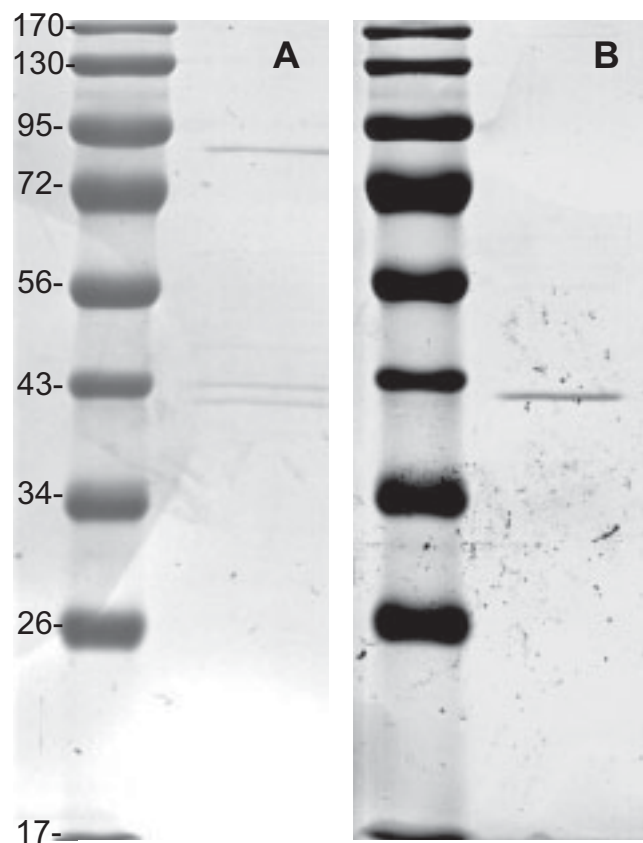


Fig. 2: SDS-PAGE of proteins obtained by an initial and the final linalool dehydratase purification scheme. (A) The preparation contains as major proteins a 43 and a 40 kDa protein, presumably the preprotein and the mature protein. (B) The preparation contains a single protein band. The gels contained 12% acrylamide and were stained with coomassie. Gels with lower acrylamide content revealed the absence of smaller proteins (data not shown).

*Purification of linalool dehydratase from C. defragrans strain 65Phen*—The purification of the linalool dehydratase yielded initially a preparation with several proteins (Fig. 2A). A significant progress was the replacement of the phenyl-sepharose column by a butyl-sepharose column. The protein eluted from this column in the 6 M urea fraction. In a five-step protocol, the enzyme activity was purified to a single protein band (Fig. 2B). The linalool dehydratase protein yield was 0.02% of the initial protein, accompanied by a 1846-fold increase in the specific activity (Tab. 1). Gel filtration chromatography on a Superdex<sup>TM</sup>200-pg column gave a single peak of active protein after 62 ml retention volume. Based on a calibration with standard proteins, linalool dehydratase exhibited a native molecular mass of 160 kDa. SDS-PAGE of the purified enzyme showed a single band at a molecular mass of 40 kDa (Fig. 2B). These observations suggested that the linalool dehydratase from *C. defragrans* 65Phen is in its active form a homotetramer ( $\alpha_4$ ). UV-visible absorbance spectra revealed no absorbance between 300 and 850 nm, suggesting the absence of a prosthetic group.

Tab. 1. Purification of linalool dehydratase from *C. defragrans* 65Phen

Purification step	Protein [mg]	Activity [mU]	Specific activity [mU/mg]	Relative specific activity	Protein yield [%]
crude extract	2490.3	775	0.3	1	100.0
anion exchange	401.6	1527	3.8	13	16.1
hydrohobic interaction	33.3	1149	34.5	115	1.3
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> precipitation	15.3	2032	132.8	443	0.6
size exclusion	6.9	1160	167.0	557	0.3
anion exchange	0.6	320	553.7	1846	0.1

*Catalytic properties of the purified linalool dehydratase*—The purified protein catalyzed in the absence of molecular oxygen and in the presence of 2 mM DTT the dehydration of linalool to myrcene. Geraniol was isomerized initially to linalool and subsequently myrcene appeared (Fig. 3A). Thus one protein catalyzed both novel enzyme activities that were observed in the soluble extracts. Both activities coincided in all purification steps (Fig. 4) and the purification of the geraniol isomerase activity was 1740-fold.

The enzyme activity measurements were performed in a two-phase system with an organic carrier phase, 2,2,4,4,6,8,8-heptamethylnonane. The organic phase served as reservoir for

the monoterpenoids and in equilibrium the actual concentrations in aqueous solution were in the micromolar range. Observed rates under these conditions were low,  $0.87 \text{ mU ((mg protein))}^{-1}$  for linalool dehydratase and  $0.53 \text{ mU mg}^{-1}$  for geraniol isomerase. The organic carrier phase served also as a solvent for myrcene. Like other monoterpenes, myrcene is hundredfold less soluble in water than monoterpenoids: it has a solubility of  $43 \text{ }\mu\text{M}$  and an octanol/water partition coefficient of  $\log P = 4.5$  (Schmid et al., 1992). The enzyme activities were not inhibited by 10% (v/v) DMSO. Thus we performed the kinetic characterization in a single phase system with 10% (v/v) DMSO. The linalool dehydratase and the geraniol isomerase activities exhibited a typical Michaelis–Menten kinetics with  $V_{\text{max}}$  values of 8.4 and  $24.6 \text{ U mg}^{-1}$  protein, respectively (Fig. 5). The  $K_{\text{m}}$  values for linalool and geraniol were  $750 \text{ }\mu\text{M}$  and  $500 \text{ }\mu\text{M}$ , respectively.

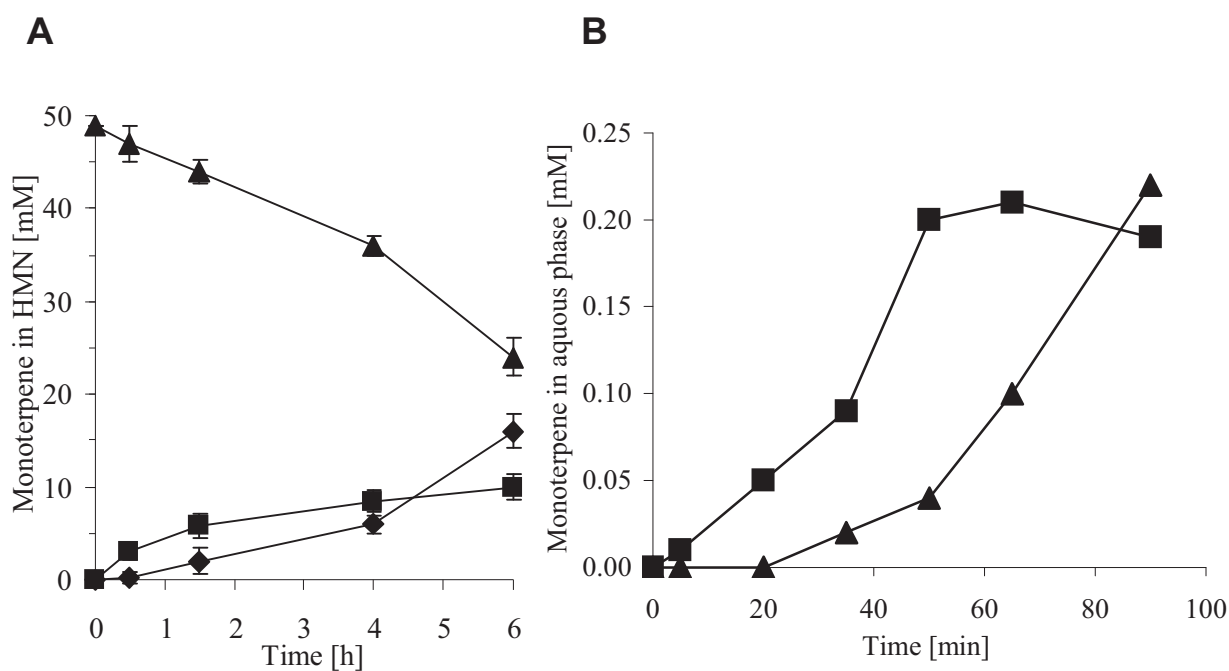


Fig. 3: Time course of monoterpene transformation by the purified linalool dehydratase in a two-phase-system with HMN as organic carrier phase (A) and in the presence of a myrcene phase (B). Myrcene (◆), Linalool (■), Geraniol (▲).

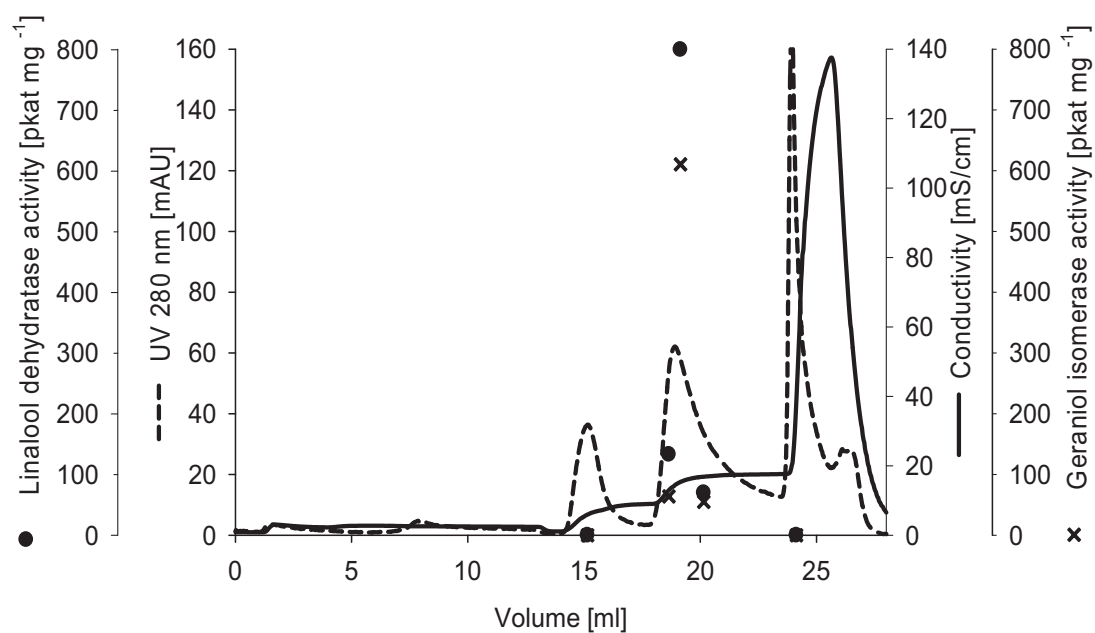


Fig. 4: Protein purification on anion exchange chromatography (AIE-Q2). Linalool dehydratase and geraniol isomerase activities eluted together at 120 mM sodium chloride. The most active fraction contained a single protein on SDS-PAGE (Fig. 2B)

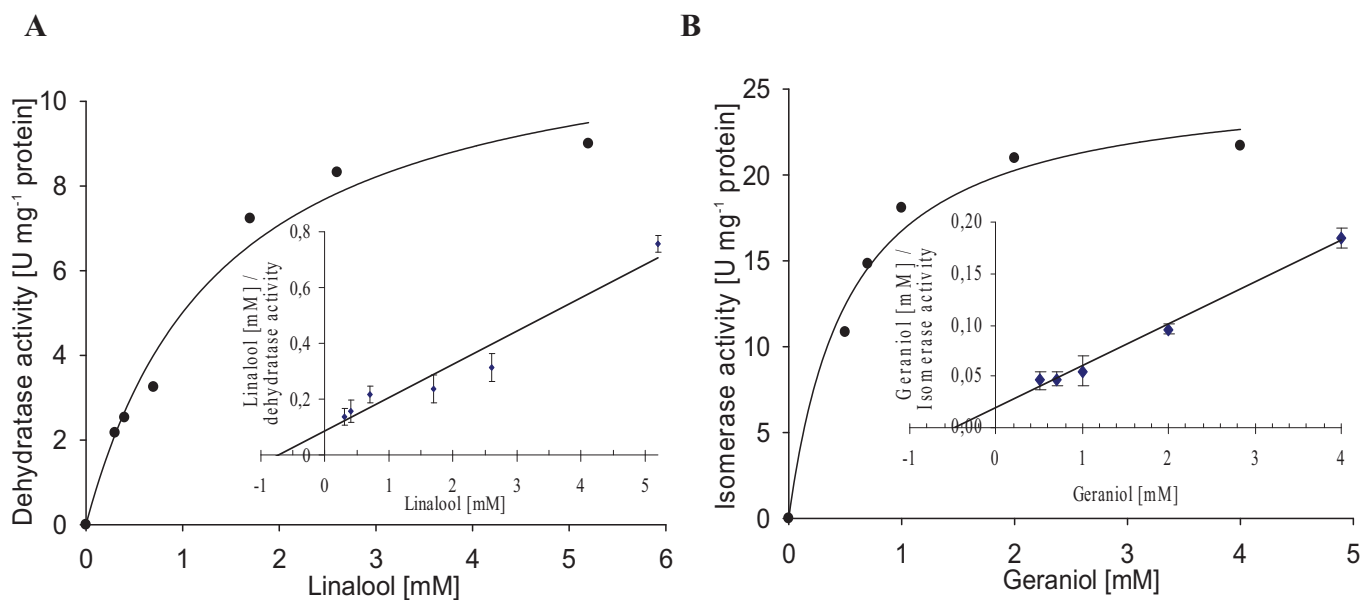


Fig. 5: Michaelis-Menten plots of linalool dehydratase activity (A) and geraniol isomerase activity (B). The inserts are Hanes plots revealing the  $K_m$  and  $V_{max}$  values.

Quantification of the reverse reactions, the hydration of myrcene to linalool and the isomerization of linalool to geraniol, were attempted with a myrcene-saturated aqueous phase which was maintained by a pure myrcene phase. The formation of linalool proceeded initially with a maximum specific activity of  $8 \text{ mU mg}^{-1}$  (Fig. 3B). After an accumulation of  $0.2 \text{ mM}$  linalool, geraniol was formed with a similar rate. This experiment revealed the reversibility of the enzyme activity. In systems without a pure myrcene phase we never detected the formation of geraniol from linalool, neither in the two-phase system with an organic carrier nor in a DMSO-containing aqueous system. Only myrcene was detected as product in these experiments.

