



Doctoral Thesis

## Discovery and characterization of novel Pup-proteasome system interaction partners in mycobacteria

**Author(s):**

Ziemski, Michal

**Publication Date:**

2018

**Permanent Link:**

<https://doi.org/10.3929/ethz-b-000257032> →

**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. 24834

Discovery and characterization of novel  
Pup-proteasome system interaction partners  
in mycobacteria

A thesis submitted to attain the degree of

Doctor of Sciences of ETH Zurich

(Dr. sc. ETH Zurich)

presented by

Michał Ziemiński

Mag. in Biotechnology, University of Silesia

born on 23.10.1987

citizen of Poland

accepted on the recommendation of:

Prof. Eilika Weber-Ban

Prof. Rudolf Glockshuber

Prof. Julia Vorholt-Zambelli

2018

# Zusammenfassung

Kontrollierte Proteolyse ist ein wichtiger Bestandteil der Proteinhomöostase in jeder lebenden Zelle. Einerseits werden auf diesem Wege fehlerhafte oder beschädigte Proteine schnell entfernt, um keinen Schaden zu verursachen, andererseits kann sich die Zelle mit Hilfe der kontrollierten Proteolyse auch an verschiedene Umwelteinflüsse anpassen, z. B. durch Eliminierung bestimmter Transkriptionsfaktoren oder anderer Regulationsproteine und der dadurch ausgelösten, notwendigen Reaktionen in der Zelle. Um unerwünschten, zufälligen Proteinabbau zu verhindern, werden Substrate meistens vom direkten Zugang zu proteolytischen Zentren fern gehalten. In Eukaryoten kann dies durch Verwendung einer spezifischen Organelle für den Abbau von Biomolekülen erreicht werden, dem Lysosom, aber auch durch zytoplasmatische, kompartmentalisierende Proteasekomplexe. Diese fassförmigen Komplexe sind auch weit verbreitet in Bakterien anzutreffen, von denen einige zusätzlich ein Proteinabbausystem ähnlich dem der Eukaryoten besitzen – das 20S-Proteasom (das sogenannte «core particle», CP). Erst kürzlich wurde jedoch deutlich, dass der bakterielle, proteasomale Proteinabbau komplexer ist als zunächst angenommen. Bisher wurden zwei proteasomale Aktivatoren in Actinobakterien beschrieben, die direkt mit dem Proteinabbau in Verbindung stehen. Der energie-abhängige Aktivatorkomplex Mpa arbeitet zusammen mit dem 20S Proteasom über einen Abbauweg, der die post-translationale Modifikation der Zielproteine mit dem kleinen Protein Pup (prokaryotisches, ubiquitinähnliches Protein) erfordert, das von Mpa erkannt wird. Ein weniger spezifischer, Proteasom-abhängiger Abbauweg rekrutiert dagegen (partiell) entfaltete Proteine, die über den Aktivatorkomplex Bpa direkt ins Proteasom eintreten können. Wenn man bedenkt, dass ein ziemlich großer Teil der Actinobakteriengene noch keine zugewiesene Funktion hat, ist es verlockend zu spekulieren, dass noch mehr Proteasomabbau-Regulatoren identifiziert werden könnten. Ziel meiner Arbeit war es Proteine zu identifizieren, die entweder direkt am proteasomalen Proteinabbau oder indirekt an der Regulation dieses Prozesses beteiligt sind.

Im ersten Teil dieser Arbeit habe ich ein bakterielles Adenylatcyclase-Zwei-Hybrid-System (BACTH) verwendet, um eine Bibliothek von mycobakteriellen offenen Leserahmen (OLRs) auf mögliche neue Protein-Protein-Interaktionen mit dem Pup-Proteasom-System von *Mycobacterium tuberculosis* zu sichten. Dazu habe ich eine über das BACTH-Verfahren durchsuchbare Bibliothek aus einer schon existierenden DNA Bibliothek von Mtb OLRs hergestellt, indem ich die OLRs mithilfe der Gateway-Technologie in Vektoren kloniert habe, die den OLR am C- oder N-Terminus durch die

T18 oder T25 Domäne des Enzyms Adenylatzyklase verlängern. Die resultierende Bibliothek für das Durchsuchen nach Interaktoren wurde darauf getestet, ob sie alle OLRs der ursprünglichen DNA Bibliothek abdeckt, und ob sie in der Lage ist, bereits bekannte Interaktionen im Pup-Proteasom System zu detektieren. Anschliessend wurde die gesamte Bibliothek auf Wechselwirkungen mit allen Komponenten des Pup-Proteasom Genlokus durchsucht. Während die Suche mit den Pupylierungs/Depupylierungsenzymen, der Pup Ligase und der Depupylase, nur wenige Interaktionskandidaten lieferte, erhielt ich aus der Suche mit Mpa eine grosse Anzahl möglicher Interaktoren. Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass die Ligase mit ihren vielen Zielproteinen nur vorübergehend und schwach interagiert, was durch das bekanntlich breite Substratspektrum und den hohen, experimentell bestimmten KM Wert für eines der am besten untersuchten Pupylierungssubstrate unterstützt wird. Die Depupylase andererseits erkennt ihre Substrate hauptsächlich durch Pup, ein bekannter Interaktor, den das BACTH System auch detektieren kann. Mpa scheint dagegen mit vielen anderen Proteinen in der Zelle zu interagieren, von denen einige Adaptorproteine sein könnten, die an der Regulation der Proteolyse beteiligt sind, während andere vielleicht sogar Abbausubstrate sind, die ohne Pupylierung direkt erkannt werden. Weitere Studien sind nötig, um festzustellen, wie viele und welche dieser Wechselwirkungen physiologisch relevant sind.

