



Doctoral Thesis

## **New insights into the mechanism of the oxaloacetate decarboxylase Na<sup>+</sup> pump of *Klebsiella pneumoniae***

**Author(s):**

Schmid, Markus

**Publication Date:**

2001

**Permanent Link:**

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-004320704> →

**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. 14491

**New insights into the mechanism of the  
oxaloacetate decarboxylase Na<sup>+</sup> pump of  
*Klebsiella pneumoniae***

A dissertation submitted to the

**SWISS FEDERAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY ZÜRICH**

for the degree of

**DOCTOR OF NATURAL SCIENCES**

presented by

**MARKUS SCHMID**

Dipl. Natw. ETH

born November 1, 1970

from Obereggen (AI)

accepted on the recommendation of

Prof. Dr. P. Dimroth, examiner

Prof. Dr. L. Thöny-Meyer, coexaminer

Zürich 2001

## ZUSAMMENFASSUNG

Im Gegensatz zu *Escherichia coli* kann *Klebsiella pneumoniae* unter anaeroben Bedingungen mit Citrat als einziger Kohlenstoff- und Energiequelle leben. Unter diesen Bedingungen werden einige spezifische Enzyme exprimiert: ein Natrium abhängiger Citrat Transporter, eine Citrat Lyase und eine Oxalacetat Decarboxylase Natriumpumpe. Das als letztes genannte Enzym nutzt die frei werdende Decarboxylierungs-Energie direkt zum Aufbau eines elektrochemischen  $\text{Na}^+$ -Gradienten. Das Enzym besteht aus drei verschiedenen Untereinheiten. Die periphere  $\alpha$ -Untereinheit mit der prostetischen Gruppe Biotin ist durch die Zink enthaltende  $\gamma$ -Untereinheit an die membrangebundene  $\beta$ -Untereinheit gebunden. Letztere ist für die Natrium-Translokation verantwortlich. Die Topologie der  $\beta$ -Untereinheit wurde mit verschiedenen, sich ergänzenden Analysemethoden bestimmt. Viele für die Ionentranslokation wichtige Aminosäurereste wurden *via* zielgerichteter Mutagenese identifiziert. Die  $\beta$ -Untereinheit katalysiert die Decarboxylierung von Carboxybiotin, welches von der Carboxyltransferase auf der  $\alpha$ -Untereinheit gebildet wird. Die Decarboxylierung ist direkt mit dem Transport von 2 Natriumionen in das Periplasma gekoppelt. Dabei wird aus dem Periplasma ein Proton verbraucht, welches die Membran in die entgegengesetzte Richtung durchquert.

Im ersten Teil dieser Arbeit wurden die Interaktion zwischen den zwei Domänen der  $\alpha$ -Untereinheit und zwischen den Domänen der  $\alpha$ -Untereinheit und der  $\gamma$ -Untereinheit untersucht. Die zwei Domänen der  $\alpha$ -Untereinheit haben keine ausgeprägte Affinität zueinander und können darum nicht mittels Avidin-Sepharose als eine Einheit gereinigt werden. Trotzdem arbeiten die zwei Domänen zusammen, indem sie den Carboxyltransfer von Oxalacetat zum Protein gebundenen Biotin katalysieren. Diese Reaktion verläuft in Anwesenheit der Zink enthaltenden  $\gamma$ -Untereinheit sechs Mal schneller. Experimente mit modifizierten Enzymen zeigten, dass die C-terminale, biotinhaltige Domäne, und nicht die N-terminale Carboxyltransferase Domäne der  $\alpha$ -Untereinheit, einen Komplex mit der  $\gamma$ -Untereinheit bildet. Die Mutante, bei der das Histidin an Stelle 78 in der  $\gamma$ -Untereinheit gegen ein Alanin ausgetauscht wurde,

verlor die Affinität zur  $\alpha$ -Untereinheit. Dies zeigte, dass diese Aminosäure für die Bildung des ganzen Oxalacetat Decarboxylase Komplexes wichtig sein könnte.

Mittels Punkt- und Deletionsmutagenese wurden die Aminosäurereste identifiziert, welche für die Bindung des Zink-Ions wichtig sind. Der Zinkgehalt der  $\gamma$ D62A und  $\gamma$ H77A Mutanten sank auf 35 % bzw. 10 % im Vergleich zum Wild-typ Enzym. Nur noch 5 % Zink des Wild-typ Enzyms wurde in der Mutante gefunden, bei der die zwei letzten Aminosäuren am C-Terminus (H82 und P83) deletiert wurden. Entsprechend dem Zinkgehalt der Mutanten waren korrelierend dazu auch die Oxalacetat Decarboxylase Aktivitäten verringert. Diese Resultate zeigten, dass das Aspartat 62, das Histidin 77 und das Histidin 82 der  $\gamma$ -Untereinheit Liganden für das katalytisch wichtige Zink sind.