We tested other acyclic monoterpenes as substrate for the enzyme. Neither the monoterpenes  $\alpha$ - and  $\beta$ -ocimene nor the monoterpenoids citronellol and nerol were transformed. Ocimenes are stereoisomers of myrcene, but lack the methylene group in the C3 position. Citronellol lacks the double bond at the C2-carbon atom and nerol is the trans-isomer to geraniol. Thus, the enzyme seems to require a cis-configuration and a methylene group in the C3 position in the substrates for activity.

*Effects of various compounds*—The purified linalool dehydratase required only DTT as reducing agent and an oxygen free micro-environment ( $<1\%$  (v/v)) for the dehydration of linalool. The activity was not detectable in the presence of  $1 \text{ mM}$  titanium(III)citrate. Other inhibitors were molecular oxygen (Table 2) and high salt concentrations. NaCl, KCl or  $\text{MgCl}_2$  at concentrations of  $220 \text{ mM}$  inhibited the enzyme activity completely. The metal-chelating agent EDTA ( $5 \text{ mM}$ ) did not affect the enzyme activity, suggesting that either the protein does not require metals for activity or the chelating molecule was not able to remove the metals under the assay conditions. Potassium nitrite or nitrate ( $20 \text{ mM}$ ) did not influence the enzyme activity. Coenzyme A was ineffective as a cofactor.



Tab. 2. Effectors on enzyme activity. The complete assay contained 150  $\mu$ l 100 mM monoterpene dissolved in HMN and 150  $\mu$ l protein solution (0.05-5 mg/ml) including 2 mM DTT. The incubations were performed anoxically under shacking at 35°C.

Assay conditions	Concentration (mM)	Relative activity of linalool dehydration [%]	Relative activity of geraniol isomerisation [%]
Complete assay		100	100
without DTT	- 2 mM	10	10
Ti(III) citrate	1 mM	0	0
O <sub>2</sub>	0.1 % (v/v)	100	100
	0.5 % (v/v)	110	110
	1 % (v/v)	90	90
	20 % (v/v)	5	5
	99.9 % (v/v)	0	0
Pyridoxal-phosphate (pH 7.0)	1 mM	65	100
S'-adenosylmethionine	40 mM	20	500

*Optimal pH and thermophilicity*—The linalool dehydratase activity had an optimal temperature at 35°C. The enzyme activity had a pH maximum at low alkaline conditions (Fig. 6), but there was a sharp decrease in linalool dehydratase activity beyond pH 9.0. The optimal pH was 9.0 with Tris-HCl buffer. The temperature dependence of the reaction showed a linear Arrhenius plot in the range from 22°C to 35°C (Fig. 7), with an activation energy of  $E_A = 68.6$  kJ/mol.

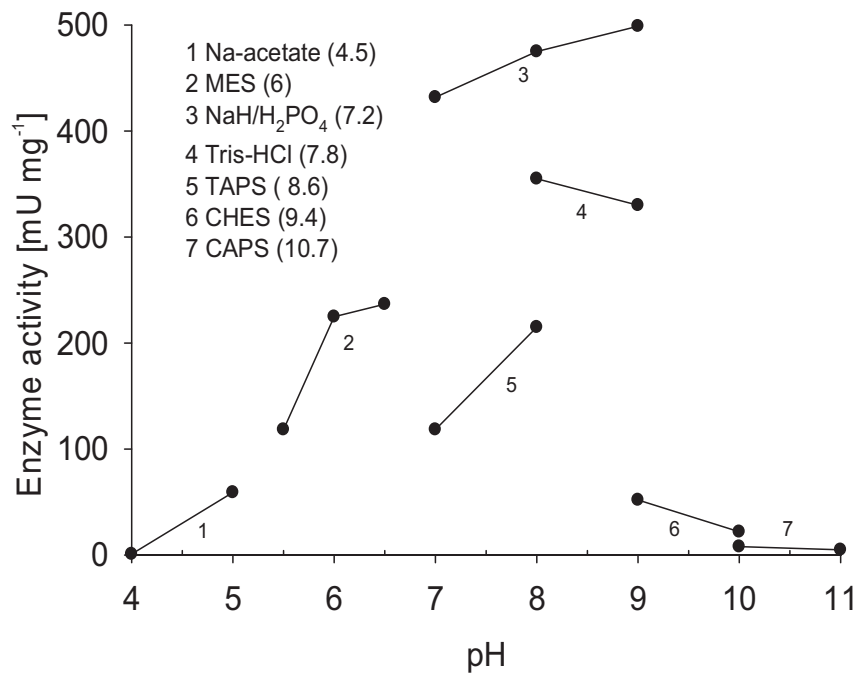


Fig. 6: pH activity profile of purified linalool dehydratase from *C. defragrans*. Activity was measured using 2 mM linalool in the two-phase-system. The buffers are listed with the pKa values at 35°C.

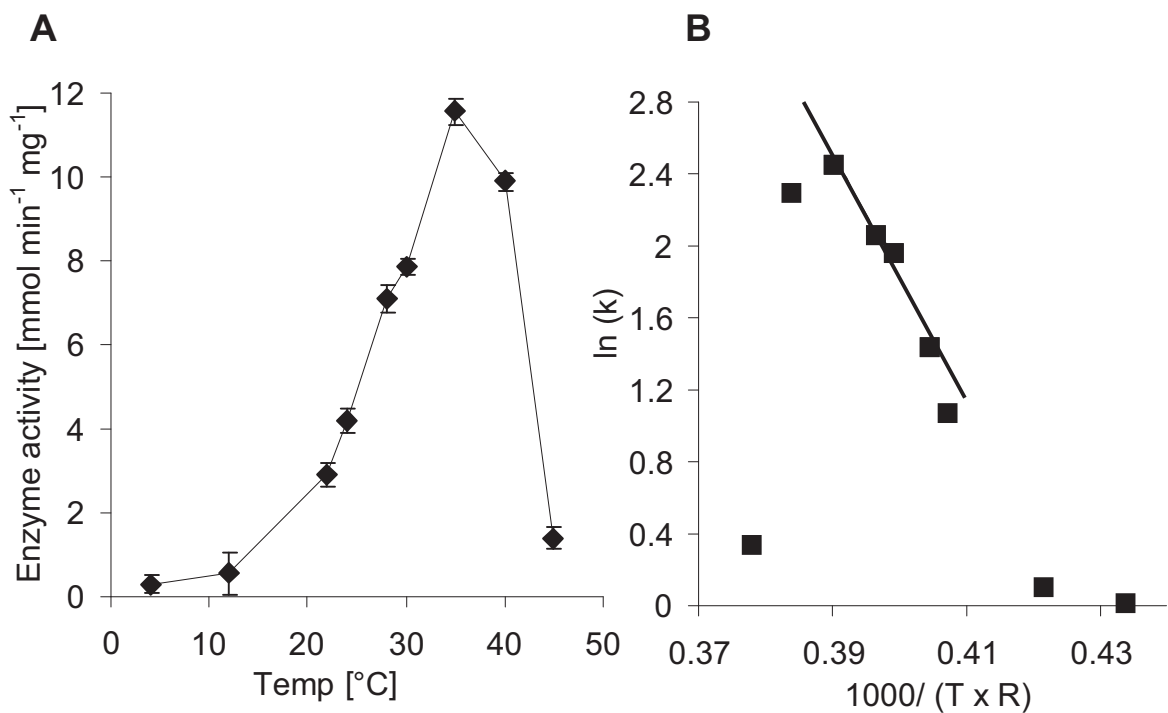


Fig. 7: Temperature profile (A) and Arrhenius plot (B). The activation energy is given by the negative slope of the regression curve in the range from 22 to 30 degree Celsius with  $E_A = 68.6$  kJ/mol

*Identification of the open reading frame*—The N-terminal protein sequence was determined and the corresponding open reading frame was found within a fosmid sequence obtained from *C. defragrans* 65Phen (Harder et al., unpublished). The gene coded for a preprotein with 397 amino acids, including an N-terminal signal peptide sequence (MRFTLKTTAIVSAAALLAGFGPPPR~~AA~~) for a transport into the periplasmic space. The alanin pair residues represent the cleavage motif. The experimentally determined N-terminus of the purified protein started with the second alanine of the predicted cleavage motif (AELPPGRLATTE). Analyses with SignalP 3.0 (Bendtsen et al., 2004) and previous studies (von Heijne, 1983) suggested a Sec-dependent membrane translocation mechanism for the preprotein into the periplasmic space. Thus the purified protein represented a matured protein. According to *in-silico* mass calculation the precursor exhibits a molecular weight of 43 kDa. This is supported by the purification of a 43 kDa protein within the initial purification scheme (Fig. 2A).

Comparisons of the protein and of the gene sequences with nucleotide, microbe and environmental databanks did not reveal significant relationships to known proteins and genes. TblastN (Altschul et al., 1997) identified as closest relative a hypothetical partial mRNA protein from the eukaryotic ascomycota *Aspergillus oryzae* RIB40 with an E-value of 2E-08. The biotransformation potential of *Aspergillus* species on myrcene had been elucidated (Farooq et al., 2004), however, linalool was not detected as transformation product. TblastP identified as closest hit a hypothetical protein form another eukaryotic ascomycota, *Nectria haematococca* mpVI, with an E value of 2E-12.

A ClustalW alignment of the linalool dehydratase-isomerase with characterized dehydratases, a  $\gamma$ -carotene 1,2-hydratase (CruF) from *Deinococcus radiodurans* R1 (Sun et al., 2009), a hydroxyneurosporene synthase from *Rhodospirillum rubrum* ATCC 11170 and the  $\gamma$ -carotene 1,2-hydroxylase from *Synechococcus* sp. PCC 7002 showed no relevant scores. This indicated again the novel character of this enzyme and its catalyzed activity.

## Discussion

Myrcene (7-methyl-3-methylene-1,6-octadiene) is an acyclic C<sub>10</sub>-hydrocarbon and represent a large fraction (74%) of monoterpenes extracted from essential oils of the hop plant *Humulus lupulus* (Thompson et al., 2009). The transformation of this unsaturated hydrocarbon at the enzymatic level was never investigated under anaerobic conditions. Here we described a new possibility of an initial reaction in the anaerobic hydrocarbon degradation: the hydration of myrcene. First a water molecule is added to the methylene double bond. Mechanistically it may be equivalent to a chemical water addition catalyzed by acids, leading to linalool, a tertiary allyl alcohol (3,7-dimethyl-1,6-octadien-3-ol). A subsequent isomerization yielded the primary allyl alcohol geraniol (3,7-dimethylocta-2,6-dien-1-ol). These two reactions are catalyzed by a single bifunctional enzyme, the linalool dehydratase-isomerase. Linalool is thermodynamically more stable than geraniol, according to experimental observations in a two-phase system (Föß and Harder, 1997). The authors measured a 5.9 kJ mol<sup>-1</sup> higher stability for linalool. Our observations confirmed this: the linalool dehydratase-isomerase catalyses the formation of linalool and subsequently of myrcene. The observation of the reverse reactions, myrcene to linalool and linalool to geraniol, revealed that the Gibbs free energy change of the hydration is rather small. The steady state equilibrium with 0.2 mM linalool in the presence of a myrcene phase (Fig. 3B) corresponds on the basis of a maximum water solubility of linalool of 10.1 mM (Fichan et al., 1999) to a difference in free energy of -10.1 kJ mol<sup>-1</sup> at 35°C which is an upper estimate due to the geraniol isomerase activity.

The linalool dehydratase-isomerase seems to be a cofactor-free enzyme. The UV-visible absorption spectrum of the purified enzyme revealed only amino acids. The purification with an elution with 6 M urea suggests a unfolding and a spontaneous folding during the dialysis. This argues together with the lack of inhibition by EDTA for the absence of a non-permanently bound cofactor. The only requirement for enzyme activity of the purified protein was a mild reducing agent, DTT, and the absence of oxygen or a strong reducing agent, e.g. Ti(III)citrate. The redox state of the four cysteines in the protein seems to be important for catalysis.

The amino acid sequence analysis attested a Sec-dependence translocation of linalool dehydratase-isomerase. Typically for these translocated proteins is a cytosolic preprotein

with a short signal sequence with a two alanine motif at the end, representing the cleavage site (von Heijne, 1983). The enzyme is transported across the cytoplasmic membrane in an unfolded state. During this process the signal peptide is cleaved.

The periplasmatic location of the enzyme reduces the amount of hydrocarbons in the inner membrane. The alcohol has a higher water solubility and a lower partition coefficient. Thus the alcohol may diffuse into the cytosol to be processed further. A periplasmatic location for a hydrocarbon activation enzyme was already detected in the denitrifying *Azoarcus* sp. EbN1 (*Aromatoleum aromaticum* EbN1) (Kniemeyer and Heider, 2001). A dehydrogenase oxidizes ethylbenzene to (*S*)-1-phenylethanol. Future experiments with protein labelling or specific antibodies may describe the translocation in more detail.

In summary, this work represents the enzyme for the initial metabolism of myrcene, an acyclical monoterpene, under anaerobic conditions. A novel type of dehydratase-isomerase is acting also on linalool. We recommend the disposition of a new protein family with the EC number 4.2.1.X.

**Acknowledgments**

We thank Robert Marmulla for his excellent technical assistance. This study was financed by the Max Planck Society.

