



Doctoral Thesis

## Structure and function of the deamidase/depupylase dop of the prokaryotic ubiquitin-like modification pathway

**Author(s):**

Özcelik, Dennis

**Publication Date:**

2012

**Permanent Link:**

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-007578229> →

**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. 20637

**Structure and Function of the Deamidase/Depupylase Dop of the  
Prokaryotic Ubiquitin-like Modification Pathway**

A dissertation submitted to

**ETH ZÜRICH**

for the degree of

**Doctor of Sciences**

presented by

**Dennis Özcelik**

Dipl. Biologie, Universität Tübingen

Born on March 14<sup>th</sup>, 1984

German

accepted on the recommendation of:

Prof. Eilika Weber-Ban

Prof. Nenad Ban

Prof. Rudi Glockshuber

Prof. Hauke Hennecke

2012

# 1 Summary/Zusammenfassung

## 1.1 Summary

Pupylation is a bacterial posttranslational modification system in *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*) and other actinobacteria, which shows analogies to ubiquitination. In a two-step-process, the small prokaryotic ubiquitin-like protein Pup is used to tag substrate proteins for proteasomal degradation. First, Pup's C-terminal glutamine is deamidated by Dop (deamidase of Pup) resulting in a C-terminal glutamate. Then, this version of Pup is attached via the formation of an isopeptide bond between the  $\gamma$ -carboxylate of glutamate and the  $\epsilon$ -amino group of a lysine of the target protein. This reaction is catalyzed by PafA (proteasome accessory factor A) and requires ATP turnover, in contrast to Dop activity, which requires binding of ATP but not its turnover. Finally, the pupylated substrate can be recognized by the chaperone-proteasome and is subsequently degraded.

In the first part of this thesis, the complete pupylation pathway of *Corynebacterium glutamicum* is reconstituted *in vitro*. The properties of the involved components are described and compared with the analogous proteins in *Mtb*. The corynebacterial AAA<sup>+</sup> ATPase exhibits higher selectivity toward the homologous Pup-tag in comparison to the ATPase of *Mtb* that equally well accepts heterologous Pup-tags. Further, the corynebacterial system is shown to be fully functional but, due to the absence of a proteasome in corynebacteria, it cannot be involved in proteasomal protein degradation. Remarkably, a new feature of this system was discovered by demonstrating that Dop also acts as a depupylase in the pupylation system. Dop removes Pup from substrates by specific cleavage of the isopeptide bond. This depupylation reaction can be enhanced by the unfolding activity of the proteasomal ATPase Arc.

In the second part of the thesis, the crystal structure of the depupylase/deamidase Dop from *Acidothermus cellulolyticus* is presented. Dop features a large N-terminal domain consisting of a central  $\beta$ -sheet packed against a cluster of helices, a fold characteristic for carboxylate-amine ligases, and a smaller C-terminal domain unique to PafA/Dop members. The active site is located on the concave surface of a central  $\beta$ -sheet with the nucleotide bound in a deep pocket. Structural data and mutational studies identify crucial residues for catalysis of Dop. Further biochemical experiments determine the region of Pup that interacts with Dop. Furthermore, a conserved groove leading into the active site is identified, which could play a role in Pup-binding.

Taken together, the discovery of depupylation and the structure determination of Dop display important insights into structure and function of the deamidase/depupylase of the pupylation system. As previously shown, the Pup-proteasome system plays a role in the pathogenicity of *M. tuberculosis*. Thus, the results presented here provide a good starting point for further biochemical and pharmacological studies to improve the treatment of tuberculosis in the future.

## 1.2 Zusammenfassung

Pupylierung ist ein bakterielles posttranslationales Modifikationssystem, das in *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*) und anderen Aktinobakterien vorkommt und Analogien zur Ubiquitinierung zeigt. In einem zweistufigen Prozess werden Substratproteine mittels des kleinen prokaryotischen Ubiquitin ähnlichen Proteins Pup für den Abbau durch das Proteasom markiert. Zuerst wird Pups C-terminales Glutamin durch Dop (*deamidase of Pup*) deamidiert. Diese Pup-Variante wird über eine Isopeptidbindung an ein Lysin des Zielproteins gebunden, und zwar zwischen dem  $\gamma$ -Carboxylat des Pup-Glutamats und der  $\epsilon$ -Aminogruppe des Lysinrests. Diese Reaktion wird durch PafA (*proteasome accessory factor A*) katalysiert und benötigt den Umsatz von ATP, im Gegensatz zur Dop-Aktivität, welche die Bindung aber nicht den Umsatz von ATP erfordert. Letztlich wird das pupylierte Substrat durch den Chaperon-Proteasome-Komplex erkannt und abgebaut.

Im ersten Teil der Doktorarbeit wird das vollständige Pupylierungssystem von *Corynebacterium glutamicum* *in vitro* rekonstituiert, dessen Eigenschaften beschrieben, sowie mit den entsprechenden Komponenten aus *Mtb* verglichen. Die corynebakterielle AAA<sup>+</sup> ATPase weist im Vergleich zur ATPase von *Mtb* eine höhere Selektivität gegenüber dem homologen Pup auf, während letztere gleichermaßen auch heterologe Pup-Reste erkennt. Es wird weiterhin gezeigt, dass das corynebakterielle System vollständig funktionell ist, aber da Corynebakterien kein Proteasom besitzen, kann es nicht am proteasomalen Proteinabbau beteiligt sein. Eine neue bemerkenswerte Eigenschaft dieses Systems wird mit der Entdeckung, dass Dop auch die Depupylase im Pupylierungssystem ist, beschrieben. Dop entfernt Pup durch spezifische Spaltung der Isopeptidbindung von dem Substrat. Durch die Entfaltungsaktivität der proteasomalen ATPase Arc kann diese Depupylierungsreaktion beschleunigt werden.

Im zweiten Teil wird die Kristallstruktur der Depupylase/Deamidase Dop von *Acidotherrnus cellulolyticus* vorgestellt. Dop besitzt eine grosse N-terminale Domäne, welche die charakteristische Faltung der Carboxylat-Amin-Ligasen zeigt, nämlich ein zentrales  $\beta$ -Faltblatt, das von einer Gruppe von Helices umgeben ist. Daneben gibt es noch eine kleinere C-terminale Domäne, die nur in der PafA/Dop-Familie vorliegt. Das aktive Zentrum befindet sich in der konkaven Oberfläche des  $\beta$ -Faltblatts, worin das Nukleotid in einer tiefen Tasche gebunden wird. Strukturdaten und Mutationsstudien zeigen katalytisch wichtige Reste auf. Weitere biochemische Experimente bestimmen die Pup-Region, die mit Dop wechselwirkt. Ausserdem wird eine konservierte Furche identifiziert, die zum aktiven Zentrum führt und eine Rolle in der Bindung von Pup spielen könnte.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass sowohl die Entdeckung der Depupylierung als auch die Strukturbestimmung von Dop wichtige Erkenntnisse für die Struktur und Funktion der Deamidase/Depupylase des Pupylierungssystems liefern. Da das Pupylierungssystem eine Rolle für die Pathogenität von *Mtb* spielt, bieten die hier vorgestellten Ergebnisse einen guten Ausgangspunkt für kommende biochemische und pharmakologische Studien, um zukünftig die Tuberkulose-Behandlung zu verbessern.