

DISS. ETH NO. 30562

**STRUCTURAL AND FUNCTIONAL STUDIES OF THE MYCOBACTERIAL
PROTEASOME AND TWO AAA+ PROTEASOMAL REGULATORS**

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

presented by

MIKHAIL KAVALCHUK

Specialist Chemist, Lecturer in Chemistry, Lomonosov Moscow State University

born on 07.10.1993

accepted on the recommendation of

Prof. Eilika Weber-Ban (examiner)
Prof. Rudolf Glockshuber (co-examiner)
Prof. Markus Seeger (co-examiner)

2024

Summary

Proteostasis, the correct balance between protein production, folding, and degradation, is crucial for the survival of all living organisms due to its role in maintaining cellular function and responding to external stimuli. Protein degradation or proteolysis is destructive by nature and must be tightly regulated. Regulated proteolysis is often carried out by compartmentalizing proteases, in which the proteolytic site is physically sequestered and can only be accessed via a specific degradation signal. A prominent example is the proteasome, a barrel-shaped molecular machine found in eukaryotes, archaea, and actinobacteria. The latter group includes the successful human pathogen *Mycobacterium tuberculosis*, where proteasomal degradation supports survival of the pathogen inside the host. Like its eukaryotic homolog, the bacterial proteasome requires energy-dependent regulator complexes belonging to the family of ATPases associated with diverse cellular activities (AAA+) to process native cellular substrates. One of these complexes, mycobacterial proteasomal ATPase (Mpa) recognizes and unfolds proteins post-translationally modified with the prokaryotic ubiquitin-like protein (Pup). In my dissertation research, I investigated the molecular basis of the interactions between the proteasome, its AAA+ partner Mpa, and pupylated substrates. In addition, I examined the structure and function of a more recently identified alternative AAA+ partner of the proteasome – Cdc48-like protein of actinobacteria (Cpa).

In the first part of this study, I used single-particle cryogenic electron microscopy (cryo-EM) to determine the structure of Mpa in complex with the 20S proteasome core particle during the early stage of pupylated substrate recruitment. Two distinct states of Mpa were resolved, revealing a helical arrangement of Mpa subunits around the translocating substrate chain. This agrees with the “hand-over-hand” model of sequential ATP hydrolysis and substrate translocation, in which subunits transition from the bottom to the top position in the spiral staircase upon ATP hydrolysis and nucleotide exchange. The Mpa pore loop-1 residue F341 was found to interact with the substrate chain in a manner typical for AAA+ unfoldases, while the highly conserved pore loop-1 residue K340 was shown to play a role in intersubunit communication. The structure identified additional elements stabilizing the Mpa-proteasome interaction: the Mpa β -hairpin loop and charged residues in the helices of the proteasomal α -subunit surrounding the proteasomal substrate entry gate. The functional significance of these interactions was confirmed both *in vitro* and *in vivo* using *Mycobacterium smegmatis* cells under DNA damage stress, a condition that induces active proteasomal degradation in Mycobacteria.

The second part of the thesis focuses on the structural and functional characterization of Cpa – a proteasomal interactor featuring two AAA+ modules (D1 and D2). The structure of the Cpa hexameric ring from *Rhodococcus erythropolis* was resolved by means of single-particle cryo-EM. A helical arrangement of the subunits around a peptide chain in the central channel was observed, suggesting that the molecular machine was captured during substrate translocation. Several nucleotide-binding states were observed in different Cpa protomers, likely reflecting different substrate-binding status of their D2 modules. In contrast to eukaryotic homologs, Cpa exclusively contained ADP in all the D1 nucleotide-binding sites, which may be of functional importance. Furthermore, two residues potentially involved in intersubunit signaling during ATP hydrolysis were identified through comparison between the protomers in the ring. Finally, the interactome of *M. smegmatis* Cpa was explored. Several promising interactor candidates were identified and the involvement of Cpa in pupylated substrate processing was ruled out.

Zusammenfassung

Die zelluläre Proteostase, das fein abgestimmte Gleichgewicht zwischen der Produktion, Faltung und dem Abbau von Proteinen, ist für das Überleben aller Lebewesen von entscheidender Bedeutung. Sie spielt eine wesentliche Rolle bei der Aufrechterhaltung der Zellfunktionen und der Reaktion auf äußere Reize. Der Proteinabbau (Proteolyse) ist von Natur aus destruktiv und muss daher streng reguliert werden. Häufig erfolgt die regulierte Proteolyse durch sogenannte kompartimentierende Proteasen, bei denen das proteolytisch aktive Zentrum physisch sequestriert ist und nur von Substraten mit einem spezifischen Abbausignal erreicht werden kann. Ein prominentes Beispiel hierfür ist das Proteasom, eine tonnenförmige molekulare Maschine, die in Eukaryoten, Archaeen und Actinobakterien vorkommt. Zu dieser letzten Gruppe gehört auch der erfolgreiche menschliche Krankheitserreger *Mycobacterium tuberculosis*, bei dem der proteasomale Abbau das Überleben im Wirt unterstützt.