## References

- Aeckersberg, F., Bak, F. and Widdel, F. (1991). Anaerobic oxidation of saturated hydrocarbons to CO<sub>2</sub> by a new type of sulfate-reducing bacterium. *Arch. Microbiol.* **156**: 5-14.
- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schaffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. and Lipman, D. J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* **25**: 3389-3402.
- Bendtsen, J. D., Nielsen, H., von Heijne, G. and Brunak, S. (2004). Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0. *J. Mol. Biol.* **340**: 783-795.
- Boucher, y. and Doolittle, W. F. (2000). The role of lateral gene transfer in the evolution of isoprenoid biosynthesis pathways. *Mol. Microbiol.* **37**: 703-716.
- Bradford M. M. (1976). A rapid and sensitive method for quantitation of microgrammes quantities of protein utilizing the principle of protein dye-binding. *Anal Biochem* **72**: 248-254.
- Chiang, Y., Ismail, W., Mueller, M. and Fuchs, G. (2007). Initial steps in the anoxic metabolism of cholesterol by the denitrifying *Sterolibacterium denitrificans*. *J. Biol. Chem.* **282**: 13240-13249.
- Erman, W. F. (1985). Chemistry of the monoterpenes: an encyclopedic handbook. Studies in organic chemistry. Gassman, P. G. New York, Marcel Dekker. **A, B**.
- Evans, P. J., Ling, W., Goldschmidt, B., Ritter, E. R. and Young, L. Y. (1992). Metabolites formed during anaerobic transformation of toluene and o-xylene and their proposed relationship to the initial steps of toluene mineralization. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**: 496-501.
- Farooq, A. R., Rahman, A. and Choudhary, A. I. (2004). Fungal transformation of monoterpenes. *Curr. Org. Chem.* **8**: 353-367.
- Fichan, I., C. Larroche, Gros, J. B. (1998). Water solubility, vapor pressure, and activity coefficients of terpenes and terpenoids. *J. Chem. Eng. Data* **44**: 56-62.
- Förster-Fromme, K. and Jendrossek, D. (2008). Biochemical characterization of isovaleryl-CoA dehydrogenase (LiuA) of *Pseudomonas aeruginosa* and the importance of *liu* genes for a functional catabolic pathway of methyl-branched compounds. *FEMS Microbiol. Lett.* **286**: 78-84.
- Foss, S. and Harder, J. (1997). Microbial transformation of a tertiary allyl alcohol: regioselective isomerisation of linalool to geraniol without nerol formation. *FEMS Microbiol. Lett.* **149**: 71-75.

- Foss, S. and Harder, J. (1998). *Thauera linaloolentis* sp. nov. and *Thauera terpenica* sp. nov., isolated on oxygen-containing monoterpenes (linalool, menthol and eucalyptol) and nitrate. *System. Appl. Microbiol.* **21**: 365-373.
- Foss, S., Heyen, U. and Harder, J. (1998). *Alcaligenes defragrans* sp. nov., description of four strains isolated on alkenoic monoterpenes ((+)-menthene,  $\alpha$ -pinene, 2-carene, and  $\alpha$ -phellandrene) and nitrate. *System. Appl. Microbiol.* **21**: 237 - 244.
- Guenther, A., Hewitt, C. N., Erickson, D., Fall, R., Geron, C., Graedel, T., Harley, P., Klinger, L., Lerdau, M., McKay, W. A. P., Pierce, T., Scholes, B., Steinbrecher, R., Tallamraju, R., Taylor, J. and Zimmerman, P. (1995). A global model of natural volatile organic compound emissions. *J. Geophys. Res.* **100**: 8873–8892.
- Harder, J., Heyen, U., Probian, C. and Foß, S. (2000). Anaerobic utilization of essential oils by denitrifying bacteria. *Biodegradation* **11**: 55-63.
- Harder, J. and Probian, C. (1995). Microbial degradation of monoterpenes in the absence of molecular oxygen. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**: 3804-3808.
- Hartmans, S., Weber, F. J., Somhorst, D. P. M. and de Bont, J. A. M. (1991). Alkene monooxygenase from *Mycobacterium*: a multicomponent enzyme. *J. Gen. Microbiol.* **137**: 2555-2560.
- Heider, J. (2007). Adding handles to unhandy substrates: anaerobic hydrocarbon activation mechanisms. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **11**: 188-194.
- Heyen, U. and Harder, J. (1998). Cometabolic isoterpinolene formation from isolimonene by nitrifying *Alcaligenes defragrans*. *FEMS Microbiol. Lett.* **169**: 67-71.
- Heyen, U. and Harder, J. (2000). Geranic acid formation, an initial reaction of anaerobic monoterpene metabolism in denitrifying *Alcaligenes defragrans*. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**: 3004-3009.
- Hunter, W. N. (2007). The non-mevalonate pathway of isoprenoid precursor biosynthesis. *J. Biol. Chem.* **282**: 21573-21577.
- Kamens, R., Jang, M., Chien, C. and Leach, K. (1999). Aerosol formation from the reaction of  $\alpha$ -Pinene and ozone using a gas-phase kinetics-aerosol partitioning model. *Environ. Sci. Technol.* **33**: 1430-1438.
- Kämpfer, P., Denger, K., Cook, A. M., Lee, S. T., Jäckel, U., Denner, E. B. M. and Busse, H. J. (2006). *Castellaniella* gen. nov., to accommodate the phylogenetic lineage of *Alcaligenes defragrans*, and proposal of *Castellaniella defragrans* gen. nov., comb. nov. and *Castellaniella denitrificans* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **56**: 815-819.
- Kiendler-Scharr, A., Wildt, J., Maso, M. D., Hohaus, T., Kleist, E., Mentel, T. F., Tillmann, R., Uerlings, R., Schurr, U. and Wahner, A. (2009). New particle formation in forests inhibited by isoprene emissions. *Nature* **461**: 381-384.



- Kloer, D. P., Hagel, C., Heider, J. and Schulz, G. E. (2006). Crystal structure of ethylbenzene dehydrogenase from *Aromatoleum aromaticum*. *Structure* **14**: 1377-1388.
- Kniemeyer, O. and Heider, J. (2001). Ethylbenzene dehydrogenase, a novel hydrocarbon-oxidizing molybdenum/iron-sulfur/heme enzyme. *J. Biol. Chem.* **276**: 21381-21386.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophages. *Nature* **227**: 680 - 685.
- Pare, P. W. and Tumlinson, J. H. (1997). Induced synthesis of plant volatiles. *Nature* **385**: 30-31.
- Rabus, R., Wilkes, H., Behrends, A., Armstroff, A., Fischer, T., Pierik, A. J. and Widdel, F. (2001). Anaerobic initial reaction of *n*-alkanes in a denitrifying bacterium: Evidence for (1-methylpentyl)succinate as initial product and for involvement of an organic radical in *n*-hexane metabolism. *J. Bacteriol.* **183**: 1707-1715.
- Schmid, C., Steinbrecher, R. and Ziegler, H. (1992). Partition coefficients of plant cuticles for monoterpenes. *Trees* **6**: 32-36.
- Sun, Z., Shen, C., Wang, C., Wang, H., Hu, Y., Jiao, J., Ma, T., Tian, B. and Hua, Y. (2009). A novel carotenoid 1,2-hydratase (CruF) from two species of the non-photosynthetic bacterium *Deinococcus*. *Microbiology* **155**: 2775-2783.
- Thompson, M. L., Marriott, R., Dowle, A. and Grogan, G. (2009). Biotransformation of  $\beta$ -myrcene to geraniol by a strain of *Rhodococcus erythropolis* isolated by selective enrichment from hop plants. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* DOI 10.1007/s00253-009-2182-6.
- Towbin, H., Staehelin, T. and Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **76**: 4350-4354.
- Trudgill, P. W. (1986). Terpinoid metabolism by *Pseudomonas*. *The bacteria: a treatise on structure and function*. Gunsalus, I. C. New York, Academic press. **10**: 483-528.
- van der Werf, M. J., Swarts, H. J. and de Bont, J. A. M. (1999). *Rhodococcus erythropolis* DCL14 contains a novel degradation pathway for limonene. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 2092-2102.
- von Heijne, G. (1983). Patterns of amino acids near signal-sequence cleavage sites. *Eur. J. Biochem.* **133**: 17-21.
- Zimmerman, P. R., Chatfield, R. B., Fishman, J., Crutzen, P. J. and Hanst, P. L. (1978). Estimates on the production of CO and H<sub>2</sub> from the oxidation of hydrocarbon emissions from vegetation. *Geophys. Res. Lett.* **5**: 679-682.

## 2

**Enantioselective isomerization of geraniol to the tertiary  
monoterpene alcohol (*S*)-(+)-linalool**

Danny Brodkorb, Robert Marmulla and Jens Harder

Department of Microbiology, Max Planck Institute for Marine Microbiology,  
Bremen, Germany

Manuscript in preparation

Address correspondence to: Department of Microbiology, Max Planck Institute for Marine  
Microbiology, Celsiusstrasse 1, 28359 Bremen, Germany, phone:+49 421 2028-750,  
fax: +49 421 2028-580, e-mail: [jharder@mpi-bremen.de](mailto:jharder@mpi-bremen.de)

**Abstract**

*Castellaniella* (ex *Alcaligenes*) *defragrans* strain 65Phen mineralizes monoterpenes in the absence of oxygen. To elucidate the enantioselectivity, we initiated biotransformation studies with purified enzyme from *C. defragrans* and with soluble extracts of related anaerobic monoterpene-degrading bacterial strains. The linalool dehydratase-isomerase from *C. defragrans* catalyzed the enantioselective conversion of the primary allylic monoterpene alcohol geraniol to (*S*)-(+)-linalool and the dehydration of (*S*)-(+)-linalool to myrcene. (*R*)-(-)-linalool was neither a substrate nor a product. Thus, the formation of (*S*)-(+)-linalool occurred with an enantiomeric excess of  $\geq 99\%$ . Crude extract of the linalool-degrading *Thauera linaloolentis* 47Lol cells catalyzed the isomerization of geraniol to the racemic mixture of (*R,S*)-( $\pm$ )-linalool. A third enzyme activity, detected in *T. terpenica* 58Eu extracts, formed directly myrcene from geraniol. Thus, a variety of geraniol isomerization enzymes exist in nature.

**Keywords:**

Hydratase, dehydratase, isomerase, enantioselectivity, myrcene, (*S*)-(+)-linalool, (*R*)-(-)-linalool, geraniol

## Introduction

Secondary plant metabolites, like monoterpenes, are involved in defense and communication. They act as attractants, repellents, toxins and antibiotics. Hence, they are important for the interaction of sessile plants with other organisms, also in the context of reproduction or biosynthesis (Gershenzon and Dudareve, 2007). Their human applications include agrochemicals and food supplements, such as flavors and fragrances. A wide range of monoterpenes have shown pharmaceutical activity against human diseases such as cancer (Cragg and Newman, 2005; Srivastava et al., 2005; Schwab et al., 2008; Billig and Sherman, 1998; Hulin et al., 1998). Enzyme-catalysed allylic rearrangements are well known in biochemistry, e.g. for the chorismate mutase and pyridoxal phosphate-dependent transaminase (Schwab and Henderson, 1990). In comparison to the chemical isomerization of allylic alcohols, the advantages of biotransformations with purified enzymes may include a higher catalytic efficiency, excellent chemo-, regio- and enantioselectivities, and may proceed under very mild conditions.

Enantiomerically pure tertiary allyl alcohols with one chiral carbon atom are optically active and play a rapidly growing role as precursors in chemical industry (O'Hagan et al., 1993). Among them, linalool and its derivatives constitutes one of the most important monoterpene alcohols used as building blocks for organic synthesis, especially since both linalool enantiomers differ in odor (Bratsch et al., 2008). In this respect, enantio-GC-olfactometry is one method to analyze the different stereoisomers and enantiomers (Wüst and Mosandl, 1999).

The *R*-(-)-enantiomer of linalool 'licareol', is a major constituent of *Cinnamomum camphora* and *Cayenne linaloe* extracts, it exhibits a woody or lavender-like odor. The *S*-(+)-enantiomer 'coriandrol' primarily occurs in coriander oil. It exhibits a floral and orange odor (van der Werf et al., 1997; de Carvalho and de Fonseca, 2006). In higher plants, linalool as other monoterpenoids is produced from isopentenyl pyrophosphate via the universal isoprenoid intermediate geranyl pyrophosphate, through a class of membrane-bound enzymes named monoterpene synthases. One of these, the linalool synthase, has already been reported to produce (*S*)-linalool in several floral tissues (Lewinshon et al., 2001).

(*S*)-(+)-linalool is recently not purchasable from chemical delivery companies, although the chemical synthesis of enantiomerically pure (*S*)-(+)-enantiomer with the readily accessible oxathiane as the chiral template was already demonstrated (Ohwa et al., 1985). Disadvantages are the harsh temperature and the different unusual chemical educts, i. e. sodium borohydride and sodium amalgam, which are necessary for the process. Uenishi and Kubo (1994) established the desulfurization of thiirane as an efficient transformation mechanism of geraniol to (*S*)-(+)- and (*R*)-(-)-Linalool, with (+)- and (-)-diethyl tartrate as chiral inducer, respectively. The obtained yields were 84% and 47%, respectively. Consequently, several attempts have been reported towards the biocatalytic resolution of the linalool enantiomers. An enantioselective transformation of (*S*)-(+)-linalool was already demonstrated in *Aspergillus niger* cultures (Demyttenaere et al., 2001). The authors detected a faster conversion of the (*S*)-(+)-linalool to furanoid and pyranoid linalool oxide compared to the (*R*)-enantiomer. The enantioselective conversion of its acetate ester was also detected in whole resting cells of *Bacillus subtilis* (Oritani and Yamashita, 1973) and *Rhodococcus rubber* (Osprian et al., 1996). With an enantiomeric excess of 58%, the enantioselectivity in *R. rubber* was insufficient for preparative application. In addition, a minor amount was biotransformed to other compounds due to undesired allylic rearrangement, indicating imprecise substrate specificity.

Recently we purified a linalool dehydratase-isomerase from the monoterpene-degrading and nitrate-respiring Betaproteobacterium *Castellaniella defragrans* strain 65Phen, which already showed high stereospecificity. In this study, we investigated the enantioselectivity of the linalool dehydratase-isomerase for the interconversion of geraniol and linalool.

## Experimental Section

*Cultivation of monoterpene-degrading betaproteobacteria*—Bacterial cultures contained 10 mM nitrate and 4 mM monoterpene, dissolved in 2% (v/v) 2,2,4,4,6,8,8-heptamethyl-nonane (HMN). The organic carrier phase reduced the toxic effect of the monoterpene during the cultivation. *C. defragrans* 65Phen was cultured on monoterpenes and on acetate. *C. defragrans* 54 Pin<sup>T</sup> was grown on  $\alpha$ -pinene and limonene and *Thauera linaloolentis* 47Lol<sup>T</sup> on linalool. *Thauera terpenica* 58Eu cells were grown on eucalyptol and on limonene.

