



Doctoral Thesis

Untersuchungen zur Struktur der Oxalacetat-Decarboxylase

Author(s):

Woehlke, Günther

Publication Date:

1994

Permanent Link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-000943956> →

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. 10654

Untersuchungen zur Struktur der Oxalacetat-Decarboxylase

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

vorgelegt von
Günther Woehlke
Dipl. Biologe Philipps-Universität Marburg/Lahn
geboren am 6. Februar 1964
Bundesrepublik Deutschland

Angenommen auf Antrag von
Prof. Dr. P. Dimroth, Referent
Prof. Dr. G. Braus, Korreferent

Zürich 1994

1. Zusammenfassung

Das Enterobakterium *Salmonella typhimurium* besitzt eine Na⁺-translozierende, biotinhaltige Oxalacetat-Decarboxylase. Auf der Grundlage einer Expressionsbank für die α -Untereinheit im λ -Phagen EMBL3 wurde die DNA-Sequenz der entsprechenden Gene aufgeklärt. Es fanden sich drei offene Leseraster, die (in der Reihenfolge) für die Untereinheiten γ (*oadG*), α (*oadA*) und β (*oadB*) codieren. Vor diesen drei Genen findet sich ein weiteres offenes Leseraster, dessen sequenzierter Teil auf Aminosäureebene 66 % Identität zu dem C-terminalen Bereich der L-Tartrat-Dehydratase β -Untereinheit aus *Escherichia coli* besitzt. Vor den *oad*-Genen findet sich keine typische Konsensussequenz für einen Promotor. Mögliche Ribosomen-Bindungsstellen liegen vor jedem offenen Leseraster.

Die abgeleiteten Aminosäuresequenzen für die Oxalacetat-Decarboxylase Untereinheiten aus *S. typhimurium* sind stark homolog zum entsprechenden *Klebsiella pneumoniae* Enzym (71 % Identität für die γ -Untereinheiten, 92 % für die α -Untereinheiten und 93 % für die β -Untereinheiten). Bei den β -Untereinheiten schien sich die Ähnlichkeit auf die N-terminalen 314 Aminosäuren zu beschränken. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass ein Artefakt bei der Klonierung der *K. pneumoniae*-Gene entstanden war, was zu irrtümlichen Ergebnissen führte.

Zur Kontrolle der Klonierung der *S. typhimurium oad*-Gene wurde eine chromosomale Kartierung vorgenommen. Sie zeigt, dass die Restriktionskarte des sequenzierten Bereichs in *S. typhimurium* mit der chromosomalen Karte übereinstimmt. Ausserdem wurde gefunden, dass ein weiterer Genlocus für die Oxalacetat-Decarboxylase vorhanden ist. Die Gencluster sind chromosomal codiert und nicht auf dem stammeigenen Plasmid pSLT.

Die Oxalacetat-Decarboxylase-Gene aus *K. pneumoniae* wurden zusammen mit dem Gen für den anaeroben Citratcarrier (*citS*) aus dem Chromosom kloniert. Die DNA-Sequenz des *oadB*-Gens konnte durch diesen Klon korrigiert und in Einklang mit der Sequenz aus *S. typhimurium* gebracht werden. In der abgeleiteten Aminosäuresequenz finden sich sämtliche proteinchemisch gewonnenen Peptidsequenzen wieder.

Für die membranständige Oxalacetat-Decarboxylase β -Untereinheit wurde ein Topologiemodell vorgeschlagen, das 9 Transmembranhelices voraussagt. Es wurde mit Hilfe von *'phoA*-Genfusionen experimentell überprüft. Vier zytoplasmatisch vorhergesagte Bereiche ergaben die erwarteten Phosphatase-negativen Fusionen, für

den fünften wurde keine Fusion erhalten. In den periplasmatisch erwarteten Loops 2, 4 und 6 wurden in Übereinstimmung zum Modell Phosphatase-positive Fusionen erhalten. Die vermeintlich periplasmatische Schleife 8 ergab wider Erwarten keine Fusion mit alkalischer Phosphatase Aktivität.

