



Doctoral Thesis

Primärstruktur und Expression der Methylmalonyl-CoA-Decarboxylase aus *Veillonella parvula*

Author(s):

Huder, Jon B.

Publication Date:

1994

Permanent Link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-000971877> →

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. 10750

**Primärstruktur und Expression der
Methylmalonyl-CoA-Decarboxylase aus
*Veillonella parvula***

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

vorgelegt von
Jon B. Huder
Dipl. Natw. ETH
geboren am 15. Dezember 1959
von Ardez GR

Angenommen auf Antrag von
Prof. Dr. P. Dimroth, Referent
Prof. Dr. H. Hennecke, Korreferent

Zürich 1994

1. Zusammenfassung

Die Gene, kodierend für die Na^+ -pumpende membrangebundene Methylmalonyl-CoA-Decarboxylase aus *Veillonella parvula*, wurden in Plasmiden kloniert. Oligonukleotide, abgeleitet von den N-terminalen Aminosäuresequenzen der α - und der γ -Untereinheit, ebenso wie von der konservierten Biotinylierungsregion auf der γ -Untereinheit, wurden als spezifische Sonden verwendet. Die ganze DNA Sequenz der Methylmalonyl-CoA-Decarboxylase Gene, zusammen mit den stromaufwärts und -abwärts gelegenen Regionen, wurde bestimmt. Die Gene kodieren für die Untereinheiten α (*mmdA*), δ (*mmdD*), ϵ (*mmdE*), γ (*mmdC*) und β (*mmdB*) der Decarboxylase und liegen in dieser Reihenfolge in gleicher Orientierung auf dem Chromosom. Das früher unbemerkte ϵ -Protein (M_r 5758) wurde eindeutig als Untereinheit der Decarboxylase nachgewiesen. Die N-terminale Aminosäuresequenz stimmt mit der von der DNA abgeleiteten *mmdE* Sequenz überein. Die offenen Leseraster der α - und der Biotin-enhaltenden γ -Untereinheit wurden durch die N-terminalen Aminosäuresequenzen identifiziert. Die N-Termini der δ - und β -Untereinheit sind blockiert. Deshalb wurde das offene Leseraster der δ -Untereinheit durch die Sequenz eines Bromcyanfragmentes bestätigt. Dagegen wurde die β -Untereinheit aufgrund der 61% Sequenzidentität mit den β -Untereinheiten der Oxalacetat-Decarboxylasen aus *Klebsiella pneumoniae* und *Salmonella typhimurium* identifiziert.

Die α -Untereinheit zeigt 60% Identität zur Carboxyltransferasedomäne der Propionyl-CoA-Carboxylase aus Rattenleber und 52% Identität zur 12 S Untereinheit der Transcarboxylase aus *Propionibacterium shermanii*. Die Biotin-enhaltende γ -Untereinheit war 29 bis 39% identisch mit den Biotindomänen anderer Biotinenzyme. Ein auf der γ -Untereinheit gefundener ausgedehnter Bereich von hauptsächlich Alanin- und Prolinresten könnte verantwortlich sein für die notwendige Flexibilität der γ -Untereinheit bei der "flip-flop" Bewegung der prosthetischen Biotingruppe zwischen den katalytischen Zentren der Carboxyltransferase und der Lyase. Die δ -Untereinheit der Methylmalonyl-CoA-Decarboxylase und die γ -Untereinheit der Oxalacetat-Decarboxylase zeigten jedoch keine signifikante Sequenzhomologie. Die Grobstruktur beider Proteine zeigte gewisse Ähnlichkeiten. Diese bestehen aus einem hydrophoben Membrananker nahe dem N-Terminus, einer Prolin/Alanin-reichen Region und einer auf fallenden Anhäufung geladener Aminosäurereste im C-terminalen Bereich. Die Sequenz der kleinen ϵ -Untereinheit konnte mit der C-terminalen Region der δ -Untereinheit unterhalb der Prolin/Alanin-reichen Region verglichen werden. In dieser Region sind die δ - und ϵ -Untereinheit zu 47% identisch und vermutlich durch Gen-duplikation hervorgegangen.

Von grossem Interesse für den Mechanismus des Na^+ -Transportes sind die langen Bereiche hoher Sequenzidentität zwischen den hydrophoben β -Untereinheiten der Methylmalonyl-CoA-Decarboxylase und den Oxalacetat-Decarboxylasen. Sequenzidentität und Strukturvorhersagen für Membranproteine führten zu einem Topologiemodell der β -Untereinheit mit zwei konservierten Aspartatresten innerhalb der postulierten Membran-durchspannenden Helices.