*Enzyme assay*—The linalool dehydratase-isomerase was purified as described previously (Brodkorb et al., submitted). Assays were performed under anoxic conditions at 37°C under a nitrogen-carbon dioxide (90/10 v/v) gas atmosphere and by horizontal shaking for several hours. Soluble extracts of other monoterpene-degrading species were dialyzed against anoxic 80 mM Tris-HCl buffer, pH 9.0. The extracts were transferred into test tubes (17 x 38 mm shorty vials, Zinsser Analytic, Frankfurt, Germany), 2 mM DTT in final concentrations were added, sealed with a butyl septum and the headspace was flushed with CO<sub>2</sub>/N<sub>2</sub> (10/90 v/v). The vials were pre-warmed to 37°C. The reaction was started by adding a distinct monoterpene concentration (10 - 100 mM) dissolved in one volume 2,2,4,4,6,8,8-heptamethyl-nonane (HMN). The tubes were briefly shaken and immediately transferred into a 37°C incubator. Samples of the organic HMN carrier phase were taken at different time points and transferred into GC sample vials. The substrate and product concentration were determined by gas chromatography.

*Screening for enantioselectivity by gas chromatography*—Stereopreference of the linalool dehydratase-isomerase and related enzyme activities from the monoterpene-degrading strains were determined by using enantiopure (*R*)-(-)-linalool, the racemic mixture (*R,S*)-( $\pm$ )-linalool and geraniol as substrates in anoxic enzymatic assays. The enantioc-configurations of alcohols were elucidated by chiral GC on a Shimadzu GC-14A (Shimadzu Europa GmbH, Duisburg, Germany) equipped with a chiral GC column (Hydrodex- $\beta$ -6TBDM, 25 m x 0,25 mm ID, Macherey-Nagel, Düren, Germany) and a flame ionization detector. The following temperature programme was applied: injection port temperature:

200°C, column start temperature: 80°C for 1 min, increasing to 130°C at a rate of 5°C min<sup>-1</sup>, 130°C for 0.5 min, detection temperature: 250°C. The split was set to 20:1.



## Results

The bacterium exhibited growth on both enantiomers of the cyclic and chiral monoterpene limonene. Therefore, the ring-opening mechanism seems no to be enantioselective.

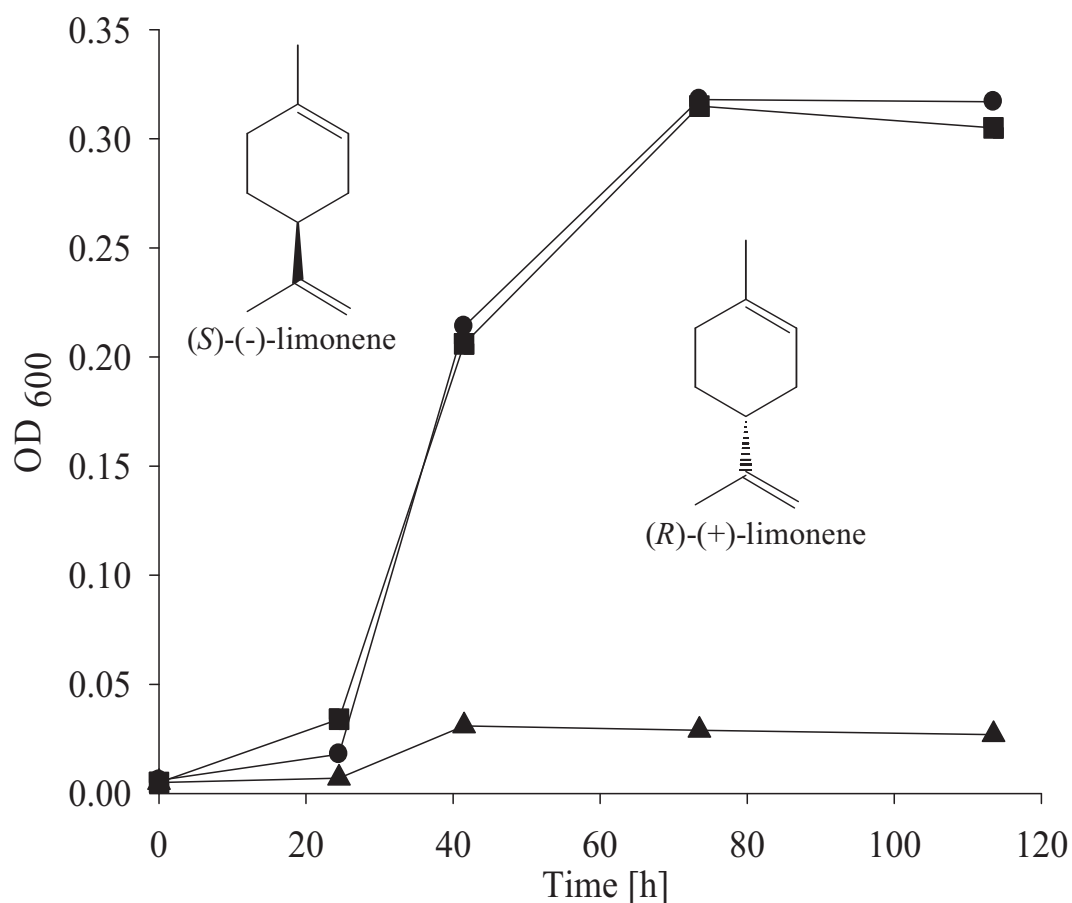


Fig. 1: Growth of *C. defragrans* on (*R*)-(+)-limonene (■), (*S*)-(-)-limonene (●) and without a carbon source (▲).

The purified linalool dehydratase-isomerase catalyzed two reversible reactions. Linalool was dehydrated to myrcene and geraniol was isomerized initially to linalool and subsequently to myrcene. The enantioselective conversion of the primary allylic monoterpene alcohol geraniol was observed by chiral gas chromatography. The geraniol isomerase ac-

tivity exhibited enantioselectivity: (*S*)-(+)-linalool was formed transiently and further dehydrated to myrcene with an *ee* value of  $\geq 99\%$  (Fig.2). (*R*)-(-)-linalool was not detected.

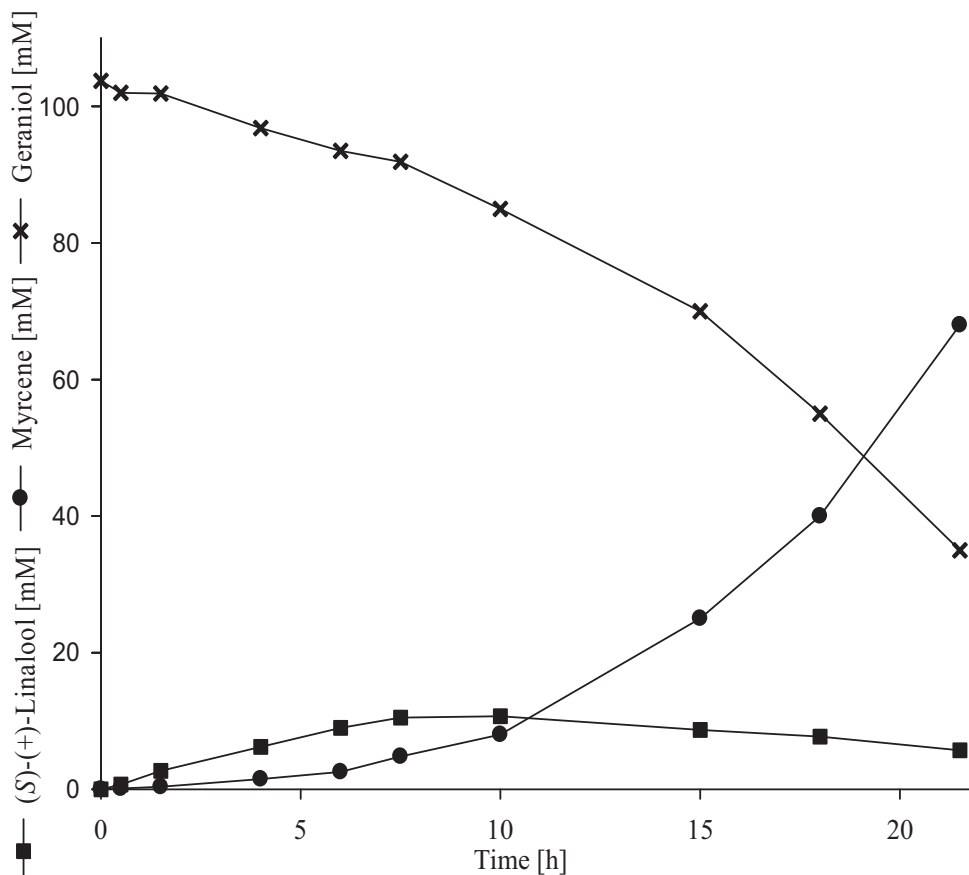


Fig. 2. Enzyme activity of linalool dehydratase-isomerase with geraniol as substrate.

A racemic mixture of (*R,S*)-( $\pm$ )-linalool was used to investigate the enantioselectivity of the linalool dehydratase activity, the second catalytic activity of the bifunctional enzyme. (*S*)-(+)-linalool disappeared with the formation of myrcene. The concentration of (*R*)-(-)-linalool did not significantly change (Fig. 3).

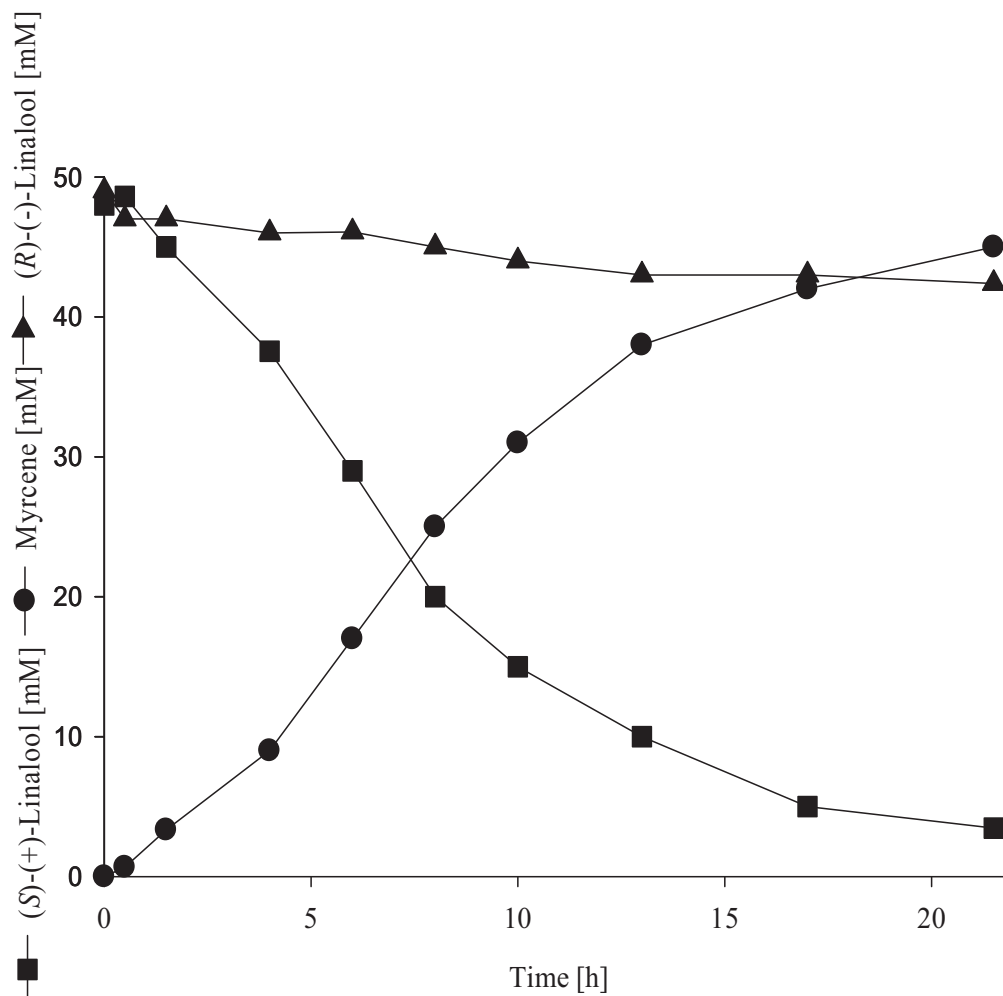


Fig. 3. *C. defragrans* linalool dehydratase-isomerase acting on (*R,S*)-( $\pm$ )-linalool.

The enantioselective dehydration of linalool had an enantiomeric excess (*ee*) of  $\geq 99\%$ . Thus, the enzyme discriminated between the two linalool enantiomers licareol and coriandrol.

Other anaerobic monoterpene-degrading strains showed a different selectivity in the production of linalool. *Thauera linaloolentis* 47Lol mineralized (*R,S*)-( $\pm$ )-linalool during growth completely with an enantiomeric excess (*ee*) of  $\geq 0\%$ . The enantiomers were both transformed to geraniol, where geraniol accumulated to a (*R,S*)-( $\pm$ )-linalool:geraniol ratio of 9 : 1 (data not shown). A dehydration to myrcene was not observed. The dialysed crude extracts catalyzed in the absence of additional electron acceptors an isomerization of geraniol to both isomers, (*S*)-(+)-linalool and (*R*)-(-)-linalool, at equal rates (Fig. 4).

