

Universität Potsdam, Institut für Biochemie und Biologie  
Proteinanalytik  
Arbeitsgruppe Prof. Dr. Silke Leimkühler

---

**Charakterisierung der Funktion der Rhodanese  
YnjE für die Molybdänkofaktor Biosynthese in  
*Escherichia coli***

**Dissertation  
zur Erlangung des akademischen Grades  
„*doctor rerum naturalium*“  
(Dr. rer.nat.)  
in der Wissenschaftsdisziplin „Biologie“**

**eingereicht an der  
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Universität Potsdam**

**von  
Alexander Urban  
geboren am 07.12.1979  
in Weißenfels**

**Potsdam, den 23.09.2008**

Online veröffentlicht auf dem  
Publikationsserver der Universität Potsdam:  
<http://opus.kobv.de/ubp/volltexte/2009/2901/>  
[urn:nbn:de:kobv:517-opus-29018](http://nbn-resolving.org/urn:nbn:de:kobv:517-opus-29018)  
[<http://nbn-resolving.org/urn:nbn:de:kobv:517-opus-29018>]

## **Vorveröffentlichungen der Dissertation**

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung des Institutes für Biochemie und Biologie, vertreten durch die Mentorin der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

### **Tagungsbeiträge:**

Alexander Urban, Andrea Freuer, Janet Donahue, Manfred Nimtz, Tim Larson, and Silke Leimkühler; „Identification of the sulfur donor for the formation of the dithiolene group of the molybdenum cofactor in *E. coli*.“

GBM (Gesellschaft für Biochemie und Molekularbiologie)-Tagung, 18.09.-21.09.2005 in Berlin.

Workshop “Molecular Interactions”, 03.04.-05.04.2006 in Berlin.

ISMSM (International Symposium of Microbial Sulfur Metabolism) in Münster, Juli 2006

„2nd Symposium of Iron-Sulfur-Cluster Proteins“ in Villard de Lans, Frankreich, Juli 2007

### **Publikation:**

Alexander Urban, Andrea Freuer, Janet Donahue, Manfred Nimtz, Tim Larson, and Silke Leimkühler; “The three domain Rhodanese-like protein YnjE is involved in the sulfurtransfer for the formation of the dithiolene group of the molybdenum cofactor in *Escherichia coli*”. (in Bearbeitung)



---

## Inhaltsverzeichnis

### 1. Einleitung

1.1	Schwefel in Biologischen Systemen	1
1.1.1	Mobilisierung des Schwefels durch Cysteindesulfurasen	2
1.1.2	Rhodanesen und Rhodanese-ähnliche Proteine im Schwefelmetabolismus	3
1.2	Der Molybdänkofaktor	4
1.2.1	Die Molybdänkofaktor-Biosynthese	6
1.2.2	Der Schwefeltransfer im zweiten Schritt der Moco-Biosynthese	8
1.2.3	Potentielle Sulfurtransfurasen der MPT-Synthese <i>E. coli</i> s	11
1.3	Ziele dieser Arbeit	14

### 2. Material und Methoden

2.1	Verwendete Medien, Puffer und Lösungen	15
2.2	Molekularbiologische Methoden	15
2.2.1	Amplifikation von DNA-Fragmenten	15
2.2.2	Restriktion von DNA und Ligation von DNA-Fragmenten	15
2.2.3	Präparation von Plasmiden und Gelfragmenten	16
2.2.4	Anzucht von <i>E. coli</i> Kulturen	16
2.2.5	Herstellung von <i>E. coli</i> -Dauerkulturen	16
2.2.6	Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen	16
2.2.7	Transformation von <i>E. coli</i>	17
2.2.8	Verifizierung der DNA-Konstrukte	17
2.2.9	Verwendete Oligonukleotide	17
2.2.10	Verwendete Plasmide	18

---

2.2.11	Verwendete Bakterienstämme:	19
2.3	Proteinbiochemische Methoden	20
2.3.1	Expression und Aufreinigung rekombinanter Proteine in <i>E. coli</i>	20
2.3.2	Konzentrierung von Proteinlösungen	20
2.3.3	Bestimmung der Proteinkonzentration	20
2.3.4	Heterologe Expression und Reinigung der YnjE-Varianten	22
2.3.4.1	Die Reinigung der Varianten His6YnjE $\Delta$ 1-21 und His6YnjE $\Delta$ 1-21C385A	22
2.3.4	Zellfraktionierung	23
2.3.5	Herstellung Zellfreier Rohextrakte	24
2.3.5.1	Mechanischer Zellaufschluss durch French Press	25
2.3.5.2	Mechanischer Zellaufschluss durch Sonifizieren	25
2.3.5.3	Chemischer Aufschluss durch alkalische Lyse	25
2.4	Analytische Methoden	26
2.4.1	Isothermale Titrationskalorimetrie	26
2.4.2	Analytische Ultrazentrifugation	26
2.4.3	SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (SDS-PAGE)	27
2.4.4	Identifizierung von Proteinen im Immunoblot	28
2.4.5	Verwendete Antikörper bzw. Antiseren	29
2.4.6	Assay zum Nachweis von MPT mittels High-Pressure-Liquid-Chromatography (HPLC)	29
2.4.7	CD-Spektroskopie	30
2.4.8	ESI-Massenspektrometrie	31
2.4.9	Bestimmung der Cystein-Desulfurase-Aktivität	31
2.4.10	Bestimmung der Sulfitoxidase-Aktivität	32
		33
2.4.11	Die „Tandem Affinity Purification“ (TAP) Methode	33
2.4.12	Ko-Immunpräzipitation bzw. Affinitätsreinigung von Proteinen der MPT-Synthese	34
2.4.13	Proteinkristallation von YnjE	34

### 3. Ergebnisse

3.1	Charakteristika YnjEs und verwendete YnjE-Varianten	36
3.1.1	Verwendete YnjE-Varianten	37
3.1.2	Expression und Reinigung von His-YnjE $\Delta$ 1-21	38
3.2	Strukturelle Charakterisierung von YnjE	41
3.2.1	Circular Dichroismus (CD) Spektroskopie	41
3.2.2	Analytische Ultrazentrifugation	43
3.2.3	Strukturaufklärung von YnjE durch Proteinkristallisationsanalyse	44
3.3	Interaktionsstudien	46
3.3.1	Nachweis der Interaktion von MoeB mit YnjE	46
3.3.2	Identifizierung von YnjE-Interaktionspartnern mittels Tandem-Affinitätsreinigung (TAP)	46
3.3.3	Identifizierung von YnjE-Interaktionspartnern mittels Antikörpergekoppelter Affinitätsreinigung	48
3.4	Analyse der Funktion von YnjE als Sulfurtransferase	52
3.4.1	Untersuchung eines möglichen Einflusses von YnjE auf die L-Cystein-Desulfurase-Aktivität	52
3.4.2	Analyse der Schwefelübertragung von L-Cystein auf YnjE durch Cysteindesulfurasen	55
3.5	Einfluss von YnjE auf die MPT-Synthese	58
3.5.1	Untersuchung eines Einflusses von YnjE auf die MPT- <i>in vitro</i> Synthese	58
3.5.2	Untersuchung des Sulfurierungsgrades von MoeD in <i>E. coli</i> - Sulfurase-Mutantenstämmen	60
3.5.3	Einfluss der Desulfurasen- bzw. YnjE-Mutanten auf die Moco-Biosynthese	62
3.6	Analyse des Cysteinrestes in Aminosäuren-Position 385	64
3.6.1	Erstellung der C385A-Mutation	64
3.6.2	Analyse der C385A-Mutante in Bezug auf die Interaktion mit dem MoeB- Protein und in Bezug auf die Beeinflussung der MPT-Synthese	65

---

3.7	Expression und Reinigung der YnjE-Varianten His-RLD1-2 $\Delta$ 1-21 und His-RLD3	67
3.8	Bestimmung der Dissoziationskonstanten möglicher YnjE Interaktionen durch ITC	69
3.9	Subzelluläre Lokalisierung von YnjE	70
<b>4.</b>	<b>Diskussion</b>	
4.1	Strukturanalyse des YnjE-Proteins	74
4.1.1	Analyse der YnjE-Domänen	74
4.1.2	Kristallisation YnjEs	75
4.2	Identifizierung einer möglichen Schwefelquelle für YnjE	76
4.3	Vergleich der der YnjE-Sulfurierung mit der Thiaminbiosynthese	78
4.4	Einfluss von YnjE auf die MPT-Synthese in <i>E. coli</i>	79
4.5	Gemeinsamkeiten mit der humanen Moco-Biosynthese	80
4.6	Lokalisierung von YnjE	83
4.7	Mögliche Funktionen des YnjE-Proteins in Peri- und Cytoplasma	84
	<b>Zusammenfassung</b>	<b>87</b>
	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>90</b>



# 1. Einleitung

## 1.1 Schwefel in biologischen Systemen

Schwefel ist für alle Organismen von essentieller Bedeutung. Die Eigenschaft des Schwefels als Nukleophil (z.B. Thiol) oder Elektrophil (z.B. Disulfid) zu wirken, macht ihn zu einer einzigartigen Komponente in einer großen Vielfalt von Biomolekülen, in denen er unterschiedlichste Funktionen erfüllt. Beispielsweise ist er Bestandteil der Aminosäuren Methionin und L-Cystein, bildet das Grundgerüst für Eisen-Schwefel-Zentren und ist in Thiamin, Biotin und in Form der einzigartigen Dithiolengruppe im Molybdänkofaktor enthalten. Eingang in den Metabolismus erlangt Schwefel dabei auf zwei Wegen, entweder durch Bindung an einen aktivierten Akzeptor während der Biosynthese von L-Cystein, oder als aktiviertes Persulfid (R-S-SH) (Kessler, 2006). Bei der Biosynthese von L-Cystein dient Sulfid als Schwefelquelle. Sulfid wird beispielsweise durch Reduktion von Sulfit durch die Sulfitreduktase bereitgestellt. Vermittelt durch die O-Acetylserin-Sulphydrylase entsteht dann L-Cystein aus freiem Sulfid und O-Acetylserin, einem aktivierten Serinester. Sowohl Sulfid als auch L-Cystein wirken toxisch, weshalb die Konzentrationen von Sulfid (20  $\mu$ M-160  $\mu$ M) und freiem L-Cystein (100  $\mu$ M-200  $\mu$ M) in der Zelle auf relativ geringem Niveau gehalten werden (Park und Imlay, 2003; Kessler 2006). L-Cystein stellt die zentrale Ausgangsverbindung für eine Reihe weiterer schwefelhaltiger Biomoleküle dar, unter anderem Methionin und CoenzymA. Darüber hinaus dient L-Cystein auch als Substrat zur Mobilisierung von Schwefel in Form von Persulfid. Persulfid gehört zu den Sulfanschwefelverbindungen, in denen Schwefel als  $S^0$  vorliegt. Neben molekularem Schwefel und Polysulfiden, gehören zu den Sulfanschwefelverbindungen auch Thiosulfat, Polythionat und Thiosulfonat. Persulfide sind in Form von freien, niedermolekularen Persulfiden (R-S-SH) relativ instabil und zerfallen unter den meisten Bedingungen in elementaren Schwefel (S) und Thiolen (R-SH), werden jedoch in der geschützten Umgebung aktiver Zentren von Persulfid-erzeugenden und bindenden Proteinen stabilisiert (Kessler, 2006). Bei diesen Proteinen handelt es sich um die L-Cystein-Desulfurasen, die Rhodanesen und Rhodanese-ähnliche Proteine, welche in den Nachfolgenden Abschnitten näher beschrieben werden.

### 1.1.1 Mobilisierung des Schwefels durch Cysteindesulfurasen

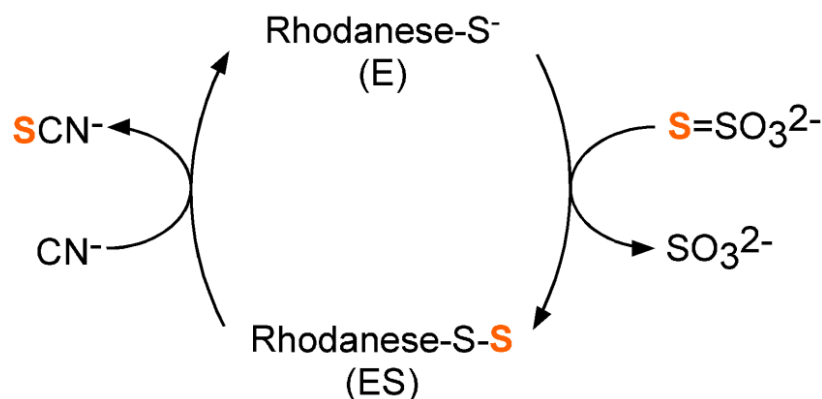
Die Cysteindesulfurasen sollen hier am Beispiel der NifS-Familie beschrieben werden. Diese nutzen einen Pyridoxal 5'-Phosphat-Kofaktor um Persulfidgruppen von L-Cystein zu mobilisieren ( $S^0$ ) und auf Cysteinreste in den aktiven Zentren (active site loop) der Zielproteine zu übertragen, wobei als Produkt Alanin entsteht (Mihara *et al.* 2002). Pyridoxalphosphat bindet dabei an einem Lysinrest innerhalb eines für diese Enzymklasse typischen His-Lys-X-X-X-Pro-X-Gly-X-Gly-Motivs. Ein weiteres Charakteristikum ist ein konservierter Cystein-Rest, welcher Bestandteil einer katalytischen Schleife am C-Terminus des Proteins ist, und an welchem das Persulfid gebildet wird. Die drei Cysteindesulfurasen IscS, CsdA und SufS aus *Escherichia coli* sind zu 40 bzw. 25% mit NifS aus *Azotobacter vinelandii* identisch auf Aminosäureebene und werden deshalb der NifS-Familie zugeordnet (Mihara *et al.*, 1999). Proteine dieser Familie haben untereinander hohe strukturelle Ähnlichkeit und bilden Homodimere. Anders als ihr Namensgeber NifS aus *A. vinelandii*, welches dort ausschließlich an der Eisen-Schwefel-Zentren-Biosynthese der Nitrogenase beteiligt ist (Zheng *et al.*, 1994), sind in *E. coli* eine ganze Reihe von Stoffwechselwegen auf Persulfurierungen durch IscS, CsdA und SufS angewiesen. Beispielsweise ist IscS an der Fe-S-Zentren-Biosynthese beteiligt (Flint, 1996), liefert Schwefel für die Biosynthese von Thionukleotiden und Thiamin (Lauhon und Kambampati, 2000) und wird für den Einbau von Selen in Selenoproteine und Selenouridin-Reste in tRNA benötigt (Mihara *et al.*, 2002). IscS ist folglich ein außerordentlich vielseitiges Protein und vermutlich die zentrale Enzym-Komponente im Schwefelmetabolismus (Lauhon, 2002). Das *iscS*-Gen ist Teil eines Operons, welches zusätzlich die Gene *iscU*, *iscA*, *hscB*, *hscA* und *fdx* umfasst. Dabei erfüllt das Protein IscU die Funktion eines Gerüstproteins, welches mit IscS interagiert und als Schwefelakzeptor des IscS-Persulfids fungiert. Das *isc*-Operon erfüllt eine Schlüsselfunktion bei der Eisen-Schwefel-Zentren-Biosynthese und ist in der Natur weit verbreitet (Zheng *et al.*, 1998). Sequenzhomologe zu *iscS* finden sich oft in der Nachbarschaft anderer Gene des *isc*-Typs. Dabei können zwei Gruppen von Desulfurasen (GI und GII) unterschieden werden. Die Einteilung erfolgt nach vier Sequenzbereichen, welche jeweils 15-30 Aminosäuren umfassen (Mihara *et al.*, 1997). Während NifS und IscS zur GI gehören, werden die *E. coli* Proteine CsdA (Mihara *et al.*, 1997) und SufS (Patzner und Handke, 1999) der Gruppe II zugeordnet. Die Inhomogenität der Gruppe II weist auf die Vielseitigkeit der ihr zugeordneten Proteine hin. Kessler *et al.* (2004) konnten für SufS Cystin-Lyase-Aktivität nachweisen. Sowohl für das CsdA- als auch für das Suf-System wurden Funktionen in der Fe-S-Zentren-

Biosynthese vorgeschlagen. Dies ist dann von Bedeutung, wenn das IscS-System inaktiviert wird. So können die Desulfurasen CsdA und SufS bei *IscS-knock out* dessen Funktionen teilweise übernehmen (Takahashi und Tokumoto, 2002; Kessler *et al.* 2006). Beide Desulfurasen sind *in vitro* dabei jedoch weniger effizient als IscS. Outten *et al.* (2003) und Loiseau *et al.* (2005) haben sowohl für CsdA als auch für SufS Enhancer-Proteine gefunden (CsdE bzw. SufE), welche die Cysteindesulfuraseaktivität *in vitro* signifikant erhöhen. Für IscS sind entsprechende Enhancer-Proteine bisher nicht bekannt.

### 1.1.2 Rhodanesen und Rhodanese-ähnliche Proteine im Schwefelmetabolismus

Rhodanesen und Rhodanese-ähnliche Proteine generieren ähnlich den Cysteindesulfurasen enzymgebundene Persulfide. Es handelt sich dabei um ein Zwischenprodukt, in welchem der zu transferierende Schwefel an einen katalytischen Cystein-Rest gebunden ist. Dieser ist ein Bestandteil einer sechs Aminosäuren umfassenden katalytischen Schleife (active site loop). Rhodanesen sind definiert als Thiosulfat-Cyanid-Sulfurtransferasen (TST), welche *in vitro* die Übertragung von Sulfanschwefel von Thiosulfat auf Cyanid katalysieren (Lang, 1933; **Abbildung 1**). Der Name Rhodanese leitet sich von Rhodanid ab, einer veralteten Bezeichnung für das gebildete Thiocyanat. Neben den Rhodanesen existieren Rhodanese-ähnliche Proteine, welche auf andere Schwefeldonoren wie beispielsweise 3-Mercaptopyruvat angewiesen sind (MST), oder den Schwefel spezifisch auf andere Akzeptoren, wie z.B. Lipoat oder Thioredoxin übertragen (Chianci *et al.*, 2000; Ray *et al.*, 2000). Über die physiologische Rolle von Rhodanesen und deren *in vivo*-Substrate wird diskutiert. Es werden ihnen Funktionen bei der Entgiftung von Cyanid oder eine Mitwirkung an der Fe-S-Zentren-Biosynthese zugeschrieben (Cerletti, 1986). Andere Studien implizieren eine Beteiligung an der Thiamin-, Thionukleosid-, und auch an der Moco-Biosynthese (Wolfe *et al.*, 2004; Matthies *et al.*, 2004). Diese Vielseitigkeit der Rhodanesen und Rhodanese-ähnlichen Proteine wird durch ihre ubiquitäre Verbreitung und den modularen Aufbau (Bordo und Bork, 2002) aus mehreren Rhodanese-Domänen unterstrichen. So besitzt die gut untersuchte Rhodanese aus Rinderleber ein N-terminales inaktives und ein C-terminales katalytisch aktives Modul von jeweils ca. 120 Aminosäuren. Diesen Grundaufbau der sogenannten Tandem-Rhodanesen teilen sowohl Vertreter der TSTs wie MSTs in allen Organismenreichen (Kessler, 2006). Eine Besonderheit unter den Tandem-Rhodanesen ist ein Protein aus

*Halanaerobium congolense*, welches zwei katalytisch aktive Schleifen besitzt (Ravot *et al.*, 2005). Unter den Rhodanesen mit nur einem Modul sei GlpE aus *E. coli* als Beispiel genannt (Ray *et al.*, 2000). Die Kristallstruktur GlpEs zeigte hohe Homologien zu den katalytischen Domänen von Tandem-Rhodanesen aus Prokaryoten und Eukaryoten, und gilt deshalb als Prototyp-Struktur für die einzelnen Rhodanese-Domänen Module (Spallarossa *et al.*, 2001). Auf Sequenzebene zeigen die Rhodanesen aus unterschiedlichen Organismen selten eine hohe Übereinstimmung, obwohl sie in ihrer Struktur in großem Maße übereinstimmen (Bordo und Bork, 2002). Unterschiede in der Substratspezifität von TST und MST werden mit Variationen in der Aminosäurezusammensetzung der katalytischen Schleife erklärt. So bestimmt die Gestalt der Seitenketten dieser Aminosäuren die Bindungstasche und dadurch die Substratbindung. Für einige dieser Rhodanesen liegt die katalytische Aktivität verglichen mit Rinder-Rhodanese für Thiosulfat als Substrat deutlich niedriger (Krepinski und Leimkühler 2007). Auch deshalb kann angezweifelt werden, dass es sich bei Thiosulfat um das physiologische Substrat der meisten Rhodanesen handelt.



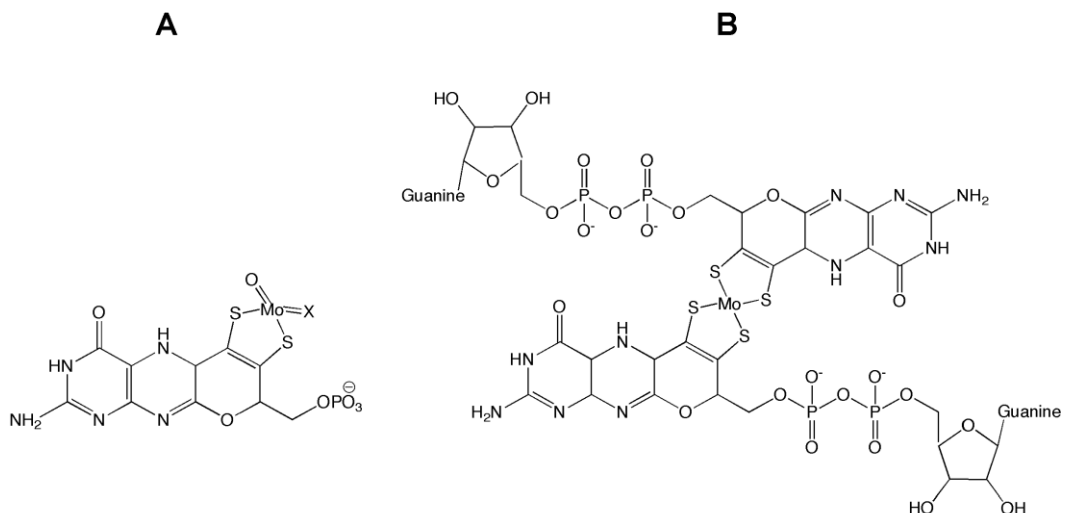
**Abbildung 1: Schwefeltransferreaktion der Rhodanesen**

Rhodanesen übertragen Persulfidschwefel von Thiosulfat ( $S=SO_3^{2-}$ ) auf Cyanid ( $CN^-$ ). Der Name Rhodanese leitet sich von Rhodanid, einer veralteten Bezeichnung für Thiocyanat ( $SCN^-$ ), ab. Das Proteingebundene Persulfid wird an einem konservierten Cysteinrest in einer katalytischen Schleife der Rhodanese gebildet.

## 1.2 Der Molybdänkofaktor

Das Spurenelement Molybdän (Mo) stellt besonders in Form des Molybdänkofaktors (Moco) eine bedeutende und vielseitige Komponente im Stoffwechsel von Prokaryoten wie Eukaryoten dar. Die Struktur des Moco ist hoch konserviert. Das organische

Grundgerüst ist ein Pterin. Am C<sub>6</sub>-Atom des Pterins schließt sich eine 4-Alkyl-Seitenkette mit einem terminalen Phosphatester an. Das C<sub>3</sub> der Seitenkette bildet mit dem C<sub>7</sub> des Pterins einen Pyranoring, die 5, 6, 7, 8-Tetrahydropyranopyranopterin-Struktur des Molybdopterins (**Abbildung 2**; Romao *et al.*, 1995; Schindelin *et al.*, 1996; Boyington *et al.*, 1997). Das Charakteristikum des Moco ist eine Dithiolengruppe um C<sub>1</sub> und C<sub>2</sub> welche das Molybdänatom koordiniert. Ist kein Molybdän an der Dithiolengruppe gebunden, spricht man von Molybdopterin (MPT). Nach Bindung des Mo wird die Bezeichnung Moco verwendet. Der Moco ist ein essentieller Bestandteil von verschiedenen Redoxenzymen, die Elektronenübertragungen von oder auf Kohlenstoff-, Schwefel- oder Stickstoffatome katalysieren. Molybdoenzyme werden im Allgemeinen in drei Familien je nach Struktur des Mo-Zentrums eingeteilt. Molybdoenzyme, welche den dioxo-Moco enthalten, gehören der Sulfite-Oxidase-Familie an. Die Xanthin-Oxidase-Familie enthält den monooxo-Moco. Die für *Escherichia coli* wahrscheinlich bedeutendste Form des Moco wird als Bis-Molybdopterin-Guanin-Dinukleotid (Bis-MGD) bezeichnet, und ist in Molybdoenzymen der Dimethylsulfoxid (DMSO)-Reduktase-Familie enthalten (**Abbildung 2**). Mitglieder der DMSO-Reduktase-Familie wurden bisher nur in Prokaryoten identifiziert, während Molybdoenzyme der Xanthin-Oxidase- und der Sulfite-Oxidase-Familie in allen Organismenreichen vorkommen.



**Abbildung 2: Struktur des Molybdänkofaktors**

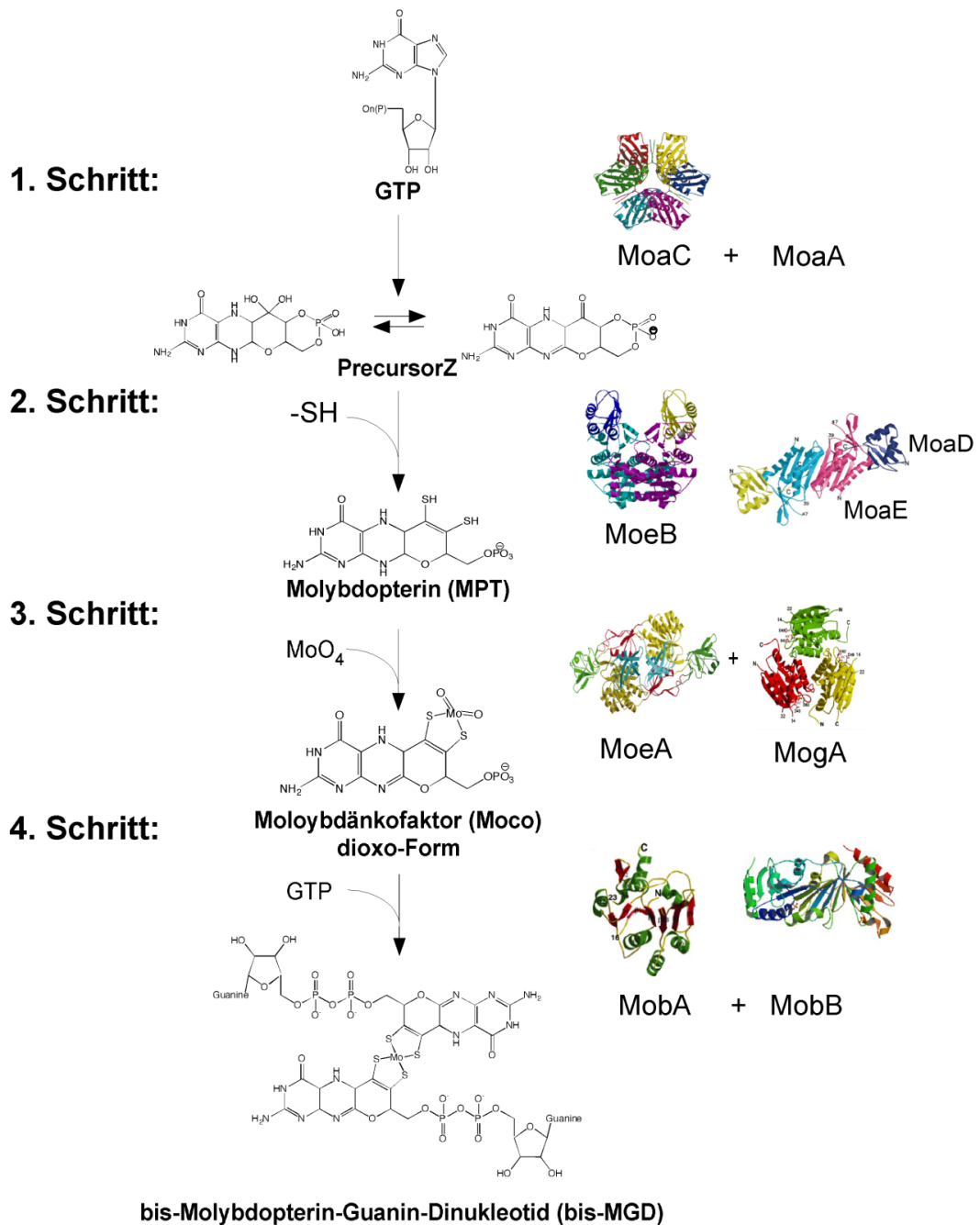
(A) der Dioxo-Moco (X=O), der Monooxo-Moco (X=S) und der in bakteriellen Molybdoenzymen vorkommende bis-MGD (B).

### 1.2.1 Die Molybdänkofaktor-Biosynthese

Die Molybdänkofaktor-Biosynthese ist ein ubiquitär verbreiteter Syntheseweg, welcher in allen bisher untersuchten Organismen im Wesentlichen nach dem gleichen Mechanismus abläuft. In *E. coli* ist die Moco-Biosynthese bisher am besten charakterisiert und soll an dieser Stelle beschrieben werden. Die in den Operons *moa*, *mob*, *moe* und *mog* organisierten Gene kodieren für neun Proteine der Moco-Biosynthese, die in vier Schritte gegliedert wird. Im ersten Schritt wird GTP, katalysiert durch MoaA und MoaC, in einer radikalischen, S-Adenosylmethionin-abhängigen Reaktion zu dem sogenannten Precursor Z umgesetzt. Dabei handelt es sich um ein Schwefel- und Metall-freies Pterinderivat, welches ein geminales Diol in der Seitenkette trägt und als meta-stabil gilt (**Abbildung 3**; Santamaria-Araujo *et al.*, 2004; Wuebbens und Rajagopalan, 1995 und 1993).

Im zweiten Schritt wird das tricyclische Pyranopterin durch Bildung einer Dithiolengruppe zu Molybdopterin (MPT) umgewandelt. An dieser Reaktion sind die Proteine MoaD, MoaE und MoeB beteiligt, wobei MoaD und MoaE einen heterotetrameren Komplex bilden, der als MPT-Synthase bezeichnet wird. Da MoaD im Gegensatz zu MoaE empfänglich für Sulfhydrylreagenzien ist, konnte gezeigt werden, dass MoaD die schwefelübertragende Komponente des MPT-Synthase-Komplexes darstellt. Schwefel ist dabei in Form einer Thiocarboxylat-Gruppe an einem Doppelglycin-Motiv am C-Terminus MoaDs gebunden (Pitterle und Rajagopalan, 1993). Voraussetzung für die Thiocarboxylierung MoaDs ist eine Aktivierung durch das Protein MoeB. In einer ATP-abhängigen Reaktion kommt es zur Bildung eines MoeB-MoaD-Acyladenylat-Komplexes (Leimkühler *et al.*, 2001). Es handelt sich um ein Heterotetramer aus dimerem MoeB mit jeweils einem gebundenen MoaD pro MoeB Untereinheit (Lake *et al.*, 2001; **Abbildung 4B**). Am Gly81 wurde dabei das Acyladenylat nachgewiesen, welches kovalent über ein Anhydrid das  $\alpha$ -Phosphat bindet. Daneben konnten die gleichen Autoren konservierte Aminosäuren identifizieren, die an der Bindung von ATP und  $Mg^{2+}$  beteiligt sind. Nach der Thiocarboxylierung MoaDs dissoziiert dieses von MoeB und bildet mit MoaE die aktive MPT-Synthase. Der Einbau des Molybdäns folgt im dritten Schritt. Dieses gelangt dabei in Form von Molybdat ( $MoO_4^{2-}$ ), vermittelt durch ein hochaffines Transporter-System vom ABC-Typ in die Zelle. Dieses besteht aus den Proteinen ModA, ModB und ModC, welche auf einem weiteren Moco-Biosynthese-assoziierten Operon (*mod*) kodiert werden (Rech *et al.*, 1995). Der Mo-Einbau wird durch die Proteine MogA und MoeA vermittelt. Nichols und Rajagopalan (2005) konnten *in vitro* zeigen, dass MogA

unter hohen Molybdatkonzentrationen nicht für die Mo-Insertion benötigt wird und MoeA für die Bildung des Moco unter physiologischen Molybdatkonzentrationen ausreicht.



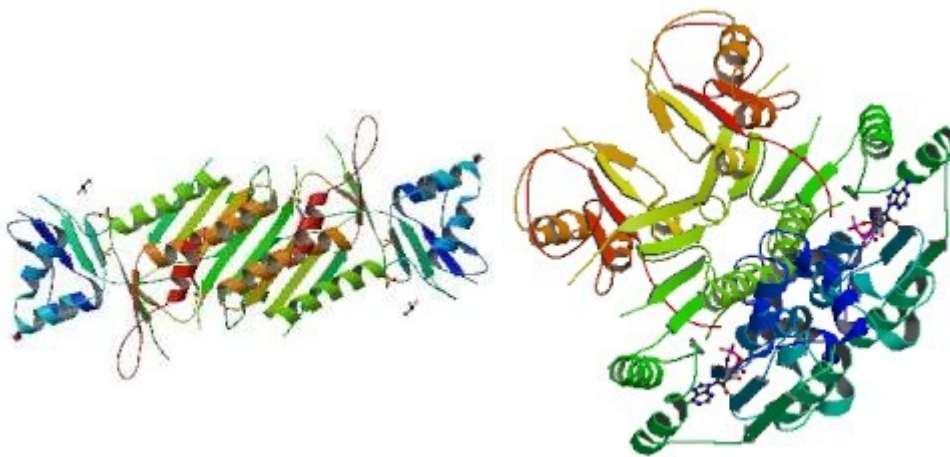
**Abbildung 3: Modell der Moco-Biosynthese**

Dargestellt sind die vier Schritte der Moco-Biosynthese in *E. coli* und die daran beteiligten Proteine. Schritt 1: Synthese von PrecursorZ; Schritt 2: Generierung von MPT; Schritt 3: Molybdäninsertion und die Bildung von bis-MGD im 4. Schritt. Details sind im Text beschrieben. Für alle beteiligten Enzyme mit Ausnahme von MoeA wurden die Kristallstrukturen in *E. coli* bereits gelöst.

Für MogA postulieren die gleichen Autoren eine unterstützende Funktion bei der Mo-Insertion, durch Vorbereitung des MPT durch Adenylierung *in vivo*. Im vierten Syntheseschritt, der in Eukaryoten nicht stattfindet, wird der Moco weiter modifiziert. Durch die Proteine MobA und MobB wird durch Hinzufügen eines Guaninnukleotids Molybdopterin-Guanin-Dinukleotid (MGD) gebildet. Zwei dieser MGD koordinieren schließlich ein Molybdän-Atom, wodurch bis-MGD entsteht. Genauer über den Mechanismus der bis-MGD-Bildung ist momentan noch nicht bekannt. Für alle genannten Proteine der Moco-Biosynthese wurde bereits die Kristallstruktur gelöst, diese sind in einer schematische Übersicht über die Moco-Biosynthese ist in **Abbildung 3** dargestellt.

### 1.2.2 Der Schwefeltransfer im zweiten Schritt der Moco-Biosynthese

Die Kristallstruktur der MPT-Synthase aus *E. coli* wurde von Rudolf *et al.*, 2001 gelöst. Zwei MoaD-Untereinheiten binden jeweils über ihren C-Terminus an eine hochkonservierte Bindungstasche der dimeren MoaE Untereinheit (**Abbildung 4**).

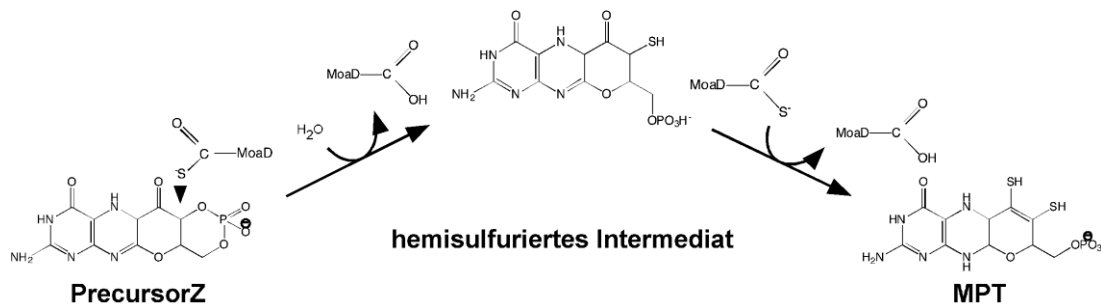


**Abbildung 4:** (A) Kristallstruktur der MPT-Synthase (Rudolph *et al.*, 2003) und des (B) MoeB-MoaD-Acyladenylat-Komplexes (Lake *et al.*, 2001)

**A:** Die heterotetramere aktive MPT-Synthase besteht aus zwei MoaE- und zwei thiocarboxylierten MoaD-Untereinheiten. Sie katalysiert die Bildung der charakteristischen Dithiolengruppe und damit die Konversion von PrecursorZ in MPT. **B:** MoaD wird unter ATP-Verbrauch durch MoeB für die Thiocarboxylierung aktiviert. *E. coli*-MoeB trägt allerdings nicht den dafür benötigten Schwefel.



