

Biochemical and Functional Studies on Regulatory Lysine Acetylation of the Bacterial Transcription Factor RutR

Abstract

Bacteria employ transcription factors for adaptation to environmental changes via regulated gene expression. Moreover, post-translational modifications such as *N*- ϵ -lysine acetylation modulate protein function. RutR in *Escherichia coli* (*E. coli*), a transcriptional regulator of the cellular nitrogen metabolism, was reported to be acetylated and a substrate of acetylation controlling enzymes.

However, it was not clear which lysines (Ks) in RutR are acetylated to what extent or how RutR acetylation is governed by enzymatic and non-enzymatic processes in detail. Furthermore, the mechanistic as well as physiological impact of RutR acetylation was not characterized. This might constitute an elegant system to translate the metabolic state directly into altered gene expression.

This study utilized a variety of biochemical, biophysical, and microbiological methods to resolve these open questions. Acetylation assays with recombinant RutR analyzed by mass spectrometry revealed specific acetylation on K7 and 11 by the acetyltransferases PatZ and YiaC as well as on K7 and 150 by acetyl phosphate. Mass spectrometric studies additionally identified acetyl-lysine (AcK) 21, 52, 62, and 95 on recombinant RutR expressed in different *E. coli* strains. The genetic code expansion concept allowed purification of RutR site-specifically acetylated on K21, 52, 62, 95, and 150. These proteins and RutR acetylated by PatZ and YiaC are site-specifically deacetylated by the sirtuin CobB on AcK7, 11, 21, 52, and 62. Complete regulatory cycles are therefore established for K7 and 11.

Investigation of the endogenous RutR level via a genomically inserted FLAG-tag uncovered constant protein levels throughout growth in LB medium. Gene expression analysis of a *rutR* deletion strain via reverse transcriptase quantitative polymerase chain reactions (RT-qPCRs) validated *carAB* and *rutA-G* as RutR targets. Only site-specifically acetylated recombinant RutR enabled studies on the functional effect of RutR acetylation. Electrophoretic mobility shift assays and isothermal titration calorimetry revealed that acetylation on K52 and 62 impairs binding of RutR to both target promoters, while the interaction with the inhibitor uracil is unaltered. For the first time, AcK was genetically encoded in *E. coli* to study lysine acetylation *in vivo*. Transcriptional reporter assays and RT-qPCRs elucidated the physiological impact of RutR acetylation on K52: The derepression of *carA* gene expression by RutR is completely abolished upon acetylation on K52. Size-exclusion chromatography and structural analyses by X-ray crystallography uncovered the mechanism of regulatory RutR acetylation: The acetyl moiety on K52 interferes with DNA binding via electrostatic quenching and steric hindrance.

This work revealed a strong regulatory potential for RutR lysine acetylation. The novel mechanistic and functional insights gained in this study might be transferred to different bacterial transcription factors. The newly established method for *in vivo* application of the genetic code expansion concept for incorporation of AcK into endogenous proteins will prove useful in upcoming studies on regulatory lysine acetylation in *E. coli*.

Biochemische und funktionelle Studien zur regulatorischen Lysin-Acetylierung des bakteriellen Transkriptionsfaktors RutR

Zusammenfassung

Bakterien nutzen Transkriptionsfaktoren zur Anpassung an Veränderungen in ihrer Umwelt durch regulierte Genexpression. Außerdem modulieren posttranslationale Modifikationen wie *N*- ϵ -Lysin-Acetylierung die Proteinfunktion. Über RutR in *Escherichia coli* (*E. coli*), einen Transkriptionsregulator des zellulären Stickstoffstoffwechsels, wurde berichtet, dass er acetyliert ist und als Substrat von acetylierungsregulierenden Enzymen fungiert.

Es war jedoch nicht bekannt, welche Lysine (Ks) in RutR in welchem Ausmaß acetyliert sind oder wie genau die RutR-Acetylierung von enzymatischen und nicht-enzymatischen Prozessen gesteuert wird. Die mechanistischen sowie physiologischen Auswirkungen der RutR-Acetylierung waren ebenfalls nicht charakterisiert. Dies könnte ein elegantes System darstellen, um den metabolischen Zustand direkt in eine veränderte Genexpression umzusetzen.

Zur Beantwortung dieser offenen Fragen nutzte diese Studie eine Vielzahl von biochemischen, biophysikalischen und mikrobiologischen Methoden. Acetylierungsassays mit rekombinantem RutR, die durch Massenspektrometrie analysiert wurden, zeigten spezifische Acetylierung von K7 und 11 durch die Acetyltransferasen PatZ und YiaC sowie an K7 und 150 durch Acetylphosphat. Massenspektrometrische Untersuchungen identifizierten außerdem Acetyllysine (AcK) 21, 52, 62 und 95 auf rekombinantem RutR, das in verschiedenen *E. coli*-Stämmen exprimiert wurde. Das Konzept der Erweiterung des genetischen Codes ermöglichte die Aufreinigung von stellenspezifisch an K21, 52, 62, 95 und 150 acetyliertem RutR. Diese Proteine werden ebenso wie von PatZ sowie YiaC acetyliertes RutR stellenspezifisch vom Sirtuin CobB an AcK7, 11, 21, 52 und 62 deacetyliert. Vollständige Regulationszyklen sind dadurch für K7 und 11 etabliert.

Eine Untersuchung des endogenen RutR-Levelns mit Hilfe eines genomisch insertierten FLAG-Tags zeigte konstante Proteinlevel während des Wachstums in LB-Medium. Genexpressionsanalysen eines *rutR*-Deletionsstammes mit Hilfe von reverse Transkriptase-quantitativer Polymerase-Kettenreaktionen (RT-qPCRs) bestätigte *carAB* und *rutA-G* als RutR-Zielgene. Nur stellenspezifisch acetyliertes rekombinantes RutR ermöglichte Untersuchungen des funktionalen Einflusses der RutR-Acetylierung. Elektrophoretische Mobilitätsverschiebungsassays und isothermale Titrationskalorimetrie zeigten, dass Acetylierung an K52 und 62 die Bindung von RutR an beide Zielpromotoren verhindert, während die Interaktion mit dem Inhibitor Uracil unverändert bleibt. Zum ersten Mal wurde AcK genetisch in *E. coli* einkodiert, um Lysinacetylierung *in vivo* zu untersuchen. Transkriptionsreporterassays und RT-qPCRs klärten den physiologischen Einfluss der RutR-Acetylierung an K52 auf: Die Derepression der *carA*-Genexpression durch RutR ist bei Acetylierung an K52 vollständig aufgehoben. Größenausschluss-Chromatographie und strukturelle Untersuchungen durch Röntgenkristallographie zeigten den Mechanismus der regulatorischen RutR-Acetylierung auf: Der Acetylrest an K52 beeinträchtigt die DNA-Bindung durch elektrostatisches Quenchen und sterische Hinderung.

Diese Arbeit enthüllte ein starkes regulatorisches Potential der RutR-Lysin-Acetylierung. Die neuen mechanistischen und funktionalen Einsichten, die in dieser Studie gewonnen wurden, könnten auf andere bakterielle Transkriptionsfaktoren übertragen werden. Die erstmalig etablierte Methode zur *in vivo* Anwendung des Konzepts der Erweiterung des genetischen Codes für den Einbau von AcK in endogene Proteine wird sich als nützlich für bevorstehende Studien zu regulatorischer Lysin-Acetylierung in *E. coli* erweisen.