



Fakultät für Chemie

Fachgebiet Proteinchemie

Untersuchungen zur Substratidentifizierung
von Fic-Proteinen aus
Coxiella burnetii und *Legionella longbeachae*

Adam Leszek Cichy

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Chemie der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

genehmigten Dissertation.

Vorsitzende(r): Univ.-Prof. Dr. Shigeyoshi Inoue

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr. Aymelt Itzen
2. Univ.-Prof. Dr. Matthias Feige

Die Dissertation wurde am 27.10.2016 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Chemie am 08.12.2016 angenommen.

Im Oktober 2016 vorgelegt von
Adam Leszek Cichy
aus Rybnik
geboren am 24.03.1986

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum von April 2012 bis August 2016 an der Fakultät für Chemie der Technischen Universität München unter der Anleitung von Prof. Dr. Aymelt Itzen durchgeführt.

Im Rahmen dieser Arbeit ist folgende Veröffentlichung erschienen:

Dolinsky, S., Haneburger, I., Cichy, A., Hannemann, M., Itzen, A., and Hilbi, H. (2014) "The *Legionella longbeachae* Icm/Dot Substrate SidC Selectively Binds Phosphatidylinositol 4-Phosphate with Nanomolar Affinity and Promotes Pathogen Vacuole-Endoplasmic Reticulum Interactions." *Infect. Immun.* 82 (10): 4021-4033.

Manuskript in Präparation:

Cichy, A. L., Mohammadi, N., Bach, N. C., Albers, M., Feige, M. J., Richter, K., Sieber, S. A., Hedberg, C. and Itzen, A. (2016) "*Coxiella burnetii* AMPylates host cell histone H3."

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	I
Abkürzungsverzeichnis.....	III
Zusammenfassung.....	1
Abstract.....	3
1. Einleitung	5
1.1. Proteinadenylylierung	5
1.2. Fic-Proteine – Eine vielseitige Proteinfamilie.....	6
1.3. Molekulare Grundlagen der Fic-Domäne	8
1.4. Regulation von Fic-Proteinen	10
1.5. Phylogenie der Fic-Proteine und ihre Bedeutung für die Medizin	12
1.7. Zellinvasive bakterielle Pathogene.....	14
1.8. <i>Coxiella burnetii</i>	14
1.9. <i>Legionella longbeachae</i>	19
1.10. Strategien zur Identifizierung von adenylierten Proteinen	21
2. Zielsetzung.....	24
3. Ergebnisse	25
3.1. CbFic1 aus <i>Coxiella burnetii</i>	25
3.1.1. Intrazelluläre Lokalisation von CbFic1	25
3.1.2. Untersuchung der CbFic1-Adenylylierungsaktivität.....	27
3.2. CbFic2 aus <i>Coxiella burnetii</i>	30
3.2.1. Untersuchung von CbFic2 in Säugetierzellen.....	30
3.2.1.1. Intrazelluläre Lokalisation von CbFic2	30
3.2.1.2. CbFic2 adenylyliert Histon H3 <i>in vivo</i>	32
3.2.1.3. CbFic2 adenylyliert Histon H3 in Abhängigkeit einer Zellkernlokalisation.....	35
3.2.2. Untersuchungen von CbFic2 <i>in vitro</i>	39
3.2.2.1. Substratspezifität unter den Kernhistonen	39
3.2.2.2. Identifizierung der Histon H3-AMP Modifikationsstellen.....	41
3.2.2.3. Die oligonukleotidbindenden Eigenschaften von CbFic2.....	47

3.2.2.4. Kinetische Betrachtung der CbFic2-DNA-Bindung	50
3.2.2.5. Quantifizierung der Adenylylierungsaktivität	53
3.2.2.6. Evaluierung von Kosubstraten.....	55
3.2.3. Histon H3-Adenylylierung: Untersuchung der physiologischen Konsequenzen.....	59
3.2.3.1. Analyse der Zellproliferation	59
3.2.3.2. Analyse der Genregulation	60
3.3. LpFic aus <i>Legionella pneumophila</i>	63
3.3.1. Intrazelluläre Lokalisation von LpFic	63
3.4.2. LpFic adenylyliert die RhoGTPase Cdc42 <i>in vitro</i>	66
4. Diskussion	66
4.1. Die Adenylyltransferase-Aktivität von CbFic1 und CbFic2	71
4.2. Nukleäre Lokalisierung von CbFic2	73
4.3. DNA-Bindung und ihre Bedeutung für die Aktivität von CbFic2.....	75
4.4. Mögliche patho-epigenetische Rolle der Histon H3-Adenylylierung	77
4.5. Subzelluläre Lokalisation und Adenylyltransferase-Aktivität von LpFic	81
5. Ausblick	83
6. Material und Methoden	85
6.1. Material	85
6.2. Molekularbiologische Methoden	91
6.3. Analytische Methoden	97
6.4. Biochemische Methoden	104
6.5. Biophysikalische Methoden	109
6.6. Zellbiologische Methoden	111
7. Literaturverzeichnis	114
8. Anhang	129
Danksagung.....	137
Eidesstattliche Erklärung.....	139

Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celsius
A (mA)	Ampere (Milliampere)
ADP	Adenosindiphosphat
AMP	Adenosinmonophosphat
AS	Aminosäuren
ATP	Adenosintriphosphat
AUZ	analytische Ultrazentrifugation
Bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serum Albumin
Bzw.	Beziehungsweise
c	Konzentration
<i>C. burnetii</i>	<i>Coxiella burnetii</i>
<i>C. difficile</i>	<i>Clostridium difficile</i>
ca.	<i>Circa</i>
CCV	<i>Coxiella containing vacuole</i>
CDP-Cholin	Cytidin-5'-diphosphocholin
CID	Kollisionsinduzierte Dissoziation
CMP	Cytidinmonophosphat
Cos1	<i>CV-1 in Origin, carrying SV40</i>
CTP	Cytidintriphosphat
d.h.	das heißt
Da (kDa)	Dalton (Kilodalton)
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
ddH ₂ O	bidestilliertes Wasser
DI	Dimerisierungsoberfläche
DIC	Differentialinterferenzkontrast
DMEM	<i>Dulbeccos Modified Eagle`s Medium</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
Dot/lcm	<i>defect in organelle trafficking/intracellular multiplication</i>
Ds	Doppelstrang
DSF	<i>Differential Scanning Fluorometry</i>
DTE	Dithioerythritol
DTT	Dithiothreitol

E	Extinktion
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ESI	Elektrospray-Ionisation
<i>et al.</i>	und andere (lat.: <i>et alii</i>)
etc.	und so weiter (lat.: <i>et cetera</i>)
ETD	Elektronen Transfer Dissoziation
Fic	<i>Filamentation induced by cyclic AMP</i>
FicT	Fic-Toxin
FL	Volllänge (engl.: <i>Full length</i>)
g (mg, µg, ng)	Gramm (Milligramm, Mikrogramm, Nanogramm)
GDP	Guanosindiphosphat
GFP	<i>Green Fluorescent Protein</i>
GMP	Guanosinmonophosphat
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunden (engl.: <i>hour</i>)
H	Histon
HCD	Hochenergie Kollision
HEK	<i>Human Embryonic Kidney</i>
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (engl.: <i>high performance liquid chromatography</i>)
HRP	<i>horse radish peroxidase</i>
HTH	<i>helix-turn-helix</i>
IER	<i>Immediate early response</i>
IMAC	<i>immobilized metal ion affinity chromatography</i>
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
k_{cat}/K_M	katalytische Effizienz
K_D	Dissoziationskonstante
K_i	kompetitive Inhibitionskonstante
l (ml, µl)	Liter (Milliliter, Mikroliter)
<i>L. pneumophila</i>	<i>Legionella pneumophila</i>
<i>L. longbeachae</i>	<i>Legionella longbeachae</i>
LB	<i>lysogeny broth</i>
LC	<i>Liquid chromatography</i>
LCV	<i>Legionella Containing Vacuole</i>
LCV ^c	<i>Large Cell Variant</i>

LOPAC	<i>Library of Pharmacologically Active Compounds</i>
m (cm, mm, μ m, nm)	Meter (Zentimeter, Millimeter, Mikrometer, Nanometer)
M (mM, μ M, nM)	Molar (Millimolar, Mikromolar, Nanomolar)
m/z	Masse/Ladung
MBP	<i>Maltose binding protein</i>
MCS	<i>multiple cloning site</i>
Min	Minute
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MS	Massenspektrometrie
MS/MS	Tandem-Massenspektrometrie
n	Anzahl
NAPPA	<i>nucleic acid programmable protein array</i>
NDP	Nukleotiddiphosphat
NI	Nach Induktion
Ni-NTA	Nickel-Nitrilotriessigsäure
NLS	Kernlokalisierungssignal (engl.: <i>Nuclear localization signal</i>)
NMP	Nukleotidmonophosphat
NTP	Nukleotidtriphosphat
OD ₆₀₀	Optische Dichte
P	Position
PC	Phosphocholin
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (engl.: <i>polymerase chain reaction</i>)
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
Pg	Trennungsgrad (engl.: <i>prep grade</i>)
pI	Isoelektrischer Punkt
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PTM	posttranslationale Modifikation
RIPA	<i>Radioimmunoprecipitation assay</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RP	Reversed Phase
rpm	Umdrehungen pro Minute (engl.: <i>revolutions per minute</i>)
s	Sekunde
s.	siehe
S	Svedberg
<i>S. oneidenensis</i>	<i>Shewanella oneidenensis</i>
<i>S. pombe</i>	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>
SAXS	<i>Small Angle X-Ray Scattering</i>

SCV	small cell variant
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese engl.: <i>sodium dodecyl sulfate polyacrylamid gel electrophoresis</i>
SILAC	<i>stable isotope labeling by aminoacids</i>
SLIC	<i>sequence and ligation independent cloning</i>
SOB	<i>super optimal broth</i>
SUMO	<i>small ubiquitin-related modifier</i>
<i>T. thermophila</i>	<i>Tetrahymena thermophila</i>
T4SS	Typ 4-Sekretionssystem
TA	Toxin-Antitoxin
TAE	TRIS-Acetat-EDTA
TBABr	Tetrabutylammoniumbromid
TEB	Triton Extraktionspuffer
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TEV	<i>Tobacco Etch Virus</i>
T _M	Schmelzpunkt
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TRIST	<i>Tris-buffered saline with Tween2</i>
tRNA	Transfer-RNA
UMP	Uridinmonophosphat
UP	<i>unique peptides</i>
UTP	Uridintriphosphat
UV	Ultraviolett
V (kV)	Volt (Kilovolt)
VI	Vor Induktion
(v/v)	Volumenprozent
WT	Wildtyp
(w/v)	Masseprozent
z.B.	zum Beispiel
α_{inh} -Helix	inhibitorische Helix
ϵ	Extinktionskoeffizient
Π	Pi, Kreiszahl

Aminosäuren wurden gemäß den Empfehlungen der International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC) und der International Union of Biochemistry and Molecular Biology (IUB) mit Ein- und Dreibuchstabencodes abgekürzt.

Zusammenfassung

Im Laufe der Evolution haben Pathogene raffinierte Methoden entwickelt, Zellen unter Umgehung der natürlichen Abwehrmechanismen zu infizieren. Die meisten Spezies nutzen dafür ein Arsenal an spezifischen Proteinen, sogenannte Effektoren, die in die Wirtszelle sekretiert werden und diverse physiologische Prozesse beeinflussen. Durch jüngste Entdeckungen ist bekannt, dass die lange unbeachtete Familie der Fic-Proteine (*filamentation induced by cyclic Adenosinmonophosphat* (AMP)) bei zahlreichen infektiösen Vorgängen eine bedeutende Rolle spielt. Fic-Proteine sind weit verbreitete und funktionell vielseitige Adenylyltransferasen (AMP-Transferasen) mit enzymatischer Plastizität, die bei einzelnen Vertretern zu einer abweichenden Funktion führt (z.B.: Phosphocholinierung). Ein intrazellulärer Parasit, der sich für pathogene Zwecke der Adenylylierung als molekulares Werkzeug bedient, ist die Spezies *Coxiella burnetii*. Jedoch sind die Substrate dieser Modifizierung sowie entsprechende Effektoren zu Beginn dieser Arbeit unbekannt gewesen. Ziel der hier dargestellten Untersuchungen war die Identifikation einiger dieser Proteine.

Dazu wurden die Coxiellen-Fic-Proteine CbFic1 (Gen: CBU_2078) und CbFic2 (Gen: CBU_0822) hinsichtlich einer potentiellen Adenylylierungsaktivität gegenüber eukaryotischer Proteine analysiert. Im Rahmen dieser Untersuchungen wurde gezeigt, dass CbFic2 unter physiologischen Bedingungen das Histon-Kernprotein H3 adenylyliert. Es wurde zudem dargelegt, dass die Reaktion in Abhängigkeit einer exklusiven Zellkernlokalisation und einer affinen Bindung des Enzyms an DNA stattfindet. Um diese Vorgänge näher zu inspizieren, wurden Verkürzungskonstrukte von CbFic2 generiert. Zellbiologische Analysen offenbarten, dass sowohl die Zellkernlokalisation als auch die DNA-Bindung über die C-terminale *helix-turn-helix* (HTH)-Domäne des Proteins vermittelt werden. Des Weiteren konnte ein stimulierender Einfluss der Nukleinsäurebindung auf die enzymatische Aktivität von CbFic2 nachgewiesen werden. Über massenspektrometrische Methoden wurden die Positionen Serin-10 und -28 in Histon H3 als Modifikationsstellen der Adenylylierung bestimmt. Diese Positionen sind essentielle Phosphorylierungsstellen in einer gesunden Zelle, wodurch eine patho-epigenetische Funktion von CbFic2 naheliegt.

Angestoßen durch die Entdeckung der Histonmodifizierung wurde das zu CbFic2 homologe Fic-Protein LpFic (Gen: LLO_0951) aus *Legionella longbeachae* im Rahmen eines zusätzlichen Projekts untersucht. LpFic wies eine spezifische subzelluläre Lokalisation am Mikrotubulizytoskelett sowie eine partielle Lokalisation im Zellkern auf. Eine *in vitro* beobachtete Adenylylierungsaktivität von LpFic gegenüber der RhoGTPase Cdc42 deutet einen potentiellen Einfluss auf die Organisation des Zytoskeletts an. Diese Arbeit umfasst die erste Beschreibung einer physiologisch relevanten Histonadenylylierung sowie einer potentiellen Bedeutung von Fic-Proteinen der Klasse II als bakterielle Effektoren.

Abstract

In the course of evolution pathogens have developed sophisticated methods to infect cells under circumvention of natural defense mechanisms. Most species achieve this by using the arsenal at their disposal: specific proteins, so-called effectors, which are secreted into the host cell, where they affect various physiological processes. Recent discoveries have shown that the long-disregarded family of Fic-proteins (filamentation induced by cyclic Adenosinmonosphat (AMP)) play an important role in various infectious processes. Fic-proteins are widely spread and functionally versatile adenylyltransferases (AMP-transferases) with remarkable enzymatic plasticity, which can lead to functional deviations in certain family members (e.g. phosphocholination). An example for an intracellular parasite which utilizes adenylylation as a molecular tool for pathogenic purposes is the species *Coxiella burnetii*. The substrates of the modification as well as the corresponding effectors were initially unknown before this thesis. Therefore, the objective of this thesis was the identification of these Fic-protein targets.

To achieve this, *Coxiella*-Fic-proteins CbFic1 (Gene: CBU_2078) and CbFic2 (Gene: CBU_0822) were analyzed regarding their potential adenylylation activity towards host proteins. Tests carried out in the framework of this analysis have shown that CbFic2 adenylylates the histone core protein H3 under physiological conditions. It was also shown that the reaction takes place dependent on exclusive nuclear localization and high affinity binding of the enzyme to the DNA. In order to more closely examine these processes, various truncation constructs of CbFic2 were generated. Cell biological analyses to that end have shown that nuclear localization as well as DNA-binding are carried out by the C-terminal *helix-turn-helix* domain of the protein. Furthermore, the nucleic acid binding was demonstrated to have a stimulating effect on the enzymatic activity of CbFic2. Mass spectrometric examinations have determined the positions Serine-10 and -28 in histone H3 as the adenylylation sites. These positions are essential phosphorylation sites in healthy cells, leading to the conclusion that CbFic2 has a patho-epigenetic function. The discovery of histone adenylylation provided the impetus to examine the homologous Fic-Protein LpFic (Gene: LLO_0951) from *Legionella longbeachae* as part of a side project. LpFic possesses a specific subcellular localization on the microtubule cytoskeleton, as well as a partial localization in the nucleus. *In vitro* studies have shown adenylylation activity of LpFic towards RhoGTPase Cdc42, suggesting a potential effect on the organization of the cytoskeleton. This thesis constitutes the first description and verification of physiologically relevant Histone adenylylation as well as the potential significance of class II Fic-proteins as bacterial effectors.

1. Einleitung

1.1. Proteinadenylylierung

Das funktionelle Repertoire von Proteinen in der Zelle beruht auf einer Vielzahl von verschiedenen Faktoren. Ein Mittel, diese funktionelle Diversität zu etablieren, ist die enzymatische Kopplung von chemischen Gruppen an spezifische Positionen im Protein, bekannt als posttranslationale Modifikation (PTM)¹⁻³. Als Ressource für die Transferreaktion dienen gewöhnliche Metabolite und ihre funktionellen chemischen Gruppen. Ribonukleotide, die in hoher Konzentration in der Zelle vorkommen und hochenergetische Bindungen enthalten, sind für diesen Zweck geradezu privilegiert⁴. So stellt die Phosphorylierung durch Anbringung des γ -Phosphats, ausgehend von Adenosintriphosphat (ATP), eine der häufigsten PTMs in der Zelle dar¹. Neben dem γ -Phosphat bieten auch das α - und β -Phosphat einen thermodynamisch günstigen Angriffspunkt. In der Zelle äußert sich eine Transferreaktion über das α -Phosphat in einer Modifizierung mit Adenosinmonophosphat (AMP), bezeichnet als Adenylylierung (siehe Abbildung 1)^{5,6}. Die Adenylylierung ist ein enzymatisch katalysierter Prozess, bei dem die Aminosäurereste von Serin, Threonin oder Tyrosin mit einer AMP-Gruppe versehen werden⁵. Als Nebenprodukt der Reaktion entsteht Pyrophosphat, das unter physiologischen Bedingungen durch Pyrophosphatasen abgebaut wird und infolgedessen das Reaktionsgleichgewicht weiter zu Gunsten der Transferreaktion verschiebt⁷.

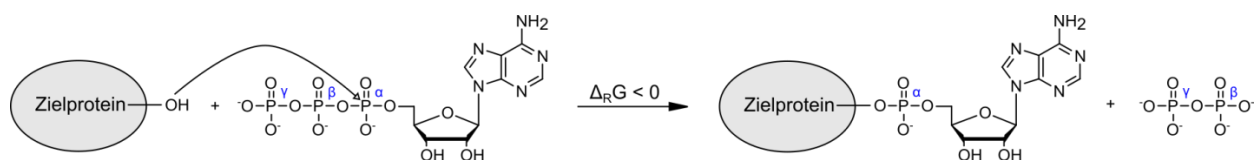


Abbildung 1: Proteinadenylylierung. Reaktionsschema der enzymkatalysierten Übertragung einer Adenosinmonophosphatgruppe auf den polaren Aminosäurerest von Serin, Threonin oder Tyrosin. Durch Spaltung einer Phosphoanhydridbindung und Generierung einer energieärmeren Phosphodiesterbindung ist die Reaktion stark exergon. Als Nebenprodukt der Reaktion entsteht Pyrophosphat, das durch Pyrophosphatasen hydrolysiert wird und das Gleichgewicht zu Gunsten der Produkte verschiebt⁵.

Die Adenylylierung von Proteinen ist eine PTM, die im Vergleich zur Phosphorylierung deutlich weniger häufig auftritt. Entdeckt wurde sie 1967 als PTM zur Aktivitätsregulation der Glutaminsynthetase (GS)⁸. Nach ihrer ersten Erwähnung fand diese PTM in der Wissenschaft jahrzehntelang keine große Beachtung bis im Jahre 2009 die Adenylyltransferaseaktivität des Proteins VopS aus dem Bakterium *Vibrio parahaemolyticus* beschrieben wurde⁹. Mit der Wiederbelebung der Aufmerksamkeit auf die Adenylylierung als molekulares Werkzeug der Zelle erlebte auch eine lang bekannte Proteinklasse ihre Renaissance: Die Fic-Proteine.

