



Doctoral Thesis

Characterisation of naturally occurring variants of the enzyme, UDP-N-acetylglucosamine enolpyruvyltransferase and analysis of conformational changes

Author(s):

Thomas, Alison Margaret

Publication Date:

2002

Permanent Link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-004378364> →

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. 14608

Characterisation of Naturally Occurring Variants of the Enzyme, UDP-*N*-
Acetylglucosamine Enolpyruvyltransferase and Analysis of
Conformational Changes

a dissertation submitted to the
SWISS FEDERAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY ZÜRICH

for the degree of
DOCTOR of NATURAL SCIENCES

presented by

Alison M. Thomas

B.Sc. (Hons) Medical Biochemistry
University of Glasgow, Scotland
born September 10, 1976
in Edinburgh, Scotland

accepted on the recommendation of
Prof. Dr. N. Amrhein, examiner
PD Dr. P. Macheroux, co-examiner
Prof. Dr. H. Hennecke, co-examiner

Zürich, 2002

Summary

The enzyme UDP-*N*-acetylglucosamine enolpyruvyltransferase (MurA) catalyses the first committed step in peptidoglycan biosynthesis. In this reaction, the enolpyruvyl moiety from phosphoenolpyruvate (PEP) is transferred to the 3' hydroxyl group of UDP-*N*-acetylglucosamine (UDPNAG) to form the product, UDP-*N*-acetylenolpyruvylglucosamine (UDPNAG-EP) with the concomitant release of inorganic phosphate.

As shown for MurA of *En. cloacae*, MurA can form two tetrahedral intermediates with the enolpyruvyl moiety of PEP, a covalently enzyme bound form and a non-covalent form with UDPNAG. Only the non-covalently bound form is required for completion of the reaction. The covalently bound intermediate is formed by the nucleophilic attack of the thiol group of the cysteine 115 residue on the C2 of PEP. The same cysteine residue also attacks the C2 of the antibiotic fosfomycin ((1*R*,2*S*)-1,2-epoxypropylphosphonic acid) to form a covalent adduct that results in the irreversible inhibition of MurA. Mutagenesis of this highly conserved Cys115 in *E. coli* MurA has demonstrated that replacement of the cysteine with an alanine or a serine residue renders the enzyme inactive, however the replacement of the cysteine with an aspartate, and to a lesser extent glutamate, retains some activity. In nature, some pathogenic organisms e.g. *Mycobacterium tuberculosis*, *Chlamydia trachomatis* and *Borrelia burgdorferi*, have exchanged this cysteine residue for an aspartate in MurA, rendering them fosfomycin resistant. The effect of this exchange on the catalytic properties of the enzyme was investigated in MurA from *Mycobacterium tuberculosis* (*MtMurA*). Additionally, a *MtMurA* aspartate to cysteine mutant (D117C) was characterised. Both proteins are enzymatically active, albeit with a large reduction in the catalytic efficiency compared to *En. cloacae* MurA. Moreover, the K_M values for both of the substrates were found to be the same for *MtMurA* as for *En. cloacae* MurA, while those for D117CMurA were about 10-fold lower. *MtMurA* is able to maintain the same K_M values as the cysteine-containing enzymes, probably as a result of favourable interactions occurring between neighbouring amino acid residues in the active site. However, the aspartate-containing enzymes appear to have sacrificed their catalytic efficiency in exchange for fosfomycin resistance. The pH of *MtMurA* was also shifted to a slightly more acidic pH compared to the D117C mutant protein, representing the presence of the aspartate in the active site of this enzyme. The weak pH dependence of the aspartate-containing MurAs may

reflect a difference in the rate-limiting step. The role of the cysteine as both a nucleophile and a general acid may be important in maintaining catalytic efficiency. The structures of MurA in the absence and the presence of UDPNAG and fosfomycin have previously been solved. In the absence of substrates, the enzyme forms an open structure where the loop containing the reactive cysteine is solvent accessible. As a result of UDPNAG binding, a tighter more compact structure is observed with the loop forming a lid over the active site. Previous studies had implicated the residue, lysine 22, as part of the conformational switch mechanism. Analysis of lysine 22 mutant proteins have shown that fosfomycin can only bind to the K22V mutant in the presence of UDPNAG. The measurement of the change in heat capacity in the K22V mutant using isothermal titration calorimetry, demonstrated that the conformational change occurs as in the wild type MurA. The presence of a positively charged side chain at this position is required for the binding of fosfomycin and probably PEP to the active site. However, the lack of activity of the K22V mutant suggests that it also has a role in the positioning of PEP in the correct steric conformation.

Zusammenfassung

Das Enzym UDP-*N*-acetylglucosamin enolpyruvyl Transferase (MurA) katalysiert den ersten Reaktionsschritt in der Biosynthese des Zellwandbestandteils Peptidoglykan (auch Murein genannt). Die Reaktion beinhaltet die Übertragung des Enolpyruvyl-Bausteins von Phosphoenolpyruvat (PEP) auf die 3'-Hydroxylgruppe von UDP-*N*-acetylglucosamin (UDPNAG), wobei UDP-*N*-acetylenolpyruvylglucosamin (UDPNAG-EP) und anorganisches Phosphat gebildet werden.

