

Zusammenfassung

Der Guaninnukleotid-Dissoziations-Inhibitor RhoGDI α ist ein wichtiger Regulator für kleine GTP-bindende Proteine der Rho-Familie. Er bindet an prenylierte Rho-Proteine und inhibiert dadurch die GEF-katalysierte Nukleotid-Dissoziation im Cytosol. Rho-Proteine sind molekulare Schalter und wechseln zwischen einem GTP-gebundenen, aktiven und einem GDP-gebundenen, inaktiven Zustand. Im aktiven Zustand sind Rho-Proteine meist an die Plasmamembran gebunden und interagieren dort mit Effektorproteinen. Rho-Proteine sind an elementaren Prozessen in der Zelle beteiligt, wie Organisation des Cytoskeletts, intrazellulären Transportprozessen, Zellproliferation oder Genexpression. Eine Fehlfunktion in der Regulation der Rho-Proteine kann zu schweren Funktionsstörungen in der Zelle führen. Dazu gehören neurodegenerative Erkrankungen, Tumordinvasion oder Metastasierung. RhoGDI α fungiert damit als negativer Regulator für Rho-Proteine.

Ein umfassender massenspektrometrischer *screen* aus dem Jahr 2009 identifizierte vier Lysine, die in humanem RhoGDI α acetyliert vorkommen. Diese wurden in weiteren Studien, auch in anderen Organismen, bestätigt und durch zusätzliche Lysine ergänzt. Ziel dieser Arbeit war es, den Einfluss der Acetylierung auf die Funktion von RhoGDI α *in vitro* zu untersuchen. Auch die Regulation und die Stöchiometrie dieser posttranslationalen Modifikation an RhoGDI α war von Interesse, um daraus eine Abschätzung über die mögliche physiologische Relevanz zu treffen.

In dieser Arbeit wurden durch das *Genetic Code Expansion Concept* ortsspezifisch acetylierte RhoGDI α -Proteine rekombinant in *E.coli* hergestellt (an den Lysinen 43, 52, 99, 105, 127, 141, 178 und eine Doppelacetylierung an K127,141). Nach der affinitätschromatographischen Reinigung der acetylierten Proteine wurden diese hinsichtlich der Interaktion mit Rho-Proteinen biochemisch, biophysikalisch und strukturell untersucht. Die weitreichende Charakterisierung der Acetylierung an einzelnen Lysinen zeigte, dass die Bindung zu prenyliertem (K52, K141, K178) sowie zu unprenyliertem (K52) RhoA beeinflusst wird. Die Kristallstruktur von RhoA·GDP·RhoGDI AcK127,141 zeigt, dass sich die Acetylierung an K141 vermutlich auf die Integrität des elektrostatischen Netzwerkes zwischen dem RhoGDI α N-Terminus und den RhoA C-Terminus auswirkt. Für die Acetylierung an K141 konnte außerdem ein indirekter *crosstalk* mit der SUMOylierung an K138 in RhoGDI α gezeigt werden. Wie bereits vorher gezeigt werden konnte, führt die SUMOylierung an K138 zur Erhöhung der Affinität von RhoGDI α zu RhoA. Eine Kristallstruktur von farnesyliertem RhoA mit RhoGDI α AcK178 zeigt, dass drei β -Stränge (β 5, β 9 und β 10) strukturell verbunden werden. Das Volumen der hydrophoben Tasche ist vergrößert und der Farnesylrest wird, im Gegensatz zum Geranylgeranylrest, anders aufgenommen. Die Acetylierung an RhoGDI α K52 verhinderte die Interaktion zu Rho-Proteinen (farnesyliert und nicht-prenyliert).

Auch die Regulation der Acetylierung von RhoGDI α war in dieser Arbeit von Interesse. Dabei konnten Sirt2 und HDAC6 als spezifische Deacetylasen für RhoGDI α *in vitro* gefunden werden. Für die enzymatische Acetylierung wurden die Acetyltransferasen CBP, p300 und pCAF als RhoGDI α -spezifisch identifiziert. In diese Arbeit konnte gezeigt werden, dass ein hohes regulatorisches Potential in der Acetylierung von RhoGDI α als posttranslationale Modifikation steckt.

Abstract

The guanine-nucleotide dissociation inhibitor RhoGDI α is a key regulator for GTP-binding proteins of the Rho-subfamily. It binds the prenylated RhoGNBPs and thereby inhibits the GEF-catalysed nucleotide dissociation in the cytosol. Rho proteins are molecular switches and cycles between a GDP-bound/inactive and a GTP-bound/active conformation. In the active conformation they are mostly bound to the plasma membrane and interact with effector proteins. Rho proteins regulate essential cellular processes, such as the organization of the cytoskeleton, intracellular transport processes, cell proliferation and gene expression. A dysfunction in the regulation of Rho-proteins could lead to severe cellular disorders such as neurodegenerative diseases, tumor invasion or metastasis. Therefore, RhoGDI α serves as a negative regulator for Rho-proteins.

A mass-spectrometric screen of the acetylome in 2009 identified four acetylation sites in human RhoGDI α . These results were confirmed by subsequent screens in different organisms and were supplemented by additional acetylation sites. The aim of this thesis was to study the impact of acetylation on RhoGDI α function *in vitro*. Moreover, the regulation and stoichiometry of this post-translational modification on RhoGDI α was of great interest to evaluate the physiological relevance of RhoGDI α acetylation.

In this study, recombinantly expressed RhoGDI α proteins were site-specifically acetylated in *E. coli* using the *genetic code expansion concept* (at the Lysines 43, 52, 99, 105, 127, 141, 178 and a double-acetylation on 127,141). After purification, the acetylated proteins were biochemically, biophysically and structurally characterized regarding towards Rho-protein interaction. The comprehensive characterization revealed that acetylation of single lysines interferes with the binding to prenylated (K52, K141, K178) and non-prenylated (K52) RhoA. The crystal structure of RhoA-GDP-RhoGDI α AcK127,141 indicates that acetylation on K141 impacts on the integrity of the electrostatic network of the RhoGDI α N-terminus and the RhoA C-terminus. Moreover, the acetylation at K141 indirectly crosstalks with the SUMOylation at K138 in RhoGDI α . Previous studies showed that SUMOylation on RhoGDI α K138 leads to an increase in RhoA affinity. The crystal structure of farnesylated RhoA in complex with RhoGDI α AcK178 shows, that AcK178 structurally couples three β -strands (β 5, β 9 und β 10). The volume of the hydrophobic pocket is increased and adopting the farnesyl-group differently compared to the geranylgeranyl-group. The acetylation on RhoGDI α K52 blocks the interaction towards RhoA, it can be regarded as a loss-of-function modification.

Also the regulation of RhoGDI α acetylation was of great interest. Sirt2 and HDAC6 were identified as specific deacetylases for RhoGDI α *in vitro*. For the enzymatic acetylation of RhoGDI α CBP, p300 and pCAF were identified. This study shows, that acetylation on RhoGDI α has a strong regulatory potential.