

Structural Basis of Enzyme Encapsulation into a Bacterial Nanocompartment

A dissertation submitted to the
ETH ZÜRICH

for the degree of
Doctor of Sciences (Dr.sc.nat.)

presented by

Markus Sutter
Dipl.-Biol. ETH Zürich

born December 16, 1976
citizen of Wald (ZH)

accepted on the recommendation of
Prof. Dr. Nenad Ban, Examiner
Prof. Dr. Eilika Weber-Ban, Co-examiner
Prof. Dr. Kaspar Locher, Co-examiner

SUMMARY

Compartmentalization of enzymes confines metabolically related reactions and occurs in all domains of life. Large eukaryotic compartments are organelles such as mitochondria, lysosomes or the peroxisomes which are enclosed by lipid bilayers. On a much smaller scale, microcompartments built entirely of protein subunits have been described. A prominent example of a bacterial microcompartment is the carboxysome, which packages the enzyme ribulose bis-phosphate carboxylase oxygenase (RuBisCO) by forming polyhedral bodies. Similar microcompartments built from related shell-forming proteins, *eut* and *pdu* organelles, are also likely to package enzymes involved in metabolic reactions. Formation of cellular or molecular compartments increases the local concentration of enzymes, facilitates substrate transfer between a series of connected reactions, and sequesters potentially toxic substrates or products. Ferritin, for example, is an octahedral protein cage that oxidizes the highly toxic Fe^(II) ions and deposits them into its cavity as an insoluble ferrihydrite form. Some multienzymes and enzyme complexes, such as the pyruvate dehydrogenase complex, lumazine synthase or the fungal fatty acid synthase, form reaction chambers into which substrates can enter but other macromolecules are excluded.

A large, yet little characterized family of conserved bacterial proteins forms large molecular weight assemblies with a diameter of about 20 nm. In the literature they are referred to as linocin-like proteins based on the observation that they are abundant in the culture supernatant of *Brevibacterium linens* which exhibits bacteriostatic activity towards various strains of *Listeria*, *Corynebacterium*, *Brevibacterium*, *Arthrobacter* and *Bacillus*. A close homologue of the *B. linens* protein (58 % identity) was found in *Mycobacterium tuberculosis*. However, neither the native nor recombinant form of this protein, CFP29 (culture filtrate protein with a mass of 29 kDa), displayed bacteriostatic activity against various *Listeria* strains. In *Thermotoga maritima* the homologous protein was characterized as a homomultimeric protease. It was shown to have proteolytic activity against various small synthetic peptides. Bactericidal activity against closely related species was tested but no growth inhibition was found.

In light of the varied biochemical data regarding the function of this poorly characterized protein family we decided to study it structurally. The protein from the thermophilic organism *T. maritima* was purified, crystallized and the structure was determined by X-ray crystallography. Based on the structural information we were able to design biochemical and electron microscopic experiments to establish that these proteins, which we refer to as

encapsulins, form nanocompartments that contain ferritin-like proteins or peroxidases, both enzymes involved in oxidative stress response. We demonstrate that these enzymes are specifically targeted to the interior of encapsulins via unique C-terminal extensions. We also show that the previously proposed function as a bacteriocin is unlikely since highly purified encapsulin shows no bactericidal activity. Encapsulation occurs in the native organism, as shown by the presence of the ferritin-like protein in *T. maritima* encapsulin crystals as well as when encapsulin and its cargo protein are expressed recombinantly, as shown in the case of *B. linens* DyP peroxidase/encapsulin.

ZUSAMMENFASSUNG

Die Kompartimentierung von Enzymen gruppiert zusammengehörige Stoffwechselprozesse und kommt in allen Lebewesen vor. In eukaryotischen Organismen gibt es grosse Organellen wie Mitochondrien, Lysosomen und Peroxisomen, die von einer Lipid-Doppelschicht umgeben sind. Es gibt aber auch viel kleinere Kompartimente, die aus Proteinen aufgebaut sind, sogenannte Mikrokompimente. Das bekannteste Beispiel ist das Carboxysom, das polyedrische Körper bildet und in seinem Inneren das Enzym Ribulose-1,5-bisphosphat-carboxylase-oxygenase (RuBisCO) verpackt. Es gibt andere ähnlich aufgebaute Mikrokompimente, die auch für bestimmte Stoffwechselprozesse verantwortlich sind.

Der Vorteil der Kompartimentierung ist dass die lokalen Enzymkonzentrationen erhöht werden und die Substrate einfacher und schneller zwischen den Enzymen transportiert werden können. Es werden auch eventuell toxische Reaktionen von Substraten oder Produkten vermieden. Ferritin ist ein oktaedrischer Proteinkomplex der die höchst schädlichen $\text{Fe}^{(II)}$ Ionen oxidiert und in seinem Inneren in einer unlöslichen Ferrihydrit-Form ablagert. Viele Multienzymkomplexe, wie z.B. Pyruvatdehydrogenase, Lumazinesynthase oder die Fettsäuresynthase aus Pilzen, bilden grosse Reaktionskammern, in denen die Reaktion von Substraten katalysiert wird, aber andere grosse Moleküle ausgeschlossen werden.

Eine grosse, wenig erforschte Familie von Proteinen bildet Strukturen mit einem Durchmesser von etwa 20 nm. Sie werden in der Literatur "Linocin" genannt, weil das Protein im Kulturüberstand von *Brevibacterium linens* vorkommt, der einen bakteriostatischen Effekt auf verschiedene Stämme der Gattungen der *Listeria*, *Corynebacterium*, *Brevibacterium*, *Arthrobacter* und *Bacillus* hat. Ein naher Verwandter des *B. linens* Proteins wurde in *Mycobacterium tuberculosis* gefunden (58 % Identität). Dieses Protein (genannt CFP29, von Kulturfiltratprotein mit einer Masse von 29 kDa) zeigte aber keine bakteriostatische Aktivität

gegen Listerien, weder die nativ aufgereinigte noch die rekombinant produzierte Variante. In *Thermotoga maritima* wurde das homologe Protein als Protease charakterisiert da es proteolytische Aktivität gegen verschiedene kleine Tripeptid-Fragmente zeigte. Eine bakteriostatische Aktivität gegen nah verwandte Stämme konnte nicht nachgewiesen werden. Angesichts der unterschiedlichen biochemischen Daten bezüglich der Funktion dieser Proteine haben wir beschlossen das Protein strukturell zu untersuchen. Das Protein vom thermophilen Organismus *T. maritima* wurde nativ aufgereinigt, kristallisiert und die hochauflösende 3D Struktur bestimmt. Basierend auf dieser Struktur wurden biochemische und elektronenmikroskopische Studien durchgeführt, die beweisen dass diese Proteine, die wir Enkapsuline nennen, Nanokompartimente bilden, in deren Innerem Ferritin-ähnliche Proteine oder Peroxidasen verpackt werden, beides Enzyme, die etwas mit oxidativem Stress zu tun haben. Es wird gezeigt, dass diese Enzyme durch ihre C-terminalen Enden spezifisch an die Innenseite der Enkapsuline binden und so verpackt werden. Die früher angenommene Aktivität als Bakterizid ist sehr unwahrscheinlich ist da hoch aufgereinigtes Enkapsulin keine Aktivität zeigt. Die Enkapsulation erfolgt sowohl im nativen Organismus, wie gezeigt durch die Anwesenheit des Ferritin-ähnlichen Proteins in *T. maritima* Enkapsulin Kristallen, als auch wenn Enkapsulin und das verpackte Protein rekombinant exprimiert werden, wie gezeigt am Beispiel von *B. linens* Peroxidase/Enkapsulin.