

The Exported Chorismate Mutase from Bacterial Pathogens of Mammals: From Residues Important for Protein Export to the Quest for the Biological Function

Doctoral Thesis

Author(s):

Mailand, Susanne

Publication date:

2018

Permanent link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-b-000260924>

Rights / license:

[In Copyright - Non-Commercial Use Permitted](#)

DISS. ETH NO. 24881

**The Exported Chorismate Mutase from
Bacterial Pathogens of Mammals:
From Residues Important for Protein Export
to the Quest for the Biological Function**

A thesis submitted to attain the degree of

DOCTOR OF SCIENCES of ETH ZURICH

(Dr. sc. ETH Zurich)

presented by

SUSANNE MAILAND

MSc Biology, ETH Zurich

born on 05.07.1984

citizen of Germany

accepted on the recommendation of

Prof. Peter Kast, examiner

Prof. Wolf-Dietrich Hardt, co-examiner

Prof. Bernd Bodenmiller, co-examiner

2018

Summary

Protein export in bacteria is the translocation of proteins out of the cytoplasm. The majority of proteins destined for export are equipped with an N-terminal leader peptide to be recognized by the transport machinery. Protein export can be exploited for the industrial production of biomolecules with bacteria as the production strains, simplifying downstream purification processes. Moreover, many exported proteins act as virulence factors to help pathogenic bacteria to invade and persist in the host. Therefore, deciphering factors important for the bacterial protein export mechanism is crucial both for the optimization of biotechnological production as well as the definition of new targets for antibiotic treatment.

Here, we used the exported chorismate mutase (*CM) from a pathogenic bacterium as a test case to study protein export. Chorismate mutase (CM) is an enzyme from the intracellular shikimate pathway converting chorismate to prephenate and leading to the synthesis of the aromatic amino acids L-tyrosine and L-phenylalanine. The shikimate pathway is ubiquitous in bacteria, fungi, and plants, but absent in mammals.

CMs of the AroQ class are α -helical and can be divided into four subclasses from AroQ $_{\alpha}$ to AroQ $_{\delta}$. The *CMs studied in this work belong to the AroQ $_{\gamma}$ subclass enzymes, which possess an N-terminal leader peptide. Their role in the extracytoplasmic space is not known. However, they occur in many pathogenic bacteria, like *Mycobacterium tuberculosis*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, but are absent, for example, in *Escherichia coli*. In contrast, AroQ $_{\alpha}$, AroQ $_{\beta}$, and AroQ $_{\delta}$ are intracellular and essential housekeeping CMs.

Directed evolution approaches targeting intracellular CMs in bacteria were previously established. On media without Tyr and Phe only cells possessing a functional intracellular CM are able to grow. We applied this directed evolution system to study protein export in bacteria by using the AroQ $_{\gamma}$ subclass CM of *S. Typhimurium* (*StCM) as a model. The enzyme without the leader peptide can complement an intracellular CM deficiency of a Tyr and Phe auxotrophic *E. coli* strain whereas the

wild-type *StCM containing its leader peptide is not able to do so. Therefore, we could actively select for export-defective variants upon subjecting the full-length protein to directed evolution. We directly identified sequence patterns in the hydrophobic core region of the heterologous bacterial leader peptide that are detrimental for efficient export in *E. coli*. The discovered amino acid changes, which drastically hampered the export of the enzyme from the cytoplasm, where substitutions from hydrophobic into charged residues, with high occurrence of Leu to His (L9H) and Met to Lys (M14K) exchanges. These results are in agreement with earlier findings that the hydrophobic core of a leader peptide is the most crucial region required for successful export. They also prove the suitability of our *CM model system to study protein export using directed evolution.

Additionally, we were interested to find residues in the mature portion of the protein that affect efficient export despite the presence of a functional leader peptide. So far, we discovered residues which, upon mutation, strongly hamper protein export. Possible functions of the discovered residues in inter- and intramolecular interactions important for export are discussed. Additional experiments are required to confirm these findings and explain the underlying mechanisms, including testing a broader range of bacterial *CMs to allow for generalized conclusions about efficient protein export.

