



Doctoral Thesis

Ethanol metabolism in *Acetobacter europaeus* purification, characterization and genetic analysis of the membrane-associated alcohol and aldehyde dehydrogenase complexes

Author(s):

Turner, Claudia Andrea Kathrin

Publication Date:

1997

Permanent Link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-001843321> →

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](#).

Ethanol metabolism in *Acetobacter europaeus*:
Purification, characterization and genetic analysis of the
membrane-associated alcohol and aldehyde
dehydrogenase complexes

A dissertation submitted to the
SWISS FEDERAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY (ETH) in
ZURICH

for the degree of
DOCTOR OF NATURAL SCIENCES

presented by
CLAUDIA ANDREA KATHRIN THURNER

Dipl. Natw. ETH
born November 27, 1967
citizen of Dübendorf (ZH)

Accepted on the recommendation of
Prof. Dr. M. Teuber, examiner
Prof. Dr. Th. Leisinger, co-examiner

Zürich 1997

SUMMARY

In acetic acid bacteria the acetic acid is produced from the conversion of ethanol by the membrane-associated enzyme complexes alcohol dehydrogenase (ADH) and aldehyde dehydrogenase (ALDH). *Acetobacter europaeus* is the main species in European industrial vinegar production due to its tolerance toward high acetic acid concentrations. In this thesis the genetic and proteinaceous basis of the ethanol metabolism in *Acetobacter europaeus* and also its taxonomic relationship to the metabolically closely related strain *Acetobacter "polyoxogenes"* are investigated.

The chromosomal region of *Acetobacter europaeus* comprising the genes *adhH* and *adhI* was cloned using PCR primers derived from homology studies of the alcohol dehydrogenase complex encoding genes of other acetic acid bacteria. The cloned fragments were sequenced, their sequences assembled and the putative open reading frames determined according to protein sequence alignments with other known acetic acid bacterial alcohol dehydrogenase complex encoding genes. Similarity studies suggests that *adhH* is coding for the dehydrogenase subunit and *adhI* for the cytochrome *c* subunit. Primer extension experiments allows the location of the start point of transcription just upstream of *adhH* and thereof a putative promoter region and ribosome binding site are discussed. A possible terminator is located just downstream of *adhI* suggesting an operon-organization of the two genes *adhH* and *adhI*. In order to investigate the role of the two genes, the alcohol dehydrogenase complex of *Acetobacter europaeus* was purified according to the metabolically closely related species *Acetobacter "polyoxogenes"*. The molecular weight of the two subunits and the K_m value were determined and substrate specificities were measured. The obtained N-terminal sequence of the larger subunit is found within the AdhH, indicating that *adhH* is the gene encoding the larger subunit and confirming the speculation of a leader peptide. The N-terminal sequence of AdhI could not be determined. Thus the cleavage of the postulated signal sequence remains to be shown. Both subunits are stainable for hemes, which is in good agreement with the heme C consensus sequence in the C-terminal domain of AdhH and the three heme C consensus sequences in AdhI, derived from the nucleotide sequence. Spectral analysis of the alcohol dehydrogenase complex confirms the presence of a cytochrome *c*. Based upon similarity studies with other known quinoproteins and also upon consensus sequence motifs derived from X-ray studies (Cozier *et al.*, 1995) the cofactor pyrroloquinoline quinone (PQQ) is assigned to the N-terminal part of the AdhH subunit. Structural analysis by computer modelling

suggests a superbarrel made up of eight topologically identical four-stranded antiparallel β -sheets arranged with radial symmetry for the N-terminal domain of AdhH

