



Doctoral Thesis

CcmA and CcmB, an ABC transporter involved in cytochrome c maturation

Author(s):

Christensen, Olaf

Publication Date:

2005

Permanent Link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-005023864> →

Rights / License:

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

This page was generated automatically upon download from the [ETH Zurich Research Collection](#). For more information please consult the [Terms of use](#).

**CcmA and CcmB, an ABC transporter involved in cytochrome *c*
maturation**

A dissertation submitted to the
SWISS FEDERAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY

ZÜRICH

for the degree of
DOCTOR OF NATURAL SCIENCES

presented by

OLAF CHRISTENSEN

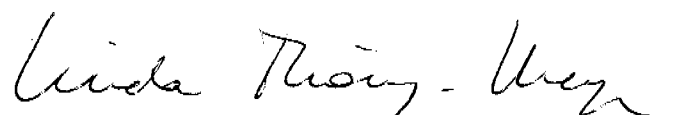
Master of Science, University of Berne

born on April 29th, 1976

citizen of Niedergösgen

accepted on the recommendation of
Prof. Dr. L. Thöny-Meyer, examiner
Prof. Dr. F. Narberhaus, co-examiner

2005



exprimiert wurde. Zusätzlich konnten bestimmte Punktmutationen von konservierten Aminosäuren in CcmB diesen Phänotyp aufheben. Mutationen von anderen konservierten Aminosäuren in CcmB zeigten keinen detektierbaren Phänotyp, weder in Bezug auf den dominant-negativen Phänotyp, noch auf die Cytochrom *c* Reifung.

Eine andere unerwartete Beobachtung war die Bildung von stabilen CcmE Dimeren in denaturierenden SDS Polyacrylamidgelen. Untersuchungen zeigten, dass diese Dimere in *ccmA* oder *ccmB* Mutanten nicht vorhanden waren. Es konnte weiter gezeigt werden, dass keine CcmE Dimere gefunden werden, wenn Häm nicht in das CcmE eingebaut wird. Dieser Einbau ist abhängig von i) CcmC ii) der Häm Biosynthese und iii) einer intakten Hämbindung am CcmE, die nur in Gegenwart von Histidin 130 erfolgen kann. Die Hypothese, dass die CcmE Dimere eine biologische Rolle in der Cytochrom *c* Bildung haben, wurde weiter unterstützt durch die Erkenntnis, dass die Dimere immer nur dann gefunden wurden, wenn ebenfalls reifes Cytochrom *c* vorhanden war.

In dieser Arbeit konnten die Dimere von den Monomeren getrennt werden. Ein Massenspektrum des isolierten Dimers ergab, dass die Dimere aus zwei Holo-CcmE Molekülen bestehen. Es schlugen alle Versuche fehl, die Dimere in Monomere zu zerteilen. Dies deutet auf eine starke Interaktion zwischen den beiden CcmE Monomeren hin, und eine kovalente Binding zwischen den beiden Häm Molekülen kann nicht ausgeschlossen werden.

Obwohl das eigentliche Substrat von CcmAB immer noch nicht gefunden werden konnte, beinhaltet diese Arbeit dennoch wichtige Erkenntnisse über CcmAB, welche für die zukünftige Forschung berücksichtigt werden müssen.

Zusammenfassung

C-Typ Cytochrome sind Elektronentransport-Proteine, welche den Kofaktor Häm als prostetische Gruppe gebunden haben. In Gram-negativen Bakterien wird sowohl die Vorstufe von Cytochrom *c* als auch das Häm-Molekül im Zytoplasma hergestellt. Das Häm Molekül und das Apo-Cytochrom *c* werden getrennt durch die Membran ins Periplasma transportiert, wo Häm kovalent an das Apo-Cytochrom *c* gebunden wird.

Man weiss zwar, dass das Apo-Cytochrom *c* mit Hilfe des Sec Apparates transloziert wird, es ist jedoch nach wie vor unbekannt, wie Häm über die Membran transportiert wird.

Im Bakterium *Escherichia coli* sind acht Proteine (CcmA-H) essentiell, um reifes Cytochrom *c* zu bilden. Die Proteine CcmA-H werden durch das *ccm* Operon kodiert. Von diesen acht Proteinen bilden CcmA, CcmB und/oder CcmC einen ABC-Transporter. Bis jetzt war es jedoch unklar, ob der ABC-Transporter lediglich aus den zwei Proteinen CcmA und CcmB besteht oder aus den Proteinen CcmA, CcmB und CcmC.

Bei der Fragestellung nach dem Aufbau des ABC-Transporters wurde mittels Interaktionsstudien ein grosser Durchbruch erreicht. In dieser Arbeit konnte klar gezeigt werden, dass der ABC-Transporter aus CcmA und CcmB mit der Anordnung CcmA₂B₂ besteht, wobei CcmC als Zusatzprotein mit dem ABC-Transporter interagiert.

