ETH zürich Research Collection

Doctoral Thesis

Metabolism of phenoxyalkanoic acid herbicides in Sphingomonas herbicidovorans MH
cloning and characterization of two enantiospecific α-ketoglutarate-dependent dioxygenases and degradation pathway analysis

Author(s):
Müller, Tina Andrea

Publication Date:
2004

Permanent Link:

https://doi.org/10.3929/ethz-a-004885312 →

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.

ETH Library

Diss. ETH No. 15588

Metabolism of Phenoxyalkanoic Acid Herbicides in *Sphingomonas herbicidovorans* MH: Cloning and Characterization of Two Enantiospecific α-Ketoglutarate-Dependent Dioxygenases and Degradation Pathway Analysis

A dissertation submitted to the
SWISS FEDERAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY ZURICH

for the degree of
DOCTOR OF NATURAL SCIENCES

presented by

TINA ANDREA MÜLLER
dipl. Umwelt-Natw. ETH Zurich
born March 8, 1973
citizen of Turbenthal ZH

accepted on the recommendation of
Prof. Dr. Alexander J. B. Zehnder, examiner
Prof. Dr. Hilary M. Lappin-Scott, co-examiner
Dr. Hans-Peter E. Kohler, co-examiner
Prof. Dr. Jan Roelof van der Meer, co-examiner

Zurich, 2004

SUMMARY

The bacterium *Sphingomonas herbicidovorans* MH is able to degrade phenoxyalkanoic acid herbicides, such as the chiral mecoprop (2-(*R,S*)-2-methyl-4-chlorophenoxypropanoic acid) and dichlorprop (2-(*R,S*)-2,4-dichlorophenoxy-propanoic acid). Strain MH degrades mecoprop and dichlorprop enantiospecific, whereby the (*S*) enantiomer is preferentially converted. This thesis work was carried out to (i) elucidate the genetic background of the mecoprop and dichlorprop degradation pathway and to (ii) characterize the two α-ketoglutarate-dependent dioxygenases that catalyze the initial degradation step and to study the features of enantioselective enzyme reactions.

To elucidate the genetic background of the phenoxyalkanoic acid degradation pathway in *S. herbicidovorans* MH, PCR- and hybridization experiments were carried out with primers and probes derived from related genes. Strain MH expressed two distinct α-ketoglutarate dependent dioxygenases, designated *(R)*- and *(S)*-dichlorprop dioxygenases (RdpA and SdpA, respectively) that converted phenoxypropanoic acid herbicides to the corresponding achiral phenols. Further breakdown of the phenol was proposed to proceed analogously to the well-studied pathway of 2,4-D (2,4-dichlorophenoxyacetic acid) in *Ralstonia eutropha* JMP134(pJP4) through a phenol hydroxylase forming a substituted catechol and further through a modified *ortho*-cleavage pathway. Several genes of this pathway were isolated: a putative phenol hydroxylase gene (*tfdB*), a putative regulatory gene (*cadR*), two genes for dichlorocatechol 1,2-dioxygenases ($dccA_{I/II}$), a complete and an incomplete gene copy for a dienelactone hydrolase ($dccD_{I/II}$), a gene for a part of a maleylacetate reductase (*dccE*) and a gene for a potential phenoxyalkanoic acid permease (*tfdK*). No gene for a chloromuconate cycloisomerase was found. In contrast to the 2,4-D pathways in other microorganisms, the *sdp*, *rdp*, and *dcc* genes of *S. herbicidovorans* MH were not located in one regulon and their expression was not tightly regulated. No coherent pattern was derived on the possible origin of the *sdp*, *rdp*, and *dcc* genes. *rdpA* from the *Alphaproteobacterium S. herbicidovorans* MH was 99% identical to *rdpA*

from the *Betaproteobacterium Delftia acidovorans* MC1. Such close resemblance is evidence for a recent gene exchange between *Alpha-* and *Betaproteobacteria*. On the contrary, $DccA_I$ and $DccA_{II}$ did not group within the known chlorocatechol 1,2-dioxygenases from *Beta-* and *Gammaproteobacteria*, but formed a separate branch in clustering analysis. This suggests a different reservoir of the genes of the modified *ortho*-cleavage pathway in *Alphaproteobacteria* from the ones in *Beta-* and *Gammaproteobacteria* and a reduced gene transfer between these bacterial groups.

