

# Post-translational lipid modification and membrane targeting of the dynamin- related large GTPase hGBP1

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades  
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität zu Köln

vorgelegt von

Julia Fres

aus Omsk/Russland

Köln, 2010

## Summary

Over a hundred proteins in eukaryotic cells carry a C-terminal CaaX box sequence, which targets them for post-translational isoprenylation of the cysteine residue. This modification, catalysed by either farnesyl or geranylgeranyl transferase, converts them into peripheral membrane proteins. Isoprenylation is usually followed by proteolytic cleavage of the aaX tripeptide and methylation of the carboxyl group of the newly exposed isoprenylcysteine. Human guanylate binding protein 1 (hGBP1) possesses a CaaX motif at its C-terminus, indicating to be a substrate for prenyltransferase.

The post-translational isoprenylation is essential for the activation-dependent recruitment to cellular membranes and the extent of the C-terminal modification might regulate the cellular localisation and biological activity of isoprenylated proteins. However, recent data suggest that not all proteins with a CaaX box undergo all three modification steps. In this study, the analysis of the modification status of endogenous hGBP1 from interferon- $\gamma$ -induced HeLa cells revealed that 80 % of the protein undergo a methylation of the carboxyl group of the C-terminus, while 20 % are farnesylated and proteolytically processed. In this work, a set of *in vivo* and *in vitro* systems was established to produce all naturally occurring forms of hGBP1 and in addition the *in vitro* methylation with the recombinant catalytic domain of human isoprenyl cysteine carboxyl methyltransferase (ICMT). These systems can be adapted to other isoprenylated proteins in order to study the differential effects of the modification steps.

The biochemical assays indicated that processed and methylated hGBP1 had a lower rate of GTP hydrolysis activity compared to the unmodified protein that was not affected by association with liposomes. However, the lipid-modified proteins displayed nucleotide-dependent binding to synthetic liposomes in their activated state. The membrane association and the precise targeting of hGBP1 required a functional LG-domain, isoprenylation and the adjacent C-terminal polybasic region. Moreover, the punctate cytosolic distribution of the interferon-induced hGBP1 was identified to be co-localised with integrin and calnexin.

This study showed that upon phagocytosis of abiotic and bacterial components hGBP1 was rapidly recruited to the plasma membrane.

The availability of differently lipid-modified forms will greatly contribute to the understanding of its subcellular trafficking and may provide new insights into the role and function of the side chain modifications of lipid-modified proteins.

## Zusammenfassung

In eukaryotischen Zellen hunderte von Proteinen tragen eine C-terminale CaaX-Box, die zur post-translationalen Isoprenylierung am Cystein führt. Durch die letzte Aminosäure der CaaX-Box wird die Kopplung des C15- oder C20-Isoprenoids an das C-terminale Cystein bestimmt. Daran anschließend werden die letzten drei Aminosäuren proteolytisch prozessiert und die endständige Carboxylgruppe methyliert. Humanes Guanylat-bindendes Protein 1 (hGBP1) besitzt eine solche CaaX-Box am seinem C-Terminus, die ein Substrat für Prenyltransferase darstellt. Die jüngsten Daten deuten darauf hin, dass nicht alle Proteine mit einer CaaX-Box allen drei Schritten der Modifikation unterzogen werden und es wurde gezeigt, dass das Ausmaß der C-terminalen Modifikation der zellulären Lokalisierung und biologische Aktivität von den Schritten der Isoprenylierung kontrolliert werden können. In dieser Studie ergab die Analyse des Modifizierungsstatus des Interferon- $\gamma$ -induzierten hGBP1 in HeLa-Zellen, dass 80 % des Proteins carboxymethyliert, während 20 % farnesyliert und proteolytisch prozessiert sind. Diese Arbeit zeigt *in vivo* und *in vitro* Strategien, die zur Produktion aller natürlich vorkommenden Formen von hGBP1 etabliert worden sind. Diese Strategien sind unter anderem an eine *in vitro* Methylierung mit der rekombinanten katalytischen Domäne der humanen Isoprenylcystein-carboxymethyltransferase (ICMT) gekoppelt. Dieses System kann an andere Proteine, die isoprenyliert werden können, angepasst werden, um die unterschiedlichen Effekte der Modifizierungsschritte zu analysieren.

Die biochemischen Analysen zeigten eine niedrigere GTP-Hydrolyse Rate des prozessierten und methylierten hGBP1 im Vergleich zum unmodifizierten und farnesylierten Protein, die nicht durch die Liposomenbindung beeinflusst worden war. Die aktivierten lipidmodifizierten Proteine offenbarten eine nukleotidabhängige Bindung an synthetische Liposomen. Die Membranbindung und die genaue Lokalisierung von hGBP1 erfordert eine funktionale LG-Domäne, Isoprenylierung und die C-terminale polybasische Aminosäuresequenz. Außerdem zeigte die zytosolische Lokalisierung des Interferon- $\gamma$ -induzierten hGBP1 eine Kollokalisierung mit Calnexin und Integrinen.

Im Rahmen dieser Studie wurde eine schnelle Rekrutierung von hGBP1 an die Plasmamembran nach der Phagozytose von abiotischen und bakteriellen Komponenten hGBP1 gezeigt.

Die Verfügbarkeit von lipidmodifizierten Formen wird wesentlich zum Verständnis ihrer zellulären Lokalisierung beitragen und kann neue Einblicke in die Rolle und Funktion der Modifikationen der lipidmodifizierten Proteine liefern.