

ZUSAMMENFASSUNG

Rho-Proteine sind an einer Vielzahl von zellulären Prozessen beteiligt. Diese beruhen meist auf Veränderungen des Aktin-Zytoskeletts und umfassen die Erhaltung der Zellform, Zellteilung und Zellbewegung. Rho-Proteine sind „molekulare Schalter“, die entweder GDP oder GTP gebunden haben. In Abhängigkeit ihrer Nukleotidbeladung sind sie entweder aktiv (GTP) oder inaktiv (GDP). Aufgrund ihrer komplexen Aufgaben in der Zelle unterliegen Rho-Proteine einer strengen Regulation. Ein wichtiger Regulator ist der Rho-Guaninnukleotid-Dissoziationsinhibitor RhoGDI α . Dieser inhibitiert den Austausch und die Hydrolyse von Rho gebundenen Nukleotiden durch GEFs und GAPs. Zudem fungiert RhoGDI α als Chaperon, welches die hydrophobe Prenylgruppe der Rho-Proteine vom wässrigen Milieu des Zytoplasmas abschirmt. Somit ist RhoGDI α in der Lage Rho-Proteine zwischen Membranen zu transportieren. Massenspektrometrische Untersuchungen auf Proteomebene ergaben, dass RhoGDI α an verschiedenen Lysinen posttranslational acetyliert wird. Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es zu untersuchen, wie Lysin-Acetylierung die Funktion von RhoGDI α beeinflusst und wie diese Art der Modifizierung reguliert wird.

Durch eine Kombination aus biochemischen, biophysikalischen und zellbiologischen Methoden konnte gezeigt werden, dass RhoGDI α auf vielfältige Weise durch Acetylierung reguliert wird und dass die Art der Regulation von der Position der modifizierten Aminosäure abhängt. Acetylierung an K141 blockierte die SUMOylierung von K138 und stellt somit eine Verbindung zwischen diesen beiden Modifikationen her. Die Acetylierung von RhoGDI α an K178 hingegen schwächte die Bindung gegenüber prenyliertem RhoA, was zu einer Erhöhung an membranständigem RhoA führte und folglich eine Steigerung der Aktinpolymerisierung und Formation von Stressfasern zur Folge hatte. Die auffallendste Veränderung ergab die Acetylierung an K52, woraus ein völliger Funktionsverlust von RhoGDI α resultierte. Durch Acetylierung an K52 war RhoGDI α nicht mehr in der Lage mit RhoA zu interagieren, was zu einem gesteigerten GEF-katalysierten Nukleotidaustausch führte und RhoGDI α daran hinderte, RhoA von zellulären Membranen zu lösen. Außerdem führte Acetylierung an dieser Position zu einer verringerten Aktinpolymerisierung und verlangsamte das Zellwachstum.

Diese Arbeit zeigt zum ersten Mal, dass sowohl endogenes als auch exogen exprimiertes RhoGDI α in humanen Zellen acetyliert wird und gibt Hinweise auf eine strenge Regulierung dieser Modifikation. Tatsächlich wurden CBP, p300 und pCAF als RhoGDI α -spezifische Lysin-Acetyltransferasen identifiziert, wohingegen HDAC6 und die Sirtuine 1-3 in der Lage sind, RhoGDI α an verschiedenen Stellen zu deacetylieren. Dabei stellte sich heraus, dass K52 der Rest ist welcher am stärksten durch Lysin-Deacetylasen reguliert wird.

Zusammengefasst ist dies die erste umfassende Studie über die Regulation von RhoGDI α durch posttranslationale Lysin-Acetylierung. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit deuten verstärkt auf eine komplexe Regulation von RhoGDI α durch Acetylierung hin und eröffnen somit völlig neue Möglichkeiten für die Entwicklung therapeutischer Ansätze.

SUMMARY

Rho proteins are involved in a variety of cellular processes predominantly mediated by actin cytoskeleton dynamics, including maintenance of cell shape, cell proliferation and cell migration. They act as ‘molecular switches’, which cycle between an active GTP-bound and an inactive GDP-loaded state. Due to their physiological importance Rho activity is strongly controlled in time and space. One major regulator of Rho proteins is RhoGDI α , which inhibits nucleotide exchange and hydrolysis mediated by GEFs and GAPs. Moreover, by accommodating Rho’s hydrophobic prenyl group RhoGDI α acts as chaperone, which shuttles Rho proteins between cellular membranes. Recent high-resolution proteomic screens revealed that RhoGDI α is post-translationally lysine acetylated at distinct sites. This study aimed to investigate how acetylation impacts on RhoGDI α function and how acetylation itself is regulated.

By using a combination of biochemical, biophysical and cell biological techniques it could be shown that acetylation regulates RhoGDI α function in many ways and in a site-specific manner. For instance, acetylation on K141 blocks SUMOylation on K138 and thus constitutes a crosstalk between these two PTMs. RhoGDI α acetylation at K178 reduces binding towards prenylated RhoA, which consequently increases the amount of plasma membrane-associated RhoA, ultimately leading to actin polymerisation and stress fibre formation in mammalian cells. Most strikingly, acetylation on K52 resembled a loss-of-function phenotype. In fact, RhoGDI α acetylated at K52 nearly completely abolished RhoA interactions, increased GEF-catalysed nucleotide exchange and impaired the solubilisation of RhoA from membranes. Furthermore, acetylation of K52 decreased the cellular F-actin content consequently lowering cell proliferation. Additionally, this study revealed that endogenously and ectopically expressed RhoGDI α is acetylated in human cells and that acetylation itself is strongly regulated. CBP, p300 and pCAF were identified as lysine acetyltransferases, whereas HDAC6 and sirtuins 1-3 were shown to deacetylate RhoGDI α at distinct sites. KDACs were shown to site-specifically act on RhoGDI α , whereby K52 is the residue which is most targeted. In sum, this is the first comprehensive study about RhoGDI α regulation by post-translational lysine acetylation. Findings of this work provide direct evidence for a sophisticated surveillance of RhoGDI α function by lysine acetylation and might open up new possibilities for therapeutic approaches.