Diese Anordnung führte zu der Fragestellung, ob die Bildung des Dithiolenschwefels unabhängig an beiden Moad-Untereinheiten der MPT-Synthase stattfindet, oder die beiden Schwefelatome nacheinander durch Weitergabe eines hemisulfurierten Intermediates von einer Moad-Untereinheit auf die Zweite übertragen werden. Nach diesem Modell wurde eine Affinitätssteigerung zu dem hemisulfurierten Intermediat nach Bindung des ersten Schwefels durch Konformationswechsel postuliert (Gutzke *et al.*, 2001). Es konnte gezeigt werden, dass MPT-Synthase und hemisulfuriertes Intermediat eng assoziiert sind (Wuebbens und Rajagopalan, 2003). Die Autoren schlagen ein Modell vor, in welchem das Intermediat seine Position nicht ändert. In diesem Fall müsste Moad nach der Übertragung des ersten Schwefels erneut thiocarboxyliert werden (**Abbildung 5**).



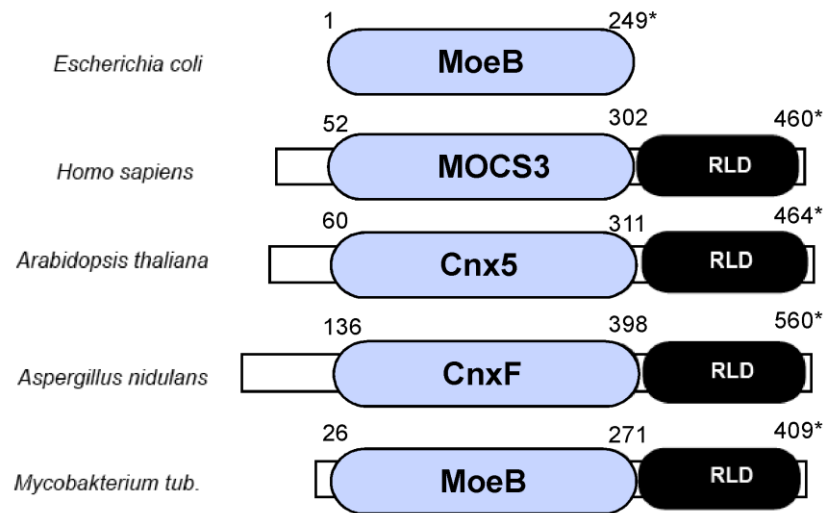
**Abbildung 5: Konversion von PrecursorZ zu MPT nach Wuebbens und Rajagopalan**

Nach diesem hypothetischen Modell könnte thiocarboxyliertes Moad die C2-Position des PrecursorZ angreifen, um das dargestellte hemisulfurierte Intermediat zu bilden. Das Intermediat bleibt gebunden, um erneut durch thiocarboxyliertes Moad zu MPT konvertiert zu werden.

Obwohl die Übertragung des Schwefels auf PrecursorZ bereits ausführlich charakterisiert wurde, blieb eine mögliche Schwefelquelle für die Thiocarboxylierung Moads sowie der genaue Mechanismus der Schwefelübertragung auf Moad bisher nur Spekulation. Der zu Grunde liegende Reaktionsmechanismus der Moad-Aktivierung weist Ähnlichkeit zu dem Ubiquitin-aktivierenden Schritt innerhalb des ubiquitinabhängigen Proteinabbaus in Eukaryoten auf. Darüber hinaus sind sowohl Moad und Ubiquitin als auch MoeB und das Ubiquitin-aktivierende Enzym E1 strukturelle Homologe. Dies legt nahe, dass die Schwefeltransferreaktion bei der

Moco-Biosynthese dem Mechanismus der Ubiquitinierung gleicht. Es wurde vermutet, dass MoeB neben der Aktivierung von MoaD auch den Schwefel für die Thiocarboxylierung liefert. Im Gegensatz zur Ubiquitinierung konnte jedoch keine Thioesterbildung zwischen MoaD und MoeB in *E. coli* nachgewiesen werden. Durch Mutationsanalysen an allen konservierten Cysteinresten MoeBs konnte sogar ausgeschlossen werden, dass der Schwefel für die Thiocarboxylierung Moads durch MoeB übertragen wird (Leimkühler *et al.*, 2001). Es ist also in *E. coli* vermutlich ein weiteres Protein für den Schwefeltransfer auf aktiviertes Moad notwendig. Vieles deutet darauf hin, dass dies durch ein Rhodanese-ähnliches Protein im Zusammenspiel mit einer Cysteindesulfurase vermittelt wird. *In vitro* war es bereits möglich, mittels der drei *E. coli* L-Cysteindesulfurasen IscS, CsdA und SufS Schwefel auf aktiviertes Moad zu übertragen (Leimkühler *et al.*, 2001). Untersuchungen an einer *E. coli* *iscS*-Mutante zeigten allerdings, dass IscS *in vivo* nicht essentiell an der Moco-Synthese beteiligt ist (Leimkühler *et al.*, 2001).

Das Protein ThiF der prokaryotischen Thiaminbiosynthese zeigt hohe Sequenzhomologie zu MoeB. ThiF katalysiert die Adenylierung von ThiS, welches ähnlich zu Moad ein C-terminales Doppel-Glycin-Motiv besitzt. ThiF und ThiS sind beide an der Schwefelübertragung auf einen Thiazol-Precursor beteiligt (Begley *et al.*, 1999). Die Thiocarboxylierung wird hier durch das Rhodanese-ähnliche Protein ThiI vermittelt, welches ein Persulfid von IscS übernimmt (Wolfe *et al.*, 2004). Auch in der humanen Moco-Biosynthese wurde eine Sulfurtransferase in Form einer Rhodanese-ähnlichen Domäne identifiziert. Diese ist C-terminaler Bestandteil des MOCS3-Proteins, dem humanen MoeB-Homolog. In Matties *et al.*, 2005 wurde nachgewiesen, dass die Rhodanese-Domäne von MOCS3 direkt am Schwefeltransfer auf das humane Moad-Homolog MOCS2A beteiligt ist. Später konnte in einem Sulfurtransferase-Assay nach Sörbo (1957) und durch massenspektrometrische Analysen gezeigt werden, dass *E. coli* IscS nicht das MOCS3-Protein persulfurieren kann (Marelja *et al.*, 2008). Der Schwefel wird im humanen System stattdessen durch NifS von L-Cystein mobilisiert und auf die Rhodanese-domäne von Mocs3 übertragen (Marelja *et al.*, 2008). Entsprechende C-terminale Fusionen finden sich an verschiedenen MoeB Homologen aus Eukaryoten wie Prokaryoten (**Abbildung 6**).



**Abbildung 6: MoeB-Homologe aus Pro- und Eukaryoten**

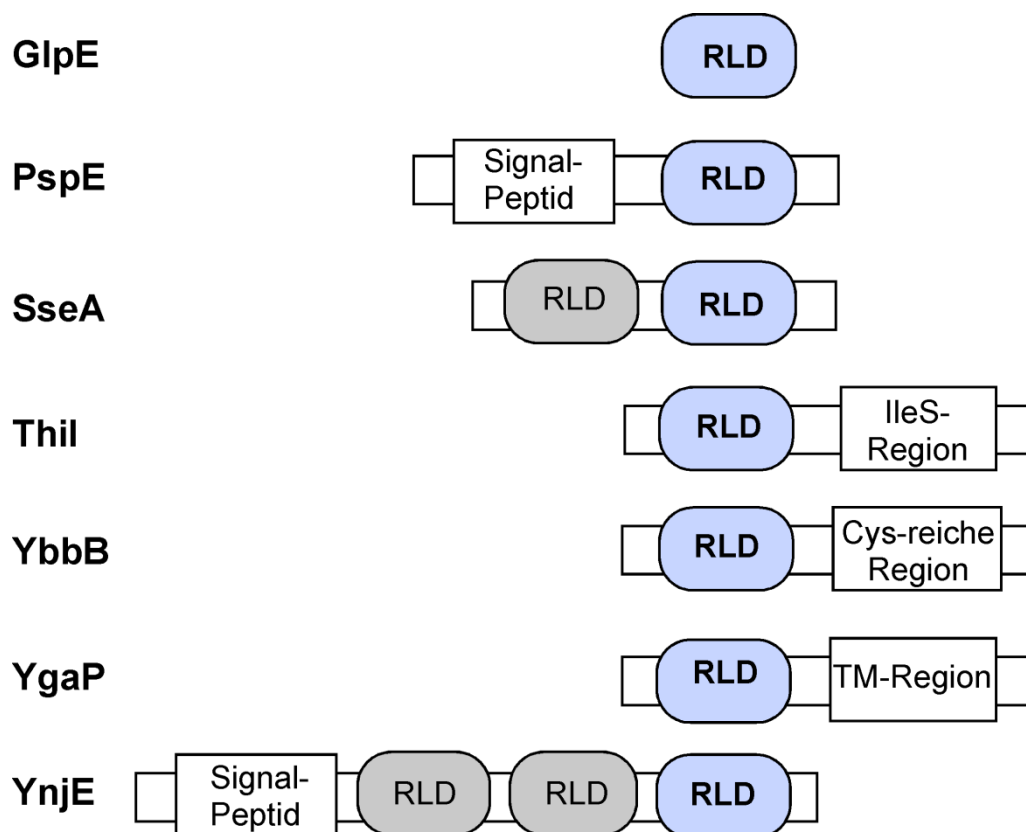
Alle bisher untersuchten MoeB-Homologe aus Eukaryoten und einige prokaryotische MoeB-Homologe besitzen C-terminale Rhodanese-Domänen. Im Fall von MOCS3 wurde gezeigt, dass diese an der Schwefelübertragung im zweiten Schritt der Moco-Synthese beteiligt ist (Matthies *et al.*, 2005). *E. coli* MoeB fehlt eine fusionierte Rhodanese-domäne. Die Nummern geben die Aminosäureposition der einzelnen Domänen an.

Krepinsky und Leimkühler (2007) gehen von einer evolutiv spezifischeren Schwefelübertragung auf die MPT-Synthase durch MoeB-Varianten mit Rhodanese-Fusion aus, da MoeB-Homologe in verschiedenen Prokaryoten mit und ohne Rhodanese-domäne nebeneinander vorkommen. *E. coli* MoeB fehlt eine entsprechende fusionierte Domäne, doch existiert in *E. coli* eine Reihe von potentiellen Sulfurtransferasen, welche eine ähnliche Funktion übernehmen könnten.

### 1.2.3 Potentielle Sulfurtransferasen der MPT-Synthese *E. coli*s

Insgesamt elf Proteine gelten in *E. coli* als Kandidaten für eine spezifische Sulfurtransferase im zweiten Schritt der Moco-Biosynthese. Drei dieser Proteine sind die bereits erwähnten L-Cysteindesulfurasen IscS, CsdA und SufS, welche Schwefel von L-Cystein mobilisieren und *in vitro* zur Thiocarboxylierung MoaDs beitragen. Da in vielen Organismen die entsprechenden MoeB-Homologe eine C-terminal-fusionierte Rhodanese-Domäne tragen, sind des Weiteren die acht Rhodanese-ähnliche-*E. coli*-Proteine GlpE, PspE, SseA, Thil, YbbB, YceA, YgaP und YnjE mögliche

Interaktionspartner MoeBs und potentielle Sulfurtransferasen bei der Bildung von MPT. Eine Übersicht über die Gestalt der Rhodanese-ähnlichen Proteine in *E.coli* liefert **Abbildung 7**. Einige dieser Proteine wurden bereits näher charakterisiert und es wurden ihnen Funktionen in anderen Stoffwechselwegen zugewiesen. GlpE und PspE konnten *in vitro* den TST zugeordnet werden (Ray *et al.*, 2000; Adams *et al.*, 2002). GlpE ist am sn-Glycerol 3-Phosphat Metabolismus beteiligt, ist eine Einzeldomänenrhodanese und bildet unter nativen Bedingungen Dimere. Das *pspE*-Gen ist Teil des *psp*- (phage-shock-protein-) Operons, dessen Expression nach Phageninfektion induziert wird. Das PspE Protein ist eine Einzeldomänenrhodanese, welche ein N-terminales periplasmatisches Signalpeptid besitzt (**Abbildung 8**).



**Abbildung 7: Übersicht über die acht Rhodanese-ähnlichen Proteine in *E.coli***

Die Rhodanesedomänen (RLD), welche einen putativ aktiven Cystein-Rest besitzen, sind in blau dargestellt. SseA und PspE besitzen periplasmatische Signalpeptide, YgaP eine Transmembranregion (TM). Da SseA und YnjE weitere Rhodanese-Domänen besitzen, gehören sie zu den sogenannten Tandem-Rhodanesen

Bei SseA handelt es sich um ein Protein aus zwei Rhodanese-Domänen und die erste in Prokaryoten identifizierte MST (Spallarossa *et al.*, 2003). Für Thil bzw. YbbB wurden Funktionen als Sulfurtransferasen in der Thiaminbiosynthese bzw. der Selenouridinbiosynthese nachgewiesen (Mueller *et al.*, 2001; Wolfe *et al.*, 2004). Beide Proteine besitzen neben einer Rhodanese-ähnlichen Domäne eine weitere Proteindomäne (**Abbildung 7**). Das Protein Thil ist innerhalb der Thiaminbiosynthese an einer Thiocarboxylierung beteiligt, und transferiert dabei Schwefel von IscS auf einen Thiazol-Precursor. Für YceA, YgaP und YnjE wurden bislang keine physiologischen Funktionen ermittelt. In Hefedi-hybrid-Analysen, in welchen eine mögliche Interaktion zwischen MoeB und den Sulfurtransferasen *E. coli*s untersucht wurde, konnte eine Interaktion zwischen YnjE und MoeB beobachtet werden (A. Freuer, 2005). Auch gab es erste Hinweise auf einen Einfluss YnjEs auf die Moco-Biosynthese *in vitro*. Durch Sequenzanalysen wurde zudem ein N-terminales Sec-System-abhängiges Periplasma-Signalpeptid identifiziert, wovon durch massenspektrometrische Analysen gezeigt werden konnte, dass es in rekombinant exprimiertem YnjE abgespalten wird. Sollte eine cytoplasmatische Funktion für YnjE in der Moco-Biosynthese und eine Lokalisierung im Periplasma bestätigt werden, wäre YnjE das erste dokumentierte prokaryotische Protein mit Funktionen in beiden Kompartimenten.

## Ziele dieser Arbeit

Eine Schwefelquelle in Form einer Sulfurtransferase für die Thiocarboxylierung MoaDs im zweiten Schritt der Moco-Biosynthese in *E. coli* ist bislang unbekannt. Die drei Cysteindesulfurasen CsdA, SufE und IscS sind *in vitro* befähigt, den Schwefel für die Thiocarboxylierung des MoaD Proteins bereitzustellen. Jedoch sind sie nicht essentiell für die Moco-Biosynthese. Zudem sind in anderen Organismen wie z B. im Menschen, Sulfurtransferasen in Form von fusionierten Rhodanese-Domänen bekannt, welche Persulfide von Cysteindesulfurasen auf MoaD übertragen können. Hinweise aus früheren Studien deuten auf das Rhodanese-ähnliche Protein YnjE für diese Funktion in *E.coli* hin. Hefe-Dihybrid-Analysen zeigten eine mögliche Interaktion von YnjE und dem MoeB-Protein, dessen Homologe meist mit Rhodanese-Domänen fusioniert sind. Für YnjE waren bislang keine Funktionen bekannt. Ziel dieser Arbeit ist es deshalb, das YnjE-Protein zu charakterisieren und auf eine mögliche Funktion in der Moco-Biosynthese zu untersuchen. Dabei soll festgestellt werden, ob YnjE die MoaD-Thiocarboxylierung *in vitro* beeinflusst und welche Auswirkungen ein YnjE bzw. Cysteindesulfurasen knock-out auf die MoaD-Sulfurierung *in vivo* hat. Eine Wechselwirkung YnjEs mit den MPT-Synthese-Proteinen in Form einer Komplexbildung soll zudem durch *in vivo*- und *in vitro*-Interaktionsanalysen nachgewiesen werden und ein Modell zur Schwefelübertragung für den zweiten Schritt der Moco-Biosynthese, wonach ein Persulfid durch die Cysteindesulfurasen von L-Cystein mobilisiert wird, um dann auf YnjE übertragen zu werden, verifiziert werden. Dazu sollte der Sulfurierungsgrad des YnjE-Proteins in Abhängigkeit der *E. coli* Cysteindesulfurasen untersucht werden. Die molekularen Grundlagen möglicher Interaktionen sollten durch Generierung und Analyse von YnjE-Mutationen, Charakterisierung der YnjE-Domänen und durch die Untersuchung der sekundär- bzw. tertiär-Struktur YnjEs aufgeklärt werden. Insbesondere die Rolle des N-terminalen Periplasma-Signalpeptides sollte dabei analysiert werden.

## **2. Material und Methoden**

### **2.1 Verwendete Medien, Puffer und Lösungen**

Standard-Lösungen, Puffer und Medien wurden nach Sambrook *et al.*, 1998 mit deionisiertem Wasser hergestellt. Der pH-Wert der Lösungen wurde, wenn nicht anders angegeben, mit HCl oder NaOH eingestellt. Medien, Medienstammlösungen und –zusätze wurden durch Autoklavieren (20 min, 1 bar, 121°C) oder Sterilfiltrieren (0,2 µm) sterilisiert.

### **2.2. Molekularbiologische Methoden**

#### **2.2.1. Amplifikation von DNA-Fragmenten**

Zur Amplifikation spezifischer DNA-Fragmente wurde die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR, Saiki *et al.*, 1988) durchgeführt. Nach Denaturierung der entsprechenden Matrizen-DNA zu Einzelsträngen, hybridisieren Oligonukleotide (Primer) mit flankierenden Abschnitten einer Zielsequenz und dienen als Startpunkt für die Pfu-DNA-Polymerase (Fermentas), welche den jeweiligen komplementären Strang synthetisiert. Die benötigten Primer wurden von der Firma BioTeZ Berlin-BuchGmbH bezogen. PCR-Fragmente wurden grundsätzlich in den pJET1 -Plasmidvektor (Fermentas) zwischenkloniert.

#### **2.2.2 Restriktion von DNA und Ligation von DNA-Fragmenten**

Mit Hilfe der hydrolytischen Aktivität spezifischer Typ II Restriktionsnukleasen erfolgte die Restriktion von DNA gemäß den Angaben des Herstellers. Die Ligation der komplementären Enden von Insert und Vektor wurde von der T4-Ligase unter ATP-Verbrauch katalysiert und erfolgte bei RT für mind. 45 min. Die benötigten Enzyme wurden von der Firma Fermentas bezogen.

### 2.2.3 Präparation von Plasmiden und Gelfragmenten

Die Isolierung von Plasmid-DNA für die Sequenzierung, den Restriktionsverdau oder als PCR-Template erfolgte durch die Verwendung des Plasmidpräparationskits NucleoSpin® Plasmid (Macherey-Nagel) gemäß den Herstellerangaben. Geschnittene DNA-Fragmente wurden einer präparativen Gelelektrophorese unterzogen, entsprechende Gelblöcke ausgeschnitten und die DNA mit Hilfe des Isolierungskits NucleoSpin® Extract (Macherey-Nagel) gereinigt. Das Elutionsvolumen betrug dabei grundsätzlich 50 µL.

### 2.2.4 Anzucht von *E. coli* Kulturen

*E. coli* Expressions-Vorkulturen und Kulturen zur Plasmidpräparation wurden in LB-Flüssigmedium (10 g/L Trypton; 10 g/L Natriumchlorid; 5 g/L Hefeextrakt) bei 37°C angezogen. Falls notwendig, wurden Ampicillin (150 µg/ml) oder Chloramphenicol (50 µg/mL) dem Medium zugesetzt.

### 2.2.5 Herstellung von *E. coli*-Dauerkulturen

Zur dauerhaften Aufbewahrung von *E. coli*-Stämmen wurden 900 µl der *E. coli*-Kultur in LB-Medium mit 100 µl sterilem Glycerol (87% v/v) versetzt. Die Glycerol-Kulturen wurden bei -70 ° C aufbewahrt.

### 2.2.6 Herstellung kompetenter *E. coli*-Zellen

Da die verwendeten *E. coli* Stämme kein natürliches Transformationssystem besitzen, wurden zur Aufnahme extrachromosomaler Plasmid-DNA die entsprechenden *E. coli*-Stämme durch Behandlung mit metallischen Kationen chemisch kompetent gemacht. Dazu wurden 100 mL LB mit 20 mM MgSO<sub>4</sub> mit einer Einzelkolonie angeimpft und bei 250 rpm und 37 °C bis zu einer o.D.600 0,9 kultiviert. Die Zellen wurden 2 min in Eiswasser geschwenkt und anschließend 30 min auf Eis inkubiert. Nach 10 minütigem Zentrifugieren bei 4 °C und 2500 rpm wurde das Pellet in 30 mL MES-Puffer (500 mM MES (N-Morpholino)-ethansulfonsäure), 30 mM CaCl<sub>2</sub>\*2 H<sub>2</sub>O, 22 mM MnCl<sub>2</sub>\*4 H<sub>2</sub>O, 10% Glycerol, pH 6,3 (mit KOH)), resuspendiert und erneut 10 min auf Eis inkubiert.



Die Zellen wurden 10 min bei 2500 rpm und 4 °C abzentrifugiert und in 8 mL MES-Puffer resuspendiert, aliquotiert und bei – 70 °C gelagert.

### 2.2.7 Transformation von *E. coli*

Präparierte Plasmid-DNA wurde in kompetente *E. coli*-Zellen eingebracht, wobei die Zellen einem Hitzeschock unterzogen wurden. Dazu wurden 100 µL kompetente Zellen auf Eis aufgetaut und mit 100 ng Plasmid-DNA versetzt und für 30 min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock für 2 min bei 42 °C wurden die Zellen auf Eis abgekühlt. Nach Zugabe von 700 µL LB-Flüssigmedium wurden die Zellen für 60-90 min bei 37 °C geschüttelt. Der gesamte Transformationsansatz wurde auf LB-Platten mit dem jeweiligen Antibiotikum zur Selektion ausplattiert und ü.N. bei 37 °C belassen.

### 2.2.8 Verifizierung der DNA-Konstrukte

Klonierungen wurden durch DNA-Sequenzanalyse verifiziert. Dazu wurde isolierte Plasmid-DNA auf eine Konzentration von 50 µg/ml gebracht und extern durch die Firma GATC sequenziert. Die Sequenzen wurden mit Hilfe der 4-Peaks-Software analysiert und auf Sequenzfehler untersucht.

### 2.2.9 Verwendete Oligonukleotide

Name	Primersequenz 5' => 3'	Restriktions-schnittstelle	Beschreibung
Rh1-2NotIRev	GGCAGCGGCCGCTTATCCA CGGGCCTG	<i>NotI</i>	Reverse-Primer zur Amplifizierung der 70. – 900. Base von <i>ynjE</i>
Rh3EcoRIFw	GCGGGAATTCGCTGCTGCA TCGC	<i>EcoRI</i>	Forward-Primer zur Amplifizierung der 900. – 1305. Base von <i>ynjE</i>
XhoI-ynjEΔ21-	CGCTCGAGGCTGAACTGGC	<i>XhoI</i>	Primer zur Ampli-

FW			fizierung von <i>ynjE</i>
YnjE-XhoI-Rev	GACAGTAGCAAATAAGTCG ACGC	<i>XhoI</i>	ohne die ersten 69 Basen
DN21ynjE-Fw	T <u>AGGATCCG</u> TGGGCCGCTG AA	<i>Bam</i> HI	(führt zu YnjE ohne Signalpeptid)
DN21ynjE-Rev	ATGCGGCCGCTTATTTGCTA CT	<i>NotI</i>	
YD1-21EcoRI-Fw	GGGAATTCGGCTGAACTGG CGAAG	<i>Eco</i> RI	
YPaulc385a-Rev	GACGCGCGCCAGCCGGTG CCGGCGTAGAA	Paul	Reverse-Primer zur Erstellung eines Cystein zu Alanin austausches in YnjE

**2.2.10 Verwendete Plasmide:**

Name	Restriktions-schnittstellen	Beschreibung	Referenz
pEB327	-	Plasmid zur Erstellung N-terminal fusionierter TAP-Konstrukte	Gully <i>et al.</i> , 2003
pACYC-Duet1	-	Expressionsplasmid	Novagen
pEB327TapynjE	<i>XhoI/XhoI</i>	Konstrukt zur Expression von YnjE mit N-terminalem TAP-Fusionspolypeptid	diese Arbeit
pACYC-Duet1Δ1-21ynjE	<i>Bam</i> HI/ <i>NotI</i>	Konstrukt zur Expression von YnjE mit N-terminalem 6xHistidin-Fusionspolypeptid	diese Arbeit
pACYC-Duet1C385A	<i>Eco</i> RI/ <i>NotI</i>	Konstrukt zur Expression einer Cystein 385 zu Alanin YnjE-Mutante mit N-terminalem 6xHistidin-Fusionspolypeptid	diese Arbeit
pACYC-Duet1Rh1-2ynjE	<i>Eco</i> RI/ <i>NotI</i>	Konstrukt zur Expression einer YnjE-Mutante mit N-terminalem	diese Arbeit

		6xHistidin-Fusionspolypeptid und deletierter C-terminaler Rhodanese-ähnlicher domäne	
pACYC-Duet1Rh3ynjE	<i>EcoRI/NotI</i>	Konstrukt zur Expression der C-terminalen Rhodanese-ähnlichen Domäne von YnjE mit N-terminalem 6xHistidin-Fusionspolypeptid	diese Arbeit
pET15b-MoaD	-	Konstrukt zur Expression von MoaD	Wuebbens <i>et al.</i> , 2003
pTrcHishSO	-	Konstrukt zur Expression der humanen Sulfidoxidase	Temple <i>et al.</i> , 2000

### 2.2.11 Verwendete Bakterienstämme:

<i>E. coli</i> -Stämme	Genotyp	Referenz
MC1061	<i>F<sup>-</sup> araD139Δ(ara leu) 7696 Δ(lac Y74) galU galK hsdR hsdM<sup>+</sup> strA</i>	M. Casadaban (1980)
<i>DynjE/csdA/sufS (CL102)</i>	Derivat vom MC1061	Lauhon (2004)
<i>DynjE (JLD42301)</i>	Derivat vom MC1061	Donahue (2005)
<i>DynjE/DiscS (PJ18)</i>	Derivat vom MC1061	Donahue (2005)
<i>DiscS (CL100)</i>	Derivat vom MC1061	Lauhon (2004)
<i>csdA/sufS</i>	Derivat vom MC1061	Lauhon (2004)
BI21 (DE3)	<i>F<sup>-</sup>, ompT, r<sub>B</sub><sup>-</sup> m<sub>B</sub><sup>-</sup> hsdS, gal (λclts857, ind1, San7, nin5, lac UV5-T7 gene 1)</i>	Studier & Moffatt (133)
DH5a	<i>supE 44Δlac U169 (Δ80lacZ ΔM15) hsd R17 recA endA1 gyrA96 thi-1 relA</i>	Hanahan <i>et al.</i> , 1983
moeB- (DE3)	<i>MJ421 (MJ7 (F<sup>-</sup> rpsL) chIN (25) (DE3)</i>	Johnson and Rajagopalan 1987

## 2.3 Proteinbiochemische Methoden

### 2.3.1 Expression und Aufreinigung rekombinanter Proteine in *E. coli*

Zur Proteinaufreinigung wurden verschiedene Methoden angewendet. Die Proteine wurden zunächst über Ammoniumsulfatfällung oder Affinitäts-Chromatographie (His-tag) vorgereinigt und anschließend über Gel-Filtration oder Anionenaustauscher-Chromatographie aufgetrennt. Für Anionenaustauschchromatographie wurde eine Q-Sepharose Säule (GE-Healthcare) verwendet. Größenausschlusschromatographische Auftrennung erfolgte mittels einer Superose 12 Gelfiltrationssäule. Beide Verfahren wurden mit Hilfe einer FPLC (ÄktaBasic bzw. ÄktaPrime, GE-Healthcare) durchgeführt. Die Reinigungsschritte der YnjE-Varianten sind im Detail nachfolgend beschrieben. Die Reinigung der übrigen Proteine erfolgte nach bereits etablierten Protokollen. (Flint *et al.*, 1996; Rudolph *et al.*, 2001; Leimkühler *et al.*, 2001; Outten *et al.*, 2003; Loiseau *et al.*, 2005; Temple *et al.*, 2000) Die Grundlegenden Reinigungsschritte und die entsprechenden Referenzen sind in **Tabelle 1** zusammengefasst.

### 2.3.2 Konzentrierung von Proteinlösungen

Die Ankonzentrierung von Proteinlösungen erfolgte mit Hilfe von Zentrifugations-Konzentratoren. Für kleine Volumina bis 2 ml wurden Centricon-, für bis zu 15 ml Centriprep-Konzentratoren (beide Amicon) mit einem Ausschlussvolumen von 3 - 30 kDa entsprechen den Angaben des Herstellers eingesetzt.

### 2.3.3 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Konzentration gereinigter Proteine ist mit Hilfe des berechneten molaren Extinktionskoeffizienten, welcher aus der Primärsequenz bestimmt werden kann (ProtParam; <http://expasy.org/tools/protparam.html>), und des Molekulargewichts durch eine Absorptionsbestimmung bei 280 nm am Spektralphotometer nach Gill & Hippel (127) ermittelt worden. Die Beziehung von Proteinkonzentration und Extinktion bzw. Absorption beschreibt das Lambert-Beersche Gesetz (**Gleichung 1**). Es müssen die Schichtdicke der Küvette sowie der Extinktionskoeffizient, eingesetzt werde

$$E = \varepsilon * c * d$$

### Gleichung 1: Lambert-Beersches Gesetz

Über das Lambert-Beersche Gesetz kann die Proteinkonzentration über die Extinktion errechnet werden, wenn der Extinktionskoeffizient bekannt ist. Die Schichtdicke der Küvette betrug in dieser Arbeit immer 1 cm. Extinktion E; Extinktionskoeffizient  $\varepsilon$ ; Proteinkonzentration  $c$  in g/mol; Schichtdicke  $d$  in cm.

Die Quantifizierbarkeit beruht auf der Absorption der  $\pi$ -Elektronensysteme der aromatischen Aminosäuren Tryptophan und Tyrosin. Die Extinktionskoeffizienten und molaren Massen der in dieser Arbeit gereinigten Proteine sind in **Tabelle 1** zusammengefasst.

Protein	Extinktionskoeffizient in $M^{-1} \times cm^{-1}$ (280nm)	Molare Masse in Da	Reinigungsschritte
His-YnjE $\Delta$ 1-21	119860	47805	Ni-NTA-Reinigung und Anionenaustauschchromatographie
His-YnjERh1-2	61420	32435	Ni-NTA-Reinigung und Gelfiltration
His-YnjERh3	52940	16656	Ni-NTA-Reinigung und Gelfiltration
IscS	39520	45100	Ammoniumacetatfällung, Anionenaustauschchromatographie und Gelfiltration; Flint <i>et al.</i> , 1996; Rudolph <i>et al.</i> , 2001; Leimkühler <i>et al.</i> , 2001
MoeB	8160	26700	
MoaE	39042	16995	
MoaD	6787	8758	
CsdA	47180	43200	Ni-NTA-Reinigung und Gel-

SufS	47890	44400	filtration; Loiseau <i>et al.</i> , 2005; Outten <i>et al.</i> , 2003
CsdE	15940	13980	
SufE	15800	21095	
hSO	-	53885	Ni-NTA-Reinigung; Temple <i>et al.</i> , 2000

**Tabelle 1: Verwendete Proteine**

### 2.3.4 Heterologe Expression und Reinigung der YnjE-Varianten

#### 2.3.4.1 Die Reinigung der Varianten His<sub>6</sub>YnjEΔ1-21 und His<sub>6</sub>YnjEΔ1-21C385A

Das Rhodanese-ähnliche Protein YnjE wurde ohne Signalpeptid mit N-terminalem His<sub>6</sub>-Fusionspolypeptid gereinigt. Zunächst wurde ein BamHI/NotI PCR-Fragment (DN23ynje-Fw- und DN23ynje-Rev-Primer) in den pACYC-Duet1-Vektor (Novagen) kloniert und in den *E. coli* BI21 Expressionstamm durch Transformation überführt. Für die Variante His<sub>6</sub>YnjEΔSigC385A wurde die Primer YD1-21EcoRI-Fw und YPaulc385a-Rev zur Amplifikation eines ynjE-Fragmentes verwendet, welches die DNA-Sequenz der aktiven Schleife umfasst und in welchem durch Sequenzmodifikation des Reverseprimers das Codon für Cystein (TGC) zu einem Codon für Alanin (CCG) ausgetauscht wurde. Dieses Fragment umfasst die 70. Bis 1176. Base des ynjE-Gens. Für die Klonierung des vollständigen ynjE wurde eine endogene Paul-Restriktionsschnittstelle genutzt. Nach Zwischenklonierung in pJET1 (Fermentas), wurde ein EcoRI/Paul-Fragment ausgeschnitten und in den zuvor EcoRI/Paul geschnittenen und gereinigten Vektor pACYC-Duet1ΔsigynjE kloniert. Dabei wurde die Vektor-eigene EcoRI-Schnittstelle genutzt (Klonierungsstrategie im **Abbildung 3.18**). Die erfolgreiche Einführung der Cystein zu Alanin-Mutation wurde durch Sequenzanalyse überprüft. Durch Transformation wurde pACYC-Duet1C385A in kompetente Zellen des BI21-Stammes überführt.

Eine Vorkultur aus diesen Zellen in 50 ml LB-Medium und 50 mg/L Chloramphenicol wurde über Nacht bei 37 °C angezogen und in einer 1:100 Verdünnung zum Beimpfen einer 2 L Hauptkultur verwendet. Die Hauptkultur wurde bei 30 °C bis zu einer Zelldichte von OD<sub>600</sub> = 0,5 bei 150 rpm geschüttelt. Die Proteinexpression wurde dann durch Zugabe von 300 μM IPTG gestartet. Nach 3-4 h Expression bei 30 °C wurde die

Kultur bei 4°C durch Zentrifugation bei 8000 rpm sedimentiert. Das Pellet wurde anschließend in 50 mM Natriumphosphat-Puffer pH 8,0 vollständig resuspendiert. Der Zellaufschluss erfolgte mittels dreimaliger Passage durch eine french press. Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation bei 20000 x g abzentrifugiert und der Überstand, welcher die löslichen Proteine enthielt dekantiert. Da das überexprimierte YnjE eine N-terminale 6xHistidin Fusion trug, wurde die Proteinlösung einer Ni-NTA Affinitätschromatographie unterzogen. Nach Überführung der Matrix (10 ml) in eine Tropfsäule folgte die Equilibrierung mit 50 mM Natriumphosphatpuffer pH 8,0; 300 mM NaCl, 10 mM Imidazol. Die equilibrierte Matrix wurde mit dem zellfreien Proteinrohextrakt versetzt und eine Stunde inkubiert. Durch Waschschriffe mit 50 mM Natriumphosphat pH 8,0; 300 mM NaCl, 10 mM Imidazol bzw. 20 mM Imidazol wurden schwach gebundene Proteine von der Ni-NTA-Matrix getrennt. Spezifisch gebundenes His<sub>6</sub>YnjE $\Delta$ Sig wurde mittels Natriumphosphatpuffer pH 8,0; 300 mM NaCl, 250 mM Imidazol eluiert. Weiter aufgereinigt wurde mittels Größenausschluss- oder Anionenaustausch-Chromatographie. Für die Größenausschlusschromatographie wurde eine Superose 12-Gelfiltrationssäule verwendet. Die Ni-NTA-gereinigte YnjE Proteinlösung wurde in Ni-NTA-Elutionspuffer aufgetragen und mit einer Flussrate von 1 ml/min per FPLC aufgetrennt. Dabei wurde die Absorption der aromatischen Aminosäuren bei 280 nm gemessen und das Eluat fraktioniert. Fraktionen aus Absorptionsmaxima wurden im SDS-PAGE analysiert. Für die Anionenaustauschchromatographie wurde das YnjE-Eluat der Ni-NTA-Chromatographie zunächst gegen 50 mM Tris-HCl-Puffer pH 7,5 über Nacht bei 4 °C dialysiert. Die Q-Sepharose-Matrix wurde im gleichen Puffer equilibriert. Die Chromatographie wurde mit einer Flussrate von 3 ml/min durchgeführt. Da ein deutlicher Reinigungseffekt ohne Bindung des YnjE-Proteins an die Matrix erreicht werden konnte, war ein Elutionspuffer ausschließlich zur Elution verunreinigender Proteine zur Regeneration der Säulenmatrix notwendig. Hierzu wurde 50 mM Tris-HCl pH 7,5; 1M NaCl verwendet. Der Reinheitsgrad wurde mittels SDS-PAGE überprüft, saubere Fraktionen gepoolt, ankonzentriert und 200  $\mu$ L -Aliquots bei - 80°C gelagert.