1.2. Fic-Proteine – Eine vielseitige Proteinfamilie

Die Abkürzung Fic steht für engl.: *filamentation induced by cyclic AMP*, eine Beobachtung an *Escherichia coli* (*E. coli*), die 1980 bei der Untersuchung einer gerichteten Mutation im Genom des Bakteriums gemacht wurde^{10;11}. Das *fic*-Gen, das bei dieser Mutationsanalyse beeinflusst wurde, codierte für das erste erforschte Fic-Protein und gab dieser Klasse ihren Namen¹⁰. Etwa dreißig Jahre lang waren entsprechende Proteine lediglich in Proteindatenbanken gelistet, bis die molekulare Funktion des Fic-Proteins VopS aus dem enterotoxischen Pathogen *Vibrio parahaemolyticus* (*V. parahaemolyticus*) beschrieben wurde. Yarbrough *et. al.* zeigten, dass VopS als AMP-Transferase fungiert, die während einer Infektion mit *V. parahaemolyticus* als Virulenzfaktor (Biomoleküle mit pathogener Wirkung) zum Einsatz kommt⁹. VopS wird in Fremdorganismen sekretiert und adenyliert dort verschiedene RhoGTPasen, die molekularen Hauptschalter für die Organisation des Zytoskeletts^{9;12;13}. Nur wenige Monate später wurde die Adenylierung von RhoGTPasen auch im Kontext einer Pathogenität durch das Multidomänen-Fic-Protein IbpA aus *Histophilus somni* beobachtet¹⁴. Die Modifizierung mit AMP erfolgt in einem regulatorisch essentiellen Bereich der Proteine, was diese in der Wechselwirkung mit Interaktionspartnern hindert^{9;14}. Für die Wirtszelle resultierte dies in einem Kollaps des Aktinfilamentnetzwerks mit begleitender toxischer Wirkung^{9;14}. Mit VopS und IbpA waren zwei voneinander unabhängige Fälle von Fic-Proteinen als bedeutende Virulenzfaktoren beschrieben. Dies offenbarte, dass neben der Bedeutung für zelleigene Prozesse scheinbar ein erheblicher Teil dieser Proteinklasse für pathogene Zwecke zuständig ist. Angestoßen durch die Signifikanz dieser Entdeckungen folgten weitere Untersuchungen, die verdeutlichten, dass die Vielfalt dieser Proteinklasse nicht nur auf funktioneller sondern auch auf mechanistischer Ebene eine weitaus größere Dimension einnimmt¹⁵. Dies wird an den folgenden drei Paradebeispielen prägnant:

AnkX aus dem opportunistischen humanen Pathogen *Legionella pneumophila* nutzt CDP-Cholin als Kosubstrat und phosphocholiniert (Modifikation mit Phosphocholin, PC) die Proteine Rab1b und Rab35 mit Konsequenzen für den exo- und endozytischen vesikulären Transport der Wirtszelle^{16;17}. Eine Uridylierung (Modifikation mit Uridinmonophosphat, UMP) der rezeptorähnlichen Kinasen Bik1 und RIPK wurde durch das Fic-Protein AvrAC, ein Pflanzenpathogen aus *Xanthomonas campestris*, beschrieben¹⁸. Bik1 und RIPK sind grundlegende Komponenten in der Pathogenerkennung und der Effektor-induzierten Immunantwort¹⁹⁻²². Ein weiterer besonderer Fall ist das Protein Doc des P1-Phagen, das die Funktion einer Kinase adaptiert und den Translations-Elongationsfaktor EF-Tu in bakteriellen Wirten phosphoryliert²³⁻²⁵. EF-TU beliefert Ribosomen mit aminoacylierten tRNAs²⁶. Die Phosphorylierung des Proteins durch Doc führt zu einer abrupten Unterbrechung der Proteinbiosynthese, wodurch das Phagen-Fic-Protein die Eigenschaft eines wirksamen Toxins erhält²⁵.

Die Funktion von Fic-Proteinen in zelleigenen Prozessen wurde bisher nur an zwei Fällen genauer bestimmt²⁷⁻³⁰. Untersuchungen begannen, wie einleitend erwähnt, mit der Mutationsanalyse des *fic*-Gens in *E. coli* aus einem genetisch veränderten Stamm (K-12 MG1655)^{10;11}. Die charakteristische Filamentbildung der Zellen wird heute auf andere Faktoren zurückgeführt, die mit zusätzlichen Mutationen im Genom des Bakteriums in Verbindung stehen¹⁵. Es ist nun auch bekannt, dass das entsprechende Fic-Protein (annotiert als EcFicT) Teil eines Toxin-Antitoxin (TA) Moduls ist, dessen physiologische Rolle aber weiterhin unbekannt ist¹⁵. Kürzlich durchgeführte Studien zeigten, dass Fic-Proteine in TA-Systemen weit verbreitet sind³⁰. Harms *et al.* beschrieben ein in Bakterien ubiquitär vorkommendes FicTA-Modul zur Regulierung des Zellwachstums über die Topoisomerase IV und DNA Gyrase (ParE, GyrB). Dabei werden für die Zellteilung essentielle Zustände der DNA Topologie durch Adenylylierung der B-Untereinheiten von ParE und GyrB inhibiert, dem wiederum das Antitoxin durch Bindung an das FicT Toxin entgegenwirkt^{30;31}. Metazoen beherbergen jeweils nur ein Fic-Protein und stellen das letzte bekannte Beispiel für den Einsatz einer Fic-vermittelten AMP-Modifikation für immanente physiologische Bedürfnisse²⁷⁻²⁹. Der humane Ortholog wird als HypE oder FicD bezeichnet und nimmt nach neuesten Erkenntnissen eine Schlüsselrolle in der Homöostase des *unfolded protein response* ein. HypE adenylyliert das Chaperon BiP in der Substratbindungsdomäne und verringert dadurch die basale ATPase-Aktivität des Proteins sowie die Stimulierung durch weitere Faktoren^{29;32;33}. Für CG9523, ein HypE Ortholog aus *Drosophila melanogaster*, wurde eine identische Funktion ermittelt²⁸. Phänotypische Merkmale (blinde Fliegen) nach einem Gen-*knockout* lassen jedoch auch weitere Substrate vermuten³⁴.

Die hier aufgeführten Studien implementieren solche Fic-Proteine, für die physiologisch relevante Interaktionspartner und Substrate und eine konkrete zelluläre Funktion bestimmt werden konnten. In einigen weiteren Untersuchungen konnten fragliche *in vitro*-Substrate identifiziert werden. Für VopS und IbpA sind es bemerkenswerterweise jeweils über 20 Substrate^{35;36}. Das Protein Hype wurde beschrieben, verschiedene Histone, Transkriptionsfaktoren und RhoGTPasen zu adenylylieren^{29;37}. Ein ähnlich breites *in vitro*-Substratspektrum (Histone, Heat-Shock 70 Proteine, Translation Elongationsfaktoren) wurde für den HypE Ortholog Fic-1 aus *Caenorhabditis elegans* gezeigt³⁸. Ob die entsprechenden Interaktionen jedoch eine biologische Bedeutung haben, ist bisher unklar. Nichtsdestotrotz demonstriert der heutige Forschungsstand, dass Vertreter der Fic-Proteinklasse an verschiedenen physiologischen sowie pathologischen Prozessen beteiligt sind, sodass ihre funktionelle Diversität diese Enzyme zu einem interessanten Forschungsobjekt macht.

1.3. Molekulare Grundlagen der Fic-Domäne

Fic-Proteine werden durch ein stark konserviertes katalytisches Motiv und eine minimale Kernstruktur von sechs α -Helices definiert, die als Fic-Domäne eingegrenzt werden kann^{39;40}. Die gesamte Struktur lässt sich als kompaktes Bündel beinahe senkrecht angeordneter Helices beschreiben^{39;40}. Das katalytische Motiv erstreckt sich über einen kurzen ungeordneten Bereich zwischen den Helices α_3 und α_4 und beherbergt die Konsensussequenz: HxFx(D/E)(A/G)N(G/K)RxxR (Fic-Motiv)^{39;40}. In der Sequenz befinden sich die grundlegenden Elemente für die Bindung des Kofaktors und der AMP-Transferreaktion⁵. Zahlreiche strukturelle und biochemische Untersuchungen erlauben folgende Interpretation: Das (A/G)N(G/K)-Submotiv formt eine sogenannte Anionenhöhle für die Bindung des α - und β -Phosphats und wird durch das erste Arginin im Fic-Motiv in der Stabilisierung des β -Phosphats unterstützt⁵. Das endständige Arginin ist für die korrekte Positionierung des Nukleotids durch Wechselwirkung mit dem γ -Phosphat und der Ribose zuständig⁵. Vervollständigt wird das Motiv durch das Histidin, welches als Base die Nukleophilie der angreifenden Hydroxylgruppe durch Deprotonierung erhöht und damit die Substitution begünstigt⁵. Die Präsenz des Histidins ist für die Reaktion essentiell, sodass eine Alaninmutation an dieser Stelle zur vollständigen Inaktivierung des Enzyms (Bez.: konstitutiv inaktiv) führt^{31;41;42}. Direkte Wechselwirkungen zwischen dem Fic-Motiv und der Nukleobase sind nicht vorhanden^{39;40}. Röntgenkristallstrukturen verschiedener Fic-Proteine im Komplex mit ATP bzw. mit nicht hydrolysierbaren Analoga zeigen eine Positionierung der Nukleobase in einer hydrophoben Ausbuchtung geformt durch die Helices α_3 und α_5 , was sich aufgrund fehlender Interaktionen mit den Seitengruppen vermutlich in einem breiten Kosubstratspektrum entsprechender Fic-Proteine äußert^{27;31;41;43;44}. Matoo *et al.* bestätigten dies für die Proteine IbpA und VopS. Es wurde gezeigt, dass Guanosin-, Cytidin- und Uridintriphosphat (GTP, CTP u. UTP) zusätzliche Kosubstrate *in vitro* für IbpA und VopS darstellen⁴⁵. Das Protein Hype weist neben der Adenylylierung eine schwache Cytidylylierungsaktivität auf⁴⁵. Ein prinzipiell nicht notwendiger aber reaktionsbegünstigender Kofaktor für Fic-Proteine ist Magnesium in seinem zweifach positivgeladenen ionischen Zustand (Mg^{2+})³⁹. Dies wird durch mehrere Kristallstrukturen angedeutet, die eine Magnesiumionenkoordinierung durch das α - und β -Phosphat von ATP sowie durch das Aspartat im Fic-Motiv darlegen^{27;31;41;43;44}. Mg^{2+} hilft bei der Kompensation der negativen Ladung am α -Phosphats und erhöht damit die Elektrophilie des Phosphoratoms, was den Angriff der Zielaminosäure und somit die Transferreaktion begünstigt⁵.

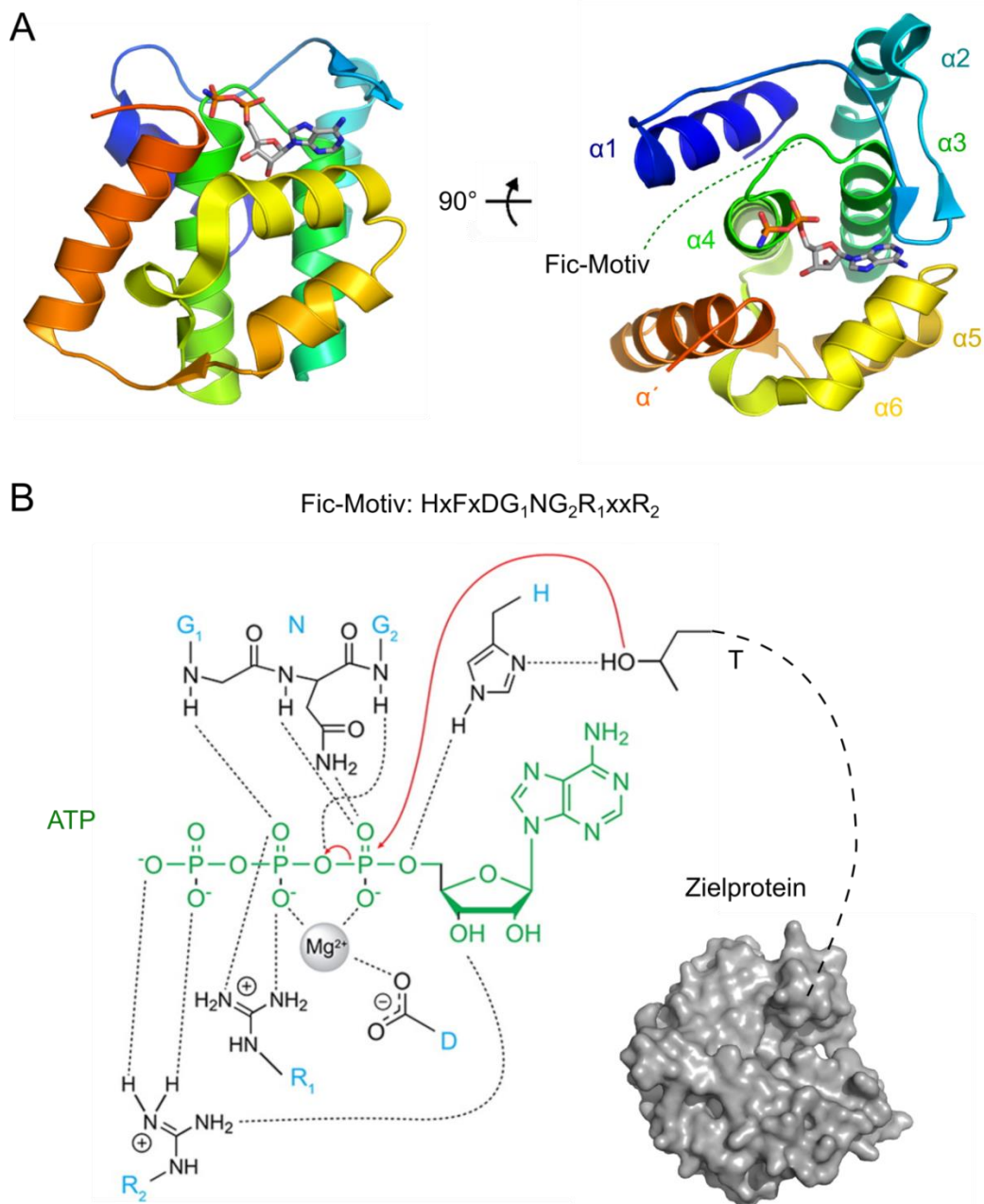


Abbildung 2: Die Fic-Domäne und ihre katalytischen Eigenschaften. (A) Minimale Fic-Domänen-Kernstruktur dargestellt anhand NmFic aus *Neisseria meningitidis* (PDB: 3S6A)³¹. Gezeigt ist die charakteristische Faltung bestehend aus sechs Helices und mehreren Loop-Elementen in Bänderdarstellung sowie zwei unterschiedlichen Perspektiven. Die Kolorierung illustriert den Verlauf vom N- (blau) zum C-Terminus (rot). Der gebundene Kofaktor ATP ist als Stabmodell mit farbiger Hervorhebung entsprechender Atome (N: blau, O: rot, P: orange) abgebildet. (B) Mechanismus der Fic-Domänen katalysierten Adenylierung einer Threonin-Seitenkette (abgeleitet von publizierten Röntgenkristallstrukturen)^{31;42;44}. Das (A/G)N(G/K) Submotiv bildet eine Tasche zur Bindung des α - und β -Phosphats von ATP und wird durch das erste Arginin im Fic-Motiv in der Stabilisierung des β -Phosphats unterstützt. Das zweite Arginin ist für die korrekte Positionierung des Nukleotids durch Interaktion mit dem γ -Phosphat und der Ribose zuständig. Mg^{2+} dient als Kofaktor, welcher die Reaktion durch Kompensation der negativen Ladung an α - und β -Phosphat begünstigt. Katalysiert wird die Reaktion durch das Histidin im Fic-Motiv, das als Base die angreifende Hydroxylgruppe deprotoniert und damit dessen Nukleophilie erhöht. Abbildung 2B modifiziert entnommen aus ⁵, mit Erlaubnis der Nature Publishing Group.

Sonderfälle wie die Phosphocholinierung durch AnkX oder die Doc-vermittelte Phosphorylierung kommen durch eine inverse Bindung des Nukleotids zustande^{23;46;47}. Im Fic-Motiv *per se* bestehen in diesen Fällen nur leichte Abweichungen von der kanonischen Sequenz, wodurch umso mehr die beeindruckende Plastizität des enzymatischen Systems verdeutlicht wird. Die verdrehte Ausrichtung des Nukleotids wird hauptsächlich durch Wechselwirkungen mit dem Zielprotein (Doc) oder einem weiteren Strukturelement (AnkX) hervorgerufen^{23;46}. Das Fic-Motiv, im Speziellen das (A/G)N(G/K)-Submotiv, behält seine Funktion als vorwiegender Phosphatbinder bei, mit dem wesentlichen Unterschied, dass das β -Phosphat von CDP-Cholin bzw. das γ -Phosphat von ATP die Position des α -Phosphats aus einer kanonischen Adenylylierung einnimmt^{23;46}. Bedingt durch die inverse Ausrichtung des Nukleotids wird schließlich Phosphocholin bzw. Phosphat auf das Zielprotein übertragen^{23;46}.

Die minimale Fic-Kernstruktur wird in der Regel durch weitere strukturelle Komponenten bzw. Domänen ergänzt³⁹. Eine scheinbar bedeutende Funktion nimmt ein β -*Hairpin* Element zwischen den Helices $\alpha 2$ und $\alpha 3$ ein, das nahezu in jedem bisher strukturell untersuchten Fic-Protein aufzufinden ist³⁹. Für die Interaktion zwischen IbpA und Cdc42 sowie AvrB und Rin4 spielt dies eine wichtige Rolle in der Erkennung und Heranführung des Zielproteins zum Fic-Motiv^{42;47}. Im Fall von IbpA wurde zusätzlich gezeigt, dass die Interaktion durch Wechselwirkung mit einem sogenannten strukturellen Arm N-terminal der Fic-Domäne vervollständigt wird⁴². An die Fic-Kernstruktur angefügte Domänen bzw. strukturelle Elemente sind ein wesentlicher Faktor für die funktionelle Diversität dieser Proteinklasse. Neben der Zielproteinerkennung werden aber auch andere Aspekte erfüllt³⁹. Verschiedene Publikationen beschreiben Strukturbereiche zur Dimerisierung von Fic-Proteinen^{27;41;48;49}. Eine besondere, strukturelle Komponente bildet eine regulatorische Helix, die in den meisten Fic-Proteinen präsent ist und die Kernstruktur flankiert³¹. Die bisherigen Erkenntnisse bezüglich dieses Strukturelements sind für das Verständnis der molekularen Funktionsweise von Fic-Proteinen von enormer Bedeutung und werden im folgenden Abschnitt gesondert aufgeführt.

1.4. Regulation von Fic-Proteinen

Fic-Proteine unterliegen in den meisten Fällen einem simplen, aber beeindruckend effektiven Mechanismus zur Regulation ihrer Aktivität, der auf ein kurzes Sequenzmotiv von sechs Aminosäuren zurückzuführen ist³¹. Es handelt sich dabei um ein hochkonserviertes Inhibitionsmotiv mit der Abfolge (S/T)xxxE(G/N), das als Teil einer Helix, die sogenannte inhibitorische Helix (α_{inh} -Helix), der Transferasefunktion des Fic-Proteins entgegenwirkt³¹. Die α_{inh} -Helix kann Teil eines Interaktionspartners sein oder als fester Bestandteil die eigene Struktur ergänzen³¹. Fic-Proteine, die durch eine α_{inh} -Helix auf externen Proteinen inhibiert werden, zählen zur der Fic-Klasse I oder nach neuer Nomenklatur zu den FicT Proteinen (Fic-Toxin) aufgrund des Toxin-Antitoxin Charakters der Interaktion^{30;31}. Die weitaus häufigere Form ist die im Protein integrierte

α_{inh} -Helix N-oder C-terminal der Fic-Kernstruktur, wodurch entsprechende Proteine in Klasse II bzw. III eingeteilt³¹. Etwa 80% der Fic-Proteine, die eine kanonische Sequenz (*bona fide* Adenylyltransferasen) aufweisen, zählen zur Klasse II¹⁵.

Für Klasse II und III Fic-Proteine ist der Mechanismus der Inhibition strukturell gut untersucht^{31;43}. Es wird bei dieser ungewöhnlichen Form der Selbstregulierung von zwei konformationellen Zuständen ausgegangen, einem geschlossenen und einem offenen Zustand^{31;43}. In der geschlossenen Konformation ist die α_{inh} -Helix dicht an die Nukleotidbindetasche angelagert^{31;43}. Das Serin bzw. Threonin des Inhibitionsmotivs bildet mit dem endständigen Arginin des Fic-Motivs eine Salzbrücke und festigt die Konformation^{18;43}. In diesem Zustand ragt die Seitenkette des Glutamats in die Bindetasche hinein und verdrängt das γ -Phosphats des Nukleotids sterisch und elektrostratisch aus seiner Position^{31;43}. Dargelegt wird dies anhand von Röntgenkristallstrukturen der Proteine SoFic aus *Shewanella oneidenensis* (*S. oneidenensis*), NmFic aus *Neisseria meningitidis* (*N. meningitidis*) und HypE im Komplex mit ATP-Analoga^{27;31;43}. Hervorgerufen durch die sterische Abstoßung nimmt das ATP eine konformationelle Haltung ein, die einen nukleophilen Angriff am α -Phosphat über die Aminosäuren-Seitenkette eines Zielproteins verhindert^{31;43}. Das Glutamat nimmt im Prozess der Inhibition die Schlüsselfunktion ein, sodass eine Mutation an dieser Position zu Alanin oder Glycin zur dauerhaften Aktivierung des Enzyms führen kann^{31;43}. Auf diesen Aspekt ist besonders hinzuweisen, da in der vorliegenden Arbeit alle aktivitätsabhängigen Versuche mit entsprechenden Glutamatmutanten, die auch als konstitutiv aktiv bezeichnet werden, durchgeführt worden sind.

