

Diss. ETH No. 15274

**Structural and functional investigations on the  
oxaloacetate decarboxylase 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 Wild**

Dipl. Microbiol. University of Zürich

born May 21, 1973

from Zürich (ZH) and Mitlödi (GL)

accepted on the recommendation of

Prof. Dr. P. Dimroth, examiner

Prof. Dr. H. Hilbi, coexaminer

Zürich 2003

## Zusammenfassung

*Klebsiella pneumoniae* kann im anaeroben Milieu auf Citrat als einziger Kohlenstoff- und Energiequelle wachsen. Unter diesen Bedingungen werden einige spezifische Enzyme exprimiert: ein Natrium-abhängiger Citrat Transporter, eine Citrat Lyase und die Natriumpumpe Oxalacetat Decarboxylase. Das als letztes genannte Enzym nutzt die frei werdende Decarboxylierungs-Energie direkt zum Aufbau eines elektrochemischen  $\text{Na}^+$ -Gradienten. Die Oxalacetat Decarboxylase besteht aus den drei Untereinheiten  $\alpha$ ,  $\beta$  und  $\gamma$ . Die periphere  $\alpha$ -Untereinheit besteht aus zwei Domänen, einer N-terminalen Domäne mit Carboxyltransferaseaktivität und einer C-terminalen Biotin-bindenden Domäne, welche mit einem flexiblen Prolin/Alanin-Linker verbunden sind. Die  $\beta$ -Untereinheit bildet den grössten, in der Membran liegenden Teil des Enzymkomplexes. Sie faltet in einen N-terminalen Bereich aus drei Transmembranhelices und einen C-terminalen Bereich aus sechs Transmembranhelices. Das verbindende Fragment dieser zwei Bereiche besteht aus zwei Schleifen, welche von der periplasmatischen Seite her in die Membran inserieren, die cytoplasmatische Seite jedoch nicht erreichen. Die  $\gamma$ -Untereinheit ist über eine einzelne N-terminale  $\alpha$ -Helix in der Membran verankert. Dieser Helix folgen auf der cytoplasmatischen Seite ein Prolin/Alanin-Linker und eine kurze hydrophile Domäne, welche ein Zinkion bindet. Die  $\gamma$ -Untereinheit bindet dieses Zinkion mit  $\gamma\text{Asp62}$ ,  $\gamma\text{His77}$ ,  $\gamma\text{His82}$  und einem Wassermolekül als Liganden. Die periphere  $\alpha$ -Untereinheit ist über die  $\gamma$ -Untereinheit an die membrangebundene  $\beta$ -Untereinheit gebunden. Die  $\gamma$ -Untereinheit bildet einen stabilen Komplex mit der C-terminalen Biotin-bindenden Domäne der  $\alpha$ -Untereinheit. Die Aminosäure  $\gamma\text{His78}$  ist essentiell für diese Interaktion. Der katalytische Zyklus startet mit dem Transfer der Carboxylgruppe von Oxalacetat auf die prosthetische Biotin Gruppe. Die  $\gamma$ -Untereinheit beschleunigt diesen Carboxyltransfer, wahrscheinlich weil das Carbonyl-Sauerstoffatom von Oxalacetat durch das Zinkion polarisiert wird. Das Carboxybiotin bewegt sich, ermöglicht durch den flexiblen Prolin/Alanin-Linker, von der Stelle des

Carboxyltransfers auf der  $\alpha$ -Untereinheit zur Stelle der Decarboxylierung auf der  $\beta$ -Untereinheit. 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. Viele für die Ionentranslokation wichtige Aminosäuren wurden via zielgerichteter Mutagenese identifiziert. Transmembran Helix VIII und das Segment IIIa der  $\beta$ -Untereinheit sind die konserviertesten Regionen. Funktionell wichtige Reste sind  $\beta$ D203 (region IIIa),  $\beta$ Y229 (helix IV),  $\beta$ N373,  $\beta$ G377,  $\beta$ S382 und  $\beta$ R389 (helix VIII), von welchen man annimmt, dass sie in die  $\text{Na}^+$ - und  $\text{H}^+$ -Translokation über die Membran involviert sind.