#### **2.3.4 Zellfraktionierung**

Für die Fraktionierung von *E. coli*- Kulturen wurde ein vereinfachtes Protokoll auf Grundlage der Methode nach Rouviere und Gross (1996) erstellt. 100 ml (für die Lokalisierung endogenen und die Lokalisierung überexprimierten YnjEs) LB-Medium

wurden mit einer Einzelkolonie des zu untersuchenden *E. coli* Stammes beimpft und das entsprechende Antibiotikum zugesetzt. Die Kultur wurde dann bei 30 ° C und 150 rpm bis zu einer relativen Zelldichte von  $OD_{600} = 0,3$  geschüttelt. Kulturen von Stämmen, welche rekombinante Proteine exprimieren sollten wurden durch Zugabe von 300  $\mu$ M IPTG zur Expression angeregt. In hSO-Expressionsstämmen wurden zusätzlich 1 mM  $NaMO_4$  zugesetzt, um die ausreichende Versorgung der Moco-Biosynthese mit Molybdän sicherzustellen. Bei einer Zelldichte von  $OD_{600}=0,8$  wurden die Kulturen bei 4°C und 5000 x g sedimentiert. Das Pellet wurde dann in 20 mM Tris-HCl-Puffer pH 7,5, 100 mM NaCl; 20% Saccharose resuspendiert und gewaschen. Anschließend folgte eine Inkubation mit 20  $\mu$ g/ml Lysozym für 30 min bei 4°C um die Zellwand zu verdauen. Nach Zugabe von 20  $\mu$ M  $Mg_2So_4$  wurde der Ansatz in vorbereitete 10 ml Falcon-Röhrchen überführt, welche eine 50 prozentige Saccharoselösung enthielten (1 ml). Durch Zentrifugation bei 5000 x g für 10 min konnten dann die Spheroplasten sedimentieren, während die lösliche periplasmatische Fraktion als Überstand dekantiert werden konnten. Eine Trennung von Cytoplasma und Cytoplasmamembran wurde nicht vorgenommen. Die Spheroplastenfraktion wurde erneut mit 20mM Tris-HCl-Puffer gewaschen, um Reste des Periplasma zu entfernen. Nach Zentrifugation bei 5000g für 10 min, wurde das Pellet in 5 ml 100mM Tris-HCl pH 7,2 resuspendiert und durch Sonifizieren aufgeschlossen. Zelltrümer wurden abzentrifugiert und der Überstand des Spheroplasten-Aufschlusses sowie die Periplasmafraktion durch Ankonzentrieren auf ein gleiches Volumen von 1 ml gebracht. Je 10  $\mu$ l der Fraktionen wurden dann mittels SDS-PAGE separiert und mit Hilfe eines YnjE Antiserums das YnjE-Protein im Immunoblot lokalisiert. Eine Überprüfung auf die erfolgreiche Separierung erfolgte mittels Immunoblot unter Verwendung eines monoklonalen Maltosebindeprotein (MBP)-Antikörpers. Dazu wurden die entsprechenden Kulturen während der Anzucht mit 0,2% (w/v) Maltose versetzt um die Bildung des MBP anzuregen.

### **2.3.5 Herstellung Zellfreier Rohextrakte**

Ein möglichst vollständiger Zellaufschluss ist Grundvoraussetzung für die effiziente Reinigung eines rekombinanten Proteins oder für die die Isolierung von Nukleinsäuren. Es wurden in dieser Arbeit chemische, mechanische und biologische Zellaufschluss-Methoden angewendet. Die sedimentierten *E. coli*-Zellkulturen wurden in 30 ml Puffer resuspendiert. Es wurde ein Puffer gewählt, den die jeweils folgenden Experimente erforderten. Für anschließende Ni-NTA-Chromatographie wurde 50 mM Tris, pH 8,0;



für Ammoniumsulfatfällungen 50 mM Tris pH 7,5; und für alle übrigen Anwendungen 100 mM Tris, pH 7,2 verwendet.

#### 2.3.5.1 Mechanischer Zellaufschluss durch French Press

Der Zellaufschluss von Kulturen zur Expression und Reinigung Rekombinanter Proteine erfolgte durch Verwendung der French Press. Die Zellpellets nach der Zellernte wurden in etwa 30 ml Puffer resuspendiert. Der mechanische Aufschluß erfolgte durch 3-5 maliges Passagieren der Zellsuspension durch eine vorgekühlte French Press-Zelle bei 1200 psi (American Company, Maryland/USA). Zelltrümmer wurden anschließend bei 20 000 g für 30 min abzentrifugiert.

#### 2.3.5.2 Mechanischer Zellaufschluss durch Sonifizieren

Der Zellaufschluß der Spheroplasten nach der Zellfraktionierung erfolgte durch Sonifikation. Die Proben wurden auf Eis 10 Minuten sonifiziert. Dabei wurde ein Puls von 1s gewählt. Nach dem Sonifizieren, wurden die Zelltrümmer bei 20.000 g für 30 min abzentrifugiert.

#### 2.3.5.3 Chemischer Aufschluss durch alkalische Lyse

Für die Isolierung von Plasmiden aus *E. coli* wurde eine alkalische Lyse durchgeführt. Es wurde das Plasmidpräparationskit NucleoSpin® Plasmid (Macherey-Nagel) verwendet, so dass der Aufschluss mit den entsprechenden mitgelieferten Puffern nach Herstellerangabe erfolgte.

## 2.4 Analytische Methoden

### 2.4.1 Isothermale Titrationskalorimetrie

Mit der isothermalen Titrationskalorimetrie ist es möglich, die Wärmeänderung durch die

Bindung zweier Proteine zu bestimmen. Dabei wird der Wärmefluß (in J/sec) gemessen, der benötigt wird, um die Temperatur des adiabatischen Systems zwischen der Referenzzelle und der Meßzelle während des Versuches konstant zu halten. Daher ist es möglich,  $\Delta H$  direkt aus der Messung abzulesen und die Bindungskonstante des Komplexes sowie seine Stöchiometrie zu berechnen.

Für die ITC-Analysen wurden alle Proteinproben über Nacht gegen 100 mM Tris, 100 mM

NaCl, pH 7,5 dialysiert und anschließend die exakte Proteinkonzentration bestimmt. Die Messungen erfolgten an einem VP-ITC-Gerät (MicroCal) mit einer 1,44 mL Meßzelle bei 25 °C. In die Meßzelle mit 15  $\mu\text{M}$  MoaE wurden in einem Volumen von 10  $\mu\text{L}$  150  $\mu\text{M}$  MoaD gegeben bis ein molares Verhältnis von MoaD zu MoaE von mind. 1:2 erreicht war (26-30 Injektionen). Als Negativkontrolle wurden 15 bzw. 20  $\mu\text{M}$  BSA in die Meßzelle gegeben und MoaD/MoaD-SH als Ligand dazu titriert.

### 2.4.2 Analytische Ultrazentrifugation

Die analytische Ultrazentrifugation ermöglicht die Untersuchung der Konzentrationsverteilung von gelösten Makromolekülen, in diesem Fall des YnjE-Proteins, unter dem Einfluß starker Zentrifugalkräfte. Die Zentrifuge ist dazu mit einem optischen System ausgestattet, das es erlaubt, während der Zentrifugation Messungen der lokalen Protein-Konzentration in der Probe durchzuführen. Mittels des hier verwendeten photoelektrischen Scanners ist die Absorption des gelösten YnjE messbar und damit eine der Molekülkonzentration proportionale Größe. Es wurde eine Sedimentations-Geschwindigkeits-Messung durchgeführt. Durch die Messung der Ausbreitungsgeschwindigkeit der YnjE-Konzentrationsmaxima ( $u$ ) wurde der Sedimentationskoeffizient ( $s$ ) YnjEs bestimmt (**Gleichung 2**). Die Auswertung der Messung geschah unter Verwendung der SEDFIT-Software ([www.analyticalultracentrifugation.com](http://www.analyticalultracentrifugation.com)). Aus den Sedimentationskoeffizienten-Verteilungen  $c(S)$  wurden so auch die Molekularmassen-Verteilungen  $c(M)$  kalkuliert.

$$s = \frac{u}{\omega^2 r}$$

### Gleichung 2: Berechnung des Sedimentationskoeffizienten

Die Gleichung beschreibt die Beziehung von Sedimentationskoeffizient (s) zu der Wanderungsgeschwindigkeit des Konzentrationsgradienten (u) in Abhängigkeit zur Winkelgeschwindigkeit des Rotors ( $\omega$ ), und dem Abstand des Konzentrationsmaximums zur Rotorachse (r). Der Sedimentationskoeffizient wird in Svedberg-Einheiten ( $S = 10^{-13}$  sec) angegeben.

Für die Auswertung der Messung wurde die SEDFIT-Software ([www.analyticalultracentrifugation.com](http://www.analyticalultracentrifugation.com)) verwendet. Aus den Sedimentationskoeffizienten-Verteilungen  $c(S)$  wurden die Molekularmassen-Verteilungen  $c(M)$  kalkuliert. Für die Messungen wurden 25  $\mu$ M His-YnjE $\Delta$ Sig in 50 mM Tris-HCl; pH 7,5 eingesetzt und der Zentrifugen-Lauf bei 20°C durchgeführt.

### 2.4.3 SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (SDS-PAGE)

Für die gelelektrophoretische Auftrennung von Proteinfractionen entsprechend ihres Molekulargewichtes wurden in dieser Arbeit diskontinuierliche Tris/Glycin-SDS-Gelsysteme zwischen 7,5 % und 12,5 % nach Laemmli (120) verwendet. Über einem Trenngel befindet sich ein großporiges Sammelgel, das einen um zwei Einheiten niedrigeren pH aufweist. Dies ermöglicht eine Konzentrierung der Proteinproben. Als Ampholyt dient Glycin. Die zu analysierenden Proteinlösungen wurden dazu mit SDS-PAGE-Ladepuffer (50 % Glycerin; 3,5 % SDS; 15 %  $\beta$ -Mercaptoethanol; 0,02 % Bromphenolblau) versetzt und für 5 - 7 min bei 95 °C denaturiert. Die Proteine werden unter denaturierenden und reduzierenden Bedingungen aufgetrennt. SDS verfügt dabei über eine negative Eigenladung und entfaltet die Proteine, indem es an die hydrophoben Bereiche bindet und dementsprechend die ursprüngliche Ladung des Proteins vernachlässigt werden kann. Die Auftrennung erfolgte bei 100 V. Im Anschluss sind die aufgetrennten Proteine im Gel mit Coomassie-Lösung angefärbt worden.

Ansatz für ein 15%iges Glycin-Trenngel:

- 1,25 mL ddH<sub>2</sub>O
- + 2,5 mL Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung (30% (w/v) 0,8%(w/v))
- + 1,25 mL 4 x Lower Tris
- + 10 µL TEMED
- + 25 µL 10 % (w/v) APS

Ansatz für ein Sammelgel:

- 1140 µL ddH<sub>2</sub>O
- + 500 µL 4x Upper Tris
- + 340 µL Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung (30 % (w/v) 0,8 % (w/v))
- + 3 µL TEMED
- + 10 µL 10 % (w/v) APS

#### **2.4.4 Identifizierung von Proteinen im Immunoblot**

Nach erfolgter SDS-PAGE wurden die Gele für ca. 10 min in Transferpuffer (10 % EtOH in Tris/Glycin) äquilibriert. Für den Transfer der Proteine auf die Trägermembran (Hybond<sup>TM</sup>-P Amersham/Pharmacia; Roti<sup>®</sup>-PVDF, Roth) wurden in Transferpuffer getränktes Whatman-Papier und das SDS-Gel luftblasenfrei auf die Apparatur gelegt, bevor die Membran (zuvor mit EthOH benetzt, mit H<sub>2</sub>O gewaschen und in Transferpuffer äquilibriert) aufgebracht wurde. Bei 250 mA wurde für 40 min geblottet. Nach dem Waschen des Blots in TBS-Lösung (10 mM Tris-HCl, pH 7,5; 150 mM NaCl) wurde die Membran für eine Stunde bei Raumtemperatur in Blockierungslösung (5 % Milchpulver in TBS) inkubiert. Der primäre Antikörper bzw. das Antiserum wurde 1:2000 in Blockierungslösung verdünnt und die Blotmembran für 1-2 Stunden unter schwenken inkubiert. Unspezifisch gebundene Antikörper wurden durch dreimaliges Waschen der Membran für 10 min in TBST (0,1 % Tween 20; in TBS) und 2 x 10 min in TBS entfernt. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem sekundären mit Alkalischer Phosphatase konjugierten Antikörper Anti-Maus-IgG (Sigma) bzw. Anti-Kaninchen IgG (Sigma) für 1 h bei RT unter Schwenken. Nach erneutem Waschen erfolgte die Färbereaktion der alkalischen Phosphatase durch eine Benetzung der Membran mit ca. 10 ml BCIP/NBT-Reaktionslösung (100 mM Tris-HCl,

pH 8,8; 100 mM NaCl; 6,4 mM MgCl<sub>2</sub>) nach Zugabe von 66 µl NBT/10 ml (Promega) und 33 µl BCIP/10 ml (Promega). Durch Entfernen der Färbelösung und anschließendem Waschen mit H<sub>2</sub>O wurde die Reaktion gestoppt.

#### **2.4.5 Verwendete Antikörper bzw. Antiseren**

In dieser Arbeit sind als primäre Antikörper ein im Zuge dieser Arbeit in Kooperation mit der AG-Micheel (AG Biotechnologie; Universität Potsdam) erstelltes murines YnjE-Antiserum, ein monoklonaler Maltosebindeprotein-Antikörper, der polyklonale Anti-MoeB-Antikörper aus Kaninchen und der polyklonale Anti-MoaD-Antikörper aus Kaninchen für die Detektion rekombinanter und endogener Proteine verwendet worden.

#### **2.4.6 Assay zum Nachweis von MPT mittels High-Pressure-Liquid-Chromatography (HPLC)**

Sowohl Molybdopterin (MPT) als auch der Molybdäncofaktor (Moco) selbst sind durch ihr Pteringerüst und die Dithiolen-Gruppe oxidationssensitiv und damit chemisch instabil. Aus diesem Grund findet der Nachweis über ein stabiles Oxidations-Derivat, das durch saure KI/I<sub>2</sub>-Oxidation entstehende „Form A“, statt. FormA kann direkt aus Moco oder seiner Vorstufe MPT generiert werden. Die saure Oxidation von MPT mit I<sub>2</sub>/KI (1 M HCl) führt zu dem stabilen Produkt FormA, welches eine detektierbare Fluoreszenz aufweist. Da Fluoreszenzmessungen extrem sensitiv sind, können auch geringere Mengen detektiert werden. Für die *in vitro* Versuche Precursor Z zu MPT zu konvertieren, wurde dieser je nach Ansatz mit inaktiver MPT-Synthase, MoeB, MgATP sowie einer Rhodanese oder Sulfurtransferase 30 min. bei Raumtemperatur in 100 mM Tris/HCl, pH 7.2 in einem Gesamtvolumen von 400 µl inkubiert und das entstandene MPT als Form A-dephospho detektiert. Dazu wurden 50 µl einer wässrig sauren I<sub>2</sub>/KI -Lösung (1% I<sub>2</sub> / 2% KI in 1 M HCl) in einem Reaktionsgefäß vorgelegt, mit dem 400 µl Ansatz aufgefüllt und über Nacht bei RT im Dunkeln inkubiert. Das ausgefallene Protein und andere Niederschläge sind durch 5-minütige Zentrifugation bei 12000 x g pelletiert worden. Der Überstand wurde in ein anderes Reaktionsgefäß überführt, in dem 55 µl einer frisch angesetzten Ascorbinsäurelösung (1 % in ddH<sub>2</sub>O)

vorgelegt war. Durch Zugabe von 200  $\mu\text{l}$  1 M Tris wurde der pH-Wert der Lösung auf ca. 8,3 eingestellt bevor 16  $\mu\text{l}$  1 M  $\text{MgCl}_2$  zugesetzt wurden. Anschließend sind 0,5 U einer alkalischen Phosphatase (AP)-Lösung in den Ansatz gegeben worden, was zu einer Abspaltung der terminalen Phosphat-Gruppe führte. Die Inkubation erfolgte für mindestens 30 min. bei Raumtemperatur im Dunkeln. Nach vollständigem Einsinken ist das gebundene Form A-dephospho mit 2 ml 10 mM Essigsäure eluiert worden. Zur Untersuchung und Quantifizierung der Form A-dephospho Proben wurden 100  $\mu\text{l}$  auf eine HPLC C18 Reverse Phase Column (4,6 x 250 mm, Hypersil-ODS-Particle, 5  $\mu\text{m}$ ) aufgetragen. In dieser Arbeit wurde eine HPLC-Anlage der Agilent Technologies Serie 1100 benutzt. Die Flussrate betrug 1 ml / min. Der Laufpuffer bestand aus 90 % 50 mM  $\text{NH}_4$ -Acetat und 10 % Methanol. Zur Detektion und Quantifizierung der Proben wurde ein Fluoreszenzdetektor der HPLC 1100 Serie von Agilent genutzt.

#### 2.4.7 CD-Spektroskopie

Proteine sind optisch aktive Chromophore, die rechts und links polarisiertes Licht unterschiedlich absorbieren. Dies führt dazu, daß zirkular polarisiertes Licht elliptisch polarisiert wird. Mit Hilfe der CD-Spektroskopie kann die Sekundärstruktur von Proteinen analysiert werden. Jedes Sekundärstrukturelement eines Proteins ( $\beta$ -Faltblatt,  $\alpha$ -Helix) weist dabei ein eigenes, charakteristisches CD-Spektrum auf. Für die Messungen wurden 0,2 mg/mL Proteinlösung in einem Volumen von 150  $\mu\text{L}$  (in 20mM Tris-HCl, pH 7,2) an einem Jasco-J810 CD-Spektrometer in einem Wellenlängenbereich von 190-260 nm vermessen. Dabei sind folgende Parameter festgesetzt worden: Data Pitch: 0,2 bzw. 0,5 nm; Scan Speed: 10 nm/sec; Response: 2; Bandwidth: 1; Accumulations 3. Die Hintergrund-Spektren der Proben ohne Enzym wurden von den vermessenen Spektren subtrahiert.

Für die Hauptkomponenten von Proteinsekundärstrukturen,  $\alpha$ -Helix und  $\beta$ -Faltblatt, ergeben sich Referenzspektren mit charakteristischen Maxima und Minima. Liegt eine dieser beiden Strukturen in einem Protein zum überwiegenden Teil vor, entspricht das Spektrum des vermessenen Proteins dem jeweiligen Referenzspektrum (**Tabelle 2**).

Struktur	Maximum bei	Minimum bei
überwiegend $\alpha$ -Helix-Strukturen	195 nm	210 nm 220 nm
überwiegend $\beta$ -Faltblatt-Strukturen	215 nm	

**Tabelle 2: Charakteristische Maxima und Minima der Lichtdrehung**

$\alpha$ -helicale Strukturen und  $\beta$ -Faltblatt-Strukturen eines Proteins zeigen im CD-Spectrum typische Maxima und Minima der Lichtdrehung

#### 2.4.8 ESI-Massenspektrometrie

Die massenspektroskopischen Analysen in der vorliegenden Arbeit wurden am Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung (Braunschweig) durch Dr. Manfred Nimtz durchgeführt. Bei einem Elektrospray-Ionisations-Massenspektrometer (ESI-MS) erfolgt die Desolvatisierung der Ionen durch kontinuierliche Zuführung des gelösten Analyten an der Spitze einer leitfähigen Kapillare. Ein angelegtes elektrisches Feld zwischen Kapillarspitze und Massenspektrometer durchdringt die Analytlösung und trennt die Ionen. Bei einem ausreichend hohen elektrischen Feld bildet sich ein sogenannter Taylor-Kegel. Aus diesem Kegel lösen sich geladene Tröpfchen ab, die durch Verdunstung immer kleiner werden. Dadurch werden die Ionen zusammengedrängt und es kommt zur Coulomb-Explosion, bei der das Tröpfchen in kleinste Tröpfchen explodiert. Reste der Lösungsmittelmoleküle werden dadurch entfernt und die Analytmoleküle zum Massenspektrometer transferiert.

#### 2.4.9 Bestimmung der Cystein-Desulfurase-Aktivität

Für Messungen der Cysteindesulfuraseaktivität wurde der Methylenblau-Assay durchgeführt (Fogo und Pokowski, 1949; Urbina *et al.*, 2001). Der Methylenblau-Assay erlaubt das von den Desulfurasen mobilisierte Persulfid durch Bildung von

Methylenblau photometrisch zu quantifizieren. Zunächst wird *in vitro* ein Reaktionsansatz in entsprechendem Puffer bestehend aus L-Cystein, Cysteindesulfurase und Enhancer-Protein erstellt sowie Dithioretinol (DDT) zugegeben und für 20 min inkubiert. Die Cysteindesulfurase mobilisiert dabei Schwefel von L-Cystein und bindet ihn in Form von Persulfid. Die Zugabe Salzsäure (HCl) führt zur Freisetzung des säurelabilen Sulfids. Die Methylenblau-Reaktion unter Verwendung von N,N,-Dimethylphenyldiamin als Ausgangsverbindung sowie FeCl<sub>3</sub> in 25-prozentiger HCl-Lösung führt zur Bindung des freien Sulfids wodurch Methylenblau entsteht, welches unter den sauren Assay-Bedingungen in oxidierte Form vorliegt und somit als Blauer Farbstoff photometrisch detektiert werden kann. Die Proteine CsdA, SufE und IscS wurden alleine oder zusätzlich mit je einem der drei Proteine CsdE, SufE oder YnjE inkubiert. Nach 10 min wurde die Reaktion abgebrochen, und das gebildete Sulfid wie beschrieben in Methylenblau überführt. Aus den einzelnen Ansätzen wurde dann die optische Dichte bei 670 nm gemessen. Die Quantifizierung des gebildeten Methylenblaus erfolgte über eine Kalibrierungsreihe unter Verwendung von Natriumsulfid. Lösungen der Konzentration 5 µM, 10 µM, 20 µM, 25 µM und 50 µM wurden mit N, N,-Dimethylphenyldiamin und FeCl<sub>3</sub> versetzt. Das dadurch gebildete Methylenblau wurde dann Photometrisch bei 670 nm vermessen und anschließend die optische Dichte gegen die Natriumsulfidkonzentrationen aufgetragen. Durch lineare Regression wurde eine Gleichung zur Berechnung der Sulfidkonzentration in den zu analysierenden Proben abgeleitet.

#### **2.4.10 Bestimmung der Sulfitoxidase-Aktivität**

Die Cytochrom c-Reduktase Aktivität der in den *E. coli* Sulfurtransferase- bzw. YnjE-Mutantenstämmen heterolog exprimierten humanen Sulfitoxidase wurde mit einer Endkonzentration von 50 µmol Cytochrom c und einer Natriumsulfit-Konzentration von 400 µmol in einem Gesamtvolumen von 1 ml (20 mM Tris/Acetat, pH 8.0, 1 mM EDTA) durch Messung der Absorptionssteigerung bei 550 nm über 1 min verfolgt. Zur Berechnung der Enzymaktivität wurde der Cytochrom c-Umsatz (Extinktionskoeffizient  $\epsilon$  von 19630 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> bei 550 nm) mit der eingesetzten Enzymmenge bestimmt.



#### 2.4.11 Die „Tandem Affinity Purification“ (TAP) Methode

Die Tandem Affinity Purification (TAP) Methode ermöglicht es, Protein-Komplexe unter nativen Bedingungen schnell und schonend zu reinigen. Die Methode wurde ursprünglich von Puig *et al.* (2001) für *Saccharomyces cerevisiae* entwickelt und von Gully *et al.* (2003) für *E. coli* etabliert. Sie basiert auf der Fusion eines Köderproteins mit einem C- oder N-terminalen TAP-Tag. Der TAP-Tag besteht aus einer IgG-bindenden Domäne des *Staphylococcus aureus* Protein A (Prot A) und einer Calmodulin bindenden Domäne (CB). Beide Domänen sind durch eine TEV Protease cleavage site getrennt. Der N-terminale TAP-Tag besitzt eine zusätzliche Enterokinase (EK) cleavage site. Das Reinigungsprinzip der TAP-Methode beruht auf zwei Affinitätsschritten. Zunächst bindet die Protein A-Domäne des Köderproteins an eine IgG-Matrix. Anschließende Waschschriffe gewährleisten, dass nur spezifische Protein-Protein-Interaktionen bestehen bleiben. Durch die Inkubation mit einer TEV Kinase wird die Protein A-Domäne abgespalten und das Protein von der Matrix eluiert. Im zweiten Affinitätsschritt erfolgt die Bindung an eine Calmodulin-Matrix. Protein-Komplexe können durch EGTA eluiert werden. Die Elutionsfraktionen wurden anschließend anhand SDS-PAGE aufgetrennt und Coomassie gefärbt. Die sichtbaren Proteinbanden wurden aus dem Gel geschnitten, gewaschen, tryptisch verdaut und anhand Massenspektroskopie (MS) identifiziert. Die DNA-Sequenzen von YnjE ohne den DNA-Abschnitt, welcher für das Signalpeptid kodiert, wurde über die Restriktionsstelle *XhoI* in das zur Verfügung stehende Plasmid pEB327 kloniert. Bei pEB327 handelte es sich um einen pBAD24 Vektor mit einem N-terminalen TAP-Tag. In diesem Plasmid wird die Gentranskription durch den PBAD Promotor des *araBAD* Operon reguliert und die rekombinante Proteinexpression durch Arabinose induziert. Zur Proteinexpression wurden die hergestellten Konstrukte in den *E. coli* Mutantenstamm MC1061DYnjE, transformiert. Mit einer 10 ml-Übernachtskultur wurde eine 2-Liter Expressionskultur angeimpft und bei 30 °C wachsen gelassen. Bei einer OD600 von 0,8 wurde die Kultur mit 0,01 % Arabinose induziert und für 4 h exprimiert. Anschließend sind die Zellen geerntet, mit H<sub>2</sub>O gewaschen und in 20 ml IPP50-Prot.A Puffer (10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 50 mM NaCl, 0,1 % NP40) resuspendiert worden. Nach dreimaliger Passage durch eine French Press wurden die Zellen bei 20000 x g, 4 °C, für 30 min zentrifugiert. Der Überstand wurde mit 10 ml einer in IPP50-Prot.A Puffer-äquilibrierten IgG-Sepharose Matrix (Pharmacia) für 2 h bei 4 °C unter Schütteln inkubiert. Das Gemisch ist in eine Tropfsäule überführt und mit 5 x 10 ml IPP50-Prot.A Puffer gewaschen worden. Die gewaschenen Beads wurden mit 10 ml TEV-Puffer (GIBCO BRL) mit 100 U rTEV-Kinase (GIBCO BRL) für 2 h bei 16 °C

inkubiert. Der Überstand wurde auf 10 ml in IPP50-Calmodulin-binding-Puffer (10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 50 mM NaCl, 0,1 % NP40, 1 mM Mg-Acetat, 2 mM CaCl<sub>2</sub>) äquilibrierte Calmodulin-Matrix (Stratagene) gegeben und für 1 h bei 4 °C unter Schütteln inkubiert. Die Beads wurden anschließend mit 5 x 10 ml IPP50-Calmodulin-binding-Puffer gewaschen und die Proteinkomplexe durch IPP50-Calmodulin-Elutions-Puffer (10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 50 mM NaCl, 0,1 % NP40, 1 mM Mg-Acetat, 2 mM EGTA) in 1 ml Fraktionen eluiert. Die Elutionsfraktionen sind anschließend gepoolt, mit Centricon-Konzentratoren (3 kDa, Amicon) auf 300 µl ankonzentriert und auf ein 15 %iges SDS-PAGE aufgetragen worden. Die Coomassie-gefärbten Proteinbanden sind sauber aus dem Gel eluiert, mit ddH<sub>2</sub>O gespült und anhand Massenspektrometrie identifiziert worden.

#### **2.4.12 Ko-Immunpräzipitation bzw. Affinitätsreinigung von Proteinen der MPT-Synthese**

Durch spezifische Antikörper gegen einen der Interaktionspartner eines Proteinkomplexes, ist es möglich Bindungspartner dieses Proteins zu identifizieren. Dabei wird der Verlust der Löslichkeit der Antigen-Antikörper-Komplexe als Immunpräzipitation bezeichnet. In dieser Arbeit wurde der Antikörper an eine Protein G Sepharose-Matrix (GE-Healthcare) gebunden und das Experiment in Form einer Affinitätsreinigung in einer Tropfsäule durchgeführt. Es wurden 50 µl murines YnjE-Antiserum an 300 µl Protein G Sepharose in einem Volumen von 2 ml (100 mM Tris, pH 7,2) für 4 h bei 4 °C gekoppelt. Nach dem Koppeln ist der Ansatz mit 2 ml Puffer gewaschen worden. Ein Proteingemisch aus His6-YnjEDSig (40 µM) und MoeB, IscS, MoaE, MoaD wurde in equimolarer Konzentration von 50 µM in einem Volumen von 1 ml auf die Matrix gegeben und für 4h bei 4 °C inkubiert. Nachfolgend wurde der Ansatz mit 2 ml Puffer gewaschen. Die Elution der Proteinkomplexe erfolgte mittels 4 ml 500 mM Citratpuffer pH 2. Das Eluat ist anschließend auf ein Volumen von 100 µl ankonzentriert worden. Das Proteingemisch wurde anschließend in einem fünfzehnprozentigen SDS-PAGE analysiert.

#### **2.4.13 Proteinkristallation von YnjE**

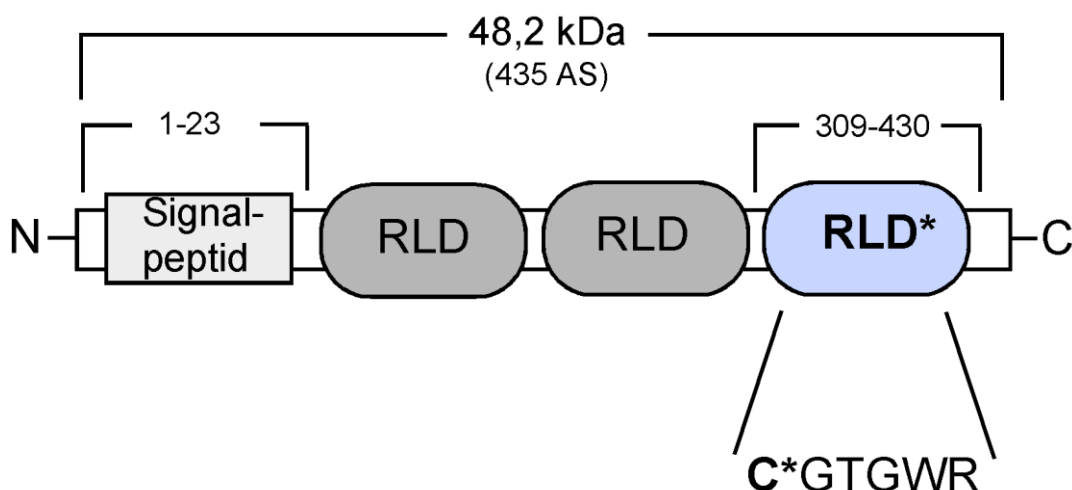
Die Kristallstrukturanalyse ermöglicht es den Aufbau eines Kristalls durch Beugung geeigneter Strahlung an dessen Kristallgitter zu bestimmen. Häufig wird hierfür

monochromatische Röntgenstrahlung verwendet. Es wird die Verteilung der Elektronen in der Elementarzelle des Kristalls bestimmt, da diese mit der Strahlung in Wechselwirkung treten. Aus dem beobachteten Beugungsmuster kann anschließend die Kristallstruktur berechnet werden. Dabei wird die Geometrie der Elementarzelle des Kristallgitters vollständig anhand der Winkel abgeleitet, unter denen die Beugungsmaxima auftreten. Aus der Stärke der Beugungsmaxima kann mittels verschiedener mathematischer Methoden die Anordnung der Atome innerhalb der Elementarzelle mit Hilfe der entsprechenden Software berechnet werden. Für die Röntgenstrukturanalyse eines Proteins ist es zunächst notwendig dieses in kristalline Form zu bringen. Dabei sollte idealerweise ein sogenannter makroskopischer Einkristall vorliegen, bei welchem die einzelnen Proteinmoleküle ein einheitliches Kristallgitter bilden. Damit sich ein Kristall bilden kann, muss das auszukristallisierende Protein zunächst in Übersättigung gebracht werden. Dies geschieht zum Beispiel durch Abkühlungsprozesse von Lösungen oder durch Variation des Lösungsmittels z.B. in Bezug auf den Salzgehalt. Das Kristallwasser der Proteinkristalle nimmt etwa 30–70 % des Kristallvolumens ein und liegt teilweise in flüssiger Form in den Hohlräumen zwischen den Proteinmolekülen vor. Proteinkristalle sind daher im Vergleich zu Ionen- oder Molekülkristallen sehr viel empfindlicher, was sowohl den Wasserverlust, als auch die mechanischen Eigenschaften betrifft. Die Voraussetzung zur Herstellung von Proteinkristallen sind ausreichende Mengen an hochreinem Protein. Wie in Abbildung **11B** dargestellt konnte das Protein YnjE in reiner Form in ausreichenden Mengen (10 mg/ml) hergestellt werden. Die Kristallisationsbedingungen findet man, indem man hochkonzentrierte Proteinlösungen (ca. 2–20 mg Protein/ml) mit verschiedenen Puffer-Lösungen, die zumeist sehr hohe Konzentrationen an Salzen (z. B. Ammoniumsulfat), Alkoholen (z. B. Ethanol und Methylpentandiol) oder Polyethylenglykol (PEG) enthalten, in kleinen Tropfen mit Volumina im Mikroliterbereich vermischt und bei konstanter Temperatur inkubiert. Für die Kristallisation wurden 10 mg/ml YnjE-Lösung in 100mM Tris-HCl-Puffer pH7,2 verwendet und der Hampton Crystal Screen (Hampton Research) durchgeführt. Dabei wurde die Methode des hängenden Tropfens auf Mikrotiterplatten angewandt. Die Ansätze wurden bei 24°C inkubiert und im Abstand von 24 Stunden auf das Wachstum von Kristallen unter dem Mikroskop untersucht. Proteinkristalle konnten unter Verwendung der Kristallisationspuffer 0,2 M Magnesiumacetat, 0,1 M Natriumcacodylat pH 6,5; 20% PEG 8000 bzw. 10% Isopropanol, 0,1 Natrium-Hepes pH 7,5; 20% PEG 4000 erzeugt werden. Ein Wachstum war nach 5-10 Tagen bei 24°C zu beobachten.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Charakteristika YnjEs und verwendete YnjE-Varianten

Das Protein YnjE ist eines der Rhodanese-ähnlichen Proteine *E. coli*s, dessen physiologische Funktion bislang nicht bekannt ist. Mit einer molaren Masse von 48228 Da umfasst das Protein 435 Aminosäuren. YnjE ist in drei Rhodanese-ähnlichen Domänen organisiert. YnjE gehört damit zu den Tandem-Rhodanesen. Unter den drei Rhodanese-Domänen besitzt nur die C-Terminale Domäne einen Cystein-Rest in der putativ katalytisch aktiven Schleife (active-site-loop). Dieser Cysteinrest in der Aminosäure-Position 385 ist darüber hinaus der einzige Cysteinrest des Proteins. Eine mögliche physiologische Schwefelquelle für die Persulfurierung des Cystein-Restes ist bisher unbekannt. Die putative katalytische Schleife ähnelt nicht dem „*aktive-site-loop*“ bisher charakterisierter TSTs. Mercaptopyruvat konnte zudem als Substrat für YnjE ausgeschlossen werden (A. Freuer, 2005). Es kann daher vermutet werden, dass es sich bei YnjE weder um eine TST noch eine MST handelt. Am N-Terminus YnjEs ist eine Sec-System-abhängige periplasmatische Signalsequenz vorhanden, welche 23 Aminosäuren umfasst. Unter den Rhodanesen in *E. coli* besitzt neben YnjE nur das Protein PspE eine Sec-Signal-Sequenz. Einen Überblick über den grundlegenden Aufbau des YnjE Proteins gibt in schematischer Darstellung **Abbildung 8**.



