

DISS. ETH NO. 29922

DNA damage response systems and the
Pup-proteasome pathway in
Mycobacterium smegmatis

A thesis submitted to attain the degree of
DOCTOR OF SCIENCES of ETH ZURICH
(Dr. sc. ETH Zurich)

presented by
Lena Maria Leone Keller

M.Sc. in Biology, LUDWIG-MAXIMILIANS UNIVERSITY MUNICH

born on *17.03.1995*

accepted on the recommendation of
Prof. Dr. Eilika Weber-Ban
Prof. Dr. Michael Bott
Prof. Dr. Peter Sander
Prof. Dr. Julia Vorholt

2024

SUMMARY

Transcriptional regulation is an essential process which allows cells to reprogram the production of new proteins in response to changing environments and stress conditions. On the other hand, controlled protein degradation removes existing cellular proteins as a means of protein quality control and to overcome certain stresses. This thesis highlights both transcriptional regulation and regulated protein degradation in the context of mycobacterial stress responses.

WYL domain-containing proteins are known to play crucial roles in bacterial stress responses. For instance, the mechanistically well-characterized WYL transcription factor PafBC is the global activator of the DNA damage response in mycobacteria and co-regulates the canonical SOS response. Some WYL transcription factors have been identified as repressors of bacterial immunity systems. My thesis research focused on another homologous WYL domain-containing protein in *Mycobacterium smegmatis*, which I have designated as the “stress-involved WYL domain-containing regulator” or SiwR, based on my experimental findings.

I found that SiwR forms homodimers and is primarily present in rapidly-growing mycobacteria. It co-localizes with two genes from the DinB/YfiT-like putative metalloenzymes superfamily, specifically *msmeg_1357* and *msmeg_1356*. My investigation demonstrated that SiwR binds the promoter region of these two genes, with the binding being mediated by the N-terminal HTH domain. Moreover, I provided experimental evidence showing that SiwR functions as a transcriptional activator, leading to the upregulation of *msmeg_1357* and *msmeg_1356* in response to DNA damaging agents such as zeocin or oxidative stress caused by H₂O₂. This upregulation was found to be

dependent on the ability of SiwR to bind nucleic acids with single-stranded regions through its WYL domain. Despite activating its target genes in response to genotoxic agents, deletion of *siwR* is not lethal even upon treatment of the cells with mitomycin C, zeocin or H₂O₂. This lack of a phenotype can be attributed to redundancy in the stress response and the presence of a high number of DinB/YfiT-like putative metalloenzymes superfamily genes in rapidly-growing mycobacteria.

Pupylation is a post-translational modification present in all mycobacteria, including the deadliest human pathogen, *M. tuberculosis*. Similar to ubiquitination in eukaryotes, this process involves the post-translational modification of substrate proteins with the small prokaryotic ubiquitin-like protein Pup. Pupylated proteins, are recognized by the mycobacterial proteasome ATPase Mpa, which forms a complex with the 20S proteasome. Mpa unfolds the pupylated proteins and translocates them into the proteolytic chamber to be degraded. The genes encoding the Mpa-proteasome, Pup and the pupylation enzymes are found close together in the genome in a locus referred to as the Pup-proteasome system (PPS) gene locus. Studies have reported the significance of the PPS for nitrogen recycling and the response of the bacterium to nitric oxide stress and DNA damage. Research involving *M. tuberculosis* mouse infection models demonstrated the importance of pupylation and the 20S proteasome in virulence and persistence. To explore the role of the PPS in mycobacteria, here, I generated a Δpps strain in *M. smegmatis*. My findings revealed that this system plays an important role in overcoming unfavorable growth conditions while no phenotype can be observed in nutrient-rich media. I conducted a whole proteome quantification experiment to further investigate one of the growth defects I had identified.

In summary, my doctoral thesis expands our understanding of mycobacterial WYL domain-containing proteins, with a specific focus on SiwR as a transcriptional activator involved in genotoxic stress responses. Additionally, I have examined the role of the PPS in the presence of different nutrients, shedding light on its importance during nutrient limitation. My research approach encompassed a diverse range of techniques, including biochemical and *in vivo* methods, to unravel the mechanisms underlying these stress response systems.

ZUSAMMENFASSUNG

Transkriptionelle Regulation ist ein wesentlicher Prozess, der Zellen ermöglicht, die Produktion neuer Proteine als Reaktion auf sich verändernde Umgebungen und Stressbedingungen umzuprogrammieren. Andererseits entfernt kontrollierter Proteinabbau bereits vorhandene zelluläre Proteine als Mittel zur Qualitätskontrolle von Proteinen und um bestimmten Stressbedingungen zu begegnen. Diese Dissertation hebt sowohl die transkriptionelle Regulation als auch den regulierten Proteinabbau im Kontext der Stressantworten von Mykobakterien hervor.

