

The destructive force of large bacterial metallo-proteinases – A structural study of FtsH and ZmpC

by Julia Charl, Institute for Biochemistry, Math. Nat. Faculty

Zusammenfassung

Große bakterielle Metalloproteasen sind für eine Vielzahl physiologischer und pathogener Prozesse unerlässlich, jedoch sind Informationen über ihre strukturellen und mechanistischen Eigenschaften bislang nur unvollständig. In dieser Dissertation untersuche ich FtsH, ein universell in Eukaryoten und Bakterien vorhandenes Protein, sowie ZmpC, einen Virulenzfaktor aus *Streptococcus pneumoniae*. Um tiefere Einblicke in ihre Funktion zu gewinnen, analysierte ich ihre Strukturen und proteolytischen Eigenschaften. Die membrangebundene AAA+-Protease FtsH, die in *Escherichia coli* aufgrund ihrer Regulation der Synthese von Lipopolysacchariden essenziell ist, veranschaulicht die komplexe Kopplung von ATP-Hydrolyse-getriebener Translokation an die Proteolyse. Obwohl bereits mehrere Strukturen der löslichen katalytischen Region veröffentlicht wurden, blieb die Struktur des Volllängen-Konstrukts, insbesondere in Bezug auf die Anordnung des ATPase-Rings, lange unklar. Hier präsentiere ich drei Kryo-EM-Strukturen von *Aquifex aeolicus* FtsH in Volllänge, jeweils gebunden an ATP, ADP und AMP-PNP. Diese zeigen eine asymmetrische, spiralförmige Anordnung der ATPase-Domäne, ähnlich der homologen YME1 Protease, aus der sich eine koordinierte Untereinheitenbewegungen in einem sequenziellen Hydrolysezyklus ableiten lässt, der die Substrattranslokation antreibt. Parallel dazu illustriert die extrazelluläre Metalloprotease ZmpC aus *Streptococcus pneumoniae*, welche ein Virulenzfaktor ist, der extrazellulären Matrixproteine des Wirts degradiert, eine weitere Facette der bakteriellen proteolytischen Vielfalt. Eine Kryo-EM-Struktur der Peptidasedomäne von katalytisch inaktivem ZmpC, gebunden an ein Peptid aus seinem Substrat MMP-9, wurde gelöst und zeigte dynamische Öffnungs- und Schließbewegungen einer β -Helix, was einem potenziellen Gating-Mechanismus der homologen IgA1-Protease ähnelt. Ich identifizierte die genaue Schnittstelle in der flexiblen, O-glykosylierten Linkerregion von MMP-9, die durch ZmpC gespalten wird, und analysierte die proteolytische Spezifität von ZmpC. Zwar ließ sich keine eindeutige Konsensussequenz für die Substraterkennung durch ZmpC feststellen, jedoch könnte die G5-Domäne von ZmpC

an der Erkennung des O-Glykosylierungsmusters beteiligt sein. Zusammengenommen erweitern diese Studien das strukturelle Verständnis bakterieller Metalloproteasen in membrangebundenen und extrazellulären Kontexten und verdeutlichen sowohl konservierte Prinzipien koordinierter Domänenbewegungen als auch unterschiedliche Strategien zur Substraterkennung und -verarbeitung.

Abstract

Large bacterial metalloproteases are a requirement for diverse physiological and pathogenic processes, yet structural and mechanistic information about them remain incompletely understood. In this thesis, I will shed light onto FtsH, a universal protein found in all organisms apart from archaea, and ZmpC, a virulence factor from *Streptococcus pneumoniae*. To gain a deeper insight into their function, I analysed their structures and their proteolytic characteristics. The membrane-bound AAA+ protease FtsH, essential in *Escherichia coli* for lipopolysaccharide regulation, exemplifies the intricate coupling of ATP-hydrolysis-driven translocation to proteolysis. Despite multiple structures of its soluble catalytic region published, the full-length architecture had remained elusive, especially regarding the assembly of the ATPase ring. Here, I report three cryo-EM structures of full-length *Aquifex aeolicus* FtsH bound to ATP, ADP, and AMP-PNP, respectively. They reveal an asymmetric spiral staircase arrangement in the ATPase domain similar to the homologous YME1, which implies coordinated subunit motions in a sequential hydrolysis cycle that drives substrate translocation. In parallel, the extracellular metalloprotease ZmpC from *Streptococcus pneumoniae*, a virulence factor targeting host extracellular matrix proteins, illustrates another facet of bacterial proteolytic diversity. A cryo-EM structure of catalytically inactive ZmpC variant bound to a peptide from its substrate MMP-9 was solved, revealing dynamic opening–closing motions of a β -helix, a potential gating mechanism similar to the homologous IgA1 protease. I identified the precise cleavage site in MMP-9's flexible, O-glycosylated linker region and analysed the proteolytic specificity of ZmpC. While there is no clear consensus sequence for substrate recognition by ZmpC, its G5 domain might play a role in O-glycosylation pattern recognition. Together, these studies expand the structural understanding of bacterial metalloproteases across membrane-bound and extracellular contexts, highlighting conserved principles of coordinated domain motion alongside diverse strategies for substrate recognition and processing.