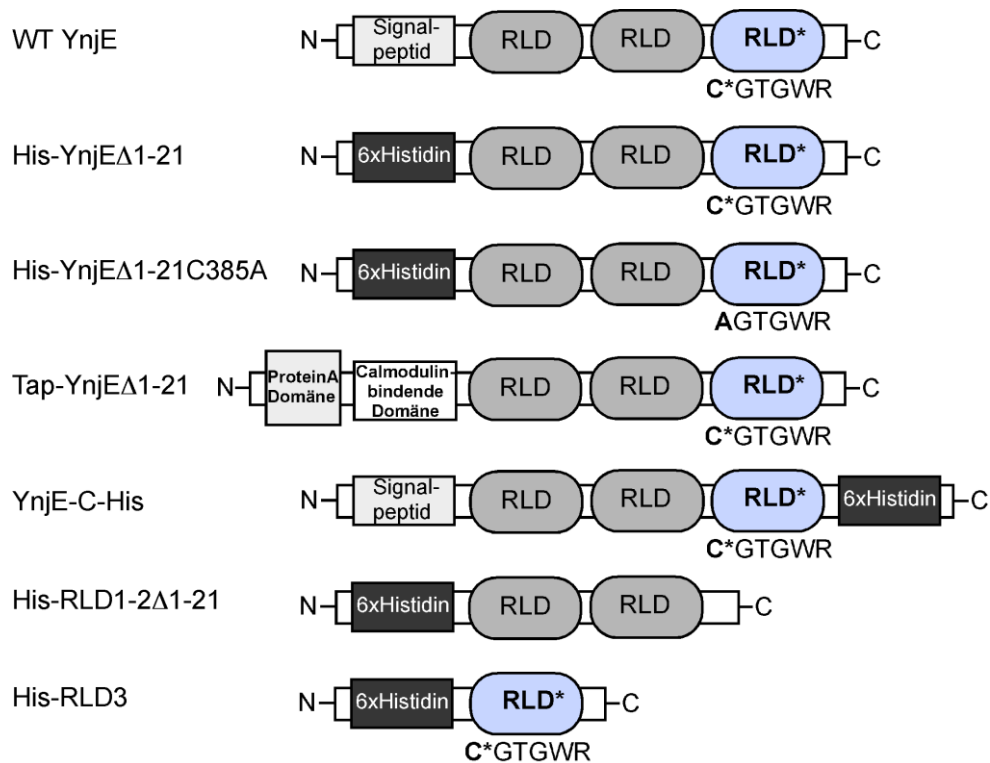
**Abbildung 8: Schematische Übersicht von YnjE**

Die Übersicht verdeutlicht die Tandem-Anordnung der Rhodanese-ähnlichen Domänen (RLD). Ein Cystein-Rest in der putativ-katalytischen Schleife findet sich nur in der C-terminalen (C) Rhodanese-Domäne. N-terminal (N) fusioniert ist ein Sec-abhängiges Signalpeptid, welches 23 Aminosäuren umfasst.

Erste Hinweise auf eine Funktion von YnjE lieferte ein Hefe-Zwei-Hybrid Ansatz unter den Sulfurtransferasen *E. coli*s, wodurch YnjE als Interaktionspartner des MoeB-Proteins identifiziert wurde (A. Freuer 2005). YnjE ist demnach der prominenteste Kandidat für die Rolle der physiologischen Sulfurtransferase bei der MPT-Synthese in *E. coli*.

### 3.1.1 Verwendete YnjE-Varianten

In dieser Arbeit wurden sechs rekombinante Varianten des YnjE-Proteins verwendet, deren Charakteristika folgend beschrieben werden. Aus vorhergehenden Studien wurde ein Plasmid-Konstrukt übernommen, welches die Expression von YnjE mit C-terminalem Histidin-Fusionspolypeptid ermöglicht (YnjE-C-His). Diese Variante wurde für Analysen des Signalpeptids verwendet. In dieser Arbeit vorausgehenden Studien wurden Experimente mit dieser YnjE-Variante durchgeführt. Da sich der putativ katalytische loop in der C-terminalen Domäne von YnjE befindet, könnte eine C-terminale 6xHis-Fusion einen Einfluss auf die Aktivität YnjEs haben, indem die Bindung möglicher Substrate behindert werden könnte (Kramer *et al.*, 2001). Aus diesem Grund wurden im Zuge dieser Arbeit YnjE-Varianten mit N-terminaler 6xHis-Fusion erstellt. Am N-Terminus endogenen YnjEs befindet sich ein 23 Aminosäuren umfassendes Sec-Signalpeptid. Um eine Abspaltung der N-terminalen 6xHis-Fusion auszuschließen, wurde das Signalpeptid deletiert. His-YnjE $\Delta$ 1-21 wurde für den überwiegenden Teil der Experimente verwendet. Die Punktmutante His-YnjE-C385A- $\Delta$ 1-21 diente der Analyse des putativ katalytischen Cystein-Restes. Sie gleicht der vorherigen Variante, mit dem Unterschied eines Aminosäureaustausches des Cystein-Restes in Position 385 zu Alanin. Für die Tandem-Affinitätsreinigung wurde ebenfalls ein Konstrukt mit deletiertem Signalpeptid generiert. Am N-Terminus wurde hier jedoch ein TAP-Polypeptid fusioniert (Tap-YnjE- $\Delta$ 1-21). Bei der Mutante His-RLD1-2 $\Delta$ 1-21 wurden zusätzlich zum Signalpeptid die Aminosäuren 300-435 deletiert. Der Mutante His-RLD3 fehlen die ersten 299 Aminosäuren. Beide Varianten wurden zur Untersuchung der einzelnen Rhodanese-ähnlichen Domänen erstellt. Eine schematische Übersicht über alle verwendeten YnjE-Varianten ist in **Abbildung 9** dargestellt.

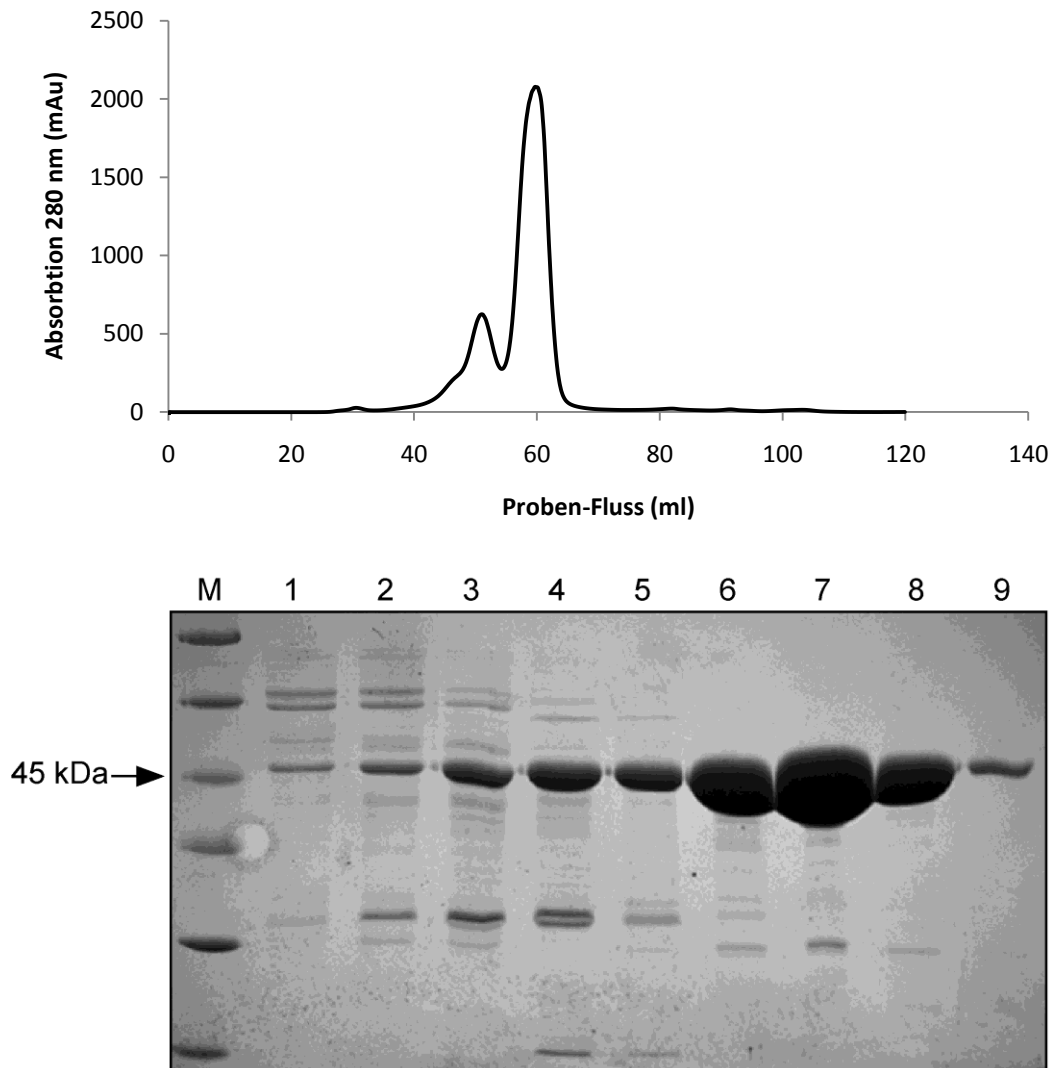


**Abbildung 9: YnjE-Varianten**

Schematisch sind die Charakteristika der in dieser Arbeit verwendeten YnjE-Varianten dargestellt. Die Variante YnjE-C-His wurde von T. Larson (Virginia Tech Blacksburg) Zur Verfügung gestellt, die übrigen YnjE-Konstrukte wurden in dieser Arbeit hergestellt.

### 3.1.2 Expression und Reinigung von His-YnjE $\Delta$ 1-21

Für die Expression von His-YnjE $\Delta$ 1-21 wurde der *E. coli*-Expressionsstamm BL21(DE3) verwendet. Die Expression, Ernte und Zellaufschluss erfolgte wie in Material und Methoden beschrieben. Nach dem Zellaufschluss wurde die lösliche Fraktion einer Ni-NTA-Chromatographie unterzogen und im Anschluss das Eluat mittels SDS-PAGE auf den Reinheitsgrad von YnjE überprüft. Um den Reinigungsgrad YnjEs zu erhöhen, wurde das Eluat der Ni-NTA Chromatographie direkt einer Größen-Ausschluss-Chromatographie unterzogen. In **Abbildung 10** sind das Elutionsschema (**A**) dieses Reinigungsschrittes und die im SDS-PAGE separierten Proteine der einzelnen Fraktionen dargestellt (**B**). Geringe Verunreinigungen sind auch hier noch enthalten. Es wurde überprüft, ob mittels Anionenaustauschchromatographie ein größerer Reinigungseffekt als durch Größen-Ausschlussverfahren erreicht werden kann.

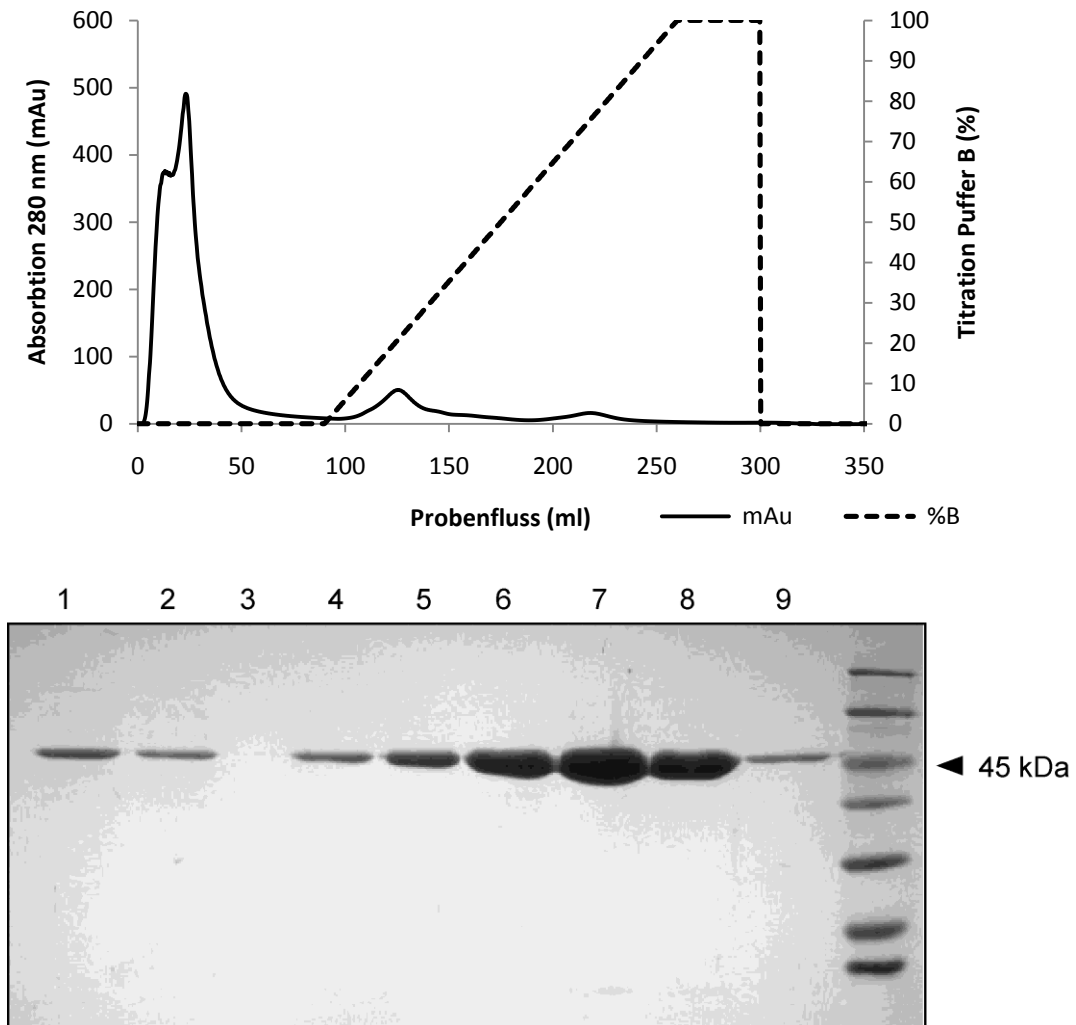


**Abbildung 10: Reinigung von His-YnjE $\Delta$ 1-21 mittels Größenausschluss-Chromatographie**

Das kleinere Elutionsmaximum in **A** bei ca. 50 ml entspricht den Fraktionen 1-4 in **B**. Die Fraktionen 5-6 in entsprechen dem Maximum bei ca. 60 ml. Es ist zu erkennen, dass neben YnjE noch andere Proteine enthalten sind. Es wurde ein 12 prozentiges SDS-Polyacrylamidgel verwendet.

Es wurde die Q-Sepharose-Matrix verwendet, welche es erlaubt Moleküle mit negativer Nettoladung zu binden. Zu diesem Zeitpunkt war die Oberflächenladung des nativen YnjE noch nicht bekannt. Ein Natriumchlorid-Konzentrationsgradient (Puffer B) sollte der Elution an die Säule gebundener Proteine dienen. In **Abbildung 11A** ist ersichtlich, dass der größte Teil des aufgetragenen Proteins nicht an die Q-Sepharose-Matrix gebunden hatte. Durch Analyse mittels SDS-PAGE konnte bestätigt werden, dass es sich dabei um YnjE handelt (**Abbildung 11B**). Da der Reinigungsgrad YnjEs

jedoch deutlich größer ist als er durch Größenausschlussverfahren erreicht wurde und die Anionenaustausch-Chromatographie deutlich schneller durchgeführt werden kann, kam in folgenden YnjE-Reinigungen die Anionenaustauschchromatographie im Anschluss an die Ni-NTA-Reinigung zur Anwendung. Die Ausbeute aus 4 L Expressionskultur betrug ca. 10 mg YnjE-Protein.



#### Abbildung 11: Reinigung YnjEs mittels Anionenaustausch-Chromatographie

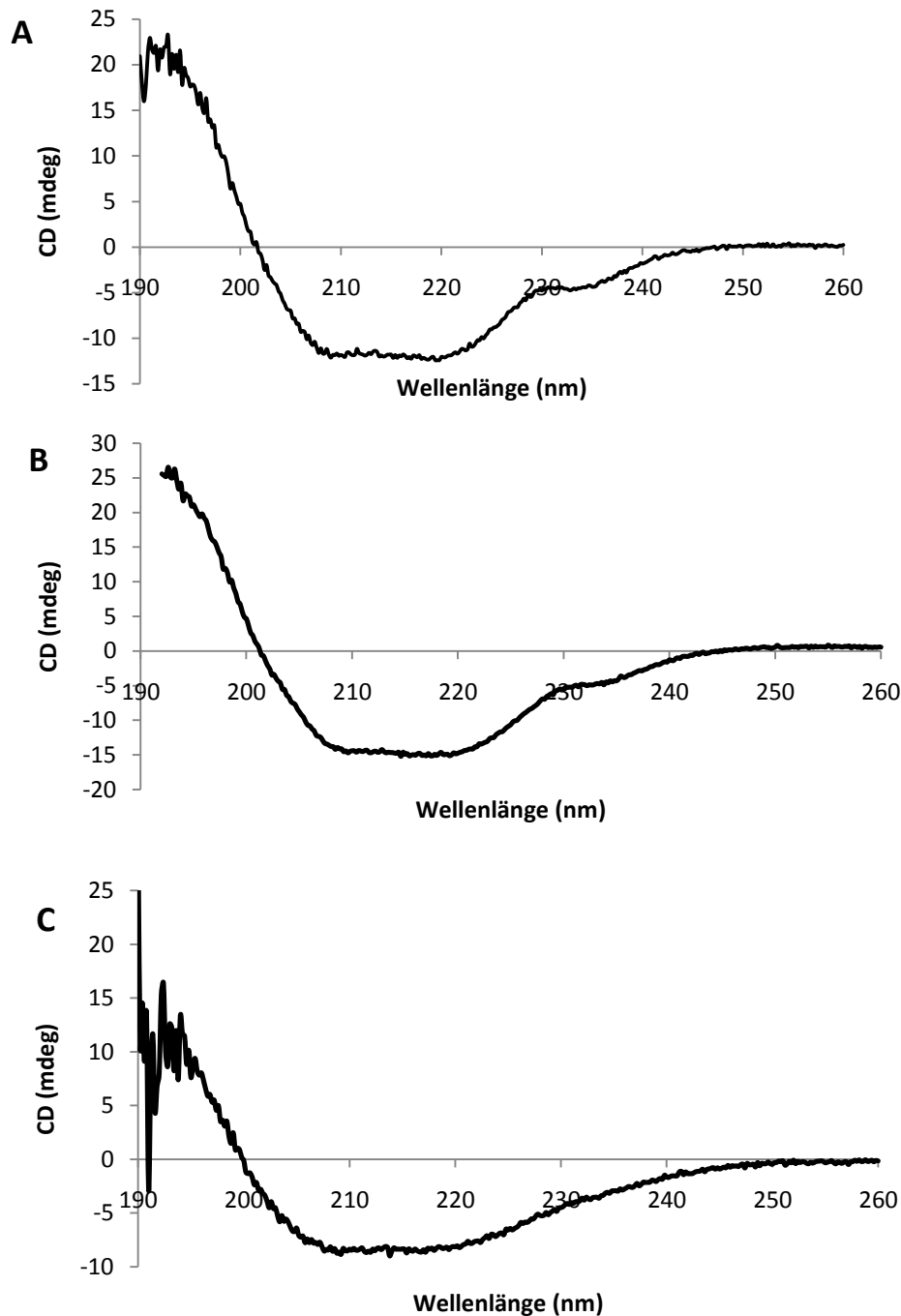
(A) Das Elutionsschema der Anionenaustauschchromatographie YnjEs verdeutlicht, dass der größte Teil des aufgetragenen Proteins nicht bzw. nur schwach an die Säulenmatrix gebunden wurde, und bereits vor Titration des NaCl-Gradienten eluiert (Maximum nach ca. 10-50 ml). Nur geringe Proteinmengen haben an die Matrix gebunden und eluieren nach 10% bzw. 60% des titrierten NaCl-Puffers. (B) Dargestellt ist ein SDS-Gel (12%) in welchem 10  $\mu$ l der Fraktionen des kleineren Absorptions-Maximums bei ca. 125 ml (1-2) und des Maximums bei 10-30 ml (4-9) aufgetragen wurden. Der größte Teil YnjEs hat nicht an die Q-Sepharose gebunden (Spuren 4-9).



## 3.2 Strukturelle Charakterisierung von YnjE

### 3.2.1 Circular Dichroismus (CD) Spektroskopie

Durch die Analyse der Sekundärstruktur von His-YnjE $\Delta$ 1-21 durch CD-Spektroskopie sollte überprüft werden, ob der N-terminale Histidin-Tag und die Deletion des Signalpeptids einen Einfluss auf die Faltung YnjEs im Vergleich zur Variante YnjE-C-His hat. Eine Untersuchung der Sekundärstruktur von YnjE-C-His in Abhängigkeit einer Persulfidbildung wurde in vorhergehenden Studien durchgeführt. Durch einen Vergleich der Sekundärstruktur von His-YnjE $\Delta$ 1-21 und der C385A-Variante sollte in dieser Arbeit ein Einfluss des Austausches des katalytischen Cysteins auf die Proteinfaltung überprüft und in einem weiteren Experiment die Thermostabilität YnjEs analysiert werden. Für die Analysen wurden 0,2 mg/ml His-YnjE $\Delta$ 1-21 in 20 mM Tris-HCl-Puffer eingesetzt. Die Messungen wurden bei 20°C durchgeführt, da die meisten der folgenden *in vitro*-Experimente bei dieser Temperatur durchgeführt werden sollten. Zunächst wurde ein CD-Spektrum von 190-260 nm für die Variante His-YnjE $\Delta$ Sig aufgezeichnet. Im Fall von YnjE deutet das gemessene Spektrum mit dem Referenzspektrum für  $\alpha$ -helikale-Strukturen eine Übereinstimmung an **Abbildung 12A**.  $\alpha$ -Helices überwiegen dementsprechend in der YnjE-Sekundärstruktur. Das in vorhergehenden Studien vermessene YnjE-His-Spektrum stimmt weitgehend mit dem His-YnjE $\Delta$ 1-21-Spektrum überein. Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass die Deletion des periplasmatischen Signalpeptids die Struktur YnjEs nicht beeinflusst. Eine Schulter bei 230 nm ist in allen bisher CD-Spektroskopisch untersuchten YnjE-Varianten charakteristisch. Sie wird vermutlich durch Häufung von aromatischen Aminosäuren in der YnjE-Proteinsequenz verursacht, welche sich auch im recht hohen Extinktionskoeffizienten widerspiegeln. Die Mutante C385A wurde unter den gleichen Bedingungen vermessen (**Abbildung 12B**). Das entsprechende CD-Spektrum ist mit dem zuvor gemessenden identisch, weshalb der Austausch des Cysteins 385 demzufolge keine messbaren Auswirkungen auf die Struktur des Proteins zu haben scheint. Das YnjE-Protein wurde anschließend auf seine Thermostabilität untersucht. Dazu wurden die charakteristischen Wellenlängen des gemessenen 20°C-Spektrums bei steigenden Temperaturen gemessen. Bei Veränderungen der Proteinstruktur im Zuge einer Denaturierung kommt es entsprechend zu Veränderungen der Drehung des polarisierten Lichtes verschiedener Wellenlängen im Vergleich zur nativen Struktur. Dadurch ist es möglich, diejenige Temperatur zu ermitteln, bei welcher YnjE denaturiert. Die Messung erfolgte bei den Wellenlängen 195, 210, 220 und 230 nm.



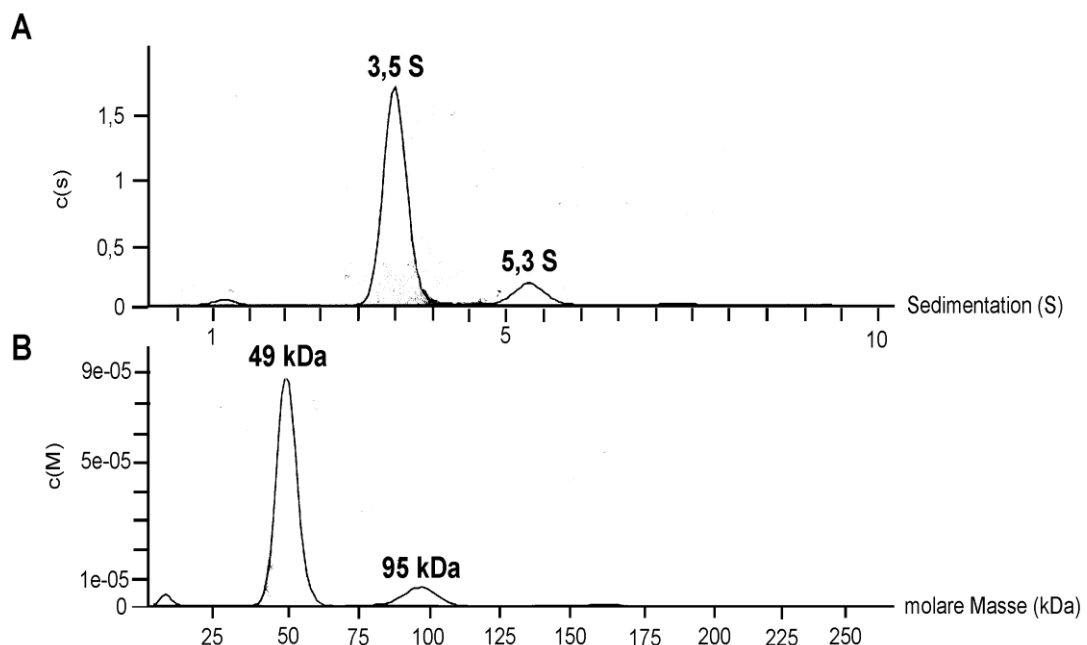
### Abbildung 12: Analyse der YnjE-Sekundärstruktur mittels CD-Spektroskopie

Das CD-Spektrum YnjEs bei 20°C in **A** zeigt den typischen Verlauf für Proteine mit überwiegend  $\alpha$ -helicalen Strukturen mit den charakteristischen Maxima und Minima der Lichtdrehung bei 190 nm, 210 nm und 220 nm. In **B** ist ein unter denselben Bedingungen gemessenes CD-Spektrum der Cystein385-Austauschmutante dargestellt. Es stimmt weitgehend mit dem Spectrum des His-YnjE $\Delta$ 1-21 überein. (**C**) CD-Spektrum denaturierten YnjEs. YnjE wurde in mehreren Schritten auf 60° C erhitzt und anschließend ein CD-Spektrum bei 60° C aufgezeichnet. Es ist erkennbar, dass die zuvor beobachtete Schulter bei 230 nm nach der Denaturierung nicht mehr messbar ist.

Eine mögliche Denaturierung konnte bei ca. 50° C beobachtet werden. Die vollständige Entfaltung des Proteins war bei ca. 55° C erreicht. Anschließend wurde erneut ein CD-Spektrum bei 60°C gemessen (**Abbildung 12 C**). Vollständig entfaltete Proteine zeichnen sich durch ein für  $\alpha$ -helikale Strukturen charakteristisches CD-Spektrum aus, welches ebenfalls für natives YnjE charakteristisch zu sein scheint. Die charakteristische Schulter bei 230 nm im 20°C-Spektrum ist allerdings bei 60° C nicht mehr nachweisbar.

### 3.2.2 Analytische Ultrazentrifugation

Mittels analytischer Ultrazentrifugation sollte überprüft werden, ob YnjE als Monomer oder Oligomer vorliegt. Für die Messungen wurden 25  $\mu$ M His-YnjE $\Delta$ 1-21 in 50 mM Tris-HCl; pH 7,5 eingesetzt und der Zentrifugenlauf bei 20°C durchgeführt. In **Abbildung 13A** ist ein deutliches YnjE-Konzentrations-Maximum bei 3,5 S und ein deutlich kleineres bei 5,3 S erkennbar. Dies entspricht den kalkulierten Molekularmassen von ca. 49 bzw. 95 kDa (**Abbildung 13B**). Dabei ist zu berücksichtigen, dass laut Hersteller ein Gerätefehler von bis zu 10% möglich ist.



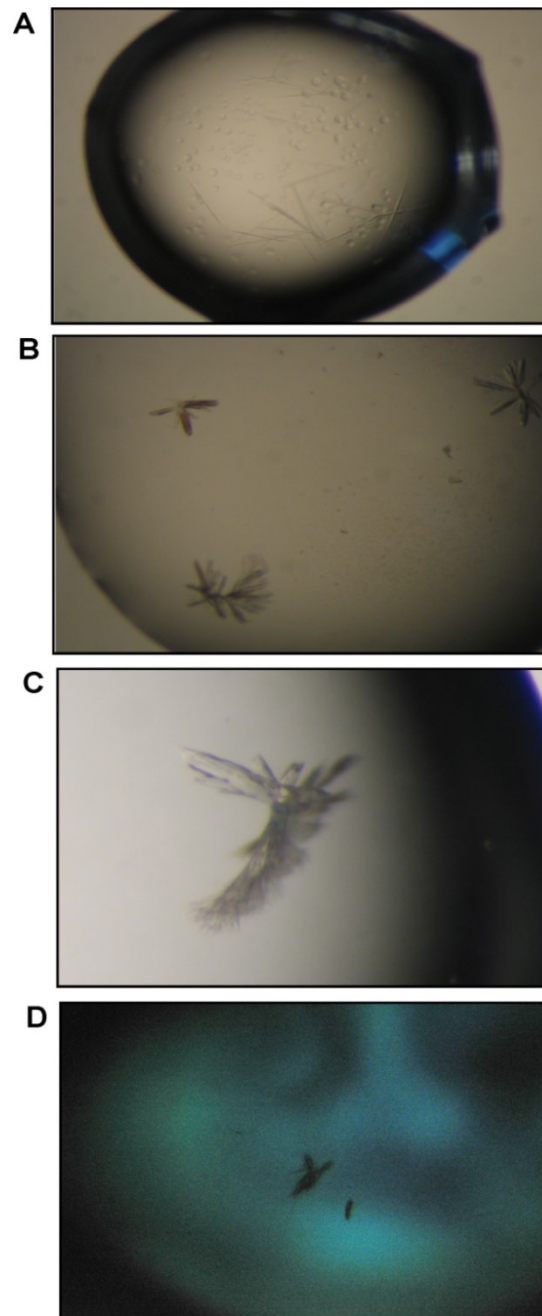
**Abbildung 13: Untersuchung YnjEs mittels analytischer Ultrazentrifugation**

(A) Die Auftragung der YnjE-Konzentrations-Maxima nach Sedimentation in Svedberg-Einheiten (S) und die daraus kalkulierte Molekularmasse (kDa) YnjEs verdeutlichen, dass das native Protein unter den verwendeten Bedingungen in monomerer Form vorliegt.

Es kann also davon ausgegangen werden, dass es sich bei dem Maximum der Größe von 49 kDa um monomeres YnjE (47,8 kDa) handelt. Das 95 kDa-Maximum könnte auf dimeres YnjE zurückzuführen sein. Dabei ist zu berücksichtigen, dass relativ hohe YnjE-Konzentrationen eingesetzt wurden und es damit nicht um ein Gleichgewicht von mono- und dimerem YnjE handelt. Unter hohen Proteinkonzentrationen ist eine Aggregatbildung oder Dimerisierung häufig zu beobachten. Es kann aufgrund der Reinheit des verwendeten YnjE-Proteins (**Abbildung 11**) ausgeschlossen werden, dass es sich bei dem Maximum von 5,3 S um Verunreinigungen handelt.

### 3.2.3 Strukturaufklärung von YnjE durch Proteinkristallisationsanalyse

Zur vollständigen Strukturanalyse des YnjE-Proteins sollte die Proteinkristallstruktur aufgeklärt werden. Für die Kristallisation wurden 10 mg/ml YnjE-Lösung in 100mM Tris-HCl-Puffer pH7,2 verwendet und der Hampton Crystall Screen (Hampton Research) durchgeführt. Dabei wurde die Methode des hängenden Tropfens auf Mikrotiterplatten angewandt (siehe Material und Methoden). Die Ansätze wurden bei 24°C inkubiert und im Abstand von 24 Stunden auf das Wachstum von Kristallen unter dem Mikroskop untersucht. Viel häufiger als Einkristalle entstehen amorphe Niederschläge (Präzipitate) oder auch Kristalle, die nicht für eine derartige Untersuchung geeignet sind (**Abbildung 14A**). Unter zwei unterschiedlichen Screen-Bedingungen wurde ein mögliches Kristallwachstum beobachtet (**Abbildungen 14B und C**). Durch den Kristallisationspuffer 0,2 M Magnesiumacetat, 0,1 M Natriumcacolydat pH 6,5; 20% PEG 8000 wurden erste Kristalle nach 10 Tagen bei 24 °C beobachtet, in 10% Isopropanol, 0,1 Natrium-Hepes pH 7,5; 20% PEG 4000 bereits nach 5 Tagen bei 24 °C. Zur Überprüfung dieser Kristalle wurde eine Färbung mit IZIT (Hampton Research) durchgeführt. Dabei handelt es sich um eine Coomassie-basierte wässrige Färbelösung, welche es ermöglicht Proteinkristalle von Salzkristallen zu unterscheiden. IZIT ist ein niedermolekularer Farbstoff, welcher in die wässrigen Hohlräume der Proteinkristalle eindringt und diese tiefblau färbt (**Abbildung 14D**). Salzkristalle besitzen entsprechende Hohlräume nicht und werden deshalb nicht angefärbt. Der Kristall aus **Abbildung 28C** wurde anschließend in Kooperation mit Hermann Schindelin am Institut für Strukturbiologie an der Universität Würzburg im Röntgendiffraktometer vermessen. Diese Messung trägt einen Teil der notwendigen Daten für die Kristallstrukturaufklärung des YnjE-Proteins bei, die von den Kooperationspartnern durchgeführt wird.



**Abbildung 14: Kristallisation von YnjE**

(A) Die Bildung von Salzkristallen oder die Präzipitation von Protein ist in vielen Fällen bereits optisch von einem Proteinkristall zu unterscheiden. (B;C) Unter Verwendung der Kristallisationspuffer 0,2 M Magnesiumacetat, 0,1 M Natriumcacolydat pH 6,5; 20% PEG 8000 bzw. 10% Isopropanol, 0,1 Natrium-Hepes pH 7,5; 20% PEG 4000 konnte ein mögliches Kristallwachstum beobachtet werden. Durch Färbung mit IZIT können Proteinkristalle angefärbt und dadurch von Salzkristallen unterschieden werden (D).