Since the shikimate pathway takes place intracellularly, the role of a CM outside of the cytoplasm is puzzling. We confirmed that *CMs are very active enzymes. However, outside of the cytoplasm there seems to be no source of chorismate nor use for prephenate. For several phytopathogenic organisms it has been shown that the exported chorismate mutase is involved in their virulence and important for host invasion. We have previously reported that also in pathogenic bacteria of mammals the AroQ_y enzyme might act as a virulence factor, even though their hosts do not produce or metabolize chorismate. Here, we addressed the elucidation of the natural function of *CMs and investigated their influence on the phenotype of pathogenic bacteria of animals. For this we focused on two pathogenic bacteria, *S. Typhimurium* and *P. aeruginosa*.

The pathogen *S. Typhimurium* inhabits the gut of its host, which can lead to inflammation of the intestine resulting in severe diarrheal disease. We explored whether *StCM is required under nutrient-limiting conditions or whether it could be involved in resistance to growth-inhibiting agents using a previously established set of *aroQ_γ* *S. Typhimurium* strains, including an *aroQ_γ* knock-out, a complemented knock-out, and the wild-type strain. Together with the company Biolog Inc. we performed a high-throughput approach to test nutrient usage and sensitivity to chemicals by measuring metabolic activity under different growth conditions. Differences in the metabolic activity of the three *aroQ_γ* *S. Typhimurium* strains were assessed through pairwise comparison. Under nutrient-limiting conditions, no significant difference in metabolic activity was observed comparing the three strains. However, some antimicrobial conditions did reveal differences, prompting further investigations to clearly establish whether *CM confers a significant advantage for the pathogen.

Additionally, we sought to reveal the nature of the signals that induce *aroQ_γ* gene expression. We could show that deployment of *CMs occurs in response to environmental signals that indicate host interactions. An *S. Typhimurium* reporter strain with a transcriptional fusion of *lacZ* to the *aroQ_γ* gene has been constructed previously and it has been shown that a low Mg^{2+} concentration led to 30-fold increase of *aroQ_γ* promoter activity. Since low Mg^{2+} concentration mimics an environment in a host cell, we were looking for other host-specific factors sensed by *S. Typhimurium* during the infection process. During host colonization, *S. Typhimurium* has to overcome the harsh conditions of the intestinal tract. We found that the addition of bile salts to the growth medium enhances *aroQ_γ* promoter activity about 3-fold, while an increase of 100-fold was observed if combined with low Mg^{2+} concentration. However, we could demonstrate in a growth experiment that the enzyme does not seem to be involved in conferring resistance of the organism to bile salts. It is therefore still unclear how the enzyme is needed in the intestine of a host. Potential involvements in signaling cascades are discussed.

Bacteria possess tightly regulated signaling mechanisms recognizing environmental cues leading to the expression of required virulence factors to successfully

adapt to and persevere in a host environment. This is typically not established by a single bacterium alone but rather by a group, which communicates *via* chemical signals to establish group behaviors (e.g. biofilm formation), ultimately resulting in a response, such as virulence. We hypothesized that the *CM might be involved in such interactions either with the environment or with other bacteria from the community. Therefore, another model organism, *P. aeruginosa*, was considered. This opportunistic pathogen has the ability to invade a broad range of habitats including organs of mammals. When colonizing the lungs of cystic fibrosis patients deadly infections can result. This species has already been thoroughly used to study bacterial group behaviors, including biofilm formation and swarming.

Two *P. aeruginosa* mutants were acquired from a transposon mutant library containing insertions in the *aroQ_γ* gene. Biofilm and swarming behaviors were tested, comparing the mutants to the wild-type parental strain. Under biofilm-promoting conditions, the wild type showed increased biofilm formation whereas the *aroQ_γ* mutants did not increase their biofilm mass. Furthermore, on a semi-solid surface the *aroQ_γ* mutants exhibited a strong swarming phenotype compared to the more weakly swarming wild type. This is compatible with the notion that biofilm formation and swarming ability are oppositely regulated. In fact, the differential phenotypes of the mutants and the wild type suggest an involvement of *aroQ_γ* in the regulatory mechanism controlling swarming and biofilm production. Future experiments will involve genetic complementation of the phenotypes to establish this hypothesis further.

