

Diss ETH 17530

**Regulation of the VCIP135 deubiquitinating activity  
within the p97 chaperone complex**

A dissertation submitted to the  
SWISS FEDERAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY ZUERICH  
for the degree of  
Doctor of Natural Science

presented by  
Stephan Zeibig  
Dipl. Biochem., Eberhard Karls University of Tübingen  
born October 30<sup>th</sup>, 1976  
citizen of Germany

accepted on the recommendation of  
Prof. Matthias Peter, examiner  
Dr. Hemmo Meyer, co-examiner  
Prof. Frauke Melchior, co-examiner

2007

## 2 Summary

The ubiquitin system is of central importance for a huge number of cellular pathways. At its center is a post-translational modification with the small protein ubiquitin that may regulate protein stability, activity or localization depending on whether a single ubiquitin or different types of ubiquitin chains are conjugated. Ubiquitination may be controlled on two levels. Whereas most research has focused on the regulation of ubiquitin ligases that conjugate ubiquitin to substrates, much less is known about regulation of deubiquitinating enzymes that remove the ubiquitin modification and thereby antagonize the ligases.

In this study, we investigated the regulation of the deubiquitinating enzyme VCIP135. VCIP135 is a member of the ovarian tumor (OTU) family of deubiquitinating enzymes that cooperates with the hexameric chaperone and ATPase p97 and its substrate adaptor p47 in reformation of the Golgi apparatus after mitosis. The p97-p47 complex is structurally well defined and can easily be reconstituted *in vitro*. Therefore, it provides an ideal subject for investigating the function of a deubiquitinating enzyme in context of a multiprotein complex.

First, we found that unlike other OTU deubiquitinating enzymes, the catalytic domain is not sufficient for deubiquitinating activity. It requires additional moieties C-terminal of the OTU domain that may represent a substrate binding site. Second, we found that p47 is central in controlling the deubiquitinating activity of the p97-p47-VCIP135 holoenzyme. Its UBA domain, which is able to bind ubiquitin, inhibits ubiquitin chain disassembly by sequestering the chains. Furthermore, a central SEP domain that is structurally related to known cysteine protease inhibitors, directly inhibits VCIP135 activity most likely by binding to its catalytic site. This is the first protein inhibitor of a deubiquitinating enzyme known until now. Our data suggest that structural changes of the p97-p47 complex upon ATP hydrolysis may dynamically regulate VCIP135 activity and coordinate it with p97 chaperone activity. Finally, we could demonstrate an analogous inhibitory effect on the OTU deubiquitinating enzyme Cezanne that is closely related to VCIP135 and therefore provide a first evidence for a general role of the p47 SEP domain as an inhibitor of OTU-type deubiquitinating enzymes.

### 3 Zusammenfassung

Das Ubiquitin-System ist von zentraler Bedeutung für eine große Anzahl zellulärer Vorgänge. Im Zentrum steht dabei die post-translationale Modifikation mit dem kleinen Protein Ubiquitin, welches die Stabilität, Aktivität und Lokalisierung von Proteinen beeinflussen kann, je nachdem ob einzelne Ubiquitin-Einheiten oder verschiedene Arten von Ubiquitin-Ketten angehängt werden. Ubiquitinierung kann hierbei auf zwei Ebenen kontrolliert werden. Während der Großteil der Forschung bisher auf die Regulation von Ubiquitin-Ligasen fokussiert war, welche Ubiquitin mit Substrat-Proteinen verknüpfen, ist weit weniger über Deubiquitinierungsenzyme bekannt, deren Aufgabe es ist Ubiquitin-Modifikationen zu entfernen und die somit antagonistisch zu Ubiquitin-Ligasen arbeiten.

In dieser Studie haben wir die Regulation des Deubiquitinierungsenzymes VCIP135 untersucht. VCIP135 ist ein Vertreter der ovarian tumor (OTU) Familie von Deubiquitinierungsenzymen und kooperiert mit dem hexameren Chaperone und ATPase p97 und seinem Substrat-Adapter p47 beim Wiederaufbau des Golgi-Apparates nach der Mitose. Der p97-p47 Komplex ist strukturell gut verstanden und kann leicht *in vitro* rekonstituiert werden. Aufgrund dessen stellt er einen idealen Gegenstand dar um die Funktion eines Deubiquitinierungsenzyms im Kontext eines Multiprotein-Komplexes zu untersuchen.

Erstens konnten wir zeigen, dass, im Gegensatz zu anderen OTU-Deubiquitinierungsenzymen, die katalytische Domäne für Deubiquitinierungsaktivität nicht ausreicht. Es werden weitere Teile C-terminal der katalytischen Domäne benötigt, welche eine Substrat-Bindedomäne darstellen könnten. Zweitens konnten wir zeigen, dass p47 von zentraler Bedeutung für die Kontrolle der Deubiquitinierungsaktivität im p97-p47-VCIP135 Holoenzym ist. Seine UBA-Domäne, welche Ubiquitin binden kann, inhibiert den Abbau von Ubiquitinketten indem es die Ketten schützt. Weiterhin inhibiert die zentrale SEP Domäne, welche strukturell mit bekannten Inhibitoren von Cystein-Proteasen verwandt ist, die Aktivität von VCIP135, wahrscheinlich durch Binden an das katalytische Zentrum. Dies ist der erste bekannte Protein-Inhibitor eines Deubiquitinierungsenzyms. Unsere Daten weisen darauf hin, dass strukturelle Änderungen innerhalb des p97-p47 Komplexes bei ATP-Hydrolyse die VCIP135 Aktivität dynamisch regulieren und mit der ATPase-Aktivität von p97 koordinieren. Schließlich konnten wir noch einen analogen inhibitorischen Effekt auf das OTU-

Deubiquitinierungsenzym Cezanne, welches nah mit VCIP135 verwandt ist, demonstrieren und liefern damit einen ersten Hinweis auf eine mögliche generelle Funktion der p47 SEP-Domäne als Inhibitor von OTU-Deubiquitinierungsenzymen.