Principally the same procedure was carried out in order to obtain the sequences of the three genes coding for the subunits of the aldehyde dehydrogenase complex (ALDH) of *Acetobacter europaeus*, being *aldF*, *aldG* and *aldH*. Based upon similarity studies three putative open reading frames are defined, named AldF, AldG and AldH. The results of primer extension experiments allows the location of the start point of transcription just upstream of *aldF*, and a putative promoter region and ribosome binding site are suggested. A possible terminator is located just downstream of *aldH*. The operon-organization of the three genes is also shown by Northern blot hybridization experiments. The aldehyde dehydrogenase complex of *Acetobacter europaeus* was also purified and partially characterized: The molecular weights of the three subunits, the substrate specificity and the K_m -value are determined. The obtained N-terminal sequence of the largest subunit is found within the sequence of AldH, indicating that *aldH* is the gene encoding the largest subunit and confirming the speculation of a leader peptide. The N-terminal sequence of the other sequences could not be determined but a periplasmic localization is also postulated for the subunits AldF and AldG. The larger two subunits, AldF and AldH are specifically stainable for hemes. The medium-sized AldF contains three CXXCH motifs typical for heme C binding consensus sequences and shows also high similarities to other cytochromes *c*. In the largest subunit AldH no such motifs are present. Based upon spectral analysis, a heme B is assigned to this subunit. Similarity studies with various molybdopterin cofactor containing enzymes suggests the presence of a molybdopterin cytosin dinucleotide cofactor also in AldH nevertheless since recent results obtained by X-ray analysis from a similar protein stress this fact. For AldG two iron-sulfur centers are assigned based on a consensus sequence for [2Fe-2S] cluster binding in bacterial and chloroplast-type ferredoxins and on consensus sequences obtained by X-ray analysis. This fact is also confirmed by spectral analysis.

From the taxonomic point of view *Acetobacter europaeus* and *Acetobacter "polyoxogenes"* seem to be very closely related since the subunits of the alcohol- and aldehyde dehydrogenase complex encoding genes, as far as the sequences of *Acetobacter "polyoxogenes"* are already known, show a 98.8 to 100% positional amino acid identity between the respective subunits.

ZUSAMMENFASSUNG

Essigsäure wird von Essigsäurebakterien durch die beiden Membran-assoziierten Enzymkomplexe Alkohol-(ADH) und Aldehyddehydrogenase (ALDH) aus Ethanol produziert. *Acetobacter europaeus* ist die hauptsächlich in europäischer Essigherstellung vorkommende Spezies, was auf seine hohe Essigsäuretoleranz zurückzuführen ist. In dieser Arbeit wurde der Ethanolmetabolismus von *Acetobacter europaeus* auf Gen- und Proteinbasis und seine taxonomische Verwandtschaft zum metabolisch ähnlichen *Acetobacter "polyoxogenes"* untersucht.

Die beiden Gene *adhH* und *adhI*, welche in *Acetobacter europaeus* für den Alkoholdehydrogenase Komplex codieren, wurde mit Hilfe der PCR hergestellt und kloniert. Die PCR Primer wurden dabei von bereits bekannten Alkoholdehydrogenase Komplex kodierenden Genen der Essigsäurebakterien hergestellt und flankierende Fragmente aus angereicherten Genbanken und mittels Koloniehybridisierung detektiert und isoliert. Die klonierten Fragmente wurden sequenziert, ihre Sequenzen zusammengefügt und die möglichen, aufgrund von Homologievergleichen abgeleiteten, offenen Leseraster vorgeschlagen. Ähnlichkeitsstudien liessen vermuten, dass *adhH* für die in Essigsäurebakterien vorkommende Dehydrogenase Untereinheit und *adhI* für die Cytochrom *c* Untereinheit des Alkoholdehydrogenase Komplexes kodieren. Aufgrund von Primer Extensions Experimenten konnte der Transkriptionsstart oberhalb von *adhH* lokalisiert werden. Ein möglicher Promoter und eine mögliche Ribosomen Bindungsstelle sind daraufhin vorgeschlagen worden. Gerade unterhalb von *adhI* befindet sich ein möglicher Terminator, was eine Operonstruktur des *adhHI* clusters vermuten lässt. Um die Funktion der beiden Gene näher zu untersuchen, wurde der Alkoholdehydrogenase Komplex von *Acetobacter europaeus* nach dem Protokoll der metabolisch nahe verwandten Spezies *Acetobacter "polyoxogenes"* gereinigt. Das Molekulargewicht der beiden Untereinheiten, der Km-Wert und Substratspezifitäten des Alkoholdehydrogenase Komplexes wurden bestimmt. Der ansequenzierte N-Terminus der grösseren Untereinheit weist auf eine Signalsequenz hin und bestätigt zudem, dass *adhH* für die grössere Untereinheit kodiert. Der N-Terminus von AdhI konnte nicht bestimmt werden und die postulierte Signalsequenz muss deshalb noch bewiesen werden. Beide Untereinheiten sind hämspezifisch anfärbbar, was gut mit den gefundenen Häm C Konsensussequenzen in der C-terminalen Domäne von AdhH und den drei Häm C Konsensussequenzen in AdhI übereinstimmt. Spektroskopische Daten des ganzen Alkoholdehydrogenase Komplexes bestätigen das Vorhandensein eines Cytochroms *c*. Aufgrund von Ähnlichkeitsstudien mit anderen bekannten Quinoproteinen und auch aufgrund von kürzlich erhaltenen Röntgenkristallographischen

