

# Reactions catalysed by the chlorobenzene dioxygenase and cis-chlorobenzene dihydrodiol dehydrogenase of *Pseudomonas* sp. Strain P51

**Doctoral Thesis**

**Author(s):**

Raschke, Henning

**Publication date:**

1998

**Permanent link:**

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-001998945>

**Rights / license:**

In Copyright - Non-Commercial Use Permitted

Diss. ETH No. 12840

**Reactions Catalysed by the Chlorobenzene  
Dioxygenase and *cis*-Chlorobenzene Dihydrodiol  
Dehydrogenase of *Pseudomonas* sp. Strain P51**

A dissertation submitted to the  
SWISS FEDERAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY ZURICH  
for the degree of  
Doctor of Natural Sciences

presented by  
Henning Raschke  
Dipl.-Ing. (TH Köthen, Germany)  
born May 27, 1967  
in Wolfen, Germany

accepted on the recommendation of  
Prof. Dr. Alexander J. B. Zehnder, examiner  
Prof. Dr. Bernard Witholt, co-examiner  
Dr. Hans-Peter E. Kohler, co-examiner

Zürich, 1998

---

## SUMMARY

In this study, we investigated a biotransformation system that is able to transform achiral substrates to chiral products (chlorobenzene dioxygenase of *Pseudomonas* sp. strain P51, cloned into *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  (pTCB144), CDO), and another biotransformation system that transforms the chiral products of CDO to achiral products (*cis*-chlorobenzene dihydrodiol dehydrogenase of *Pseudomonas* sp. strain P51, cloned into *E. coli* DH5 $\alpha$  (pTCB 149), CDD). Our research demonstrates that it is possible to produce enantiomerically pure *cis*-dihydrodiols from some of the substrates and that both biotransformation systems catalyze different types of reactions.

It was shown that CDO is a broad substrate range enzyme. We demonstrated that it was able to catalyze the asymmetric dihydroxylation of numerous substrate, e.g. substituted benzenes, biphenyls, and naphthalenes. In accordance to other investigated dioxygenases, it dioxygenated monosubstituted benzenes, except fluorobenzene, to single monosubstituted *cis*-benzene dihydrodiol enantiomers. All monosubstituted *cis*-benzene dihydrodiol products that were investigated had an *S*-configuration at the C-atom in *meta*-position with respect to the substituent. This is also in agreement to most other dioxygenases. Besides monosubstituted benzenes, additional substrates were transformed to pure *cis*-dihydrodiol enantiomers, e.g. naphthalene, dioxin, and dibenzofuran. CDO transformed, with one exception, 1,4-disubstituted benzenes to *cis*-dihydrodiols that had higher optical purities than those formed by other dioxygenases (Chapter 2).

We developed a novel GC-MS method (gas chromatography mass spectroscopy) to determine the enantiomeric excess of *cis*-dihydrodiols. The method included extraction of *cis*-dihydrodiols, derivatization with *n*-butylboronic acid, and analysis by GC-MS. The advantage of this novel method is that an exhaustive isolation and cleanup of *cis*-dihydrodiols is not needed. However, this method is not suited for the determination of absolute configurations of enantiomerically pure *cis*-dihydrodiols, when standards are not available (Chapter 2).

Besides dioxygenation, CDO has potential to catalyze other types of reactions (Chapter 3). Benzocyclic substrates (e.g. indan, 1,2-dihydronaphthalene) were transformed by CDO through dihydroxylation, monohydroxylation and desaturation reactions. In terms of its ability to catalyze different types of reactions, CDO is a less versatile enzyme than naphthalene dioxygenase of *Pseudomonas* sp. strain NCIB 9816 (NDO) and toluene dioxygenase of *Pseudomonas putida* F39/D (TDO). Most of the

---

products had identical absolute configurations as those formed by NDO and were different from those formed by TDO. Interestingly, the genes encoding CDO (*tcbAa*, *Ab*, *Ac*, *Ad*) are closely related to those encoding TDO (*todC1C2BA*), but are different to those encoding NDO (*nahAndoABC*). These results indicate, that small, but significant differences in the active sites of TDO and CDO may exist. This small differences might be responsible for the differences in the absolute configurations of certain products formed from benzocyclic substrates by TDO and CDO.

