



Doctoral Thesis

Structural and Functional Characterization of the Prokaryotic Ubiquitin-like Protein (Pup) Ligase PafA

Author(s):

Barandun, Jonas

Publication Date:

2014

Permanent Link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-010271548> →

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. 21981

**Structural and Functional Characterization of the
Prokaryotic Ubiquitin-like Protein (Pup) Ligase PafA**

A thesis submitted to attain the degree of

DOCTOR OF SCIENCES of ETH ZURICH

(Dr. sc. ETH Zurich)

presented by

JONAS BARANDUN

Msc. Biology, ETH Zurich

born on June 13th, 1984

citizen of Switzerland

accepted on the recommendation of:

Prof. Eilika Weber-Ban

Prof. Markus Aebi

Prof. Timm Maier

2014

Summary

Pupylation, an ubiquitin-like post-translational protein modification in *Actinobacteria*, involves the covalent attachment of a 60-70 amino acid protein to a target protein. In contrast to ubiquitin, which adopts a stable fold, prokaryotic ubiquitin-like protein (Pup) is intrinsically disordered. The ligation reaction is catalyzed by a single ligase, PafA (Proteasome accessory factor A). The isopeptide linkage is formed through Pup's C-terminal residue, a glutamate, to the ϵ -amino group of a substrate lysine. Proteins modified with this tag can be recognized and degraded by the actinobacterial proteasome complex.

Proteomic studies identified hundreds of proteins modified with Pup indicating a fundamental role of this post-translational modification for protein homeostasis. In *Mycobacteria* and some other *Actinobacteria*, Pup is encoded with a C-terminal glutamine instead of a glutamate, necessitating a deamidation to prepare Pup for ligation. This reaction is carried out by Dop (deamidase of Pup), a paralog of PafA. Interestingly, this enzyme also displays depupylase activity, thus acting to counteract the ligase. The fact that the modification is reversible and some organisms possess the pupylation system but lack a proteasome, suggests other roles besides degradation.

In *Mycobacterium tuberculosis (Mtb)*, the pupylation system is critical for resistance against the nitrosative stress this pathogen encounters in the host. One reasonable explanation for this could be the controlled unfolding and degradation of damaged proteins. The fact that the Pup-proteasome pathway is essential for persistence of *Mtb* makes the entire pupylation system an attractive drug target.

In my thesis I undertook the structural characterization of the Pup ligase PafA from *Corynebacterium glutamicum*, an organism closely related to *Mtb*. In the first part, I solved the crystal structure of PafA in the presence of ADP at 2.15 Å resolution. Carrying out structure-based mutational and biochemical studies, I could identify the region of Pup that likely interacts with the ligase and could reveal crucial residues for catalysis of the enzyme. Moreover, I showed that not only the last glutamate, the point of ligation, but the entire C-terminal half of the intrinsically disordered protein Pup (about 30 amino acids) is required for ligation to substrates, as determined by activity assays with N-terminally truncated Pup variants. A conserved groove running along PafA agreed size-wise with such extensive interaction and appeared to be the most likely docking site for Pup.

In the second part of my thesis I addressed the interaction of PafA with Pup. Since crystal contacts in my first structure of PafA prevented soaking or co-crystallization under the same conditions of full length or C-terminal parts of Pup, I employed a fusion strategy to rescreen for new crystal forms that would allow me to structurally characterize the low affinity interaction between Pup and its ligase. In the fusion constructs, the prokaryotic ubiquitin-like protein was fused to the C-

terminus of PafA using differently sized linkers to on the one hand increase the local concentration and on the other assure a one to one ratio of Pup to PafA in the crystal.

With this strategy, I was able to determine the structure of the ligase in complex with the prokaryotic ubiquitin-like protein at 2.8 Å resolution. Although Pup is disordered in solution, the electron density map showed a continuous density for the last 27 amino acids when bound to PafA. Upon binding to its ligase, the C-terminal half of Pup becomes ordered forming two orthogonal helices connected by a linker. Pup binds into the conserved groove I identified as a likely interaction place in my previous structure. Along the groove Pup wraps around half of the PafA circumference with the less conserved, unbound N-terminal region of Pup pointed away from the active site and the highly conserved C-terminal end pointed into the active site. This arrangement prevents an intramolecular attack by a lysine in the flexible N-terminal region of Pup, which would proceed much faster than the intermolecular attack by the substrate lysine.

Fluorescence anisotropy-based affinity measurements with full length Pup and a truncated variant lacking the C-terminal helix helped elucidate the roles played by the two helices. The helix more distant from the active site provides most of the binding energy, while the second helix is involved in the precise positioning of the C-terminal glutamate in the active site.

