



Doctoral Thesis

## Dichlormethan-Dehalogenase von *Hyphomicrobium* sp.DM2

**Author(s):**

Kohler-Staub, Doris

**Publication Date:**

1986

**Permanent Link:**

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-000363169> →

**Rights / License:**

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

This page was generated automatically upon download from the [ETH Zurich Research Collection](#). For more information please consult the [Terms of use](#).

Diss. ETH Nr. 8047

**Dichlormethan-Dehalogenase  
von *Hyphomicrobium* sp. DM2**

ABHANDLUNG  
zur Erlangung des Titels eines  
DOKTORS DER NATURWISSENSCHAFTEN  
der  
EIDGENÖSSISCHEN TECHNISCHEN HOCHSCHULE  
ZÜRICH

vorgelegt von  
DORIS KOHLER-STAUB  
dipl. natw. ETH  
geboren am 17. Juni 1955  
von Zürich (ZH)

Angenommen auf Antrag von:  
Prof. Dr. Th. Leisinger, Referent  
Prof. Dr. H. Hennecke, Korreferent

1986

teilweise veröffentlicht in:  
Journal of Bacteriology 162: 676-681 (1985)

## 5. ZUSAMMENFASSUNG

Aus dem fakultativ methylo-trophen Bakterium *Hyphomicrobium* DM2, das fähig ist, auf Dichlormethan (DCM) als einziger Kohlenstoff- und Energiequelle zu wachsen, wurde die stark induzierbare, Glutathion (GSH)-abhängige DCM-Dehalogenase, welche die Umsetzung von DCM zu Formaldehyd und Salzsäure katalysiert, isoliert. Die Enzymreinigung umfasste die Gewinnung von Rohextrakt aus DCM-gewachsenen Zellen, Protaminsulfatfällung und Säulenchromatographie an DEAE-Cellulose, Pentyl-Sepharose und Hydroxyapatit. Es erfolgte bei 60% Ausbeute an Gesamtaktivität eine fünffache Anreicherung der spezifischen DCM-Dehalogenase-Aktivität auf 17.3 mkat/kg Protein. Das Aktivitätsmaximum des gereinigten Enzyms wurde bei pH 8.5 beobachtet. Das reine Präparat zeigte bei -20°C während mindestens 6 Monaten keine Aktivitätsabnahme. Mit SDS-PAGE wurde ein Untereinheiten-Molekulargewicht von 33000 bestimmt. Gelfiltration mit nativer DCM-Dehalogenase liess auf ein Molekulargewicht von 195000 schliessen. Durch Untereinheiten-Verbrückung mit Dimethylsuberimidat konnte bestätigt werden, dass es sich bei diesem Enzym um ein aus sechs identischen Untereinheiten zusammengesetztes Hexamer handelt. Die reine DCM-Dehalogenase zeigte hohe Spezifität gegenüber Dihalomethanen. Die apparenten  $K_m$ -Werte waren 30  $\mu\text{M}$  für DCM, 15  $\mu\text{M}$  für  $\text{CH}_2\text{BrCl}$ , 13  $\mu\text{M}$  für  $\text{CH}_2\text{Br}_2$ , 5  $\mu\text{M}$  für  $\text{CH}_2\text{I}_2$  und 320  $\mu\text{M}$  für GSH. Mehrere chlorierte aliphatische Verbindungen hemmten die DCM-Dehalogenase-Aktivität des reinen Enzyms. Die  $K_i$ -Werte der kompetitiven Hemmstoffe 1,2-Dichloräthan (1,2 DCA) und 1-Chlorpropan betragen 3  $\mu\text{M}$ , bzw. 56  $\mu\text{M}$ .

Die DCM-Dehalogenasen der fakultativ methylo-trophen, DCM-verwertenden Stämme *Pseudomonas* DM1, *Methylobacterium* DM4 und *Hyphomicrobium* GJ21 wurden mit der DCM-Dehalogenase von *Hyphomicrobium* DM2 verglichen. Im Rohextrakt DCM-gewachsener Zellen wurde mit allen vier Stämmen ähnlich hohe spezifische Aktivität gemessen. SDS-PAGE-Analyse erbrachte für alle DCM-Dehalogenasen ein Untereinheiten-Molekulargewicht von rund 33000. Mit Hilfe von Kaninchenantikörper, welche gegen reine DCM-Dehalogenase von *Hyphomicrobium* DM2 erzeugt worden waren, konnte mit Doppelimmunodiffusion, Immunoblotting und quantitativer Immunpräzipitation eine enge immunologische Verwandtschaft zwischen den vier Proteinen nachgewiesen werden. Die Bestimmung der N-terminalen Sequenz von 15 Aminosäuren führte mit den vier Enzymen zu absolut