Welche Faktoren eine Öffnung der inhibitorischen Helix bewirken, ist bisher ungeklärt. Am Klasse III Fic-Protein NmFic wurde gezeigt, dass die Aktivität durch eine Kombination aus Automodifikation (intra- oder intermolekulare Modifikation des Enzyms) im inhibitorischen Modul und Oligomerisierung reguliert wird⁴⁹. Initiale Untersuchungen an einem Klasse I Fic-Protein aus *Pseudomonas fluorescens* lassen einen ähnlichen Vorgang vermuten⁵⁰. Im Zusammenhang mit zahlreichen anderen Fic-Proteinen wurde ein derartiger Mechanismus jedoch nicht beobachtet, wodurch eine allgemeine Gültigkeit nicht geschlussfolgert werden kann.

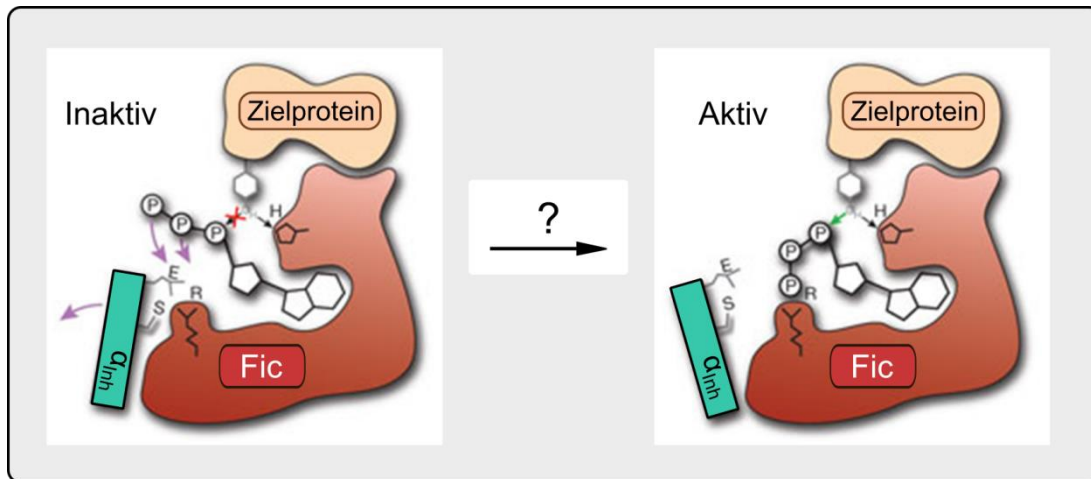


Abbildung 3: Intramolekulare Inhibition der Fic-Domäne. Schematische Darstellung der Fic-Protein Inhibition über die α_{inh} -Helix (grün) mit dem Inhibitionsmotiv (S/T)XXXE(G/N) in Fic-Proteinen der Klasse I bis III (braun). Im geschlossenen Zustand (inaktiv) der α_{inh} -Helix wechselwirkt das Serin bzw. Threonin im Inhibitionsmotivs mit dem endständigen Arginin des Fic-Motivs. Das Glutamat ragt in die Bindetasche hinein und verdrängt in Folge eines sterischen Konflikts mit dem γ -Phosphat des Nukleotids diesen aus seiner Position. Im offenen Zustand (aktiv) orientiert sich das ATP in eine reaktive Position zurück. Es findet eine Adenylierung des Zielproteins (beige) statt. Abbildung modifiziert entnommen aus ³¹, mit Erlaubnis der Nature Publishing Group.

1.5. Phylogenie der Fic-Proteine und ihre Bedeutung für die Medizin

Das Fic-Motiv kann als eindeutige Signatur angesehen werden, die es erlaubt, ein entsprechendes Protein allein anhand der Aminosäuresequenz der Fic-Familie zuzuordnen⁶. So lassen sich über Gen- bzw. Proteindatenbanken leicht wertvolle Informationen bezüglich Vorkommen, Taxonomie oder Phylogenie generieren^{6;51}. Zur systematischen Klassifizierung wird teils anstatt Fic- der Begriff Fido-Proteine verwendet, um explizit zwischen Fic-, Doc- und AvrB-Familie zu unterscheiden⁶. Im Gegensatz zur kanonischen Sequenz der Fic-Proteine weisen Doc-ähnliche Proteine eine unvollständige Fic-Domäne sowie ein degeneriertes Fic-Motiv auf^{39;52}. Die AvrB-Familie weicht in der Primärsequenz deutlich ab, enthält aber ein kanonisches Fic-Motiv und eine charakteristische Fic-Domänen-Faltung⁶. In dieser Arbeit wird der Oberbegriff Fic bevorzugt oder entsprechend differenziert, insofern dies notwendig ist.

Zwei detaillierte *in silico* Studien beschäftigten sich mit der Phylogenie von Fic-Proteinen, woraus Schlüsse zur Ausbreitung der entsprechenden Domäne gezogen werden konnten^{6;51}. In einer Untersuchung von Khater und Mohanty wurde die Fic-Proteinfamilie auf etwa 7000 Vertreter eingegrenzt⁵¹. Die InterPro domain Datenbank enthält ca. 20.000 Sequenzen, die jedoch mit hoher Wahrscheinlichkeit zum Teil redundant sind^{15; 53}. Fic-Proteine sind in allen Bereichen des Lebens (Eukaryoten, Archaeen, Bakterien) existent, jedoch mit deutlicher Mehrheit in Bakterien (~ 90%), dem vermuteten evolutionären Ursprung^{6;51}. Innerhalb der Bakterien sind Fic-Proteine besonders in den Stämmen der Proteobakterien, allem voran den Gammaproteobakterien, kon-

zentriert^{6;51}. Diese Klasse umfasst eine überdurchschnittlich hohe Anzahl an prominenten Krankheitserregern, wodurch sich interessanterweise eine Krankheitsrelevanz der Fic-Proteine ableiten lassen könnte (siehe Anhang, Abbildung 43)⁵⁴. Wie in Abschnitt 1.2. dargestellt wurde, sind einige pathogene Fic-Proteine aus dieser Klasse bereits beschrieben^{9;16;14}. Die taxonomische Einteilung lässt somit auf ein frequentiertes Vorkommen von Fic-Proteinen in Krankheitserregern schließen. Diese Annahme wird durch die Verteilung einzelner Fic-Sequenzcluster über horizontalen Gentransfer, was unter anderem charakteristisch für genomische Pathogenitätsinseln ist, gestärkt^{51;55}.

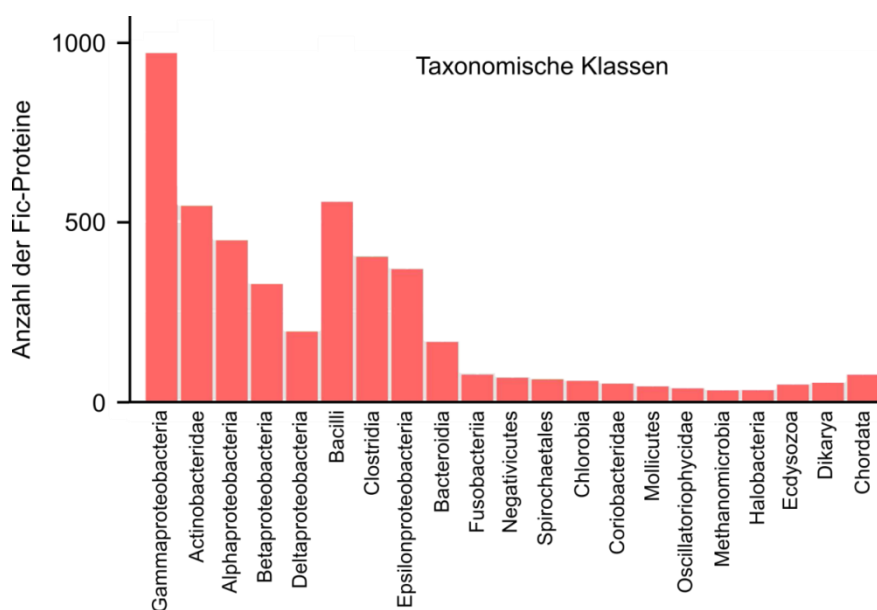


Abbildung 4: Taxonomische Verteilung von Fic-Proteinen. Dargestellt ist die taxonomische Verteilung von Fic-Proteinen anhand einzelner Klassen aus Eukaryoten, Archaeen und Bakterien. Besonders abundant sind Fic-Proteine in den Klassen der Proteobakterien, insbesondere der Gammaproteobakterien. Die dargestellten Daten entstammen einer *in silico* Analyse der nr-Datenbank. Abbildung modifiziert entnommen aus ⁵¹ (Khater und Mohanty; Nature Publishing Group; ISSN 2045-2322, CC-By 4.0; GSATase- und DrrA-Proteinfamilie entfernt).

Ein wesentlicher Teil der bakteriellen Fic-Proteine könnte grundsätzlich für pathogene Aufgaben programmiert sein. Aus medizinischer Sicht birgt dies großes Potential für die Entwicklung von nebenwirkungsarmen Wirkstoffen, da mit HYPE lediglich ein Fic-Protein im humanen Genom codiert ist⁵⁶. Potentielle Angriffsstellen bieten sowohl die Fic-Domäne als auch Regulationselemente wie die α_{inh} -Helix. Ein prominentes Beispiel für die prinzipielle Anwendbarkeit von Inhibitoren bietet das Protein VopS, das als bedeutender Pathogenitätsfaktor beschrieben wurde⁹: Lewallen *et al.* erstellten eine Methode zur Evaluierung von VopS-spezifischen Inhibitoren⁵⁶. In einem Hochdurchsatzverfahren der LOPAC-Sammlung wurden aktivitätsmindernde Liganden mit einer kompetitiven Inhibitionskonstante (K_i) im Bereich von 6–50 μ M identifiziert, die eine Selektivität gegenüber HYPE um den Faktor 30 aufwiesen⁵⁶. Trotz moderater zellulärer Wirkung stellt dies einen aussichtsreichen Ansatz dar⁵⁶.

1.7. Zellinvasive bakterielle Pathogene

Eine Vielzahl verschiedener Bakterien entfaltet besondere Fähigkeiten zur Einnistung in fremde Wirtszellen und zur Entwicklung in einem nährstoffreichen Habitat der Zelle^{57;58}. Gleichsam haben im Laufe der Evolution entsprechende Wirtszellen gut ausgeprägte Abwehrmechanismen hervorgebracht, sodass intrazelluläre Bakterien ausgeklügelte Strategien benötigen, diesen effektiv entgegenzuwirken^{57;58}. Pathogene beherbergen dafür ein Arsenal an spezialisierten Proteinen, sogenannte Effektorproteine⁵⁹. Diese Proteine sind die molekularen Waffen des Bakteriums. Sie werden zeitlich abgestimmt in die Wirtszelle sekretiert und verändern gezielt physiologische Prozesse zur Etablierung der Infektion⁵⁹. Primäre Angriffsziele sind in der Regel Abläufe, die gegen sie gerichtet sind, wie z. B. der lysosomale Abbau oder die Einleitung der Apoptose, und Prozesse, die für ihren Metabolismus von essentieller Bedeutung sind^{59;60}. Für das Eingreifen in die komplexe Physiologie der Zelle ist ein vielfältiges und hochangepasstes Spektrum an Effektoren notwendig⁵⁹. Ein Bakterium kann einige hundert solcher Proteine in seinem Repertoire besitzen (Kinasen, Proteasen, Lipasen usw.)⁵⁹. Ebenso verschieden wie die Effektoren sind die Sekretionssysteme, die Bakterien während ihres evolutiven Anpassungsprozesses entwickelt haben⁶¹. Prinzipiell lassen sich drei verschiedene Arten unterscheiden: Sekretionssysteme, die beim Transportvorgang nur die innere (Tat, Sec) oder nur die äußere Bakterienmembran (Typ: II, V) überwinden und daher grundsätzlich in Kombination auftreten und Sekretionssysteme, die Kanäle über zwei (Typ I) sowie drei Membranen (Typ: III, IV, VI) bilden⁶¹. Letzteres ist vor allem für Pathogene, die nicht frei im Zytoplasma sondern eingeschlossen in einer Vakuole vorliegen, von essentieller Bedeutung⁶¹. Die nahverwandten Spezies *Coxiella burnetii* (*C. burnetii*) und *Legionella longbeachae* (*L. longbeachae*), zwei Gammaproteobakterien aus der Ordnung der *Legionellales*, stellen derartige Pathogene dar^{62;63}. Beide Bakterien starten ihren molekularen Feldzug ausgehend von einem umfunktionierten Phagosom^{64;65}. In der vorliegenden Arbeit wurde die Aufmerksamkeit auf ausgewählte Fic-Proteine aus diesen Organismen gelegt. Die folgenden Abschnitte fassen kurz die charakteristischen Merkmale der *Coxiella*- und *Legionella*-Infektion zusammen und geben anschließend eine Einführung bezüglich der in den Organismen vorkommenden Fic-Proteine.

1.8. *Coxiella burnetii*

Das Bakterium *Coxiella burnetii* aus der Familie der *Coxiellaceae* ist ein obligat intrazellulärer Parasit und der Erreger des Q-Fiebers⁶⁶. Es ist in der Lage, eine Reihe differenter Zellen zu befallen mit Tropismus für alveoläre Makrophagen⁶⁷. *C. burnetii* gelangt in der Regel durch Einatmen kontaminierter Aerosole unter anderem in die Lunge des Menschen⁶⁷. Dort bindet es zunächst über spezifische Rezeptoren an $\alpha_v\beta_3$ -Integrin auf der Oberfläche der Wirtszelle, das seine passive phagozytotische Aufnahme fördert⁶⁶. Eingeschlossen in einer Vakuole, bezeich-

net als *Coxiella containing vacuole* (CCV), ist *C. burnetii* der natürlichen Reifung des Phagosoms zum Lysosom mit den dafür charakteristischen Merkmalen ausgesetzt. Im Gegensatz zu den meisten anderen intrazellulären Pathogenen, blockiert *C. burnetii* diesen Entwicklungsprozess nicht, sondern ist vielmehr auf diesen angewiesen⁶⁶. So ist die Anwesenheit typischer Faktoren der Phagosomenreifung, wie die regulatorischen Proteine Rab5, Rab7 und LAMP1, für die Entwicklung der CCV charakteristisch und für das Bakterium essentiell⁶⁶. Um den Prozess der parasitären Einnistung zu ermöglichen, sekretiert *C. burnetii* ein Arsenal an Effektoren, die in Signal- und Transportwege, Autophagie und Apoptose eingreifen⁶⁶. Zurzeit sind etwa 130 Effektoren bekannt, überwiegend Substrate des Dot/Icm (engl.: *defect in organelle trafficking/intracellular multiplication*) Typ 4-Sekretionssystems (T4SS), die in einer Kombination aus Mutagenesestudien und Sekretionsexperimenten identifiziert wurden^{65,68;69}. Begründet durch bioinformatische Genomanalysen und einem Vergleich mit dem Pathogen *Legionella pneumophila* geht man jedoch von mindestens 200 Effektoren aus⁶⁵. In einem Zeitraum von sechs Tagen vermehrt sich das Bakterium ungestört von lysosomalen Abwehrmechanismen wie der Ansäuerung und der Präsenz von Cathepsinen und Hydrolasen stetig, bis zum Erreichen einer stationären Phase, in der die Vermehrung eingestellt wird⁶⁶. Ab da an verweilen die neu gebildeten Pathogene als Parasiten in der Zelle oder induzieren zur Freisetzung den Zelltod⁶⁶.

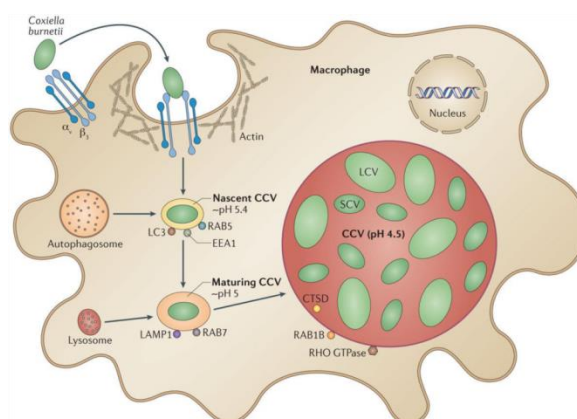


Abbildung 5: Der intrazelluläre Pfad von *Coxiella burnetii*. *Coxiella burnetii* bindet an alveoläre Makrophagen über $\alpha_v\beta_3$ -Integrin auf der Zelloberfläche und stimuliert dadurch seine phagozytotische Aufnahme. Innerhalb der Zelle durchgeht das in *C. burnetii* enthaltene Phagosom (CCV) den natürlichen endosomalen Entwicklungsprozess zum Lysosom. Festzustellen ist dies anhand charakteristischer Proteine des frühen (Rab5, EEA1) und späten Endosoms (Rab7, Lamp1) sowie einer Ansäuerung des Vakuolen-Innenraums. Gegen einen lysosomalen Abbau ist *C. burnetii* jedoch resistent, ferner werden die harschen Bedingungen für eine Entwicklung des Bakteriums von einer kleinen (SCV) zu einer großen Variante (LCV^c) benötigt. Während der Infektion werden verschiedene Effektoren ins Zytosol der Wirtszelle sekretiert, die diverse physiologische Prozesse beeinflussen. Eine wichtige Rolle spielt dabei die Versorgung mit Nährstoffen durch das Autophagosom und die Inhibition der Apoptose. Nach etwa sechs Tagen ist ein Großteil des Zellinnenraums durch die Verschmelzung vieler kleiner CCV zu einer Haupt-CCV eingenommen. Das Bakterium bleibt ab diesem Zeitpunkt entweder als Parasit in einer stationären Phase in der Zelle oder induziert den Zelltod zur Ausbreitung ins umliegende Gewebe. Abbildung entnommen aus ⁶⁶, mit Erlaubnis der Nature Publishing Group.

Im Genom von *C. burnetii* sind insgesamt fünf vorhergesagte Fic-Proteine codiert, wodurch das Bakterium zu einem besonders interessanten Versuchsobjekt in der Erforschung dieser Enzyme wird^{70;71}. Vier der entsprechenden Gene befinden sich auf genomischer DNA, eines davon auf einem separaten Plasmid (pQpH1) (siehe Tabelle 1). Innerhalb der vier *C. burnetii* Isolate (Nine Mile Phase I, Dugway, K (Q154) und H (Q212)), deren Genome vollständig sequenziert wurden und eine hohe Plastizität aufweisen, sind alle Fic-Proteine konserviert^{70;72}. Konkrete Daten zu einer physiologischen Funktion der Fic-Proteine sind in der Literatur nicht aufgeführt. Spärliche Informationen bestehen nur über das Fic-Protein mit der Gennummer CBU_2078, das in dieser Arbeit mit dem systematischen Namen CbFic1 annotiert wird. In einer Sekretionsanalyse ausgewählter *C. burnetii* Proteine unter Verwendung von *Legionella pneumophila* als Surrogat wurde eine Sekretion des Proteins über das T4SS gezeigt und dieses damit als potentieller Effektor eingestuft⁶⁹. Ein Jahr später wurde CbFic1 im Zusammenhang mit einer Phosphocholinierung von humanen Proteinen im Größenbereich von 20-25 kDa gebracht¹⁶. Eine Beobachtung, die nach transienter Expression des Proteins in HEK293T-Zellen festgestellt, aber nachfolgend unzulänglich untersucht und nicht bestätigt wurde¹⁶.

Tabelle 1: Fic-Proteine in *Coxiella burnetii* (strain RSA 493; Nine Mile phase I).

Gen	Proteinname	Lokalisation	Länge (AS)
CBU_0372	Nicht definiert	Genomische DNA	454
CBU_0822	CbFic-2	Genomische DNA	378
CBU_0946	Nicht definiert	Genomische DNA	348
CBU_2078	CbFic-1	Genomische DNA	328
CBUA0003	Nicht definiert	Plasmid pQpH1	153

Prof. Dr. Christian Hedberg führte mit seinem Arbeitskreis in Umeå (Schweden) Immunoblotstudien an Zelllysaten, die von *C. burnetii*-infizierten Zellen entstammen, durch (mündliche Kommunikation). Ziel war es, AMP-modifizierte Wirtsproteine zu identifizieren, die den Einsatz der Proteinadenylylierung als pathogenes Mittel von *C. burnetii* belegen würden. Für den Versuch wurden HeLa-Zellen mit dem Pathogen infiziert und Proben dieser Kultur zu verschiedenen Zeitpunkten entnommen. Anschließend wurden entsprechende Zelllysate mit spezifischen Antikörpern, gerichtet gegen Ser/Thr-AMP und Tyr-AMP, in einem Immunoblot analysiert. Die Untersuchungen zeigten, dass im Infektionsverlauf mit *C. burnetii* mehrere Proteine adenyliert werden, in einer Kontrolllinie gesunder Zellen hingegen nicht. Erste detektierbare AMP-modifizierte Proteine waren bereits eine Stunde nach Infektionsbeginn festzustellen. Wie anhand der Darstellung des Immunoblots in Abbildung 6 zu erkennen ist, äußerte sich dies in mehreren Banden in einem Bereich von 15-70 kDa (Vergleich über das Laufmuster eines Standardmarkers). Dabei stach eine markante Bande bei etwa 15-20 kDa besonders hervor.

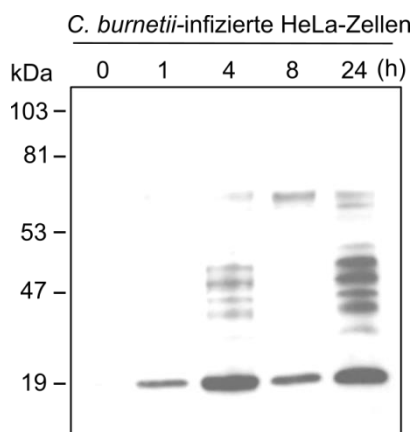


Abbildung 6: Wirtsproteinadenylylierung durch *C. burnetii*.