PafA uses ATP to phosphorylate the C-terminal glutamate, thereby activating the side chain carbonyl-carbon for a subsequent nucleophilic attack by the substrate lysine. As the crystals were soaked with ATP resulting in a well observable difference density I could analyze the positioning of ATP with respect to Pup. The tightly bound ATP, coordinated by two magnesium ions, points its γ -phosphate towards the C-terminal glutamate. This terminal residue is in close proximity for the phosphorylation step. The penultimate di-glycine motif, also present in the eukaryotic ubiquitin, helps to reach from the Pup binding platform into the active site where the formation of the isopeptide bond occurs.

The two structures of PafA in presence of ADP and in complex with ATP and Pup provide the first insights on the pupylation system at atomic resolution and will serve as a framework for further biochemical studies. This recently discovered prokaryotic post-translational modification system is unique to *Actinobacteria*, a phylum harboring many human pathogens including *Mycobacterium tuberculosis*. The results of this study can help to find inhibitors against the Pup ligase PafA, a key player in the pupylation pathway. Further, this work supports the notion, that not only eukaryotes but also bacteria use intrinsically disordered proteins to mediate protein interactions.

Zusammenfassung

Pupylierung ist eine Ubiquitin-ähnliche post-translationale Proteinmodifikation in *Aktinobakterien*, bei der ein 60 bis 70 Aminosäuren langes Protein kovalent an ein Zielprotein angeheftet wird. Im Gegensatz zu Ubiquitin, welches eine stabile Tertiärstruktur einnimmt, ist das prokaryotische Ubiquitin-ähnliche Protein (Pup) unstrukturiert. Die Ligationsreaktion wird durch eine einzelne Ligase, PafA (Proteasome accessory factor A), katalysiert. Die Isopeptidbindung wird zwischen dem C-terminalen Glutamat von Pup sowie der ϵ -Aminogruppe eines Substrat-Lysins gebildet. Proteine, welche mit dieser Modifikation markiert sind, können durch einen aktinobakterien-spezifischen Proteasomkomplex degradiert werden.

Massenspektrometrische Studien haben hunderte von Substraten identifiziert, die mit Pup modifiziert sind. Dies deutet auf eine fundamentale Rolle dieser post-translationalen Modifikation für das Proteingleichgewicht hin. In *Mykobakterien* und einigen anderen *Aktinobakterien* wird Pup mit einem C-terminalen Glutamin anstelle des Glutamats kodiert, was eine Deamidierungsreaktion vor der Ligation erfordert. Diese Reaktion wird durch die Deamidase von Pup (Dop), einem Paralog von PafA, katalysiert. Interessanterweise zeigt dieses Enzym auch eine Depupylase-Aktivität, welche der Ligrationsreaktion entgegen wirkt. Diese Reversibilität sowie die Tatsache, dass einige Bakterien das ganze System aber kein Proteasom besitzen, ist ein Hinweis auf eine weitere Funktion dieser Modifikation neben dem Proteinabbau.

In *Mycobacterium tuberculosis (Mtb)* ist das Pupylierungssystem wichtig für die Resistenz gegen den nitrosativen Stress, welchen dieses Pathogen im Wirt antrifft. Eine mögliche Erklärung dafür ist die kontrollierte Entfaltung gefolgt vom Abbau der durch diesen Stress beschädigten Proteine. Die Tatsache, dass das Pup-Proteasom System wichtig für die Persistenz von *Mtb* ist, macht das gesamte System zu einem attraktiven Ziel für die Medikamentenentwicklung.

In meiner Doktorarbeit charakterisierte ich die Pup Ligase PafA von *Corynebacterium glutamicum*, einem mit *Mtb* nahe verwandten Organismus, strukturell. Im ersten Teil löste ich die Kristallstruktur von PafA in Gegenwart von ADP mit einer Auflösung von 2.15 Å. Mithilfe strukturbasierender Mutations- und biochemischer Studien konnte ich die Region von Pup identifizieren, die mit der Ligase interagiert. Des Weiteren konnte ich für die enzymatische Katalyse wichtige PafA Seitenketten identifizieren. Zusätzlich konnte ich zeigen, dass nicht nur das terminale Glutamat sondern die gesamte C-terminale Hälfte (30 Aminosäuren) von Pup wichtig für die Aktivität der Ligase sind. Dies wurde mit Aktivitätsmessungen unter Verwendung verschieden langer N-terminal verkürzter Pup-Varianten bestimmt. Eine konservierte Furche, welche an der PafA Oberfläche verläuft, entspricht in ihrer Länge der extensiven Interaktionsfläche (30 Aminosäuren) und ist die wahrscheinlichste Bindungsstelle für Pup.