identischen Ergebnissen. Einzig in bezug auf die Spezifität der an der Synthese der DCM-Dehalogenase beteiligten Regulationselemente konnten Unterschiede entdeckt werden. In den beiden untersuchten *Hyphomicrobium* Stämmen waren 1,2 DCA und 1,1 DCA wirksame "Gratis"-Induktoren während in *Pseudomonas* DM1 und *Methylobacterium* DM4 diese Substanzen nur geringe Enzyymbildung auslösten.

Aufgrund der Enzymcharakterisierung und der vergleichenden Untersuchung kommt man zum Schluss, dass es sich bei der DCM-Dehalogenase um ein entwicklungsgeschichtlich noch junges Enzym handelt, das durch horizontalen Gentransfer in verschiedene Mikroorganismen gelangt war.

## 6. SUMMARY

Dichloromethane (DCM) dehalogenase, a highly inducible glutathione (GSH) dependent enzyme catalyzing the conversion of DCM into formaldehyde and hydrogen chloride, was isolated from the facultative methylotroph *Hyphomicrobium* DM2, that is able to grow on DCM as a sole carbon and energy source. Enzyme purification comprised preparation of crude extract from DCM-grown cells, protamine sulfate precipitation and column chromatography on DEAE-cellulose, pentyl-Sepharose and on hydroxyapatite. With a 60% yield of total activity the specific DCM-dehalogenase activity was enhanced fivefold to 17.3 mkat/kg protein. Maximum activity of the purified enzyme was observed at pH 8.5. Storage of this pure preparation at  $-20^{\circ}\text{C}$  did not cause any activity decrease for at least six months. A subunit molecular weight of 33000 was determined by SDS-PAGE. Gelfiltration of native DCM-dehalogenase yielded a molecular weight of 195000. It was confirmed by subunit crosslinking with dimethyl suberimidate that the enzyme is composed of six identical subunits. DCM-dehalogenase was highly specific for dihalomethanes. Its apparent  $K_m$  values were 30  $\mu\text{M}$  for DCM, 15  $\mu\text{M}$  for  $\text{CH}_2\text{BrCl}$ , 13  $\mu\text{M}$  for  $\text{CH}_2\text{Br}_2$ , 5  $\mu\text{M}$  for  $\text{CH}_2\text{I}_2$  and 320  $\mu\text{M}$  for GSH. Several chlorinated aliphatic compounds inhibited DCM-dehalogenase activity of the pure enzyme. The  $K_i$  values of the competitive inhibitors 1,2-dichloroethane (1,2 DCA) and 1-chloropropane were 3  $\mu\text{M}$  and 56  $\mu\text{M}$ , respectively.

The DCM-dehalogenases of the facultative methylotrophs *Pseudomonas* DM1, *Methylobacterium* DM4 and *Hyphomicrobium* GJ21 were compared with the DCM-dehalogenase of *Hyphomicrobium* DM2. Similar levels of specific activities were measured in the crude extracts of DCM-grown cells. Upon SDS-PAGE all four DCM-dehalogenases showed a subunit molecular weight of approximately 33000. With rabbit antibodies raised against pure DCM-dehalogenase of *Hyphomicrobium* DM2 a very close immunological relatedness was confirmed by means of immunodiffusion analysis, immunoblotting and quantitative immunoprecipitation. The analysis of the N-terminal sequence of 15 amino acids produced absolutely identical results with all four DCM-dehalogenases. Some variation was observed with respect to the specificity of the inducers for DCM-dehalogenase. In the two *Hyphomicrobium* strains examined 1,1 DCA and 1,2 DCA were effective gratuitous inducers whereas these compounds exhibited only a marginal inducing effect in *Pseudomonas* DM1 and *Methylobacterium* DM4.

The results obtained by enzyme characterization and the comparative study suggest, that the DCM-dehalogenase is an evolutionary still young enzyme which has been distributed horizontally by gene transfer among different microorganisms.