



## Doctoral Thesis

# **Taking advantage of the catalytic promiscuity of isochorismate pyruvate lyase from *Pseudomonas aeruginosa*: Mechanistic studies and evolution into an efficient chorismate mutase**

**Author(s):**

Künzler, Dominik Eugen

**Publication Date:**

2006

**Permanent Link:**

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-005205536> →

**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. 16453

**Taking advantage of the Catalytic Promiscuity of  
Isochorismate Pyruvate Lyase from *Pseudomonas  
aeruginosa*: Mechanistic Studies and Evolution into  
an Efficient Chorismate Mutase**

A dissertation submitted to the

SWISS FEDERAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY ZURICH

For the degree of  
Doctor of Natural Sciences

Presented by

Dominik Eugen Künzler

Dipl. Natw. ETH  
born September 7, 1975  
citizen of  
St. Margrethen SG

Accepted on the recommendation of  
Prof. Dr. Donald Hilvert, examiner  
Dr. Peter Kast, co-examiner  
Prof. Dr. Dieter Haas, co-examiner

Zürich, 2006

## Abstract

The PchB protein from the opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa* catalyzes the conversion of isochorismate into salicylate and pyruvate. This reaction is the committed step in the biosynthesis of salicylate-based siderophores in several pathogenic bacteria. PchB mainly works as an isochorismate pyruvate lyase (IPL), but it also exhibits modest chorismate mutase (CM) activity. PchB was investigated by homology modeling and directed evolution. Assuming that both reactions are catalyzed by the same active site, a model was built for PchB based on the solved x-ray structure of EcCM, the homologous AroQ<sub>p</sub> domain of the bifunctional chorismate mutase-prephenate dehydratase from *Escherichia coli*. To obtain insights into the reaction mechanism of the IPL activity, critical active site residues (Arg54, Glu90, Gln91) were varied by targeted random mutagenesis using long degenerate oligonucleotides. The gene libraries were introduced into an *in vivo* selection system for CM activity and subjected to selection for growth on minimal media. Arg 54 was fully conserved in active variants, in agreement with the role the homologous residue plays in the structure of the *E. coli* enzyme. The observation that position 90 was tolerant to substitution but position 91 was essentially confined to Gln or Glu in functional variants rules out involvement of Glu90 in general base catalysis. Counter to the generally accepted mechanistic hypothesis for pyruvate lyases, we propose for PchB a rare [1,5]-sigmatropic reaction mechanism that invokes electrostatic catalysis in analogy to the [3,3]-pericyclic rearrangement of chorismate in CMs.

To characterize the IPL activity of the selected PchB variants a new on-line IPL activity assay was developed. Using this assay, the covariance of the catalytic parameters for the CM and IPL activities in PchB mutants (including a shared functional requirement for a protonated Glu91 in the Q91E variant) was established, supporting the notion of a common catalytic principle of both PchB functions. To facilitate access to the substrate needed in the IPL assay, the microbial production of isochorismate was optimized and adapted to the harmless class I organism *E. coli* KA12. The uncatalyzed degradation of isochorismate was investigated, and  $k_{\text{uncat}}$  for the uncatalyzed decomposition of isochorismate was determined.

To distinguish between several mechanistic alternatives for the IPL activity of PchB, isochorismate selectively deuterated at the C2 position was employed. Chemically labeled [6,6-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]shikimate was enzymatically converted to [2-<sup>2</sup>H]isochorismate by incubation with

cell extracts of the engineered *E. coli* strain KA12/pKAD50/pKS3-02. The  $^2\text{H}$  kinetic isotope effects on  $k_{\text{cat}}$  and on  $k_{\text{cat}}/K_m$  were  $2.34 \pm 0.08$  and  $1.75 \pm 0.18$ , respectively. These values are in accord with a [1,5]-pericyclic reaction mechanism. To determine the fate of the deuterium in  $2\text{-}^2\text{H}$ -labeled isochorismate the PchB-catalyzed reaction was followed directly by  $^2\text{H}$ -NMR spectroscopy to completion. It was shown that PchB transfers the deuterium quantitatively to pyruvate, making a [1,5]-pericyclic reaction mechanism very plausible.

