

Zusammenfassung

Die U32-Peptidase-Familie ist eine Gruppe von verschiedenen Peptidasen, die eine unbekannte katalytische Struktur und Klasse aufweisen. Peptidasen, die aus dieser Familie stammen, treten in allen Domänen des Lebens auf und werden häufig aufgrund ihrer beschriebenen kollagenolytischen und proteolytischen Eigenschaften mit menschlichen Krankheiten in Zusammenhang gebracht. Um U32 Peptidasen biochemisch und strukturell detaillierter zu charakterisieren, wurden Reinigungsprotokolle für YrrO (*Bacillus subtilis*), MJ0090 (*Methanocaldococcus jannaschii*) und YhbV (*Escherichia coli*) mit verschiedenen Affinitäts-Chromatographien etabliert. Im Verlauf der Reinigung zeigten die rekombinanten Proteine YhbV und YrrO eine rote Färbung. Durch EPR wurde für YhbV-His gezeigt, dass die Rotfärbung durch die Bindung eines High-Spin-Eisens (III) verursacht wird.

In einer früheren Studie wurde die einzige verfügbare 3D-Struktur einer U32 Peptidase namens MK0906 von *Methanopyrus kandleri* bestimmt. In dieser Studie wurde die proteolytische und kollagenolytische Aktivität des Proteins untersucht. Jedoch konnte keine Aktivität nachgewiesen werden. Daher wurde versucht, andere U32 Peptidasen strukturell und funktionell zu charakterisieren, insbesondere YhbV aus *E. coli* und YrrO aus *B. subtilis*.

Da YhbV-His und His-YrrO nicht kristallisierten und entsprechend keine Kristallstruktur bestimmt werden konnte, wurde die grobe Form der Proteine durch SAXS bewertet. Hierbei wurde beobachtet, dass His-YrrO einen hohen Anteil an flexibler Region besitzt, während das Protein YhbV-His weniger flexible Regionen zeigte.

Aufgrund der nicht nachweisbaren proteolytischen Aktivität, nicht nur für MK0906, sondern auch für andere bereits untersuchten U32 Proteine, wurde nun nach Hinweisen auf andere Funktionen dieser Proteine gesucht und die nachfolgend beschriebenen Experimente durchgeführt.

In *Escherichia coli* gibt es die vier U32-Peptidase Gene *yegQ*, *ycdP*, *yhbU* und *yhbV*. Es wurden einfach- bis vierfach-Gen-Knockout-Mutanten dieser *E. coli* Gene generiert und mit Hilfe von Phenotype MicroArray Hochdurchsatz-Screenings analysiert, um Bedingungen der Expression zu identifizieren. Unter anaeroben Bedingungen kann der Wildtyp-Stamm W3110 in Anwesenheit von L-Leucin, aber nicht von L-Norleucin bei einem pH-Wert von 9.5 Metabolismus betreiben. Für den Doppel-Knockout-Stamm

W3110 $\Delta yhbU$ $yhbV$ war die Situation umgekehrt. Realtime-PCR Analysen ergaben, dass unter aeroben Bedingungen diese Aminosäuren nicht das Transkriptionsniveau des Genes *yhbU* beeinflussen. Wenn überhaupt, findet die Regulation auf der Ebene der Translation statt.

Eine Promotoranalyse durch 5'RACE zeigte, dass die Gene *yhbU* und *yhbV* von den Transkriptionsstartstellen 44 und 46 bp aufwärts des Gens *yhbU* kotranskribiert werden und somit ein Operon bilden. Das Gen *yhbW* befindet sich weiter abwärts, in der gleichen Orientierung wie das *yhbUV* Operon und gehört dennoch zu seiner eigenen Transkriptionseinheit.

Abstract

The U32 peptidase family is a group of diverse peptidases that have an unknown catalytic type and structure. Peptidases derived from this family occur in all domains of life and are often implicated in human diseases based on their described collagenolytic and proteolytic properties. In order to characterise U32 peptidases biochemically as well as structurally, in more detail purification protocols were established for YrrO (*Bacillus subtilis*), MJ0090 (*Methanocaldococcus jannaschii*) and YhbV (*Escherichia coli*) with different affinity chromatographies. Over the course of purification, recombinant YhbV and YrrO exhibited a red colour. By EPR it was shown for YhbV-His, that this red colour is caused by the binding of a high spin iron (III).

In an earlier study the only available 3D structure of a U32 peptidase, namely MK0906 from *Methanopyrus kandleri*, was determined. In this study the proteolytic and collagenolytic activity was investigated. However, biochemical assays failed to demonstrate activity. Therefore, other U32 peptidases were analysed in order to gain a closer insight into their structure and function, especially for YhbV from *E. coli* and for YrrO from *B. subtilis*.

Because YhbV-His and His-YrrO did not crystallise in numerous trials and thus structure determination was not possible, the overall shape of these proteins was assessed by SAXS. It was observed that His-YrrO contained a high proportion of flexible regions. Whereas the protein YhbV-His showed less flexible regions.

Based on the missing proteolytic activity, not only for MK0906, but also for a number of previously studied U32 proteins, clues for another function of these proteins were sought and the experiments described below were conducted:

In *Escherichia coli*, there are the four U32 peptidases genes *yegQ*, *ycdP*, *yhbU* and *yhbV*. Single to quadruple gene knockouts mutants of these *E. coli* genes were generated and analysed by Phenotype MicroArray high throughput screens to identify conditions of expression. Under anaerobic conditions and in presence of L-Leucine, but not L-Norleucine at a pH of 9.5 the wild-type strain W3110 is metabolic active. For the double knockout strain W3110 Δ yhbU yhbV the situation was vice versa. Realtime-PCR analysis revealed that these amino acids under aerobic conditions did not influence the transcription level of both genes and if at all, regulation occurs on the level of translation.

A promoter analysis by 5' RACE revealed that the genes *yhbU* and *yhbV* are cotranscribed from transcriptional start sites located 44 and 46 bp upstream of the *yhbU* gene and thus form an operon. The gene *yhbW* is located further downstream, in the same orientation as the *yhbUV* operon, belongs to its own transcription unit.