

**New insights into the redox pathway of
bacterial cytochrome *c* maturation:
CycY/CcmG and CcmH**

A dissertation submitted to the
SWISS FEDERAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY ZÜRICH
for the degree of
DOCTOR OF NATURAL SCIENCE

presented by
Renata Annette Fabianek
Dipl. Natw. ETH
born on May 27, 1971
from Germany

accepted on the recommendation of
Prof. Dr. H. Hennecke, examiner
Prof. Dr. R. Glockshuber, co-examiner
Prof. Dr. L. Thöny-Meyer, co-examiner

Zürich 1999

Abstract

The characteristic feature of *c*-type cytochromes is the covalent attachment of the prosthetic heme group to the polypeptide; the vinyl groups of heme are added via two thioether bonds to the cysteine residues in the conserved motif C-X-X-C-H of apocytochrome *c*. The key step of the cytochrome *c* biogenesis pathway, i.e., the covalent attachment of heme, takes place in the periplasm. This requires that apocytochrome *c* and heme are transported to the periplasm and that both the cysteinyl side chains of apocytochrome *c* and heme are in the reduced state for ligation.

In various Gram-negative bacteria genes have been identified that are essential for the maturation of *c*-type cytochromes: *ccmABCDEFGHI*. The gene products of two of them, CcmG and CcmH, participate in the redox pathway of cytochrome *c* maturation. Both proteins possess the conserved motif C-X-X-C, which is in common with many known protein thiol:disulfide oxidoreductases. CcmG, in particular, shows extended similarity to the thioredoxin-like proteins, whereas the sequence of CcmH displays no further similarity.

The thioredoxin-like protein with the conserved motif W-C-X-X-C has been analyzed in two organisms, *Bradyrhizobium japonicum* and *Escherichia coli*. The protein in *E. coli* is called CcmG, whereas for historical reasons the homologue in *B. japonicum* is called CycY. It was demonstrated by Western blot analysis, that both proteins are anchored to the membrane via their N-terminal signal sequence. Translational *phoA* fusions to the genes demonstrated that, when expressed, their hydrophilic C-terminal domain with the conserved motif is exposed to the periplasm.

CycY of *B. japonicum* was analyzed biochemically. A soluble version of the protein devoid of its N-terminal membrane anchor (CycY*) was expressed in *E. coli* and purified to homogeneity from the periplasmic fraction. The protein showed a redox-dependent migration difference when separated by SDS-PAGE under reducing and non-reducing conditions. However, it failed to react *in vitro* with model substrates such as insulin or DsbA, indicating that it may possess a high degree of substrate specificity. Like other thioredoxin-like proteins, oxidized CycY is able to quench partially the tryptophan fluorescence. This property was used to determine its equilibrium constant with glutathione from which a redox potential of -0.217 mV was calculated. This redox

potential was closer to that of proteins acting as reductases (e.g., thioredoxin) than to that of proteins acting as oxidases (e.g., DsbA). Therefore, it was suggested that the protein might play a reducing role during cytochrome *c* biogenesis by keeping - directly or indirectly - the heme-binding motif of apocytochrome *c* in the reduced state.

This assumption was confirmed by the genetic analysis of the *ccmG* gene in *E. coli*. The active-site cysteine residues were exchanged against serine residues by site-directed mutagenesis, and the resulting effect on cytochrome *c* maturation was tested. Surprisingly, the active-site mutants were still able to form some holoprotein, yet, they were clearly affected in this ability. The addition of reducing agents such as L-cysteine, 2-mercapto-ethanesulfonic acid (MESA) or glutathione could restore the formation of mature protein in the active-site mutants. Remarkably, no restoration was observed for the nonpolar in-frame *ccmG* deletion mutant. Thus, it was suggested that CcmG is involved in the redox pathway of cytochrome *c* maturation and that it has a reducing function. The active site of the protein is important for this process but not essential. By contrast, the presence of the CcmG polypeptide proved to be essential, indicating that CcmG might have a further function in cytochrome *c* maturation in addition to the reducing one.