Dargestellt ist ein α -AMP-Immunoblot zur Erfassung der Proteinadenylylierung während einer *C. burnetii*-Infektion. Für das Experiment wurden HeLa-Zellen mit dem Pathogen infiziert und Zellproben zu verschiedenen Zeitpunkten (0, 1, 4, 8 und 24 h, *post infectionem*) entnommen. Die Untersuchungen wurden durch N. Mohammadi unter der Leitung von Prof. Dr. C. Hedberg in Umeå, Schweden, durchgeführt.

Die α -AMP-Immunoblotstudien offenbarten, dass vermutlich mehrere Adenylyltransferasen an der Infektion mit *C. burnetii* beteiligt sind. Die im Genom des Bakteriums codierten Fic-Proteine stellten in diesem Zusammenhang die kürzeste Verbindung dar, da die Bedeutung dieser Proteine als Virulenzfaktoren bzw. Effektoren anhand anderer Vertreter bereits ausführlich beschrieben wurde (siehe Abschnitt 1.2.).

Ausgehend von diesen Beobachtungen wurden in der vorliegenden Arbeit ausgewählte Fic-Proteine aus *Coxiella burnetii* untersucht. Gegenstand dieser Untersuchung war CbFic1 und das Fic-Protein mit der Gennummer CBU_0822, welches im Folgenden als CbFic2 bezeichnet wird. Im Vorfeld der Arbeit wurden zunächst wertvolle Informationen aus einer *in silico* Analyse der *C. burnetii*-Fic-Proteine bezogen, die in der Regel den Beginn jeder Proteinuntersuchung darstellt. Sequenzähnlichkeiten zu bereits charakterisierten Proteinen sowie Signal- und Struktur motive lassen Vermutungen auf die Funktion und den Aufbau des Proteins schließen und können so helfen, eine experimentelle Strategie zu entwickeln. Folgende Ergebnisse wurden mit Hilfe des SMART-Servers (Simple Modular Architecture Research Tool) und dem Programm HHpred (Homology detection and structure prediction by HMM-HMM comparison) ermittelt^{73;74}:

Das Protein CbFic1 gehört den Fic-Proteinen der Klasse II an. Es enthält im Bereich der Aminosäuren 51-56 ein Inhibitionsmotiv, das sich N-terminal von der Fic-Domäne mit einer kanonischen Fic-Motiv Sequenz zwischen Position 189 und 197 befindet. Der Bereich um die α_{inh} -Helix wird in der Pfam-Datenbank als Fic_N Domäne zusammengefasst und enthält weitere Strukturelemente mit unbekannter Funktion⁷⁵. Am C-Terminus ist eine putative HTH (*helix-turn-helix*)-DNA-Bindungsdomäne angegliedert, die Sequenzhomologie zu bekannten DNA-Bindungsdomänen zeigt. CbFic2 weist eine homologe Domänenarchitektur mit hoher Sequenzähnlichkeit (25% Identität, 37% Ähnlichkeit) und annähernd gleicher Länge auf. Analog zu CbFic1 befindet sich ebenso am C-Terminus von CbFic2 eine vorhergesagte HTH-DNA-Bindedomäne (AS: 304-362), in beiden Fällen mit einem charakteristisch hohen Anteil an basischen Aminosäuren in der AS-Sequenz (pI: ~ 10). CbFic2 enthält ein Inhibitionsmotiv (AS: 62-67) N-terminal vom Fic Motiv (AS: 205-213) und wird daher ebenfalls zu den Klasse II Fic-Proteinen gezählt. Diese gehören mit etwa 80% zu den häufigsten *bona fide* Adenylyltransfera-

sen (Einschätzung aufgrund kanonischer Sequenz), die meist in Kombination mit diversen Domänen auftreten¹⁵. Trotz der hohen Abundanz ist abgesehen vom humanen Vertreter HypE nichts über die biologischen Funktionen dieser Untergruppe bekannt. Initiale Forschungen in dieser Klasse begannen mit der strukturellen Charakterisierung des Proteins SoFic aus *Shewanella oneidensis*, das ebenfalls den Gammaproteobakterien angehört⁴⁸. Analog zu der *in silico* ermittelten Domänenarchitektur von CbFic1 und 2 enthält SoFic eine Fic_N-Domäne am N-Terminus und eine HTH-Domäne am C-Terminus⁴⁸. Die Fic_N-Domäne beinhaltet neben der α_{inh} -Helix einen weiteren kurzen, helikalen Abschnitt, der als Dimerisierungsoberfläche dient⁴⁸. Dieser charakteristische Aufbau, der SoFic, CbFic1 und CbFic2 in eine gemeinsame Kategorie einordnen lässt, ist in zahlreichen datenbankgeführten Fic-Proteinen zu finden und stellt vermutlich eine evolutionär etablierte Fic-Protein-Spezies dar⁶. Aufgrund der in Transkriptionsfaktoren häufig vorkommenden HTH-Domäne werden einige dieser Proteine unter der Bezeichnung *putative transcription factor* geführt. SoFic wurde beschrieben, nach rekombinanter Expression in *E. coli*-Zellen toxisch zu sein und wird daher als mikrobielles Toxin eingeordnet³¹. Ein Substrat bzw. ein Einfluss auf definierte zelluläre Prozesse in *E. coli*-Zellen wurde nicht ermittelt.

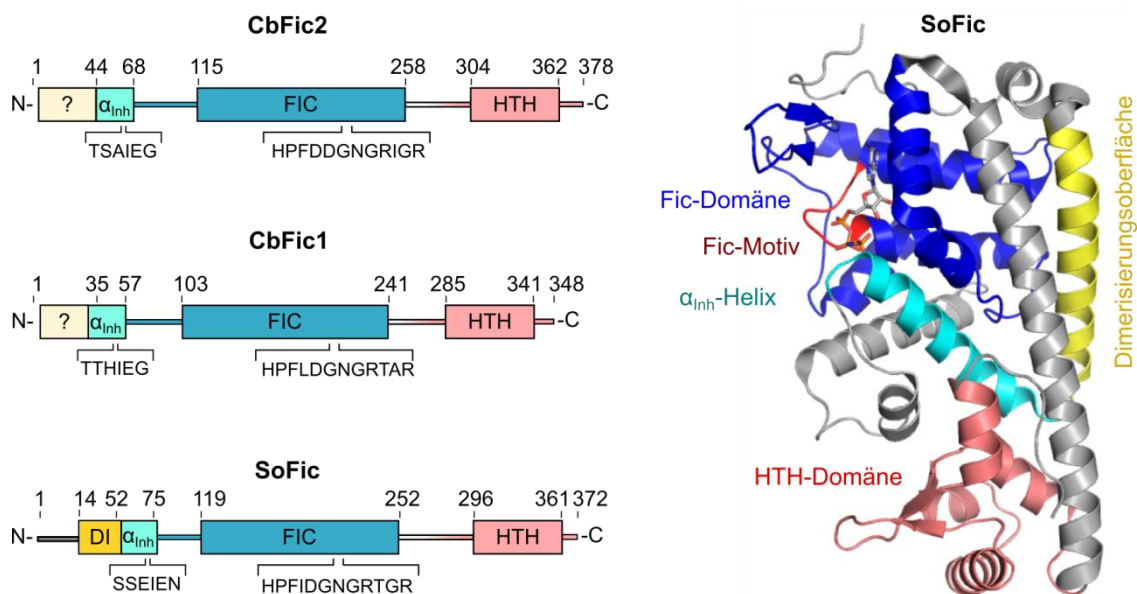


Abbildung 7: Domänenarchitektur der *Coxiella burnetii* Fic-Proteine CbFic1 und CbFic2. (links) Schematische Darstellung der mutmaßlichen Domänenarchitektur von CbFic1 (CBU_2078) und CbFic2 (CBU_0822) aus *C. burnetii* sowie der experimentell bestimmten Domänenarchitektur im Fic-Protein SoFic⁴⁸ aus *S. oneidensis*. Der Vergleich zeigt einen konvergierenden, charakteristischen Aufbau, bestehend aus einer N-terminalen Einheit, die eine regulatorische α_{inh} -Helix (α_{inh}) und ein weiteres strukturelles Element (SoFic: Dimerisierungsoberfläche (DI)) beherbergt, eine zentrale Fic-Domäne (Fic) und eine C-terminale HTH-Domäne (HTH). Die Domänenbestimmung erfolgte über den SMART-Server in Kombination mit einer Phyre²-Strukturvorhersage zur präziseren Eingrenzung entsprechender Abschnitte. (rechts) Röntgenkristallstruktur von SoFic (PDB: 3ZEC)⁴³ in Bänderdarstellung. Kolorierung: Dimerisierungsoberfläche (gelb), α_{inh} -Helix (türkis), Fic-Domäne (blau), Fic-Motiv (rot), HTH-Domäne (rosa), AppNHp (Stabmodell, grau).

Die Fic-Proteine mit den Genbezeichnungen CBU_0372 und CBU_0964 sind nicht Gegenstand dieser Arbeit, weisen aber ebenfalls interessante Merkmale auf und werden daher im Folgenden kurz beschrieben. CBU_0372 stellt mit 454 Aminosäuren das größte *C. burnetii*-Fic-Protein dar⁷¹. Es enthält am N-Terminus zwischen den Positionen 21-38 eine putative Transmembrandomäne sowie einen 42 Aminosäuren langen Bereich am C-terminus, der in der SCOP-Datenbank als Bestandteil von S-Adenosyl-L-methioninabhängigen Methyltransferasen geführt ist⁷⁶. CBU_0946 weist keine bekannten bzw. vorhersagbaren Domänen auf. Es enthält jedoch im Bereich der Aminosäuren 67-152 eine homologe Sequenz zu dem *Salmonella Typhimurium* Virulenzfaktor RhuM, ein Protein, das in der genomischen SPI-3 Pathogenitätsinsel von *Salmonellen* codiert ist⁷⁷. Beide Fic-Proteine weisen ein leicht degeneriertes Fic-Motiv auf, ähnlich zu der Phosphocholintransferase AnkX aus *L. pneumophila*.

1.9. *Legionella longbeachae*

Es existieren über 50 verschiedene *Legionella*-Spezies, Gram-negative, opportunistische Bakterien, wovon die meisten in der natürlichen Umwelt und in kleineren Mikroben vorkommen⁷⁸. Einige Spezies sind jedoch für den Menschen pathogen und verursachen die Legionärskrankheit, eine schwere, atypische Lungenentzündung⁷⁹⁻⁸¹. Für etwa 90% der klinischen Krankheitsfälle ist die Spezies *Legionella pneumophila* (*L. pneumophila*) verantwortlich, gefolgt von *Legionella longbeachae* mit ungefähr 5%⁷⁸. In der Vergangenheit wurden beide Spezies intensiv untersucht, was stark zum Verständnis über die Infektionsstrategie und die zugrundeliegende Maschinerie beigetragen hat. Diese Spezies befallen alveoläre Makrophagen, indem sie nach phagozytotischer Aufnahme durch Manipulation verschiedener zellulärer Signalwege ein replikationspermissives Kompartiment bilden, bekannt als *Legionella Containing Vacuole* (LCV)^{82;83}. Eine Schlüsselfunktion bei diesem Prozess spielt die Rekrutierung von Vesikeln aus dem Endoplasmatischen Retikulum (ER) mit der LCV^{82;83}. Im Gegensatz zu *Coxiella burnetii* können Spezies aus *Legionella* nicht in dem sauren und proteolytisch aktivem Milieu des Lysosoms überleben^{82;83}. Legionellen nutzen daher die Membranidentität des ER, um die LCV zu maskieren und eine endosomale Reifung zum Lysosom zu verhindern^{82;83}. Beim parasitären Überfall von *L. pneumophila* werden bereits wenige Minuten nach Eintritt in die Wirtszelle diverse Effektoren sekretiert, die nach vier Stunden eine LCV nahezu vollständig aus der ER-Membran etabliert haben⁶⁴. Von Beginn der Infektion bis zur Freisetzung der neu gebildeten Legionellen vergehen nur etwa 12 Stunden⁶⁴.

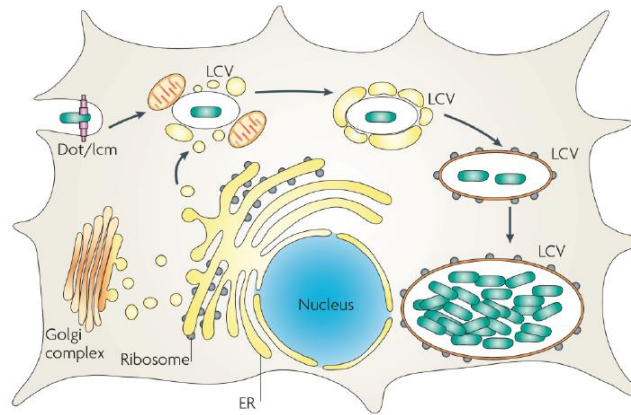


Abbildung 8: Der intrazelluläre Pfad von Legionella (Dargestellt anhand Legionella pneumophila). *L. pneumophila* befällt alveoläre Makrophagen. Dort manipuliert es verschiedene physiologische Prozesse und bildet so unentdeckt von Abwehrmechanismen der Wirtszelle ein replikationspermissives Kompartiment (LCV). Es umgeht dem lysosomalen Abbau durch Maskierung des Phagosoms mit Membranen des Endoplasmatischen Reticulums (ER). Hierfür sekretiert das Bakterium bereits wenige Minuten nach der phagozytotischen Aufnahme diverse Effektoren hauptsächlich über das Dot/Icm T4-Sekretionssystem (T4SS) in die Wirtszelle. Nach etwa 4 Stunden besteht die LCV nahezu vollständig aus rauer ER-Membran. In dieser Phase beginnt die Replikation von *L. pneumophila* innerhalb der LCV. Der Infektionszyklus endet nach etwa 12 Stunden. Die neu gebildeten Pathogene werden aus der Wirtszelle freigesetzt. Abbildung zum Teil entnommen aus ⁶⁴, mit Erlaubnis der Nature Publishing Group.

Trotz des gleichen Krankheitsbildes und scheinbar identischen Prozesse unterscheiden sich die Spezies genomisch und in ihrem Effektorrepertoire immens voneinander⁸⁴. Für *L. pneumophila* sind etwa 60 Effektoren als Substrate des T2- und über 300 Effektoren als Substrate des T4-Sekretionssystems experimentell bestimmt worden. Nur 70% der T2SS- und 30% der T4SS-Substrate sind zu bekannten und hypothetischen Effektoren von *L. longbeachae* homolog⁸⁴. Diese genomische Heterogenität spiegelt sich auch im Fic-Protein Repertoire der beiden Spezies wieder.

L. longbeachae enthält drei Fic-Proteine mit unbekannter Funktion (Gennummern: LLO_0943, LLO_0951 und LLO_3282)⁷⁰. Die Proteine LLO_0943 und LLO_0951 weisen nach *in silico* Analyse (SMART-Server) der Aminosäuresequenz eine alleinstehende Fic-Domäne mit degeneriertem Motiv auf. Die Abwesenheit eines regulatorischen Inhibitionsmotivs verweist auf eine mögliche Rolle der Fic-Proteine in einem Toxin-Antitoxin Modul. Das Protein LLO_0951, in dieser Arbeit mit dem systematischen Namen LpFic bezeichnet, ist ein Fic-Protein der Klasse II mit einer N-terminalen Einheit, die eine α_{inh} -Helix enthält, und einer vorhergesagten HTH-Domäne am C-Terminus. Homologe bzw. sequenzähnliche Fic-Proteine sind in den pathogenen *L. pneumophila* Stämmen (Philadelphia, Paris, Lens, Corby) nicht präsent (eigene Recherche). Hingegen ist in einigen Stämmen das Fic-Protein AnkX, eine Phosphocholyltransferase, und das Multidomänenprotein DrrA (Synonym: SidM), dessen Untereinheit eine atypische Adenylyltransferase aus der Familie der β -Polymerasen darstellt, zu finden^{16;70;85}. Beide Proteine

nehmen als Effektoren eine bedeutende Rolle in der Manipulation der GTPase Rab1 ein. Rab1 ist ein wesentlicher Regulator des vesikulären Transportes zwischen ER und Golgi und bildet für zahlreiche *L. pneumophila*-Proteine das Hauptangriffsziel⁸⁶. Zu Beginn der Infektion wird das Protein an die LCV entführt und dort durch Adenylylierung und Phosphocholinierung in seiner Aktivität und Zugänglichkeit für spezifische Interaktionspartner reguliert⁸⁶.

Interessanterweise führt *L. longbeachae* die mit Rab1 interagierenden Effektoren DrrA und AnkX sowie weitere ungenannte nicht in seinem Repertoire.⁶⁵ Dies verdeutlicht, dass *L. longbeachae* überwiegend unterschiedliche Effektoren zur Verfolgung gleicher Ziele (z.B.: ER-Vesikel Rekrutierung) beherbergt. Derzeitige Forschungen beschäftigen sich mit der Frage, ob die Prozesse der Infektion über dieselben oder alternative Routen erfolgen. Auch eine mögliche Beteiligung der in *L. longbeachae* codierten Fic-Proteine konnte bisher noch nicht geklärt werden.

1.10. Strategien zur Identifizierung von adenylylierten Proteinen

Die Suche nach Zielproteinen bzw. Substraten distinkter Enzyme ist in der Regel ein akribischer Prozess, bei dem diverse unbekannte Faktoren über den Erfolg des Vorhabens entscheiden. Ein generelles Erfolgsrezept ist nicht existent. So ist das experimentelle Vorgehen dem jeweiligen speziellen Fall anzupassen. Die kleine Anzahl an bisher identifizierten Zielproteinen von Fic-Proteinen verdeutlicht, dass effektive Methoden ausgerichtet auf die Reaktion der Adenylylierung bis dato nicht etabliert sind. Die erste Beschreibung einer Fic-vermittelten AMP-Modifikation gründet auf einer sorgfältigen Beobachtung morphologischer Veränderungen einer humanen Zelllinie nach transienter Expression des fraglichen Proteins in dieser⁹. Das untersuchte Protein VopS offenbarte so einen destabilisierenden Effekt auf das Zytoskelett der Zelle⁹. Durch Antizipation möglicher Zielproteine, die im direkten Zusammenhang mit dieser subzellulären Struktur stehen, wurden letzten Endes RhoGTPasen als Substrate von VopS identifiziert; ein Konzept, das sich folglich ebenfalls bei dem Effektor IbpA bewährte und auch in dieser Arbeit reichlich Anwendung fand^{9;14}. Die eukaryotischen Zellsysteme dienen bei diesen Versuchen als Model für eine natürliche Wirtszelle. Die Expression des Fremdproteins simuliert eine entsprechende Sekretion ins Zytosol. Veränderungen in der Vitalität und Morphologie der Zelle sind mit diesem Verfahren geradewegs auf das eingebrachte Protein zurückzuführen und können wichtige Anhaltspunkte auf eine mögliche Einflussnahme bestimmter Prozesse, Signalwege oder zelluläre Strukturen darstellen. Für eine direkte Detektion bzw. Identifikation von potentiell adenylylierten Proteinen müssen Zellen zunächst aufgeschlossen und entsprechende Proteine zugänglich gemacht werden. Diesbezüglich wurden bereits mehrere experimentelle Strategien beschrieben und können prinzipiell in drei Kategorien eingeordnet werden. Die Erste umfasst Methoden, die auf Verwendung von chemischen Sonden beruhen. Grammel *et al.* synthetisierten eine ATP-Sonde mit einer Alkinylfunktion an der N6-Position von Adenosin (N⁶pATP,

p: Propargyl) und überprüften ihre grundsätzliche Anwendbarkeit mit den Proteinen VopS, IbpA und DrrA⁸⁷. Über eine bioorthogonale Azid-Alkin-Cycloaddition (Click-Chemie) konnte Cdc42 als Zielprotein von VopS isoliert und anschließend über Tandem-Massenspektrometrie identifiziert werden⁸⁷. Ein ähnlicher experimenteller Ansatz wurde von Lewallen *et al.* verfolgt, der zur Identifizierung von potentiellen VopS Substraten abseits der Rho-Familie führte³⁵. In den Versuchen wurde Fluoreszein, gekoppelt an der N6-Position von ATP, zunächst für eine Visualisierung der modifizierten Proteine in einem SDS-PA-Gel (engl.: *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel*) und anschließend für eine Immunopräzipitation dieser verwendet³⁵. Eine sehr elegante, aber durch zahlreiche Faktoren limitierte Methode wurde durch Yu *et al.* beschrieben. Zur Identifizierung neuer VopS und IbpA Substrate wurden NAPPA (nucleic acid programmable protein array)-*Microarrays*, die eine zellfreie Transkription und Translation verschiedener Proteine simultan ermöglichen, in Kombination mit N⁶pATP eingesetzt³⁶. Dieser hohe Aufwand wurde mit über 30 neu identifizierten Substraten belohnt³⁶. ATP-Sonden können als sehr effektive molekulare Werkzeuge für die Untersuchung von Fic-Proteinen fungieren, wie anhand der Vorreiterstudien dargestellt wurde. Es sind jedoch zwei wesentliche Schwächen hervorzuheben: Zum einen kann eine zusätzliche chemische Gruppe am Nukleotid mit der Bindung im Protein interferieren. Einige Röntgenkristallstrukturen lassen vermuten, dass auch die scheinbar strategisch geeignete N6-Position Wechselwirkungen mit manchen Fic-Proteinen in der aktiven Tasche eingeht^{31;42}. Zum anderen ist der Einsatz von Sonden auf *in vitro* Methoden und damit der Arbeit mit Zellysaten bzw. gereinigten Proteinen beschränkt. Die starke negative Ladung der Phosphate verhindert eine effektive Einfuhr der Sonden über die Plasmamembran von Zellen und damit die Verwendung *in vivo*⁸⁸. Selbst bei einer guten Zellpermeabilität müssten entsprechende ATP-Analoga gegen die hohe intrazelluläre ATP Konzentration kompetieren⁴. Die Alternativen für eine sondenbasierte Untersuchung stellen massenspektrometrische Analysen oder der Gebrauch von spezifischen α -AMP-Antikörpern dar. Beide Methoden haben den grundlegenden Vorteil, die Adenylylierungsreaktion unter nativen Bedingungen durchführen zu können. In einer Flüssigchromatographie-gekoppelten (LC) Tandem-Massenspektrometrie (MS/MS) können AMP-modifizierte Peptide aus kruden Peptidgemischen über den charakteristischen Massenzuwachs von 329 Da identifiziert und entsprechenden Proteinen zugeordnet werden^{89;90}. Die AMP-Gruppe zeigt jedoch mit sehr unterschiedlicher Ausprägung Instabilität unter den drei gängigen Fragmentationstechniken (Elektron Transfer Dissoziation (ETD), Kollisionsinduzierte Dissoziation (CID) und Hochenergie Kollision (HCD)). Dies äußert sich in einem Neutralverlust der Adenin-, Adenosin- oder der ganzen AMP-Gruppe und kann die Auswertung der entsprechenden Spektren erheblich erschweren^{89;90}. Pielles *et al.* verknüpften die LC-MS/MS Methode mit einer stabilen Isotopenmarkierung⁹¹. Durch Einsatz eines Gemisches aus drei unterschiedlich Isotop-markiertem ATP Varianten konnte bei der MS/MS Spektren-Auswertung ein reportionenspezifischer Cluster als zusätzliches Identifikationsmerkmal herangezogen werden⁹¹. Die

Anwendung umging damit die Probleme der AMP-Fragmentierung, blieb jedoch erneut auf *in vitro* Versuche beschränkt.