### 3.3 Interaktionsstudien

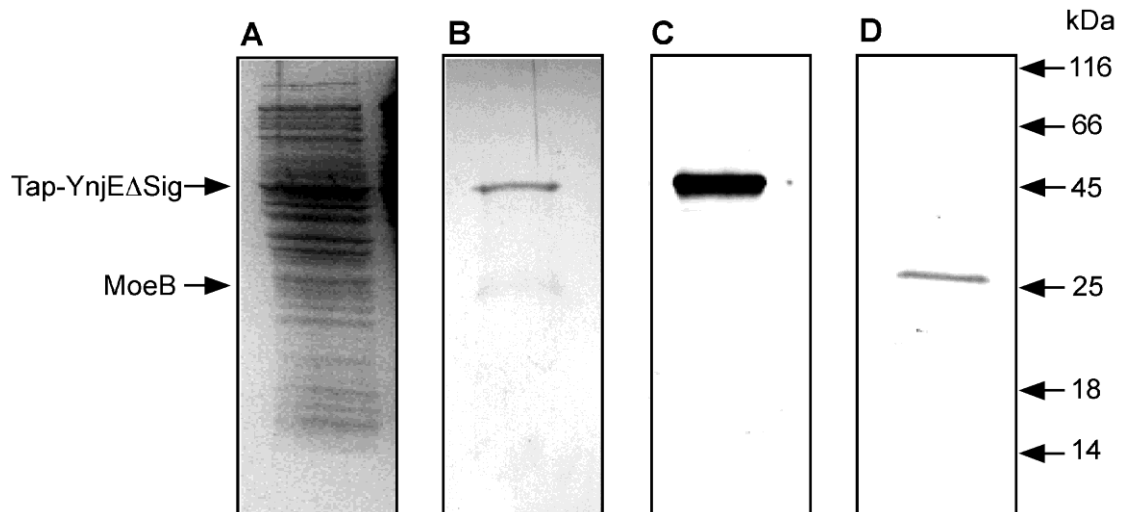
#### 3.3.1 Nachweis der Interaktion von MoeB mit YnjE

Eine Interaktion zwischen MoeB und dem Rhodanese-ähnlichen Protein YnjE wurde auf Grund von drei unabhängigen Untersuchungen vermutet (A. Freuer, 2005). In einer Hefe-dihybrid-Analyse zeigte sich die höchste  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität bei einer Ko-Expression von MoeB mit YnjE. Mittels Tandem Affinity Purification (TAP), einer Methode zur Reinigung von Proteinkomplexen unter nativen Bedingungen in *E. coli* (Gully *et al.* 2003) konnte YnjE zusammen mit einem MoeB-Köderprotein Ko-gereinigt werden. Einen dritten Hinweis lieferte ein Immunpräzipitationsansatz mit MoeB, der eine Ko-Prezipitation von YnjE erkennen ließ. In jedem dieser Experimente wurde MoeB als Köderprotein eingesetzt, weshalb zu klären war, ob die Proteininteraktion zwischen MoeB und dem Rhodanese-ähnlichen Protein YnjE durch Ansätze verifiziert werden kann, in welchen YnjE die Köderprotein-Komponente darstellt. Des Weiteren war von Interesse, ob YnjE möglicherweise mit weiteren Proteinen interagiert, insbesondere mit den Proteinen der MPT-Synthese.

#### 3.3.2 Identifizierung von YnjE-Interaktionspartnern mittels Tandem-Affinitätsreinigung (TAP)

Die Tap-Methode erlaubt die Verwendung zweier verschiedener Affinitätsmatrices, IgG-Matrix und Calmodulin-Matrix, zur Reinigung von Proteinkomplexen unter schonenden Bedingungen. Kernstück dieser Methode ist der TAP-Tag, ein Fusionspolypeptid aus einem ProteinA-Tag mit einem an das Köderprotein anschließenden Calmodulin-Binding-Protein-Tags. Um YnjE mit dem Tap-Tag zu fusionieren wurde das *ynjE*-Gen in den Expressionsvektor pEB327 überführt, der es ermöglicht YnjE unter Kontrolle eines Arabinose-induzierbaren Promotors mit N-terminalem Fusionspolipeptid zu exprimieren. Es wurde keine C-terminale Fusion erstellt, um die möglicherweise wichtigere C-terminale Rhodanese-Domäne nicht zu blockieren. Die Expression des Tap-YnjE-Köderproteins erfolgte in einem *E. coli* MC1061 -Stamm, in welchem das endogene *ynjE* deletiert wurde. Dadurch wurden Interaktionen mit endogenem YnjE ausgeschlossen. Im Gegensatz zu früheren Ansätzen wurde kein zusätzlicher rekombinanter Interaktionskandidat in den Expressionsstamm eingeführt. Dadurch wurde sichergestellt, dass nur endogene

Proteine für eine Interaktion zur Verfügung stehen. Der MC1061-Stamm wurde angezogen und die Expression durch Zugabe von Arabinose induziert. Die Kultur wurde wie in Material und Methoden beschrieben geerntet und aufgeschossen. Zur Kontrolle der Expression des Tap-fusionierten YnjE, wurde der Rohextrakt nach Zellaufschluss mittels SDS-PAGE analysiert. In **Abbildung 15A** ist die Überexpression des YnjE-Köderproteins mit einer Größe von ca. 47 kDa zu erkennen. Der Rohextrakt wurde anschließend für die Tandem-Affinitätsreinigung verwendet. Dabei bindet zunächst der N-terminale ProteinA-Tag an eine IgG-Sepharose-Matrix, welche zuvor in ProteinA-Bindungspuffer (siehe Material und Methoden) äquilibriert wurde. Der ProteinA-Tag ist über eine TEV-Protease Erkennungssequenz abspaltbar. Nach der Inkubation mit der TEV-Protease in entsprechendem Puffer, wird das Köderprotein mit Bindungspartnern eluiert, wobei gleichzeitig der Calmodulin-bindende-Tag frei wird. Nach einem zweiten Reinigungsschritt über eine Calmodulin-Sepharose-Matrix wurde das Eluat, welches ein Proteingemisch aus YnjE und Interaktionspartnern in relativ geringer Verdünnung enthielt, ankonzentriert, um die einzelnen Proteine dieses Gemisches detektieren zu können. Nach erneuter SDS-PAGE ist das ca. 47 kDa große Tap-YnjE-Köderprotein und eine Bande in der Größe von ca. 27 kDa, welche der Größe des MoeB-Proteins entspräche, erkennbar (**Abbildung 15B**). Mittels Immunoblot bzw. Elektronenspray-Ionisations-Massenspektrometrie (ESI-MS) wurden die Proteinbanden anschließend genauer charakterisiert. Die 47 kDa bzw. 27 kDa großen Banden konnten mit den jeweiligen spezifischen Antikörpern im Immunoblot wie auch mittels ESI-MS eindeutig YnjE bzw. MoeB zugeordnet werden (**Abbildung 15C und 15D**). Bei einer weiteren Bande in der Größe von ca. 8-10 kDa (nicht gezeigt) wurde die kleinere MPT-Synthase Untereinheit MoeD vermutet. Allerdings konnte dies weder durch ESI-MS noch durch Immunoblot-Analysen zweifelsfrei bestätigt werden. Da im Eluat keine weiteren prominenten Proteinbanden erkennbar sind, kann davon ausgegangen werden, dass durch die Tandem-Affinitätsreinigung nur Interaktionspartner von YnjE ko-gereinigt wurden und eine unspezifische Bindung von MoeB mit den Matrices unwahrscheinlich ist.



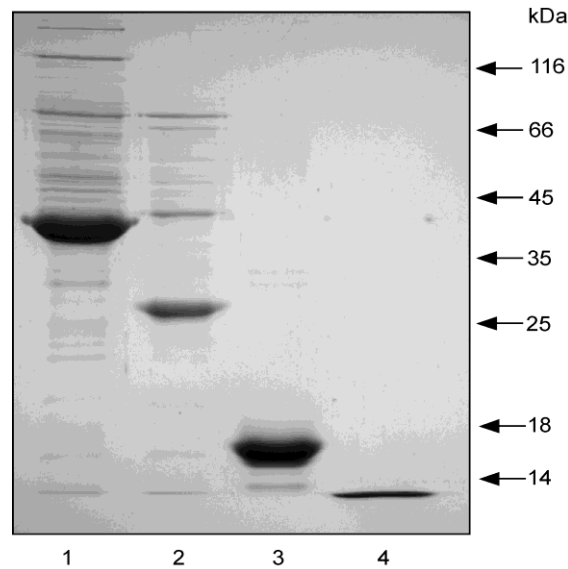
**Abbildung 15: Tandem-Affinitätsreinigung mit Tap-YnjE $\Delta$ Sig**

Expression und Ko-Reinigung des Tap-fusionierten YnjE-Köderproteins in MC1061 $\Delta$ ynjE. (A) SDS-PAGE des Rohextrakts, (B) SDS-PAGE des Eluates der Calmodulin-Matrix, (C) Immunblot des Eluats unter Verwendung eines murinen anti-YnjE Serum bzw. (D) eines MoeB-spezifischen Antikörpers.

### 3.3.3 Identifizierung von YnjE-Interaktionspartnern mittels Antikörpergekoppelter Affinitätsreinigung

An der Synthese von MPT sind die heterotetramere MPT-Synthase, bestehend aus den Untereinheiten MoaE (17 kDa) und MoaD (8 kDa), und das MoeB-Protein (27 kDa) beteiligt. *In vitro* konnte zudem IscS als Schwefel-mobilisierende Komponente identifiziert werden. Mittels Immunpräzipitationsexperimenten sollte festgestellt werden, ob sich für YnjE neben MoeB weitere Interaktionspartner unter diesen Proteinen finden, ob mehrere dieser Proteine einen Komplex bilden und welche Proteine für diesen möglichen Komplex essentiell sind. Im Falle einer Wechselwirkung YnjEs mit einem der oben genannten Proteine, könnten diese ko-precipitiert und in einem SDS-Gel analysiert werden. Expression und Reinigung der Proteine des zweiten Schrittes der Moco-Biosynthese und der *E. coli*-L-Cystein-Desulfurase IscS erfolgte nach bereits etablierten Protokollen (siehe Material und Methoden). Der Reinheitsgrad der Proteine wurde mittels SDS-PAGE überprüft (**Abbildung 16**). Da Bindungspartner von YnjE identifiziert werden sollten, wurde als Köder für YnjE ein YnjE-Antiserum aus *Mus musculus* verwendet. Die Spezifität dieses Serums wurde unter Verwendung einer *E. coli*-Rohextrakt-Kontrolle mittels Immunoblot überprüft. Es zeigte sich eine spezifische Hybridisierung mit dem, ca. 47 kDa großen YnjE-Protein (**Abbildung 17A**).

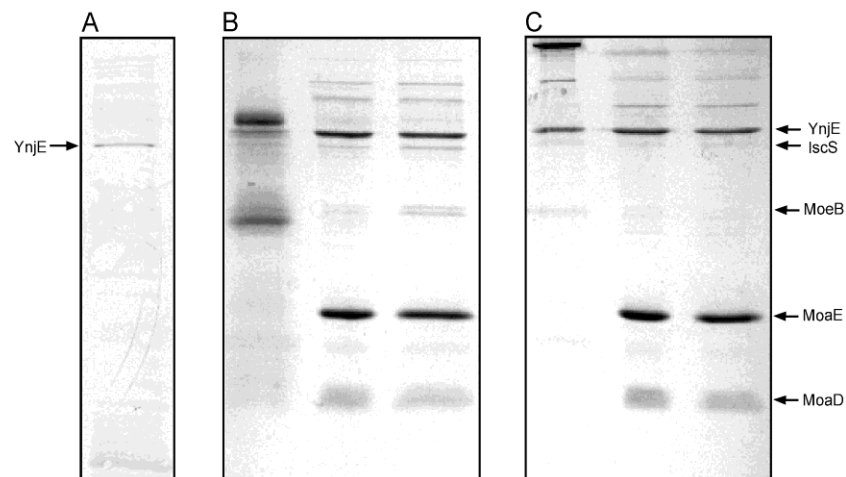




**Abbildung 16: SDS-PAGE der gereinigten Proteine der MPT-Synthese**

Die Proteine wurden nach bereits etablierten Protokollen gereinigt und in einem SDS-Gel auf ihren Reinheitsgrad überprüft. (1) IscS; (2) MoeB; (3) MoeA; (4) MoeD.

Die im Serum enthaltenen Antikörper wurden auf einer ProteinG-Sepharose-Matrix immobilisiert und mit den oben genannten Proteinen sowie YnjE als Proteingemisch inkubiert. MoeB, MPT-Synthase und IscS wurden dabei im Überschuss eingesetzt, um YnjE mit Bindungspartnern zu sättigen. Nach der Inkubation wurden nicht gebundene Proteine durch Waschschritte entfernt. Um YnjE mit Bindungspartnern von der ProteinG-Sepharose zu trennen, wurden zwei verschiedene Methoden angewandt. Einer der Ansätze wurde in SDS-Ladepuffer auf 70°C erhitzt, um die Proteinbestandteile zu denaturieren und anschließend abzuzentrifugieren (**Abb. 17B**). In einen weiten Ansatz wurden im Wechsel Citratpuffer (pH 2) und Tris-HCl-Puffer (pH 7,2) verwendet um Antikörper gebundene Proteinkomplexe von der Säule zu eluieren (**Abb. 17C**). Es ist erkennbar, dass durch Erhitzen im Eluat Degradationprodukte enthalten sind. Es handelt sich dabei vermutlich um Abbauprodukte des Antikörpers oder der Protein G-Sepharose. Besonders in der Größe zwischen ca. 20-50 kDa wirken diese störend, da hier durch Verunreinigungen das MoeB-Protein schlecht zu identifizieren ist. Die Elution mittels Citratpuffer war dementsprechend die schonendere Methode und wurde für weitere Immunpräzipitationsexperimente bevorzugt.

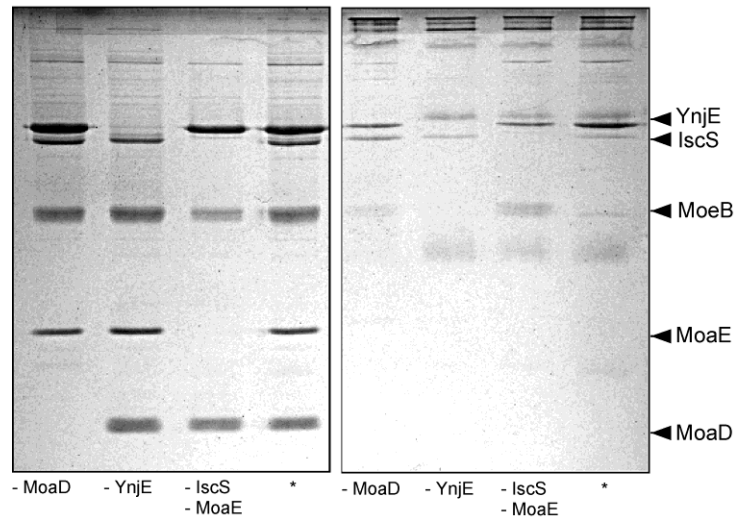


### Abbildung 17: Optimierung der Immunpräzipitation mit YnjE

(A) Im Immunoblot wurde überprüft, ob ein murines YnjE-Antiserum spezifisch mit YnjE in einem *E.coli*-Protein-Rohextrakt interagiert. (B und C) SDS-PAGE von Durchfluss, Wasch- und Elutionsfraktion der Immunpräzipitation. In B wurde durch Erhitzen auf 70°C eluiert, in C durch Verwendung von Citratpuffer. Im Durchfluss und Waschfraktion sind jeweils die im Ansatz enthaltenen Proteine erkennbar.

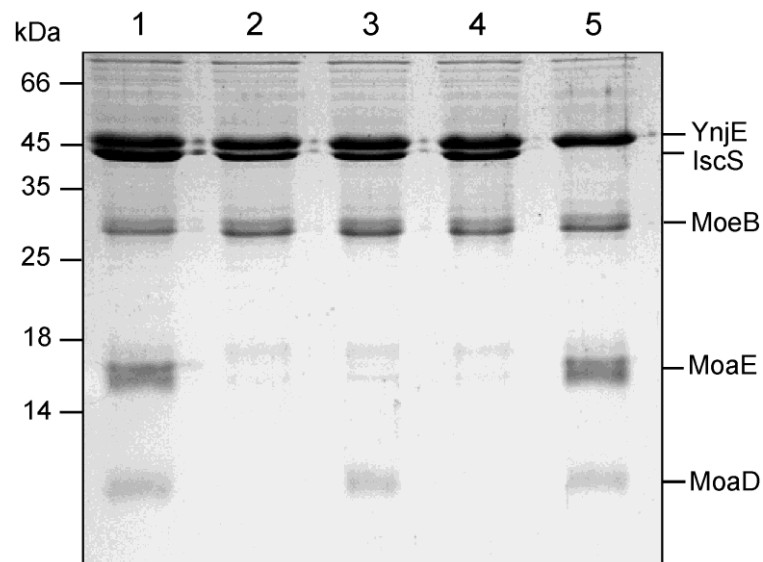
In **Abbildung 17C** ist erkennbar, dass zusammen mit YnjE Proteine in der Größe von ca. 45 kDa bzw. 27 kDa ko-precipitiert wurden. Mittels Immunoblot-Analysen und durch ESI-MS konnte die 27 kDa Bande als MoeB identifiziert werden (Abbildung X2). Bei der 45 kDa Bande handelt es sich um IscS. Eine weitere Bande in der Größe von ca. 12 kDa zeigte nach ESI-MS-Analyse keine Aminosäureübereinstimmungen mit den eingesetzten Proteinen der Moco-Biosynthese. In weiteren Ansätzen sollte der Einfluss der einzelnen Proteine der MPT-Synthese auf die MoeB-YnjE-Kopräzipitation untersucht werden. Gleichzeitig wurde als Kontrolle für mögliche unerwünschte Interaktionen der Proteine mit der Matrix ein Proteingemisch ohne YnjE verwendet. Eine unspezifische Interaktion zwischen Protein G-Sepharose und MoeB wäre auch ohne YnjE im Ansatz zu beobachten. Jedoch ist in der Spur B2 der **Abbildung 18** erkennbar, dass kein MoeB im Eluat ohne YnjE im Ansatz detektierbar ist. Die Proteine MoaD, IscS und MoaE scheinen zudem keinen Einfluss auf die MoeB-YnjE-Interaktion zu haben (**Abbildung 18 Spur 1 und 3**). In einem weiteren Immunpräzipitationsexperiment sollte der Einfluss von ATP auf die Proteininteraktionen untersucht werden, da die Thiocarboxylierung MoaDs in Abhängigkeit einer vorhergehenden Adenylierung durch MoeB stattfindet. In die Reaktionsansätze wurde hierzu MgCl<sub>2</sub> und ATP hinzugefügt und das Experiment wie oben beschrieben durchgeführt. Durch die Zugabe von ATP konnte neben dem MoeB-Protein zusätzlich MoaD und MoaE ko-eluiert werden. Dabei ist davon auszugehen,

dass keine direkte Interaktion zwischen MoeE und YnjE stattfindet, denn ohne MoeD im Ansatz wird kein MoeE-Protein koeluiert (**Abbildung 19**). Durch ATP scheint entsprechend ein Protein-Komplex zwischen MPT-Synthase, MoeB gebildet zu werden.



**Abbildung 18: Einfluss der einzelnen Proteine der MPT-Synthese auf die MoeB-YnjE-Interaktion**

Dargestellt sind der Durchfluss (A) und die Elutionsfraktionen (B) von Immunpräzipitationsansätzen, in denen MoeD, YnjE, IscS oder MoeE nicht zugegeben wurde. \* kennzeichnet die Fraktion, welche alle fünf untersuchten Proteine enthielt.



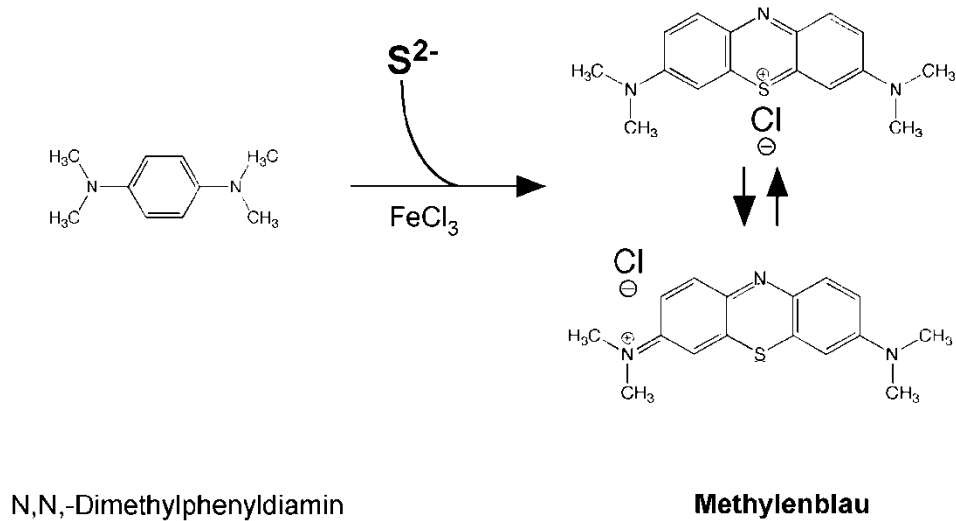
**Abbildung 19: Einfluss von ATP auf die Interaktionen von YnjE**

Den Ansätzen 1 und 3 bis 5 wurde ATP zugegeben um einen Einfluss auf die Interaktion YnjEs mit den Proteinen des zweiten Schrittes der Moco-Biosynthese zu analysieren. Die Ansätze in den Spuren 1 und 2 enthielten die Proteine YnjE; IscS; MoeB; MoeE und MoeD. In den übrigen Spuren wurden die Proteine MoeE (3); MoeD (4) und IscS (5) den Ansätzen nicht zugegeben.

### 3.4 Analyse der Funktion von YnjE als Sulfurtransferase

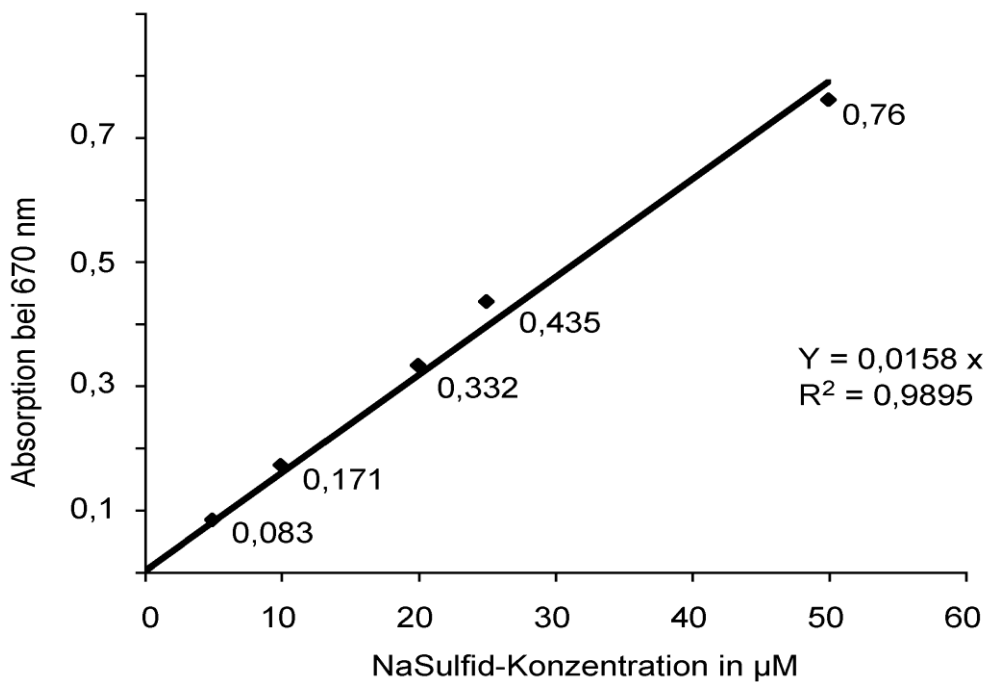
#### 3.4.1 Untersuchung eines möglichen Einflusses von YnjE auf die L-Cystein-Desulfurase-Aktivität

Für die *E. coli* Cysteindesulfurasen CsdA und SufS wurden Enhancer-Proteine identifiziert (CsdE und SufE), die deren Desulfuraseaktivität deutlich erhöhen können (Loiseau *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2005). Da eine Interaktion zwischen IscS und YnjE nachgewiesen werden konnte, sollte überprüft werden, ob YnjE einen Einfluss auf die Mobilisierung des L-Cystein-Schwefels durch IscS, CsdA oder SufS hat und möglicherweise ein Enhancerprotein ist. Für Messungen der Cysteindesulfuraseaktivität gilt der Methylenblau-Assay als Standardmethode (Fogo und Pokowski, 1949; Urbina *et al.*, 2001). Der Methylenblau-Assay erlaubt das von den Desulfurasen mobilisierte Persulfid durch Bildung von Methylenblau photometrisch zu quantifizieren. Zunächst wird *in vitro* ein Reaktionsansatz in entsprechendem Puffer bestehend aus L-Cystein, Cysteindesulfurase und Enhancer-Protein erstellt sowie Dithiotreitol (DTT) zugegeben und für 20 min inkubiert. Die Cysteindesulfurase mobilisiert dabei Schwefel von L-Cystein und bindet ihn in Form von Persulfid. Die Zugabe von Salzsäure (HCl) führt zur Freisetzung des säurelabilen Sulfids. Die Methylenblau-Reaktion unter Verwendung von N,N,-Dimethylphenyldiamin als Ausgangsverbindung sowie FeCl<sub>3</sub> in 25-prozentiger HCl-Lösung führt zur Bindung des freien Sulfids wodurch Methylenblau entsteht, welches unter den sauren Assay-Bedingungen in oxidierte Form vorliegt und somit als blauer Farbstoff photometrisch detektiert werden kann (**Abbildung 20**). Die Proteine CsdA, SufE und IscS wurden alleine oder zusätzlich mit je einem der drei Proteine CsdE, SufE oder YnjE inkubiert. Nach 10 min wurde die Reaktion abgebrochen, und das gebildete Sulfid in Methylenblau überführt. In den einzelnen Ansätzen wurde dann die optische Dichte bei 670 nm gemessen. Die Quantifizierung des gebildeten Methylenblaus erfolgte über eine Kalibrierungsreihe unter Verwendung von Natriumsulfid. Lösungen der Konzentration 5 µM, 10 µM, 20 µM, 25 µM und 50 µM wurden mit N, N,-Dimethylphenyldiamin und FeCl<sub>3</sub> versetzt. Das dadurch gebildete Methylenblau wurde dann photometrisch bei 670 nm bestimmt und anschließend die optische Dichte gegen die Natriumsulfidkonzentrationen aufgetragen. Durch lineare Regression wurde eine Gleichung zur Berechnung der Sulfidkonzentration in den zu analysierenden Proben abgeleitet (**Abbildung 21**).



**Abbildung 20: Methylenblaureaktion**

Durch den Zusatz von HCl zum Cysteindesulfurase-Assay entsteht freies Sulfid, welches in der Methylenblau-Reaktion zur Bildung eines blauen Farbstoffes führt, welcher bei 670 nm ein Absorptionsmaximum besitzt.



**Abbildung 21: Natriumsulfid-Kalibrierungsreihe**

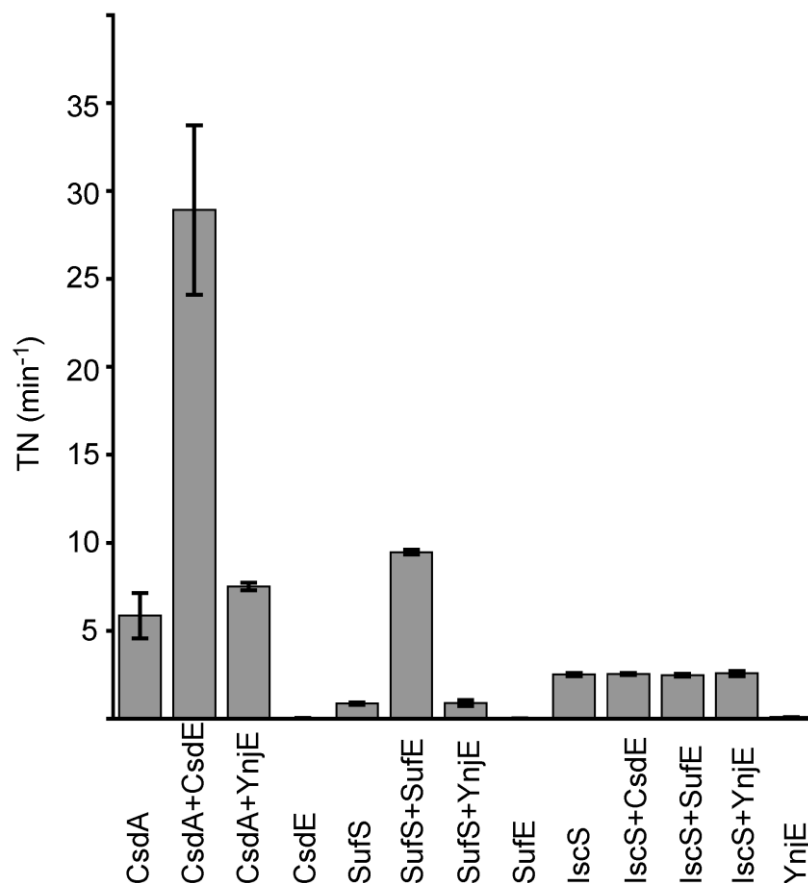
Aufgetragen sind die optischen Dichten des gebildeten Methylenblaus bei 670 nm gegen die Natriumsulfid-Konzentration der Kalibrationslösungen. Durch lineare Regression wurde die Funktion  $y = 0,0158 x$  ermittelt, über welche die Natriumsulfid-Konzentrationen in den einzelnen Proben des Cystein-Desulfurase-Assays berechnet wurde.

Das gebildete Sulfid pro min und für ein Mol Desulfurase ( $k_{cat}$ ) wurde berechnet. Die Inkubation geschah für 10 min unter Verwendung von 5  $\mu$ M Enzym. Der Stoffumsatz pro min (TN) für die einzelnen Ansätze wurde in **Tabelle 3** zusammengefasst. Zur Veranschaulichung wurden die Ergebnisse in einem Diagramm verglichen (**Abbildung 22**). Die ermittelten katalytischen Aktivitäten für CsdA bzw. SufS sowohl mit und ohne Enhancerprotein, lagen in der Größenordnung der Literaturwerte (Urbina *et al.*, 2001) liegen jedoch deutlich niedriger (**Tabelle 3**). Dies ist auf die veränderten Assay-Bedingungen zurückzuführen (siehe Material und Methoden). Da eine deutliche Steigerung der Aktivitäten von CsdA und SufS durch die jeweiligen Enhancer zu beobachten war, sind die Abweichungen in den absoluten Werten der Desulfuraseaktivitäten in diesem Experiment zu vernachlässigen. Die Aktivität von CsdA durch CsdE konnte um das ca. Sechsfache, die Aktivität von SufS durch SufE um das ca. Zehnfache gesteigert werden. Wie erwartet beeinflussen SufE bzw. CsdE spezifisch ihre jeweilige Desulfurase. Es konnte keine gesteigerte Aktivität von IscS durch SufE oder CsdE beobachtet werden. Diese Ansätze dienten als Kontrollen. Eindeutig zu erkennen ist, dass YnjE auf die Aktivitäten aller *E. coli* L-Cystein-Desulfurasen keinen Einfluss hat (**Abbildung 22**).

Desulfurase/Enhancer	TN (min <sup>-1</sup> )	Desulfurase/Enhancer	TN (min <sup>-1</sup> )
CsdA	5,8 ± 1,3	IscS	2,5 ± 0,1
CsdA/CsdE	28,9 ± 4,8	IscS/CsdE	2,5 ± 0,1
CsdA/YnjE	7,5 ± 0,2	IscS/SufE	2,5 ± 0,1
SufS	0,9 ± 0,1	IscS/YnjE	2,5 ± 0,2
SufS/SufE	9,4 ± 0,1	CsdE	n.d.
SufS/YnjE	0,9 ± 0,2	SufE	n.d.
		YnjE	n.d.

**Tabelle 3: Einfluss von Enhancerproteinen und YnjE auf die Aktivität der *E. coli*-L-Cystein-Desulfurasen**

Der Stoffumsatz pro min (Turn-over-number, TN) wurde für die L-Cystein-Desulfurasen CsdA, SufS und IscS berechnet. Die Werte weichen von den publizierten Literaturwerten ab, da die Assaybedingungen verändert wurden. Wie erwartet können die Enhancerproteine CsdE und SufE die Aktivität von CsdA bzw. SufS deutlich steigern. YnjE hat hingegen keinen Einfluss auf die Desulfurase-Aktivität.



**Abbildung 22: Einfluss von YnjE auf die Aktivität der *E. coli* Cysteindesulfurasen**

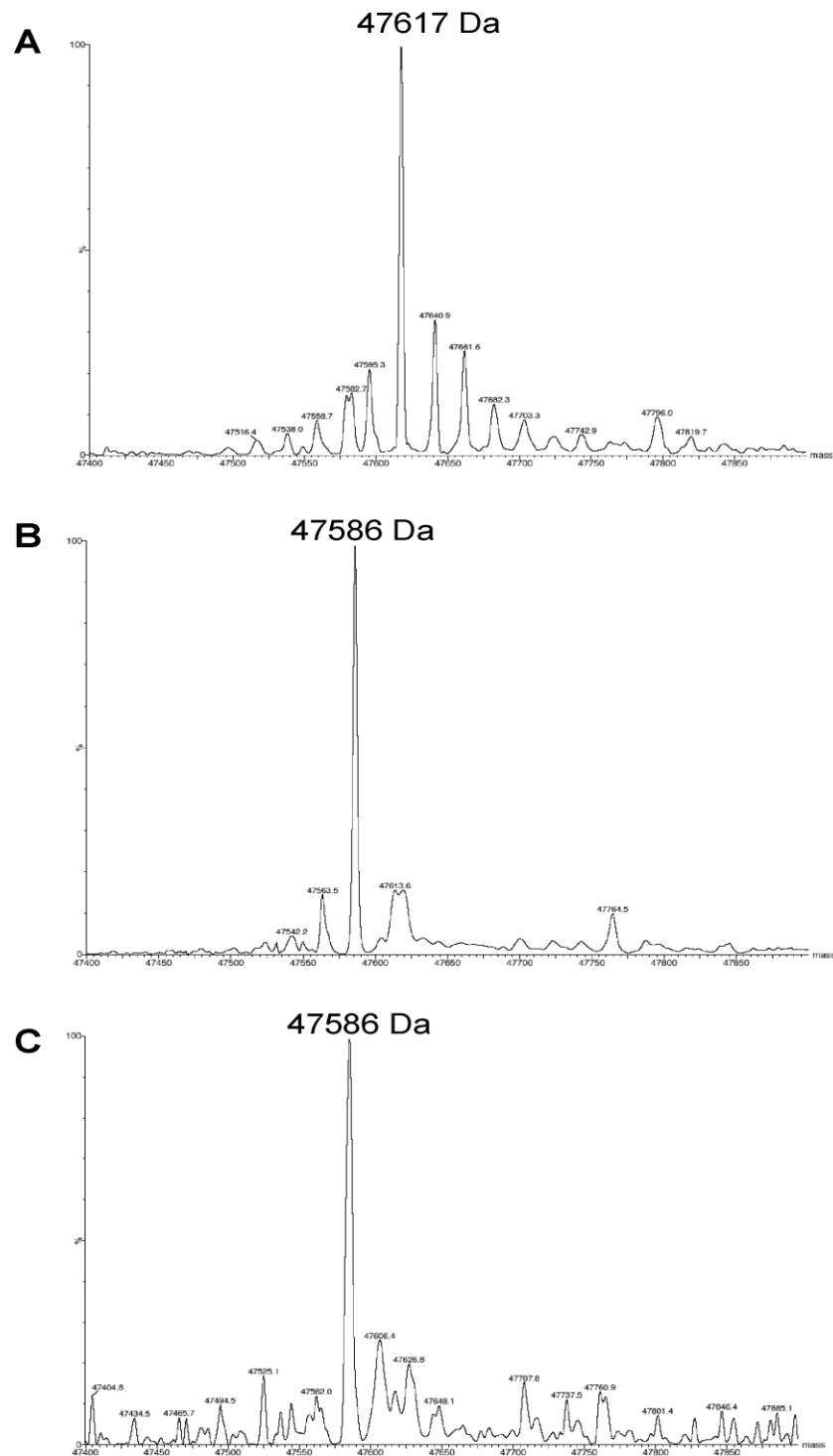
Im Balkendiagramm der Ergebnisse des Methylenlau-Assays wurden die Wechselzahl (TN pro min) der L-Cysteindesulfurasen verglichen.