Wie sein eukaryotisches Homolog benötigt das bakterielle Proteasom energieabhängige Regulator-Komplexe der AAA+ (ATPase assoziiert mit einer Vielzahl zellulärer Aktivitäten) Familie, um native zelluläre Substrate zu verarbeiten. Einer dieser Komplexe, die mykobakterielle proteasomale ATPase (Mpa), erkennt und entfaltet Proteine, die post-translational mit dem prokaryotischen Ubiquitin-ähnlichen Protein (Pup) modifiziert wurden. In meiner Dissertation untersuchte ich die molekularen Grundlagen der Wechselwirkungen zwischen dem Proteasom, seinem AAA+-Partner Mpa und pupylierten Substraten. Darüber hinaus habe ich die Struktur und Funktion eines erst kürzlich identifizierten alternativen AAA+-Partners des Proteasoms – des Cdc48-ähnlichen Proteins der Actinobakterien (Cpa), erforscht.

Im ersten Teil dieser Studie habe ich die Einzelpartikel-Kryo-Elektronenmikroskopie (Kryo-EM) verwendet, um die Struktur von Mpa im Komplex mit dem 20S-Proteasom-Kernpartikel während der frühen Phase der Rekrutierung von pupyliertem Substrat zu bestimmen. Dies steht im Einklang mit dem "Hand-über-Hand"-Modell der sequentiellen ATP-Hydrolyse und Substrattranslokation, bei dem Untereinheiten unter ATP-Hydrolyse und Nukleotidaustausch von der unteren in die obere Position der spiralförmigen Treppe übergehen. Es wurde festgestellt, dass der Mpa-Porenschleifenrest F341 mit der Substratkette auf eine Weise interagiert, die für AAA+-Unfoldasen charakteristisch ist, während der hochkonservierte Porenschleifenrest K340 eine Rolle bei der Kommunikation zwischen den Untereinheiten spielt. Die Struktur identifizierte zudem zusätzliche Elemente, die die Mpa-Proteasom-Interaktion stabilisieren: eine β -Haarnadel-Schleife in Mpa sowie geladene Reste in den Helices der Proteasom- α -Untereinheiten, die die Eingangspore des Proteasoms umgeben. Die funktionale Bedeutung dieser Interaktionen wurde

sowohl *in vitro* als auch *in vivo* in unter DNA-Stress kultivierten *Mycobacterium smegmatis*-Zellen bestätigt, einer Bedingung, die den aktiven proteasomalen Abbau in Mykobakterien induziert.

Der zweite Teil der Dissertation konzentriert sich auf die strukturelle und funktionale Charakterisierung von Cpa – einem proteasomalen Interaktor mit zwei AAA+-Modulen (D1 und D2). Die Struktur des hexameren Cpa-Rings von *Rhodococcus erythropolis* wurde mittels Einzelpartikel-Kryo-EM aufgelöst. Es wurde eine spiralförmige Anordnung der Untereinheiten um eine Peptidkette im zentralen Translokations-Kanal beobachtet, was darauf hindeutet, dass die molekulare Maschine während der Substrattranslokation erfasst wurde. Mehrere Nukleotid-Bindungszustände wurden in den verschiedenen Cpa-Protomeren beobachtet, die wahrscheinlich den unterschiedlichen Substrat-Bindungsstatus ihrer D2-Module widerspiegeln. Im Gegensatz zu eukaryotischen Homologen enthielt Cpa ausschließlich ADP in allen D1-Nukleotid-Bindungsstellen, was von funktionaler Bedeutung sein könnte. Darüber hinaus wurden durch Vergleiche zwischen den Protomeren im Ring zwei Reste identifiziert, die möglicherweise an der Signalübertragung zwischen den Untereinheiten während der ATP-Hydrolyse beteiligt sind. Schließlich wurde das Interaktom von *M. smegmatis* Cpa untersucht, wobei mehrere vielversprechende Interaktionspartner identifiziert und die Beteiligung von Cpa an der Verarbeitung pupylierter Substrate ausgeschlossen wurden.