Finally, CcmH of *E. coli* was characterized. The protein is supposed to have two transmembrane helices. Translational *phoA* fusion analysis showed that the N-terminal domain with the conserved motif L-R-C-X-X-C is oriented to the periplasm. Several *ccmH* deletion mutants were analyzed for their ability to form holocytochrome *c*. It was found that the hydrophilic C-terminal domain, which is assumed to be also located in the periplasm, is not required for cytochrome *c* maturation. However, deleting more of the *ccmH* gene (leading to a truncated CcmH product consisting of the N-terminal soluble domain) strongly affected cytochrome *c* biogenesis. The cysteine residues of the conserved motif were exchanged by site-directed mutagenesis. In contrast to the *ccmH* deletion mutant, the ability to produce holocytochrome *c* was not completely destroyed in the active-site mutants, but strongly affected. Analysis of the active-site mutants under different growth conditions revealed that both cysteine residues are required for cytochrome *c* maturation during aerobic growth, whereas only the more C-terminal cysteine residue is required for cytochrome *c* maturation during anaerobic growth. The only reducing substance that could restore cytochrome *c* maturation in the active-site

mutants was MESA. It was suggested that CcmH also plays a reducing role in cytochrome *c* maturation.

It was proposed that reduction of the heme-binding site of apocytochrome *c* occurs via a redox cascade involving CcmG, CcmH and further thiol:disulfide oxidoreductases such as the DsbD protein. Two alternative models for the redox pathway of cytochrome *c* biogenesis may be formulated. Unfortunately, the attempt to confirm one of them by identifying the target proteins of CcmG and CcmH has failed so far.

Zusammenfassung

Die charakteristische Eigenschaft von *c*-Typ Cytochromen ist die kovalente Bindung der prosthetischen Hämgruppe an das Polypeptid; die Vinylgruppen des Häms sind über zwei Thioetherbindungen an die Cysteinreste im konservierten Motiv C-X-X-C-H des Apocytochroms *c* geknüpft. Der entscheidende Schritt während der Cytochrom *c*-Biogenese, d.h. die kovalente Verknüpfung von Häm, erfolgt im Periplasma. Daher müssen Apocytochrom *c* und Häm ins Periplasma transportiert werden und sowohl die Cysteinylseitenketten von Apocytochrom *c* also auch Häm in der reduzierten Form vorliegen.

In einer Vielzahl von Gram-negativen Bakterien sind Gene identifiziert worden, die für die Reifung von *c*-Typ Cytochromen essentiell sind: *ccmABCDEFGHI*. Die Genprodukte der Gene *ccmG* und *ccmH* sind am Redoxweg der Cytochrom *c*-Reifung beteiligt. Beide Proteine besitzen das konservierte Motiv C-X-X-C, das auch in vielen bekannten Protein Thiol:Disulfid Oxidoreduktasen vorhanden ist. Während CcmG weitere Homologien zu Thioredoxin-ähnlichen Proteinen besitzt, weist die Sequenz von CcmH keine weitere Ähnlichkeit auf.

Das Thioredoxin-ähnliche Protein mit dem konservierten Motiv W-C-X-X-C wurde in zwei Organismen analysiert, in *Bradyrhizobium japonicum* und in *Escherichia coli*. Das Protein in *E. coli* heißt CcmG, während das homologe Protein in *B. japonicum* aus historischen Gründen CycY heißt. Western-Blot Analyse zeigte, daß beide Proteine über ihre N-terminale Signalsequenz in der Membran verankert sind. Mit translationellen *phoA* Fusionen konnte gezeigt werden, daß die hydrophilen C-terminalen Domänen mit dem konservierten Motiv ins Periplasma orientiert sind.

CycY von *B. japonicum* wurde biochemisch analysiert. Dazu wurde eine lösliche Domäne ohne den N-terminalen Membrananker (CycY*) in *E. coli* exprimiert und aus der periplasmatischen Fraktion gereinigt. Das Protein zeigte ein unterschiedliches Auftrennungsverhalten im SDS-PAGE je nach reduzierenden bzw. oxidierenden Bedingungen. Jedoch reagierte es *in vitro* nicht mit Modells substraten wie zum Beispiel Insulin oder DsbA, was auf eine hohe Substratspezifität hindeutet. Wie in anderen Thioredoxin-ähnlichen Proteinen wird im oxidierten CycY die Tryptophanfluoreszenz teilweise gelöscht. Diese Eigenschaft wurde für die Bestimmung

der Gleichgewichtskonstante mit Glutathion genutzt. Das daraus berechnete Redoxpotential von -0.217 mV ist näher zu dem Redoxpotential von Reduktasen (z.B. Thioredoxin) als zu dem von Oxidasen (z.B. DsbA). Daher wurde vermutet, daß das Protein wahrscheinlich eine reduzierende Funktion während der Cytochrom *c* Biogenese hat, indem es - direkt oder indirekt - das Hämbindungsmotiv von Apocytochrom *c* im reduzierten Zustand hält.