### 3.4.2 Analyse der Schwefelübertragung von L-Cystein auf YnjE durch Cysteindesulfurasen

Die katalytische Schleife YnjEs zeigt keine Ähnlichkeit zu den von Bordo und Bork (2002) klassifizierten TST- oder MST-Schleifen. In vorhergehenden Studien konnte für YnjE keine Sulfurtransferaseaktivität mit Thiosulfat und 3-Mercaptopyruvat in Sörbos Assay nachgewiesen werden (A. Freuer, 2005). Im Zuge dieser Arbeit konnte durch Untersuchung dieser Schwefeldonoren im DTT-Assay (siehe Material und Methoden) bestätigt werden, dass weder Thiosulfat noch 3-Mercaptopyruvat Schwefeldonoren für YnjE sind. Es ist nicht ungewöhnlich, dass Proteine, wie z. B. L-Cysteindesulfurasen als Schwefeldonoren für Rhodanesen fungieren. Das Rhodanese-ähnliche Protein Thil wird innerhalb der Thiaminbiosynthese durch die L-Cysteindesulfurase IscS persulfuriert. In der humanen Moco-Biosynthese wird ein Persulfid von der

Cysteindesulfurase NifS1 auf die Rhodanesedomäne des MoeB-Homologs MOCS3 übertragen. Möglicherweise handelt es sich bei dem physiologischen Schwefeldonor YnjEs um eine der drei Desulfurasen *E. coli*s. Da eine Interaktion von YnjE mit dem IscS Protein in den Immunpräzipitationsexperimenten erkennbar war und YnjE scheinbar kein Enhancer-Protein für die Mobilisierung des Schwefels aus L-Cystein ist, war es von Interesse zu untersuchen, ob IscS Schwefel auf den Cystein-Rest (C385) in der putativ aktiven Schleife YnjEs übertragen kann, und YnjE somit ein Schwefelakzeptor von IscS sein könnte. Die Experimente wurden darüber hinaus neben IscS auch für SufS und CsdA durchgeführt, da im Methylenblauassay eine entsprechende Schwefelübertragung auf YnjE durch diese Desulfurasen nicht ausgeschlossen wurde. Der C385 in der aktiven Schleife von YnjE ist der einzige des Proteins, weshalb eine Persulfid-Bildung an YnjE nur über C385 erfolgen kann. Die Untersuchung des Cystein 385 wurde in Zusammenarbeit mit Manfred Nimtz (Helmholtzzentrum für Infektionsforschung, Braunschweig) mittels Elektrospray-Ionisations-Massenspektrometrie durchgeführt. Zur Probenvorbereitung wurde His-YnjED1-21 mit je einer der *E. coli* Cystein-Desulfurasen unter Zusatz von L-Cystein als Schwefelquelle für eine Stunde inkubiert. Als Kontrolle wurde YnjE nur mit L-Cystein inkubiert. Um gegebenenfalls bereits gebundene Persulfide vom YnjE Protein zu lösen und freies Sulfid aus dem Ansatz zu eliminieren, wurde vor der Inkubation mit den Cysteindesulfurasen Kaliumcyanid zugesetzt und das YnjE-Protein anschließend gelfiltriert. Da IscS, CsdA und SufS (je ca. 45 kDa) und YnjE (ca. 47 kDa) recht ähnliche Massen besitzen, wurde nach der Inkubation YnjE mittels erneuter Ni-NTA-Reinigung von den Cysteindesulfurasen separiert und in NH<sub>4</sub>Ac überführt. Nach Zugabe von Methanol und Ameisensäure, wurden die Ansätze Massenspektrometrisch vermessen. Die verwendete YnjE-Variante besitzt im nicht persulfurierten Zustand ein kalkuliertes Molekulargewicht von 47586 Da, persulfuriertes YnjE eine molare Masse von 47619 Da (Persulfid –SS-H, 33 Da). In **Abbildung 22** sind die Spektren der ESI-MS Analysen dargestellt. Es ist erkennbar, dass gereinigtes YnjE, welches nicht mit den Cysteindesulfurasen inkubiert wurde, zum größten Teil mit einer molare Masse von 47586 Da identifiziert wurde und dementsprechend nicht persulfuriert ist (**Abbildung 22B**). Wird YnjE mit IscS oder CsdA unter Verwendung von L-Cystein als Schwefelquelle inkubiert, liegt YnjE im persulfurierten Zustand vor, was einer molaren Masse von 47619 Da entspricht (**Abbildung 22A**). Beide Cysteindesulfurasen können dementsprechend *in vitro* das von L-Cystein mobilisierte Persulfid auf YnjE übertragen. Eine Inkubation von YnjE mit SufS und L-Cystein sowie L-Cystein ohne Cystein-Desulfurase hatte keine Auswirkung auf den Persulfurierungsgrad YnjEs (**Abbildung 22B und 22C**).





**Abbildung 22: Analyse der Persulfurierung von YnjE durch Cysteindesulfurasen**

Durch massenspektrometrische Untersuchungen wurde die Masse von YnjE vor und nach Inkubation mit Cystein und einer der drei *E. coli* Cysteindesulfurasen bestimmt. Nach der Inkubation mit IscS (**A**) erhöht sich die Molare Masse des YnjE-Proteins um 33 kDa, was der Masse einer Persulfidgruppe entspricht. Eine Inkubation mit Cystein ohne Desulfurase (**C**) führte zur Detektion einer molaren Masse, welche dem unbehandelten YnjE (**B**) entspricht.

### 3.5 Einfluss von YnjE auf die MPT-Synthese

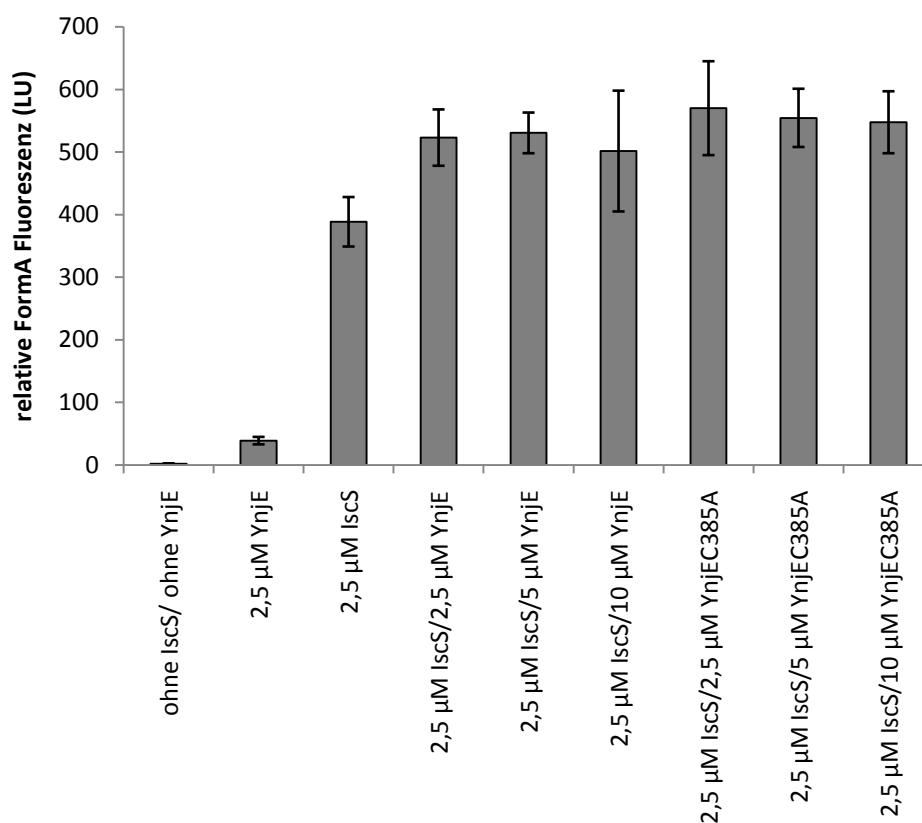
Die Cysteindesulfurase IscS kann eine Perulfidgruppe auf das Cystein der putativ aktiven Schleife YnjEs übertragen. Darüber hinaus wurde in den zuvor beschriebenen Experimenten eine Interaktion zwischen YnjE und dem MoeB-Protein nachgewiesen. Um die Rolle YnjEs im zweiten Schritt der Moco-Biosynthese zu untersuchen, wurden drei verschiedene Versuchsansätze gewählt. Zunächst wurde der Einfluss YnjEs auf einen *in vitro* Ansatz zur MPT-Synthese untersucht. In einem zweiten Versuch folgte die Aktivitätsbestimmung eines Molybdoenzym, welches zuvor in verschiedenen YnjE- und Cysteindesulfurase knock-out-Stämmen exprimiert wurde. Darüber hinaus wurde der relative Sulfurierungsgrad des gereinigten MoaD-Proteins aus diesen Mutantenstämmen bestimmt.

#### 3.5.1 Untersuchung eines Einflusses von YnjE auf die MPT-*in vitro* Synthese

Die Thiocarboxylierung MoaDs ist *in vitro* durch Zugabe von MoeB und ATP für die Adenylierung sowie IscS und L-Cystein als Schwefelquelle durchführbar. Der Anteil an thiocarboxyliertem MoaD kann dann indirekt nachgewiesen werden, indem durch Zugabe von MoaE der aktive MPT-Synthase-Komplex gebildet werden kann und dieser PrecursorZ zu MPT konvertiert. Das gebildete MPT kann dann quantifiziert werden.

Für diesen Versuch wurden 20  $\mu\text{M}$  MoeB, 20  $\mu\text{M}$  inaktive MPT-Synthase und 2,5  $\mu\text{M}$  IscS eingesetzt. In unterschiedlichen Ansätzen wurde YnjE in steigenden Konzentrationen von 0-10  $\mu\text{M}$  hinzugefügt. Dabei wurde zunächst IscS mit L-Cystein und YnjE versetzt und erst nach 5 min Inkubation die inaktive MPT-Synthase und MoeB hinzugefügt. Die Konzentrationen an IscS und YnjE gering gehalten, um sich den physiologischen Bedingungen möglichst anzunähern. Wurde weniger als die oben genannten Protein-Konzentrationen eingesetzt, war keine *in vitro* MPT-Synthese möglich. Durch Zugabe von PrecursorZ wurde die MPT-Synthese gestartet. Nach 20 minütiger Inkubation wurde die Reaktion durch saures Jodkaliumjodid gestoppt und die Ansätze über Nacht oxidiert. Die Überführung von MPT in die stabilere und fluoreszierende FormA ist wie in Material und Methoden beschrieben durchgeführt worden. Die Höhe der relativen FormA-Fluoreszenz in den verschiedenen Ansätzen, welche der MPT-Produktion entspricht, ist in **Abbildung 23** dargestellt. Es ist zu erkennen, dass durch Zugabe von YnjE eine Steigerung der MPT-Synthese erreicht

werden konnte. Ein steigender Effekt ist bis zu einer YnjE-Konzentration zu beobachten, welche der IscS-Konzentration entspricht (2,5  $\mu$ M). Darüber hinaus gehende YnjE-Konzentrationen führen zu keiner weiteren Steigerung der MPT-Synthese. Bei equimolarer YnjE/IscS-Konzentration beträgt die Steigerung des gebildeten MPT ca. 10-20 % im Vergleich zur IscS-Kontrolle (**Abbildung 23**). Durch einen weiteren Kontrollansatz ohne IscS konnte gezeigt werden, dass durch YnjE allein eine *in vitro* Synthese von MPT unter den etablierten Assay-Bedingungen nicht möglich ist (**Abbildung 23**).

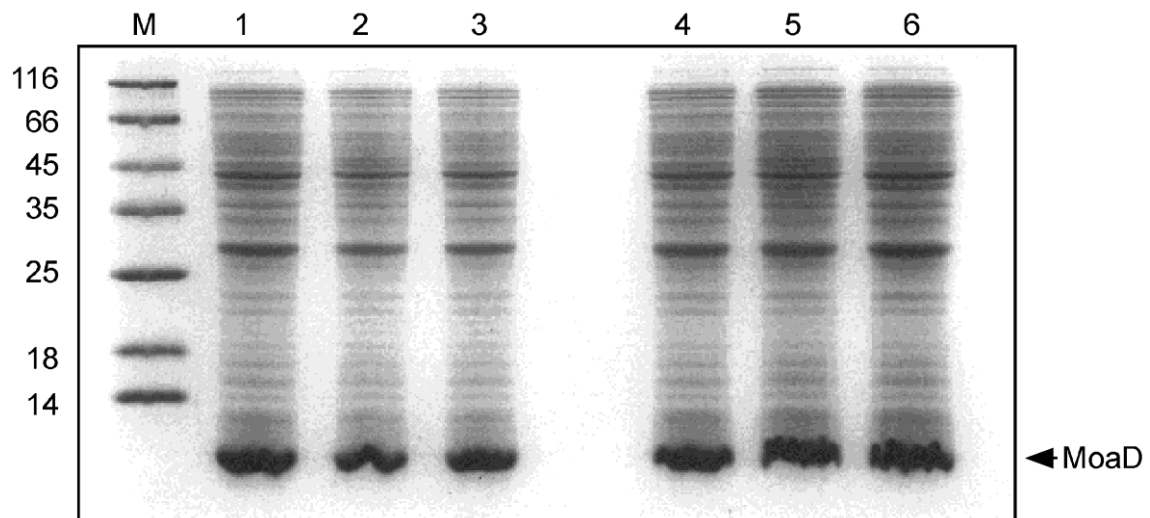


**Abbildung 23: Synthese von MPT *in vitro***

MPT wurde *in vitro* durch die Proteine des zweiten Schrittes der Moco-Biosynthese; MoeB (20 $\mu$ M) und die inaktive MPT-Synthase (20 $\mu$ M) hergestellt. Dabei wurde L-Cystein als Schwefelquelle verwendet. Durch die Zugabe von IscS (2,5 $\mu$ M) wurde ein Persulfid von L-Cystein mobilisiert und der inaktiven MPT-Synthase zur Verfügung gestellt, wodurch PrecursorZ zu MPT umgewandelt wurde. Ein Effekt von YnjE in steigenden Konzentrationen auf die Schwefelübertragung wurde hier analysiert. Durch die Zugabe von equimolaren IscS/YnjE-Konzentrationen konnte eine Steigerung der MPT-Synthese von ca. 20% gemessen werden. Höhere YnjE-Konzentrationen hatten keinen weiteren Einfluss. Die Cysteinaustauschmutante YnjEC385A hatte einen vergleichbaren Effekt auf die MPT-Synthese wie die Variante His-YnjE $\Delta$ 1-21.

### 3.5.2 Untersuchung des Sulfurierungsgrades von Moad in *E. coli*- Sulfurase-Mutantenstämmen

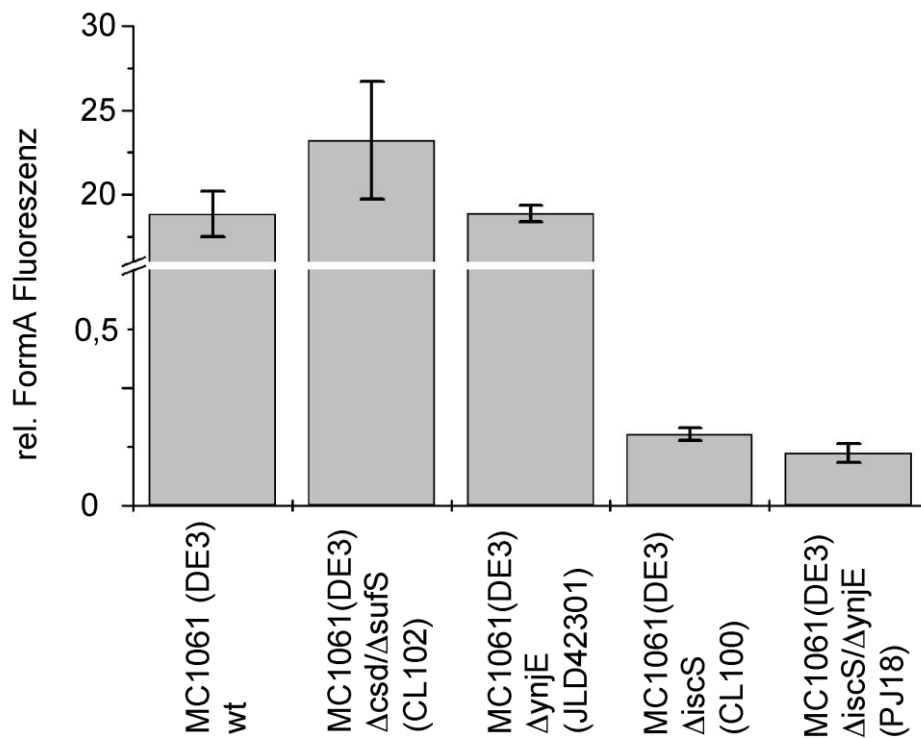
In diesem Experiment wurde der Einfluss der drei *E. coli*-Desulfurasen und YnjEs auf die Thiocarboxylierung Moads *in vivo* untersucht. Hierzu sollte das Moad Protein aus verschiedenen Mutantenstämmen isoliert werden und mittels des zuvor beschriebenen *in vitro* Assays zur MPT-Synthese eingesetzt werden. In diesen Mutanten wurden die jeweiligen Gene für die Expression der endogenen Desulfurasen CsdA, SufS, IscS oder YnjE ausgeschaltet. Ein *knock out* des IscS-Proteins führt zu einer stark verminderten Teilungsrate der betroffenen Stämme. Aus diesem Grund wurden die Mutantenstämme zur gleichen Zelldichte von  $OD_{600} = 0,8$  angezogen und geerntet. Ein erster Versuch endogenes Moad in Proteinrohextrakten der Mutantenstämme zu vermessen schlug vermutlich aufgrund der zu geringen Moad-Konzentration fehl. In keinem dieser Ansätze unter Verwendung von Proteinrohextrakten, war FormA detektierbar. Um Moad in ausreichender Menge zur Verfügung zu haben wurden deshalb in die Mutantenstämme Moad-Expressionsplasmide eingeführt. Eine Überexpression des verwendeten Moad-Konstrukts ist allerdings nur in Abhängigkeit von der T7-Polymerase möglich. Da die verwendeten Desulfurase-Mutanten diese nicht enthielten, mussten mittels Lysogenisierung der MC1061-Mutantenstämme die entsprechenden Phagen-DNA-Fragmente nachträglich unter Verwendung des DE3-Page-Lysogenisation-Kit (Invitrogen) eingeführt werden. Die Überprüfung einer erfolgreichen Lysogenisierung und der Expression Moads erfolgte in einem SDS-PAGE (**Abbildung 24**). Die Proteinrohextrakte wurden dazu nach Zellaufschluss durch Ammoniumsulfatfällung angereinigt. In den Fraktionen aller lysogenisierten MC1061-Stämme war eine deutliche Überexpression von Moad im Proteinextrakt zu erkennen, woraus man auf die erfolgreiche DE3-Lysogenisierung der MC1061-Stämme schließen kann (**Abbildung 24**). Gleichzeitig wurde mit der SDS-PAGE abgeschätzt, ob die Moad-Menge in allen verwendeten Mutanten-Stämmen übereinstimmt. Die Gesamtproteinkonzentration wurde durch Absorptionsmessung bei 280 nm über den kalkulierten Moad-Extinktionskoeffizienten bestimmt (siehe Material und Methoden). Der Ansatz zur MPT-*in vitro* Synthese enthielt Moad, wie es in **Abbildung 24** dargestellt ist. Der Ansatz enthielt darüber hinaus keine weitere Schwefelquelle oder MoeB, um eine Thiocarboxylierung Moads *in vitro* auszuschließen. Es kann also davon ausgegangen werden, dass der thiocarboxylierte Anteil an gereinigtem Moad bereits *in vivo* sulfuriert wurde. Nur thiocarboxyliertes Moad kann mit MoadE den aktiven MPT-Synthasen-Komplex bilden, welcher PrecursorZ zu MPT konvertieren kann.



**Abbildung 24: Überexpression von MoaD in MC1061**

Die erfolgreiche Lysogenisierung der MC1061-Stämme (Lauhon, 2004) und die daraus resultierende Überexpression MoaDs wurde mittels SDS-PAGE verifiziert. In den angereinigten Extrakten aller verwendeten Stämme ist deutlich eine Überexpression MoaDs erkennbar. Es wurden 8µg Gesamtprotein in einem 15%igen Acrylamidgel eingesetzt.

Das synthetisierte MPT in einem Ansatz mit MoaD, MoaE und PrecursorZ sollte dementsprechend proportional zu dem Anteil von thiocarboxyliertem MoaD sein und sich in Abhängigkeit des verwendeten MoaD-Expressionsstammes unterscheiden, falls ein Sulfurtransferase-*knock-out* einen Einfluss auf die MoaD-Thiocarboxylierung hat. Nach der Inkubation von MoaE, PrecursorZ und MoaD aus einem der sechs verwendeten Mutantenstämme, wurde das gebildete MPT in die stabilere FormA überführt und wie im vorhergehenden Abschnitt beschrieben mittels reversed phase HPLC analysiert. Die relative FormA-Fluoreszenz der einzelnen Ansätze zur Untersuchung des MoaD-Sulfurierungsgrades ist in **Abbildung 25** dargestellt. Deutlich zu erkennen ist ein Einfluss des *IscS-knock-outs* auf die detektierbare FormA-Fluoreszenz, während ein Fehlen der Cysteindesulfurasen CsdA oder SufS keinen Einfluss auf die MPT-Bildung zu haben scheint. Ein Einfluss der *YnjE-Deletion*, ist nur in Zusammenhang mit dem *IscS-knock-out* zu beobachten. Eine Minderung der detektierbaren FormA-Fluoreszenz war hier allerdings signifikant ( $p = 0,043$  ausgehend von einer Signifikanzebene von 0,05). Zudem entspricht die daraus ableitbare Minderung des MoaD-Sulfurierungsgrades in diesem Experiment der Steigerung der MPT-Bildung im vorhergehenden *in vitro*-Experiment.



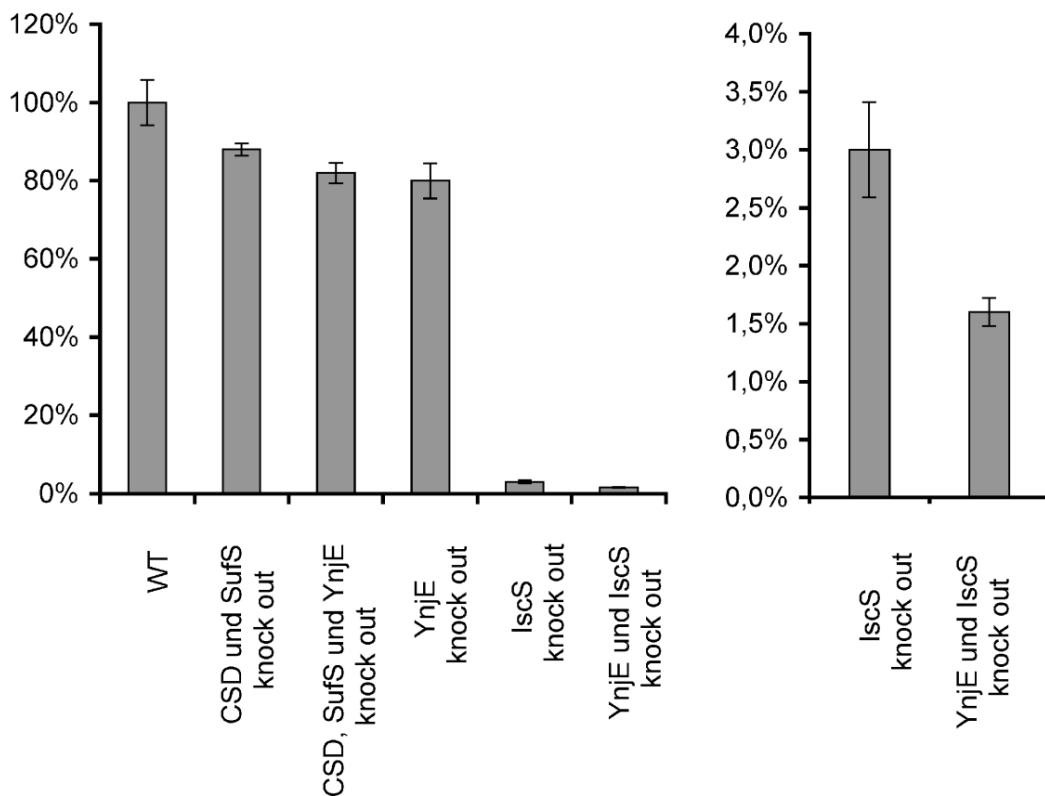
**Abbildung 25: Analyse des MoaD Sulfurierungsgrades**

Rekombinantes MoaD wurde aus den dargestellten *E. coli* MC1061-Stämmen isoliert und in einem Assay zur MPT-Synthese eingesetzt. Die relative Fluoreszenz des Oxidationsproduktes FormA wurde mittels HPLC ermittelt, entsprechend dem jeweiligen Expressionstamm zugeordnet und in einem Diagramm dargestellt. Einen negativen Effekt auf die MPT-Bildung hat nur das IscS-knock-out. Ein zusätzlicher negativer Effekt konnte in Form der IscS/YnjE-Mutante beobachtet werden. 75  $\mu$ M MoaD aus jeweils drei unabhängigen Reinigungen wurde für die MPT-Synthese verwendet und die entsprechenden Daten gemittelt. ( $p = 0,043$  ausgehend von einer Signifikanzebene von 0,05 für CL100 vs. PJ18).

### 3.5.3 Einfluss der Desulfurasen- bzw. YnjE-Mutanten auf die Moco-Biosynthese

In einem vergleichbaren Ansatz wurde die Bildung des Moco in den oben verwendeten Desulfurase-Mutantenstämmen zur zusätzlichen Bestätigung der Ergebnisse untersucht. Dazu sollte die Aktivität eines Molybdoenzym bestimmt werden, als Maß für den erfolgten Einbau des Moco in das entsprechende Enzym. Es wird vorausgesetzt, dass eine Beeinflussung der MPT-Bildung sich in der Aktivität des

Molybdoenzym widerspiegelt. Die humane Sulfitoxidase (hSO) wurde unter Zugabe von Natriummolybdat in den Cysteindesulfurase- und den YnjE-Mutantenstämmen aus dem vorhergehenden Experiment heterolog mit fusioniertem N-terminalen 6xHistidin Polypeptid exprimiert, und mittels Ni-NTA-Chromatographie gereinigt. Die spezifische Aktivität der hSO wurde wie in Material und Methoden beschrieben nach einem etablierten Protokoll des Cytochrom c-Reduktase Assays bestimmt. (**Abbildung 26**). Eine Minderung der hSO-Aktivität war zu beobachten, wenn diese im *iscS*-Mutantenstamm exprimiert wurde. Durch zusätzliches *ynjE*-knock out wurde die hSO-Aktivität zusätzlich herabgesetzt (**Abbildung 26**). Es konnte der gleiche Effekt wie in Abschnitt 3.5.2 beobachtet werden.



**Abbildung 26: Einfluss der Desulfurase-knock-outs auf die Aktivität der hSO**

Die hSO-Aktivitäten der MC1061-Mutanten wurden in prozentual in Bezug zur MC1061 (WT)-Aktivität in einem Diagramm dargestellt. Der *ynjE* knock out Hintergrund bei der Expression der hSO führt zu einer zusätzlichen Minderung der hSO-Aktivität im Vergleich zur *IscS*-Mutante.

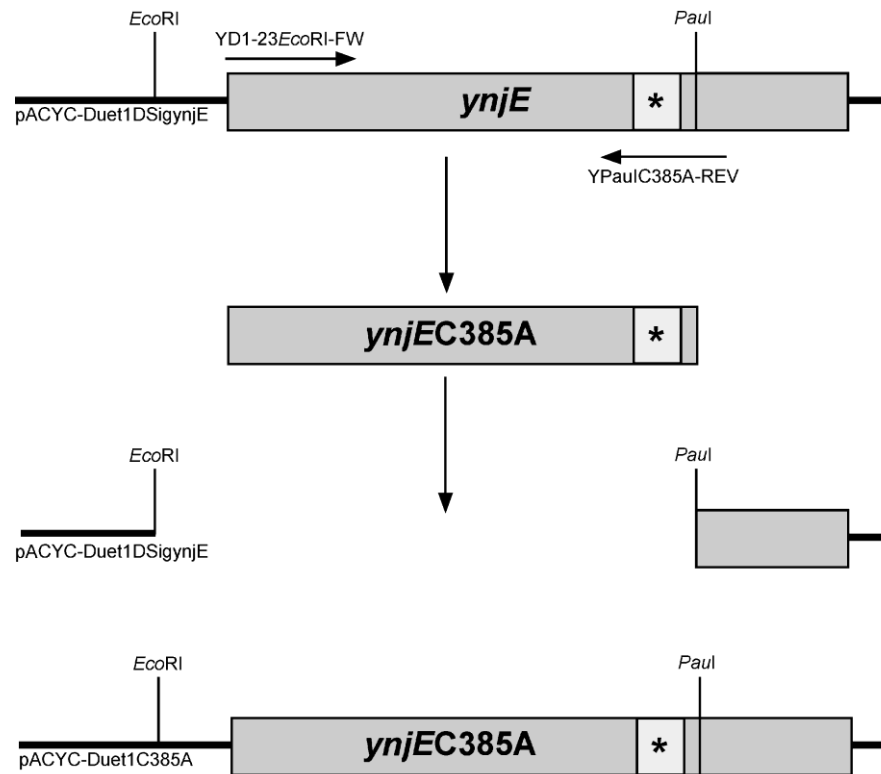
### 3.6 Analyse des Cysteinrestes in Aminosäuren-Position 385

In den vorhergehenden Experimenten konnte eine Interaktion zwischen MoeB und YnjE, ein positiver Einfluss YnjEs auf die MPT-Synthese und die Sulfurierung YnjEs durch IscS unter Mobilisierung des Schwefels aus L-Cystein, nachgewiesen werden. Anhand einer YnjE-Mutante, in welcher der einzige Cysteinrest zu Alanin ausgetauscht wurde, sollte überprüft werden, ob die beobachteten Effekte auf eine Persulfurierung dieses Cysteins zurückzuführen sind. Der C385 ist der einzige Cysteinrest YnjEs, weshalb nur dieser für eine Persulfurierung in Betracht gezogen werden kann.

#### 3.6.1 Erstellung der C385A-Mutation

Die C385A-Mutation wurde mittels PCR durch Oligonukleotide mit veränderter Basenfolge generiert. Es wurde ein verkürztes *ynjE*-Fragment amplifiziert, welches die Basenpaare 70 bis 1176 umfasst und die DNA-Sequenz, die für die aktive Schleife kodiert einschließt (**Abbildung 27**). Es wurden die Oligonukleotide YD1-21EcoRI-Fw und YPaulc385a-Rev (siehe Material und Methoden) verwendet. Nach der Amplifikation wurde das Fragment direkt aus dem PCR-Produkt mit den Restriktionsenzymen *EcoRI* und *Paul* ausgeschnitten und in einem Agarosegel separiert. Dieses *Paul*-, *EcoRI*-Frament wurde dann in einen Vektor ligiert, welcher die 5'-*ynjE*-Sequenz enthielt und zuvor ebenfalls mit *Paul* und *EcoRI* verdaut und separiert wurde. Dabei wurde eine endogene *Paul*-Restriktionsschnittstelle genutzt, welche stromabwärts der DNA-Sequenz der aktiven Schleife lokalisiert ist. Die Klonierungsstrategie zur Erstellung der Cysteinaustauschmutante ist in **Abbildung 27** dargestellt. Die erfolgreich eingeführte Mutation wurde durch Sequenzieren verifiziert. Die Expression und Reinigung der Variante His-YnjE-C385A- $\Delta$ 1-21 erfolgte wie für die Variante His-YnjE $\Delta$ 1-21 beschrieben. Die Proteinausbeute betrug ebenfalls ca. 10 mg Protein aus 5 L Expressionskultur.





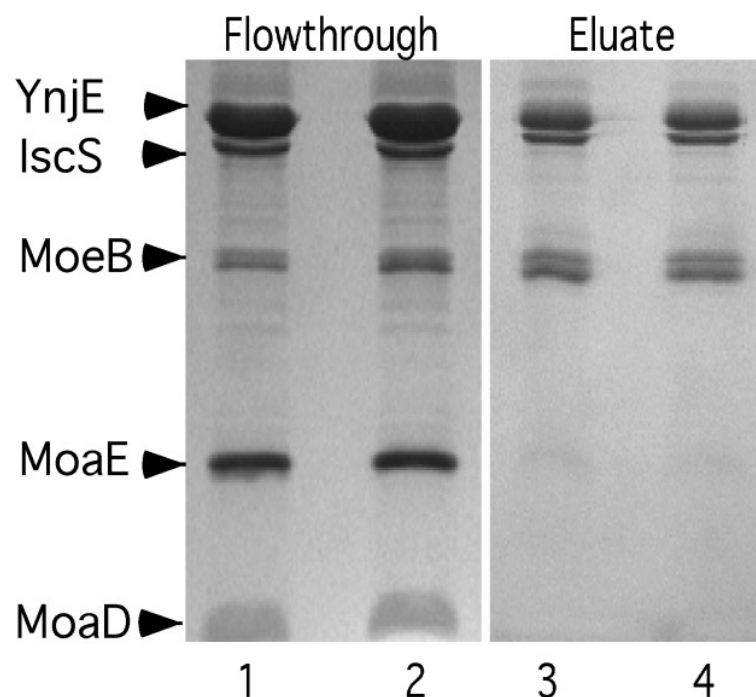
**Abbildung 27: Klonierungsstrategie zur Erstellung der C385A-Mutante von YnjE**

Aus dem Vektor *pACYC-Duet1DSigynjE* (PCR-Template DNA) wurde ein *ynjE*-Fragment amplifiziert, welches die Basen 70-1176 des *ynjE*-Gens umfasst und einen Austausch des Codons für das Cystein 385 der aktiven Schleife (\*) enthielt. Über die eingeführten Restriktionsschnittstellen *EcoRI* und *Paul* wurde dieses PCR-Fragment verdaut und in den ebenfalls *EcoRI* (Vektor-eigene Schnittstelle) und *Paul* (endogene *ynjE*-Schnittstelle) geschnittenen *pACYC-Duet1DSigynjE* (Verdau-Template) kloniert. Somit wurde das vollständige Vektorkonstrukt *pACYC-Duet1C385A* erhalten.

### 3.6.2 Analyse der C385A-Mutante in Bezug auf die Interaktion mit dem MoeB-Protein und in Bezug auf die Beeinflussung der MPT-Synthese

Mit Hilfe der YnjE-Antiserum vermittelten Ko-Affinitätsreinigung sollte überprüft werden, ob der Austausch des Cystein 385 die Interaktion mit dem MoeB-Protein beeinflusst. Das Experiment wurde wie in **Abschnitt 3.3.3** beschrieben mit His-YnjE-C385A- $\Delta$ 1-21 und His-YnjE $\Delta$ 1-21 vergleichend durchgeführt. Abbildung 28 verdeutlicht, dass kein Einfluss der C385A-Mutation auf die Interaktion zwischen YnjE und MoeB beobachtet werden konnte (**Abbildung 28**).

Durch den in Abschnitt 3.5.1 beschriebenen Versuch zur MPT-*in vitro* Synthese, sollte ein Einfluss der Mutation auf die für die Variante His-YnjE $\Delta$ 1-21 beobachtete Steigerung des gebildeten MPT untersucht werden. Eine Abhängigkeit des Cystein 385 ließe Rückschlüsse auf einen Schwefeltransfer über ein Cystein 385 gebundenes Persulfid im zweiten Schritt der Moco-Biosynthese zu. Es konnte allerdings ein vergleichbarer steigernder Effekt der Mutante auf die MPT-Synthese beobachtet werden (**Abbildung 23**).



**Abbildung 28: Einfluss des C385 YnjEs auf die Interaktion mit MoeB**

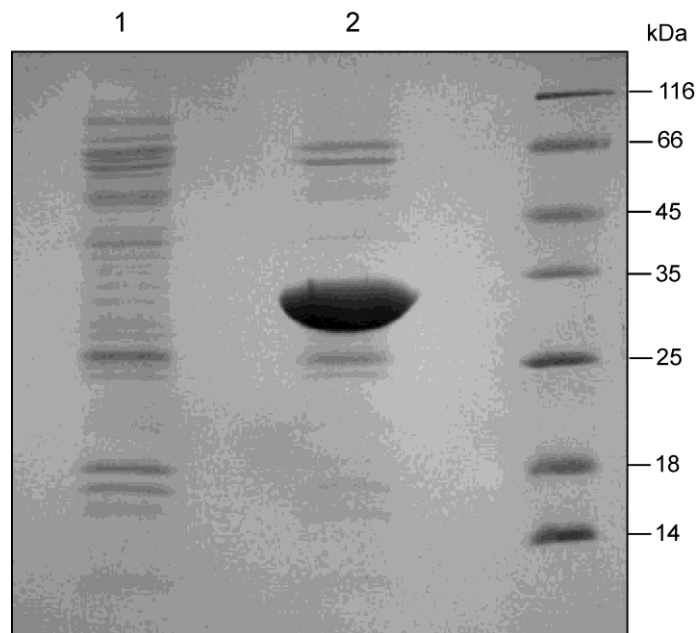
Vergleichend dargestellt sind anti-YnjE-Affinitätsreinigungs-Ansätze, welche im SDS-PAGE analysiert wurden. In den Spuren 1 und 3 wurde His-YnjE $\Delta$ Sig, in den Spuren 2 und 4 die Cystein zu Alanin Austauschmutante His-YnjE $\Delta$ 1-21C385A eingesetzt. Der C385 hat keinen Einfluss auf die Interaktion zwischen YnjE und MoeB. Es wurde ein 15%iges Acrylamidgel verwendet.