Sequenzvergleiche von  $\beta$ -Untereinheiten mehrerer Mitglieder der Natriumpumpenden Decarboxylase-Familie zeigten in vielen Segmenten grosse Ähnlichkeiten. Fusionsproteine, bei denen der C-terminale Teil der  $\beta$ -Untereinheit der Oxalacetat Decarboxylase durch äquivalente Proteinfragmente anderer Natriumpumpen ersetzt wurden, konnten aber nie als vollständige Komplexe gereinigt werden. Nach Affinitätschromatographie konnte immer nur ein  $\alpha\gamma$ -Subkomplex detektiert werden. Fusionsproteine mit dem C-terminalen Teil der  $\beta$ -Untereinheit der Malonat Decarboxylase aus *M. rubra* waren für *E. coli* letal. Dies steht in Einklang mit der Tatsache, dass die ganze Malonat Decarboxylase oder auch nur deren vollständige  $\beta$ -Untereinheit aus *M. rubra* nicht in *E. coli* exprimiert werden konnte. Diese Resultate deuten darauf hin, dass der C-terminale Bereich der  $\beta$ -Untereinheit der Oxalacetat Decarboxylase für die Faltung sehr wichtig ist und dass die verwandten Enzyme nicht so ähnlich sind, dass man diesen Teil ersetzen könnte.

Zielgerichtete Mutagenese an der  $\beta$ -Untereinheit führte in früheren Studien zur Identifizierung hochkonservierter Reste, die für Bindung und Translokation von Natrium und Protonen essentiell sind. Daraus folgte auch ein Modell für den Mechanismus zur Kopplung zwischen Ionentranslokation und Oxalacetat Decarboxylierung. Sorgfältige Kinetikstudien an bereits vorhandenen Mutanten in dieser Arbeit führte zu einem tieferen Verständnis für den Mechanismus dieser Natriumpumpe und zu einem neuen, sehr durchdachten Kopplungsmechanismus für

die Natrium pumpende Carboxybiotin Decarboxylase. Asp203 in der Region IIIa und Asn373 in der Helix VIII bilden das Zentrum I, und Tyr229 auf der Helix IV und Ser382 in Helix VIII das Zentrum II. Während einem Katalysenzyklus bindet das erste Natrium Ion leicht an das Zentrum I mit einem deprotonierten Aspartat und das zweite Natrium ersetzt das Proton von Tyr229 im Zentrum II und leitet so den Decarboxylierungsschritt ein. Früher dachte man, das Ser382 werde deprotoniert. Doch auf Grund von verschiedenen Hinweisen ist es viel wahrscheinlicher, dass das Tyr229 diese Rolle übernimmt. Die Mutante S382A kann bei sehr hohen Natrium Konzentrationen Oxalacetat ziemlich schnell decarboxylieren. Dies spricht sehr stark dagegen, dass diese Aminosäure während einem Katalysenzyklus deprotoniert wird. Auf Grund der Daten dieser Arbeit denken wir, dass das Ser382 seine Hydroxylgruppe dafür braucht, das Natrium in der Bindungstasche zu koordinieren und dass das Tyr229 deprotoniert/protoniert wird und zusätzlich an der Natriumbindung beteiligt ist. Zusätzlich wurde das Arg389 als wichtiger Rest für die Decarboxylierung von Carboxybiotin identifiziert.

## SUMMARY

*Klebsiella pneumoniae* is able to grow anaerobically on citrate as sole carbon and energy source. Under these conditions it synthesizes a set of specific enzymes, i.e. a  $\text{Na}^+$  dependent citrate carrier, a citrate lyase and an oxaloacetate decarboxylase  $\text{Na}^+$  pump. The latter membrane bound enzyme utilizes the resulting free energy of decarboxylation to generate an electrochemical  $\text{Na}^+$  gradient over the membrane. The oxaloacetate decarboxylase consists of three subunits:  $\alpha$ ,  $\beta$ , and  $\gamma$ . The peripheral  $\alpha$ -subunit harboring the biotin prosthetic group is attached *via* the  $\text{Zn}^{2+}$  containing  $\gamma$ -subunit to the membrane bound  $\beta$ -subunit. The topology of the  $\beta$ -subunit has been elucidated by different methods, and amino acids important for ion translocation have been identified by site-directed mutagenesis studies. The  $\beta$ -subunit catalyzes the decarboxylation of carboxybiotin, which was formed by the carboxyltransferase reaction on the  $\alpha$ -subunit. The decarboxylation is coupled to the transport of 2  $\text{Na}^+$  ions into the periplasm, and one periplasmic proton, which crosses the membrane in the opposite direction is consumed at the cytoplasmic side in the decarboxylation event.