We demonstrated, that there was a clear positive relation between enantiomeric structures that were preferentially formed by CDO and those that were preferentially transformed by CDD. Experiments with indan derivatives (*cis*-1,2-indandiol and 1-indanol) as biotransformation substrates showed that CDD transformed exclusively (+)-*cis*-(1*R*,2*S*)-indandiol and (+)-(1*S*)-indanol. (+)-(1*S*)-indanol was stoichiometrically transformed to 1-indanon. This is an unequivocal experimental prove that a *cis*-dihydrodiol dehydrogenase can also act as an alcohol dehydrogenase (Chapter 4).

CDO is a four-subunit complex, formed by the gene products of *tcbAa* for the large subunit of the terminal oxygenase, *tcbAb* for the small subunit of the terminal oxygenase, *tcbAc* for the ferredoxin, and *tcbAd* for the NADH-reductase. The activity of CDO was reconstituted by mixing crude cell extracts of overexpression clones that contain the CDO subunits. A small activity was measured without the NADH reductase. The activity was increased tenfold when all subunits were combined. Crude cell extracts of *E. coli* BL21 (pTCB116), which contains the CDO ferredoxin and NADH reductase subunit, were sufficient to supply both electron transfer subunits to screen for the presence of the terminal oxygenase component of CDO in protein purification experiments. Experiments that were done with partially purified protein to determine the dependence of the transformation rate on the substrate concentration showed a Michaelis-Menten kinetic for both toluene and chlorobenzene. The apparent  $K_m$  value for chlorobenzene was approximately half of that for toluene (Chapter 5).

We developed an alternative to  $^{14}\text{C}$  measurements to quantify dioxygenase activities (Chapter 5). The method included acidic dehydration of *cis*-dihydrodiols to phenols, extraction, derivatization of phenols with 2,3,4,5,6-pentafluorobenzylbromid, and analysis of the phenol derivatives by gas chromatography with electron capture detection (ECD).

---

## ZUSAMMENFASSUNG

Die Untersuchung enzymatischer Prozesse ist eine der zentralen Aufgabenstellungen vieler Forschungsprojekte der Umweltnaturwissenschaften. Die Ziele der entsprechenden Projekte sind völlig unterschiedlicher Art. In den letzten zwei bis drei Dekaden war eines dieser Forschungsgebiete die Abklärung biologischer Abbauewege verschiedenster Chemikalien und damit die Untersuchung der zugrundeliegenden enzymatischen Reaktionen. Dabei war die Erforschung der biologischen Abbaubarkeit von Umweltchemikalien mit potentiell gefährlichen Nebenwirkungen auf Menschen, Flora und Fauna ein zentraler Aspekt. Die Vielzahl dieser Umweltchemikalien sind aromatische Verbindungen oder von diesen abgeleitete Substanzen.

Inzwischen sind die Fähigkeiten von Bakterien, Umweltchemikalien abzubauen, weit fortgeschritten. Um aber die aus den Abbauexperimenten gewonnenen Erkenntnisse besser verstehen zu können, mussten sich Wissenschaftler einer genaueren Untersuchung der enzymatischen Reaktionen zuwenden, die Teilreaktionen von Abbauwegen darstellen. Unter anderem waren in diesem Zusammenhang Reaktionen von Interesse, die durch Dioxygenasen und *cis*-Dihydrodiol Dehydrogenasen katalysiert werden. Dioxygenasen initiieren den Abbau von nichtaktivierten Aromaten durch das Einfügen von zwei Hydroxylgruppen in den aromatischen Kern. Die beiden Hydroxylgruppen werden in benachbarter Position und in *cis*-Konfiguration zueinander eingeführt. Dadurch entstehen *cis*-Dihydroxyderivate der Ausgangssubstanzen, sogenannte *cis*-Dihydrodiole. Als Ergebnis dieser Reaktion wird die aromatische Grundstruktur des Substrates aufgelöst und in den meisten Fällen entsteht ein chirales Produkt mit zwei asymmetrischen Zentren. Im weiteren Verlauf des mikrobiologischen Abbaus wird das *cis*-Dihydrodiol rearomatisiert durch eine *cis*-Dihydrodiol Dehydrogenase. Dabei geht die Chiralität verloren und als Produkt entsteht ein achirales Catechol.