### 3.7 Expression und Reinigung der YnjE-Varianten His-RLD1-2 $\Delta$ 1-21 und His-RLD3

Durch die Generierung von YnjE-Domänenmutanten, sollte die Rolle der einzelnen YnjE-Domänen untersucht werden. Dabei wurde die Variante His-YnjE-Rh1-2 hergestellt, welche die Aminosäuren 24-300 und damit die beiden N-terminalen Rhodanese-ähnlichen Domänen des YnjE-Proteins umfasst. Mit Hilfe der Primer YD1-21EcoRI-Fw und Rh1-2NotIRev wurde ein entsprechendes PCR-Fragment erzeugt um in den Expressionsvektor pACYC-Duet1 (Novagen) über die Restriktionsschnittstellen überführt. Die Variante His-YnjERLD3 umfasste die C-terminale Rhodanese-Domäne mit den Aminosäuren 300-435. Das Expressionkonstrukt wurde durch die Primer Rh3EcoRIFw und DN23ynje-Rev ebenfalls in pACYC-Duet1 (*EcoRI/NotI*) erzeugt. Beide Varianten enthielten eine N-terminale His<sub>6</sub>-Fusion.

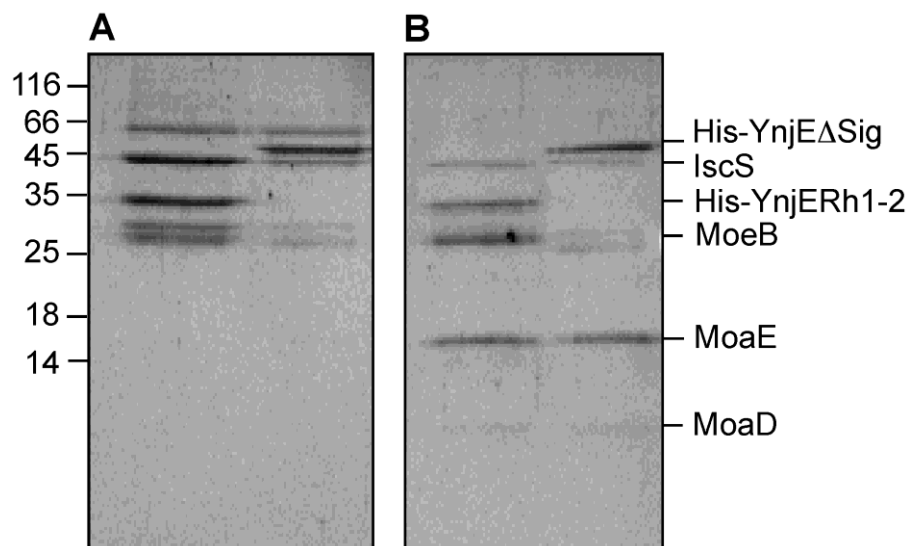
Die Expression erfolgte wie in Material und Methoden beschrieben, die Reinigung mittels Ni-NTA-Chromatographie, welcher eine Größenausschlusschromatographie unter Verwendung einer Superose 12-Gelfiltrationssäule (GE-Healthcare) angeschlossen wurde. In **Abbildung 29** wurde die Reinheit der gereinigten YnjE-Domänenmutanten in einem SDS-PAGE analysiert. His-YnjE-RLD1-2 (32 kDa) konnte in Mengen von ca. 8 mg aus 4 L Expressionskultur in vergleichbarer Qualität zu His-YnjE $\Delta$ 1-21 gereinigt werden (**Abbildung 29 Spur 2**). Die Ausbeute an His-YnjERLD3 (16 kDa) betrug ca. 0,2 mg aus 4 L Expressionskultur, und wies noch erhebliche Verunreinigungen auf (**Abbildung 29 Spur 1**). Darüber hinaus präzipitiert His-YnjERLD3 bei 4°C innerhalb von 24 h. Die Reinigung der YnjE-Variante His-YnjERh3 wurde in dieser Arbeit nicht weiter optimiert. Aufgrund der zu geringen Proteinkonzentration konnte diese YnjE-Variante nicht für Analysen genutzt werden.

Die Variante His-YnjE-RLD1-2 wurde zur Analyse der Interaktion mit den Proteinen des zweiten Schrittes der Moco-Biosynthese verwendet. Zunächst wurde überprüft, ob eine Bindung des bereits verwendeten YnjE-Antiserums mit His-YnjE-Rh1-2 im Immunoblot detektierbar ist und somit für die Antikörpergebundene Affinitätsreinigung verwendet werden kann. Da auf dem Immunoblot eine 32 kDa Bande detektiert werden konnte, und diese His-YnjE-RLD1-2 entspricht, wurde die Interaktionsanalyse wie in Abschnitt 3.3.3 vergleichend mit His-YnjE-RLD1-2 und His-YnjE $\Delta$ 1-21 durchgeführt (**Abbildung 30A**). His-YnjE-RLD1-2 wurde mit dem MoeB-Protein koeluiert, weshalb davon ausgegangen werden kann, dass die beiden N-terminalen Rhodanese-Domänen des YnjE-Proteins die Interaktion mit MoeB vermitteln (**Abbildung 30A Spur 1**).



**Abbildung 29: Reinigung der YnjE-Varianten**

Die YnjE-Varianten His-YnjE-RLD1-2 und His-YnjERLD3 wurden mittels Ni-NTA-Chromatographie und Gelfiltration gereinigt und in einem SDS-PAGE analysiert. Die His-YnjERLD3-Reinigung weist noch erhebliche Verunreinigungen bei geringer Proteinausbeute auf. Die His-YnjE-RLD1-2-Variante wurde für weitere Analysen verwendet.



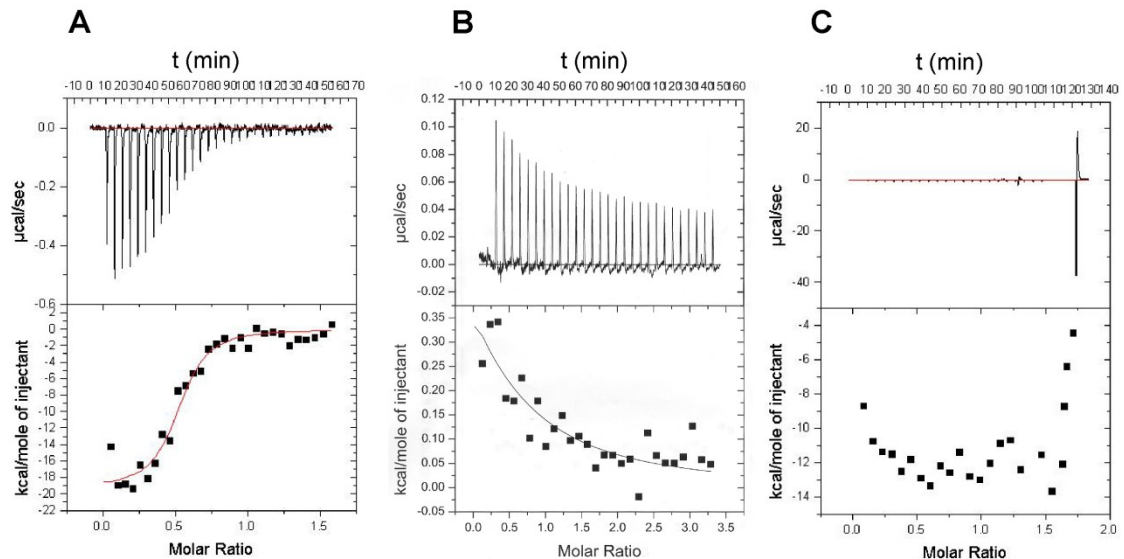
**Abbildung 30: Interaktionsanalyse von His-YnjERh1-2**

Im SDS-Gel wurden die Ansätze der antikörpergebundenen Affinitätsreinigung mit der His-YnjE-RLD1-2-Variante analysiert. (A) Eluat; (B) Durchfluss der ProteinG Säule. Verglichen wurde die Interaktion von YnjE-RLD1-2; 32 kDa (1) mit His-YnjE $\Delta$ Sig; 47 kDa (2). In beiden Ansätzen wurde MoeB koeluiert.

### 3.8 Bestimmung der Dissoziationskonstanten möglicher YnjE Interaktionen durch ITC

Die Isothermale Titrationskalorimetrie erlaubt indirekt die Messung der Bindungswärme, welche bei der Komplexbildung zweier Proteine (Ligand und Bindungspartner) der Umgebung entzogen wird oder frei wird. Die Umgebungstemperatur wird dabei vom Gerät kontinuierlich gemessen und konstant gehalten, während der Ligand portionsweise in die Messzelle des Kalorimeters gegeben wird. Entzieht die Interaktion von Ligand und Bindungspartner der Umgebung Energie muss das System die Messzelle um einen dementsprechend höheren Energiebetrag erwärmen. Bei exothermer Interaktion wird hingegen ein geringerer Energiebetrag benötigt um die Temperatur der Messzelle konstant zu halten. Diese Energiedifferenz wird in Form eines elektrischen Impulses gemessen und entspricht der Temperaturdifferenz ( $\Delta T$ ). Diese ermöglicht es die Entropie, freie Enthalpie und die Dissoziationskonstante der Interaktion zu bestimmen, wenn die Konzentration der Bindungspartner bekannt ist. Die Methode der ITC wurde in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Hermann Schindelin an der Universität Würzburg erlernt und in der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Dr. Silke Leimkuehler etabliert. Als Positivkontrolle wurde die Interaktion zwischen den beiden MPT-Synthase-Untereinheiten vermessen, und eine Dissoziationskonstante von  $K_d = 0,9 \mu\text{M}$  für diese Interaktion bestimmt (**Abbildung 31**).

Im Zuge dieser Arbeit sollte eine Interaktion zwischen IscS/YnjE; MoeB/YnjE und MoaD/YnjE untersucht werden. Dazu wurden 200, 100 bzw. 50  $\mu\text{M}$  YnjE als Ligand zu 20 bzw. 10  $\mu\text{M}$  IscS, MoeB bzw. MoaD bei 20 ° C und 15 °C titriert. Im Fall von IscS wurde eine mögliche Interaktion von einer Dissoziation des IscS-Dimers überlagert, welche durch eine Puffer-Titrationskontrolle bestätigt wurde. Auf Grund der Präzipitation des MoeB-Proteins war eine Messung der MoeB/YnjE-Interaktion ebenfalls nicht möglich. Für MoaD konnte keine Interaktion mit YnjE durch die ITC nachgewiesen werden. Möglicherweise könnte eine Interaktion von YnjE und der MPT-Synthase durch Bildung eines Proteinkomplexes aus YnjE, MoeB und MPT-Synthase stattfinden. Es ist jedoch nicht möglich diesen mittels ITC zu analysieren, da hier nur Interaktionen zwischen zwei Interaktionspartnern gemessen werden können.



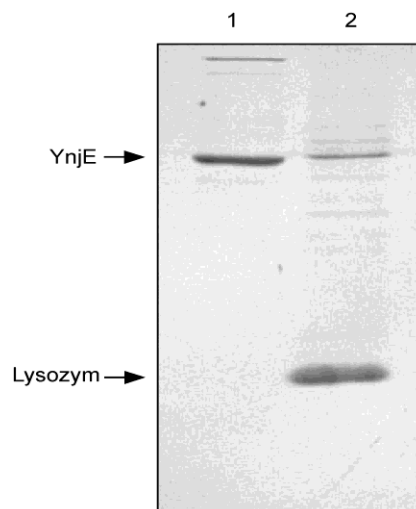
**Abbildung 31: ITC-Experimente**

Dargestellt ist die Titrationskurve für 150  $\mu\text{M}$  MoaD in 15  $\mu\text{M}$  MoaE als Kontrollexperiment (A), 200  $\mu\text{M}$  YnjE zu 20  $\mu\text{M}$  IscS (B) und 200  $\mu\text{M}$  YnjE zu 20  $\mu\text{M}$  MoeB (C). Die berechnete molare Energie (kcal/mol) ist aufgetragen gegen das Konzentrationsverhältnis der jeweiligen Interaktionspartner.

### 3.9 Subzelluläre Lokalisierung von YnjE

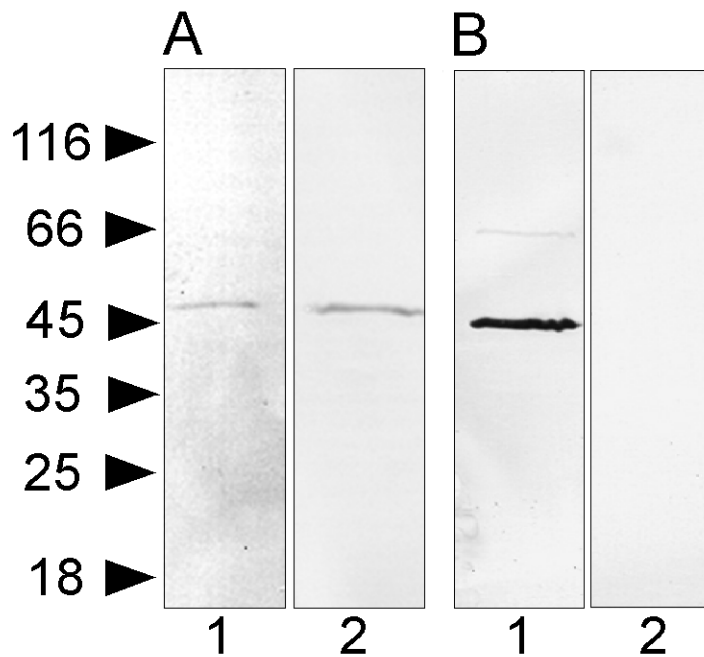
Die Aminosäuren 1-21 des endogenen YnjE-Proteins sind Bestandteil eines periplasmatischen Signalpeptids. Durch Sequenzanalysen konnte eine Übereinstimmung mit Sec-System-abhängigen Signalpeptiden identifiziert werden. In der Regel werden Proteine mit Sec-Signalpeptid in den periplasmatischen Raum transportiert, wobei die Signalsequenz abgespalten wird (Buist *et al.*, 2006). Durch Massenspektrometrie konnte gezeigt werden, dass gereinigtes YnjE-His kein Signalpeptid enthält. Da eine Interaktion von YnjE mit dem MoeB-Protein und eine Schwefelübertragung von IscS auf YnjE nachgewiesen wurden, diese Interaktionspartner jedoch cytoplasmatische Proteine sind, sollte überprüft werden, ob YnjE im Cytoplasma verbleibt oder sowohl in Cytoplasma als auch im Periplasma lokalisiert ist. Es wurde sowohl heterolog exprimiertes YnjE-His aus *E. coli* BL21 als auch endogenes YnjE aus dem *E. coli* Stamm MC1061 lokalisiert. Zudem wurde überprüft, ob die Überexpression der humanen Sulfitoxidase in MC1061 einen Einfluss auf die Lokalisierung endogenen YnjEs besitzt.

Die Trennung von Periplasma- und Cytoplasmafraktion wurde wie in Material und Methoden beschrieben durchgeführt. Dabei wurde auf eine Separation der Membranfraktion verzichtet. Periplasma- und Cytoplasma-Fractionen wurden in einem gleichen Volumen von 1ml in 20 mM Tris-HCl pH 7,5 aufgenommen. Die fraktionierten Protein-Rohextrakte wurden im SDS-PAGE aufgetrennt und YnjE im Immunoblot durch Verwendung des murinen YnjE-Antiserums detektiert. Zunächst wurde die Variante YnjE-His lokalisiert, um die Durchführbarkeit der Methode grundsätzlich zu überprüfen. In **Abbildung 32** wurde überexprimiertes YnjE-His sowohl cytoplasmatisch als auch periplasmatisch lokalisiert. Dabei ist eine deutlich größere Proteinmenge im Cytoplasma zu finden. Durch die Induzierung der YnjE-His Expression erlaubt dies jedoch keine Rückschlüsse auf die physiologische Verteilung des YnjE Proteins. Aus diesem Grund wurde die Fraktionierung im *E. coli* MC1061-Wildtypstamm durchgeführt, in welchem endogenes YnjE detektiert werden sollte. Wie in **Abbildung 33A** verdeutlicht, wurde endogenes YnjE in der Periplasma- (1) und Cytoplasmafraktion (2) detektiert. Dabei besitzt die YnjE-Bande des Cytoplasma eine geringere Intensität als die Periplasmatische.



**Abbildung 32: Lokalisierung von YnjE-His in *E. coli* BI21**

Die Fraktionierung in Cytoplasma- (1) und Periplasmafraktion (2) wurde wie in Material und Methoden durchgeführt. Überexprimiertes YnjE-His wurde mit Hilfe eines YnjE-Antiserums in einem Immunoblot detektiert. Es ist deutlich mehr Protein in der Cytoplasmafraktion als im Periplasma nachweisbar. Lysozym wurde zum Verdau der Zellwand verwendet.



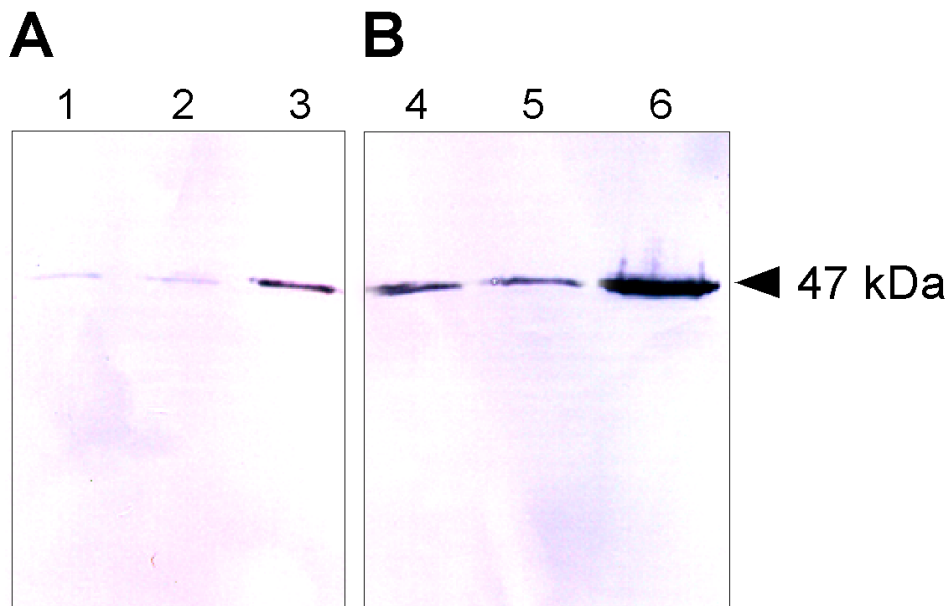
**Abbildung 33: Lokalisierung von endogenem YnjE aus *E. coli* MC1061**

Endogenes YnjE wurde mit Hilfe des YnjE-Antiserums im *E. coli*-Stamm MC1061 detektiert (**A**). Als Kontrolle wurde das periplasmatische Maltosebindeprotein (MBP) mittels eines MBP-Antikörpers lokalisiert (**B**). In (1) ist jeweils die Periplasmatische Fraktion, in (2) das Cytoplasma dargestellt.

Als Kontrolle für eine vollständige Trennung von Periplasma und Cytoplasma, wurde das endogene Maltosebindeprotein mit Hilfe eines spezifischen monoklonalen Antikörpers in den gleichen Fraktionen detektiert. Nach Induktion mit 0,2% w/v Maltose ist dieses nur in der Periplasmafraktion zu finden (**Abbildung 33B**).

In einem weiteren Experiment sollte überprüft werden, ob die Lokalisierung des YnjE-Proteins in Zusammenhang mit einer induzierten Moco-Biosynthese steht. Dazu wurde die subzelluläre Verteilung des YnjE-Proteins in einem MC1061-Stamm, in welchem die humane Sulfioxidase (hSO) heterolog überexprimiert wurde mit der YnjE-Verteilung im MC1061 (WT) verglichen. Im Immunblot war durch dieses Experiment kein Unterschied in Bezug auf die Lokalisierung des endogenen YnjE durch Überexpression der hSO nachweisbar (**Abbildung 34**).





**Abbildung 34: Einfluss der hSO auf die Lokalisierung von YnjE**

Die hSO wurde im *E. coli*-Stamm MC1061 überexprimiert und endogenes YnjE mittels Immunoblot im fraktionierten Proteinrohextrakt dieses Stammes detektiert. (**A**) Periplasma; (**B**) Cytoplasma; (1, 4) MC1061 mit überexprimierter hSO; (2, 5) MC1061 WT; (3, 6) überexprimiertes YnjE-C-His in *E. coli* BI21.

## 4. Diskussion

### 4.1 Strukturanalyse des YnjE-Proteins

#### 4.1.1 Analyse der YnjE-Domänen

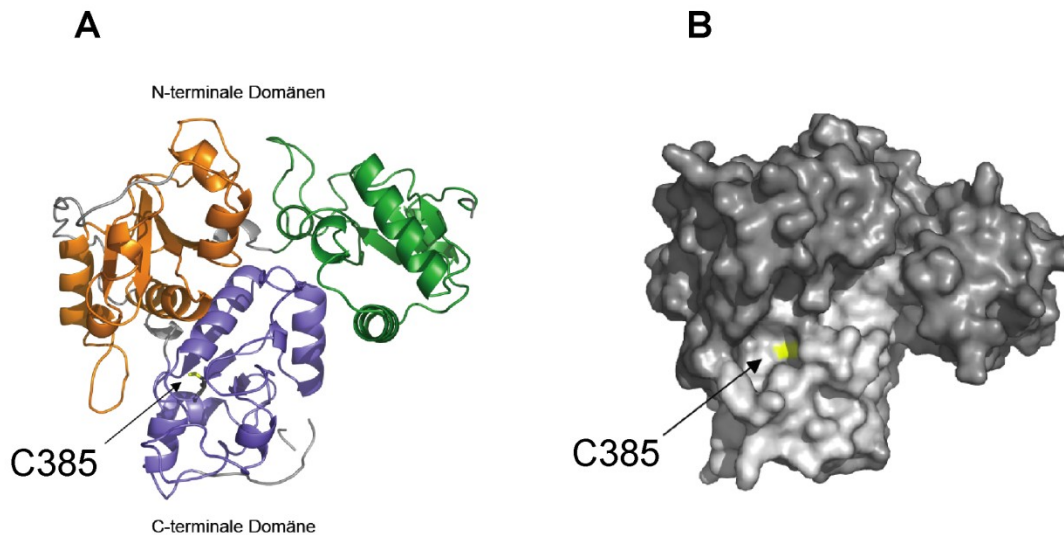
YnjE ist aus drei Rhodanese-ähnlichen Domänen aufgebaut, und ist damit die einzige bisher bekannte drei-Domänen-Rhodanese. Unter den Rhodanese-ähnlichen Proteinen existieren sowohl Proteine aus einer Domäne, Proteine aus zwei durch *linker*-Sequenzen verbundenen Rhodanesedomänen und Rhodanesen, welche neben der Rhodanesedomäne andere Domänen wie beispielsweise Signalpeptide enthalten. Der modulare Aufbau ist charakteristisch für die Familie der Rhodanesen. Proteine, welche nur eine Rhodanesedomäne besitzen bilden häufig Dimere, wie z. B. das *E. coli*-Protein GlpE. Wie für die meisten Rhodanesen ist zwar bisher auch für GlpE eine Verbindung zum Schwefelmetabolismus *E. coli* *in vivo* nicht nachgewiesen. Für die katalytische Sulfurtransferaseaktivität *in vitro* von Thiosulfat auf Cyanid ist allerdings jede der Dimeruntereinheiten befähigt (Ray *et al.*, 2000). Gleiches gilt für zwei-Domänen-Rhodanesen mit *linker*-Sequenz. Hier wurde ebenfalls Sulfurtransferaseaktivität für Mercaptopyruvat, am Beispiel der *Arabidopsis thaliana* Sulfurtransferase (Burow *et al.*, 2002) gemessen, indem rekombinante Einzeldomänen erstellt wurden. Es wurde deshalb vermutet, dass sowohl die Dimerisierung als auch die Tandem-Organisation von Rhodanesen keine Rolle beim Substratumsatz spielt, sondern eher zur Stabilität des Enzyms beiträgt (Burow *et al.*, 2002). Innerhalb dieser Arbeit wurden die Domänen des YnjE-Proteins durch die Erstellung von YnjE-Deletionsmutanten untersucht. Um die Rolle der YnjE-Domänen für die gezeigte Interaktion mit dem MoeB-Protein zu untersuchen wurden Mutanten erstellt die zu einem die beiden N-terminalen Domänen und zum anderen die C-terminale Domäne mit der aktiven Schleife umfasst. Letztere Variante neigte unter den hier verwendeten Bedingungen zur Präzipitation. Die fehlenden N-terminalen Domänen YnjEs tragen dementsprechend wesentlich zur Stabilität des vollständigen Proteins bei. Um diese YnjE-Variante zu charakterisieren ist zunächst eine Optimierung der Expression und Reinigung notwendig. Erste Erfolge eine Präzipitation zu verhindern konnten durch die Verwendung von höheren Puffer pH-Werten (pH 8,5) erreicht werden. Dennoch waren Untersuchungen an His-YnjERLD3 nicht möglich.

Die vergleichenden Interaktionsstudien wurden deshalb mit der Mutante His-YnjE-Rh1-2 durchgeführt. Diese zeigte in der Antikörpergebundenen Affinitätsreinigung wie die Variante His-YnjE $\Delta$ 1-21 eine spezifische Interaktion mit dem MoeB-Protein und IscS. Die N-terminalen Rhodanesedomänen YnjE sind dementsprechend für eine Interaktion mit diesen Proteinen ausreichend. Eine Interaktion von Moad mit der Variante His-YnjE-Rh1-2 ohne ATP konnte nicht nachgewiesen werden. Dies legt nahe, dass auch dann wenn MoeB an YnjE gebunden ist, eine Interaktion von MoeB/Moad in Form des Acyladenylatkomplexes stattfindet.

#### 4.1.2 Kristallisation YnjEs

Genauer über die Rolle der einzelnen Domänen YnjEs könnten Informationen über die räumliche Struktur des YnjE-Proteins liefern. Diese ermöglicht es die Ergebnisse der Interaktionsstudien anhand von Proteinstruktur-basierten Analysen nachzuvollziehen, und die Bedeutung des einzigartigen Aufbaus aus drei Rhodanesedomänen zu verstehen. Beispielsweise könnten Vorhersagen über mögliche Interaktionen mit den Proteinen des zweiten Schrittes der Moco-Biosynthese oder Ko-Kristallisation eines YnjE/MoeB Komplexes die hier aufgeführten Ergebnisse zusätzlich stützen. Da das YnjE-Protein in dieser Arbeit erfolgreich exprimiert und gereinigt werden konnte, mit einer Proteinausbeute von ca. 2-5 mg hochreinem Protein pro L Kultur, konnten YnjE-Proteinkristalle generiert werden, welche zur Aufklärung der Tertiärstruktur beitragen. Da YnjE kaum Homologien zu anderen Rhodanesen mit gelöster Proteinkristallstruktur zeigt (höchste Übereinstimmung mit SseA ca. 20% Ähnlichkeit auf Aminosäureebene) wurden zusätzlich Schwermetallderivate von YnjE durch die Kooperationspartner (AG. H. Schindelin) erzeugt und vermessen. Die CD-Spektroskopischen Analysen haben erste Hinweise auf die Sekundärstruktur des YnjE-Proteins erbracht. Demnach überwiegen hier  $\alpha$ -helikale Strukturen. Erste Ergebnisse der Röntgenstrukturanalyse bestätigen dies. Zudem konnte eine recht hohe negative Oberflächenladung des YnjE-Proteins identifiziert werden. Diese vorläufige Struktur aus den bisherigen Daten der Röntgenstrukturanalyse des YnjE-Proteins ist in **Abbildung 36A** dargestellt. Durch den Aufbau aus drei Rhodanesedomänen, findet sich auch auf der Ebene der Proteinstruktur keine Gemeinsamkeit mit bereits kristallisierten Rhodanesen. Auch ist eine Trimerisierung anderer

Rhodanesen bisher nicht bekannt. Die ohnehin geringe Ähnlichkeit zu SseA auf Aminosäureebene lässt auch keine Parallelen in der Proteinstruktur erkennen. Der katalytische Cysteinrest der aktiven Schleife wurde mit gebundenem Persulfid nachgewiesen, und befindet sich in einer Bindungstasche im Zentrum des Proteins (**Abbildung 36B**).



**Abbildung 36: Kristallstruktur des YnjE-Proteins**

Dargestellt eine vorläufige Struktur des YnjE-Proteins. Gekennzeichnet sind die einzelnen Rhodanesedomänen und die Position des katalytischen Cysteins 385. In B ist die Lage des Cysteins 385 in einer Bindungstasche erkennbar.

## 4.2 Identifizierung einer möglichen Schwefelquelle für YnjE

Die katalytische Schleife des YnjE-Proteins zeigt kaum Gemeinsamkeiten mit den von Bordo und Bork (2002) kategorisierten Konsensussequenzen für TSTs (**Abbildung 34**). Es war experimentell nicht möglich YnjE durch Inkubation mit den Substraten Thiosulfat, Mercaptopyruvat oder L-Cystein zu persulfurieren, weshalb es sich bei YnjE weder um eine MST noch TST handeln kann. Ein Schwefeltransfermechanismus auf YnjE von L-Cystein über eine Cysteindesulfurase wurde deshalb vermutet.

YnjE	-C G T G W R-
Thiosulfat:Cyanid -Sulfurtransferase	-C R X G X (R/T)-
3-Mercaptopyruvat: Cyanid-Sulfurtrans- ferase	-C G (S/T) G V T-

**Abbildung 34: Konsensussequenzen für TST und MST im Vergleich zur Aktiven Schleife von YnjE**

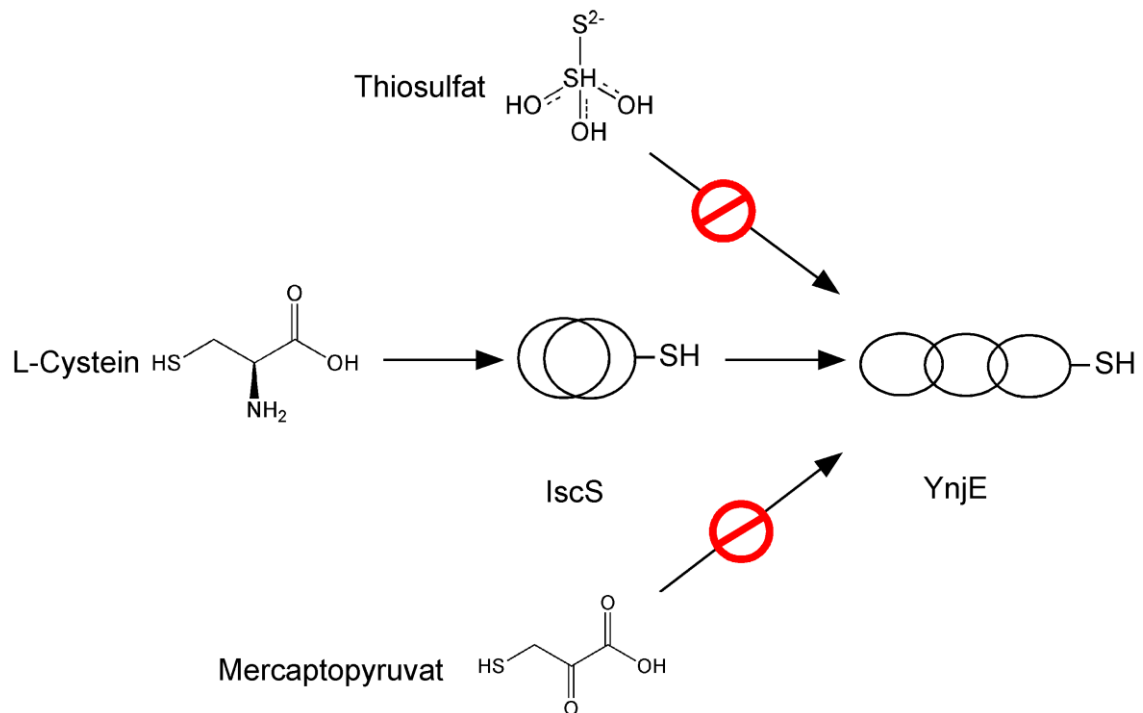
Die Aminosäuresequenz der aktiven Schleife des YnjE-Proteins weist nicht auf eine TST nach den von Bordo und Bork (2002) vorgeschlagenen Konsensussequenzen hin. Obwohl eine Übereinstimmung mit MST-Schleifen erkennbar ist, konnte dies experimentell nicht bestätigt werden. In rot sind die persulfurierten Cysteinreste hervorgehoben.

In der vorliegenden Arbeit konnte massenspektrometrisch nachgewiesen werden, dass YnjE nach Inkubation mit L-Cystein und IscS persulfuriert wird. Die durch die Interaktionsanalysen bereits vermutete Schwefelübertragung von IscS auf YnjE mit L-Cystein als Schwefelquelle konnte dementsprechend bestätigt werden. L-Cystein kann schließlich aufgrund seiner universellen Bedeutung im Schwefelmetabolismus, und der essentiellen Bedeutung der Cysteindesulfurase IscS für die Thiocarboxylierung Moads, als physiologische Schwefelquelle der Bildung der Dithiolengruppe im zweiten Schritt der Moco-Biosynthese angesehen werden (**Abbildung 35**). Durch Analysen der Cysteindesulfuraseaktivitäten der drei *E. coli* Desulfurasen CsdA, SufS und IscS in Abhängigkeit von YnjE konnte ausgeschlossen werden, dass YnjE ein Enhancer-Protein für eine dieser Desulfurasen ist. Im Gegensatz zu den bereits identifizierten Enhancerproteinen SufE und CsdE hatte YnjE keinen Einfluss auf die Aktivität dieser Proteine. YnjE hat dementsprechend keinen generellen Bezug zur Funktion der vielseitigen Cysteindesulfurasen, insbesondere des IscS-Proteins. IscS ist an einer Fülle von verschiedenen Biosynthesewegen, die die Übertragung einer Persulfidgruppe beinhalten beteiligt. YnjE scheint spezifisch die Schwefelübertragung innerhalb der Moco-Biosynthese zu beeinflussen, oder IscS für diesen Biosyntheseweg durch Bindung oder Vermittlung der Interaktion mit dem MoeB-Moad-

Acyladenylatkomplex besser zugänglich zu machen. Der Rhodanese-abhängige Mechanismus der Schwefelübertragung innerhalb der Thiaminbiosynthese, die für die Synthese von Eisen-Schwefel-Zentren benötigten Gerüstproteine und Chaperone sowie die Rolle des YnjE-Proteins innerhalb der Moco-Biosynthese in *E. coli* lassen vermuten, dass eine wichtige Funktion dieser Proteine und insbesondere der Rhodanesen sein könnte, die universellen Funktionen der Cysteindesulfurasen zu verschiedenen Stoffwechselwegen spezifisch zu lenken. Dies ließe darüber hinaus weitere Möglichkeiten der Regulation zu. Die Schwefelübertragung im zweiten Schritt der Moco-Biosynthese in *E. coli* ist vergleichbar zum humanen System und weist deutliche Parallelen zu der Persulfurierung von ThiI in der Thiaminbiosynthese auf.

#### **4.3 Vergleich der der YnjE-Sulfurierung mit der Thiaminbiosynthese**

Die Thiaminbiosynthese in *E. coli* weist weitreichende Gemeinsamkeiten mit der Moco-Biosynthese auf. Im Zuge des Einbaus eines Schwefelatoms in einen Thiazolprecursor wird ein Thiocarboxylat an einem konservierten Glycinrest des ThiS-Proteins, ähnlich der Thiocarboxylierung Moads gebildet (Taylor *et al.*, 1998). Dazu wird das ThiS-Protein durch ThiF acyladenyliert. Der Schwefel für die Thiocarboxylierung wird durch IscS von L-Cystein mobilisiert und in Form eines Persulfids auf die Rhodanese ThiI übertragen, welche den Schwefel schließlich auf ThiS überträgt (Taylor *et al.*, 1998; Xi *et al.*, 2001; Park *et al.*, 2003). YnjE könnte eine ähnliche Rolle bei der Moco-Biosynthese zugeschrieben werden, wobei IscS als die zentrale Schwefel-mobilisierende Komponente ein Persulfid für Akzeptorproteine bereitstellt und Rhodanesen wie ThiI oder YnjE dieses zu den jeweiligen Stoffwechselwegen lenken.



**Abbildung 35: Modell der Schwefelübertragung auf YnjE**

Durch massenspektrometrische Analyse wurde eine Schwefelquelle für die Persulfurierung des YnjE-Proteins identifiziert. Schwefel wird in Form eines Persulfids von IscS, CsdA oder SufS von Cystein mobilisiert und auf YnjE übertragen. Thiosulfat und Mercaptopyruvat sind keine Schwefeldonoren für YnjE.