In this work, we probed interactions between the two domains of the  $\alpha$ -subunit and between  $\alpha$ -subunit domains and the  $\gamma$ -subunit. The two  $\alpha$ -subunit domains had no distinct affinity towards each other and could therefore not be purified as a unit on avidin-Sepharose. The two domains reacted together catalytically, however, performing the carboxyltransfer from oxaloacetate to protein-bound biotin. This reaction was enhanced up to 6-fold in the presence of the  $\text{Zn}^{2+}$  containing  $\gamma$ -subunit. Based on copurification with different tagged proteins, the C-terminal biotin domain but not the N-terminal carboxyltransferase domain of the  $\alpha$ -subunit formed a strong complex with the  $\gamma$ -subunit. Upon mutating  $\gamma\text{His78}$  to alanine the binding affinity to subunit  $\alpha$  was lost indicating that this amino acid may be essential for formation of the oxaloacetate decarboxylase enzyme complex. The binding residues for the  $\text{Zn}^{2+}$  metal ion were identified by site-directed and deletion mutagenesis. In the  $\gamma\text{D62A}$  or  $\gamma\text{H77A}$  mutant, the  $\text{Zn}^{2+}$  content of the decarboxylase decreased to 35% or 10% of the

wild-type enzyme, respectively. Less than 5% of the  $Zn^{2+}$  present in the wild-type enzyme was found if the two C-terminal  $\gamma$ -subunit residues H82 and P83 were deleted. Corresponding with the reduced  $Zn^{2+}$  contents in these mutants, the oxaloacetate decarboxylase activities were diminished. These results indicate that aspartate 62, histidine 77 and histidine 82 of the  $\gamma$ -subunit are ligands for the catalytically important  $Zn^{2+}$  metal ion.

Sequence alignments of  $\beta$ -subunits of different members of the  $Na^+$  pumping decarboxylases revealed striking similarities. Fusion proteins composed of the N-terminal part of the  $\beta$ -subunit of the oxaloacetate decarboxylase and C-termini of other decarboxylase sodium pumps could not be purified as a whole complex. After purification by monomeric avidin-Sepharose chromatography, only  $\alpha\gamma$ -subcomplexes could be detected by SDS-PAGE analysis. Chimeras containing the C-terminal domain of the  $\beta$ -subunit of *M. rubra* were lethal for *E. coli*. This is in agreement with the observation that neither the entire malonate decarboxylase nor the  $\beta$ -subunit of *M. rubra* could be synthesized in *E. coli*. These results showed the importance of the C-terminal region of the  $\beta$ -subunit of the oxaloacetate decarboxylase for intact protein folding and that this region cannot be substituted by regions from homologous proteins.

Conserved amino acids in the  $\beta$ -subunit of the oxalacetate decarboxylase that are important for binding and translocation of sodium ions and protons through the membrane have been identified. From these and other results, a model for the coupling mechanism between ion translocation and oxaloacetate decarboxylation was proposed. In this study, careful kinetic analyses with existing mutants resulted in deeper understanding of the mechanism of this sodium pump and revealed a highly sophisticated coupling mechanism for the carboxybiotin decarboxylase  $Na^+$  pump OadB. D203 in region IIIa and N373 on helix VIII are forming center I, and Y229 in helix IV and S382 in helix VIII center II. In a catalytic cycle, the first  $Na^+$  binds readily to center I with the unprotonated D203. The second  $Na^+$  easily displaces the proton from Y229 on center II and thus initiates the decarboxylation step. Previously, S382 was thought to dissociate, but in view of a number of new considerations, Y229 is the more likely candidate. The observation that the S382A enzyme is still capable

---

of decarboxylation of oxaloacetate at reasonable rates, albeit at very high  $\text{Na}^+$  concentrations, makes this residue an unlikely candidate for  $\text{H}^+$  donation. Based on the data obtained in this work, we propose that S382 is providing its hydroxyl group to coordinate  $\text{Na}^+$  in the binding pocket and that Y229 is involved in the protonation/deprotonation and the  $\text{Na}^+$  binding cycle. Additionally, R389 has been identified as an important residue for the decarboxylation of the carboxybiotin.