

DISS. ETH NO. 23817

***STRUCTURAL AND MECHANISTIC CHARACTERIZATION OF THE
BACTERIAL PROTEASOME-RELATED PROTEINS BPA AND DOP***

A thesis submitted to attain the degree of
DOCTOR OF SCIENCES of ETH ZURICH
(Dr. sc. ETH Zurich)

presented by

MARCEL BOLTEN

M.Sc. in Chemical Biology, TU Dortmund

born on *25.07.1986*

citizen of *Germany*

accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Eilika Weber-Ban

Prof. Dr. Rudi Glockshuber

Prof. Dr. Donald Hilvert

2016

Zusammenfassung

Proteinhomöostase ist ein fundamentaler Prozess des Lebens und beschreibt die Kontrolle der Proteinkonzentrationen und der Funktionalität des Proteoms in lebenden Zellen. Ein wichtiger Aspekt dieses Kontrollprozesses ist der Proteinabbau, bei welchem Proteasen selektiv beschädigte oder nicht länger benötigte Proteine verdauen. Diese Aufgabe wird üblicherweise von kompartmentalisierenden Proteasekomplexen übernommen, die abgeschlossene Abbaukompartimente mit Zugangskontrolle besitzen, wodurch deren proteolytische Aktivität gegenüber dem Zytosol abgeschottet ist. In einigen Actinobakterien wurde einer dieser makromolekularen Komplexe, das Proteasom, gefunden, das für gewöhnlich nur in Eukaryoten und Archaeen vorkommt. Das Proteasom besteht aus einem Hohlzylinder mit siebenzähliger Symmetrie, in dessen Innerem sich die katalytisch aktiven Zentren befinden. Um den aktiven Proteasomkomplex zu bilden, assoziiert dieses sogenannte “*core particle*”, (CP) mit ringförmigen Regulatoren, die für die Erkennung abzubauenen Proteinsubstrate verantwortlich sind. In Actinobakterien sind zwei Regulatorkomplexe mit unterschiedlicher Funktion bekannt, die mycobakterielle, proteasomale ATPase (Mpa) und der bakterielle Proteasomeaktivator (Bpa). Bpa besitzt eine Interaktionsplattform für partiell entfaltete Proteine, vermittelt ATP-unabhängig deren weitere Entfaltung und die Einfädung in den Hohlzylinder des CP. Dagegen ist Mpa ein durch ATP-Hydrolyse angetriebener Komplex, welcher Proteine, die post-translational kovalent mit dem prokaryotischen ubiquitin-ähnlichen Protein (Pup) modifiziert sind, rekrutiert, und unter Umsatz von ATP aktiv entfaltet. Im Gegensatz zum gut untersuchten Mpa-Komplex ist nur wenig über das erst kürzlich entdeckte Bpa bekannt.

In der vorliegenden Arbeit wurde die dreidimensionale Struktur von Bpa durch Röntgenkristallographie mit einer Auflösung von 2.6 Å aufgeklärt. Der Bpa-Komplex bildet eine Ring aus zwölf Untereinheiten, die eine Vier-Helix-Bündel Faltung einnehmen. Die C-terminalen Segmente der Protomere, die das für die Bindung am CP essentielle C-terminale Tetrapeptidmotif GQYL tragen, treten alle auf der

gleichen Seite des Bpa-Ringkomplexes hervor. Die Bpa-CP Berührungsfläche ist somit ein weiteres Beispiel für die Wechselwirkung zwischen Ringsystemen mit nicht übereinstimmender Symmetrie.

Mpa-abhängiger Proteinabbau erfordert eine als Pupylierung bezeichnete post-translationale Modifikation der abzubauenen Proteine. In diesem Prozess wird durch die Ligase PafA eine Isopeptidbindung zwischen dem C-terminalen Glutamarest des kleinen Proteins Pup und einer Lysinseitenkette des Substratproteins ausgebildet. In einigen Actinobakterien ist Pup als Protein mit einem C-terminalen Glutamin kodiert, welches vor der Ligation erst zu Glutamat umgewandelt werden muss. Die Deamidase Dop (*deamidase of Pup*) katalysiert diese Reaktion und weist zusätzlich Depupylierungsaktivität auf. PafA und Dop sind paraloge Enzyme mit hoher Struktur- und Sequenzhomologie und sehr ähnlich aufgebauten katalytischen Zentren. Während bei PafA der ATP-Umsatz stöchiometrisch mit der Ligationreaktion gekoppelt ist, ist bei Dop zwar die Bindung von ATP für die Aktivität erforderlich, jedoch erfolgt keine stöchiometrische Umsetzung von ATP.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wird der Frage nachgegangen, warum Dop ATP benötigt. Mit Hilfe von Röntgenkristallographie und biochemischen Methoden wird gezeigt, dass die katalytische Aktivität von Dop abhängig von ADP und anorganischem Phosphat ist und nicht von ATP. Bei der Depupylase-Aktivität von Dop fungiert das anorganische Phosphat als Nukleophil bei der Spaltung der Amidbindung. Somit ist der katalytische Mechanismus von Dop demjenigen von PafA ähnlicher als zuvor angenommen.