Diese Vermutung wurde durch die genetische Analyse von *ccmG* in *E. coli* bestätigt. Die Cysteine im aktiven Zentrum wurden durch ortsspezifische Mutagenese gegen Serinreste ausgetauscht und der daraus resultierende Effekt auf die Cytochrom *c* Biogenese untersucht. Erstaunlicherweise waren die Punktmutanten des C-X-X-C Motivs - wenn auch in vermindertem Maße - noch in der Lage das Holoprotein herzustellen. Die Zugabe von reduzierenden Substanzen wie L-Cystein, 2-Mercaptoethansulfonsäure (MESA) oder Glutathion stellte die Fähigkeit zur Bildung von Holoprotein in den Punktmutanten wieder her. Dagegen war in der nicht polaren *ccmG* Deletionsmutante die Cytochrom *c*-Reifung irreversibel unterbrochen. Daraus wurde geschlossen, daß CcmG eine reduzierende Funktion während des Redoxweges der Cytochrom *c*-Reifung ausübt. Das aktive Zentrum ist für diesen Prozess wichtig, aber nicht essentiell. Das CcmG-Polypeptid hingegen ist essentiell, was andeutet, daß CcmG zusätzlich zur reduzierenden eine weitere Funktion während der Cytochrom *c*-Reifung ausübt.

Desweiteren wurde CcmH von *E. coli* charakterisiert. Das Protein hat vermutlich zwei transmembrane Helices. Eine translationelle *phoA* Fusion zeigte, daß die N-terminale Domäne mit dem konservierten Motiv L-R-C-X-X-C ins Periplasma ragt. Verschiedene *ccmH*-Deletionsmutanten wurden auf ihre Eigenschaften während der Cytochrom *c*-Biogenese untersucht. Es wurde gefunden, daß die C-terminale Domäne, die wahrscheinlich ebenfalls im Periplasma liegt, nicht für die Cytochrom *c*-Reifung erforderlich ist. Hingegen führte die zusätzliche Deletion von weiterer 3'-Region des *ccmH* Gens (es wurde nur noch die lösliche N-terminale Domäne von CcmH hergestellt) zur Unterbrechung der Cytochrom *c*-Biogenese. Durch ortsspezifische Mutagenese wurden die Cysteinreste im konservierten Motiv ausgetauscht. Im Unterschied zur *ccmH* Deletionsmutante war in den Punktmutanten die Fähigkeit zur Holocytochrom *c* Herstellung nicht vollständig zerstört, aber stark beeinträchtigt. Analyse der Punktmutanten unter unterschiedlichen

Wachstumsbedingungen zeigte, daß beide Reste unter aeroben Wachstumsbedingungen für die Cytochrom *c*-Biogenese wichtig sind, während unter anaeroben Bedingungen nur der C-terminale Cysteinrest des Motivs erforderlich ist. Als einzige reduzierende Substanz konnte MESA in den Punktmutanten die Fähigkeit zur Cytochrom *c*-Biogenese wiederherstellen. CcmH spielt daher wahrscheinlich auch eine reduzierende Rolle während der Cytochrom *c*-Biogenese.

Die erzielten Resultate legen nahe, daß die Reduktion der Häm-Bindungsstelle von Apocytochrom *c* über eine Redoxkaskade erfolgt, die CcmG, CcmH und weitere Protein Thiol:Disulfid Oxidoreduktasen wie das DsbD Protein einschließt. Zwei alternative Modelle wurden für den Redoxweg der Cytochrom *c*-Biogenese formuliert. Bisher war es jedoch nicht möglich, die Targetproteine von CcmG oder CcmH zu identifizieren und so eine der beiden Alternativen zu bestätigen.