Daten eines Quinoproteins konnte der Kofaktor Pyrroloquinolin Quinon der N-terminalen Domäne der AdhH Untereinheit zugewiesen werden. Strukturanalysen mit Hilfe von Computermodellierungsprogrammen lässt auf einen "Superbarrel" mit acht jeweils aus vier antiparallelen Strängen aufgebauten β -Faltblättern mit radialer Symmetrie für den N-terminalen Teil der AdhH schliessen.

Grundsätzlich das gleiche Vorgehen wurde gewählt um die drei Gene *aldF*, *aldG* und *aldH*, welche für die drei Untereinheiten AldF, AldG und AldH des Aldehyddehydrogenase Komplexes (ALDH) von *Acetobacter europaeus* kodieren zu untersuchen. AldH zeigte dabei sehr hohe Ähnlichkeiten bezüglich der Aminosäuresequenz mit der Dehydrogenase Untereinheit von *Acetobacter "polyoxogenes"*. Mittels Primer Extensions Experimenten wurde der Transkriptionsstart oberhalb von *aldF* bestimmt und daraufhin ein möglicher Promoter und eine Ribosomenbindungsstelle vorgeschlagen. Ein möglicher Terminator befindet sich gerade unterhalb von *aldH*. Die Operonorganisation der drei Gene wurde auch durch Northernblot Hybridisierungsexperimente gezeigt. Der Aldehyddehydrogenase Komplex von *Acetobacter europaeus* wurde gereinigt und charakterisiert: Die Molekulargewichte der drei Untereinheiten, Substratspezifitäten und der Km-Wert mit Acetaldehyd als Substrat wurden bestimmt. Der ansequenzierte N-Terminus der grössten Untereinheit AldH zeigt, dass *aldH* für diese Untereinheit kodiert und bestätigte auch das Vorhandensein einer Signalsequenz. Eine periplasmatische Lokalisierung wird auch für die beiden Untereinheiten AldF und AldG postuliert. Die grösseren beiden Untereinheiten AldF und AldH waren hämspezifisch anfärbbar. Die mittlere Untereinheit AldF enthält drei typische CXXCH Motive für die Häm C Bindungsstelle und wies auch hohe Ähnlichkeiten zu anderen Cytochrom *c* auf. In der grössten Untereinheit waren keine derartigen Sequenzen vorhanden. Aufgrund von spektroskopischen Untersuchungen konnte ein HämB aber dieser Untereinheit zugewiesen werden. Mittels Ähnlichkeitsstudien verschiedener Molybdopterin enthaltenden Enzyme und auch aufgrund von kürzlich erhaltenen röntgenkristallographischen Untersuchungen von einem mit AldH sehr ähnlichen Protein wird das Vorhandensein des Kofaktors Molybdopterin Cytosin Dinukleotid mit einem Monooxo-Monosulfido Typ Zentrum in AldH vorgeschlagen. Der AldG Untereinheit konnten zwei [2Fe-2S] Kofaktoren zugewiesen werden.

Aus taxonomischer Sicht sind *Acetobacter europaeus* und *Acetobacter "polyoxogenes"* aufgrund der Sequenzen der Alkohol- und Aldehyddehydrogenase Komplex Untereinheiten äussert ähnlich, soweit das aufgrund der zur Zeit erst teilweise bestimmten Sequenzen von *Acetobacter "polyoxogenes"* geschlossen werden konnte; die positionale Aminosäureidentität beträgt 98.8 bis 100%.