In conclusion, amino acid residues important for protein export were discovered in this work employing directed evolution. Besides exploiting the *CM to investigate protein export, the natural function of this group of exported enzyme was studied. Using the pathogenic bacteria *S. Typhimurium* and *P. aeruginosa* as model organisms and comparing wild type and *aroQ_γ* mutants in a variety of experiments, our results suggest that *CMs are important under specific environmental conditions and that they might trigger particular phenotypes upon recognition of environmental cues. Further experiments are proposed to elucidate the biological role of *CMs in pathogens of mammals.

Zusammenfassung

Die Translokation von Proteinen aus dem Cytoplasma heraus wird Proteinexport genannt. Die meisten Proteine, die für den Export bestimmt sind, besitzen ein N-terminales Signalpeptid, das von den Transportapparaten erkannt wird. Proteinexport wird bei der industriellen Herstellung von Biomolekülen mit Bakterien als Produktionsstämme genutzt, wodurch die anschließende Proteinaufreinigung vereinfacht wird. Ausserdem exportieren viele pathogene Bakterien Proteine, die als Virulenzfaktoren fungieren und den Bakterien beim Eindringen und Überleben im Wirtsorganismus helfen. Somit ist das Verständnis über Faktoren, die für den bakteriellen Exportvorgang wichtig sind von Bedeutung für das Optimieren biotechnologischer Produktionsprozesse, sowie auch für die Bestimmung von Angriffspunkten neuer antimikrobieller Wirkstoffe.

In der vorliegenden Arbeit wurde die exportierte Chorismat-Mutase (*CM) aus einem pathogenen Bakterium verwendet um den Proteinexport zu erforschen. Die Chorismat-Mutase (CM) ist ein Enzym aus dem intrazellulären Shikimat-Biosyntheseweg, wobei Chorismat zu Prephenat umwandelt wird, was dann zur Synthese der aromatischen Aminosäuren L-Phenylalanin und L-Tyrosin führt. Der Shikimat-Weg ist in allen Bakterien, Pilzen und Pflanzen zu finden, jedoch nicht in Säugetieren.

Die CMs aus der AroQ-Klasse bestehen aus α -helicalen Strukturen und können in vier Subklassen, AroQ $_{\alpha}$ bis AroQ $_{\delta}$, unterteilt werden. Die vorliegende Arbeit untersucht die *CMs aus der AroQ $_{\gamma}$ -Subklasse, welche eine N-terminale Signalsequenz besitzen. Welche Rolle die *CMs ausserhalb des Cytoplasmas spielen, ist unbekannt. Jedoch findet man sie in verschiedenen pathogenen Bakterien, wie z.B. *Mycobacterium tuberculosis*, *Pseudomonas aeruginosa* und *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, aber nicht in *Escherichia coli*. Im Gegensatz dazu sind die CMs der Subklassen AroQ $_{\alpha}$, AroQ $_{\beta}$ und AroQ $_{\delta}$ intrazelluläre und essentielle CMs.

Gerichtete Evolutionsstrategien, die intrazelluläre bakterielle CMs als Ziel verfolgen, wurden bereits früher etabliert. Auf Medien ohne Tyr und Phe wachsen nur

die Zellen, die eine funktionstüchtige intrazelluläre CM besitzen. Wir haben das System der gerichteten Evolution angewendet, um den Proteinexport in Bakterien zu untersuchen, indem wir die AroQ_Y-CM von *S. Typhimurium* (*StCM) als Modellprotein verwendet haben. Das Enzym ohne Signalsequenz kann ein intrazelluläres CM-Defizit eines Tyr- und Phe-auxotrophen *E. coli* Stammes komplementieren, wohingegen die Wildtyp-*StCM mit Signalsequenz dies nicht vermag. Somit konnten wir unter Anwendung von gerichteter Evolution aktive Selektion von Export-defekten Varianten der Proteine mit kompletter Länge betreiben. Wir konnten so direkt Sequenzmuster im hydrophoben Kern der heterologen bakteriellen Signalsequenz identifizieren, die für einen effizienten Protein-Export in *E. coli* hinderlich sind. Die gefundenen Aminosäuresubstitutionen, welche den Export des Enzyms aus dem Cytoplasma drastisch behinderten, waren Austausch von hydrophoben gegen geladene Reste, wobei Leu zu His (L9H) und Met zu Lys (M14K) am häufigsten auftraten. Dieses Resultat steht im Einklang mit früheren Forschungsergebnissen, die aufzeigen, dass der hydrophobe Kern der Signalsequenz die kritischste Region für einen erfolgreichen Export ist. Demnach konnten wir zeigen, dass das *CM-Modell für die Erforschung des Proteinexports unter Verwendung von gerichteter Evolution geeignet ist.

