

Summary

Tungsten (W) and Molybdenum (Mo) are the only transition metals of the sixth group in the periodic table of elements, which are biologically relevant. In enzymes, W and Mo are coordinated by an organic scaffold – the metal-binding pterin (MPT) – forming the tungsten (Wco) and molybdenum cofactor (Moco), respectively. Biosynthesis of Moco has been intensively studied in the last decades and was shown to be highly conserved in all domains of life. In contrast, biosynthesis of Wco, mostly found in Archaea, is less understood, and was therefore the focus of this study.

The final steps of Wco-maturation were investigated in the W-dependent archaeon *Pyrococcus furiosus*. *P. furiosus* is a hyperthermophilic organism with an optimal growth temperature of 100 °C, which required the development of adaptation mechanisms to resist thermal denaturation of proteins. Therefore, the structural basis underlying thermal stability of the Wco-synthesising protein MoaB from *P. furiosus* was investigated. The crystal structure of hexameric MoaB was determined by X-ray crystallography at 2.6 Å resolution and showed a high degree of structural homology to other MPT-adenylyl-transferases from Eukarya, Bacteria and Archaea. To elucidate the impact of MoaB hexamerization on thermostability, interactions between two trimers within the hexamer were disrupted by structure-guided mutagenesis. The resulting mutant variant mainly formed dimers and exhibited a 15 °C lower melting temperature than WT MoaB. Structural comparison of *P. furiosus* MoaB with orthologues from mesophilic and thermophilic organisms showed that increased interface area, increased number of inter-subunit interactions at the hexamerization interface, as well as shortening of loops and decreased content of thermolabile residues represent structural determinants of the *P. furiosus* MoaB stability. Remarkably, the non-hexameric mutant variant showed increased activity at temperatures below 50°C in comparison to WT MoaB.

The reaction product of MoaB is MPT-AMP, which was shown in Moco-utilizing organisms to be cleaved by enzymes of the MoeA family thus leading to the insertion of Mo and release of Moco. In *P. furiosus* two paralogues MoeA1 and MoeA2 are expressed, which were assumed to play a similar role in Wco biosynthesis. *In vivo* binding of MPT-AMP to both MoeA1 and MoeA2 was shown. Furthermore, an *in vitro* Wco synthesis system using purified, MPT-AMP-containing MoeA1 and MoeA2 was established. Implications for the physiological role of the *moeA* duplication in *P. furiosus*, as well as metal specificity of MoeA paralogues are discussed.

Biosynthesis of the GMP-modified form of Moco requires the activity of the MobA protein. In *E. coli* the *mobA* gene is co-transcribed with *mobB* - a gene, which is not essential for biosynthesis of Moco, but believed to act as MobA adaptor thus facilitating cofactor transfer to target enzymes. *P. furiosus* MobB was recombinantly expressed in *E. coli*, purified and characterized. MobB exhibited low GTPase activity, similarly to *E. coli* MobB. However, differently from the *E. coli* orthologue, *P. furiosus* MobB was found to harbour an additional Fe-S cluster-containing domain of unknown function and folding with a conserved Cx₂Cx₃Cx₁₆C motif. Spectroscopic and elemental analysis of purified MobB suggested the presence of a [4Fe-4S] type of clusters. Physiological functions of MobB are discussed.

Zusammenfassung

Die Übergangsmetalle Wolfram(W) und Molybdän(Mo) sind die einzigen chemischen Elemente der sechsten Gruppe des Periodensystems mit einer biologischen Bedeutung. In Enzymen werden W und Mo durch ein organisches Molekül – das Metall-bindende-Pterin (MPT) – koordiniert, welches das Gerüst des Wolfram- (Wco) und Molybdän-Kofaktors (Moco) bildet. Die Biosynthese des Moco wurde bereits intensiv untersucht und weist eine hohe Konservierung in allen drein Domänen des Lebens auf. Im Gegensatz dazu ist die Biosynthese des Wco, welches hauptsächlich in Archaeen vorkommt, noch nicht ausreichend erforscht und war demnach der Fokus der aktuellen Arbeit.