In dieser Arbeit wurde die funktionell wichtige Helix VIII einer Cystein Scanning Mutagenese in einem cysteinfreien  $\beta$ -Untereinheit Hintergrund unterworfen. Das Zugänglichkeitsmuster, welches mit geladenen Methanthiosulfonat Reagentien von der periplasmatischen Seite von der Helix VIII erhalten wurde, zeigte eine Periodizität, welche eine  $\alpha$ -helicale Struktur in dieser Region vermuten lässt. Eine Wasserzugängliche Seite, welche die Reste  $\beta$ N373,  $\beta$ G377,  $\beta$ S382,  $\beta$ M386 und  $\beta$ V390 beinhaltet, könnte ein Bestandteil des  $\text{Na}^+$  Kanals sein. Cysteinreste, welche in dem cytoplasmatisch orientierten Teil der Helix VIII eingeführt wurden, waren für verschiedene wasserlösliche Methanthiosulfonat Reagentien zugänglich. Man nimmt deshalb an, dass diese Reste auf dieser Seite der Membran gegenüber dem Wasser exponiert sind. Die unterschiedlichen Resultate der Zugänglichkeit gegenüber verschiedenen Methanthiosulfonat Verbindungen, welche in An- oder Abwesenheit von  $\text{Na}^+$ -Ionen erhalten wurden, lassen eine durch die Bindung von  $\text{Na}^+$  induzierte Konformationsänderung in dieser Region vermuten. Die  $\beta$ R389C Mutante hatte eine reduzierte Aktivität und ein pH Optimum bei pH 9. Nach einer chemischen Modifizierung mit 2-Aminoethyl Methanthiosulfonat, konnte das pH Optimum vom Wild Typ von 6.5 wiederhergestellt werden und die Aktivität um 400 % gesteigert werden.

Das traditionelle Reinigungsprotokoll für die Oxalacetat Decarboxylase beinhaltet eine Avidin Sepharose Chromatographie und liefert eine aktive Spezies, bei welcher aber ein spezifischer Aktivitätsverlust von 80 % innerhalb von 24 Stunden beobachtet wurde,

wenn das Enzym bei 4 °C gelagert wurde. In dieser Arbeit wurden neue Reinigungsprotokolle entwickelt, mit welchen eine stabile Oxalacetat Decarboxylase hergestellt werden konnte. Stabile Spezies wurden erhalten, wenn der Enzymkomplex in Thesit, gemischten Mizellen (Decylmaltosid / Lauryldimethylaminoxid) oder in 1, 2-Diheptanoyl-sn-Glycero-3-Phosphocholine gereinigt wurde. Oxalacetat Decarboxylase, welche mittels einer Fractogel Trimethylaminoethyl Säule (ein starker basischer Anionentauscher) gereinigt wurde, war stabiler im Vergleich zu Oxalacetat Decarboxylase, welche mittels einer monomeren Avidin Sepharose Säule gereinigt wurde. Eine Erklärung für dieses unterschiedliche Verhalten könnte sein, dass die Interaktion zwischen dem Enzymkomplex und diesem Fractogel Trimethylaminoethyl Material schonender ist als die Interaktion von Avidin mit dem biotinyliertem Protein. Zusätzlich könnte es sein, dass funktionell wichtige Lipide am Enzym gebunden bleiben. Gelfiltrationsanalysen zeigten, dass die Bildung von verschiedenen aktiven und inaktiven oligomeren Formen der Oxalacetat Decarboxylase vom verwendeten Detergenz abhängig war. Diese Erkenntnisse wurden verwendet, um nach Kristallisationsbedingungen für die gereinigte Oxalacetat Decarboxylase zu suchen. Unter den getesteten Bedingungen wurden jedoch keine Kristalle der Oxalacetat Decarboxylase erhalten. Ein Problem könnte die Flexibilität dieses Enzymkomplexes sein, welche durch die zwei Prolin/Alanin Linker in der  $\alpha$ - und  $\gamma$ - Untereinheit zustande kommt und somit die Bildung von Kristallen verhindert. Ein anderes Problem war der proteolytische Abbau des Holoenzym. Ein drittes Problem war die Instabilität der oligomeren Formen der Oxalacetat Decarboxylase. Diese Oligomere waren 2-3 Tage stabil, zerfielen danach aber zu kleineren Spezies. Die Suche nach Kristallisationsbedingungen brachte Kristalle von einem noch nicht identifizierten Protein hervor, welches eine Masse von 19446 Da hat. Diese Kristalle mit den Einheitszellen-Parametern  $a = 119.1$ ,  $b = 208.4$ ,  $c = 213.5 \text{ \AA}$ ,  $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$  streuten Röntgenstrahlen bis  $4.2 \text{ \AA}$  und gehören zur orthorhombischen P2 oder P2 (1) Raumgruppe.