We intensively investigated the two α-ketoglutarate-dependent dichlorprop-dioxygenases RdpA and SdpA, which were 30% identical to each other. The amino acid sequence of RdpA was 100% identical to the one of RdpA from the dichlorprop degrader *D. acidovorans* MC1, whereas the amino acid sequence of SdpA was only 63% identical to the one of SdpA from D. acidovorans MC1. With TfdA and TauD, the identities lay in the range of 30–37%. A conserved motif of α-ketoglutarate-dependent dioxygenases, $HXDX_{24}TX_{131}HX_{10}R$ for RdpA and $HXDX_{24}TX_{127}HX_{10}R$ for SdpA, was recognized in both proteins. In RdpA, His-111, Asp-113 and His-270 are predicted to form the 2-His-1-carboxylate facial triad involved in iron(II) binding and the residues Thr-138 and Arg-281 were putative α-ketoglutarate binding sites. The predicted iron-binding residues in SdpA were His-102, Asp-104 and His-257; and the predicted α-ketoglutarate binding residues were Thr-129 and Arg-268.

We expressed and purified both enzymes as 6xHis-tagged proteins and characterized them with respect to their physicochemical properties, their substrate, cosubstrate and cofactor specificities and enzyme kinetics. RdpA turned out to be a trimer with a subunit size of 36 kDa whereas SdpA was a monomer with a size of 32 kDa. RdpA exclusively converted the *(R)* enantiomers of dichlorprop and mecoprop whereas SdpA was specific for the *(S)* enantiomers. Both dioxygenases preferred substituted phenoxypropanoic acids to unsubstituted ones. Furthermore, RdpA and SdpA were only slightly or not active at all with phenoxyacetic and phenoxybutyric acids as substrates. RdpA activity was linearly dependent on oxygen concentration whereas SdpA showed Michalis-Menten behavior with O_2 as

the substrate with an apparent K_m-value of 159 μM. Both dioxygenases were quite specific for their cosubstrate α-ketoglutarate. The only other cosubstrate that supported activity was 2-oxoadipate. High specificity was also observed for Fe(II) which could not be replaced by any of the tested divalent cations. In the absence of ascorbate, RdpA and SdpA exhibited lower activity suggesting uncoupled decarboxylation of α-ketoglutarate.

S. herbicidovorans MH grows on 2,4-D, but neither RdpA nor SdpA catalyzed 2,4-D to a significant extent indicating the existence of a third phenoxyalkanoic acid converting enzyme. However, *tfdA*-like, *tfdA*α-like or *cadAB*-like genes were not detected in strain MH with PCR- and hybridization experiments.

Finally, we modeled the native structure of RdpA and SdpA with TauD as a template and speculated about the active sites of the two enzymes. The overall structures of RdpA and SdpA could be modeled on the TauD structure and showed the typical jellyroll motif. The model confirmed the predicted iron(II)- and α-ketoglutarate-binding residues in both dioxygenases. In both proteins, a cavity was formed by several amino acid residues, which had the potential to bind the aromatic ring of the phenoxypropanoic acids. The most striking difference between RdpA and SdpA was the replacement of the neutral Gly-107 in RdpA by the basic Asn-95 in SdpA at the active site. This indicates an important rote of this residue in interacting with the alkyl- or the carboxy-moiety of the substrates and hence also in determining the stereospecificity of the enzyme. Since these are only model predictions based on an existing template structure, further direct crystallization studies are needed to obtain a more appropriate view on the native fold and the active sites of RdpA and SdpA. The work presented here gives the basis for such experiments.