Ein sehr nützliches biotechnologisches Utensil in der Untersuchung der Proteinadenylylierung bilden spezifische α -AMP-Antikörper. Die ersten Antikörper dieser Art wurden bereits vor ca. 30 Jahren zur Untersuchung der Glutamin-Synthetase unter Verwendung von adenylylierten Modellproteinen (AMP-Albumin) hergestellt, die jedoch nur eine bedingte Spezifität aufwiesen⁹². Erst durch den Einsatz von AMP-modifizierten Peptiden in der Immunisierung konnten qualitativ hochwertige Antikörper erzeugt werden^{93;94}. Kurze Peptide implementieren weniger ungewünschte Epitope als vollständige Proteine, was im Prozess der Antikörperherstellung zu höherer Spezifität führt. Smit *et al.* entwickelten eine Synthesemethode für die effiziente Herstellung von AMP-modifizierten Serin-, Threonin- und Tyrosinbausteinen⁹⁴. Diese können in einer herkömmlichen Fmoc-Festphasensynthese eingesetzt werden und ermöglichen so die Generierung von beliebigen adenylylierten Peptiden in hoher Ausbeute⁹⁴. Auf Basis dieser Peptide wurden nachfolgend spezifische Antikörper, gerichtet gegen Ser/Thr-AMP und Tyr-AMP, hergestellt⁹⁴. In der vorliegenden Arbeit erwiesen sich diese Antikörper in verschiedenen Immunoblotprozeduren als unentbehrliche Hilfsmittel. Sie erlaubten einen relativ schnellen und zuverlässigen Nachweis einer AMP-Modifikation sowohl von gereinigten Proteinproben als auch von unbekanntem Substraten in komplexen Zelllysaten.

2. Zielsetzung

Das Interesse an der Proteinadenylylierung ist seit ihrer Wiederentdeckung in den vergangenen sieben Jahren sprunghaft angestiegen. Diverse Untersuchungen haben dargelegt, dass diese posttranslationale Modifikation in der Pathogenität vieler Bakterien eine bedeutende Rolle spielt. Als Hauptakteure des enzymkatalysierten Transfers einer AMP-Gruppe auf ein Zielprotein hat sich die Familie der Fic-Proteine hervorgehoben, die über 7000 Vertreter in allen Bereichen des Lebens hält und eine besondere funktionelle Diversität aufweist. Trotz der numerischen Größe ist nur von wenigen Exemplaren dieser Enzymklasse die physiologische Funktion bekannt. Die weitaus größte Fraktion der Fic-Proteinfamilie (Klasse II) ist experimentell noch nahezu unange-tastet, was zeigt, dass die Forschung in diesem Bereich erst am Anfang steht. Begründet durch dieses unzureichende Wissen war es Ziel der Arbeit, ausgewählte Klasse II Fic-Proteine aus dem reichhaltigen Repertoire der bakteriellen Ordnung der *Legionellales*, die potentielle Effektoren darstellen, zu untersuchen.

Als Orientierung dienten Experimente von Prof. Dr. C. Hedberg und Nasibeh Mohammadi an der Universität Umeå, Schweden, die zeigten, dass der intrazelluläre Parasit *Coxiella burnetii* Effektoren zur Adenylylierung von Wirtszellproteinen nutzt. Die Analyse erfolgte über einen α -AMP-Immunoblot mit Lysatproben einer infizierten HeLa-Zelllinie. Da Informationen zur Identität des Zielproteins sowie des/der Effektors/en in dieser Prozedur verborgen blieben, sollten einzelne Fic-Proteine auf eine mögliche Rolle in der *Coxiella burnetii* vermittelten Adenylylierung untersucht werden. In einer Kombination aus zellbiologischen und biochemischen Untersuchungen wurden die Klasse II Fic-Proteine CbFic1 (CBU_2078) und CbFic2 (CBU_0822) erforscht. Die Schwerpunkte der Arbeit sollten mikroskopische Untersuchungen der subzellulären Lokalisation und die Identifizierung potentieller Zielproteine sein. Im Verlauf der Arbeit wurde das Zellkernprotein Histon H3 als physiologisch relevantes Substrat des Fic-Proteins CbFic2 identifiziert. Diese Entdeckung bildete die Grundlage für eine nähere Charakterisierung der Interaktion zwischen Histon H3 und CbFic2 mit verschiedenen *in vitro* Methoden. Ziel war es, die Stellen der AMP-Modifizierung, die Spezifität gegenüber Proteinen der Histonfamilie, kinetische Parameter der Reaktion, die DNA-bindenden Eigenschaften der HTH-Domäne und die Kosubstratspezifität zu ermitteln. In einem parallelen Projekt wurde das zu CbFic2 homologe Fic-Protein LpFic (LLO_0951) aus *Legionella longbeachae* untersucht. Hierzu sollten analog zu den Coxiellenproteinen Methoden zur Bestimmung der subzellulären Lokalisation sowie zur Ermittlung von Substraten herangezogen werden.

3. Ergebnisse

Gegenstand dieser Arbeit ist die Untersuchung von Fic-Proteinen aus den obligat intrazellulären Pathogenen *Coxiella burnetii* und *Legionella longbeachae* mit Hauptaugenmerk auf die Identifizierung potentieller Substrate der Adenylylierung. Zu diesem Zweck wurden ausgewählte Fic-Proteine der Klasse II in einer Kombination aus biochemischen Methoden und mikroskopischen Studien analysiert. In Abschnitt 3.1. wird auf CbFic1 aus *C. burnetii* eingegangen, dessen Untersuchung den Startpunkt dieser Arbeit legte. Abschnitt 3.2. bildet mit dem *C. burnetii* Fic-Protein CbFic² den Kern dieser Arbeit und umfasst intensivere Untersuchungen der Funktion sowie der biophysikalischen Eigenschaften des Proteins. Abschnitt 3.3. widmet sich den Ergebnissen, die mit LpFic aus *L. longbeachae* erzielt wurden.

3.1. CbFic1 aus *Coxiella burnetii*

Das Protein CbFic1, das durch das Gen CBU_2078 codiert wird, ist eines von fünf Fic-Proteinen des Pathogens *C. burnetii* und wurde als Substrat des T4-Sekretionssystems beschrieben. Auf Basis dieser Informationen erfolgten initiale Experimente zur Untersuchung der *C. burnetii* vermittelten Proteinadenylylierung mit CbFic1. Der folgende Abschnitt fasst die Ergebnisse zusammen.

3.1.1. Intrazelluläre Lokalisation von CbFic1

Zur ersten Eingrenzung des möglichen Substratspektrums sollte die subzelluläre Lokalisation des Fic-Proteins CbFic1 in eukaryotischen Zellen charakterisiert werden, sodass in Analogie zu den Arbeiten von Orth und Dixon anhand des zellulären Erscheinungsbildes auf das mögliche Substrat geschlossen werden kann. Entsprechende mikroskopische Untersuchungen fanden in Kooperation mit Prof. Dr. Matthias Feige statt. Hierzu wurden Cos1-Zellen (engl.: *CV-1 in Origin, carrying SV40*) transient mit CbFic1-Genkonstrukten in der Wildtyp-Form sowie der konstitutiv aktiven (E55G) und inaktiven Variante (H189A) transfiziert. In einem vierten Ansatz wurden Zellen mit dem Leervektor (ohne CbFic1 Gen) als Negativkontrolle ausgestattet. Die Zelllinie Cos1 (Fibroblasten) zeichnet sich durch ein hohes Zellvolumen und große Zellorganellen aus und wurde aufgrund dessen zur Erfassung von Veränderungen in der Zellbeschaffenheit gewählt. CbFic1 wurde mit dem Fluoreszenzmarker *Green Fluorescent Protein* (GFP) ausgestattet, was einerseits als Expressionskontrolle, andererseits zur Untersuchung der subzellulären Lokalisation dienen sollte. Da eine Einflussnahme des GFP-Markers auf die Interaktion mit möglichen intrazellulären Strukturen bzw. Zielproteinen in Betracht gezogen werden musste, wurden N- und C-terminal markierte Fic-Proteine analysiert. Die mikroskopische Untersuchung

wurde mit lebenden Zellen durchgeführt, die, wie in Abschnitt 6.6.6. beschrieben, in mit Nährmedium gefüllten Kammerobjektträgern gehalten wurden, um sie vor äußeren Stressfaktoren zu schützen. Weiterhin wurde zur Färbung der Zellkerne der fluoreszente Farbstoff Hoechst-33342 verwendet, welcher im blauen Spektralbereich emittiert und im Vergleich zu 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) eine höhere Zellpermeabilität aufweist. Mikroskopische Aufnahmen wurden in einem Weitfeldmikroskop mit 100-facher Vergrößerung erstellt. Das Lichtbild wurde mit Differentialinterferenzkontrast (DIC) aufgenommen, das gut für die Visualisierung von Oberflächenstrukturen geeignet ist. Repräsentative Aufnahmen der Mikroskopie werden anhand der konstitutiv aktiven Mutante von CbFic1 in Abbildung 9 dargestellt.

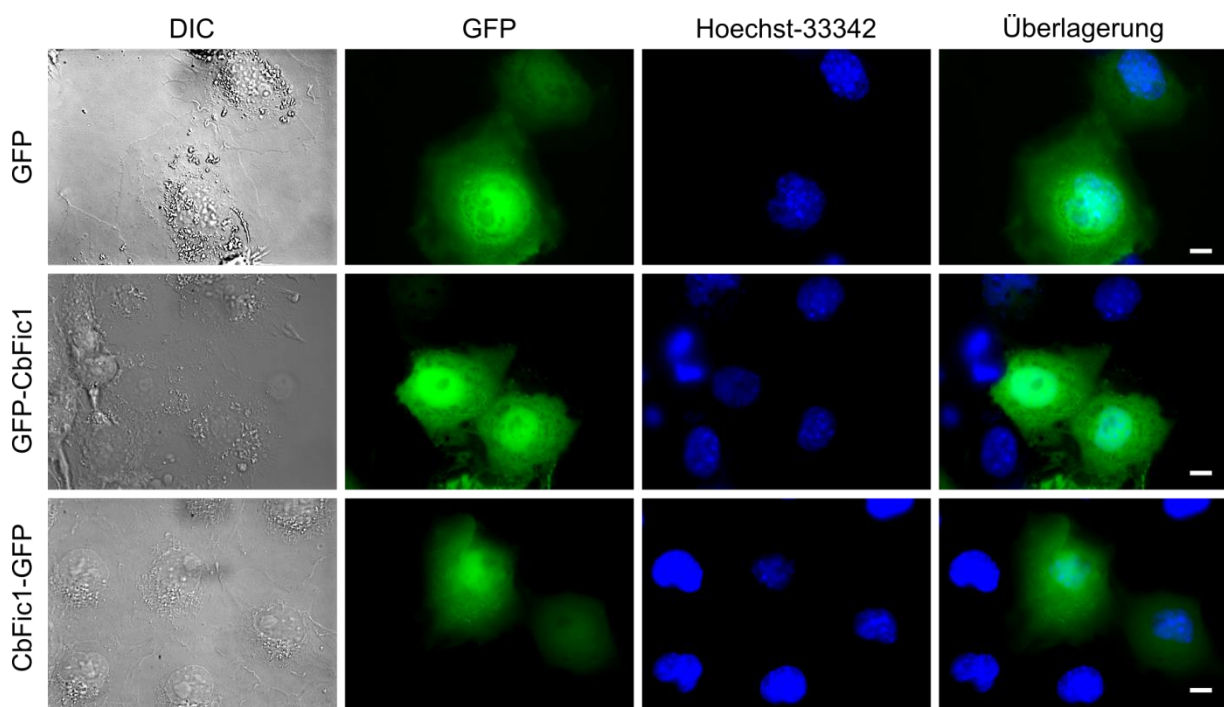


Abbildung 9: Transiente Expression von CbFic1 in Cos1-Zellen. Dargestellt sind fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von GFP (Leervektor), GFP-CbFic1 und CbFic1-GFP. Cos1-Zellen wurden zunächst in Kammerobjektträgern kultiviert, anschließend mit dem GFP markierten CbFic1-Fusionskonstrukten sowie dem GFP enthaltenen Leervektor als Negativkontrolle transfiziert und nach 24 h mikroskopiert. Zur Visualisierung der Zellkerne wurde Hoechst-33342 verwendet. Die Bilderreihen zeigen (von links nach rechts): Differentialinterferenzkontrast, GFP-Kanal (Grün), DAPI-Kanal (Blau) und die Überlagerung beider Fluoreszenzaufnahmen. GFP-CbFic1 und CbFic1-GFP weisen analog zu GFP eine diffuse Verteilung im Zytosol auf. Eine definierte subzelluläre Lokalisation ist nicht sichtbar. Maßstabsleiste: 10 μ m.

Beim Vergleich der Bilder von GFP markierten CbFic1 E55G (N- und C-terminal) und ungebundenem GFP (Vektorkontrolle) sind keine wesentlichen Unterschiede in der intrazellulären Lokalisation erkennbar. In allen Fällen zeigen die Konstrukte eine globale Verteilung im Zytosol der Cos1-Zelle ohne eine definierte Lokalisation an ein subzelluläres Kompartiment. Ein signifikanter Effekt auf die Morphologie der Zelle ist anhand der strukturellen Umrisse ebenfalls nicht er-

fassbar. Cos1-Zellen, die sowohl mit den CbFic1 Konstrukten als auch mit dem Leervektor transfiziert wurden, zeigten ein Lebend/Tod Verhältnis von etwa 7:1, wodurch eine toxische Wirkung des Enzyms ausgeschlossen werden kann. Versuche mit anderen Zelllinien (HeLa, HEK293T) bestätigten die Ergebnisse, sodass keine hilfreichen Schlüsse auf einen potentiellen subzellulären Wirkungsort des Fic-Proteins aus dieser zellbiologischen Untersuchung gezogen werden können.

3.1.2. Untersuchung der CbFic1-Adenylylierungsaktivität

Um mögliche Substrate von CbFic1 zu identifizieren, wurden verschiedene Ansätze verfolgt. Dies beinhaltete *in vitro* Analysen mit Zelllysaten als Substratquelle und chemischen Sonden zur Identifizierung entsprechend modifizierter Proteine sowie Immunoblotuntersuchungen mit spezifischen α -AMP-Antikörpern. Eine Adenylylierung von Proteinen durch CbFic1 konnte jedoch nicht festgestellt werden. Im Folgenden wird repräsentativ eine Immunoblotuntersuchung, in der neben der Adenylylierungs- auch eine potentielle Phosphocholinierungsaktivität von CbFic1 analysiert wurde, dargestellt. Wie bereits in der Einleitung erwähnt, beschrieben Mukherjee *et al.* für CbFic1 eine Phosphocholintransferaseaktivität¹⁶. Die Zuverlässigkeit dieses Ergebnisses wurde infrage gestellt und in einem vergleichbaren Versuchsaufbau überprüft.

Für das Experiment wurde zunächst GFP-markiertes CbFic1 in der Wildtyp-Form sowie der konstitutiv aktiven Variante in HEK293T-Zellen für 24 h transient exprimiert. Neben der inaktiven Variante wurde der Leervektor, der ausschließlich den GFP-Reportertag codiert, in parallelen Ansätzen als Negativkontrolle hinzugezogen. Die Zellen wurden lysiert, das Gesamtprotein gelelektrophoretisch aufgetrennt und für eine α -AMP-Immunoblotanalyse auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Zur Detektion potentieller adenylylierter Proteine wurde ein Gemisch aus α -Ser/Thr-AMP- und α -Tyr-AMP-Antikörpern eingesetzt, um ein breiteres Detektionsspektrum zu erreichen. Nach der Auswertung wurde die Membran von α -AMP-Antikörpern befreit (engl.: *stripped*) und mit α -PC-Antikörpern analysiert. In Abbildung 10 sind die entsprechenden Immunoblotanalysen zur Untersuchung der AMP- bzw. PC-Transferaseaktivität von CbFic1 dargestellt.

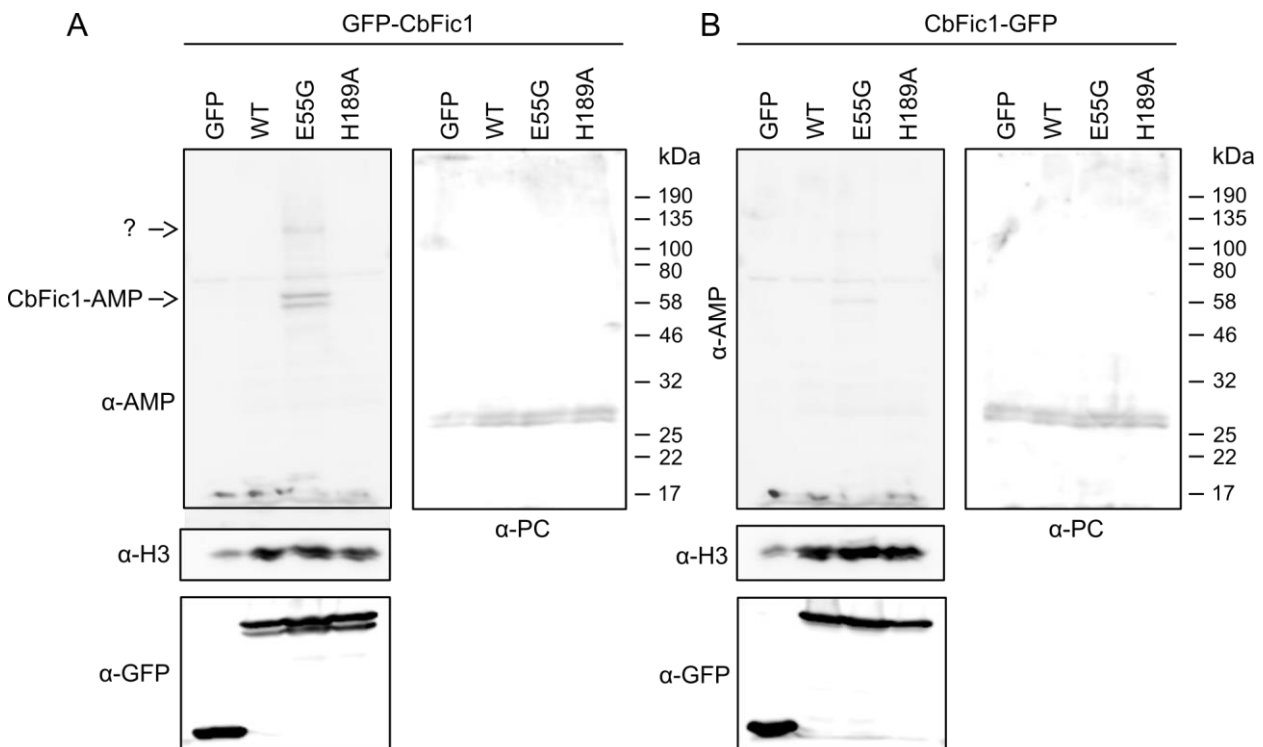


Abbildung 10: Immunoblotuntersuchung zur CbFic1-Transferaseaktivität. HEK293T-Zellen wurden mit CbFic1-Genkonstrukten (CbFic1 WT, CbFic1 E55G und CbFic1 H189A) sowie dem Leervektor als Negativkontrolle transient exprimiert, für 24 h inkubiert, anschließend lysiert und das entsprechende Gesamtprotein zur Immunoblotanalyse gelelektrophoretisch aufgetrennt. Analysiert wurden N- (A) und C-terminal (B) mit GFP markierte Konstrukte. Die Immunoblotanalyse erfolgte mit Antikörpern, gerichtet gegen Ser/Thr- und Tyr-AMP, PC, Histon H3 (Ladekontrolle) sowie GFP (Expressionskontrolle). Zu sehen ist eine CbFic1 E55G vermittelte Adenylierung eines unbekannten Proteins (~ 120 kDa) sowie eine Automodifikation des Proteins mit AMP. Eine Phosphocholintransferaseaktivität von CbFic1 ist nicht festzustellen.