Im Rahmen dieser Arbeit habe ich mich mit zwei Enzymen beschäftigt, einer Dioxygenase und einer *cis*-Dihydrodiol Dehydrogenase. Es handelte sich um die Chlorbenzoldioxygenase (CDO) und die *cis*-Chlorbenzol Dihydrodiol Dehydrogenase (CDD) des Stammes *Pseudomonas* sp. P51. In dieser Dissertation wurden Reaktionen untersucht, die durch diese beiden Enzyme katalysiert werden. Die Experimente wurden ausschliesslich mit rekombinanten *Escherichia coli* Stämmen (Klone) durchgeführt, in die die Gene, die die entsprechenden Enzyme kodieren, kloniert wurden. Der Wildtyp-Stamm *Pseudomonas* sp. P51 wurde in dieser Dissertation nicht benutzt. Für Vergleichsexperimente wurde der Stamm *Pseudomonas putida* F39/D verwendet, der

---

freundlicherweise von Herrn Prof. D.T. Gibson, University of Iowa, zur Verfügung gestellt wurde. Zur Charakterisierung einer Komponente der CDO wurden auch Klone verwendet, die Aktivitäten aller Komponenten der CDO separat exprimieren. Das Anfertigen aller benutzten Klone war nicht Bestandteil dieser Dissertation. Das Klonieren geschah durch Kollegen an der EAWAG im Rahmen anderer Forschungsprojekte.

CDO transformiert eine Vielzahl aromatischer Substrate zu *cis*-Dihydrodiol-Produkten. Das vielseitige Substratspektrum der CDO rechtfertigt eine Klassifizierung als "broad substrate range enzyme". Einfach substituierte Benzole werden mit der Ausnahme von Fluorbenzol zu reinen *cis*-Dihydrodiol-Enantiomeren umgewandelt. Das Einfügen der beiden Hydroxylgruppen geschieht in *ortho*- und *meta*-Position zum Substituenten. Den durch CDO gebildeten einfach substituierten *cis*-Benzoldihydrodiolen ist die gleiche Absolutkonfiguration gemeinsam. Diese ist charakterisiert durch eine *S*-Konfiguration des C-Atoms, welches sich in *meta*-Position zum Substituenten befindet. Die Konfiguration des C-Atoms in *ortho*-Position zum Substituenten ist entsprechend der Regeln von Cahn-Ingold-Prelog durch die Priorität des Substituenten bestimmt. So hat dieses C-Atom im Falle von *cis*-Toluoldihydrodiol eine *R*-Konfiguration, dagegen aber im Falle von *cis*-Brombenzoldihydrodiol eine *S*-Konfiguration. Eine Vielzahl 1,4-disubstituierter Benzole wird durch CDO zu *cis*-Dihydrodiolen transformiert. In einigen Fällen entstanden beide möglichen Dihydrodiolenantiomere. Von einer Ausnahme abgesehen, hatten die durch CDO gebildeten Produkte höhere Enantiomerenüberschüsse als die durch andere Dioxygenasen gebildeten. Die Enantiomerenüberschüsse von *cis*-Dihydrodiolen wurden mit einer GC-MS-Methode ermittelt (Gaschromatographie-Massenspektroskopie). Dies ist der erste Bericht, dass *cis*-Dihydrodiol-Enantiomere auf diese Weise getrennt werden konnten (Kapitel 2).

CDO stellt an ihre Substrate bestimmte Anforderungen: CDO toleriert keine polaren Substituenten am Benzolring, so sind Anilin und Phenol keine Substrate der CDO. Substituierte Benzole, die durch CDO umgesetzt werden, müssen zwei benachbarte unsubstituierte C-Atome aufweisen. 1,2,3,4-Tetrachlorbenzol ist ein Substrat der CDO, 1,2,3,5-Tetrachlorbenzol dagegen nicht. CDO transformiert keine mehrfach substituierten Biphenyle und keine polycyclischen aromatischen Kohlenwasserstoffe mit mehr als zwei Benzolringen. Experimente zur Ermittlung der Bildungsraten verschiedener Produkte zeigten, dass Naphthalin wesentlich schneller durch CDO umgesetzt wird als Benzol und einige einfach substituierte Benzole. Einfach substituierte Benzole werden schneller umgesetzt als Benzol (Kapitel 2).

