



Doctoral Thesis

Functional investigation of methanol dehydrogenase-like protein XoxF in *Methylobacterium extorquens* AM1

Author(s):

Schmidt, Sabrina

Publication Date:

2010

Permanent Link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-006212345> →

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. 19282

**Functional investigation of methanol
dehydrogenase-like protein XoxF in
Methylobacterium extorquens AM1**

A dissertation submitted to the
ETH ZURICH
for the degree of
DOCTOR OF SCIENCES

Presented by
SABRINA SCHMIDT
Diplom biologist, TU Braunschweig

Born on May 23, 1982
Citizen of Germany

Accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Julia Vorholt
Prof. Dr. Hauke Hennecke

2010

Abstract

Methylotrophic bacteria possess the ability to use reduced C₁ substrates (i.e. without carbon-carbon bonds) as sole source of carbon and energy, e.g. methanol, methane, or methylamine. Their widespread habitats encompass diverse aquatic and terrestrial ecosystems.

Methylobacterium extorquens, a well-studied representative of this group of microorganisms was chosen as an experimental model strain for the following work. The Gram-negative, facultative methylotrophic bacterium oxidizes methanol and methylamine as well as multicarbon compounds such as succinate. Among other habitats, the pink-pigmented Alphaproteobacterium colonizes plant surfaces where it benefits from methanol produced by the plant. At least three different types of enzymes are known to be involved in the microbial catalysis of the primary C₁ oxidation step from methanol to formaldehyde. The Gram-negative bacterium employs the pyrroloquinoline quinone-dependent methanol dehydrogenase (EC 1.1.99.8) for methanol conversion.

Methanol dehydrogenase-like protein XoxF of *M. extorquens* AM1 exhibits a sequence identity of 50% to the catalytic subunit MxaF of periplasmic methanol dehydrogenase in the same organism. The latter has been characterized in detail. It has been identified as a pyrroloquinoline quinone (PQQ)-dependent protein and has been shown to be essential for growth in the presence of methanol in this methylotrophic bacterium. In contrast, the function of XoxF in *M. extorquens* AM1 has not yet been elucidated, and a phenotype remained to be described for a *xoxF* mutant. Here, I found that a *xoxF* mutant is less competitive than the wild type during colonization of the phyllosphere of *Arabidopsis thaliana*, indicating a function for XoxF during plant colonization. A comparison of the growth parameters of the *M. extorquens* AM1 *xoxF* mutant and the wild type during exponential growth revealed a reduced methanol uptake rate and a reduced growth rate for the *xoxF* mutant of about 30%. Experiments with cells starved for carbon revealed that methanol oxidation in the *xoxF* mutant occurs less rapidly compared to the wild type, especially in the first minutes after methanol addition. A distinct phenotype for the *xoxF* mutant was also observed when formate and CO₂ production were measured after the addition of methanol or formaldehyde to starved cells. The wild type, but not the *xoxF* mutant, accumulated formate upon substrate addition and had a one-hour lag in CO₂ production under the experimental conditions. Determination of the kinetic properties of the purified enzyme showed a conversion capacity for both formaldehyde and methanol. The obtained data suggest that XoxF is involved in C₁ metabolism in *M. extorquens* AM1 and confers a growth advantage to this organism during plant colonization under competitive conditions.

Zusammenfassung

Methylotrophe Bakterien besitzen die Fähigkeit, reduzierte C₁-Substrate (d.h. ohne Kohlenstoff-Kohlenstoffbindungen) wie z.B. Methanol, Methan oder Methylamin als einzige Kohlenstoff- und Energiequellen zu nutzen. Ihren weitverbreiteten Habitaten gehören verschiedene aquatische und terrestrische Ökosysteme an.

Methylobacterium extorquens AM1, ein gut untersuchter Vertreter dieser Gruppe von Mikroorganismen, diente der folgenden Arbeit als experimenteller Modellorganismus. Das Gram-negative, fakultativ methylotrophe Bakterium oxidiert Methanol und Methylamin sowie Verbindungen mit mehreren Kohlenstoffatomen wie Succinat. Das rosafarbene Alphaproteobakterium besiedelt Pflanzenoberflächen, wo es von dem Methanol profitiert, das Pflanzen freisetzen. Es sind mindestens drei unterschiedliche Enzyme bekannt, die in der mikrobiellen Katalyse des primären C₁-Oxidationsschrittes von Methanol zu Formaldehyd involviert sind. Das Gram-negative Bakterium nutzt die Pyrroloquinolinquinon-abhängige Methanoldehydrogenase (EC 1.1.99.8) für die Umsetzung von Methanol.

Das Methanoldehydrogenase ähnliche Protein XoxF von *M. extorquens* AM1 weist eine 50%ige Identität zu MxaF auf, der katalytischen Untereinheit der periplasmatischen Methanoldehydrogenase im gleichen Organismus. Letztere wurde ausführlich charakterisiert, als Pyrroloquinolinquinon (PQQ)-abhängiges Protein identifiziert und erwies sich in diesem methylotrophen Bakterium als essentiell für das Wachstum in Gegenwart von Methanol. Im Gegensatz dazu wurde die Funktion von XoxF in *M. extorquens* AM1 bislang noch nicht aufgeklärt. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine *xoxF*-Mutante während der Phyllosphärenkolonisierung von *Arabidopsis thaliana* weniger konkurrenzfähig ist als der Wildtyp. Dies weist auf eine Funktion von XoxF während der Pflanzenkolonisierung hin. Ein Wachstumsparameter-Vergleich der *M. extorquens* AM1 *xoxF*-Mutante und des Wildtyps während des exponentiellen Wachstums liess eine um 30 % reduzierte Methanolaufnahme- und Wachstumsrate für die *xoxF*-Mutante erkennen. Experimente mit Kohlenstoff-hungernden Zellen ergaben, dass die Methanoloxidation in der *xoxF*-Mutante im Vergleich zum Wildtyp langsamer verläuft, insbesondere in den ersten Minuten nach der Methanolzugabe. Es wurde ein deutlicher Phänotyp für die *xoxF*-Mutante beobachtet, als die Formiat- und CO₂-Produktion nach Zugabe von Methanol und Formaldehyd zu den hungernden Zellen gemessen wurde. Der Wildtyp, aber nicht die *xoxF*-Mutante akkumulierte Formiat nach erfolgter Substratzugabe und wies unter den experimentellen Bedingungen eine einstündige Verzögerung in der CO₂-Entstehung auf. Durch die Bestimmung der

kinetischen Eigenschaften des gereinigten Enzyms konnte die Umsetzung beider Substrate, Formaldehyd und Methanol, gezeigt werden. Zusammenfassend lassen diese Ergebnisse vermuten, dass XoxF in dem C₁-Stoffwechselweg in *M. extorquens* AM1 involviert ist und diesem Bakterium unter kompetitiven Bedingungen während der Pflanzenkolonisierung einen Wachstumsvorteil verschafft.