Der zweite Teil der Dissertation konzentriert sich auf eine bestimmte mycobakterielle AAA+ ATPase mit Homologie zur eukaryontischen ATPase Cdc48, welche wir Cpa (Cdc48-like protein of Actinobacteria) genannt haben. Mithilfe biochemischer und biophysikalischer Analysen zeige ich, dass Cpa in Anwesenheit von Nukleotid einen homohexameren Ring bildet, dessen Assemblierung bei niedriger Ionenstärke begünstigt und bei hoher Ionenstärke gehemmt ist. Darüber hinaus zeigen meine Ergebnisse, dass Cpa in seinem assemblierten Zustand mit dem 20S Proteasom interagieren kann, was es zum dritten identifizierten Proteasominteraktor macht. In einem Versuch, potentielle Substrate des Cpa-20S-Komplexes zu finden, generierte ich einen cpa-Deletions-Stamm des nicht-pathogenen Verwandten von Mtb, *Mycobacterium smegmatis*, und verglich das Proteom des Wildtyp-Stamms mit dem des cpa-Deletions-Stamms. Die erhaltenen Ergebnisse zeigten, dass im cpa-Deletions-Stamm bei Mangel einer Kohlenstoffquelle im Wachstumsmedium viele Proteine, die an der Transkription beteiligt sind, sowie ribosomale Strukturkomponenten akkumulieren. Dies könnte darauf hindeuten, dass Cpa unter diesen Bedingungen direkt oder indirekt an der Regulation der Transkription und/oder Translation beteiligt ist.

## Summary

Controlled proteolysis is an important element of protein homeostasis in any living cell. On the one hand, it ensures that aberrant and damaged proteins will be quickly removed in order to avoid any damage, but at the same time it helps the cell to adapt to various environmental pressures by e.g. eliminating certain transcription factors or other regulatory proteins and therefore activating the required responses. In order to prevent harmful, random protein degradation, proteolytic sites are most of the time sequestered from direct access to their substrates. In eukaryotes, this can be achieved by dedicating a specific organelle, the lysosome, for degradation but also by using cytoplasmic self-compartmentalized proteases. Those barrel-like assemblies are also widely encountered in bacteria, some of whom additionally possess the eukaryotic-like protein degradation machinery – the 20S proteasome. Only recently, however, it has become more apparent that bacterial proteasomal protein degradation may be more complex than initially thought. Two proteasomal activators have been described thus far to exist in actinobacteria, where they were also directly implicated in protein degradation. The energy-dependent activator Mpa acts together with the 20S particle through a pathway requiring posttranslational modification with the small protein Pup (prokaryotic ubiquitin-like protein) recognized by Mpa. A less specific proteasomal degradation pathway recruits poorly structured proteins that just enter the alternative activator-proteasome complex (Bpa-20S) directly. Considering that a rather big fraction of actinobacterial genes still has no assigned function, it is tempting to speculate that other proteasomal degradation regulators could still be identified. In this work I attempted to screen for potential interactor proteins involved either directly in proteasomal protein degradation or indirectly in regulation of this process. In the first part of this thesis I applied a bacterial adenylate cyclase two-hybrid system to screen a library of mycobacterial open reading frames (ORF) for potential new protein-protein interactions in the Pup-proteasome system of *Mycobacterium tuberculosis*. I generated the screen library from an existing Mtb ORF DNA library by subcloning it into vectors designed to extend the ORF either C- or N-terminally with the T18 or T25 domains of the adenylate cyclase using the Gateway technology. The resulting library for interaction screening was tested for coverage of all ORFs from the original library and was assessed for its ability to pick up already known interactions within the Pup-proteasome system. Subsequently, full library screens were carried out with all components of the Pup-proteasome gene locus. While screening of the

enzymes involved in pupylation/depupylation, the Pup ligase and the depupylase, did not return many new candidate interactors, the screen on the proteasome activator Mpa returned many potential interactors. This finding suggests that the ligase interacts with its many pupylation targets only transiently and weakly, which is supported by its broad substrate specificity and the high  $K_M$  value reported for one of the best-characterized pupylation substrates. The depupylase on the other hand mostly recognizes its targets via Pup, a known interactor that was picked up in the screen. Mpa, on the other hand, seems to interact with many proteins, some of which could be adaptor proteins involved in regulating degradation, while others might even represent substrates recognized in the absence of a Pup tag. It remains to be established how many of the identified interactions are physiologically relevant.

The second part of the thesis focuses on one particular mycobacterial AAA+ family ATPase homologous to eukaryotic Cdc48, which we have termed Cpa (Cdc48-like protein of *Actinobacteria*). Using biochemical and biophysical analysis I demonstrate that in the presence of nucleotide Cpa assembles into a homo-hexameric ring, a process strongly encouraged by an increase of ionic strength. I further show that in its assembled state Cpa can interact with the 20S proteasomal core, thereby making it the third known interactor of the actinobacterial proteasome. In an attempt to find potential substrates of the Cpa-20S complex, I generated a *cpa*-knockout strain of the non-pathogenic relative of Mtb, *Mycobacterium smegmatis*, and compared the proteome of the parent strain with the proteome of the *cpa* knockout strain. The obtained results revealed that during nutrient limitation many proteins involved in transcription as well as ribosome structural components accumulate in the knockout cells. This might indicate that Cpa is, directly or indirectly, involved in the regulation of transcription and/or translation under starvation conditions.