Proteine mit WYL-Domänen spielen eine entscheidende Rolle in bakteriellen Stressantworten. Zum Beispiel ist der mechanistisch gut charakterisierte WYL-Transkriptionsfaktor PafBC der globale Aktivator der DNA-Schadensantwort in Mykobakterien und co-reguliert die kanonische SOS-Antwort. Einige WYL-Transkriptionsfaktoren wurden als Repressoren bakterieller Immunitätssysteme identifiziert. Meine Arbeit konzentrierte sich auf ein weiteres homologes Protein mit WYL-Domäne in *Mycobacterium smegmatis*, das ich aufgrund meiner experimentellen Befunde als "stressinvolvierten WYL-domänenhaltigen Regulator" oder SiwR bezeichnet habe.

Ich fand heraus, dass SiwR Homodimere bildet und hauptsächlich in schnell wachsenden Mykobakterien vorhanden ist. Das SiwR-Gen colokalisiert mit zwei Genen aus der DinB/YfiT-ähnlichen putativen Metalloenzym-Superfamilie, nämlich *msmeg_1357* und *msmeg_1356*. Meine Untersuchung zeigte, dass SiwR an den Promotorbereich dieser beiden Gene bindet, wobei die Bindung durch die N-terminale HTH-Domäne vermittelt wird. Darüber hinaus lieferte ich experimentelle Evidenz dafür, dass SiwR als transkriptioneller Aktivator fungiert, was

zu einer Hochregulierung von *msmeg_1357* und *msmeg_1356* als Reaktion auf DNA-schädigende Mittel wie Zeocin oder oxidativen Stress durch H_2O_2 führt. Diese Hochregulierung hängt von der Fähigkeit von SiwR ab, Nukleinsäuren mit einsträngigen Regionen über seine WYL-Domäne zu binden. Trotz der Aktivierung seiner Zielgene als Reaktion auf genotoxische Mittel ist die Deletion von SiwR nicht letal, selbst bei Behandlung der Zellen mit Mitomycin C, Zeocin oder H_2O_2 . Der fehlende Phänotyp kann auf Redundanz in der Stressantwort und auf die hohe Anzahl von Genen der DinB/YfiT-ähnlichen putativen Metalloenzym-Superfamilie in schnell wachsenden Mykobakterien zurückgeführt werden.

Pupylierung ist eine posttranslationale Modifikation, die in allen Mykobakterien, einschließlich des gefährlichsten menschlichen Krankheitserregers, *M. tuberculosis*, vorkommt. Ähnlich wie bei der Ubiquitinierung in Eukaryoten beinhaltet dieser Prozess die posttranslationale Modifikation von Substratproteinen mit dem kleinen prokaryotischen ubiquitinähnlichen Protein Pup. Pupylierte Proteine werden vom mykobakteriellen Proteasom-ATPase Mpa erkannt, der eine Einheit mit dem 20S-Proteasom bildet. Mpa entfaltet die pupylierten Proteine und transportiert sie in die proteolytische Kammer, um abgebaut zu werden. Die Gene, die für das Mpa-Proteasom, Pup und die Pupylierungsenzyme kodieren, befinden sich eng beieinander im Genom in einem Locus, der als Pup-Proteasom-System (PPS) bezeichnet wird. Studien haben die Bedeutung des PPS für die Stickstoffrückgewinnung und die Reaktion des Bakteriums auf Stickoxidstress und DNA-Schäden herausgestellt. Forschungen zu *M. tuberculosis*-Mausinfektionsmodellen haben die Bedeutung der Pupylierung und des 20S-Proteasoms für Virulenz und Persistenz gezeigt. Um die Rolle des PPS in Mykobakterien zu untersuchen, habe

ich hier einen Δpps -Stamm in *M. smegmatis* generiert. Meine Ergebnisse zeigten, dass dieses System eine wichtige Rolle bei der Überwindung ungünstiger Wachstumsbedingungen spielt, während kein Phänotyp in nährstoffreichen Medien beobachtet werden kann. Ich führte ein ganzes Proteom-Quantifizierungsexperiment durch, um eine der identifizierten Wachstumsdefekte weiter zu untersuchen. Zusammenfassend erweitert meine Doktorarbeit unser Verständnis von mykobakteriellen WYL-Domänen-Proteinen, wobei ein besonderer Fokus auf SiwR als transkriptionellem Aktivator in Stressantworten auf genotoxischen Stress liegt. Darüber hinaus habe ich die Rolle des PPS in Anwesenheit unterschiedlicher Nährstoffe untersucht und dabei seine Bedeutung während Nährstoffmangel beleuchtet. Mein Forschungsansatz umfasste eine Vielzahl von Techniken, einschließlich biochemischer und *in vivo*-Methoden, um die Mechanismen dieser Stressantwortssysteme zu entschlüsseln.