

Diss. ETH Nr. 14035

Thermodynamic and Mutational Analysis of Substrate and
Fosfomycin Binding to UDP-*N*-Acetylglucosamine Enolpyruvyl
Transferase from *Enterobacter cloacae*

a dissertation submitted to the
SWISS FERDERAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY ZÜRICH

for the degree of
DOCTOR of NATURAL SCIENCES

presented by

Anne K. Samland

Diplom-Biochemikerin
Ruhr-Universität Bochum, Germany
born December 4, 1972
in Karlsruhe, Germany

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

Zürich, 2001

This thesis is published in part in:

Biochemistry **38**, 13162-13169 (1999)

Biochemistry **39**, 12671-12677 (2000)

Biochemistry **40**, 1550-1559 (2001)

Zusammenfassung

Das Enzym UDP-*N*-Acetylglucosamin Enolpyruvyltransferase (MurA) katalysiert den Transfer des Enolpyruvylrestes von Phosphoenolpyruvat (PEP) auf die 3'-Hydroxylgruppe von UDP-*N*-Acetylglucosamin (UDPNAG). Dies ist der erste Schritt zur Synthese des Peptidoglykans, eines wichtigen Bestandteils der bakteriellen Zellwand. Anhand veröffentlichter Kristallstrukturen wurden drei Reste (K22, N23 und D305) ausgewählt und ihre Funktion hinsichtlich der Bindung der Substrate oder des Antibiotikums Fosfomycin, sowie der Katalyse untersucht. Die Aminosäuren wurden mit Hilfe zielgerichteter Mutagenese ausgetauscht und die bis zur Homogenität gereinigten Proteine wurden mit einer Reihe von biophysikalischen Methoden charakterisiert. Dies beinhaltete spektroskopische Methoden (UV/Vis und Fluoreszenz), isotherme Titrationskalorimetrie, chromatografische Methoden und massenspektroskopische Untersuchungen (MALDI-TOF).

Es konnte gezeigt werden, dass die Substratbindung an MurA einem geordneten Mechanismus folgt, wobei UDPNAG bevorzugt als erstes Substrat bindet. Bindungsstudien zeigten allerdings, dass prinzipiell beide Substrate unabhängig voneinander an das freie Enzym binden können. Mit dem Binden von UDPNAG werden eine Reihe von Reaktionen im aktiven Zentrum ausgelöst. D305 spielt eine wichtige Rolle beim Binden von UDPNAG und ist auch für die Deprotonierung der 3'-Hydroxylgruppe von UDPNAG verantwortlich. Unterstützt wird es in diesen Funktionen von N23, das aber vor allem als Sensor für die Anwesenheit von UDPNAG dient. Wenn UDPNAG gebunden ist, führt es zusammen mit einer Reihe weiterer Aminosäurereste, die alle durch ein Netzwerk aus Wasserstoffbrücken miteinander verbunden sind, zur Konformationsänderung. N23 interagiert direkt mit K22, das auch mit der Phosphatgruppe von PEP eine Wasserstoffbrücke ausbildet. Es konnte gezeigt werden, dass K22 nicht an der Bindung der Substrate beteiligt ist, aber an der Ausbildung des *O*-Phosphothioketals von PEP und des kovalenten Addukts von Fosfomycin mit C115. Diese werden bevorzugt gebildet, wenn in der Anwesenheit von UDPNAG die Konformationsänderung von der offenen zur geschlossenen Konformation vollzogen wird.

Mikrokalorimetrische Untersuchungen mit MurA (Wildtyp) und den Liganden UDPNAG und Fosfomycin konnten zeigen, dass die Bindung von UDPNAG mit der

VII

Konformationsänderung von der offenen zur geschlossenen Konformation einhergeht. Bei der Ausbildung des ternären Komplexes zwischen MurA, UDPNAG und Fosfomycin kommt es zusätzlich zum Erstarren vibratorischer Freiheitsgrade.

Weitere Untersuchungen zur Funktion der Seitenkette von C115 zeigten, dass UDPNAG nicht die Reaktivität dieses katalytisch wichtigen Cysteins durch eine Verschiebung des pK_a Wertes beeinflusst. Vielmehr wird durch die Konformationsänderung eine höher affine Bindungsstelle für PEP bzw. Fosfomycin geschaffen, die auch das entstehende *O*-Phosphothioketal besser stabilisieren kann. Mit einem pK_a Wert von 8,3 (experimentell ermittelt von Krekel und veröffentlicht in einer gemeinsamen Publikation: *Biochemistry* 39, 12671-12677 (2000)) fungiert C115 als generelle Säure im aktiven Zentrum.

Summary

The enzyme UDP-*N*-acetylglucosamine enolpyruvyl transferase (MurA) catalyzes the transfer of the enolpyruvyl moiety from phosphoenolpyruvate (PEP) to the 3'-hydroxyl group of UDP-*N*-acetylglucosamine (UDPNAG). This is the first committed step in the biosynthesis of peptidoglycan, a major component of the bacterial cell wall. Based on 3D structures available for the protein, we selected three residues K22, N23 and D305, to study their role in substrate and fosfomycin (inhibitor) binding as well as in catalysis. Using site-directed mutagenesis the amino acids were replaced, the mutant proteins were purified to homogeneity and characterized by several biophysical methods. Spectroscopic methods (UV/Vis and fluorescence), isothermal titration calorimetry, chromatographic techniques and MALDI-TOF mass spectroscopy were used for activity tests and binding assays.

It was shown that MurA follows a compulsory order mechanism with UDPNAG binding before PEP, although both substrates are able to bind to free MurA. The binding of UDPNAG starts a chain of events with the following sequence: D305 is important for the binding of UDPNAG and the deprotonation of the 3'-hydroxyl group of the sugar nucleotide. It is assisted in these functions by N23. More importantly, N23 is the sensor for the presence of UDPNAG. Through a hydrogen bond network it finally leads to the closed conformation of the enzyme. The next component of this network is K22 which interacts with N23 and the phosphate group of PEP. It was demonstrated that K22 is not involved in the initial binding of either substrate. However, it is important for the formation of the *O*-phosphothioketal of PEP covalently linked to C115 and the covalent adduct with fosfomycin which is preferentially formed with the conformational change upon UDPNAG binding as a prerequisite.

Microcalorimetric studies with wild-type MurA and the ligands UDPNAG and fosfomycin revealed that binding of UDPNAG is associated with the conformational change from the open to the closed conformation. The formation of the ternary complex of MurA, UDPNAG and fosfomycin leads to a tighter complex by additional loss of vibrational modes.

Further studies on the function of the side chain of C115 revealed that UDPNAG does not influence the reactivity of this catalytically important cysteine by lowering its pK_a value, as might have been expected from its postulated function as a proton donor

IX

during catalysis, but rather leads to a conformational change resulting in a binding site for PEP or fosfomycin with higher affinity and which is able to stabilize the *O*-phosphothioketal reaction intermediate of PEP. With a pK_a value of 8.3 (experimentally determined by Krekel and reported in a joint publication: *Biochemistry* 39, 12671-12677 (2000)) it serves as a general acid in the active site.