



Doctoral Thesis

## **The phosphoketolase from *Bifidobacterium lactis* Biochemistry, genetics, and phylogeny**

**Author(s):**

Rohr, Lukas Martin

**Publication Date:**

2003

**Permanent Link:**

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-004630490> →

**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 no. 15285

# **The Phosphoketolase from *Bifidobacterium lactis*: Biochemistry, Genetics, and Phylogeny**

A dissertation submitted to the

**SWISS FEDERAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY ZURICH  
(ETHZ)**

for the degree of  
Doctor of Sciences

presented by

**Lukas Martin Rohr**

dipl. Lm.-Ing. ETH

born October 16, 1973

citizen of Hunzenschwil (AG)

accepted on the recommendation of  
Prof. Dr. Michael Teuber, examiner  
PD Dr. Leo Meile, co-examiner  
Dr. Fabrizio Arigoni, co-examiner

Zurich, 2003

# SUMMARY

Bifidobacteria belong to the predominant microflora of the human and animal intestine. The attribution of various health-promoting qualities to them has markedly increased the scientific and economic interest in these Gram-positive anaerobes. Besides their application as probiotic food supplements, the ability of bifidobacteria to degrade a wide range of complex carbohydrates predestines them as target organisms for prebiotic substances. The fermentation of hexoses by bifidobacteria follows a characteristic pathway known as the fructose 6-phosphate (F6P) shunt with its characteristic key enzyme fructose 6-phosphate phosphoketolase (F6PPK), which converts F6P to acetyl phosphate and erythrose 4-phosphate. Phosphoketolases splitting xylulose 5-phosphate (X5P) play a major role in heterolactic fermentation, but enzymes of both specificities have also been described in other microorganisms. Since molecular data on any phosphoketolase were lacking at the beginning of this study, the main goal was the biochemical and genetic investigation of this thiamin diphosphate (ThDP)-dependent enzyme.

A protein exhibiting F6PPK activity was purified from *Bifidobacterium lactis* to a specific activity of 4.28 U per mg of protein. Its molecular mass was estimated to 550 kDa, while the subunit size upon sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis was approximately 90 kDa, suggesting a homohexameric quarternary structure for the native protein. The enzyme was revealed to be a dual substrate D-xylulose 5-phosphate/D-fructose 6-phosphate phosphoketolase (Xfp) with apparent  $K_m$  values of 45 and 10 mM for X5P and F6P, respectively. The *xfp* gene was identified on the *B. lactis* chromosome using degenerated oligonucleotide probes deduced from the N-terminal amino acid sequence of both the native and denatured enzyme. A two-step procedure resulted in the cloning of a 4,123-bp segment of chromosomal DNA containing an open reading frame (ORF) coding for a 825-amino acid protein, of which the N terminus and the calculated size (92,529 Da) corresponded to the properties of the purified protein. On this cloned fragment, the *xfp* gene is flanked by two truncated ORFs assigned to phosphotransacetylase (Pta) and guanosine monophosphate synthetase (GuaA), respectively. Whilst all attempts to clone the *B. lactis xfp* gene in *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *freudenreichii* failed, final evidence of the enzyme to possess dual substrate phosphoketolase activity was obtained by the heterologous expression in *Escherichia coli*. The recombinant Xfp protein was found to differ from the native enzyme in respects of its heat sensitivity; moreover, the addition of the cofactor ThDP was crucial for considerable activity and medium-term storage of the recombinant enzyme.

As shown by Northern blot experiments, the *xfp* gene is transcribed in *B. lactis* as a monocistronic operon. The transcription start point was located 96 nucleotides upstream of the translation initiation codon. The F6PPK activity in crude extracts was not altered by growth of *B. lactis* cells on four different sugars, whereas it was halved upon transition from the exponential to the stationary growth phase. However, no change of the *xfp* transcript concentration could be detected simultaneously, making a regulation on that level improbable.