ZUSAMMENFASSUNG

Das Bakterium *Sphingomonas herbicidovorans* MH baut Phenoxyalkansäure-Herbizide wie die chiralen Verbindungen Mecoprop (2-(*R,S*)-2-Methyl-4-chloro-phenoxypropionsäure) und Dichlorprop (2-(*R,S*)-2,4-Dichlorophenoxypropionsäure) ab. Der Stamm MH baut Mecoprop und Dichlorprop enantiospezifisch ab, wobei das *(S)* Enantiomer bevorzugt umgewandelt wird. Diese Doktorarbeit wurde ausgeführt um (i) den genetischen Hintergrund des Mecoprop- und Dichlorprop-Abbauweges zu untersuchen und um (ii) die zwei α-Ketoglutarat abhängigen Dioxygenasen zu charakterisieren, die den ersten Abbauschritt katalysieren und um die Eigenschaften dieser enantioselektiven Enzymreaktion zu studieren.

Um den genetischen Hintergrund des Phenoxyalkansäure-Abbauweges in *S. herbicidovorans* MH aufzuklären, wurden PCR- und Hybridisierungsexperimente mit Primern und Sonden, die aus verwandten Genen abgeleitet wurden, durchgeführt. Der Stamm MH exprimiert zwei verschiedene α-Ketoglutarat abhängige Dioxygenasen, *(R)*- und *(S)*-Dichlorprop Dioxygenasen, die Phenoxypropionsäure-Herbizide in die entsprechenden Phenole umwandeln. Es wurde vorgeschlagen, dass die Phenole analog des bekannten 2,4-D (2,4-Dichlorophenoxyessigsäure) Abbauweges von *Ralstonia eutropha* JMP134(pJP4) mittels einer Phenol Hydroxylase, die ein substituiertes Catechol bildet, abgebaut werden und dann durch den modifizierten *ortho*-cleavage Abbauweg metabolisiert werden. Verschiedene Gene dieses Abbauweges wurden aus Stamm MH isoliert: ein mutmassliches Phenol Hydroxylase-Gen (*tfdB*), ein mögliches Regulatorgen (*cadR*), zwei Gene für Dichlorocatechol 1,2-Dioxygenasen ($dccA_{I/II}$), eine vollständige und eine unvollständige Genkopie einer Dienelactone Hydrolase ($dccD_{I/II}$), ein Gen für einen Teil einer Maleylacetat Reduktase (*dccE*) und ein Gen für eine potentielle Phenoxyalkansäure Permease (*tfdK*). Ein Chloromuconat Cycloisomerase-Gen wurde nicht gefunden. Im Gegensatz zu den 2,4-D Abbauwegen in anderen Mikroorganismen sind die *sdp*, *rdp*, und *dcc*-Gene in *S. herbicidovorans* MH nicht in einem Regulon angeordnet und ihre Expression ist nicht streng reguliert. Es wurde weiter auch kein einheitliches Bild über den möglichen Ursprung der *sdp*, *rdp*, und *dcc*-Gene erhalten. *rdpA* vom *Alphaproteobakterium S. herbicidovorans* MH war 99% identisch zu *rdpA* vom *Betaproteobakterium Delftia acidovorans* MC1. Eine solche Ähnlichkeit deutet an, dass kürzlich ein Genaustausch zwischen *Alpha*- und *Betaproteobakterien* stattgefunden hat.

Im Gegensatz dazu können $DccA_I$ und $DccA_{II}$ nicht mit den bekannten Chlorocatechol 1,2-Dioxygenasen von *Beta-* und *Gammaproteobakterien* gruppiert werden, sondern bilden einen eigenen Ast in einer Klusteranalyse. Daher wird vorgeschlagen, dass verschiedene Reservoirs von Genen des modifizierten *ortho*-cleavage Abbauweges in *Alphaproteobakterien* und *Beta-* und *Gammaproteobakterien* existieren und dass die Gene zwischen diesen Bakteriengruppen nur begrenzt ausgetauscht werden.