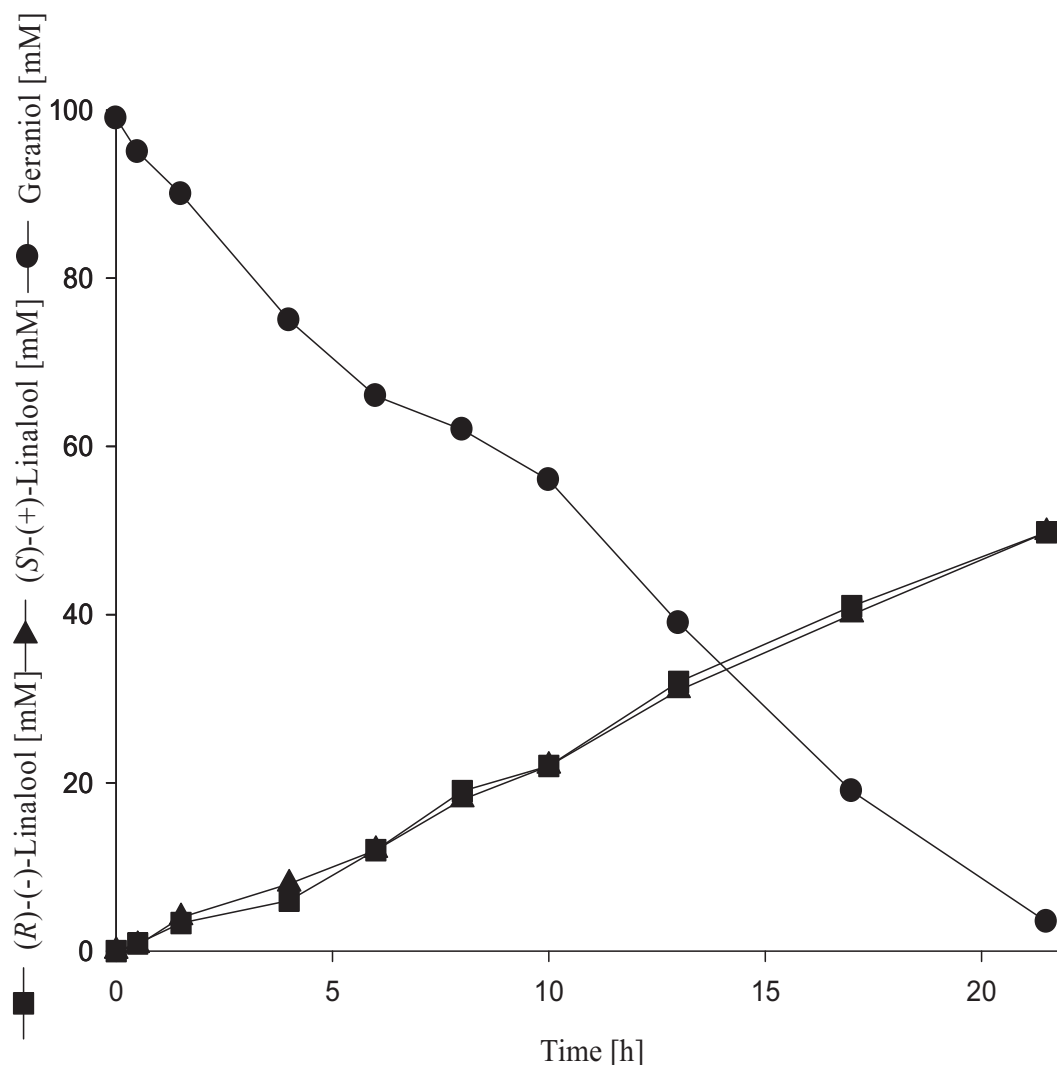


Fig. 4: *Thauera linaloolentis* 47Lol crude extract assay with geraniol as substrate.

The absence of the linalool dehydratase activity in *T. linaloolentis* 47Lol cells confirmed the existence of different geraniol isomerization enzymes in nature. In contrast to *C. defragrans*, *T. linaloolentis* cells exhibited a geraniol isomerase activity without enantioselectivity. This result agrees with the observation of Foss and Harder (1998): a relative broad growth substrate spectrum of *T. linaloolentis* 47Lol, but an incompetence to grow on myrcene was obtained.

Another species of the genera *Thauera* is the eucalyptol-degrading and denitrifying strain *T. terpenica* 58Eu. This organism exhibits neither linalool dehydratase nor geraniol isomerase activity when cells were grown on the cyclic monoterpene alcohol eucalyptol.

A minor formation of myrcene, without the transient formation of linalool was observed in a crude extract assay with geraniol as substrate when cells were grown on the cyclic monoterpene limonene (Table 2). *T. terpenica* 58Eu seems to have two monoterpene degradation pathways. The organism may exhibit modified types of this enzyme, that allows the product of the isomerization reaction to remain bound to the enzyme complex and therefore, it is immediately further dehydrated to myrcene, without the transient formation of the intermediate linalool.

These observations revealed several possibilities for the biotransformation of monoterpenes under anaerobic conditions and a growth-substrate dependent expression of relevant enzymes. This was also observed for *C. defragrans*. Acetate-grown cells exhibited no linalool dehydratase-isomerase.

Table 2: Monoterpene-degrading strains and linalool dehydratase activity with respect to enantioselectivity and transient formation of (*R,S*)-( $\pm$ )-linalool

Monoterpene degrading strain	Grown on	Linalool dehydra- tion [mU mg <sup>-1</sup> ]	Geraniol isomeri- zation [mU mg <sup>-1</sup> ]	Enantiomeric excess [%]
<i>Castellaniella defragrans</i> 65Phen	acetate	0	0	b. d.
<i>C. defragrans</i> 65Phen	limonene	863	925	$\geq 99$
<i>C. defragrans</i> 54Pin	$\alpha$ -pinene	87	96	b. d.
<i>Thauera terpenica</i> 58Eu	eucalyptol	0	$>0^*$	b. d.
<i>T. terpenica</i> 58Eu	limonene	0	90*	b. d.
<i>T. linaloolentis</i> 47Lol	linalool	0	812	$\geq 0$

b. d. = below detection limit ( $\leq 5\%$ )

\* geraniol is directly converted to myrcene, no transient formation of (*R,S*)-linalool

## Discussion

Myrcene (7-methyl-3-methylene-1,6-octadiene) is an acyclic unoxygenated C<sub>10</sub>-compound. The anaerobic biotransformation of this unsaturated hydrocarbon by linalool dehydratase-isomerase was recently described. The reaction proceeded under an oxygen-free atmosphere, without the addition of any additional compound, except DTT as reducing agent.

We started detailed investigation of the linalool dehydratase-isomerase activity and found an excellent enantioselectivity. The conversion of the primary allylic monoterpene alcohol geraniol to its tertiary isomer linalool was highly enantioselective. The formation of (*S*)-(+)-linalool was observed. Further GC analysis revealed the continuing dehydration of (*S*)-(+)-linalool to myrcene. Therefore, also the dehydration activity exhibits enantioselectivity.

On the other hand, crude extract of *Thauera linaloolentis* 47Lol was able to isomerize geraniol to both linalool enantiomers. The racemic mixture of (*R,S*)-( $\pm$ )-linalool as substrate was not dehydrated to myrcene, we measured an evenly decrease of both enantiomers and the formation of a minor amount of geraniol from (*R,S*)-( $\pm$ )-linalool.

In agreement with the observations of Foss and Harder (1998), we found an isomerase without dehydratase activity. Detailed molecular studies could help to investigate the similarities on the basis of DNA and protein level.

To our knowledge this is the first time that a formation of (*S*)-(+)-linalool in an anaerobic growing bacterium was observed. Figure 6 gives an overview about the enzyme catalyzed transformations of myrcene and (*R,S*)-( $\pm$ )-linalool to geraniol.

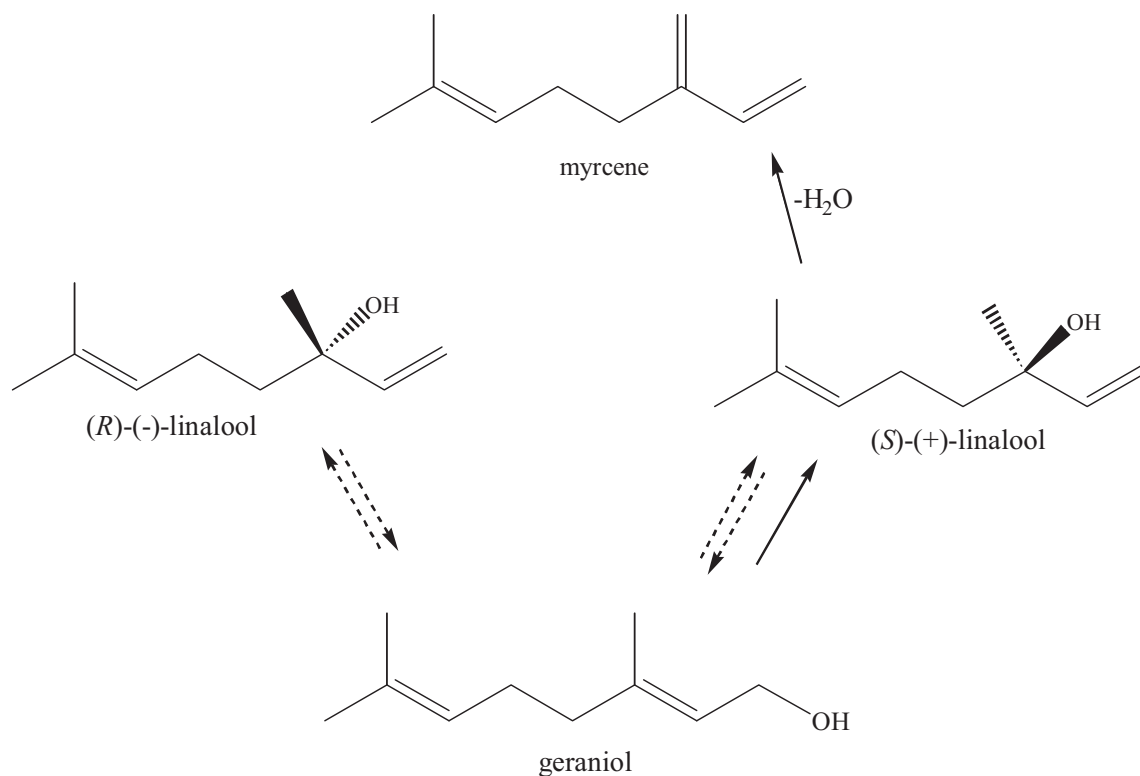


Fig. 6: Myrcene conversion to geraniol via linalool enantiomer formation and experimental proven transformation by *Thauera linaloolentis* 47Lol (dotted arrows) and *C. defragrans* 65Phen (continuous arrows).

Compared to other anaerobic monoterpene-degrading strains the (*S*)-(+)-linalool formation of *C. defragrans* 65Phen is so far a unique feature. The rare feature of double selectivity: *stereoselectivity* and *enantioselectivity* regarding the preference for a given substrate enantiomer makes this enzyme a valuable candidate for the deracemisation of the tertiary alcohol linalool. A pure (*S*)-(+)-linalool is still not commercial available, probably due to a missing remunerative chemical or biotechnological process of synthesis. Cell-free extracts obtained from different plant tissues exhibit a linalool synthase activity. This enzyme is able to produce linalool from geranyl diphosphate (Dudareva et al., 1996). Although the predominant enantiomer produced *in vitro* was (*S*)-(+)-linalool, with an optical purity of just about 85% (Sitrit et al., 2004), the substrate geranyl diphosphate is not as suitable for a promising biotechnological process as myrcene. Like some other monoterpenes also myrcene is categorized as a suitable source of potential renewable chemicals, which resonate with green technology (Vandamme and Soetaert, 2002; Woodley, 2008).

In addition the linalool dehydratase-isomerase exhibits the advantages of a bacterial enzyme, e. g. no posttranslational processing is necessary and a simple harvest, due to its translocation in the periplasmatic space. The formation of (*S*)-(+)-linalool from myrcene by inactivation of the geraniol isomerase activity or the formation of (*S*)-(+)-linalool from geraniol by inactivation of the linalool dehydratase activity could become a beneficial biotechnological process for the synthesis of (*S*)-(+)-linalool.

Even if the linalool dehydratase-isomerase exhibit affords potential in the fine chemicals and pharmaceuticals industry, it's still a "wild-type" enzyme. Often such enzymes do not show broad substrate specificity in combination with sufficiently high *stereoselectivity* and *enantioselectivity*. These limitations can be overcome in the future by using rational protein design or directed evolution.



## **Acknowledgments**

We like to thank Robert Kourist, University of Greifswald, for scientific discussions. This study was financed by the Max Planck Society.

## References

- Bartsch, S., Kourist, R. and Bornscheuer, U. T. (2008). Complete inversion of enantioselectivity towards acetylated tertiary alcohols by a double mutant of a *Bacillus subtilis* esterase. *Angew. Chem. Int. Ed.* **47**: 1508–1511.
- Billing, J. and Sherman, P. I. W. (1998). Antimicrobial functions of spices: Why some like it hot. *Q. Rev. Biol.* **73**: 3-49.
- Cragg, G. M. and Newman, D. J. (2005). Plants as a source of anti-cancer agents. *J. Ethnopharmacol.* **100** 72–79.
- de Carvalho, C. and de Fonseca, M. (2006). Biotransformation of terpenes. *Biotech. Adv.* **24**: 134-142.
- Demyttenaere, J. C. R., Adams, A., Vanoverschelde, J. and De Kimpe, N. (2001). Biotransformation of (*S*)-(+)-linalool by *Aspergillus niger*: An Investigation of the Culture Conditions. *J. Agric. Food Chem.* **49**: 5895-5901.
- Dudareva, N., Cseke, L., Blanc, V. M. and Pichersky, E. (1996). Evolution of floral scent in *Clarkia*: novel patterns of *S*-linalool synthase gene expression in the *C. breweri* flower. *Plant Cell* **8**: 1137-1148.
- Foss, S. and Harder, J. (1998). *Thauera linaloolentis* sp. nov. and *Thauera terpenica* sp. nov., isolated on oxygen-containing monoterpenes (linalool, menthol and eucalyptol) and nitrate. *System. Appl. Microbiol.* **21**: 365-373.
- Gershenzon, J. and Dudareva, N. (2007). The function of terpene natural products in the natural world. *Nat. Chem. Biol.* **3**: 408-414.
- Hulin, V., Mathot, A. G., Mafart, P. and Dufossé, L. (1998). Antimicrobial properties of essential oils and flavour compounds. *Sci. Aliment* **18**: 563-582.
- Lewinshon, E., Schalechet, F., Wilkinson, J., Matsui, K., Tadmor, Y., Nam, K., Amar, O., Lastochkin, E., Larkov, O., Ravid, U., Hiatt, W., Gepstein, S. and Pichersky, E. (2001). Enhanced levels of the aroma and flavor compound *S*-linalool by metabolic engineering of the terpenoid pathway in tomato fruits. *Plant Physiol.* **127**: 1256-1265.
- O'Hagan, D., Zaidia, N. A. and Lamontb, R. B. (1993). The synthesis of (*R*)- $\gamma$ -phenyl- $\gamma$ -(trifluoromethyl)-butyrolactone and (2*R*,3*S*)-1,1,1-trifluoro-2-methoxy-2-phenyl-3,4-epoxybutane in homochiral forms. *Tetrahedron: Asymmetry* **4**: 1703-1708.
- Ohwa, M., Kogure, T. and Eliel, E. L. (1986). An asymmetric synthesis of enantiomerically pure (*S*)-(+)-linalool (3,7-dimethyl-1,6-octadien-3-ol) and a formal synthesis of (*R*)-(-)-linalool. *J. Org. Chem.* **51**: 2599-2601.
- Oritani, T. and Yamashita, K. (1973). Microbial resolution of ( $\pm$ )-acyclic alcohols. *Agric. Biol. Chem.* **37**: 1923-1928.

