



Doctoral Thesis

**Prolinkatabolismus in *Pseudomonas aeruginosa*
Eigenschaften gereinigter Prolin-Dehydrogenase/1-Pyrrolin-5-
Carboxylat-Dehydrogenase und Regulation ihrer Synthese**

Author(s):

Meile, Leo

Publication Date:

1982

Permanent Link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-000257404> →

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. Nr. 7026

PROLINKATABOLISMUS
IN PSEUDOMONAS AERUGINOSA

EIGENSCHAFTEN GEREINIGTER
PROLIN-DEHYDROGENASE/1-PYRROLIN-5-CARBOXYLAT-DEHYDROGENASE
UND REGULATION IHRER SYNTHESE

ABHANDLUNG

zur Erlangung

des Titels eines Doktors der Naturwissenschaften der

EIDGENOESSISCHEN TECHNISCHEN

HOCHSCHULE ZUERICH

vorgelegt von

LEO MEILE

dipl. Natw. ETH

geboren am 1. Dezember 1953

von Mosnang (Kt. St.Gallen)

Angenommen auf Antrag von
Prof. Dr. Th. Leisinger, Referent
Prof. Dr. L. Ettliger, Korreferent

1982

5. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde der Abbau von Prolin in Pseudomonas aeruginosa untersucht. L-Prolin wird durch ein bifunktionelles Enzym, die Prolin-Dehydrogenase/P5C-Dehydrogenase (Pro-DH/P5C-DH), zu Glutamat abgebaut. Das Enzym aus mit Prolin gezüchteten Zellen von Stamm PA01 wurde bis zur elektrophoretischen Homogenität mittels Ionenaustauscher- und Affinitätschromatographie gereinigt und charakterisiert. Eine Analyse mittels SDS-Gelelektrophorese ergab ein Molekulargewicht von 119'000 Dalton für die kleinste Untereinheit, welche einen N-Terminus mit den Aminosäuren N-Pro-Ala-Asp aufwies. Unter nativen Bedingungen wurde mittels Polyacrylamidgelelektrophorese ein Molekulargewicht von 241'000 und 470'000 Dalton, und mittels Ausschluss-Chromatographie eines von 235'000 bestimmt. Die FAD-abhängige Pro-DH-Aktivität ist spezifisch für L-Prolin und weist einen relativen hohen K_m -Wert von 45mM für Prolin auf. Sie ist an die Atmungskette gebunden in vivo. Pro-DH/P5C-DH setzt spezifisch nur L-P5C mit dem Cofaktor NAD(P) um und zeigt höhere Affinität für NAD ($K_m = 0.03\text{mM}$) als für NADP ($K_m = 0.17\text{mM}$). Die Synthese von Pro-DH/P5C-DH unterliegt den Kontrollmechanismen der Induktion (mit Prolin als Induktor), Katabolitrepression durch Citrat und Stickstoffkontrolle. Das Enzym spielt auch im Ornithinabbau eine wichtige Rolle, indem die P5C-DH-Aktivität von der Acetylornithin-5-Aminotransferase angeliefertes P5C zu Glutamat weitermetabolisiert.

Mutantenstämme von Pseudomonas aeruginosa, die Prolin nicht mehr als C- und N-Quelle verwerten konnten (pru-Mutanten), wurden auf den Besitz der Pro-DH - und P5C-DH-Aktivität untersucht. Es wurden Stämme mit defekter Pro-DH-Aktivität und solche mit defekter Pro-DH/P5C-DH charakterisiert, hingegen wurden keine Mutanten vom Typ Pro-DH⁺/P5C-DH⁻ gefunden. Die Mutanten mit defekter Pro-DH/P5C-DH konnten Ornithin nicht verwerten, was darauf hinweist, dass eine einzige P5C-DH-Aktivität am Abbau von Ornithin und Prolin beteiligt ist. Durch Konstruktion von Mehrfachmutanten konnte Prolin als alleiniger Induktor der Pro-DH/P5C-DH identifiziert werden.

Summary

Proline dehydrogenase/l-Pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase (Pro-DH/P5C-DH), a bifunctional enzyme catalyzing the two consecutive reactions of the oxidation of proline to glutamic acid was purified from Pseudomonas aeruginosa. Pro-DH/P5C-DH oxidized L-proline in an FAD-dependent reaction to L-1-pyrroline-5-carboxylic acid and converted this intermediate with NAD(P) as cosubstrates to L-glutamic acid. The purification procedure involved DEAE-chromatography and affinity chromatography on Matrex Gel Red A. It resulted after 40-fold purification with 11 % yield in a homogeneous preparation (>98 % pure). The molecular weight of the single subunit was determined at 119'000. The pure preparation contained catalytically active dimers and tetramers. Manual Edman degradation revealed N-pro-ala-asp as the N-terminal amino acid sequence. Pro-DH/P5C-DH was highly specific for the L-forms of proline and l-pyrroline-5-carboxylic acid. Its apparent K_m values were 45 mM for L-proline, 0.03 mM for NAD and 0.17 mM for NADP. The saturation function for l-pyrroline-5-caboxylic acid was non-hyperbolic.

Mutants of Pseudomonas aeruginosa deficient in the utilization of L-proline as the only carbon and nitrogen source have been found to be defective either in Pro-DH activity or in both Pro-DH and P5C-DH activities. The latter type of mutants was unable to utilize L-ornithine, indicating that a single P5C-DH activity is involved in the degradation of ornithine and proline. Pro-DH and P5C-DH activities were strongly and coordinatly induced by proline. It was excluded that l-pyrroline-5-carboxylic acid acted as an inducer of the bifunctional enzyme and the low level induction observed during growth on ornithine was attributed to the intracellular formation of proline. The formation of the proline degradative enzyme was shown to be subject to catabolite repression by citrate and nitrogen control.