Die vorgestellten Ergebnisse liefern aus verschiedenen Blickwinkeln neue und interessante Erkenntnisse zum proteasomalen Proteinabbau in Mykobakterien. Beide Teile der Arbeit liefern strukturelle Details in atomarer Auflösung und bilden daher die Grundlage für die Entwicklung neuer Medikamente, die auf der Inhibition des für die Virulenz von *Mycobacterium tuberculosis* essentiellen proteasomalen Proteinabbaus beruhen.

Abstract

Protein homeostasis is a fundamental process of life and describes the control of the protein levels and integrity of the proteome in living cells. An important part of this control process is protein degradation, where proteases digest selectively damaged or no longer needed proteins. This activity is usually carried out by compartmentalizing proteases that form reaction chambers which are under controlled access and shield the proteolytic activity from the rest of the cytosol. It was found that some actinobacteria harbor one of these macromolecular assemblies that is usually only found in eukaryotes or archaea, namely the proteasome. The proteasome consists of a proteolytic core cylinder with seven fold symmetry, also called core particle (CP), and ring-shaped regulators that associate with the CP to form the active proteasome complex. In actinobacteria two regulators, Mpa (mycobacterium proteasome ATPase) and Bpa (bacterial proteasome activator), are known, which can be distinguished by their mode of action. Bpa provides an interaction platform for partially unfolded proteins and relies on a passive, ATP-independent, further unfolding to ultimately degrade proteins. Mpa is an ATPase-driven complex that recruits proteins covalently modified with prokaryotic ubiquitin-like protein (Pup) and actively unfolds them under expense of ATP. In contrast to the well-studied Mpa only limited knowledge is available for the recently discovered Bpa.

In the first part of this thesis I solved the Bpa structure by X-ray crystallography at a resolution of 2.6 Å. The structure shows that Bpa is a dodecameric ring assembly formed by protomers with a four-helix bundle fold. The twelve C-termini bear a conserved GQYL interaction motif that protrudes on one side of the ring in order to dock onto the CP cylinder. Interestingly, the Bpa-CP interface is an example of a ring-ring interaction with a significant twelve to seven symmetry mismatch.

Protein degradation mediated by Mpa requires a post-translational modification of degradation substrates referred to as pupylation. In this process the C-terminal glutamate of the small protein Pup is attached via an isopeptide bond to a lysine

side chain of the protein substrates by the Pup ligase PafA. In some actinobacteria Pup is genetically encoded with a C-terminal glutamine that needs to be converted to glutamate prior to ligation. Dop (deamidase of Pup) is catalyzing this reaction and features in addition depupylase activity as well. PafA and Dop are paralogs with a high structural and sequence homology and they even have identical residues forming the active site. However, PafA shows stoichiometric ATP turnover along with the ligation reaction, whereas Dop needs ATP for proper function without stoichiometric turnover.

In the second part of this thesis, the puzzling question why Dop needs ATP is addressed. Using a combination of X-ray crystallography and biochemical methods it is shown that the catalytic activity of Dop depends on ADP and inorganic phosphate rather than on ATP. The inorganic phosphate acts as a nucleophile during amide bond cleavage and the overall catalytic mechanism of Dop is therefore more similar to that of PafA than previously thought.

In summary, the presented results provide new and interesting insights in the field of bacterial proteasome-mediated protein degradation from different points of view. Both parts provide structural details at atomic resolution and thus lay a foundation for the development of new drugs targeting the proteasomal protein degradation system of mycobacteria, that was shown to be essential for virulence of *Mycobacterium tuberculosis*.