- Osprian, I., Steinreiber, A., Mischitz, M. and Faber, K. (1996). Novel bacterial isolates for the resolution of esters of tertiary alcohols. *Biotechnol. Lett.* **18**: 1331-1334.
- Schwab, J. M. and Henderson, B. S. (1990). Enzyme-catalysed allylic rearrangements. *Chem. Rev.* **90**: 1203–1245.
- Schwab, W., Davidovich-Rikanati, R. and Lewinsohn, E. (2008). Biosynthesis of plant-derived flavor compounds. *Plant J.* **54**: 712-732.
- Sitrit, Y., Ninio, R., Bar, E., Golan, E., Larkov, O., Ravid, U. and Lewinsohn, E. (2004). *S*-Linalool synthase activity in developing fruit of the columnar cactus koubo [*Cereus peruvianus* (L.) Miller]. *Plant Science* **167**: 1257-1262.
- Srivastava, V., Negi, A. S., Kumar, J. K., Gupta, M. M. and Khanuja, S. P. S. (2005). Plant-based anticancer molecules: A chemical and biological profile of some important leads. *Bioorg. Med. Chem.* **13**: 5892-5908.
- Uenishi, J. and Kubo, Y. (1994). An extremely mild desulfurization of thiiranes; an efficient transformation from geraniol to (+)- and (-)-linalool. *Tetrahedron Lett.* **35**: 6697-6700.
- van der Werf, M. J., de Bont, J. A. M. and Leak, D. J. (1997). Opportunities in microbial biotransformation of monoterpenes. *Biotechnology of aroma compounds*. Schleper, T. and Gerger, B. G. Berlin, Springer. **55**: 147-177.
- Vandamme, E. J. and Soetaert, W. (2002). Bioflavours and fragrances via fermentation and biocatalysis. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **77**: 1323–1332.
- Woodley, J. M. (2008). New opportunities for biocatalysis: making pharmaceutical processes greener. *Trends Biotechnol.* **26**: 321–327.
- Wüst, M. and Mosandl, A. (1999). Important chiral monoterpenoid ethers in flavours and essential oils - enantioselective analysis and biogenesis. *Eur. Food. Res. Technol.* **209** 3–11.

3

**Linalool dehydratase-isomerase undergoes reversible unfolding in the presence of the denaturant agent urea**

Danny Brodkorb and Jens Harder

Department of Microbiology, Max Planck Institute for Marine Microbiology,  
Bremen, Germany

Manuscript in preparation

Address correspondence to: Department of Microbiology, Max Planck Institute for Marine Microbiology, Celsiusstrasse 1, 28359 Bremen, Germany, phone:+49 421 2028-750, fax: +49 421 2028-580, e-mail: [jharder@mpi-bremen.de](mailto:jharder@mpi-bremen.de)

**Abstract**

Hydrocarbons are denaturing agents. Microorganisms, which are able to utilize them as carbon and energy source, have to circumvent the toxic effects, e. g. by the evolution of solvent-stable or spontaneously refolding enzymes. Myrcene, linalool and geraniol are representatives of acyclic monoterpenes and are the substrates for linalool dehydratase-isomerase, a monoterpene-transforming enzyme from the betaproteobacterial strain *Castellaniella defragrans* 65Phen. In this study, we analyzed the influence of urea as denaturant on the protein folding state and the enzyme activity. Denaturant-gradient gel electrophoresis (DGGE) was applied to investigate the unfolding/refolding behavior of the linalool dehydratase-isomerase in the presence of the chaotropic agent urea.

The unfolding of the protein included several intermediate states and required for a full unfolding more than 9 M urea. We measured a full recovery of the enzymatic activity after treatment with 6 M urea and investigated in detail the conformational change, starting with the unfolded protein. The mobility of the protein increased with decreasing urea concentrations. Folding intermediates were not observed. The continuous protein band of the linalool dehydratase-isomerase revealed a fast folding transition. Thus, the enzyme seems to be adapted to transiently high concentration of denaturants.

## Introduction

Solvent-tolerant microbes are able to thrive in the presence of organic solvents. These organisms circumvent the solvent's toxic effects by virtue of various adaptations, e.g. at the level of the cytoplasmic membrane, by degradation and transformation of solvents, and by active excretion of solvents. Their enzymes have evolved to mediate cellular and metabolic processes in a solvent-rich environment and are often stable in the presence of organic solvents. In general, enzymes get inactivated or have very low reaction rates in non-aqueous media. But proteins from solvent-tolerant microbes appear to survive in the presence of a range of organic solvents. The lipophilic character of these compounds and the interactions with hydrophobic parts of the cell play an important role in the mechanism of the toxic action. Proteins (enzymes) known to be located in the cytoplasmic membrane include ATPases, transport proteins, transferases, various oxidoreductases, and signal-transducing enzymes. Studies on the effects of membrane fluidity on enzymatic properties showed that small changes in fluidity can affect the functioning of various membrane-embedded proteins (Gordon et al., 1980; van der Meer, 1984; Zheng et al., 1988). Higher membrane fluidity may not prevent the maintenance of protein complexes. An alternative explanation for the loss of activity at higher solvent concentrations is a direct conversion of the enzyme to an inactive form. An example was given by Mason et al. (1965) for the cytochrome P-450 of the progesterone-11- $\alpha$ -hydroxylase. The inactive P-450-system caused an effectively uncoupling of the reaction. To what extent organic solvents cause an effect on the three-dimensional structure of an enzyme, remains unclear. Nevertheless, a refolding mechanism after a decrease in concentration of the denaturant would be one way to circumvent that problem.

The thermodynamic hypothesis states that the three-dimensional structure of a native protein in its normal physiological environment is the one in which the Gibbs free energy of the whole system is lowest (Anfinsen, 1973). It is defined by pH, ionic strength, presence of prosthetic groups, temperature and other factors. Several methods allow to probe the protein structure by chemico-physical analyses, e. g. capillary zone electrophoresis (Kilár and Hjertén, 1993; Skelsey and Bushey, 1996), denaturation curves in solution (Pace, 1986), circular dichroism and optical rotatory dispersion (Adler et al., 1973; Yang and Chau, 1973; Holmquist and Vallee, 1978, Turner, 1978, Stevens, 1978, Kahn, 1979; Yang

et al., 1986; Holmquist, 1986; Labhardt, 1986), flow analysis and viscosimetry (McKie and Brandts, 1972; Kasai and Oosawa, 1972, Uhlenhopp and Zimm, 1973; Auld, 1979), thermal titrimetry and scanning calorimetry (Marini, 1973; Krishnan and Brandts, 1978; Langerman, 1979; Biltonen and Langerman, 1979; Privalov and Potekhin, 1986) and different spectroscopy techniques, like infrared spectroscopy (Susi and Byler, 1972; Timasheff, 1973), Raman spectroscopy (Tobin, 1972; Van Wart and Scheraga, 1978; Williams, 1986; Hudson and Mayne, 1986) and nuclear magnetic resonance spectroscopy, NMR (Markley, 1972; Meadows, 1972; Philips, 1973).

Gel electrophoresis monitors the changes in the mobility of a protein (Goldenberg, 1989). The primary advantages of polyacrylamide gel electrophoresis are its high resolution and its compatibility with a continuous variation of denaturing conditions in the second dimension, e. g. with an increasing urea concentration. The resulting two-dimensional patterns yield information on the number of conformational species present. Hence, it may detect heterogeneity of the protein. A slight change in the urea concentration may cause unfolding. The theory of DGGE has been clearly described in a number of papers by Creighton and his colleagues (Creighton, 1979; Creighton 1980; Hollecker and Creighton, 1982; Goldenberg and Creighton, 1984; Creighton, 1986; Goldenberg, 1989). By incorporating a transverse gradient within the gel perpendicular to the direction of electrophoresis, a protein applied on top of the gel will migrate in a continuum of denaturant concentration. The shape of a protein affects the rate at which it migrates through polyacrylamide gels (Crambach and Rodbard, 1971). The rate of electrophoretic migration through gels has been shown to be sensitive to the compactness of trapped intermediates in protein folding (Creighton, 1979). Hence, unfolding is manifested by a marked decrease in electrophoretic mobility due to molecular sieving of the expanded polypeptide chain in the polyacrylamide gel. The molecular dimensions of proteins changes upon unfolding and turns the very compact close-packed globule of a folded protein into an unfolded polypeptide chain with a larger hydrodynamic volume (Tanford, 1968).

The chaotropic agent urea is a suitable denaturant for this technique. The precise physical explanation of the denaturing ability of urea is not clear, but studies with model compounds suggest that urea acts by increasing the aqueous solubility of the hydrophobic portions of proteins (Nozaki and Tanford, 1963; Wetlaufer et al., 1964; Roseman and Jencks, 1975). Urea interrupts established hydrogen bonding patterns of proteins, which results in

the depletion of a high order structure. The loss of secondary and tertiary structure is accurately described as protein unfolding. In general, unfolding occurs as a cooperative process, involving all parts of the protein at once as soon as a threshold concentration of denaturing agent is attained or proceed through intermediate steps. In the latter instance, different domains may unfold independently from one another or the tertiary structure may be lost before the secondary structure is affected. This results in protein denaturation, since unfolded peptides are unable to support the functional properties of the native molecules. The novel linalool dehydratase-isomerase is a soluble protein in the biotransformation of acyclic monoterpenes in *C. defragrans*. It catalyzes two reversible reactions: the water elimination of the tertiary alcohol (*S*)-(+)-linalool to the corresponding acyclic monoterpene myrcene and the isomerization of the primary allyl alcohol geraniol in its stereoisomer (*S*)-(+)-linalool. The enzyme has a molecular weight of 40 000 Da and four cysteine residues at the positions 74, 127, 196 and 205. The catalytic activity seems to be cofactor independent. The purification scheme involved a hydrophobic interaction chromatography and an elution with 6 M urea. This observation suggested a reversible unfolding and folding mechanism of the enzyme. Hence we studied the urea-induced denaturation of *C. defragrans* linalool dehydratase-isomerase by electrophoresis on urea gradient slab gels by the method of Creighton (1986) to gain insight into the denaturation behavior of a hydrocarbon-transforming enzyme. So far, this is the first DGGE-study investigating the folding behaviour of an enzyme from solvent-tolerant microbes.



## Materials and Method

*Cells growth and purification of linalool dehydratase-isomerase*—*C. defragrans* strain 65Phen was maintained since the isolation in the laboratory. For biomass production, the strain was cultivated as described (Heyen and Harder, 2000) on 30 mM limonene and 100 mM nitrate. The enzyme was purified as recently described in a five step protocol, which included a butyl sepharose column (HiScreen Butyl FF, 4.7 ml, GE Healthcare). After a pre-equilibration with 15% (v/v) saturated ammonium sulfate in 80 mM Tris-HCl, pH 8.0, a first elution with 80 mM Tris-HCl, pH 8.0, removed weakly bound proteins. The enzyme was subsequently eluted with 6 M urea. The linalool dehydratase-isomerase activity was determined as described previously.

*Casting transverse gradient gels*—The urea gradient gel electrophoresis was performed with the DCode-DGGE-system (Bio-Rad, Laboratories GmbH, München, Germany) including urea as denaturant agent. Hydrolysis of urea is known to generate cyanates which react with amino groups and alter the net charge on the protein and the apparent electrophoretic mobility. Therefore solutions were prepared with urea p. a. (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) freshly prior to use.

The following instructions were applied for preparing urea gradient gels of 20 cm width. The gels were cast and later moved 90° clockwise, thus the top and bottom contained a width of 1 cm with 10 M and 0 M urea, respectively. Gravity was used to form the gradient with an appropriate flow-rate, to cast the gel within 10 min. The gel sandwiches were assembled and the casting box was connected with tubes. To prevent the formation of air bubbles, 50 ml of a solution containing 20% ethanol and 0.002% bromophenol blue was prepared and filled at the bottom of the gel sandwiches (2-4 cm). The blue-coloured solution was drawn with a syringe into the tubing between the mixing vessel and the casting box. The tubing was then clamped on the gradient former (Model 385, Biorad Laboratories GmbH, München, Germany). Both gel solutions were prepared as indicated by Goldenberg (1984) with a few modifications. The 10 M urea solution was placed into the reservoir chamber of the gradient former. Photo-polymerization was performed with riboflavin. TEMED was added to the gel solutions and 19 ml of the 0 M urea solution and 16.5 ml of the 10 M urea solution were filled into the reservoir and the mixing chamber,

respectively. A magnetic stir bar was placed into the mixing chamber which was standing on a magnetic stirrer. With the opening of the tube-cock the 0 M urea solution ran into the gel form and in parallel the 10 M Urea solution was pulled by gravity into the mixing chamber. Consequently, the urea concentration in the mixing vessel increased linearly. After the closing of the inlet the gel was placed in front of a light source to initiate photopolymerization with riboflavin.

*Sample preparation, application and electrophoresis*—The sample for the 20 cm wide urea gradient gel contained 50 µg of protein in a volume of 75 - 100 µl. The sample was applied evenly across the top of the gel. The protein sample contained 10% glycerol and a marker dye: 0.002% bromophenol blue for electrophoresis towards the anode. In some cases the sample was prepared as unfolded protein. Therefore, the native and purified linalool dehydratase-isomerase was treated with 10 M urea before being loaded to the gel. The presence of urea made the addition of glycerol unnecessary. Before the application of the sample, the gel was pre-electrophoresed for 1h at 50 mA to remove any charged reactive species that may have arisen from decomposition of the urea or from the polymerization process. During the pre-electrophoresis, some of the urea diffused into the top of the gel and was removed with a Pasteur pipette before the application of the sample. The urea gradient electrophoresis was performed with 50 mM Tris-HCl, pH 8.0 and, to investigate the influence of acidic pH on migration profiles, with 50 mM Acetate-Tris pH 4.0. Electrophoresis was revealed for 2-14 h at 100 mA and at 37°C. After electrophoresis, the gels were stained and de-stained after a protocol of Kang et al. (2002).

