



Doctoral Thesis

Characterization of a new AAA+ protein from *A. fulgidus* and functional studies on chaperone-proteasome complexes in Archaea and Eubacteria

Author(s):

Summer, Heike

Publication Date:

2006

Permanent Link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-005207512> →

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](#).

DISS. ETH NO. 16678

Characterization of a new AAA+ protein from *A. fulgidus*
and Functional Studies on
Chaperone-Proteasome Complexes in Archaea and Eubacteria

A dissertation submitted to the

SWISS FEDERAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY ZUERICH

for the degree of

Doctor of Natural Sciences

presented by

HEIKE SUMMER

Mag. rer. nat., University of Innsbruck

Born 04.10.1978

Austrian

Accepted on the recommendation of:

Prof. Eilika Weber-Ban, examiner
Prof. Rudolf Glockshuber, co-examiner

2006

Summary

This thesis is divided into two parts. The first part describes the cloning, purification and characterization of three prokaryotic chaperone-proteasome complexes, whereas the second part represents the result of the characterization of a novel AAA+ protein from *Archaeoblobus fulgidus*.

Prokaryotic Chaperone-Proteasome Complexes

We have cloned four members of ATP-dependent protease complexes from three archaea and one eubacterial source. Chaperone proteasome complexes contain a central protease part and an associated chaperone part for substrate recognition, unfolding and translocation to the protease part. The archaeal chaperone part PAN (Proteasome Activating Nucleotidase) is a member of the AAA+ superfamily (ATPases associated with various cellular activities), forms homohexameric rings, has chaperone activity and is responsible for recognition and unfolding of substrate proteins that are then translocated into the protease part. The prokaryotic proteasomes consist of two different subunits, alpha and beta, with each subunit forming homoheptameric rings. The rings stack on top of each other in an $\alpha\beta\beta\alpha$ order with two inner beta-rings and two outer alpha-rings. The proteins of the three archaea members were over-expressed in *E. coli* and purified to homogeneity. The proteasome core complexes could be reconstituted and basic measurements were performed to proof their function ability *in vitro*. Interaction between PAN and the proteasome could be shown by SsrA-tagged green fluorescent protein (GFP) degradation and peptidase activity of the proteasome was measured separately with fluorogenic peptides. As the interaction between the chaperone and proteasome is transient, no convincing results were obtained by electron microscopy or analytical size exclusion experiments.

A novel AAA+ protein from *Archaeoglobus fulgidus*

A new member of the AAA+ protein family was examined from *Archaeoglobus fulgidus*. This protein is also found in all methanogenic archaea. We named the protein ATA for archaeal triple-A ATPase. It has a monomeric molecular weight of 40'000 Dalton. We over-expressed this protein in *E. coli* and purified it to homogeneity. Like other AAA+ proteins ATA forms hexameric rings with 125 Å diameters, even in absence of ATP. The hexameric assembly state was confirmed by using sedimentation equilibrium analysis over a wide concentration range. Sequence alignments revealed homology to the AAA-domain of FtsH from bacteria, while the N-terminal domain shows homology to members of the CDC48 family of AAA+ proteins. The complex is capable to bind and hydrolyze ATP. Michaelis-Menten analysis revealed a k_{cat} of 118 min⁻¹ and a K_M of 1.4 mM at 78 °C. As *Archaeoglobus*

fulgidus is a hyperthermophilic sulphate-reducing archaea this AAA-ATPase is stable to 86 °C and the ATPase activity is maximal at this temperature.

Zusammenfassung

Diese Doktorarbeit ist in zwei Teile aufgliedert. Der erste Teil behandelt das Klonieren, Aufreinigen und die Beschreibung von prokaryontischen Chaperon-Proteasom Komplexen, waehrend der zweite Teil die Charakterisierung eines neuen AAA+ Proteins aus *Archaeoglobus fulgidus* praesentiert.