Wie in Abbildung 10 zu erkennen ist, konnte eine CbFic1 vermittelte Phosphocholinierung nicht festgestellt werden; allerdings zeigt CbFic1 eindeutig Adenylierungsaktivität. In der Spur des konstitutiv aktiven CbFic1 E55G, das N-terminal mit GFP markiert ist, befinden sich zwei Detektionsbanden im Bereich der Laufhöhe von 60-80 kDa. Durch Abgleich mit den Detektionssignalen aus dem α-GFP-Immunoblot, dessen Signale sich in Abstand, Höhe und relativer Intensität gleichen, kann dies durch eine Autoadenylierung und einen Abbau von CbFic1-E55G begründet werden. Eine weitere, in der Intensität sehr schwache Bande ist auf Höhe von etwa 120 kDa zu erkennen. Da während einer *C. burnetii*-Infektion keine entsprechende Proteinadenylierung auftritt (vgl. Immunoblot, Abschnitt 1.8.), ist diese wahrscheinlich auf eine irrelevante bzw. unspezifische Reaktion zurückzuführen. CbFic1, das C-terminal mit GFP markiert ist, weist eine deutlich geringere Autoadenylierung auf. Daraus ist zu entnehmen, dass der GFP-Tag an dieser Position mit der Adenylierungsreaktion interferiert und grundsätzlich auch die Erkennung eines potentiellen Substrats beeinflussen könnte.

Die Immunoblotanalyse signalisierte, dass CbFic1 vermutlich als Adenylyltransferase fungiert und keine Phosphocholintransferaseaktivität besitzt. Um diese Beobachtung zu stützen, wurde ein Ligandenbindungstest herangezogen, in dem ATP und CDP Cholin sowie weitere potentielle Kosubstrate (siehe Anhang, Abbildung 49) qualitativ miteinander verglichen wurden. Als Indikator für die Bindung des Nukleotids wurde der Schmelzpunkt (T_M) des Proteins (Mittelpunkt der Entfaltung) in Gegenwart der Nukleotide mittels *Differential Scanning Fluorometry* (DSF) bestimmt. Das Analyseverfahren beruht auf dem Prinzip, dass die Stabilität einer Proteindomäne durch Bindung eines niedermolekularen Liganden, in diesem Fall der Nukleotidkofaktor, aufgrund der zusätzlichen Wechselwirkungen in der Bindetasche gefestigt wird^{95;96}. Der Zuwachs in T_M stellt dadurch einen direkten Zusammenhang zur Affinität der Bindung⁹⁶. Abbildung 11 zeigt repräsentative Schmelzkurven von 5 μ M CbFic1 E55G nach Inkubation mit 0,5 mM ATP bzw. CDP-Cholin sowie eine Balkendarstellung der entsprechenden Schmelzpunkte zur besseren Übersicht. Es lässt sich deutlich erkennen, dass in Gegenwart von ATP ein signifikanter Effekt auf den Schmelzpunkt (ΔT_M : 8°C) vorhanden ist. Hingegen ist durch CDP-Cholin keine Stabilisierung festzustellen. Dies impliziert klar, dass ATP als Kosubstrat gebunden wird, was in Bezug auf CDP-Cholin nicht bestätigt werden kann.

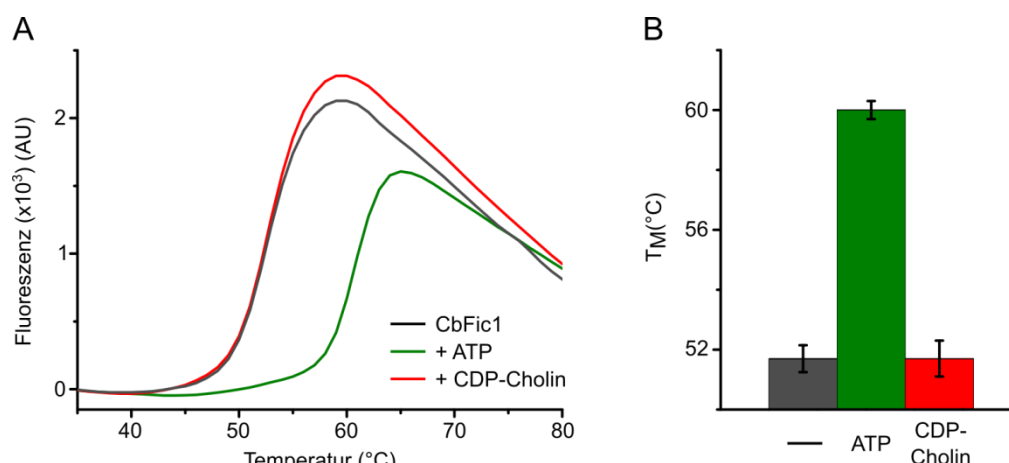


Abbildung 11: Evaluierung der CbFic1-Nukleotidbindung. (A) *Differential Scanning Fluorometry* von CbFic1. Gezeigt sind Schmelzkurven von 5 μ M CbFic1 E55G nach Inkubation mit 0,5 mM ATP, CDP-Cholin sowie von Nukleotid-freiem CbFic1 als Referenz. (B) Balkendiagramm zur Darstellung der ermittelten Schmelzpunkte von CbFic1 E55G in Gegenwart von ATP, CDP-Cholin oder Puffer (Kontrolle). Aufgetragen sind Mittelwerte aus Triplikatemessungen. Vertikale Linien stellen den Standardfehler dar.

Zusammengefasst zeigen die hier dargestellten Ergebnisse, dass CbFic1 sehr wahrscheinlich keine Phosphocholintransferase, sondern, wie von der Primärsequenz angedeutet (z.B.: kanonisches Fic-Motiv; siehe Abschnitt 1.8.), eine Adenylyltransferase ist. Mukherjee *et al.* beschrieben für CbFic1 eine Phosphocholintransferaseaktivität, die sich in Detektionsbanden im Bereich von 20-25 kDa in einem Immunoblot mit α -PC Antikörpern präsentierte¹⁶. Nahezu identische Beobachtungen wurden mit dem Fic-Protein AnkX aus *L. pneumophila* in einem parallelen An-

satz gemacht, dessen Funktion als Phosphocholintransferase für die GTPasen Rab1 und Rab35 bekannt ist¹⁶. Eine Bestätigung dieser Ergebnisse durch weitere Experimente, wie z. B. einer *in vitro* Reaktion mit gereinigten CbFic1 und RabGTPasen, ist nicht publiziert, was vermuten lässt, dass experimentelle Fehler (z.B. Verwechslung von Proben) in der entsprechenden Immunoblotuntersuchung zugrunde lagen.

Unabhängig von der Kosubstratspezifität konnte in dieser Arbeit keine relevante enzymatische Aktivität von CbFic1 gegenüber Proteinen eukaryotischer Zelllinien festgestellt werden. Zur Identifizierung von Substraten, ferner zur Klärung der Fragestellung, inwiefern das Enzym an der *C. burnetii*-Infektion beteiligt ist, wird eine alternative Untersuchungsstrategie nötig sein.

3.2. CbFic2 aus *Coxiella burnetii*

Die Untersuchungen von CbFic2, das durch das Gen CBU_0822 codiert wird, führten zur Identifikation von Histon H3 als physiologisch relevantes Substrat, was die Grundlage für eine ausgedehnte Charakterisierung dieser Interaktion bildete. Die Ergebnisse dieses Kapitels werden in drei Teile gegliedert. Der erste Abschnitt befasst sich mit Untersuchungen von CbFic2 nach transienter Expression in eukaryotischen Zelllinien. Darauf folgt die Darstellung von Experimenten zur Inspizierung der Histon H3-Adenylylierung *in vitro* sowie reaktionsrelevanter, biophysikalischer Eigenschaften von CbFic2. Zuletzt werden experimentelle Ansätze präsentiert, welche die physiologischen Auswirkungen der CbFic2 vermittelten Adenylylierung näher beleuchten sollten.

3.2.1. Untersuchung von CbFic2 in Säugetierzellen

3.2.1.1. Intrazelluläre Lokalisation von CbFic2

In Konvergenz zur Vorgehensweise bezüglich der Untersuchung von CbFic1 sollte zur ersten Eingrenzung des möglichen Substratspektrums die subzelluläre Lokalisation des Fic-Proteins CbFic2 charakterisiert werden. Hierzu wurden sowohl N- als auch C-terminale GFP-Fusionskonstrukte in Cos1-Zellen für 24 h transient exprimiert, die Zellen anschließend mit Hoechst-33342 zur Zellkernfärbung behandelt und in Nährmedium enthaltenen Kammerobjektträgern mikroskopisch analysiert. In Abbildung 12 sind repräsentative licht- sowie fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der transfizierten Zellen dargestellt.

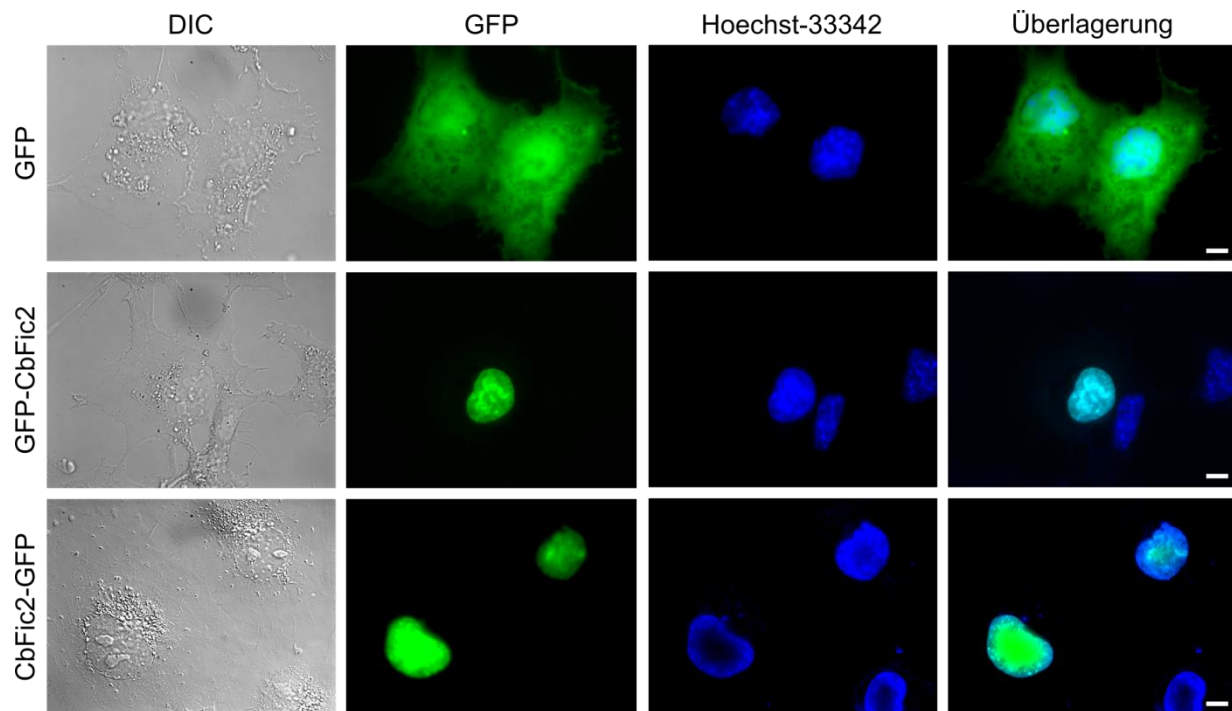


Abbildung 12: Intrazelluläre Lokalisation von CbFic2. Abgebildet sind fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von Cos1-Zellen, die transient GFP, GFP-CbFic2 oder CbFic2-GFP exprimieren. Cos1-Zellen wurden zunächst in Kammerobjektträgern kultiviert, anschließend mit GFP markierten Konstrukten sowie dem GFP enthaltenen Leervektor als Negativkontrolle transfiziert und nach 24 h mikroskopisch untersucht. Zur Visualisierung der Zellkerne wurden diese mit Hoechst-33342 gefärbt. Die Bilderreihen zeigen (von links nach rechts): Differentialinterferenzkontrast, GFP-Kanal (Grün), DAPI-Kanal (Blau) und die Überlagerung beider Fluoreszenzaufnahmen. Deutlich zu erkennen ist eine Kolokalisation von CbFic2-GFP und Hoechst-33342. Maßstabsleiste: 10 µm.

Beim Vergleich der Aufnahmen ist prägnant erkennbar, dass die Fluoreszenz des GFP-markierten CbFic2 mit der des nukleären Markers Hoechst-33342 präzise überlagert, was auf eine Lokalisation im Zellkern hinweist. Hingegen illustrieren entsprechende Aufnahmen der Vektorkontrolle eine globale Verteilung des ungebundenen GFP innerhalb der Zelle; eine Gegebenheit, die darauf hindeutet, dass der Fluoreszenzmarker gelöst im Zytosol ohne eine signifikante Akkumulierung an eine bestimmte intrazelluläre Struktur vorliegt. Aus diesem signifikanten Unterschied kann geschlossen werden, dass die Zellkernlokalisation allein auf das CbFic2 zurückzuführen ist. Es indiziert zudem die Kompatibilität des Proteins mit dem eukaryotischen nukleären Importsystem. Somit birgt CbFic2 eine adaptierte eukaryotische Eigenschaft; ein starker Hinweis, dass es sich bei diesem Protein um einen Effektor handelt, der während einer *C. burnetii*-Infektion in die Wirtszelle sekretiert wird.

3.2.1.2. CbFic2 adenyliert Histon H3 *in vivo*

Die vorangegangene mikroskopische Untersuchung zeigte, dass CbFic2 im Zellkern lokalisiert und implizierte damit eine im Zellorganell spezifische Funktion. Ausgehend von diesen Erkenntnissen wurde anschließend nach potentiellen Zielproteinen gesucht. Hierzu wurden HEK293T-Zellen in einer Multiwell-Platte kultiviert und mit CbFic2-GFP-Genkonstrukten in der Wildtyp Form sowie der konstitutiv aktiven und inaktiven Variante transfiziert. Neben der inaktiven Variante diente der Leervektor in einem parallelen Ansatz als Negativkontrolle. Die transiente Expression wurde für 48 h ausgeführt, anschließend wurden die Zellen lysiert und elektrophoretisch in einem SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Das aufgetrennte Gesamtprotein, eine Art Spiegelbild des Proteoms, wurde in einem Immunoblot mit α -Ser/Thr-AMP-Antikörpern analysiert. In Abbildung 13B sind entsprechende Chemolumineszenzaufnahmen nach Inkubation mit α -Ser/Thr-AMP-Antikörpern sowie α -Histon H3 als Ladekontrolle und α -GFP als Expressionskontrolle abgebildet. Zusätzlich wird ein SDS-PA-Gel zur Veranschaulichung der Komplexität der Zellysate-Proben gezeigt.

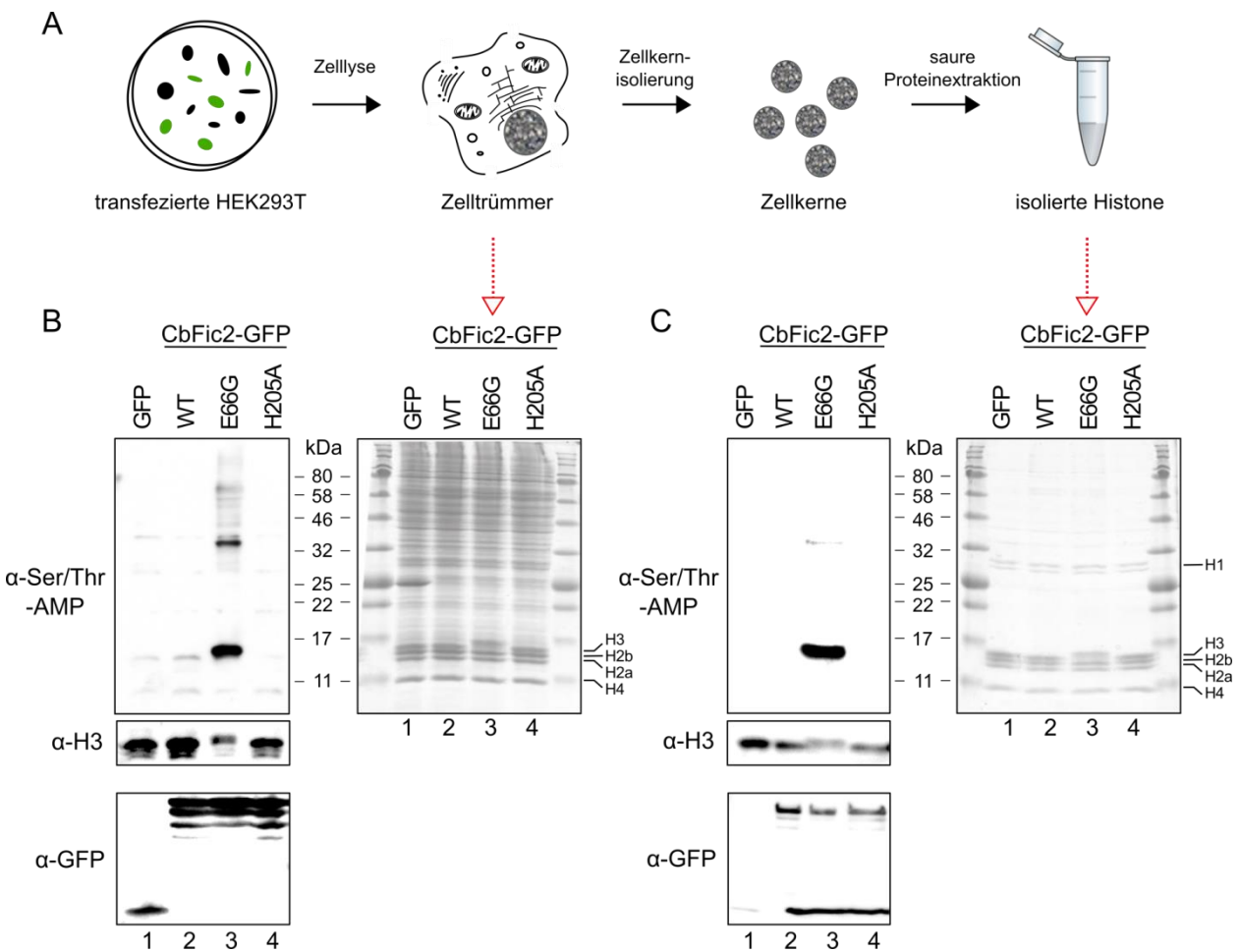


Abbildung 13: CbFic2 adenyliert Histon H3 *in vivo*.

(A) Schematische Darstellung der experimentellen Vorgehensweise zur Identifizierung potentieller Zielproteine von CbFic2 in eukaryotischen Zellen. HEK293T-Zellen, die transient CbFic2-GFP in der WT Form sowie der konstitutiv aktiven und inaktiven Variante exprimieren, wurden für 48 h bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert und anschließend zur Totalproteinextraktion (B) sowie zur sauren Extraktion von Histonen (C) lysiert und die entsprechenden Proteinpräparationen gelelektrophoretisch aufgetrennt. Die aufgetrennten Proteine wurden im nächsten Schritt in einem Immunoblot mit Antikörpern gerichtet gegen Ser-/Thr-AMP sowie Histon H3 (Ladekontrolle) und GFP (Expressionskontrolle) analysiert. Transient exprimiertes CbFic2 adenylyliert in HEK293T-Zellen Histon H3 sowie ein unbekanntes Protein mit einem Molekulargewicht von ca. 40 kDa.

