

Structural and Biochemical Characterization of Metallopeptidases from Enteropathogenic Bacteria

Abstract

Proteolytic processes are not only essential for protein degradation, but they are also a key posttranslational modification as they regulate interaction capacity, activity, and/or localization of the cleaved protein. Unsurprisingly, proteolytic enzymes play an important role in a variety of diseases. Due to their broad diversity and often unique specificity, proteases are highly suitable pharmacological targets. For the development of potent inhibitors, however, a profound understanding of the proteolytic mechanism is very useful. In this thesis, the structure-function relationships of two related proteins, which are involved in gut infection by two major bacterial pathogens, have been studied. One of these proteins is a confirmed and the other one a putative protease.

Proline-proline endopeptidase-1 (PPEP-1) is a secreted metalloprotease from *Clostridium difficile* showing a unique specificity for Pro-Pro peptide bonds. In line with the cleavage of two endogenous adhesion proteins, PPEP-1 has been shown to be important for motility of *C. difficile* and hence for efficient gut colonization. Starting from a previously determined crystal structure, a more profound understanding about the Pro-Pro specificity of PPEP-1 was obtained. In addition, the residues Lys101, Trp103 and Glu184 of PPEP-1 were identified to be crucial for proteolytic activity. This in turn underlines the importance of a flexible loop located directly above the substrate-binding cleft in defining substrate specificity of PPEP-1 beyond the Pro-Pro bond.

PPEP-1 related protein 1 (PRP-1) from *Vibrio cholerae* is a putative metallopeptidase and shares approximately 15 % sequence identity with PPEP-1. The gene coding for PRP-1 is located on a genome section (so-called pathogenic island) in which virulence factors are clustered. In agreement, it has been reported that PRP-1 modulates the pathogenicity of *V. cholerae*. With regard to the sequence similarity and the involvement in pathological processes, we aimed at an initial biochemical and structural characterization of PRP-1 in this thesis. To this end, a heterologous expression and purification protocol was established. The recombinant protein was void of any detectable proteolytic activity. The crystal structure of PRP-1 solved in thesis, however, confirmed that the protein has a fold similar to PPEP-1. Apart from the peptidase domain it possesses an additional N-terminal region that is not a pro-domain.

Nevertheless, the protein in the crystal structure was in a proteolytic inactive conformation. This implies that PRP-1 may have a unique regulatory mechanism. Interestingly, this crystal structure indicated that an artificially introduced N-terminal metal ion binding motif could be exploited as a crystallization chaperone and as a specific heavy-atom derivatization site in crystallization experiments of other proteins.

Additionally, during the crystallographic work in this thesis, a simple, fast and cost-efficient method was developed for the detection of protein crystals by employing 2,2,2-trichloroethanol as tryptophan fluorescence enhancer. In two tested cases, this method had no effects on the diffraction properties of the treated crystals and no changes could be detected in the crystal structures.

Zusammenfassung

Proteolytische Spaltungen sind nicht nur essentiell für den Proteinabbau, sondern auch wichtig für die posttranslationale Veränderung von Proteinen, da dies die Interaktionsfähigkeit, Aktivität und/oder Lokalisierung der geschnittenen Proteine regulieren kann. Es überrascht nicht, dass proteolytische Enzyme eine wichtige Rolle bei einer Vielzahl von Krankheitsprozessen spielen. Aufgrund ihrer großen Vielfalt und ihrer oftmals einzigartigen Spezifität sind Proteasen für die pharmakologische Hemmung sehr gut geeignet. Allerdings ist häufig ein tiefes Verständnis des Protease-Mechanismus für die Entwicklung von potenten und selektiven Inhibitoren zwingend erforderlich. In dieser Arbeit wurden die Struktur-Funktionsbeziehungen von zwei ähnlichen Proteinen untersucht, die bei Darminfektionen beteiligt sind. Beide Proteine sind bedeutenden bakteriellen Pathogenen. Das eine Protein ist eine bestätigte, und das andere eine mutmaßliche Protease.

Prolin-Prolin-Endopeptidase-1 (PPEP-1) ist eine sezernierte Metalloprotease aus *Clostridium difficile*, die eine einzigartige Spezifität für Prolin-Prolin-Peptidbindungen zeigt. In Übereinstimmung mit der Prozessierung zweier endogener Adhäsionsproteine hat sich PPEP-1 als bedeutsam für die Motilität und damit für eine effiziente Darmkolonisation von *C. difficile* erwiesen. Ausgehend von einer zuvor ermittelten Kristallstruktur konnte in dieser Arbeit ein tieferes Verständnis über die Prolin-Prolin-Spezifität von PPEP-1 erhalten werden. Darüber hinaus wurden die Aminosäuren Lys101, Trp103 und Glu184 von PPEP-1 als entscheidend für die proteolytische Aktivität identifiziert. Dies unterstreicht wiederum die Bedeutung einer flexiblen Schleifenregion, die sich direkt oberhalb der Substratbindungstasche befindet, für die Definierung der Substratspezifität von PPEP-1 jenseits der Positionen direkt benachbart zur Spaltungsstelle.

„PPEP-1 verwandtes Protein 1“ (PRP-1) ist eine mutmaßliche Protease von *Vibrio cholerae* und teilt mit PPEP-1 eine Sequenzidentität von etwa 15 %. Das Gen von PRP-1 liegt auf einem Abschnitt im Genom in denen Gene von Virulenzfaktoren gruppiert vorliegen (eine sogenannte pathogene Insel). Damit übereinstimmend wurde berichtet, dass PRP-1 die Pathogenität von *V. cholerae* moduliert. Im Hinblick auf die Sequenzähnlichkeit und die Beteiligung an pathologischen Prozessen zielten wir in dieser Arbeit auf eine anfängliche biochemische und strukturelle Charakterisierung von PRP-1 ab. Hierzu wurde zunächst ein heterologes Expressions- und Aufreinigungsprotokoll etabliert. Das rekombinante Protein wies keine nachweisbare proteolytische Aktivität auf. Dennoch konnte die hier gelöste Kristallstruktur von PRP-1 bestätigen, dass das PRP-1 eine ähnliche Faltung wie PPEP-1 aufweist. Zusätzlich besitzt es eine N-terminale Region, die keine Pro-Domäne ist. Trotzdem lag das Protein in der Kristallstruktur in einer proteolytisch inaktiven Konformation vor. Dies

lässt vermuten, dass PRP-1 einen einzigartigen Regulationsmechanismus aufweist. Interessanterweise, wurde in der Kristallstruktur ein künstlich eingeführtes N-terminales Metallionenbindungsmotiv beobachtet. Dies könnte als Kristallisationschaperon und spezifische Schweratom-Derivatisierungsstelle in Kristallisations-Experimenten mit anderen Proteinen genutzt werden.

Zusätzlich wurde in dieser Studie während der kristallographischen Arbeit ein einfaches, schnelles und kostengünstiges Verfahren für den Nachweis von Proteinkristallen unter Verwendung von 2,2,2-Trichlorethanol als Tryptophan-Fluoreszenzverstärker entwickelt. In den zwei getesteten Fällen hatte diese Methode keine Auswirkungen auf die Beugungseigenschaften der behandelten Kristalle und es konnten keine Veränderungen in den Kristallstrukturen festgestellt werden.