Im weiteren untersuchten wir die zwei α-Ketoglutarat abhängigen Dichlorprop Dioxygenasen, die 30% identisch zueinander sind. Die Aminosäuresequenz von RdpA ist 100% identisch mit derjenigen von RdpA vom Dichlorprop-Abbauer *D. acidovorans* MC1, während die Aminosäuresequenz von SdpA nur 63% identisch ist mit derjenigen von SdpA von Stamm MC1. Die Identität zu TfdA und TauD liegt im Bereich zwischen 30–37%. Ein in α-Ketoglutarat abhängigen Dioxygenasen konserviertes Motiv, $HXDX_{24}TX_{131}HX_{10}R$ in RdpA und $HXDX_{24}TX_{127}HX_{10}R$ in SdpA, wurde in beiden Proteinen gefunden. Für RdpA wurde vorhergesagt, dass His-111, Asp-113 und His-270 die 2-His-1-carboxylate facial triad bilden, die in die Eisen(II)-Bindung involviert ist, und Thr-138 und Arg-281 bilden mögliche α-Ketoglutarat bindende Aminosäuren. In SdpA wurden His-102, Asp-104 und His-257 als Eisen(II)-bindende und Thr-129 und Arg-268 als α-Ketoglutarat bindende Aminosäuren vorhergesagt.

Wir haben beide Enzyme als 6xHis-tagged Fusionsproteine exprimiert, gereinigt und sie hinsichtlich ihrer physikalisch-chemischen Eigenschaften, ihrer Substrat-, Kosubstrat- und Kofaktoren-Spektren und ihrer Enzymkinetik charakterisiert. RdpA war ein Trimer mit einer Untereinheit von 36 kDa, während SdpA ein Monomer mit einer Grösse von 32 kDa war. RdpA wandelte nur die *(R)* Enantiomere von Dichlorprop und Mecoprop um, SdpA war im Gegensatz dazu spezifisch für die *(S)* Enantiomere. Beide Dichlorprop-Dioxygenasen waren nur schwach oder überhaupt nicht aktiv mit Phenoxyessig- und Phenoxybuttersäuren. Die RdpA Aktivität war linear abhängig von der Sauerstoffkonzentration, während SdpA Michaelis-Menten-Kinetik-Verhalten mit Sauerstoff als Substrat zeigte und einen apparenten K_m-Wert von 159 μM aufwies. Beide Dioxygenasen waren ziemlich spezifisch für das Kosubstrat α-Ketoglutarat. Das einzige andere Kosubstrat, das Aktivität unterstützte, war 2-Oxoadipat. Hohe Spezifizität wurde auch für Fe(II) gezeigt, das durch kein anderes divalentes Kation ersetzt werden konnte. Ohne Ascorbat wurde eine verminderte Aktivität von RdpA und SdpA gemessen, was auf eine entkoppelte α-Ketoglutarat-Dekarboxylierung hindeutet.

S. herbicidovorans MH wächst auf 2,4-D, aber weder RdpA noch SdpA wandeln 2,4-D mit einer signifikanten Umsatzrate um. Dies deutet darauf hin, dass ein drittes, Phenoxyalkansäure umsetzendes Enzym existiert. Dennoch wurden mit PCR- und Hybridisierungsexperimenten keine *tfdA*-ähnliche, *tfdA*α-ähnliche oder *cadAB*-ähnliche Gene im Stamm MH gefunden.

Schliesslich modellierten wir die Struktur von RdpA und SdpA mit TauD als Vorlage und spekulierten über die aktive Seite der beiden Enzyme. Die Struktur von RdpA und SdpA konnte 'auf' TauD modelliert werden und das typische 'jellyroll' Motiv wurde gefunden. Das Modell bestätigte die vorhergesagten Eisen- und α-Ketoglutarat bindenden Aminosäuren in beiden Dioxygenasen. In beiden Proteinen bildeten einige Aminosäuren eine ‚Höhle', die ein Bindungspotential für den aromatischen Ring der Phenoxyalkansäure hatte. Der erstaunlichste Unterschied zwischen RdpA und SdpA war, dass das neutrale Gly-107 von RdpA in SdpA durch das basische Asn-95 ersetzt wurde. Das deutet darauf hin, dass diese Aminosäuren eine wichtige Rolle in der Interaktion mit der Alkyl- bzw. mit der Carboxygruppe der chiralen Substrate spielen und daher die Enantiospezifität bestimmen könnten. Alle diese Voraussagen beruhen auf einem Model, das auf nur einer Vorlage gemacht wurde. Deshalb sind jetzt Kristallisationsstudien nötig, um eine noch bessere Sicht auf die Struktur und die aktive Seite von RdpA und SdpA zu gewinnen. Die hier präsentierte Arbeit bildet eine Grundlage für solche Experimente.