Die Chemolumineszenzaufnahme der α -Ser/Thr-AMP-Analyse in Abbildung 13B zeigt zwei markante Banden in der Spur der exprimierten konstitutiv aktiven Mutante (CbFic2-E66G), die eindeutig auf adenylylierte Proteine hinweisen. Demgegenüber sind bis auf einen schwachen Hintergrund in den Spuren der Kontrollproben (Leervektor und konstitutiv inaktives CbFic2-H205A) und dem Wildtyp keine Banden zu erkennen. Die α -AMP-Signale, bei denen die Untere in der Intensität am stärksten ist, befinden sich auf einer Laufhöhe, die etwa 15 und 40 kDa entspricht. Weiterhin sind einige schwache Banden mit abnehmender Intensität ausgehend von einer Masse von ca. 70 kDa erkennbar; ein Muster, was charakteristisch für den Abbau eines Proteins ist. Vermutlich beruhen diese Signale auf einer Autoadenylylierungsaktivität von CbFic2, das in Fusion mit GFP eine Masse von 72,2 kDa umfasst. Diese Vermutung wird durch die Ergebnisse des α -GFP-Immunoblots gestützt, in dem ein deutlicher Abbau des exprimierten Fusionskonstrukts nachzuweisen ist. Der α -Histon H3-Antikörper wurde zwecks einer Ladekontrolle der Blotmembran verwendet. Auffällig ist, dass die Detektion von Histon H3 in der Spur des aktiven CbFic2-E66G eine merklich schwächere Bande aufweist, wogegen die restlichen Spuren ein uniformes Signal bergen. Eine ungleichmäßige Beladung der Spuren liegt jedoch nicht vor, was aus der Ponceau Färbung sowie auch der Betrachtung weiterer unspezifischer Banden im Blot ersichtlich wird (siehe Anhang, Abbildung 44). Weiterhin ist zu vermerken, dass die Position des Detektionssignals der Histon H3-Bande im Vergleich zu den anderen Spuren etwas höher liegt, was auf eine höhere Retention im SDS-PA-Gel zurückzuführen ist. Ein direkter Einfluss des aktiven CbFic2-E66G ist hier naheliegend.

Zusammengefasst führten die Tatsachen, dass eines der potentiellen Zielproteine eine Masse von ungefähr 15 kDa aufweist, die exklusive Zellkernlokalisation von CbFic2 und die aufgeführten Erkenntnisse zur Histon H3-Antikörperbindung zur Mutmaßung, dass CbFic2 das Zellkernprotein Histon H3 adenylyliert. Um dies zu bestätigen, wurde das Experiment wiederholt mit dem wesentlichen Unterschied, dass zur Immunmarkierung anstatt totaler Zellextrakte lediglich extrahierte Histone verwendet wurden. Die Histone wurden, wie in Abschnitt 6.3.4. beschrieben, nach Isolierung der Zellkerne mit 12 M HCl sauer extrahiert; eine Methode, die sich die enorme Basizität der Kernproteine zunutze macht. Histone bleiben unter diesen harschen Bedingungen gelöst, wohingegen nahezu alle restlichen Proteine präzipitieren. Der Erfolg der Histonisolierung ist beim Vergleich der SDS-PA-Gele aus Abbildung B und C ersichtlich; vorherrschend ist nach

der Extraktion das prägnante Bandenmuster der Histone in der Reihenfolge H1 (~ 20 kDa), H3 (~ 15 kDa), H2b (~ 13 kDa), H2a (~ 13 kDa) und H4 (~ 11 kDa). Die entscheidende Erkenntnis bei dem Folgeexperiment war jedoch, dass das α -AMP-Detektionssignal auf Laufhöhe des Histons H3 im Immunoblot bestehen bleibt und zudem in Korrespondenz mit der Anreicherung des Histons in der Signalintensität zunimmt. Dieses Ergebnis bestätigte die These der Histon H3-Adenylylierung durch CbFic2 und stellte die Grundlage für die nähere Charakterisierung dieser Interaktion in der hier vorliegenden Arbeit. Die Kernaussage des aufgeführten Experiments ist somit: CbFic2 adenylyliert Histon H3 *in vivo*.

Im Folgenden wird zudem auf zwei Nebenaspekte der hier beschriebenen Beobachtungen eingegangen. Als erstes ist die Präsenz des zweiten, deutlichen α -AMP-Detektionssignals auf Höhe von etwa 40 kDa zu erwähnen. Aufgrund der hohen Intensität der Bande handelt es sich hierbei vermutlich um ein physiologisch relevantes Zielprotein. Die Identität dieses Proteins blieb im Rahmen dieser Arbeit unbekannt. Versuche mit Zellfraktionen zeigten, dass das potentielle Zielprotein vermutlich ubiquitär in der Zelle vorliegt. Detektionssignale wurden in Fraktionen des Zytosols, des Zellkerns und in einem Extrakt von Membranproteinen gefunden (siehe Anhang, Abbildung 45). Die Annahme einer globalen Verteilung des Proteins in der Zelle wird zusätzlich durch eine domänenabhängige Lokalisationsstudie bestätigt (siehe Abbildung 16). Verschiedene Ansätze, das Protein zu identifizieren, blieben erfolglos.

Zuletzt ist die erhöhte Retention von Histon H3 in einer SDS-PAGE zu diskutieren. Das veränderte gelelektrophoretische Laufverhalten kann aus physikalischer Sicht nur drei Ursachen haben: Eine erhöhte Masse, ein Zuwachs im sphärischen Anspruch oder ein deutlich veränderter Ladungszustand. Es stellte sich die Frage, ob die AMP-Modifikation allein oder andere zelluläre Faktoren bzw. eine weitere Prozessierung des Proteins dies, ausgelöst durch die Adenylylierung, verursacht. Dieser Sachverhalt wurde mittels gereinigtem MBP (engl.: *Maltose Binding Protein*)-CbFic2 E66G und Histon H3 in einer *in vitro* Adenylylierung geklärt. Wie auf dem SDS-PA-Gel in Abbildung 14 zu erkennen ist, verschiebt sich die Bande sowohl vom gereinigten Histon H3.1 als auch aus HEK293T-Zellen isolierten Histon H3 nach Inkubation mit MBP-CbFic2 E66G und ATP. Damit ist belegt, dass für die erhöhte Retention des Histon H3-Proteins lediglich die AMP-Modifikation verantwortlich ist.

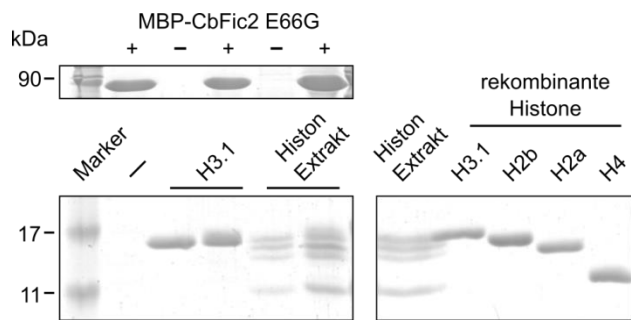


Abbildung 14: Gelelektrophoretische Retention von Histon H3-AMP. Links: Rekombinantes Histon H3 (gereinigt, NEB) und aus HEK293T-Zellen isolierte Histone wurden mit MBP-CbFic2 E66G und 5 mM ATP für drei Stunden inkubiert und anschließend in einer SDS-PAGE analysiert. Das adenylierte Histon H3 weist im Vergleich zum unmodifizierten Protein eine erhöhte Retention im Gel auf. Rechts: Vergleich von gereinigten, rekombinanten Histonen (H2a, H2b, H3, H4) mit dem Bandenmuster extrahierter Histone in einer SDS-PAGE.

3.2.1.3. CbFic2 adenyliert Histon H3 in Abhängigkeit einer Zellkernlokalisierung

Zur weiteren Untersuchung von CbFic2 in einem eukaryotischen Zellsystem wurden DNA-Konstrukte des Proteins mit terminalen Verkürzungen sowie Deletionen mutmaßlicher Domänen generiert. Dies sollte einerseits den Einfluss einzelner Sequenzabschnitte auf die intrazelluläre Zellkernlokalisierung des Proteins, andererseits die Auswirkung auf die enzymatische Funktion der Fic-Domäne näher erörtern.

Die Versuche in Abschnitt 3.2.1.1. bestätigten, dass der GFP-Tag an beiden Termini von CbFic2 die Zellkernlokalisierung sowie die Adenylierung von Histon H3 nicht beeinträchtigt. So wurden den N-Terminus betreffend Verkürzungskonstrukte C-terminal mit dem fluoreszenten Protein markiert und Konstrukte mit Verkürzung am C-Terminus entsprechend am N-terminus. Weiterhin wurden die CbFic2-Genkonstrukte in der konstitutiv aktiven Form (E66G) erstellt, um den Einfluss auf die Adenylierungsaktivität in einem α -Ser/Thr-AMP-Immunoblot erfassen zu können. Die Grenzen, der hier eingesetzten Konstrukte, wurden auf Basis von *in silico* Untersuchungen der Sekundär- und Tertiärstruktur festgelegt (siehe Abschnitt 1.8.). Schnittpunkte wurden bevorzugt an putativ ungeordneten Bereichen sowie Verbindungselementen gesetzt, um keine für die Stabilität des Proteins unerlässlichen Strukturelemente zu degenerieren. In Abbildung 15 sind repräsentative Fluoreszenzaufnahmen von Cos1-Zellen, nach Transfektion, der hier analysierten Konstrukte abgebildet. Zur Zellkernmarkierung und Kolokalisationsanalyse wurde, wie bereits in Abschnitt 3.2.1.1. beschrieben, Hoechst-33342 verwendet. Eine schematische Darstellung der eingesetzten Konstrukte ist linksseitig den jeweiligen Bildern zugeordnet.

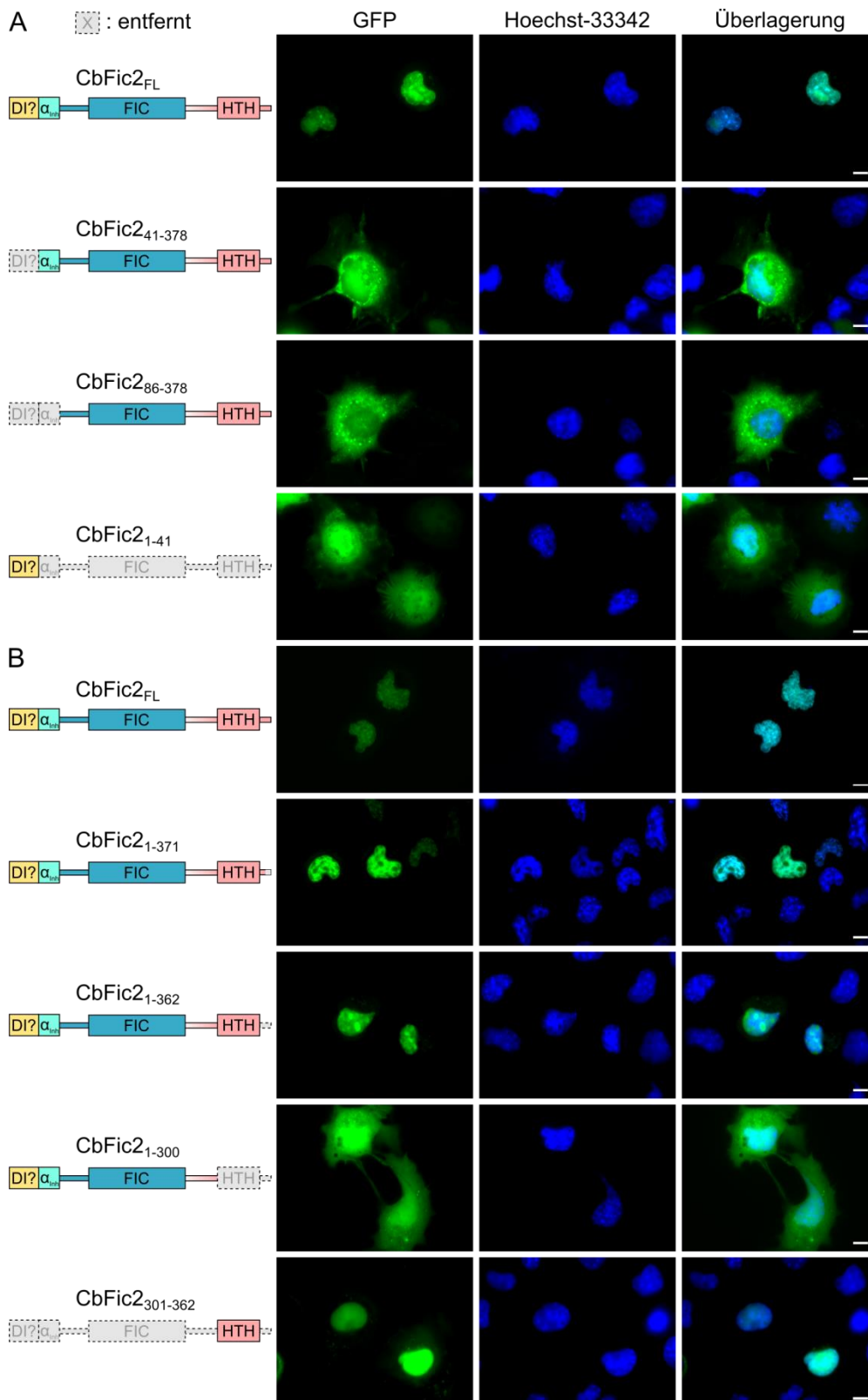


Abbildung 15: Intrazelluläre Lokalisation von CbFic2-Verkürzungskonstrukten. Dargestellt sind Fluoreszenzaufnahmen von Cos1-Zellen, die transient GFP markierte CbFic2-Konstrukte exprimieren (grün), entsprechende mit Hoechst-33342 gefärbte Zellkerne (blau) und eine Überlagerung beider Aufnahmen. Folgende Konstrukte sind aufgeführt: (A) GFP-CbFic2_{FL} sowie Verkürzungen des Proteins am N-Terminus (GFP-CbFic2₁₋₄₁, CbFic2₁₋₈₆) und der N-terminale Abschnitt GFP-CbFic2₁₋₄₁. (B) CbFic2_{FL}-GFP, die C-terminal verkürzten CbFic2₁₋₃₇₁-GFP und CbFic2₁₋₃₆₂-GFP und CbFic2₃₀₁₋₃₆₂-GFP (HTH-Domäne). Die Fluoreszenzaufnahmen zeigen eine durch die HTH-Domäne vermittelte Lokalisation im Zellkern. Maßstabsleiste: 10 µm.

Verkürzungen am N-Terminus von CbFic2 bezogen sich auf den Bereich AS 1-41, ein vermutlich α -helikaler Abschnitt, der als Dimerisierungsoberfläche dient, und AS 1-86, der zusätzlich die nachfolgende inhibitorische α -Helix beinhaltet. Beide Konstrukte zeigten eine globale Verteilung im Zytosol der Zelle mit punktförmigen Akkumulierungen im perinukleären Raum, vermutlich dem ER (siehe Abbildung 15A). Es ist jedoch anzumerken, dass es sich bei den Akkumulierungen nicht zwangsweise um eine gerichtete Lokalisation handeln muss, vielmehr ist eine Proteinaggregation in Folge von Fehlfaltung bzw. verringerter Löslichkeit wahrscheinlicher. Eine Lokalisation innerhalb des Zellkerns, wie es CbFic2 in Volllänge (engl.: *full length*; CbFic2_{FL}) aufweist, konnte nicht beobachtet werden. Aus diesem Grund wurde mit dem Konstrukt GFP-CbFic2₁₋₄₁ überprüft, ob der N-terminale Bereich für die Präsenz von CbFic2_{FL} im Zellkern beispielsweise durch eine Kernlokalisationssequenz verantwortlich ist. Wie jedoch in der letzten Bilderreihe in Abbildung 15A zu erkennen ist, findet keine Zellkernlokalisierung statt.

C-terminale Verkürzungen von CbFic2 umfassten einen kurzen, mutmaßlich unstrukturierten Fortsatz mit einer Länge von 16 Aminosäuren (AS 363-378), der das C-terminale Ende des Proteins und die gesamte *in silico* vorhergesagte HTH-Domäne (AS 301-361) bildet. Abbildung 15B zeigt repräsentative Fluoreszenzaufnahmen der hier verwendeten C-terminalen CbFic2-Verkürzungskonstrukte. Es ist deutlich zu erkennen, dass die letzten 6 ebenso wie die letzten 16 Aminosäuren von CbFic2 (AS 371-378 u. AS 363-378) keinen Einfluss auf die Zellkernlokalisierung haben. Ein signifikanter Unterschied ist mit diesen Konstrukten im Vergleich zum Vollängenprotein nicht ersichtlich. Hervorzuheben sind hingegen GFP-CbFic2₁₋₃₀₀ und GFP-CbFic2₃₀₁₋₃₆₂, gewissermaßen Konstrukte einer Zweiteilung von CbFic2 im Verbindungsstück zwischen Fic- und HTH-Domäne. Die Fluoreszenzaufnahmen von GFP-CbFic2₁₋₃₀₀ zeigen eine gleichmäßige Verteilung des GFP-Fluoreszenzsignals im Zytosol und demonstrieren unmissverständlich, dass die Deletion der HTH-Domäne zu einer Lokalisierung außerhalb des Zellkerns führt. Im Gegensatz dazu weist GFP-CbFic2₃₀₁₋₃₆₂ eine klare Überlagerung mit den nukleären Marker Hoechst 33342 auf, folglich eine Lokalisation im Zellkern. Dies erlaubt die Schlussfolgerung, dass die HTH-Domäne für die CbFic2 Lokalisation im Zellkern maßgeblich verantwortlich ist.

Der zweite Teil der Domänenstudie befasste sich mit den Auswirkungen auf die Histon H3-Adenylylierung. Hierfür wurden die transient transfizierten Zellen lysiert, das Gesamtprotein gelelektrophoretisch getrennt und einer Immunoblotanalyse zugeführt. Die Evaluierung der Histon H3-Adenylylierung erfolgte, identisch zur Vorgehensweise in Abschnitt 3.2.1.2., unter Zuhilfenahme von α -Ser/Thr-AMP, α -H3 (Ladekontrolle) und α -GFP (Expressionskontrolle) Antikörpern. In Abbildung 16 sind entsprechende Immunoblotanalysen, repräsentativ für zwei voneinander unabhängige Versuche, dargestellt.

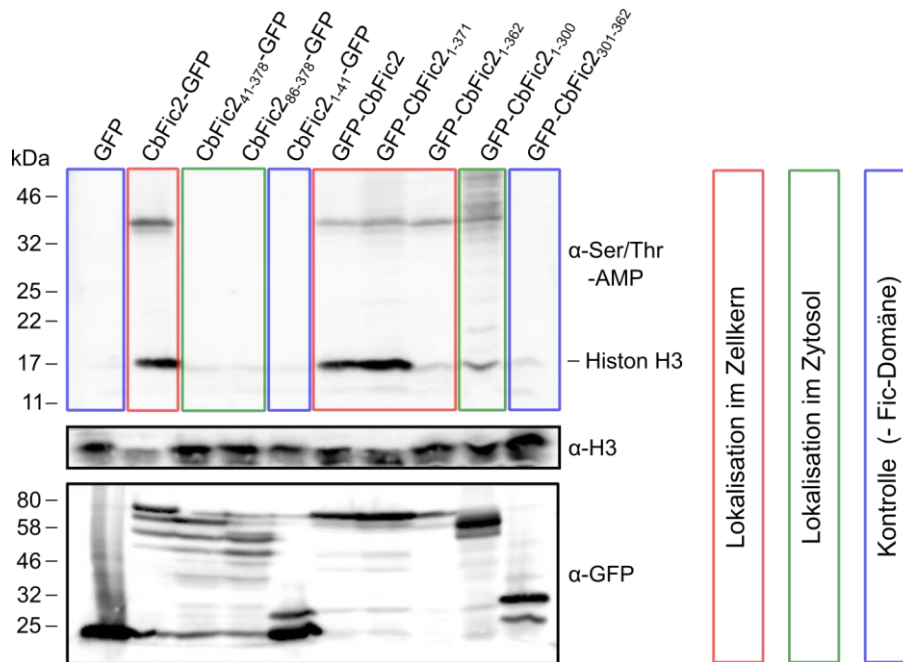


Abbildung 16: Adenylierungsaktivität von CbFic2-Verkürzungsstrukturen *in vivo*. HEK293T-Zellen wurden mit GFP markierten CbFic2-Verkürzungsstrukturen in der konstitutiv aktiven Form transient exprimiert, für 48 h inkubiert, anschließend lysiert und das entsprechende Gesamtprotein zur Immunoblotanalyse gelelektrophoretisch aufgetrennt. Der Einfluss einzelner Domänen bzw. Sequenzabschnitte auf die Adenylierungsaktivität der Fic-Domäne von CbFic2 wurde mit Antikörpern gerichtet gegen Ser/Thr-AMP, Histon H3 (Ladekontrolle) und GFP (Expressionskontrolle) analysiert. Eine Aufzählung der verwendeten Konstrukte befindet sich über dem abgebildeten Immunoblot. Rechts: Legende der farblichen Markierung der Laufspuren.

Bei der Betrachtung des Immunoblots in Abbildung 16 ist zunächst festzuhalten, dass von allen getesteten Verkürzungsstrukturen lediglich CbFic2₁₋₃₇₁ ein deutliches, zum Vollängenprotein vergleichbares AMP-Detektionssignal von Histon H3 im Immunoblot hervorruft. Interessanterweise zeigt CbFic2₁₋₃₆₁ eine nur schwache Adenylierung von Histon H3. Diese beiden Konstrukte enthalten Verkürzungen am mutmaßlich flexiblen C-terminalen Fortsatz, was die Zellkernlokalisierung nicht beeinträchtigt. Dies impliziert, dass der Sequenzbereich zwischen den Positionen 362-371 einen Einfluss auf die Fic-Domänen katalysierte Histon H3-Adenylierung hat. Da dieser Sequenzbereich an der HTH-Domäne angrenzt und diese wiederum in der Regel eine Funktion in der DNA-Bindung einnehmen, ist zu vermuten, dass eine derartige Interaktion hier gestört ist.