Ausserdem wollten wir Reste im maturen Teil des Proteins finden, welche die Effektivität des Exports trotz einer funktionalen Signalsequenz negativ beeinflussen. Bislang haben wir einige mutierte Reste gefunden, die den Proteinexport stark hemmen. Mögliche Funktionen der entdeckten Reste in inter- und intramolekularen Interaktionen, die für den Export wichtig sind, wurden diskutiert. Um diese Befunde zu bestätigen und die zugrundeliegenden Mechanismen zu erklären, sind weitere Experimente nötig, beispielsweise unter Einbezug von weiteren bakteriellen *CMs, um die Schlussfolgerungen über effizienten Proteinexport verallgemeinern zu können.

Die Rolle einer CM ausserhalb des Cytoplasmas ist verwirrend, da der Shikimat-Weg nur intrazellulär vorliegt. Wir konnten bestätigen, dass *CMs sehr aktive Enzyme sind. Jedoch scheint sich ausserhalb des Cytoplasmas keine Quelle für Chorismat und auch keine Verwendung für Prephenat zu befinden. Für einige phytopathogene

Organismen konnte gezeigt werden, dass die exportierte Chorismat-Mutase einen Beitrag zur Virulenz leistet und für die Infektion des Wirtes wichtig ist. Vor einiger Zeit haben wir berichtet, dass auch in pathogenen Bakterien von Säugetieren das *AroQ_γ* Enzym als Virulenzfaktor fungieren könnte, obwohl deren Wirte Chorismat weder produzieren noch im Stoffwechsel umwandeln. In der vorliegenden Arbeit wollten wir die natürliche Funktion der *CMs aufklären und deren Einfluss auf den Phänotyp von pathogenen Bakterien von Tieren untersuchen. Dazu haben wir uns auf die zwei pathogenen Bakterien *S. Typhimurium* und *P. aeruginosa* konzentriert.

Der Krankheitserreger *S. Typhimurium* bewohnt den Verdauungstrakt des Wirtes, was zu Entzündungen und folgenschweren, durchfallähnlichen Krankheiten führen kann. Unter Verwendung eines früher konstruierten Satzes von *aroQ_γ* *S. Typhimurium* Stämmen, einschliesslich eines *aroQ_γ* Knock-Outs, eines komplementierten Knock-Outs und des Wildtyp-Stammes, haben wir erforscht, ob die *StCM bei Nahrungsmangel oder zum Widerstand gegen antimikrobielle Substanzen erforderlich ist. Zusammen mit der Firma Biolog wurde ein Hochdurchsatz-Experiment durchgeführt, wobei verschiedene Wachstumssubstrate und die Empfindlichkeit gegenüber Chemikalien untersucht wurde, indem die Stoffwechselaktivität unter verschiedenen Wachstumsbedingungen gemessen wurde. Unterschiede in der Stoffwechselaktivität der drei *aroQ_γ* *S. Typhimurium* Stämme wurden durch paarweisen Vergleich bestimmt. Unter Nahrungsmangel wurden beim Vergleich keine nennenswerten Unterschiede in der Stoffwechselaktivität beobachtet. Einige antimikrobielle Bedingungen haben aber Unterschiede gezeigt, welche nun weitere Untersuchungen erfordern, um nachzuweisen, dass die *CM einen klaren Vorteil für den Krankheitserreger verschafft.

Zusätzlich wollten wir wissen, welche Signale die Expression des *aroQ_γ*-Gens induzieren. Wir konnten zeigen, dass der Einsatz von *CMs als Antwort auf Signale aus der Umwelt auf Interaktionen mit einem Wirt hinweisen. Ein *S. Typhimurium* Reporter Stamm wurde vorgängig konstruiert und es konnte nachgewiesen werden, dass eine niedrige Konzentration von Mg^{2+} zu einem dreissigfachen Anstieg der *aroQ_γ* Promotor-Aktivität führt. Da niedrige Mg^{2+} Konzentrationen die Umgebung in einer

