



Doctoral Thesis

## The mycobacterial proteasome degradation pathway

**Author(s):**

Striebel, Frank Roland

**Publication Date:**

2010

**Permanent Link:**

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-006078249> →

**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 Nr. 18887

**The mycobacterial proteasome degradation pathway**

A dissertation submitted to

**ETH ZÜRICH**

for the degree of

**Doctor of Sciences**

presented by

**Frank Roland Striebel**

M.S. Biochemie, Technische Universität München (TUM)

born on August 23<sup>rd</sup>, 1979

German

accepted on the recommendation of:

Dr. Eilika Weber-Ban, examiner  
Prof. Rudi Glockshuber, co-examiner  
Prof. Bernd Bukau, co-examiner

2010

# 1 Summary/Zusammenfassung

## 1.1 Summary

Proteasomes are large cylindrical assemblies responsible for the controlled degradation of proteins. The specificity of degradation is achieved by the use of tagging systems that covalently modify substrates destined for destruction with a degradation signal. The tagged substrates are recruited to the proteasomal ATPase-rings that feed the substrates into the central proteolytic chamber under the expense of energy. Whereas the eukaryotic ubiquitin-proteasome system has been studied in detail, only recently *in vivo* evidence showed that proteasome-harboring bacteria target substrates for degradation through modification with a prokaryotic ubiquitin-like protein (Pup). Pupylated substrates are recognized by the AAA-ATPase ARC/Mpa, which leads to their unfolding and translocation into the bacterial proteasome for degradation.

In this dissertation study, the complete proteasomal tagging- and degradation-pathway of *Mycobacterium tuberculosis* is reconstituted *in vitro*, describing mechanistic properties of the involved enzymes. In the first part of the thesis, a two-step modification pathway leading to conjugation of Pup to proteasomal substrate proteins is described. The first step is performed by the previously undescribed enzyme Dop (deamidase of Pup), which is herein identified as the enzyme that catalyzes the deamidation of the C-terminal glutamine of Pup to glutamate. The deamidation is specific for the C-terminal glutamine of Pup and requires ATP as a cofactor but not its hydrolysis. Further it is shown that the second step is catalyzed by the enzyme PafA (proteasome accessory factor A), which conjugates deamidated Pup to lysine residues of proteasomal substrate proteins. This formation of an isopeptide bond requires the turnover of ATP to ADP, suggesting that deamidated Pup is activated for conjugation via phosphorylation of its C-terminal glutamate.

In the second part of the thesis it is demonstrated that the AAA-ATPase ARC/Mpa specifically unfolds pupylated substrates and that the ARC/Mpa-proteasome complex is sufficient for degradation of pupylated proteins. Using a combination of biochemical and spectroscopic methods a model is established describing the unfolding and translocation reaction. Initially, Pup is recognized by the coiled-coil domains of ARC/Mpa. Subsequently, the pupylated substrate is engaged into the ARC/Mpa-pore via the flexible N-terminal region of Pup. In this process, ARC/Mpa pulls on Pup to initiate unfolding of substrate proteins and drags them toward the proteasome chamber. Unlike the eukaryotic ubiquitin, Pup is not recycled but degraded along with the substrate. This assigns a dual role to Pup as both the ARC/Mpa recognition element as well as the threading determinant.

Taken together, both the Pup-conjugation reaction and the degradation of pupylated substrates by the ARC/Mpa-proteasome display important mechanistic differences to the eukaryotic ubiquitin system. As it was shown that the proteasome system of *M. tuberculosis* plays a role in the pathogenicity of this highly infectious bacterium, the results presented here provide a basis for future biochemical and pharmacological studies.

## 1.2 Zusammenfassung

Proteasome sind grosse, zylindrische Komplexe, die für den kontrollierten Abbau von Proteinen verantwortlich sind. Die Spezifität des Abbaus wird durch Modifikationssysteme gewährleistet, welche die zum Abbau bestimmten Proteine kovalent mit einem Abbausignal markieren. Die markierten Proteine werden zu den proteasomalen ATPase-Ringen rekrutiert, die die Substrate unter Verbrauch von Energie in die zentrale proteolytische Kammer transportieren. Während das eukaryotische Ubiquitin-Proteasom-System schon im Detail beschrieben ist, wurde erst kürzlich durch *in vivo* Belege gezeigt, dass Bakterien, die Proteasome besitzen, ihre Substrate durch eine Modifikation mit einem prokaryotischen, ubiquitinähnlichen Protein (Pup) für den Abbau markieren. Pupylierte Substrate werden von der AAA-ATPase ARC/Mpa erkannt, was zu ihrer Entfaltung und Translokation in das bakterielle Proteasom führt.

In dieser Dissertation werden der vollständige Markierungs- und Abbauweg von *Mycobacterium tuberculosis in vitro* rekonstituiert und mechanistische Aspekte der beteiligten Enzyme beschrieben. Im ersten Teil dieser Arbeit wird ein Zweistufenmechanismus vorgestellt, welcher zur Konjugation von Pup an proteasomale Substratproteine führt. Der erste Schritt wird vom bisher nicht charakterisierten Enzym Dop (*deamidase of Pup*) ausgeführt, welches im Rahmen dieser Studie als das Enzym identifiziert wird, das die Deamidierung des C-terminalen Glutamins von Pup zu Glutamat katalysiert. Die Deamidierung ist spezifisch für das C-terminale Glutamin und benötigt ATP als Kofaktor aber nicht dessen Hydrolyse. Des Weiteren wird gezeigt, dass der zweite Schritt durch das Enzym PafA (*proteasome accessory factor A*), welches deamidiertes Pup auf Lysinreste von Substratproteinen konjugiert, katalysiert wird. Diese Bildung einer Isopeptidbindung verlangt den Umsatz von ATP zu ADP, was darauf hindeutet, dass deamidiertes Pup durch Phosphorylierung des C-terminalen Glutamats aktiviert wird.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wird gezeigt, dass die AAA-ATPase ARC/Mpa spezifisch pupylierte Substrate entfaltet und dass der ARC/Mpa-Proteasom-Komplex für den Abbau von pupylierten Proteinen ausreichend ist. Durch die Kombination von biochemischen und spektroskopischen Methoden konnte ein Modell aufgestellt werden, das die Entfaltungs- und Translokationsreaktion beschreibt. Zunächst wird Pup durch die *coiled-coil*-Domänen von ARC/Mpa erkannt. Danach wird das pupylierte Substrat anhand der flexiblen N-terminalen Region von Pup in die Pore von ARC/Mpa eingefädelt. In diesem Prozess übt ARC/Mpa eine Zugkraft auf Pup aus, was zur Entfaltung des pupylierten Substrats und dessen Translokation in Richtung des Proteasoms führt. Im Unterschied zum eukaryotischen Ubiquitin wird Pup nicht wiederverwertet sondern mit dem Substrat abgebaut. Dies weist Pup eine doppelte Funktion als Erkennungselement und als Determinante für die Translokation zu.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass sowohl die Pup-Konjugationsreaktion als auch der Abbau von pupylierten Substraten durch das ARC/Mpa-Proteasom wichtige mechanistische Unterschiede zum eukaryotischen Ubiquitin-System aufweisen. Da das Proteasom-System von *M. tuberculosis* eine Rolle für die Pathogenität dieses

hochinfektösen Bakteriums spielt, legen die hier vorgestellten Resultate den Grundstein für kommende biochemische und pharmakologische Studien.