Der CcmAB Komplex wurde gereinigt, und es wurde eine intrinsische ATPase Aktivität festgestellt. Diese Aktivität wurde durch das CcmE Protein leicht stimuliert, jedoch weder durch Häm noch durch andere redox-aktive Substanzen. Weiter hemmte eine Mutation im Walker A Motif von CcmA nicht nur die ATP Hydrolyse, sondern ebenfalls die Cytochrom *c* Reifung. Somit konnte gezeigt werden, dass die ATP Hydrolyse eine wichtige Voraussetzung der Cytochrom *c* Reifung ist. Die Komplementation einer *ccmA* Mutante mit Häm misslang, womit es sehr unwahrscheinlich ist, dass Häm von CcmA und CcmB transportiert wird.

Es wurde versucht, essentielle Aminosäuren in CcmB zu bestimmen. Dies sollte erreicht werden, indem das *ccmB* Gen in einer *ccmB* Mutante exprimiert wurde. Es zeigte sich jedoch ein interessantes Ergebnis: Überexpression des *ccmB* Gens verursachte einen dominant-negativen Phänotyp. Das bedeutet, dass das Gen *ccmB*, welches von einem Plasmid exprimiert wurde, nicht in der Lage war, eine *ccmB* Deletionsmutante zu komplementieren. Dieser dominant-negative Phänotyp konnte jedoch aufgehoben werden, wenn *ccmB* zusammen mit *ccmA* und *ccmC*

biosynthesis and iii) an intact heme binding site of CcmE, i.e. the presence of histidine 130. The hypothesis that CcmE dimers have a biological role in cytochrome *c* formation was further supported by the finding that CcmE dimer formation was always observed in strains able to produce holo-cytochrome *c*. Separation of the dimer from the monomer followed by mass spectroscopy showed that the dimer consists of two holo-CcmE polypeptides. Moreover, attempts to dissociate these dimers failed. Thus, a strong interaction of two molecules, probably by a covalent bond between the two CcmE polypeptides and/or heme is hypothesized. Although the actual substrate of CcmAB still remains unknown, this work revealed important characteristics of CcmAB that need to be considered in future research.

Abstract

C-type cytochromes are electron transfer proteins that carry heme as a prosthetic group. In Gram-negative bacteria, the precursor forms of cytochrome *c* as well as heme are synthesized in the cytoplasm. Heme and the apo-cytochrome *c* are translocated separately across the membrane to the periplasm, the site of assembly. It is known that apo-cytochrome *c* is translocated by the Sec machinery, but it is still an open question how heme is transported.

In *Escherichia coli*, eight proteins, CcmA-H, are encoded by the *ccm* operon and are essential for cytochrome *c* maturation. Among them, the proteins CcmA, CcmB and/or CcmC are believed to constitute an ABC transporter. Until now, it was unclear, whether the ABC transporter consists of the two proteins CcmA and CcmB or of the three proteins CcmA, CcmB and CcmC.

I present a major breakthrough to answer the question of assembly. This was achieved by interaction studies, which clearly showed that CcmA and CcmB form an ABC transporter, most likely of the composition CcmA₂B₂ with CcmC as an accessory protein. The active CcmAB complex was purified and its intrinsic ATPase activity was determined. This activity could be stimulated slightly by the addition of the CcmE protein, but not by heme or other redox-active substances. A mutation in the Walker A motif of CcmA abolished not only ATP hydrolysis, but also cytochrome *c* formation. This demonstrates that ATP hydrolysis by CcmA is an essential prerequisite of cytochrome *c* maturation. Complementation of a *ccmA* mutant with extracellular heme failed. Thus, it is very unlikely that heme is transported by CcmA and CcmB.

Determination of essential residues for CcmB activity was also tried, which involved expression of *ccmB* from a plasmid in a strain lacking the chromosomal gene. This led to a surprising finding: overexpression of *ccmB* caused a dominant negative phenotype, i.e. *ccmB* expressed from a plasmid was unable to complement the *ccmB* deletion strain. The dominant negative phenotype could be relieved when *ccmB* was overexpressed together with *ccmA* and *ccmC*, or with certain point mutations in some of the conserved residues of CcmB. Mutations of other conserved amino acid residues within CcmB had no detectable phenotype, neither regarding the dominant negative effect, nor with respect to cytochrome *c* maturation.

Another unexpected observation was the formation of stable CcmE dimers visible in denaturing SDS polyacrylamide gels. This dimer formation was further investigated, because strains mutated in *ccmA* or *ccmB* were not able to form CcmE dimer. This dimer formation was not observed, when heme was not incorporated into CcmE, which was dependent on i) CcmC, ii) heme