Wirtszelle simulieren, haben wir nach weiteren wirtsspezifischen Faktoren gesucht, welche von *S. Typhimurium* während des Infektionsprozesses wahrgenommen werden. Während der Kolonisierung des Wirtes muss *S. Typhimurium* die harschen Bedingungen im Verdauungstrakt überstehen. Wir haben gefunden, dass die Zugabe von Gallensalzen zum Wachstumsmedium die Aktivität des *aroQ_γ* Promotors verdreifacht, während in Kombination mit niedriger Mg²⁺ Konzentration der Faktor sogar auf 100 ansteigt. Mit einem Wachstumsexperiment konnten wir nachweisen, dass das Enzym wahrscheinlich nicht zur Resistenz des Bakteriums gegen Gallensalze beiträgt. Deshalb ist es immer noch nicht klar, wofür das Enzym im Verdauungstrakt des Wirtes benötigt wird. Als mögliche Funktion wird ein Mitwirken in Signalwegen diskutiert.

Bakterien besitzen einen streng geregelten Signalübertragungsmechanismus, der zur Erkennung von Umweltsignalen dient, was zur Ausbildung von Virulenzfaktoren, sowie zur Anpassung und Überlebensfähigkeit in der Wirtsumgebung führt. Dies wird häufig nicht durch ein einzelnes Bakterium erreicht, sondern durch eine Gruppe, deren Mitglieder über chemische Signale kommunizieren, um ein Gruppenverhalten einzustellen (z.B. Bildung eines Biofilmes), was auch zu erhöhter Virulenz führen kann. Wir vermuten, dass die *CM ebenfalls in derartige Wechselwirkungen zwischen Umwelt und anderen Bakterien involviert sein könnte. Dazu haben wir *P. aeruginosa*, einen weiteren Modellorganismus, zur Untersuchung herangezogen. Dieser opportunistische Erreger besitzt die Fähigkeit, in eine breite Palette von Umgebungen einschliesslich der Organe von Säugetieren einzudringen, wo er z.B. in Patienten mit zystischer Fibrose tödliche Infektionen auslösen kann. *P. aeruginosa* wurde bereits ausgiebig verwendet, um das Verhalten von Bakteriengruppen einschliesslich Schwarm- und Biofilmeigenschaften zu untersuchen.

Um den Einfluss von *AroQ_γ* auf das Gruppenverhalten zu testen, wurden zwei *P. aeruginosa aroQ_γ* Mutanten aus einer Transposon-Mutantenbibliothek erworben und mit dem Wildtyp-Verhalten verglichen. Unter Biofilm-begünstigenden Bedingungen zeigte der Wildtyp erhöhte Biofilmproduktion, während die Mutanten wenig Biofilmmasse produzierten. Hingegen wiesen die Mutanten in einem Schwarmtest auf

halbester Oberfläche einen Hyperschwarm-Phänotyp auf verglichen mit dem schwachen Schwarmverhalten des Wildtyps. Dies passt gut zur Auffassung, dass Biofilmproduktion und Schwarmverhalten gegensätzlich reguliert sind. Tatsächlich deutet der unterschiedliche Phänotyp von Mutanten und Wildtyp darauf hin, dass *aroQ_γ* in regulatorische Mechanismen involviert sein könnte, die das Schwarmverhalten und die Biofilmproduktion kontrollieren. Zukünftige Experimente werden die genetische Komplementierung des Phänotyps beinhalten, um diese Hypothese zu verifizieren.

Schlussfolgernd wurden in dieser Arbeit unter Anwendung von gerichteter Evolution Aminosäure-Reste gefunden, die für den Proteinexport wichtig sind. Nebst der Verwendung der *CM um Proteinexport zu untersuchen, wurde auch die natürliche Funktion dieser Gruppe exportierter Enzyme erforscht. *S. Typhimurium* und *P. aeruginosa* dienten als Modellorganismen, wobei in einer Vielzahl von Experimenten jeweils der Wildtyp mit *aroQ_γ* Mutanten verglichen wurde. Unsere Resultate deuten darauf hin, dass *CMs unter spezifischen Umweltbedingungen wichtig sind, und dass sie Umweltfaktoren erkennen, worauf sie die Ausbildung bestimmter Phänotypen auslösen könnten. Um die biologische Rolle der *CMs pathogener Bakterien von Säugetieren detaillierter aufzuklären, werden weitere Experimente vorgeschlagen.