## Results and Discussion

*Urea gradient gel electrophoresis*—We investigated the conformation changes of linalool dehydratase-isomerase caused by urea in denaturant gradient gel electrophoresis (DGGE).

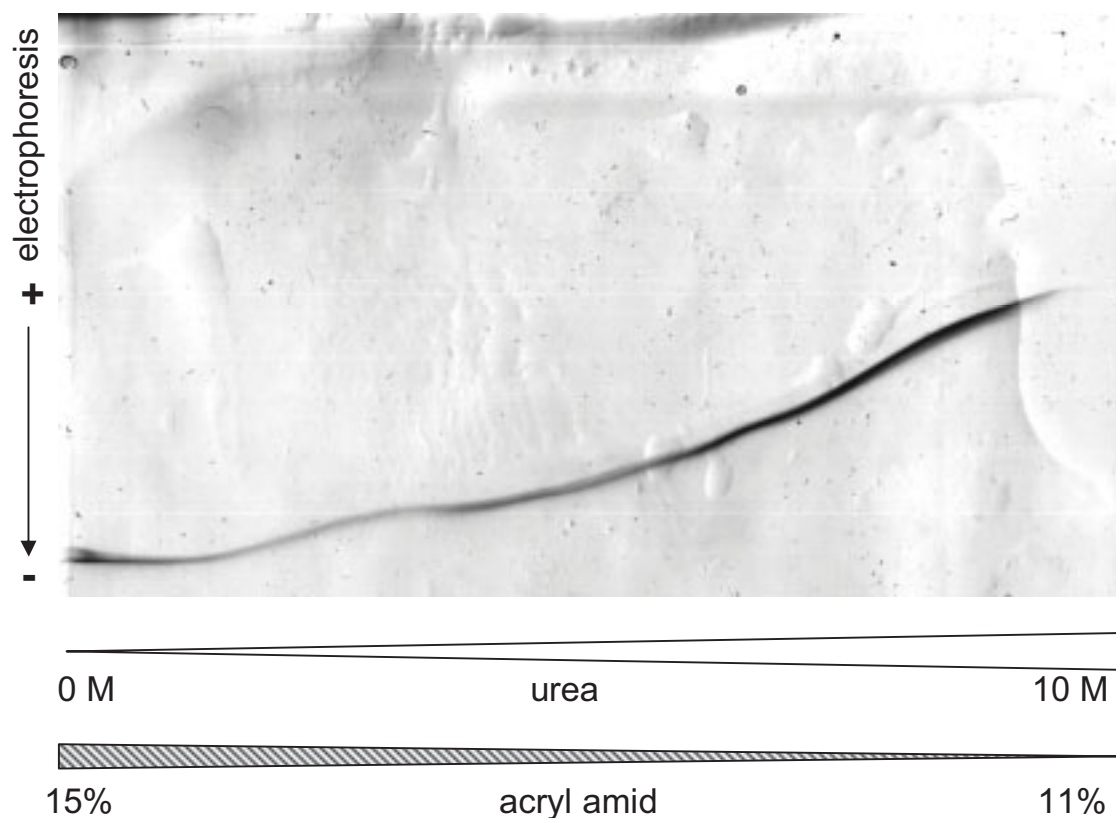


Fig. 1. Urea induced unfolding transition of native linalool dehydratase-isomerase. Two clear defined separate folding transitions, one at 2 M urea, the other at 4.5 M urea, are observed.

The DGGE with the purified linalool dehydratase-isomerase revealed a single protein lane, which indicates the absence of modifications, e. g. several redox states or a contamination with other enzymes. A smooth change from higher to lower mobility was observed along a sigmoidal curve. At very low urea concentrations ( $\leq 2$  M) the native form predominates, while at higher urea concentrations several unfolded forms, which exhibited a reduced electrophoretic mobility, predominate. Therefore, an unfolding occurred during

the treatment with urea in the protein purification step. The intermediates in the unfolding region in the gel probably correspond to the independent unfolding of domains in the linalool dehydratase-isomerase at different urea concentrations. The first folding transitions occurred at 2 M urea, while a second inflexion point was observed at 4.5 M urea (Fig. 1). Multidomain proteins exhibit complex equilibrium folding transitions if the individual domains unfold independently. Intermediate conformations are present at equilibrium in which one or more domains are folded, others unfolded. A similar observation was made with other enzymes that were analyzed by urea-gradient electrophoresis: the tryptophan synthetase  $\alpha$ -subunit (Matthews and Crisanti, 1981; Miles et al., 1982), transferrin (Evans and Williams, 1980), penicillinase and calmodulin (Privalov, 1982; Drabikowski et al., 1982). All these enzymes exhibit a subunit molecular weight of 18-45 kDa and are active as dimers, tetramers or hexamers. Similar characteristics are found for the linalool dehydratase-isomerase, which is active as a homotetramer and has a molecular weight of 40 kDa. All of them are composed of multiple domains, which may unfold independently at different urea concentrations.

The refolding ability of the linalool dehydratase-isomerase was investigated by application of unfolded enzyme on the gel. Therefore, the sample had already a urea concentration of 10 M. At low urea concentrations in the gel the enzyme reappears to its native conformation, a more compact structure with a lower hydrodynamic volume. The sigmoidal curve of the continuous protein band exhibits no obvious inflexion points in the transition zone, as illustrated in Figure 2. Only the fraction above 9 M urea seems to remain completely unfolded. Below this concentration the enzymes refold linear to the decreasing urea concentration. Thus the unfolding transitions were not obtained when unfolded protein was used as sample. The refolding process seems to increase linearly with a decrease of urea concentration and without a multistage transition.

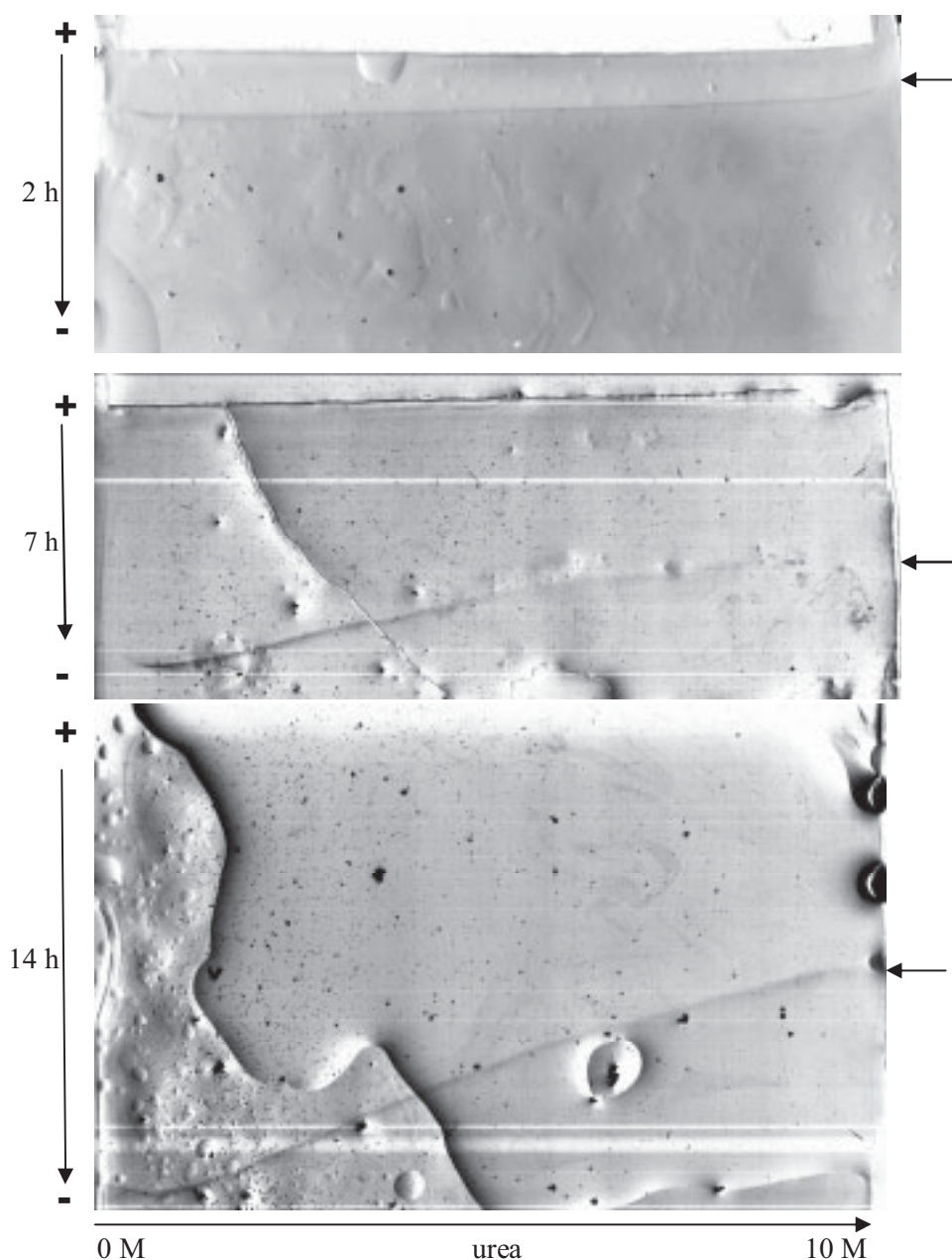


Fig. 2. Urea gradient electrophoresis of unfolded linalool dehydratase-isomerase. The initially unfolded proteins were subjected to electrophoresis in 1-mm-thick urea-gradient gels at pH 8.0 for the periods of time indicated on the left. The arrow on the right indicates the end of the protein band.

*Thermodynamics and kinetics of urea-induced unfolding transition*— In addition to providing a graphic qualitative profile of the urea-induced unfolding transition of a protein, urea-gradient gels can be used for semi-quantitative analysis of the transition and to estimate the stability of the folded state in the absence of urea. As with most other methods

for measuring protein stability, data from the transition zone must be extrapolated to zero denaturant concentration, as illustrated in Figure 3 for a ferricytochrome *c*. Schellman (1978) has argued that the free energy of folding can be given in the equation:  $\Delta G_f = -RT \ln [(N)/(U)]$  and should be a linear function of denaturant concentration in the region of the mid-point of the transition. The mobilities of the native and unfolded forms in a gel define the free energy scale values of  $-2RT$  and  $+2RT$ , respectively ( $R$  is the gas constant and  $T$  the absolute temperature). This assumption has been widely used in analyzing denaturant-induced unfolding curves (Tanford, 1968; Tanford, 1970; Pace, 1975).

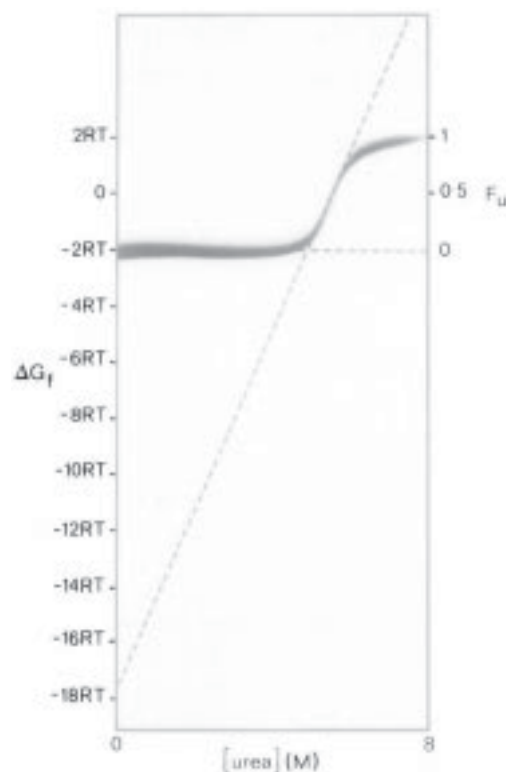


Fig. 3. Estimation of the net stability of ferricytochrome *c* by extrapolation from urea induced unfolding transition. The mobility of the protein at each urea concentration indicates the fraction of protein unfolded,  $F_u$ , as indicated on the right hand scale. Near the midpoint of the transition, where  $F_u = 0.5$  and the net stability of the folded state,  $\Delta G_f$ , equals 0,  $F_u$  is approximately a linear function of urea concentration. The net stability in the absence of denaturant is estimated by extrapolating  $\Delta G_f$  from the transition region to the position of zero urea concentration, assuming a linear relationship between  $\Delta G_f$  and urea concentration. The plateau positions of the unfolded and native states correspond to the positions on the left hand scale where  $\Delta G_f = 2RT$  and  $-2RT$  ( $R$  is the gas constant and  $T$  is the absolute temperature). Taken from Goldenberg and Creighton (1984).

Linalool dehydratase-isomerase seems to undergo a more complex unfolding transition in which partially folded intermediates are present. As mentioned before, most of the proteins that have been observed to undergo multi-state unfolding transitions appear to be composed of several domains that unfold independently. Unless there is a clear plateau between the transitions, extrapolating the stabilities of the native protein and intermediates may not be as simple as for a two-state transition. On the contrary, the linalool dehydratase-isomerase seems to undergo a more simple refolding transition when unfolded protein is applied on the gel (Fig. 2). According to the method described by Goldenberg and Creighton (1984) the free energy of folding was estimated for the linalool dehydratase-isomerase and revealed a  $\Delta G_f$  of  $6.2 \pm 0.8$  kJ / mol.

Beside the thermodynamics DGGE provides also information about the kinetics of the unfolding transition. In kinetic studies the detection of intermediates in protein folding by using urea-gradient electrophoresis required several gel-runs for different periods of time. In general, rates of unfolding increase and rates of folding decrease with increasing urea concentration (Ferguson, 1964; Hedrick and Smith, 1968). As a consequence, both folding and unfolding are often relatively slow in the transition zone. The kinetic of the transition is reflected in the continuity of the band of protein in a urea gradient gel.

Linalool dehydratase-isomerase exhibits a rapid folding equilibrium compared to the time of electrophoresis. A sharp continuous band was generated through the transition zone, whether the protein applied to the gel was folded or unfolded (Fig. 2, 3). A hypothetical slow folding transition exhibits a discontinuous protein band, a smear of protein between the native and unfolded state. This was not observed for DGGE analyses with the linalool dehydratase-isomerase.