Aus dem Sequenzvergleich der β -Untereinheiten der Oxalacetat-Decarboxylasen und der Methylmalonyl-CoA-Decarboxylase aus *Veillonella parvula* wurden konservierte Bereiche identifiziert und spezifische Primer für eine Polymerase Kettenreaktion konstruiert. Mit diesem Ansatz konnte im Rahmen einer Diplomarbeit ein 750 bp grosses DNA Fragment aus *Propionigenium modestum* amplifiziert, kloniert und sequenziert werden, das Teil eines *mmdB*-Gens ist. Die abgeleitete Aminosäuresequenz weist 65 % Identität zu den drei sequenzierten β -Untereinheiten von Na^+ -translozierenden Decarboxylasen auf.

Um Oxalacetat-Decarboxylasen in Bakterien ausserhalb der Klasse der Enterobakterien zu finden, wurden im Rahmen einer Semesterarbeit physiologische Untersuchungen an *Lactococcus lactis* ssp *lactis* und *Clostridium sphenoides* durchgeführt. In keinem der beiden Organismen fand sich eine solche Enzymaktivität im Rohextrakt. Es werden Abbauege für Citrat beschritten, die die Decarboxylierung von Oxalacetat umgehen.

1. Summary

The Enterobacterium *Salmonella typhimurium* LT2 possesses a Na⁺-translocating, biotin-containing oxaloacetate decarboxylase. The nucleotide sequences of the corresponding genes were established on the basis of a genomic library in the λ -phage EMBL3 screened immunologically for the expression of the α -subunit. Three open reading frames were found encoding the subunits γ (*oadG*), α (*oadA*) and β (*oadB*) in this order. Upstream of these genes, an additional open reading frame was detected with 66 % identity on amino acid level in its sequenced part with the C-terminal part of the L-tartrate dehydratase β -subunit from *Escherichia coli*. Upstream of the *oad*-genes no typical promoter sequence was found but putative ribosome binding sites were identified before each open reading frame.

The deduced amino acid sequences for the oxaloacetate decarboxylase subunits from *S. typhimurium* are highly homologous to the *Klebsiella pneumoniae* enzyme with 71 % identity between the γ -subunits, 92 % identity between the α -subunits, and 93 % identity between the β -subunits. The similarity between the corresponding β -subunits appeared to exist only for the 314 N-terminal amino acid residues. It was shown that an artifact had occurred during cloning of the *K. pneumoniae*-genes that led to erroneous results.

As a control for the cloning of the *S. typhimurium* genes, the *oad*-genes were mapped on the chromosome. The map of the sequenced part was in accordance with the chromosomal map. Furthermore, an additional gene locus coding for an oxaloacetate decarboxylase in *S. typhimurium* was identified. The two *oad*-gene-clusters are located on the chromosome and not on the strain-specific plasmid pSLT.

The *K. pneumoniae oad*-genes were cloned together with the gene encoding the anaerobic citrate carrier (*citS*) from the chromosome. The nucleotide sequence of the *oadB* gene was corrected and is now in accordance with the corresponding *S. typhimurium*-gene and with all available peptide sequences.

A topology model for the integral membrane-bound subunit β was proposed, predicting 9 transmembrane helices. The model was tested experimentally with the *'phoA* gene fusion technique. Four loops predicted to be cytoplasmic were found to give phosphatase-negative fusions. The fifth cytoplasmic fusion was not obtained. In accordance with the model, in loops 2, 4 and 6 the fusions were phosphatase-positive.

Unexpectedly, the putative periplasmic loop 8 does not confer activity to phosphatase fusions.

From alignments of the β -subunits of the oxaloacetate decarboxylases and the methylmalonyl-CoA decarboxylase from *Veillonella parvula* conserved regions were identified and specific primers for polymerase chain-reaction were constructed in the course of a diploma thesis. With this approach, it was possible to amplify, to clone and to sequence a 750 bp DNA fragment from *Propionigenium modestum* which is part of a *mmdB* gene. The deduced amino acid sequence shows 65 % identity with the three sequenced β -subunits from Na^+ -translocating decarboxylases.

In order to identify oxaloacetate decarboxylases in bacteria other than Enterobacteria, physiological investigations were performed in *Lactococcus lactis* ssp *lactis* and *Clostridium sphenoides* in the frame of a laboratory course. None of these organisms showed enzymatic activity in the crude extract. In the anaerobic metabolism of these bacteria, the decarboxylation of oxaloacetate is circumvented.