Prokaryontische Chaperon-Proteasom Komplexe

Vier Vertreter der ATP-abhaengigen Protease Komplexe wurden kloniert, drei von Archaeobakterien und ein eubakterieller. Chaperon-proteasome Komplexe bestehen aus der zentralen Protease und den assoziierten Chaperonen, welche das Substrat erkennen, entfalten und der Protease zufuehren. Das Chaperon PAN (Proteasome Activating Nucleotidase) gehoert zur Gruppe der AAA+ Proteine (ATPases associated with various cellular activities) und bildet homohexamere Ringe, zeigt Chaperon-Aktivitaet und ist fuer die Erkennung und Entfaltung von Substrat-Proteinen verantwortlich, welche dann dem Protease Teil uebergeben werden. Das prokaryontische Proteasom besteht aus zwei unterschiedlichen Untereinheiten, Alpha und Beta Untereinheiten, wobei jede Untereinheit homoheptamere Ringe bildet. Die Ringe stapeln sich aufeinander und der resultierende Holokomplex besteht aus den jeweils zwei inneren Betaringen und den auesseren Alpharingen. Die Proteine wurden in *E. coli* ueberexprimiert und aufgereinigt. Der Proteasom Komplex konnte erfolgreich zusammengesetzt und grundlegende Messungen durchgefuehrt werden, um die volle Funktion *in vitro* zu ueberpruefen. Die Peptidase Aktivitaet des Proteasomes wurde mithilfe fluorogener Peptide gemessen. Eine Interaktion zwischen PAN und dem Proteasom konnte gezeigt werden, indem der Abbau von mit SsrA-Erkennungssequenz versehenem Green fluorescent protein (GFP) gemessen wurde.

Da die Interaktion zwischen PAN und dem Proteasom transient und nicht sehr stabil ist, konnten keine ueberzeugenden Resultate von Elektronenmikroskopie oder analytischer Groessenausschlusschromatographie aufgezeigt werden.

Ein neues AAA+ Protein aus *Archaeoglobus fulgidus*

Ein neues Mitglied der AAA+ Proteinfamilie aus *Archaeoglobus fulgidus* wurde untersucht. Dieses Protein kommt ausserdem in allen methanogenen Archaeen vor. Wir benannten das Protein ATA fuer archaeale triple-A ATPase. Es hat ein monomeres Molekulargewicht von 40 kD. Die Ueberexpression in *E. coli* und

Aufreinigung waren erfolgreich. Aehnlich zu anderen AAA+ Proteinen bildet ATA hexamere Ringe mit 125 Å Durchmesser in Abwesenheit von ATP aus. Der hexamere Aufbau wurde durch Analytische Ultrazentrifugations Analysen ueber weitreichende Konzentrationsbereiche bestaetigt. Sequenzvergleiche der AAA-Domaene zeigten Homologien zu der von bakteriellem FtsH, waehrend die N-terminale Domaene Homologien zu Mitgliedern der CDC48 Familie von AAA+ Proteinen zeigte. Diese Uebereinstimmungen wiesen darauf hin, dass ATA imstande ist, ATP zu binden und zu hydrolisieren. Michaelis-Menten Analyse ergab einen k_{cat} von 118 min^{-1} und einen K_M von 1.4 mM bei 78 °C. *Archaeoglobus fulgidus* ist ein hyperthermophiler Sulfat Reduzierer, deshalb ist diese AAA-ATPase stabil bis zu 86°C mit maximaler ATPase Aktivitaet bei dieser Temperatur.

Aim of this thesis

When this work was initiated, nothing was known about the herein characterized AAA+ protein from *Archaeoglobus fulgidus* and methanogenic archaea. In order to answer some questions about the function on chaperone proteasome complexes, we cloned, purified and performed first functional studies. In this thesis I will describe and discuss the experiments that were performed in order to achieve these goals. I first give an introduction about this topic and will then describe how the experiments were done. Next, I describe the functional studies which were done on the archaeal chaperone proteasome complexes plus the eubacterial ARC complex. The final chapter presents the published work on the new described AAA+ protein. The thesis concludes with the description of future prospects of the work.