*Isoelectric point in vivo and in silico*—A macromolecule with a net charge in an electric field is subjected to a force which will accelerate it until the opposing frictional force is equal in magnitude (Goldenberg and Creighton, 1984). In non-denaturing gel electrophoresis, the choice of buffer depends on the particular protein and the experimental setup. Since some proteins do not unfold in urea at neutral pH, a more acidic or alkaline pH could force the unfolding transition. Proteins often unfold at extreme pH values. This is usually caused by ionization of groups that were buried in the folded conformation in de-ionized form (Hermans and Scheraga, 1961; Breslow and Gurd, 1962; Brandts, 1964;

Hermans and Acampora, 1967). In addition also air oxidation of thiols and rearrangement of disulfide bonds are minimized at low pH (Goldenberg and Greighton, 1984).

In the particular case of the linalool dehydratase-isomerase, the urea gradient electrophoresis with 50 mM Tris-HCl pH 7.0 and pH 8.0 revealed a reduced unfolding and migration of the protein through the gel, probably due to insufficient net-charge for a migration towards the anode (data not shown). In opposite, the urea gradient electrophoresis in 50 mM Acetate-Tris pH 4.0 seems to lead to a protonation of the charged amino acid residues of linalool dehydratase-isomerase and consequently to a positive net-charge. Thus the protein migrates towards the cathode and consequently out of the gel (data not shown). The observation confirms the theoretical isoelectric point of the linalool dehydratase-isomerase: *in silico* calculation yielded 5.8 and 6.1, without or with the signal peptide, respectively.



## Conclusion and Outlook

The denaturant gradient gel electrophoresis with the purified linalool dehydratase-isomerase revealed a single protein lane that showed a lower migration at a higher denaturant concentration caused by unfolding and a resulting higher hydrodynamic volume. The denaturation revealed multiple unfolding transition states. The free energy of folding for the linalool dehydratase-isomerase was  $\Delta G_f$  of  $6.2 \pm 0.8$  kJ/ mol.

To investigate the correlation between the putative independent unfolding of different domains and their influence on the linalool dehydratase-isomerase activity enzymatic measurements at different urea concentrations may be conducted. With the results from such experiments it would be possible to combine structural formation behavior with enzyme activity.

**Acknowledgments**

This study was financed by the Max Planck Society.

**References**

- Adler, A. J., Greenfield, N. J. and Fasman, G. D. (1973). Circular dichroism and optical rotatory dispersion of proteins and polypeptides. *Methods Enzymol.* **27**: 675-735.
- Auld, D. S. (1979). Conformational changes in proteins by low temperature--rapid flow analysis. *Methods Enzymol.* **61**: 318-335.
- Biltonen, R. L. and Langerman, N. (1979). Microcalorimetry for biological chemistry: Experimental design, data analysis, and interpretation. *Methods Enzymol.* **61**: 287-318.
- Brandts, J. F. (1964). The thermodynamics of protein denaturation II. A model of reversible denaturation and interpretations regarding the stability of chymotrypsinogen. *J. Am. Chem. Soc.* **86**: 4302-4314.
- Breslow, E. and Gurd, F. R. N. (1962). Reactivity of sperm whale metmyoglobin towards hydrogen ions and p-nitrophenyl acetate. *J. Biol. Chem.* **237**: 371-381.
- Chrambach, A. and Rodbard, D. (1971). Polyacrylamide gel electrophoresis. *Science* **172**: 440-451.
- Creighton, T. E. (1979). Electrophoretic analysis of the unfolding of proteins by urea. *J. Mol. Biol.* **129**: 235-264.
- Creighton, T. E. (1979). Experimental studies of protein folding and unfolding. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **33**: 231-297.
- Creighton, T. E. (1980). Kinetic study of protein unfolding and refolding using urea gradient electrophoresis. *J. Mol. Biol.* **137**: 61-80.
- Creighton, T. E. (1986). Detection of folding intermediates using urea-gradient electrophoresis. *Methods Enzymol.* **131**: 156-172.
- Drabikowski, W., Brzeska, A. and Venyaminov, S. Y. (1982). Tryptic fragments of calmodulin.  $\text{Ca}^{2+}$ - and  $\text{Mg}^{2+}$ -induced conformational changes. *J. Biol. Chem.* **257**: 11584-11590.
- Evans, R. W. and Williams, J. (1980). The electrophoresis of transferrins in urea/polyacrylamide gels. *Biochem. J.* **189**: 541-546.
- Ferguson, K. A. (1964). Starch-gel electrophoresis - application to the classification of pituitary proteins and polypeptides. *Metabolism* **12**: 985-1002.
- Goldenberg, D. P. (1989). Analysis of protein conformation by gel electrophoresis. *Protein structure: A practical approach*. T. E. Creighton. Oxford, RL Press: 225-250.
- Goldenberg, D. P. and Creighton, T. E. (1984). Gel electrophoresis in studies of protein conformation and folding. *Anal. Biochem.* **138**: 1-18.

- Gordon, L. M., Sauerheber, R. D., Esgate, J. A., Dipple, I., Marchmont, R. J. and Houslay, M. D. (1980). The increase in bilayer fluidity of rat liver plasma membranes achieved by the local anesthetic benzyl alcohol affects the activity of intrinsic membrane enzymes. *J. Biol. Chem.* **255**: 4519-4527.
- Hedrick, J. L. and Smith, A. J. (1968). Size and charge isomer separation and estimation of molecular weights of proteins by disc gel electrophoresis. *Arch. Biochem. Biophys.* **126**: 155-64.
- Hermans, J., J. and Scheraga, H. A. (1961). Structural studies of ribonuclease. IV. Abnormal ionizable groups. *J. Am. Chem. Soc.* **83**: 3283-3292.
- Hermans, J. J. and Acampora, G. (1967). Reversible denaturation of sperm whale myoglobin. II. Thermodynamic analysis. *J. Am. Chem. Soc.* **89**: 1547-1552.
- Heyen, U. and Harder, J. (2000). Geranic acid formation, an initial reaction of anaerobic monoterpene metabolism in denitrifying *Alcaligenes defragrans*. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**: 3004-3009.
- Hollecker, M. and Creighton, T. E. (1982). Effect on protein stability of reversing the charge on amino groups. *Biochim. Biophys. Acta* **701**: 395-404.
- Holmquist, B. and . (1986). Magnetic circular dichroism. *Methods Enzymol.* **130**: 270-290.
- Holmquist, B. and Vallee, B. L. (1978). Magnetic circular dichroism. *Methods Enzymol.* **49**: 149-179.
- Hudson, B. and Mayne, L. (1986). Ultraviolet resonance Raman spectroscopy of biopolymers. *Methods Enzymol.* **130**: 331-350.
- Kahn, P. C. (1979). The interpretation of near-ultraviolet circular dichroism. *Methods Enzymol.* **61**: 339-378.
- Kang, D., Yong, S. G., Suh, M. and Kang, C. (2002). Highly sensitive and fast protein detection with coomassie brilliant blue in sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Bull. Korean Chem. Soc.* **23**: 1511-1512.
- Kasai, M. and Oosawa, F. (1972). Flow birefringence. *Methods Enzymol.* **26**: 289-323.
- Kilár, F. and Hjertén, S. (1993). Unfolding of human serum transferrin in urea studied by high-performance capillary electrophoresis. *J. Chromatogr.* **638**: 269-276.
- Krishnan, K. S. and Brandts, J. F. (1978). Scanning calorimetry. *Methods Enzymol.* **49**: 3-14.
- Labhardt, A. M. (1986). Folding intermediates studied by circular dichroism. *Methods Enzymol.* **131**: 126-135.

- Langerman, N. and Biltonen, R. L. (1979). Microcalorimeters for biological chemistry: Applications, instrumentation and experimental design. *Methods Enzymol.* **61**: 261-286.
- Marini, M. A. and Martin, C. J. (1973). Thermal titrimetry. *Methods Enzymol.* **27**: 590-616.
- Markley, J. L. (1972). High-resolution proton magnetic resonance spectroscopy of selectively deuterated enzymes. *Methods Enzymol.* **26**: 605-627.
- Matthews, C. R. and Crisanti, M. M. (1981). Urea-induced unfolding of the  $\alpha$  subunit of tryptophan synthase: evidence for a multistate process. *Biochemistry* **20**: 784-792.
- McKie, J. E. and Brandts, J. F. (1972). High precision capillary viscometry. *Methods Enzymol.* **26**: 257-288.
- Meadows, D. H. (1972). Determination of pKa's of individual histidine residues in pancreatic ribonuclease by hydrogen-tritium exchange. *Methods Enzymol.* **26**: 638-645.
- Miles, E. W., Yutani, K. and Ogasahara, K. (1982). Guanidine hydrochloride-induced unfolding of the  $\alpha$  subunit of tryptophan synthase and of the two  $\alpha$  proteolytic fragments: evidence for stepwise unfolding of the two  $\alpha$  domains. *Biochemistry* **21**: 2586-2592.
- Nozaki, Y. and Tanford, C. (1963). The solubility of amino acids and related compounds in aqueous urea solutions. *J. Biol. Chem.* **238**: 4074-4081.
- Pace, C. N. and Hermans, J. (1975). The stability of globular protein. *Crit. Rev. Biochem.* **3**: 1-43.
- Phillips, W. D. (1973). Nuclear magnetic resonance spectroscopy of proteins. *Methods Enzymol.* **27**: 825-836.
- Privalov, P. L. (1982). Stability of Proteins: Proteins which do not present a single cooperative system. *Advan. Protein Chem.* **35**: 1-104.
- Privalov, P. L. and Potekhin, S. A. (1986). Scanning microcalorimetry in studying temperature-induced changes in proteins. *Methods Enzymol.* **131**: 4-51.
- Roseman, M. and Jencks, W. P. (1975). Interactions of urea and other polar compounds in water. *J. Am. Chem. Soc.* **97**: 631-640.
- Schellman, J. A. (1978). Solvent denaturation. *Biopolymers* **17**: 1305-1322.
- Skelsey, K. R. and Bushey, M. M. (1996). Capillary electrophoretic monitoring of the folding and unfolding of  $\beta$ -lactoglobulin B. *J. Chromatogr. Sci.* **34**: 85-91.

- Stevens, E. S. (1978). Far (vacuum) ultraviolet circular dichroism. *Methods Enzymol.* **49**: 214-221.
- Susi, H. (1972). The strength of hydrogen bonding: Infrared spectroscopy. *Methods Enzymol.* **26**: 381-391.
- Tanford, C. (1968). Protein denaturation. *Advan. Protein Chem.* **23**: 121-282.
- Tanford, C. (1970). Protein denaturation: Part C. Theoretical models for the mechanism of denaturation. *Advan. Protein Chem.* **24**: 1-95.
- Timasheff, S. N., Susi, H. and Rupley, J. A. (1973). Difference infrared spectrophotometric titration of protein carboxyls. *Methods Enzymol.* **27**: 548-557.
- Tobin, M. C. (1972). Raman spectroscopy. *Methods Enzymol.* **26**: 473-497.
- Turner, D. H. (1978). Fluorescence-detected circular dichroism. *Methods Enzymol.* **49**: 199-214.
- Uhlenhopp, E. L. and Zimm, B. H. (1973). Rotating cylinder viscometers. *Methods Enzymol.* **27**: 483-491.
- van der Meer, W. (1984). Physical aspects of membrane fluidity. *Physiology of membrane fluidity*. M. Shinitzky. Boca Raton, CRC Press. I: 53-71.
- van Wart, H. v. E. and Scheraga, H. A. (1978). Raman and resonance Raman spectroscopy. *Methods Enzymol.* **49**: 67-149.
- Wetlaufer, D. B., Malik, S. K., Stoller, L. and Coffin, R. L. (1964). Nonpolar group participation in the denaturation of proteins by urea and guanidinium salts model compound studies. *J. Am. Chem. Soc.* **86**: 508-514.
- Williams, R. W. (1986). Protein secondary structure analysis using Raman amide I and amide III spectra. *Methods Enzymol.* **130**: 311-331.
- Yang, J. T. and Chau, K. H. (1973 ). Difference optical rotatory dispersion and circular dichroism. *Methods Enzymol.* **27**: 736-750.
- Yang, J. T., Wu, C. S. C. and Martinez, H. M. (1986). Calculation of protein conformation from circular dichroism. *Methods Enzymol.* **130**: 208-269.
- Zheng, T., A. , Driessen, J. M. and Konings, W. N. (1988). Effect of cholesterol on the branched-chain amino acid transport system of *Streptococcus cremoris*. *J. Bacteriol.* **170**: 3194-3198.



## **Danksagung**

An dieser Stelle möchte ich allen Personen danken, ohne die diese Arbeit nicht in der vorliegenden Form hätte entstehen können.

Ich danke Herrn Prof. Friedrich Widdel dafür, dass er diese Arbeit ermöglicht hat und für die Übernahme der Gutachterfunktion.

Mein besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. Jens Harder, für seine hervorragende Betreuung, die unermüdliche Unterstützung während der Promotion und für seine große Fähigkeit zu motivieren. Seine Hilfe zur Vorbereitung von Konferenzen, Publikationen oder Seminaren war stets von unschätzbarem Wert.

Mein großer Dank richtet sich an die Mitarbeiter der Abteilung für Mikrobiologie. Für ihre vielfältigen Anregungen, die fachliche Unterstützung, für die vielen hilfreichen Gespräche, inklusive der produktiven Kritik und die freundschaftliche und angenehme Arbeitsatmosphäre möchte ich allen danken. Ganz speziell möchte ich Dr. Olav Grundmann und Insa Werner für die Unterstützung bei der Proteinreinigung, für die GC-MS-Analysen und die Hilfe beim Proteinblotten danken.

Christina Probian danke ich für die freundliche Einarbeitung, ihre hilfreichen Ratschläge für das „Widdelsche“ anaerobe Arbeiten und für die Hilfe bei den HPLC- und GC-Analysen.

Ich möchte mich bei allen Labor- und Bürokollegen für die sehr schöne Zeit bedanken, besonders bei Frauke, Johannes, Philipp, Robert, Carsten und Richard. Vielen Dank auch an die Korrekturleser meiner Arbeit.

Schließlich möchte ich mich herzlichst bei meiner Verlobten, Annett, für ihre Liebe und Unterstützung während meiner Promotion bedanken. Das Gleiche gilt für meine Familie, die mir stets Zuspruch, Zuversicht und Kraft für meine Arbeit schenkte.