Mechanistische Untersuchungen erbrachten Hinweise für das Auftreten zweier unterschiedlicher Reaktionsintermediate: ein kovalent und ein nicht-kovalent gebundenes. Das kovalent-gebundene Intermediat entsteht beim nucleophilen Angriff der Thiolgruppe der Aminosäure Cystein 115 auf das C-2 Atom von PEP während das nicht-kovalente Intermediat durch den nucleophilen Angriff der 3'-Hydroxylgruppe von UDPNAG auf eben dieses Kohlenstoffatom des PEP gebildet wird. Dieses nicht-kovalent gebundene Intermediat befindet sich auf dem katalytischen Reaktionsweg zu den Produkten. MurA wird irreversibel durch das Antibiotikum Fosfomycin ((1*R*, 2*S*)-1,2-Epoxypropylphosphonsäure) gehemmt. Diese Hemmung kommt durch den nucleophilen Angriff der Thiolgruppe von Cystein 115 auf den Epoxid-Ring zustande. Durch Austausch dieses hochkonservierten Cysteins mittels ortsspezifischer Mutagenese konnte gezeigt werden, dass ein Serin bzw. Alanin in dieser Position zu einer vollständigen Inaktivierung des Enzyms führt. Andererseits führte ein Austausch mit den Aminosäuren Asparagin- oder Glutaminsäure zu einer Erhaltung der enzymatischen Aktivität. Interessanterweise kommt in einigen pathogenen Bakterien, wie z. B. *Mycobacterium tuberculosis*, *Chlamydia trachomatis* und *Borrelia burgdorferi*, anstelle des Cysteins eine Asparaginsäure vor. Dieser natürlich auftretende Aminosäureaustausch konserviert die Aktivität des Enzyms und bedingt gleichzeitig eine Resistenz gegenüber dem Antibiotikum Fosfomycin. In der vorliegenden Arbeit wurde die Fosfomycin-resistente MurA von *M. tuberculosis* heterolog in *Escherichia coli* exprimiert und aus Rohextrakten gereinigt. Dieses Wildtyp Protein wurde hinsichtlich seiner enzymatischen Eigenschaften charakterisiert. Anschliessend wurde die Asparaginsäure gegen Cystein ausgetauscht und das mutierte Protein hinsichtlich seiner katalytischen Eigenschaften mit dem zuvor charakterisierten Wildtyp Protein verglichen. Es zeigte sich, dass der Austausch der Asparaginsäure mit Cystein zu einer Hemmung durch Fosfomycin führt. Sowohl das Wildtyp Protein als auch die Mutante

(Asparaginsäure zu Cystein) zeigten enzymatische Aktivität, die allerdings im Vergleich zu MurA aus *Enterobacter cloacae* sehr gering ist. Andererseits zeigte sich, dass die Michaelis-Menten Parameter für beide Substrate im Falle der Wildtyp MurA aus *M. tuberculosis* vergleichbar sind mit denjenigen, die für das Enzym aus *En. cloacae* (besitzt ein Cystein in der korrespondierenden Position) bestimmt wurden. Die D117C Mutante zeigte demgegenüber eine ca. 10-fache Verringerung der K_M -Werte für beide Substrate. Das pH-Optimum von Wildtyp MurA ist im Vergleich zur Asparaginsäure zu Cystein-Mutante leicht zu einem niedrigeren pH-Wert verschoben. Diese Verschiebung kann durch den unterschiedlichen pK_a -Wert der Carboxylgruppe im Vergleich zur Thiolgruppe verstanden werden.

Die dreidimensionale Struktur von MurA (aus *E. coli* und *En. cloacae*) konnte sowohl in einer freien Form als auch im Komplex mit UDPNAG und Fosfomycin mittels Röntgenstrukturanalyse gelöst werden. In Abwesenheit von Liganden liegt das Protein in einer "offenen" Konformation vor und das oben erwähnte reaktive Cystein befindet sich in einer dem Lösungsmittel zugänglichen Schleife. In Anwesenheit von UDPNAG befindet sich das Protein in einer "geschlossenen" Konformation, in der sich diese Schleife über das Aktivzentrum legt und dieses damit für Lösungsmittel unzugänglich werden lässt. Frühere Untersuchungen ergaben Hinweise darauf, dass die Aminosäure Lysin 22 massgeblich an dieser Konformationsänderung beteiligt ist. Eine weiterführende Charakterisierung von Proteinen, die in Position 22 entweder ein Arginin, eine Glutaminsäure oder ein Valin trugen, haben diese Hypothese nicht bestätigen können. Mikrokolorimetrische und massenspektrometrische Untersuchungen zeigten jedoch, dass eine positiv geladene Seitenkette in Position 22 essentiell für die Bindung von Fosfomycin ist.