The weak CM activity and the roughly 20% sequence identity to AroQ class CMs, with particular conservation of active site residues, suggest that PchB had evolved from a CM precursor, which developed IPL activity while losing most of its CM activity. Using our *in vivo* selection system for CM activity we successfully evolved PchB back into a catalyst with a CM activity typical for wild-type (WT) CMs. This was achieved by targeted random mutagenesis of 7 active site residues, which are distinct in PchB and EcCM, coupled to increasingly stringent selection pressure. After two consecutive rounds of randomization and selection, a PchB variant showing a 43-fold increased CM activity compared to WT PchB could be isolated. In fact, this variant's CM activity has a  $k_{\text{cat}}/K_m$  within a factor of 2-3 of EcCM, but the mutant has nearly no IPL activity. PchB variants with CM activities above the WT PchB level showed a high conservation of glutamic acid at position 55 and a low IPL activity.

Since the CM and IPL reactions in PchB share the same active site and a similar mechanism, we screened representative members of AroQ class CMs for IPL activity. Of the CMs investigated, only the exported CM of *Mycobacterium tuberculosis* (\*MtCM) exhibited a very low (five times over background), but significant IPL activity. By comparing the predicted catalytic residues of \*MtCM and PchB with the relevant active site residues of other AroQ class CMs a valine was found to be present at position 55 of PchB and the corresponding position in \*MtCM only, but not in the other CMs. Therefore, it can be speculated that a valine at position 55 seems to permit IPL activity, while a glutamic acid at position 55 (the residue generally conserved in the AroQ class proteins) seems to be essential for high CM activity.

Additionally, efforts were made to verify and improve an *in vivo* selection system for IPL activity based on the *E. coli* strain XL1-Blue that was described in the diploma thesis of D. Heer. The system is based on the induction of antibiotic resistance-providing genes by the salicylate-dependent activator NahR. Only enzymes with IPL activity should provide the

salicylate needed for gene activation and thus enable growth on selective plates. Unfortunately, discrimination between active and inactive mutants was not achieved with this system, although a facilitated screening strategy could be established. In the modified system, the expression of the gene coding for the green fluorescent protein (GFP) is controlled by the NahR activator, and thus dependent on salicylate. It was shown that switching on the *pchB* gene led to a two-fold enhancement of fluorescence compared to a suspension of uninduced cells. Thus, it appears possible to set up a high-throughput screening system based on intracellular IPL activity. Such a system would allow the evolution of enzymes with both high IPL and CM activity.