## SUMMARY

*Klebsiella pneumoniae* is able to grow anaerobically on citrate as sole carbon and energy source. Under these conditions it synthesises a set of specific enzymes, i.e. a Na<sup>+</sup>-dependent citrate carrier, a citrate lyase and an oxaloacetate decarboxylase Na<sup>+</sup> pump. The latter membrane-bound enzyme utilises the resulting free energy of decarboxylation to generate an electrochemical Na<sup>+</sup> gradient over the membrane. The oxaloacetate decarboxylase consists of three subunits  $\alpha$ ,  $\beta$ , and  $\gamma$ . The peripheral  $\alpha$ -subunit consists of two domains, the N-terminal carboxyltransferase domain and the C-terminal biotin-binding domain, which are connected by a flexible proline/alanine linker. The  $\beta$ -subunit comprises the main membrane integral portion of the enzyme complex. It folds into an N-terminal block of three membrane-spanning  $\alpha$ -helices and a C-terminal block of six membrane-spanning  $\alpha$ -helices. The connecting fragment consists of two loops that insert from the periplasm into the membrane, but do not reach the cytoplasmic surface. The  $\gamma$ -subunit is anchored in the membrane with a single N-terminal  $\alpha$ -helix. This is followed on the cytoplasmic surface by a proline/alanine linker and a short hydrophilic domain that binds Zn<sup>2+</sup>. The  $\gamma$ -subunit binds the Zn<sup>2+</sup> ion, with  $\gamma$ Asp62,  $\gamma$ His77,  $\gamma$ His82, and a H<sub>2</sub>O molecule as ligands. The peripheral  $\alpha$ -subunit is attached *via* the  $\gamma$ -subunit to the membrane-bound  $\beta$ -subunit. The  $\gamma$ -subunit forms a strong complex with the C-terminal biotin-binding domain of the  $\alpha$ -subunit. An essential amino acid for this interaction is the  $\gamma$ His78. The catalytic reaction cycle starts with the carboxyl transfer from oxaloacetate to the prosthetic biotin group. The  $\gamma$ -subunit accelerates the carboxyltransfer reaction, presumably by polarizing the carbonyl oxygen bond of oxaloacetate with its Zn<sup>2+</sup> ion. Facilitated by the flexible proline/alanine linker, the carboxybiotin switches from the carboxyl transfer site at the  $\alpha$ -subunit to the decarboxylase site at the  $\beta$ -subunit. The decarboxylation is coupled to the transport of 2 Na<sup>+</sup> 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. Amino acids important for ion translocation have been identified by site-directed mutagenesis studies. The most

conserved regions of the  $\beta$ -subunit are region IIIa and transmembrane helix VIII. Functionally important residues are  $\beta$ D203 (region IIIa),  $\beta$ Y229 (helix IV),  $\beta$ N373,  $\beta$ G377,  $\beta$ S382 and  $\beta$ R389 (helix VIII), which are believed to be involved in the  $\text{Na}^+$ - and  $\text{H}^+$ -translocation through the membrane.

In this work, the functionally important helix VIII was subjected to cysteine scanning mutagenesis in a Cys-less  $\beta$ -subunit background. The pattern of accessibility of charged methanethiosulfonate reagents from the periplasmic side of helix VIII shows a periodicity which suggests that this region is  $\alpha$ -helical. A water-accessible face comprising  $\beta$ N373,  $\beta$ G377,  $\beta$ S382,  $\beta$ M386 and  $\beta$ V390 may be part of a  $\text{Na}^+$  channel. Cys residues introduced in the cytoplasmically oriented part of helix VIII were accessible to different water-soluble methanethiosulfonate reagents and therefore believed to be exposed to water on this side of the membrane. The distinct results on accessibility towards the different methanethiosulfonate compounds obtained in the presence or absence of  $\text{Na}^+$  ions may suggest a conformational change upon binding of  $\text{Na}^+$  in this region. The  $\beta$ R389C mutant had a reduced activity and a pH optimum at pH 9, which could be restored to wild-type pH optimum of 6.5 and to a 400 % gain in activity upon chemical modification with 2-aminoethyl methanethiosulfonate.

The traditional oxaloacetate decarboxylase purification protocol involves avidin sepharose chromatography and yields an active species, but a loss of 80 % of the specific activity is detected within 24 h of storage at 4 °C. In this work, we developed new purification protocols yielding a stable oxaloacetate decarboxylase. Stable species were obtained when the enzyme complex was purified in Thesit, in mixed micelles (decylmaltoside / lauryldimethylamine oxide) or in 1, 2-diheptanoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine. Oxaloacetate decarboxylase which was purified over a Fractogel trimethylaminoethyl column, a strong basic anion exchanger, was more stable compared to oxaloacetate decarboxylase which was purified over a monomeric avidin column. One explanation for the maintenance of the stability might be that the interaction between the enzyme complex and this Fractogel trimethylaminoethyl material is milder than the interaction with avidin and the biotinylated protein. Moreover, functionally important

---

lipids could remain bound to the enzyme. Gelfiltration analysis revealed that the formation of the different active or inactive oligomeric forms of the oxaloacetate decarboxylase was dependent on the detergent used. These insights were used as a starting point for extensive crystallization setups with the purified oxaloacetate decarboxylase. However, no crystals of the oxaloacetate decarboxylase were observed, probably for various reasons. One is the flexibility of the whole enzyme complex, notably the two proline/alanine linkers located in the  $\alpha$ - and  $\gamma$ -subunits, which might prevent crystal formation. Another problem was proteolytic degradation of the holoenzyme yielding degradation products. A third problem was the instability of the oligomeric forms of the oxaloacetate decarboxylase. Oligomers were stable for 2 to 3 days, but then degradation to a smaller sized species occurred. Nevertheless, the crystallization screening yielded crystals of a yet unidentified protein, with a mass of 19446 Da. These crystals with unit-cell parameters  $a = 119.1$ ,  $b = 208.4$ ,  $c = 213.5$  Å,  $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$ , diffracted X-rays to a resolution of 4.2 Å and belong to the orthorhombic P2 or P2 (1) space group.