Ferner wurde gezeigt, dass CDO neben der Dihydroxylierung, die zur Bildung von *cis*-Dihydrodiolen führt, auch zwei andere Reaktionstypen katalysieren kann (Kapitel 3). Die getesteten Substrate waren benzocyclische Verbindungen, z.B. Indan und 1,2-Dihydronaphthalin. Es handelt sich dabei um die Reaktionstypen Monohydroxylierung und Desaturierung. Durch die Desaturierung entstehen Produkte, die wiederum als Substrate für eine anschließende Dihydroxylierung dienen. Die direkten Dihydroxylierungsprodukte benzocyclischer Substrate (Inden und 1,2-Dihydronaphthalin) waren *cis*-Dihydrodirole mit entgegengesetzter Absolutkonfiguration. Das Dihydroxylierungsprodukt von Inden, *cis*-1,2-Indandiol, hatte eine (1*R*,2*S*)-Konfiguration, wogegen das Dihydroxylierungsprodukt von 1,2-Dihydronaphthalin, *cis*-1,2-Dihydroxy-1,2,3,4-tetrahydronaphthalin, eine (1*S*,2*R*)-Konfiguration besass. CDO ist weniger vielfältig in der Fähigkeit, verschiedene Reaktionstypen zu katalysieren als Naphthalindioxygenase (NDO) von Stamm *Pseudomonas* sp. NCIB 9816 und Toluoldioxygenase (TDO) von Stamm *Pseudomonas putida* F39/D. Die meisten durch CDO gebildeten Produkte hatten gleiche Absolutkonfigurationen wie die durch NDO gebildeten und unterschieden sich von denen durch TDO gebildeten. Dieses Ergebnis überrascht, da die Gene, welche die terminale Oxygenase der CDO kodieren, den Genen, welche die terminale Oxygenase der TDO kodierenden, sehr ähnlich sind und sich von denen, welche die terminale Oxygenase der NDO kodieren, unterscheiden. Dies deutet darauf hin, dass kleine, aber signifikante Unterschiede in den aktiven Zentren von TDO und CDO existieren könnten, die für die verschiedenen Absolutkonfigurationen der durch CDO und TDO gebildeten Oxidationsprodukte benzocyclischer Substrate verantwortlich sein könnten.

CDO ist ein Enzymkomplex aus vier Untereinheiten, der durch die Genprodukte von *tcbAa* (grosse Untereinheit der terminalen Oxygenase), *tcbAb* (kleine Untereinheit der terminalen Oxygenase), *tcbAc* (Ferredoxin) und *tcbAd* (NADH-Reduktase) gebildet wird. Die Aktivität der CDO wurde mit Zellextrakten von Klonen, die einzelne der drei Komponenten der CDO überexprimieren, rekonstituiert (Kapitel 5). Bereits ohne die NADH-Reduktase war eine kleine Aktivität messbar. In Anwesenheit aller CDO-Komponenten erfolgte eine Rekonstitution mit etwa zehnfach höherer Aktivität. Zellextrakte von *E. coli* BL21 (pTCB116), der die Ferredoxin- und NADH-Reduktase-Untereinheit der CDO enthält, wurden benutzt, um beide Elektronentransfer-Komponenten zur Verfügung zu stellen um die Elution der terminalen Oxygenase Komponente der CDO in Proteinreinigungsexperimenten zu ermitteln. Experimente mit partiell gereinigtem Protein zur Ermittlung der Umsatzgeschwindigkeit von Toluol und Chlorbenzol durch CDO als Funktion der Substratkonzentration ergaben eine

---

Abhängigkeit, die einer Michaelis-Menten-Kinetik entsprach. Der scheinbare  $K_m$ -Wert für Chlorbenzol war etwa die Hälfte des scheinbaren  $K_m$ -Wertes für Toluol.

Neben der Charakterisierung der CDO wurden im Rahmen dieser Arbeit Experimente mit einem zweiten Enzym, der CDD, durchgeführt. Ziel dieser Experimente war zu ermitteln, ob CDD *cis*-Dihydrodiol enantiospezifisch umsetzt. Es zeigte sich, dass CDD von den jeweiligen beiden Enantiomeren von vier *para*-substituierten *cis*-Toluoldihydrodiolen immer das Enantiomer schneller transformierte, das durch CDO im Überschuss gebildet wird. Experimente mit zwei benzocyclischen *cis*-Dihydrodiolen zeigten, dass CDD beide Enantiomere von *cis*-1,2-Dihydroxy-1,2,3,4-tetrahydronaphthalin, aber nur das (1*R*,2*S*)-Enantiomer von *cis*-Indandiol transformierte. Von 1-Indanol wurde durch CDD nur das (*S*)-Enantiomer umgesetzt. Dieses wurde stöchiometrisch zu 1-Indanon transformiert. Damit wurde gezeigt, dass CDD auch als Alkoholdehydrogenase agieren kann. Die Experimente mit CDD sind in Kapitel 4 dargestellt.