## Zusammenfassung

Das PchB Protein aus dem opportunistischen Pathogen *Pseudomonas aeruginosa* katalysiert die Umwandlung von Isochorismat zu Salicylat und Pyruvat. Diese Reaktion ist in mehreren pathogenen Bakterien der entscheidende Schritt in der Biosynthese von Siderophoren, welche auf Salicylat beruhen. PchB erfüllt seine Funktion hauptsächlich als eine Isochorismat-Pyruvat-Lyase (IPL), aber es zeigt auch eine bescheidene Chorismat-Mutase (CM) Aktivität. PchB wurde durch Homologie-Modellierung und gerichtete Evolution erforscht. Unter der Annahme, dass beide Reaktionen durch die gleiche aktive Tasche katalysiert werden, wurde ein Modell für PchB erstellt, welches auf der gelösten Röntgen-Struktur von EcCM, der homologen AroQ<sub>p</sub> Domäne der bifunktionellen Chorismat-Mutase/Prephenat-Dehydratase aus *Escherichia coli*, beruht. Um Erkenntnisse über den Reaktionsmechanismus der IPL Aktivität zu erhalten, wurden potentiell wichtige Reste der aktiven Tasche (Arg54, Glu90, Gln91) durch gerichtete zufällige Mutagenisierung unter der Verwendung von langen degenerierten Oligonukleotiden verändert. Die Genbanken wurden in ein *in vivo* Selektionssystem für CM Aktivität eingebracht und einer Selektion für Wachstum auf Minimalmedium unterzogen. Arg54 war in aktiven Varianten vollständig konserviert, in Übereinstimmung mit der Rolle, welche der homologe Rest in der Struktur des Enzyms von *E. coli* spielt. Die Beobachtung, dass Position 90 gegenüber Ersetzungen tolerant war, Position 91 hingegen in funktionellen Varianten auf Gln oder Glu beschränkt war, schliesst eine Beteiligung von Glu90 an einer generellen Basenkatalyse aus. Entgegen der allgemein akzeptierten mechanistischen Hypothese für Pyruvat-Lyasen, schlagen wir für PchB einen aussergewöhnlichen [1,5]-sigmatropen Reaktionsmechanismus vor, welcher eine elektrostatische Katalyse in Analogie zur [3,3]-perizyklischen Umlagerung von Chorismat in CMs mit einbezieht.

Um die IPL Aktivität von selektionierten PchB Varianten zu charakterisieren, wurde ein neuer on-line IPL Aktivitätstest entwickelt. Unter der Verwendung dieses Tests wurde die Kovarianz der katalytischen Parameter für die CM und die IPL Aktivitäten von PchB Mutanten (einschliesslich der gemeinsamen funktionellen Notwendigkeit eines protonierten Glu91 in der Q91E Variante) gezeigt. Dies unterstützt die Hypothese eines gemeinsamen katalytischen Prinzips beider Funktionen von PchB. Um den Zugang zu dem für den IPL Test benötigten Substrat zu erleichtern, wurde die mikrobielle Produktion von Isochorismat optimiert und an den harmlosen Klasse 1 Organismus *E. coli* KA12 angepasst. Die

unkatalysierten Umwandlungen von Isochorismat wurden untersucht, und  $k_{\text{uncat}}$  für den unkatalysierten Abbau von Isochorismat wurde bestimmt.

Um zwischen mehreren mechanistischen Alternativen für die IPL Aktivität von PchB zu unterscheiden, wurde Isochorismat, welches selektiv an der C2 Position deuteriert war, verwendet. Chemisch markiertes [6,6- $^2\text{H}_2$ ]Schikimat wurde enzymatisch durch Inkubation mit Zellextrakten aus dem konstruierten *E. coli* Stamm KA12/pKAD50/pKS3-02 zu [2- $^2\text{H}$ ]Isochorismat umgesetzt. Die  $^2\text{H}$  kinetischen Isotopen Effekte betragen für  $k_{\text{cat}}$   $2.34 \pm 0.08$  und für  $k_{\text{cat}}/K_m$   $1.75 \pm 0.18$ . Diese Werte stimmen gut mit einem [1,5]-perizyklischen Reaktionsmechanismus überein. Um das Schicksal des Deuteriums im 2- $^2\text{H}$ -markierten Isochorismat zu ergründen, wurde die PchB-katalysierte Reaktion direkt mittels  $^2\text{H}$ -NMR Spektroskopie bis zur vollständigen Umsetzung verfolgt. Es wurde gezeigt, dass PchB das Deuterium quantitativ zu Pyruvat transferiert und somit ein [1,5]-perizyklischer Mechanismus sehr plausibel ist.