#### 4.4 Einfluss von YnjE auf die MPT-Synthese in *E. coli*

Eine weitere Verbindung zwischen YnjE und der Moco-Biosynthese besteht in dem positiven Einfluss des YnjE-Proteins auf die Bildung von MPT. In einem *in vitro* Ansatz der die Proteine des zweiten Schrittes der Moco-Synthese sowie die Ausgangsverbindung PrecursorZ enthielt, konnte eine gesteigerte Menge an MPT nachgewiesen werden, wenn im Ansatz neben der Schwefelquelle L-Cystein und der Cysteindesulfurase IscS, das YnjE-Protein in äquimolarer Konzentration zugegeben wurde. Da höhere YnjE-Konzentrationen keinen zusätzlichen steigernden Effekt auf die MPT-Bildung besitzen und keine *in vitro*-Synthese von MPT ohne IscS als schwefelmobilisierende Komponente möglich ist, konnte eine direkte Übertragung von Schwefel von YnjE auf MoaD nicht bestätigt werden. Der maximale steigernde Effekt bei äquimolarer Konzentration deutet zudem zusätzlich

auf eine Rolle YnjEs bei der Vermittlung der Interaktion zwischen den Proteinen der MPT-Synthese hin.

Auch die durchgeführten Untersuchungen am Cystein 385 unterstützen diese Annahme. Der Austausch des Cystein-Restes 385, welcher ein Persulfid tragen könnte, hatte keinen Einfluss auf den steigenden Effekt des YnjE-Proteins in der MPT-Synthese *in vitro*. Auch dies unterstreicht die Annahme, dass sich die Rolle des YnjE-Proteins auf eine Vermittlung der Proteininteraktion zwischen den Proteinen IscS, MoeB und der MPT-Synthase beschränkt oder zumindest den deutlichsten Effekt auf die Moco-Biosynthese verursacht. Der positive Einfluss des YnjE-Proteins auf die Bildung von MPT konnte zudem durch die Analyse des Sulfurierungsgrades von Moad aus verschiedenen Cysteindesulfurase-Mutanten bzw. YnjE-Mutanten bestätigt werden. Ein *IscS-knock out* führte zu einer Minderung der Moad Sulfurierung. Dies zeigt, dass auch bei dem Schwefeltransfer auf Moad andere Proteine den *IscS*-Phänotyp zumindest teilweise komplementieren können. Ein zusätzliches *YnjE-knock-out* führte zu einer weiteren Verringerung des Moad-Sulfurierungsgrades in der *IscS knock-out*-Mutante. Zuvor wurde bereits gezeigt, dass nach einer Deletion der anderen sieben Rhodanese-ähnlichen Proteine *E. coli*s immer noch MPT-Synthese nachweisbar ist (A. Freuer, 2005). Das *YnjE-knock-out* allein hatte ebenfalls keinen wesentlichen Effekt auf den Moad-Sulfurierungsgrad, was auf ein nicht essentielles Zusammenspiel zwischen *YnjE* und *IscS* bei der Übertragung des Schwefels in Bezug auf die Moco-Biosynthese hinweist und darüber hinaus verdeutlicht, dass andere Proteine in *E. coli* die Funktionen von *IscS* und *YnjE* komplementieren können. Vermutlich sind diese *CsdA* und *SufS*.

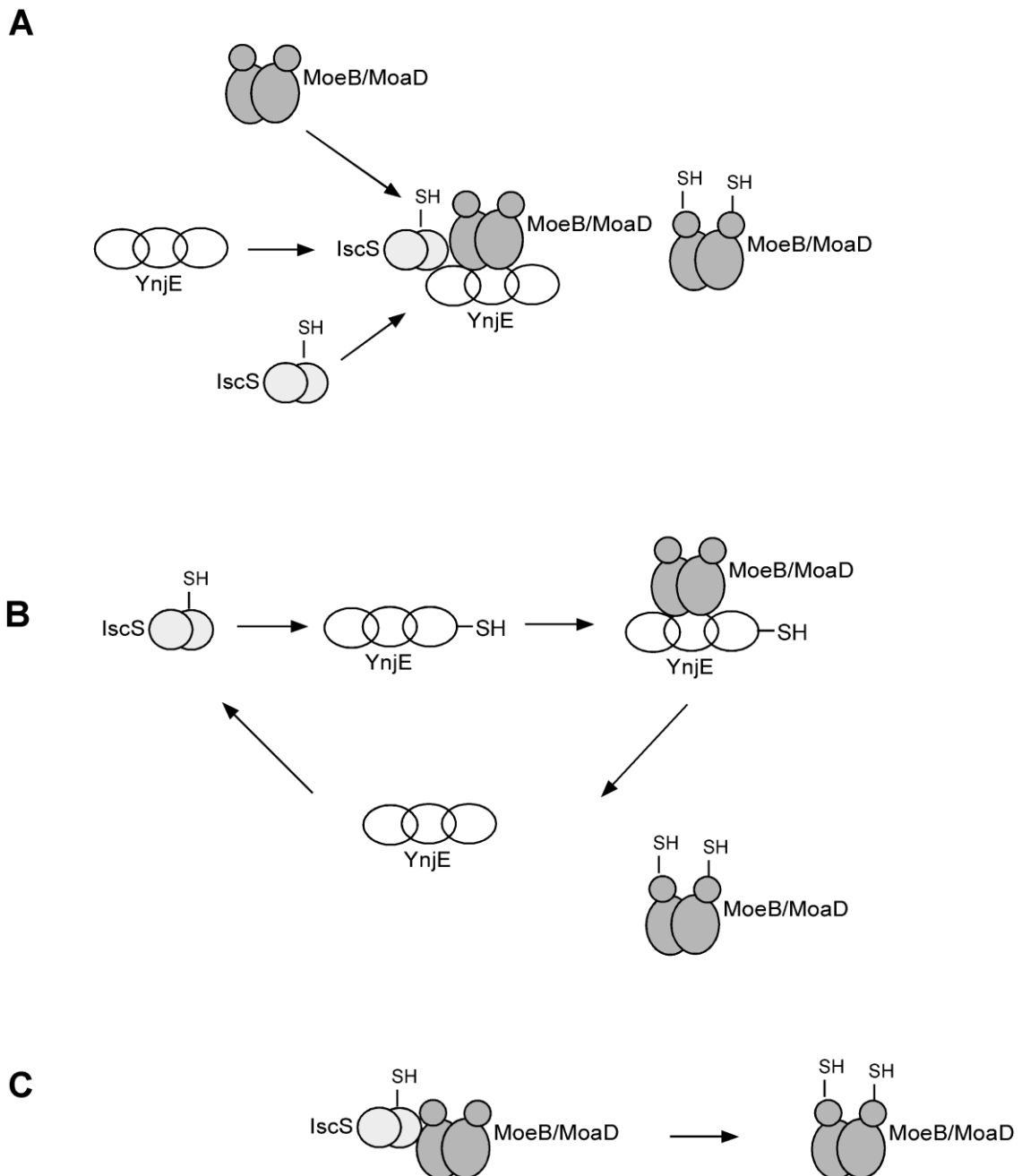
#### 4.5 Gemeinsamkeiten mit der humanen Moco-Biosynthese

In der humanen Moco-Biosynthese katalysiert das zu *E. coli* MoeB homologe Protein MOCS3 sowohl die Adenylierung als auch die Thiocarboxylierung des MOCS2A-Proteins, welches zusammen mit MOCS2B die aktive MPT-Synthase bildet (Matthies *et al.*, 2005). Der Schwefel wird dabei auf einen C-terminalen Glycinrest des MOCS2A-Proteins übertragen. An MOCS3 ist dieser Schwefel in Form eines Persulfids an einem Cysteinrest in der aktiven Schleife der C-terminalen Rhodanese-ähnlichen Domäne von MOCS3 gebunden. Auf Grund von



detaillierten Mutagenesestudien an der aktiven Schleife und durch die geringe Aktivität bei der Sulfurierung MOCS3s mit Thiosulfat als Substrat, wurde davon ausgegangen, dass Thiosulfat nicht die physiologische Schwefelquelle der MOCS3 Sulfurierung ist (Krepinsky und Leimkühler 2007). Marelja *et al.* (2008) konnten bestätigen, dass die Cysteindesulfurase Nfs1 am Schwefeltransfer auf die MOCS3-Rhodanesedomäne beteiligt ist. Es existieren zwei Isoformen des Nfs1 Proteins. Das mitochondriale Nfs1 ist an der Synthese der Eisen-Schwefel-Zentren beteiligt (Tong und Rouault, 2006), während die cytosolische Funktion beispielsweise in der Schwefelübertragung auf MOCS3 besteht. Dabei konnte sowohl eine direkte Proteininteraktion zwischen Nfs1 und der Rhodanesedomäne von MOCS3 als auch ein Schwefeltransfer von Nfs1 über ein Cysteingebundenes Persulfid auf die Rhodanesedomäne nachgewiesen werden (Marelja *et al.*, 2008). *E. coli* MoeB besitzt im Gegensatz zum humanen MOCS3 keine Rhodanesedomäne. YnjE ist eines von acht Rhodanese-ähnlichen Proteinen in *E. coli*. Bereits Krepinsky und Leimkuehler haben 2005 vermutet, dass Organismen mit MoeB-Homologen ohne Rhodanesedomäne, eines der Rhodanese-ähnlichen Proteine nutzen, um durch Interaktion mit MoeB analog zum humanen System den Schwefeltransfer auf Moad durchzuführen. Da in einigen Organismen beide Varianten MoeB-homologer Proteine vorkommen, gehen die gleichen Autoren von einer Evolution zu MoeB-Varianten mit fusionierter Rhodanesedomäne aus, da dies möglicherweise Vorteile in Bezug auf die Synthese des Moco bietet. Neben der YnjE/MoeB-Interaktion konnte in der vorliegenden Arbeit eine Interaktion zwischen YnjE und der *E. coli* L-Cystein-Desulfurase IscS und ein Schwefeltransfer von L-Cystein über IscS zu YnjE in Form einer Persulfidgruppe nachgewiesen werden. Auch hier sind die Parallelen zur humanen Moco-Biosynthese offensichtlich. Durch Analysen des Cystein 385, welcher der einzige Cysteinrest des YnjE-Proteins ist, konnte allerdings nicht bestätigt werden, dass die Schwefelübertragung auf YnjE eine Bedingung für die Rolle des YnjE-Proteins in der Thiocarboxylierung Moads ist. Die Mutante hatte den gleichen positiven Einfluss auf die Bildung von MPT. Die Rolle von YnjE scheint vielmehr die Vermittlung der Interaktion von IscS mit dem MoeB/Moad Acyladenylatkomplex zu sein (**Abbildung 37A**). Möglicherweise ist die Effizienz der Schwefelübertragung durch YnjE zu gering, um mit den hier verwendeten Methoden detektiert werden zu können. Die direkte Übertragung des Schwefels durch YnjE findet *in vivo* unter Umständen unter Stressbedingungen statt, welche in bisherigen Analysen nicht berücksichtigt wurden. Eine direkte

Übertragung des Schwefels auf Moad ist deshalb sowohl durch YnjE (**Abbildung 37B**), als auch durch IscS (**Abbildung 37C**) nicht auszuschließen.



### Abbildung 37: Modell der Schwefelübertragung auf Moad

(A) YnjE vermittelt die Interaktion zwischen dem Moad/MoeB-Acyladenylatkomplex und IscS. Dieses überträgt den Schwefel, ohne Bildung eines Persulfids an YnjE. (B) IscS überträgt eine Persulfidgruppe auf YnjE, dieses bindet den Moad/MoeB-Acyladenylatkomplex und liefert den Schwefel für die Thiocarboxylierung Moads. (C) Der Schwefel kann auch *in vivo* direkt von IscS auf Moad übertragen werden.

#### 4.6 Lokalisierung von YnjE

Endogenes YnjE besitzt eine N-terminale Periplasma-Signalsequenz. Durch Sequenzanalysen wurde eine Übereinstimmung für Konsensus-Sequenzen des Sec-Systems identifiziert. Das Sec-System in gram negativen Bakterien, auch als Typ I-Sekretionssystem bezeichnet entspricht einem Transporter vom ABC-Typ bestehend aus den Untereinheiten SecY, SecG und SecE, welcher zusätzlich mit Hilfe eines multifunktionalen Proteins (SecA) die Translokation von Protein-Vorstufen in das Periplasma ermöglicht. Das Translokase-assoziierte SecA bindet die Proteinvorstufen. Während der Translokation wird das Signalpeptid durch eine *leader*-Peptidase abgespalten, wodurch in der Regel die für die Funktion des Proteins nötige Faltung ermöglicht wird (Rigel und Braunstein, 2008). Um eine Faltung vor der Translokation zu verhindern, sind Chaperone beteiligt, welche das Protein in einem translokationskompetenten Modus halten (Riedel und Braunstein, 2008). Ein Schlüsselprotein ist hierbei das SecB-Protein. Es ist ein hochselektives Chaperon, dessen Bindung an Zielproteine vermutlich nicht von einer Konsensussequenz, sondern in Abhängigkeit von der bereits erfolgten Faltung des Zielproteins abhängt (Randall und Hardy, 1995). In vorhergehenden Studien wurde gereinigtes YnjE-C-His massenspektrometrisch untersucht. Dabei wurde ausschließlich YnjE ohne die 23-N-terminalen Aminosäuren, welche für das Signalpeptid kodieren identifiziert (A. Freuer). Das CD-Spektrum dieser analysierten YnjE-Variante stimmte mit dem in Zuge dieser Arbeit gemessenen CD-Spektrum für die Variante His-YnjE $\Delta$ 1-21 überein. Zudem konnte sowohl die Interaktion mit dem MoeB-Protein, als auch der positive Einfluss auf die Moco-Biosynthese für beide Varianten nachgewiesen werden. Das im Cytoplasma vorliegende YnjE scheint entsprechend funktionelles und gefaltetes Protein zu sein. Durch Zellfraktionierung wurde in dieser Arbeit festgestellt, dass dieses rekombinant exprimierte Protein zum größten Teil im Cytoplasma lokalisiert ist. Handelte es sich bei dem in der Cytoplasma-Fraktion identifizierten Anteil an YnjE um *de novo* translatiertes Protein, welches noch nicht dem Sec-System-abhängigen Transport unterzogen wurde, müsste hier das Signalpeptid noch zu identifizieren sein. Es scheint aber vielmehr bereits ohne Translokation des YnjE-Proteins ins Periplasma abgespalten zu werden. Für Eukaryotische Organismen wurde bereits ein Mechanismus einer unvollständigen Translokation beschrieben, der zur Verteilung von Proteinen mit Signalpeptid in zwei unterschiedliche

Kompartimente der Zelle führt (Regev-Rudzky und Pines, 2007). Kamiely *et al.* (2005) benennen das Cytosol als das „bevorzugte“ Zellkompartiment für unvollständige Translokation. Ähnlich könnte auch im Prokaryoten durch unvollständige Translokation eine YnjE-Lokalisierung im Cyto- und Periplasma möglich sein. Mutationsstudien zeigten, dass ohne Interaktion von SecA mit SecB keine Translokation des Zielproteins stattfindet (Francetic und Kumamoto, 1996). Der Mechanismus der SecB-Bindung an Zielproteine ist noch nicht im Detail geklärt. Für die unvollständige Translokation YnjEs könnte eine verhinderte Bindung des SecB-Proteins verantwortlich sein. Sie findet an einem Teil des translatierten YnjEs vermutlich nicht statt. Dementsprechend gelangt dieses nicht zur Translokase und verbleibt im Cytoplasma (**Abbildung 38**). Das Signalpeptid wird dann vermutlich auf einem anderem Weg abgespalten.

#### 4.7 Mögliche Funktionen des YnjE-Proteins in Peri- und Cytoplasma

Der Transport YnjEs ins Periplasma einerseits und der Verbleib im Cytoplasma andererseits legen auch unterschiedliche Funktionen YnjEs in beiden Kompartimenten nahe. Für Eukaryoten wurde bereits eine Reihe von Enzymen charakterisiert, die unterschiedliche Funktionen in ihren jeweiligen Zellkompartimenten erfüllen. Beispielsweise ist das Protein Nfs1p aus *S. cerevisiae* an der Synthese von mitochondrialen Eisen-Schwefel-Zentren-Proteinen beteiligt (Nakai *et al.*, 2001) während ihm in Zellkern eine Rolle in der Schwefelübertragung auf t-RNA zugeschrieben wird (Muhlenhoff *et al.*, 2004). Neben dem YnjE-Protein besitzt unter den Rhodanese-ähnlichen Proteinen in *E. coli* auch das Protein PspE ein Periplasma-Signalpeptid. Es erfüllt eine Funktion in der Phagen-induzierten Stressantwort in *E. coli* (Adams *et al.*, 2002). Auch hier ist die genaue Verbindung zwischen Schwefeltransfer und physiologischer Rolle des PspE-Proteins noch nicht geklärt (Adams *et al.*, 2002). Ein wichtiger Beweis für eine Funktion des YnjE-Proteins im Cytoplasma ist die mehrfach durch unabhängige Versuchsansätze bestätigte Interaktion mit den cytoplasmatischen Proteinen MoeB und IscS sowie der Einfluss des YnjE-Proteins auf die Moco-Biosynthese.



darunter die Detoxifizierung von Cyanid (Cerletti *et al.*, 1986) durch die Bildung von Thiocyanat, welche oft in Zusammenhang mit Infektionsmechanismen pathogener Bakterien genannt wird. Desweiteren werden aber auch Funktionen bei der Antwort auf verschiedene Stresssituationen diskutiert wie es am Beispiel von PspE in *E. coli* bereits gezeigt wurde. PspE ist an der Phagen induzierten Stressantwort in *E. coli* beteiligt (Adams *et al.*, 2002). Die genaue Funktion in Bezug auf eine Sulfurtransferaseaktivität ist allerdings noch unbekannt. Auch von Schwefeltransfer-Reaktionen unabhängige Funktionen für Rhodanesen wurden bereits identifiziert. Das *E. coli*-Protein YbbB ist *in vivo* für den Austausch von Schwefel durch Selen in 2-Thiouridin verantwortlich, auch hier sind genauere Details noch unbekannt (Wolfe *et al.*, 2004).

## Zusammenfassung

Die ubiquitär verbreitete Molybdänkofaktorbiosynthese ist in *Escherichia coli* (*E. coli*) bisher am umfassendsten untersucht. Bislang war jedoch nicht bekannt, welche physiologische Schwefelquelle im zweiten Schritt dieses Syntheseweges zur Bildung der charakteristischen Dithiolengruppe genutzt wird. Erste Untersuchungen deuteten auf eine der Cysteindesulfurasen *E. colis* hin, welche in Verbindung mit einem rhodaneseähnlichen Protein den Schwefel in Form eines Persulfids übertragen. Ähnliche Mechanismen wurden bereits in der humanen Moco-Biosynthese und der Thiaminbiosynthese identifiziert.

In dieser Arbeit wurde das *E. coli* Protein YnjE näher charakterisiert. Es handelt sich bei YnjE um ein rhodaneseähnliches Protein aus drei Rhodanese-domänen. Durch Proteinkristallisation und anschließender Röntgenstrukturanalyse wurde die Tertiärstruktur des YnjE-Proteins analysiert. Die hergestellten Kristalle konnten zur Gewinnung von Strukturdaten vermessen und eine Proteinkristallstruktur für YnjE berechnet werden. Desweiteren besitzt YnjE ein N-terminales Typ I Sekretionssystem abhängiges Signalpeptid. Durch Lokalisierungsexperimente wurde die Bedeutung des Signalpeptids für das YnjE-Protein untersucht. Dabei wurde festgestellt, dass endogenes YnjE sowohl im peri- als auch im cytoplasmatischen Raum lokalisiert ist. Auf Grund von vorhergehenden Studien, wurde eine Funktion des YnjE-Proteins innerhalb der Molybdänkofaktorbiosynthese in der Schwefelübertragung auf das Protein MoaD in *E. coli* vermutet und deshalb in dieser Arbeit näher untersucht. Es wurde eine Interaktion des YnjE-Proteins mit dem MoeB-Protein, welches für die Thiocarboxylierung des MoaD-Proteins essentiell ist, durch Tandem-Affinitätsreinigung und Antikörper-basierte Affinitätsreinigung nachgewiesen und ein signifikanter positiver Einfluss YnjEs auf die Bildung von Molybdopterin, einer Vorstufe des Molybdänkofaktors, bestätigt. Dabei wurde sowohl der Sulfurierungsgrad des MoaD-Proteins in YnjE und Cysteindesulfurase-knock-out Mutanten untersucht, als auch die Bildung von Molybdopterin in einem *in vitro* Ansatz in Abhängigkeit von steigenden YnjE-Konzentrationen analysiert. Im Ergebnis kann man daraus schließen, dass der Mechanismus der Schwefelübertragung ähnlich der Thiaminbiosynthese, über eine der drei Cysteindesulfurasen CsdA, SufS oder IscS geschieht, welche Schwefel in Form eines Persulfids auf YnjE übertragen können. Thiosulfat und Mercaptopyruvat, die Substrate für die beiden Familien der rhodaneseähnlichen Proteine, Thiosulfat-Sulfurtransferasen und Mercaptopyruvat-Sulfurtransferasen, dienen nicht als Substrate

für eine Persulfurierung YnjEs. Durch eine Austauschmutante des Cysteinrestes der aktiven Schleife von YnjE konnte nicht bestätigt werden, dass dieser Aminosäurerest und damit die Bildung eines YnjE-gebundenen Persulfids für die positive Beeinflussung der MPT-Synthese essentiell ist. Vielmehr kann durch diese Arbeit von einer Vermittlung der Interaktionen zwischen MoeB, IscS und der MPT-Synthase durch YnjE ausgegangen werden wobei die Cysteindesulfurase IscS den Schwefel für die Thiocarboxylierung des Moad-Proteins liefert.





**Literaturverzeichnis:**

Adams, H., W. Teertstra, *et al.* (2002). "PspE (phage-shock protein E) of *Escherichia coli* is a rhodanese." FEBS Lett **518**(1-3): 173-6.

Begley, T. P., D. M. Downs, *et al.* (1999). "Thiamin biosynthesis in prokaryotes." Arch Microbiol **171**(5): 293-300.

Bordo, D. and P. Bork (2002). "The rhodanese/Cdc25 phosphatase superfamily. Sequence-structure-function relations." EMBO Rep **3**(8): 741-6.

Boyington, J. C., V. N. Gladyshev, *et al.* (1997). "Crystal structure of formate dehydrogenase H: catalysis involving Mo, molybdopterin, selenocysteine, and an Fe4S4 Cluster." Science **275**(5304): 1305-8.

Burow, M., D. Kessler, *et al.* (2002). "Enzymatic activity of the *Arabidopsis* sulfurtransferase resides in the C-terminal domain but is boosted by the N-terminal domain and the linker peptide in the full-length enzyme." Biol Chem **383**(9): 1363-72.

Cianci, M., F. Gliubich, *et al.* (2000). "Specific interaction of lipoate at the active site of rhodanese." Biochim Biophys Acta **1481**(1): 103-8.

Flint, D. H. (1996). "*Escherichia coli* contains a protein that is homologous in function and N-terminal sequence to the protein encoded by the *nifS* gene of *Azotobacter vinelandii* and that can participate in the synthesis of the Fe-S Cluster of dihydroxy-acid dehydratase." J Biol Chem **271**(27): 16068-74.

Francetic, O. and C. A. Kumamoto (1996). "*Escherichia coli SecB* stimulates export without maintaining export competence of ribose-binding protein signal sequence mutants." J Bacteriol **178**(20): 5954-9.

Freuer, A. (2005) "Analysen zur Identifizierung einer spezifischen Sulfurtransferase für die Molybdäncofaktor Biosynthese in *E. coli*"; Dissertation an der TU-Braunschweig

Gully, D., D. Moinier, *et al.* (2003). "New partners of acyl carrier protein detected in *Escherichia coli* by tandem affinity purification." FEBS Lett **548**(1-3): 90-6.

Gutzke, G., Fischer, B., Mendel, R.R. and Schwarz, G. (2001) Thiocarboxylation of molybdopterin synthase provides evidence for the mechanism of dithiolene formation in metal-binding pterins. *J Biol Chem* **276**, 36268-36274

Kambampati, R. and C. T. Lauhon (2000). "Evidence for the transfer of sulfane sulfur from IscS to ThiI during the *in vitro* biosynthesis of 4-thiouridine in *Escherichia coli* tRNA." J Biol Chem **275**(15): 10727-30.

Kessler, D. (2004). "Sir0077 of *Synechocystis* has cysteine desulfurase as well as cystine lyase activity." Biochem Biophys Res Commun **320**(2): 571-7.

Kessler, D. (2006). "Enzymatic activation of sulfur for incorporation into biomolecules in prokaryotes." FEMS Microbiol Rev **30**(6): 825-40.

Krepinsky, K. and S. Leimkuhler (2007). "Site-directed mutagenesis of the active site loop of the rhodanese-like domain of the human molybdopterin synthase sulfurase MOCS3. Major differences in substrate specificity between eukaryotic and bacterial homologs." Febs J **274**(11): 2778-87

Lang, K (1933) *Biochem* 259,243

Lake, M. W., M. M. Wuebbens, *et al.* (2001). "Mechanism of ubiquitin activation revealed by the structure of a bacterial MoeB-MoaD complex." Nature **414**(6861): 325-9.

Lauhon, C. T. (2002). "Requirement for IscS in biosynthesis of all thionucleosides in *Escherichia coli*." J Bacteriol **184**(24): 6820-9.

Lauhon, C. T. and R. Kambampati (2000). "The *iscS* gene in *Escherichia coli* is required for the biosynthesis of 4-thiouridine, thiamin, and NAD." J Biol Chem **275**(26): 20096-103.

Leimkuhler, S. and K. V. Rajagopalan (2001). "A sulfurtransferase is required in the transfer of cysteine sulfur in the *in vitro* synthesis of molybdopterin from precursor Z in *Escherichia coli*." J Biol Chem **276**(25): 22024-31.

Leimkuhler, S., M. M. Wuebbens, *et al.* (2001). "Characterization of *Escherichia coli* MoeB and its involvement in the activation of molybdopterin synthase for the biosynthesis of the molybdenum cofactor." J Biol Chem **276**(37): 34695-701.

Loiseau, L., S. Ollagnier-de Choudens, *et al.* (2005). "Analysis of the heteromeric CsdA-CsdE cysteine desulfurase, assisting Fe-S Cluster biogenesis in *Escherichia coli*." J Biol Chem **280**(29): 26760-9.

Marelja, Z., W. Stocklein, *et al.* (2008). "A novel role for human Nfs1 in the cytoplasm: Nfs1 acts as a sulfur donor for MOCS3, a protein involved in molybdenum cofactor biosynthesis." J Biol Chem.

Matthies, A., Nimtz, M., Leimkühler, S. (2005) "Molybdenum cofactor biosynthesis in humans: identification of a persulfide group in the rhodanese-like domain of MOCS3 by mass spectrometry." Biochemistry. 2005 May 31;44(21):7912-20.

Mihara, H. and N. Esaki (2002). "Bacterial cysteine desulfurases: their function and mechanisms." Appl Microbiol Biotechnol **60**(1-2): 12-23.

- Mihara, H., S. Kato, *et al.* (2002). "The *iscS* gene is essential for the biosynthesis of 2-selenouridine in tRNA and the selenocysteine-containing formate dehydrogenase H." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(10): 6679-83.
- Mihara, H., T. Kurihara, *et al.* (1997). "Cysteine sulfinatase desulfinase, a NIFS-like protein of *Escherichia coli* with selenocysteine lyase and cysteine desulfurase activities. Gene cloning, purification, and characterization of a novel pyridoxal enzyme." J Biol Chem **272**(36): 22417-24.
- Mueller, E. G., P. M. Palenchar, *et al.* (2001). "The role of the cysteine residues of Thil in the generation of 4-thiouridine in tRNA." J Biol Chem **276**(36): 33588-95.
- Muhlenhoff, U., J. Balk, *et al.* (2004). "Functional characterization of the eukaryotic cysteine desulfurase Nfs1p from *Saccharomyces cerevisiae*." J Biol Chem **279**(35): 36906-15.
- Nakai, Y., M. Nakai, *et al.* (2001). "Nuclear localization of yeast Nfs1p is required for cell survival." J Biol Chem **276**(11): 8314-20.
- Nichols, J. D. and K. V. Rajagopalan (2005). "*In vitro* molybdenum ligation to molybdopterin using purified components." J Biol Chem **280**(9): 7817-22.
- Outten, F. W., M. J. Wood, *et al.* (2003). "The SufE protein and the SufBCD complex enhance SufS cysteine desulfurase activity as part of a sulfur transfer pathway for Fe-S Cluster assembly in *Escherichia coli*." J Biol Chem **278**(46): 45713-9.
- Park, J. H., P. C. Dorrestein, *et al.* (2003). "Biosynthesis of the thiazole moiety of thiamin pyrophosphate (vitamin B1)." Biochemistry **42**(42): 12430-8.
- Park, S. and J. A. Imlay (2003). "High levels of intracellular cysteine promote oxidative DNA damage by driving the fenton reaction." J Bacteriol **185**(6): 1942-50.
- Patzer, S. I. and K. Hantke (1999). "SufS is a NifS-like protein, and SufD is necessary for stability of the [2Fe-2S] FhuF protein in *Escherichia coli*." J Bacteriol **181**(10): 3307-9.
- Pitterle, D. M. and K. V. Rajagopalan (1993). "The biosynthesis of molybdopterin in *Escherichia coli*. Purification and characterization of the converting factor." J Biol Chem **268**(18): 13499-505.
- Puig, O., F. Casparly, *et al.* (2001). "The tandem affinity purification (TAP) method: a general procedure of protein complex purification." Methods **24**(3): 218-29.

- Rajagopalan, K. V., J. L. Johnson, *et al.* (1993). "Chemistry and biology of the molybdenum cofactors." Adv Exp Med Biol **338**: 355-62.
- Ravot, G., L. Casalot, *et al.* (2005). "*rdIA*, a new gene encoding a rhodanese-like protein in *Halanaerobium congolense* and other thiosulfate-reducing anaerobes." Res Microbiol **156**(10): 1031-8.
- Ray, W. K., G. Zeng, *et al.* (2000). "Characterization of a 12-kilodalton rhodanese encoded by *glpE* of *Escherichia coli* and its interaction with thioredoxin." J Bacteriol **182**(8): 2277-84.
- Rech, S., Deppenmeier, U, Gunsalus, R.P. (1995) Regulation of the molybdate transport operon, modABCD, of *E. coli* in response to molybdate availability. J Bacteriol **177**, 1023-1029
- Regev-Rudsky and Pines (2007) "Eclipsed distribution: A phenomenon of dual targeting of protein and its significance" BioEssays **29**:772–782, 2007.
- Rigel, N. W. and M. Braunstein (2008). "A new twist on an old pathway - accessory secretion systems." Mol Microbiol **69**(2): 291-302.
- Romao, M. J., M. Archer, *et al.* (1995). "Crystal structure of the xanthine oxidase-related aldehyde oxido-reductase from *D. gigas*." Science **270**(5239): 1170-6.
- Rouviere, P. E. and C. A. Gross (1996). "SurA, a periplasmic protein with peptidyl-prolyl isomerase activity, participates in the assembly of outer membrane porins." Genes Dev **10**(24): 3170-82.
- Rudolph, M. J., M. M. Wuebbens, *et al.* (2001). "Crystal structure of molybdopterin synthase and its evolutionary relationship to ubiquitin activation." Nat Struct Biol **8**(1): 42-6.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. (1998) *Molecular cloning: A laboratory manual*, 2<sup>nd</sup> edition, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor
- Santamaria-Araujo, J. A., B. Fischer, *et al.* (2004). "The tetrahydropyranopterin structure of the sulfur-free and metal-free molybdenum cofactor precursor." J Biol Chem **279**(16): 15994-9.
- Schindelin, H., C. Kisker, *et al.* (1996). "Crystal structure of DMSO reductase: redox-linked changes in molybdopterin coordination." Science **272**(5268): 1615-21.
- Spallarossa, A., A. Carpen, *et al.* (2003). "SseA, a 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase from *Escherichia coli*: crystallization and preliminary crystallographic data." Acta Crystallogr D Biol Crystallogr **59**(Pt 1): 168-70.

Spallarossa, A., J. L. Donahue, *et al.* (2001). "*Escherichia coli* GlpE is a prototype sulfurtransferase for the single-domain rhodanese homology superfamily." Structure **9**(11): 1117-25.

Takahashi, Y. and U. Tokumoto (2002). "A third bacterial system for the assembly of iron-sulfur Clusters with homologs in archaea and plastids." J Biol Chem **277**(32): 28380-3.

Taylor, S. V., N. L. Kelleher, *et al.* (1998). "Thiamin biosynthesis in *Escherichia coli*. Identification of this thiocarboxylate as the immediate sulfur donor in the thiazole formation." J Biol Chem **273**(26): 16555-60.

Temple CA, Graf TN, Rajagopalan KV. (2000) "Optimization of expression of human sulfite oxidase and its molybdenum domain." Arch Biochem Biophys. 2000 Nov 15;383(2):281-7.

Urbina, H. D., J. J. Silberg, *et al.* (2001). "Transfer of sulfur from IscS to IscU during Fe/S Cluster assembly." J Biol Chem **276**(48): 44521-6.

Wolfe, M. D., F. Ahmed, *et al.* (2004). "Functional diversity of the rhodanese homology domain: the *Escherichia coli ybbB* gene encodes a selenophosphate-dependent tRNA 2-selenouridine synthase." J Biol Chem **279**(3): 1801-9.

Wuebbens, M. M. and K. V. Rajagopalan (1993). "Structural characterization of a molybdopterin precursor." J Biol Chem **268**(18): 13493-8.

Wuebbens, M. M. and K. V. Rajagopalan (1995). "Investigation of the early steps of molybdopterin biosynthesis in *Escherichia coli* through the use of *in vivo* labeling studies." J Biol Chem **270**(3): 1082-7.

Xi, J., Y. Ge, *et al.* (2001). "Biosynthesis of the thiazole moiety of thiamin in *Escherichia coli*: identification of an acyldisulfide-linked protein--protein conjugate that is functionally analogous to the ubiquitin/E1 complex." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(15): 8513-8.

Zheng, L., R. H. White, *et al.* (1994). "Mechanism for the desulfurization of L-cysteine catalyzed by the *nifS* gene product." Biochemistry **33**(15): 4714-20.

## **Danksagung:**

Mein herzlicher Dank gilt Frau Prof. Dr. Silke Leimkühler für Ihre Unterstützung und Förderung. Mit ansteckender Begeisterung war sie stets ein Vorbild, wodurch ich lernte kleinen und größeren Schwierigkeiten mit Zuversicht zu begegnen. Durch sie war es mir möglich eine Vielzahl neuester Methoden anzueignen, insbesondere auch durch die Zusammenarbeit mit Kooperationspartnern. In diesem Zusammenhang möchte ich den Mitarbeitern der Arbeitsgruppe um Herrn Prof. Dr. Schindelin in Würzburg danken sowie den Mitarbeitern der Arbeitsgruppen Physikalische Biochemie von Herrn Prof. Dr. Seckler und Biotechnologie von Herrn Prof. Dr. Micheel der Universität Potsdam, welche mir mit stetiger Hilfsbereitschaft zur Seite standen.

Mein besonderer Dank gilt den Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Proteinanalytik. Jeder von ihnen hat auf seine Weise zum Gelingen meiner Arbeit beigetragen, sei es durch Rat und Tat, oder durch interessante Unterhaltungen am Mittagstisch. Ich möchte auch den Mitarbeitern der Mensa in Golm danken, dass diese dafür genug Gesprächsstoff und manchmal auch gutes Essen lieferten. Ich danke J. Schmitz, M. Neumann-Schaal, K. Krepinsky, R. Spricigo, Z. Marelja, F. Gawehns, M. Mahro, M. Mullick Chowdhury, U. Müller-Theissen und S. Reschke. Silvia Schumann möchte für ihre enorme Geduld mit mir und für ihre Freundschaft danken.

Ich danke darüber hinaus meinen Eltern Birgit und Ingolf Urban, meiner Schwester Yvonne Urban-Kumpulainen, Jussi Kumpulainen sowie Oliver Waiz und Björn Wilck.

## **Eidesstattliche Erklärung**

Ich erkläre hiermit, daß ich die vorliegende Dissertation „Charakterisierung der Funktion der Rhodanese YnjE für die Molybdänkofaktor Biosynthese in *Escherichia coli*“ selbstständig verfasst sowie die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben habe.

Potsdam, den 21.09.2008

Alexander Urban