

Abstract

Ubiquitin is a key regulator of countless cellular processes in eukaryotic cells by its conjugation to substrate proteins as a post-translational modifier. Proteases belonging to seven well-established families of deubiquitinating enzymes (DUBs) counteract ubiquitination and thereby keep a tight control over the ubiquitin system. Apart from eukaryotes, pathogenic bacteria and viruses have been known to encode their own deubiquitinating enzymes, in order to interfere with the host's most important signaling networks upon infection, thereby increasing their own replication and proliferation rate within the host cell. Most viral and bacterial DUBs belong to one of six known and structurally distinct families of CA clan cysteine proteases, while others are grouped into the CE clan, which also comprises eukaryotic proteases for the ubiquitin-like modifiers SUMO and NEDD8. One special case is an often-overlooked DUB family found in the tegument structure of herpesviruses, from which they derived the name of 'tegument DUBs'.

This study focused on the structural and biochemical characterization of tegument-like deubiquitinases after their bioinformatical identification in multiple organisms outside of herpesviruses. It could be demonstrated that transposon-derived candidates found in the genome of *Danio rerio* are closely related to the characterized viral representatives and share their proteolytic activity for NEDD8 as well as ubiquitin with preference for K11-, K48- and K63-linkages. In contrast, other tegument-like DUBs from bacteria and eukaryotes did not hydrolyze NEDDylation sites. Instead, they show a high specificity for certain ubiquitin linkages: K63 specificity in case of WadT2 and K6-specificity in case of all the other tested bacterial and eukaryotic tegument DUBs. The crystal structures of transposon-encoded DanT2 as well as bacterial WadT1 were solved during this study and highlighted that the fold of tegument DUBs is conserved throughout different species albeit their specificity is not, indicating functional differences. The structures allowed the identification of different interaction interfaces in the two aforementioned proteases potentially explaining the switch in substrate specificity of the two different subgroups of tegument DUBs. Furthermore, the alignment of the newly solved structures of DanT2 and WadT1 highlighted the close relationship of tegument DUBs to bacterial YopT-like proteases. Both families adopt an almost identical fold with a striking difference in the localization of their catalytic histidine within their respective active sites that justifies their classification as two distinct protease families.

Taken together, the results of this study identified multiple new tegument-like deubiquitinases that are distributed throughout multiple kingdoms of life. This proves that this DUB family is not exclusively found in herpesviruses and much wider distributed than initially anticipated.

Kurzzusammenfassung

Ubiquitin ist durch seine Konjugation an Substratproteine als posttranslationale Modifikation einer der Hauptregulatoren unzähliger zellulärer Prozesse. Proteasen von sieben verschiedenen und fest-etablierten Familien von Deubiquitinasen (DUBs) wirken der Ubiquitinierung entgegen und halten damit das Ubiquitinsystem unter strikter Kontrolle. Es ist schon länger bekannt, dass abseits von Eukaryonten auch pathogene Bakterien und Viren für eigene Deubiquitinasen codieren, um durch deren Expression die wichtigsten zellulären Signalnetzwerke ihres Wirts nach der Infektion zu stören und damit ihre eigene Replikation und Ausbreitung zu optimieren. Die meisten viralen und bakteriellen DUBs können zu einer der sechs bekannten und strukturell unterschiedlichen Familien von CA Clan Cysteinproteasen zugeordnet werden oder gehören zum CE Clan, der zum großen Teil verschiedene Cysteinproteasen mit Spezifität für Ubiquitin-ähnliche Protein enthält. Ein spezieller Fall ist die oft übersehene CA Clan DUB-Familie der Tegument-Deubiquitinasen, die ursprünglich in der gleichnamigen Struktur von Herpesviren gefunden wurde. Diese Arbeit fokussiert sich auf die strukturelle und biochemische Charakterisierung von Tegument-ähnlichen Deubiquitinasen, nach deren bioinformatischer Identifikation in mehreren Organismen abseits von Herpesviren. Es konnte gezeigt werden, dass Kandidaten, die in Transposonregionen im Genom von *Danio rerio* gefunden wurden, nahe mit den schon charakterisierten viralen Tegumentproteasen verwandt sind und deren proteolytische Aktivität für NEDD8 und Ubiquitin mit Präferenz für K11-, K48- und K63-Verknüpfungen teilen. Im Gegensatz dazu hydrolysierten die bakteriellen und eukaryotischen Vertreter keine NEDDylierung. Stattdessen zeigten sie eine hohe Spezifität für bestimmte Ubiquitinketten: K63-Spezifität für WadT2 und K6-Spezifität für alle anderen getesteten Deubiquitinasen aus Bakterien und Eukaryonten. Die Kristallstrukturen von transposon-kodiertem DanT2 sowie von bakteriellem WadT1 wurden in dieser Studie gelöst und verdeutlichen, dass die Faltung von Tegument-Deubiquitinasen verschiedener Spezies stark konserviert ist, auch wenn ihre Spezifität abweicht und funktionelle Unterschiede vermuten lässt. Die Strukturen gaben Aufschluss über verschiedene Interaktionsoberflächen der beiden Proteasen, die möglicherweise eine Erklärung für den Wechsel der Substratspezifität der beiden Subgruppen von Tegumentproteasen darstellen. Der Strukturvergleich von DanT2 und WadT1 zeigte darüber hinaus, die enge Verwandtschaft der Tegument-DUBs mit den YopT-Proteasen. Beide Familien nehmen eine fast identische Faltung ein, die sich nur in der Position des katalytischen Histidins im jeweiligen aktiven Zentrum stark unterscheiden, was eine Klassifizierung der Tegumentproteasen als eine eigenständige Familie rechtfertigt. Zusammengefasst identifizierte diese Arbeit mehrere neue Tegument-ähnliche Deubiquitinasen, die über mehrere verschiedene Spezies verbreitet sind. Dies zeigt, dass diese DUB-Familie nicht exklusiv in Herpesviren auftritt, sondern deutlich weiter verbreitet ist, als bisher vermutet wurde.