Die schwache CM Aktivität und die ungefähr 20%-ige Sequenzübereinstimmung mit CMs der AroQ Klasse, mit besonderer Konservierung der Reste in der aktiven Tasche, deuten darauf hin, dass PchB im Laufe der Evolution aus einem CM-Vorläufer entstand, welcher IPL Aktivität entwickelte, während der Grossteil der CM Aktivität verloren ging. Unter der Verwendung unseres *in vivo* Selektionssystems für CM Aktivität gelang uns die erfolgreiche (Rück-) Evolution von PchB in einen Katalysator mit einer CM Aktivität, welche für Wildtyp (WT) CMs typisch ist. Dies wurde durch gerichtete zufällige Mutagenese von 7 Resten der aktiven Tasche erreicht, welche in PchB und EcCM unterschiedlich sind, gekoppelt mit zunehmend strengere Selektionsdruck. Nach zwei aufeinander folgenden Zyklen von Randomisierung und Selektion konnte eine PchB Variante isoliert werden, welche eine 43-fach erhöhte CM Aktivität verglichen mit WT PchB aufwies. Tatsächlich zeigt die CM Aktivität dieser Variante einen  $k_{\text{cat}}/K_m$ , der innerhalb eines Faktors von 2 bis 3 des Wertes von EcCM liegt, jedoch hat diese Variante die IPL Aktivität fast ganz verloren. PchB Varianten mit CM Aktivitäten über dem Niveau von WT PchB zeigten eine starke Konservierung von Glutaminsäure an Position 55 und eine tiefe IPL Aktivität.

Nachdem die CM und IPL Reaktionen in PchB sich die gleiche aktive Tasche und einen ähnlichen Mechanismus teilen, haben wir repräsentative Mitglieder der AroQ Klasse CMs auf IPL Aktivität untersucht. Von den getesteten CMs zeigte nur die exportierte CM von *Mycobacterium tuberculosis* (\*MtCM) eine zwar tiefe (fünffach schneller als die

Hintergrundreaktion), aber signifikante IPL Aktivität. Durch Vergleich der vorhergesagten katalytischen Reste von \*MtCM und PchB mit den relevanten Resten in den aktiven Taschen von anderen AroQ Klasse CMs, wurde herausgefunden, dass ein Valin an der Position 55 nur in PchB und an der entsprechenden Stelle in \*MtCM existiert, aber nicht in anderen CMs. Deshalb kann vermutet werden, dass ein Valin an Position 55 IPL Aktivität zu ermöglichen scheint, wohingegen eine Glutaminsäure (der Rest, welcher allgemein in AroQ Klasse Proteinen konserviert ist) entscheidend für hohe CM Aktivität zu sein scheint.

Es wurde ausserdem versucht, ein *in vivo* Selektionssystem für IPL Aktivität, basierend auf dem *E. coli* Stamm XL1-Blue, zu erstellen. Dazu wurde die ursprüngliche Version des Systems, welche in der Diplomarbeit von D. Heer beschrieben worden ist, überprüft und erweitert. Das System basiert auf der Induktion von Antibiotikaresistenz-vermittelnden Genen durch den Salicylat-abhängigen Aktivator NahR. Nur Enzyme mit IPL Aktivität sollten das Salicylat zur Verfügung stellen können, welches zur Gen-Aktivierung benötigt wird und somit das Wachstum auf selektiven Platten ermöglichen. Leider war es mit diesem System bisher nicht möglich, zwischen aktiven und inaktiven Mutanten zu unterscheiden, aber eine Strategie zum vereinfachten Sortieren konnte erarbeitet werden. In diesem modifizierten System wird die Expression des Genes, welches für das „Green Fluorescent Protein“ (GFP) kodiert, durch den NahR Aktivator kontrolliert und ist daher von Salicylat abhängig. Es wurde gezeigt, dass die Aktivierung des *pchB* Gens zu einer Verdoppelung der Fluoreszenz im Vergleich zu einer Suspension von nicht induzierten Zellen führt. Aufgrund dieses Resultats scheint es möglich, ein Sortiersystem mit hohem Durchsatz basierend auf intrazellulärer IPL Aktivität aufzustellen. Ein solches System würde die Evolution von Proteinen sowohl mit hoher IPL, als auch CM Aktivität ermöglichen.