Die finalen Schritte der Wco-Biosynthese wurden im Wolfram-abhängigen Archaeon - *Pyrococcus furiosus* untersucht. *P. furiosus* ist ein hyperthermophiler Organismus, dessen optimale Wachstumstemperatur bei 100 °C liegt. Diese Tatsache macht die Entwicklung von Anpassungsstrategien erforderlich, um die thermische Denaturierung von Proteinen zu verhindern. In dieser Arbeit wurde die strukturelle Grundalge der Thermostabilität des Wco-synthetisierenden Proteins MoaB aus *P. furiosus* untersucht. Die Kristallstruktur von hexamerem MoaB wurde bei einer Auflösung von 2,6 Å mittels Röntgen-Kristallographie aufgeklärt und zeigte hohe strukturelle Übereinstimmungen zu den Orthologen aus Eukaryoten, Bakterien und Archaeen. Um die Auswirkungen der Hexamerisierung von MoaB auf dessen Thermostabilität zu untersuchen, wurden Wechselwirkungen zwischen zwei Trimeren im Hexamer durch die gezielte Mutagenese Struktur-relevanter Aminosäuren zerstört. Die mutierte Variante bildete vorwiegend Dimere und zeigte eine um 15°C niedrigere Schmelztemperatur als Wildtyp MoaB. Vergleichende Analysen der Struktur von *P. furiosus* MoaB mit homologen Strukturen aus mesophilen und thermophilen Organismen zeigte, dass die *P. furiosus* MoaB Struktur durch eine vergrößerte Wechselwirkungsfläche der Untereinheiten, sowie umfangreichere Wechselwirkungen am Hexamerisierung-*Interface* gekennzeichnet ist. Darüber hinaus, stellen eine Verkürzung der *Loops* in der sekundären Struktur und ein verringerter Gehalt an thermolabilen Aminosäureresten die zusätzlichen strukturellen Faktoren dar, die zur Thermostabilität des MoaBs beitragen. Desweiteren konnte für die mutierte Variante im Vergleich zum Wildtyp MoaB eine erhöhte katalytische Aktivität bei Temperaturen unter 50 °C nachgewiesen werden.

Das Reaktionsprodukt von MoaB ist MPT-AMP, welches in Moco-abhängigen Organismen durch Proteine der MoeA-Familie hydrolysiert wird, was zum Einfügen von Mo in das MPT-Gerüst und Freisetzen von Moco führt. In *P. furiosus* werden zwei Paraloge, MoeA1 und MoeA2, mit vermutlich ähnlicher Funktion, exprimiert. In dieser Arbeit konnte erstmals die Bindung von MPT-AMP sowohl an MoeA1 und MoeA2 in vivo gezeigt werden. Ferner wurde ein in vitro Wco Synthesystem unter Verwendung von gereinigten, mit MPT-AMP beladenen MoeA1 und MoeA2, etabliert. Implikationen für die physiologische Rolle der *moeA* Duplikation in *P. furiosus*, sowie Metall-Spezifität der MoeA Paralogen werden diskutiert.

Die Biosynthese der GMP-modifizierte Form des Moco erfordert die Aktivität des Proteins MobA. In *E. coli* kommt es zu einer Co-Transkription des *mobA*-Gens mit *mobB*. MobB ist nicht obligatorisch für die Biosynthese des Kofaktors. Es wird jedoch angenommen, dass MobB als MobA-Adapter dient und den Kofaktor-Transfer an Ziel-Enzyme erhöht. *P. furiosus* MobB wurde rekombinant in *E. coli* exprimiert, aufgereinigt und charakterisiert. MobB zeigte eine geringe GTPase-Aktivität, ähnlich zu *E. coli* MobB. Anders als das *E. coli* Ortholog trägt *P. furiosus* MobB jedoch eine zusätzliche, Fe-S-Cluster-enthaltende Domäne unbekannter Funktion und Faltung, mit einem konservierten C_x₂C_x₃C_x₁₆C Motiv. Spektroskopische und Elementaranalyse von gereinigtem MobB deuteten auf das Vorhandensein eines [4Fe-4S]-Clusters hin. Physiologischen Funktionen von MobB werden diskutiert.