Gel filtration chromatography experiments with the crude extracts of twelve *Bifidobacterium* species and of *Gardnerella vaginalis* revealed a second phosphoketolase activity of approximately 160 kDa besides the 550-kDa enzyme in most samples. Further analyses supported the assumption that both proteins consist of the same monomer encoded by the *xfp* gene, whereby the hexamer is prone to decay to a dimeric protein of 160 kDa under certain conditions.

Database searches led to the identification of 63 hypothetical proteins with high similarity to the *B. lactis* Xfp amino acid sequence in the genomes of 55 different microorganisms of a broad taxonomic range, including *e.g.* representatives from the proteobacteria, cyanobacteria, and yeasts, but not from archaeal species. All of these sequences share a protein motif common for ThDP enzymes and a transketolase signature; furthermore, two new Xfp phosphoketolase consensus patterns are proposed. From the results of comparative sequence analyses, combined with the available biochemical data, it can be speculated that the Xfp protein is a microbial 'ur-protein' which is still essential within the carbohydrate catabolism of some taxons, whereas in others its gene got lost or was mutated to a pseudogene. After all, it will be a challenge to clarify the physiological significance of the phosphoketolase within the metabolism of the different species harbouring its gene.

# ZUSAMMENFASSUNG

Bifidobakterien gehören zur vorherrschenden Mikroflora des menschlichen und tierischen Intestinaltraktes. Durch die gesundheitsfördernden Eigenschaften, die ihnen zugeschrieben werden, ist das Interesse an diesen Gram-positiven Anaerobiern in letzter Zeit stark gewachsen. Neben dem Einsatz von Bifidobakterien als Probiotika wird auch versucht, diese mit prebiotischen Nahrungsmittelzusätzen gezielt zu fördern, indem ihre Fähigkeit zum Abbau einer Vielfalt komplexer Kohlenhydrate ausgenutzt wird. Die Hexosefermentation folgt bei Bifidobakterien dem für sie charakteristischen Fructose-6-Phosphat (F6P)-Weg mit der Fructose-6-Phosphat-Phosphoketolase (F6PPK) als Schlüsselenzym, welches F6P zu Acetyl-Phosphat und Erythrose-4-Phosphat umsetzt. Phosphoketolasen, welche Xylulose-5-Phosphat spalten, spielen eine entscheidende Rolle bei der heterofermentativen Milchsäuregärung; Enzyme, welche das eine, das andere oder auch beide Substrate akzeptieren, wurden aber schon in verschiedenen anderen Mikroorganismen nachgewiesen. Weil zu Beginn dieser Studie noch keinerlei molekulare Daten über Phosphoketolasen publiziert waren, war das Hauptziel die biochemische und genetische Charakterisierung dieses Thiamin-Diphosphat-abhängigen Enzyms.

Aus dem zellfreien Extrakt von *Bifidobacterium lactis* wurde ein Protein mit F6PPK-Aktivität bis zu einer spezifischen Aktivität von 4.28 U pro mg Protein aufgereinigt. Sein Molekulargewicht betrug etwa 550'000, während die Grösse einer Untereinheit mittels Natriumlaurylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese auf ungefähr 90 kDa geschätzt wurde; dies führte zum Schluss, dass das native Protein wahrscheinlich als Homohexamer vorliegt. Das Enzym zeigte eine duale Substratspezifität und wurde deshalb D-Xylulose-5-Phosphat/D-Fructose-6-Phosphat-Phosphoketolase (Xfp) genannt; es wurden  $K_m$ -Werte von 45 mM mit X5P und 10 mM mit F6P als Substrat ermittelt. Das *xfp*-Gen wurde mit Hilfe von degenerierten Oligonucleotid-Sonden, welche von der N-terminalen Aminosäuresequenz des gereinigten (nativen und denaturierten) Proteins abgeleitet wurden, auf dem Chromosom von *B. lactis* identifiziert. In zwei Schritten wurde ein 4123 bp grosses DNA-Fragment kloniert, auf welchem sich ein offenes Leseraster (ORF) befindet, das für ein Polypeptid von 825 Aminosäuren Länge codiert. Der N-Terminus sowie die aus der Sequenz berechnete Grösse (92'529 Da) stimmten mit den Eigenschaften des gereinigten Proteins überein. Das *xfp*-Gen ist auf dem klonierten Fragment von zwei abgeschnittenen ORFs flankiert, welche durch Sequenzvergleiche als wahrscheinliche Phosphotransacetylase (Pta) bzw. Guanodinmonophosphat-Synthetase (GuaA) identifiziert wurden. Während alle Versuche, das *B. lactis xfp*-Gen in *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *freudenreichii* zu klonieren, scheiterten, konnte durch die heterologe Expression in *Escherichia coli* die duale Substratspezifität des Enzyms bestätigt wer-