Die auf drei Plasmiden (pJH1, pJH20 und pJH40) verteilten *mmd*-Gene wurden auf einem Plasmid in korrekter Ordnung zusammengesetzt und in *Escherichia coli* transformiert. Eine aktive Methylmalonyl-CoA-Decarboxylase wurde sowohl durch den vorhandenen *V. parvula* Promotor oberhalb des *mmdA* Gens, als auch durch den T7-Phagen Promotor exprimiert.

Um die Funktion der bisher unbekanntes ϵ -Untereinheit zu untersuchen, wurde das *mmdE* Gen durch Restriktionsendonukleasen deletiert. Die Transformation des Deletionsklons in *E. coli* führte zu einer Erhöhung der spezifischen Methylmalonyl-CoA-Decarboxylase Aktivität im Extrakt gegenüber dem Wildtyp Klon. Eine mögliche Funktion der ϵ -Untereinheit als Inhibitor wird diskutiert.

1. Summary

The genes encoding the subunits of the Na⁺-pumping membrane-bound methylmalonyl-CoA decarboxylase from *Veillonella parvula* were cloned on plasmids. Oligonucleotides derived from N-terminal amino acid sequences of the α - and γ -subunit as well as from the conserved biotinylation-site of the γ -subunit were used as specific probes. The entire DNA sequence of the methylmalonyl-CoA decarboxylase genes together with upstream and downstream regions was determined. The genes encoding subunits α (*mmdA*), δ (*mmdD*), ϵ (*mmdE*), γ (*mmdC*) and β (*mmdB*) of the decarboxylase were found clustered on the chromosome in the given order. The previously unnoted ϵ -chain (M_r 5758) was clearly shown to be a subunit of the decarboxylase by correspondence of the N-terminal amino acid sequence with that deduced from the DNA sequence of *mmdE*. The open reading frames of the α - and the biotin-containing γ -subunit were also identified by N-terminal amino acid sequencing. The δ - and the β -subunit contained blocked N-termini. Therefore, the open reading frame for the δ -subunit was verified from the sequence of a cyanogen bromide fragment, whereas that of the β -subunit could be identified by the 61% sequence identity with the β -subunits of oxaloacetate decarboxylases from *Klebsiella pneumoniae* and *Salmonella typhimurium*.

The α -subunit was 60% identical with the carboxyltransferase domain of rat liver propionyl-CoA carboxylase, and 52% identical with the 12 S subunit of the transcarboxylase of *Propionibacterium shermanii*. The biotin-containing γ -subunit was 29-39% identical with biotin-domains of other biotin enzymes. An extended stretch of mostly alanine and proline residues found on the γ -subunit could provide γ with the flexibility required for the flip-flop movement of the prosthetic biotin group between the catalytic centers of the carboxyltransferase and the lyase. The δ -subunit of methylmalonyl-CoA decarboxylase and the γ -subunit of oxaloacetate decarboxylase did not show significant sequence homology. The gross structure of both proteins, however, was similar consisting of a hydrophobic membrane anchor near the N-terminus, a proline/alanine linker, and a remarkable accumulation of charged amino acids in the C-terminal part. The sequence of the small ϵ -subunit could be aligned to the C-terminal region of the δ -subunit downstream of the proline/alanine linker. In this region the δ - and ϵ -subunits are 47% identical and may thus have evolved by gene duplication.

Of considerable interest for the mechanism of Na⁺-transport are the long stretches of complete sequence identity between the hydrophobic β -subunits of methylmalonyl-

CoA decarboxylase and oxaloacetate decarboxylases. Sequence identity and membrane protein structure predictions led to a topology model of the β -subunit with two conserved aspartic acid residues within putative membrane-spanning helices.

The *mmd*-genes distributed on three plasmids (pJH1, pJH20 and pJH40) were fused in the correct order on one single plasmid and transformed in *Escherichia coli*. An active methylmalonyl-CoA decarboxylase was expressed in the presence of the *V. parvula* promoter upstream of *mmdA* as well as from the T7 phage promoter.

To study the function of the previously unnoted ϵ -subunit, the *mmdE* gene was deleted with restriction endonucleases. The transformation of the deletion clone in *E. coli* increased the catalytic activity of the methylmalonyl-CoA decarboxylase compared with the wildtype clone. A putative function of the ϵ -subunit as an inhibitor will be discussed.