Im zweiten Teil meiner Arbeit widmete ich mich der Untersuchung der Interaktion zwischen PafA und Pup. Da Kristallkontakte in der im ersten Teil gelösten PafA Struktur das Eindiffundieren von oder die Kokristallisation mit Pup beziehungsweise C-terminalen Fragmenten von Pup unter denselben Bedingungen verhinderten, habe ich eine Fusionsstrategie angewendet um neue Kristallformen zu erhalten, die es erlauben, die schwache Interaktion zwischen Pup und PafA zu charakterisieren. Ich fusionierte das prokaryotische Ubiquitin-ähnliche Protein über unterschiedlich lange Verbindungen mit dem C-Terminus von PafA. Diese Strategie erhöht die lokale Konzentration und gewährleistet das eins-zu-eins Verhältnis von Pup zu PafA im Kristall.

Mit dieser Strategie konnte ich die Kristallstruktur der Ligase zusammen mit dem gebundenen prokaryotischen Ubiquitin-ähnlichen Protein bei einer Auflösung von 2.8 Å lösen. Obwohl Pup in Lösung unstrukturiert ist, konnte ich eine kontinuierliche Elektronendichte für die letzten 27 Aminosäuren von Pup detektieren. Während seiner Bindung an PafA nimmt die C-terminale Hälfte von Pup Struktur an und bildet zwei orthogonale, durch einen kurzen Linker verbundene Helices aus. Dabei bindet Pup in die konservierte Furche, welche im ersten Teil meiner Arbeit als Bindungsstelle identifiziert wurde. Entlang dieser Furche umrundet Pup etwa den halben Umfang der Ligase, wobei der weniger konservierte und nicht gebundene N-terminale Teil von Pup vom aktiven Zentrum des Enzymes wegführt während das stark konservierte C-terminale Ende in das aktive Zentrum zeigt. Diese Anordnung verhindert einen möglichen intramolekularen Angriff von einem Lysin im flexiblen N-terminalen Ende von Pup, welcher viel schneller als der intermolekulare Angriff von einem Substrat Lysine erfolgen würde.

Fluoreszenzanisotropie-basierte Affinitätsmessungen mit Vollängen-Pup sowie einer nach der ersten Helix gekürzten Pup Variante ermöglichten die Funktionen der beiden Pup Helices zu erklären. Während die vom aktiven Zentrum weiter entfernte Helix die meiste Bindungsenergie bereitstellt, ist die zweite Helix in der Positionierung des C-terminalen Glutamates im aktiven Zentrum involviert.

PafA verwendet ATP um das C-terminale Glutamat zu phosphorylieren. Dabei wird die Carbonylgruppe der Seitenkette für den nachfolgenden nukleophilen Angriff durch das Substrat-Lysin aktiviert. Um Informationen zu diesem Aktivierungsschritt zu erhalten, wurden die Kristalle mit ATP behandelt, was in einer gut erkennbaren Differenzdichte resultierte. Das stark gebundene ATP, welches von zwei Magnesium Ionen koordiniert wird, richtet die γ -Phosphatgruppe auf das C-terminale Glutamat von Pup aus. Diese terminale Aminosäure befindet sich nahe beim ATP für den Phosphorylierungsschritt. Das flexible di-Glycinmotiv, welches auch im eukaryotischen Ubiquitin vorkommt, macht es möglich, dass Pup seinen terminalen Glutamatrest von der Bindungsfurche in das fast rechtwinklig dazu positionierte aktive Zentrum zeigt, wo die Isopeptidbindung ausgebildet wird.

Die beiden Kristallstrukturen von PafA, eine in Gegenwart von ADP, die zweite mit ATP und Pup, ermöglichen einen ersten Einblick in das Pupylierungssystem bei atomarer Auflösung und dienen als

Basis für zukünftige biochemische Studien. Diese erst vor kurzem entdeckte prokaryotische post-translationale Modifikation ist einzigartig für die *Aktinobakterien*, einem Stamm welcher viele Pathogene inklusive *Mycobacterium tuberculosis* einschliesst. Die Resultate dieser Studie können dabei helfen, Inhibitoren gegen die Pup Ligase PafA, einem Hauptenzym der Pupylierung, zu finden. Des Weiteren zeigt diese Arbeit, dass nicht nur Eukaryonten, sondern auch Bakterien unstrukturierte Proteine verwenden um mit Bindungspartnern zu interagieren.