den. Es zeigte sich jedoch, dass sich das rekombinante Protein in seiner Hitzestabilität deutlich vom nativen unterscheidet; zudem wurde bei ersterem nur durch die Zugabe des Cofaktors ThDP eine angemessene Aktivität und Lagerfähigkeit erreicht.

Wie mit Hilfe von „Northern Blot“-Experimenten gezeigt werden konnte, liegt die *xfp*-mRNA in *B. lactis* als monocistronisches Operon vor. Der Transkriptionsstart wurde 96 Nucleotide vor dem Startcodon lokalisiert. Die F6PPK-Aktivität im Rohextrakt wurde durch das Wachstum des Bakteriums auf vier verschiedenen Zuckern nicht beeinflusst, wohingegen die Aktivität beim Übergang von der exponentiellen in die stationäre Wachstumsphase halbiert wurde. Gleichzeitig wurde jedoch keine Abnahme der *xfp*-Transkript-Konzentration festgestellt, so dass eine Regulation auf dieser Ebene unwahrscheinlich erscheint.

Anlässlich von Gelfiltrationschromatographie-Experimenten mit den Rohextrakten von zwölf *Bifidobacterium*-Arten und von *Gardnerella vaginalis* wurde in den meisten Proben neben dem beschriebenen 550-kDa-Enzym eine zweite Phosphoketolase-Aktivität gefunden, welche einem Protein von etwa 160 kDa zugeordnet werden kann. Weitere Untersuchungen führten zur Vermutung, dass es sich dabei um ein Homodimer desselben Polypeptids handelt, welches unter bestimmten Bedingungen durch Zerfall aus dem Hexamer entsteht.

Durch Vergleiche mit öffentlichen Datenbanken wurden in 55 verschiedenen Mikroorganismen einer breiten taxonomischen Herkunft insgesamt 63 hypothetische Proteine mit grosser Ähnlichkeit zur Aminosäuresequenz des Xfp-Proteins von *B. lactis* identifiziert; vertreten sind u.a. Proteobakterien, Cyanobakterien und Hefen, jedoch keine *Archaea*. Alle diese Sequenzen weisen hochkonservierte Regionen auf, darunter ist ein Transketolase-Motiv und eines, das für ThDP-abhängige Enzyme typisch ist. Des Weiteren wurden zwei neue Konsensussequenzen für Xfp-Phosphoketolasen vorgeschlagen. Aufgrund weiterer Sequenzvergleiche, kombiniert mit den publizierten biochemischen Messungen, kann die Hypothese aufgestellt werden, dass es sich bei dem Xfp-Protein um ein „Urprotein“ handeln könnte, welches in einigen Bakterien immer noch essentiell ist für den Kohlenhydratkatabolismus, dessen Gen aber in anderen Taxons verlorengegangen oder zu einem Pseudogen mutiert ist. Wie auch immer, es wird auf jeden Fall spannend sein, die physiologische Bedeutung der Phosphoketolase innerhalb des Stoffwechsels all der verschiedenen Arten zu untersuchen.