Eine effiziente Adenylierung von Histon H3 durch CbFic2 *in vivo* ist demnach nur nach einer Zellkernlokalisierung des Enzyms und nur nach Bindung an das Chromatin möglich. Diese Beobachtung mag zunächst evident erscheinen, da eine räumliche Nähe von Substrat und Enzym für eine Reaktion gegeben sein muss und mit Histonen unvermeidlich der Zellkern bzw. das Chromatin als Ort der Geschehnisse assoziiert wird, jedoch ist auch eine Interaktion mit Histonen nach ihrer biochemischen Synthese im Zytosol oder während des Transports durch

Helferproteine denkbar. So weist die Probe mit CbFic2₁₋₃₀₀, das um die HTH-Domäne verkürzt wurde und nicht im Zellkern lokalisiert, eine sehr schwaches, aber im Vergleich zur Negativkontrolle (Leervektor) signifikantes AMP-Detektionssignal bezüglich der Histon H3-Modifizierung auf. Es ist jedoch ebenso möglich, dass die Modifizierung im kruden Zustand während der Zellyse bei der Probenvorbereitung stattfand. Die hier generierten Verkürzungen am N-terminus zeigen eine vollständige Inaktivierung des Enzyms in HEK293T-Zellen. Eine Adenylylierung ist im Immunoblot nicht feststellbar. Der Verlust der Adenylylierungsfunktion scheint in Anbetracht der Ergebnisse aus der Fluoreszenzmikroskopie von einer Fehlfaltung bzw. Proteinaggregation und der damit verbundenen Lokalisation im Zytosol herzurühren. So sind vermutlich die putative Dimerisierungsfläche (AS 1-41) sowie die inhibitorische α -Helix unverzichtbare Bereiche für die Stabilität der zentralen Fic-Domäne. Zuletzt ist anzumerken, dass die Adenylylierung des unbekanntes Substrates mit einer ungefähren Masse von 40 kDa unabhängig von der Zellkernlokalisation von CbFic2 stabil bleibt. Ein Hinweis darauf, dass es sich hierbei um ein von Zellorganellen unabhängiges Protein mit Präsenz im Zytosol und im Zellkern handelt.

Zusammenfassend führen die hier dargestellten Ergebnisse zur folgenden Schlussfolgerung: Die HTH-Domäne von CbFic2 vermittelt die Zellkernlokalisation sowie vermutlich eine Bindung an chromosomale DNA. Es ist anzunehmen, dass es sich dabei um zwei essentielle Faktoren in der Histon H3-Adenylylierung durch das Coxiellenprotein handelt, was die physiologische Relevanz dieser Interaktion zusätzlich hervorhebt.

3.2.2. Untersuchungen von CbFic2 *in vitro*

3.2.2.1. Substratspezifität unter den Kernhistonen

In der Vergangenheit wurde anhand einiger Fic-Domänen enthaltenden Adenylyltransferasen gezeigt, dass diese ein recht breites Substratspektrum besitzen. Für die intensiv studierten Proteine VopS aus *Vibrio parahaemolyticus* und IbpA aus *Histophilus somni* wurden die RhoGTPasen als physiologische Zielproteine mit nur leichter Diskriminierung innerhalb der Vertreter dieser Proteinfamilie identifiziert^{9;14}. Darüber hinaus wurden in einem Hochdurchsatzverfahren 27 weitere potentielle Substrate für das Protein VopS und 29 für das Protein IbpA identifiziert³⁶. Eine ähnliche Promiskuität wurde für das humane Fic-Protein HYPE sowie dem Ortholog Fic-1 aus *Caenorhabditis elegans* beschrieben. Für HYPE wurde neben dem vermutlich physiologisch relevanten Substrat Bip1 die RhoGTPase Cdc42 sowie die Histone H2a, H2b, H3 und H4 als *in vitro* Substrate identifiziert^{33;37;45}. Interessanterweise zeigt auch das Protein Fic-1 aus *C. elegans in vitro* eine Adenylylierungsaktivität gegenüber verschiedenen Histonen³⁸. Ein ähnliches Verhalten wäre auch für CbFic2 gegenüber der Histon Proteinfamilie denkbar, dessen enzymatische Aktivität an Histon H3 in Untersuchungen *in vivo* hier gezeigt wurde. Um dies zu ergründen, wurden gereinigte rekombinante Histone von der Firma NEB bezogen und diese auf

eine Adenylylierung durch das Coxiellenprotein in einem zu HYPE und Fic-1 vergleichbaren Ansatz geprüft. Zwar deuteten die Ergebnisse aus den Immunoblot Untersuchungen in Abbildung 13 auf eine spezifische und selektive Modifizierung von Histon H3 hin, dennoch konnte eine Aktivität gegenüber anderen Histonspezies nicht ausgeschlossen werden, zumal die Massenunterschiede zwischen den Histonen H2a, H2b, H3 und H4 gering sind und damit auch die Unterschiede in der Lauffhöhe in einem SDS-PA-Gel, was eine klare Zuordnung erschwert. Um hier Klarheit zu erlangen, wurden die Histone H2a, H2b und H4 sowie drei Histon H3-Isoformen jeweils getrennt mit MBP-CbFic2 E66G und 5 mM ATP in einem *in vitro* Ansatz inkubiert, anschließend gelelektrophoretisch aufgetrennt und in einem Immunoblot mit α -Ser/Thr-AMP-Antikörpern auf eine Modifikation analysiert.

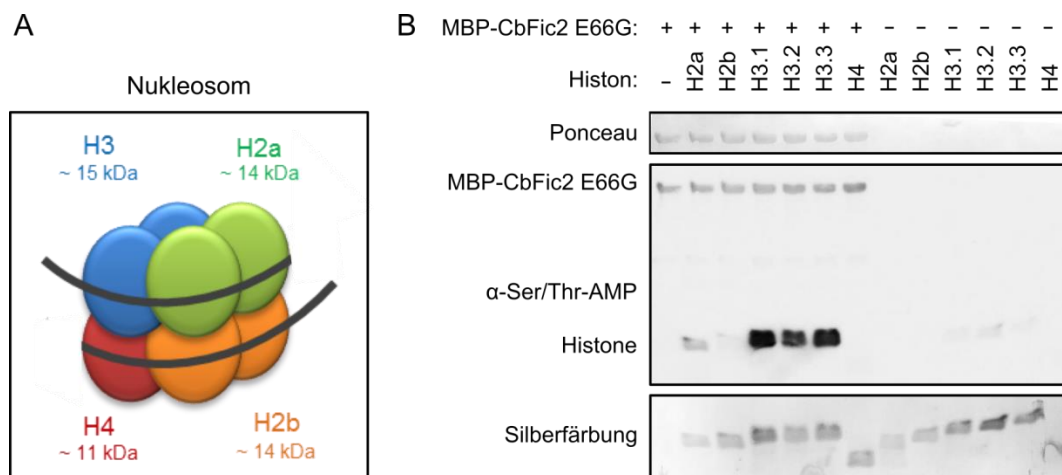


Abbildung 17: Qualitative Analyse der Histon-Spezifität von CbFic2. (A) Schematische Darstellung eines Nukleosoms, bestehend aus DNA und vier Histon-Heterodimeren (jeweils 2x H3:H4 und H2a:H2b). (B) Zur Evaluierung der CbFic2 Histon-Substratspezifität wurden 2 μ M MBP-CbFic2 E66G mit 10 μ M Histon H2a, H2b, H3.1, H3.2, H3.3 oder H4 und 5 mM ATP inkubiert, anschließend gelelektrophoretisch aufgetrennt und in einem Immunoblot unter Verwendung von α -Ser/Thr-AMP-Antikörpern analysiert. Ponceau und Silberfärbung dienten als Ladekontrolle. Die Chemolumineszenz belegt eindeutig die spezifische Adenylylierung von allen Histon H3-Isoformen.

In der in Abbildung 17 dargestellten Chemolumineszenzaufnahme ist anhand der Bandenintensität klar ersichtlich, dass eine spezifische Adenylylierung von Histon H3 stattfindet. Hierbei ist keine Präferenz gegenüber den Isoformen H3.1, H3.2 und H3.3 zu erkennen. Die Proteine H2b und H4 weisen keine AMP-Modifikation auf. Lediglich von Histon H2a geht ein geringes α -Ser/Thr-AMP-Detektionssignal aus, das aber im Vergleich zu Histon H3 deutlich geringer und vermutlich auf eine unspezifische Reaktion zurückzuführen ist. Interessanterweise zeigt die Chemolumineszenzaufnahme ebenfalls eine Automodifikation von MBP-CbFic2 E66G, die bereits an verschiedenen Fic-Proteinen beobachtet wurde. Zur Kontrolle der Beladung der Blotmembran wurde diese vor der Antikörperzugabe mit dem reversiblen Farbstoff Ponceau-Rot sowie nach erfolgter Analyse und *Stripping* der Membran mit einer Silberkolloidallösung ange-

färbt. Drastische Unterschiede in der Beladung mit den jeweiligen Histonen sowie dem MBP-CbFic2-Konstrukt, die das Ergebnis verfälschen könnten, sind hier nicht erkennbar. Die Ergebnisse aus dem Immunoblot verdeutlichen, dass im Gegensatz zu HYPE und Fic-1 das Protein CbFic2 selektiv nur Histon H3 adenyliert.

3.2.2.2. Identifizierung der Histon H3-AMP Modifikationsstellen

Die spezifische Adenylierung von Histon H3 durch CbFic2 konnte mittels α -Ser/Thr-AMP-Antikörpern in verschiedenen Immunoblot Untersuchungen belegt werden. Informationen zur Anzahl der AMP-Modifikationen sowie den Modifikationsstellen, Parameter, die für die substantielle Einordnung der Reaktion in einem physiologischen Kontext nötig sind, bleiben mit dieser Methode indes verborgen. Um diese zu ermitteln, wurde die CbFic2 vermittelte Histon H3-AMP-Modifizierung mittels verschiedener massenspektrometrischer Verfahren untersucht. Die enzymatische Adenylierung eines Proteins findet, wie bereits ausführlich in Abschnitt 1.1. beschrieben, an der Hydroxylgruppe einer Serin-, Threonin- oder Tyrosinseitenkette statt und führt zu einem charakteristischen Massezuwachs des modifizierten Proteins von 329 Da. Damit ist die AMP-Modifikation generell sehr gut über gängige massenspektrometrische Messmethoden bestimmbar und von anderen posttranslationalen Modifikationen oder Artefakten der Massenspektrometrie wie z. B. Na^+ -Addukten zu unterscheiden. Die Untersuchungen bauten auf der Strategie auf, zunächst die absolute Masse des adenylierten Proteins über ESI-MS zu bestimmen, worüber sich die Summe der AMP-Modifikationen nach Subtraktion der Masse des unmodifizierten Proteins folglich ergeben würde. Anschließend sollten mittels eines LC-MS/MS-Verfahrens nach proteolytischen Verdau des Proteins die Modifikationsstellen identifiziert werden. Für die Versuche wurde gereinigtes Histon H3.1 Protein (rekombinant) verwendet, ebenso wie CbFic2 E66G, das aus Stabilitätsgründen als Fusionskonstrukt mit MBP eingesetzt wurde. Ein repräsentatives MS-Spektrum der Gesamtmasse von Histon H3.1 nach Inkubation mit MBP-CbFic2 E66G ist in Abbildung 18A dargestellt. Diesem ist ein MS-Spektrum eines Reaktionsansatzes mit MBP-CbFic2 H205A als Negativkontrolle gegenübergestellt. Zur Übersichtlichkeit werden alle MS-Spektren dekonvolviert angezeigt, d.h. nach computergestützter Umrechnung der Signale mehrfachgeladener Ionen in eine dem Analyten zuordenbaren neutralen Masse.

Histon H3 wies nach Inkubation mit MBP-CbFic2 E66G eine Monoadenylierung auf. Jedoch waren trotz verschiedener Ansätze nur etwa 10% modifiziertes Protein ermittelbar. Eine zuverlässige Aussage über die Anzahl der Modifikationsstellen konnte aufgrund der geringen Umsetzung des Substrats nicht getätigt werden. Zudem erschwerte es die Identifizierung der Modifikationsstelle über Tandem-Massenspektrometrie, die mit diesen Proben zunächst erfolglos blieb. Der geringe Umsatz von Histon H3 beruhte hauptsächlich auf Stabilitätsproblemen sowohl des Histons als auch des Enzyms. Die Proteine koprizipitierten während der Inkubation im Reakti-

ongemisch, wohingegen das Enzym sowie das Substrat in getrennten Ansätzen stabil in Lösung blieben.

Um die Probleme in der Probenvorbereitung zu umgehen, wurde zunächst folgende Überlegung angestellt: Histone bestehen aus einer kompakten Kerndomäne und einem unstrukturierten N-terminalen Arm, der eine wichtige Rolle in der Regulierung der chromosomalen DNA einnimmt^{97,98}. Der flexible N-terminus ragt aus der dichten Nukleosomstruktur heraus und ist somit gut für entsprechende Interaktionspartner/Enzyme zugänglich. Für die DNA-Regulierung sind insbesondere zahlreiche PTMs verantwortlich, die an essentielle, zelluläre Vorgänge gekoppelt sind⁹⁸. Eine Adenylylierung von Histon H3 wäre zwecks einer Einflussnahme auf bestimmte Zellprozesse somit an diesem bedeutenden Abschnitt wahrscheinlich. Aufbauend auf diesen Leitgedanken wurde ein synthetisches Peptid, das den Bereich der Aminosäuren 1-20 im Histon H3-Protein entspricht, als Substrat von CbFic2 E66G überprüft. Wie in Abbildung 18B zu erkennen ist, erwies sich das Peptid als hervorragendes Substrat für die Untersuchung der CbFic2 katalysierten Adenylylierung. Nach Inkubation mit dem Enzym war ein vollständiger Umsatz zur modifizierten Form festzustellen. Demzufolge konnte die Modifikationsstelle auf ein kleines Fragment am N-Terminus eingegrenzt werden.

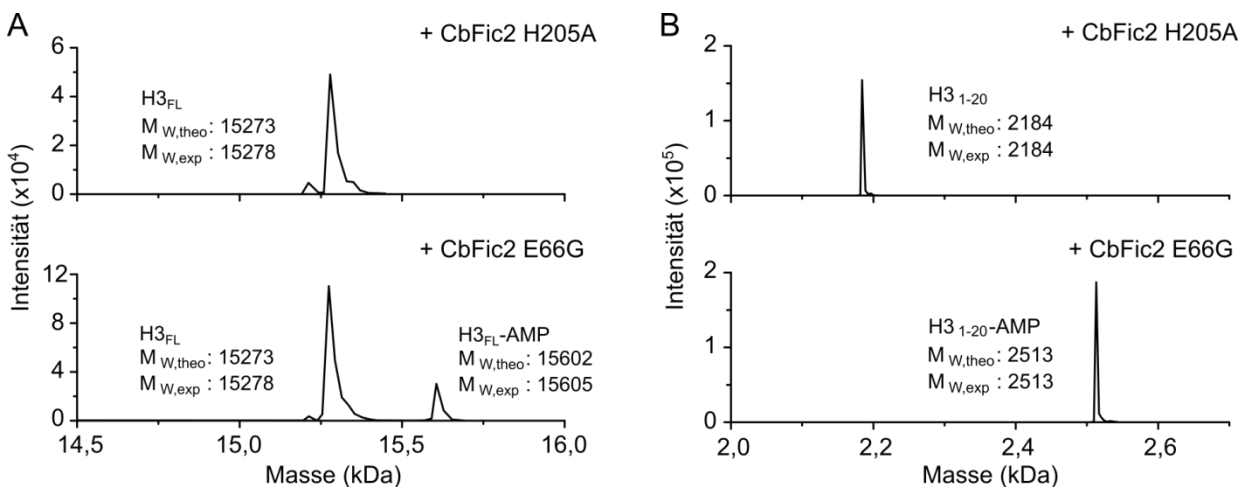


Abbildung 18: Massenspektrometrische Analyse der Histon H3-Adenylylierung. ESI-MS Spektren von Histon H3_{FL} (A) und H3₁₋₂₀ (B) nach Inkubation mit MBP-CbFic2 E66G (unten) sowie H205A (oben; Negativkontrolle) und 2,5 mM ATP. Die Adenylylierung führt zu einem Zuwachs der molekularen Masse von 329 Da, der hier festgestellt werden kann. Theoretische und experimentell ermittelte Massen sind innerhalb der Spektren angegeben.

Der experimentelle Ansatz, die Modifikationsstelle über Tandem-Massenspektrometrie zu identifizieren wurde wiederholt, mit dem grundlegenden Unterschied, dass anstatt des Volllängen-Proteins nur das adenylylierte Histon H3₁₋₂₀ Peptid (proteolytisch unbehandelt) verwendet wurde. Die Messungen wurden an einer Orbitrap Fusion mit vorgeschalteter RP-C18 Chromatographiesäule (zur Abtrennung von Verunreinigungen) durchgeführt. Zur Fragmentation des Peptids

wurde eine Konfiguration aus HCD sowie ETD, unter der ein Neutralverlust von Adenin, Adenosin oder der gesamten AMP-Gruppe am geringsten ausfällt, gewählt^{89;90}. Ein repräsentatives Fragmentationsspektrum mit nahezu vollständiger Abdeckung aller theoretisch möglichen Fragmente ist in Abbildung 19 wiedergegeben. Die detektierten ionischen Peptidfragment-Spezies sind mit einer maximalen Abweichung von 0,01 Da exakt zuordenbar. Die wenigen nicht annotierten Signale sind auf übliche Verunreinigungen (Kunststoffpolymere etc.) sowie nicht fragmentiertes Peptid (m/z : 2513, 2495 ($-H_2O$)) zurückzuführen, das die intensivsten Signale bildet. Aus diesem Spektrum kann mit sehr hoher Zuverlässigkeit Serin an Position 10 (S10) als AMP-Modifikationsstelle identifiziert werden.

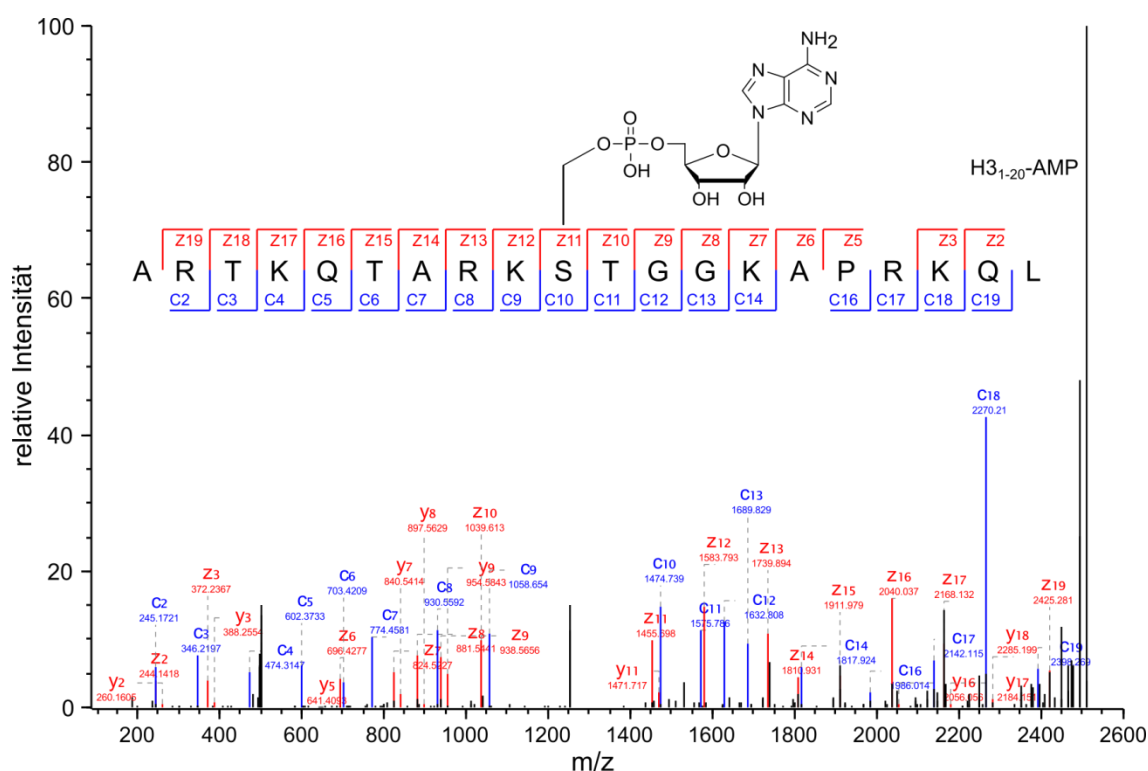


Abbildung 19: ETD-Fragmentationsspektrum von H3₁₋₂₀-AMP. Das Histon Peptid H3₁₋₂₀ wurde durch MBP-CbFic2 E66G adenyliert, anschließend entsalzt und proteolytisch unbehandelt über eine LC-MS/MS analysiert. Gezeigt wird ein ETD-Massenspektrum mit nahezu vollständiger Fragmentierung. Die AMP-Modifikation befindet sich an Position S10.

Um die Ergebnisse aus der massenspektrometrischen Untersuchung zu verifizieren, wurde ein Fusionskonstrukt zwischen dem Protein Glutathion-S-Transferase, welches in der Molekularbiologie als Löslichkeits-Tag etabliert ist, und dem H3₁₋₂₀-Peptid hergestellt. Einzelne Positionen, die mögliche Modifikationsstellen darstellen, wurden daraufhin zu Alanin mutiert. Die so generierten Punktmutanten GST-H3₁₋₂₀ T3A, -T6A, -S10A und -T11A (Zählung bezieht sich auf das H3-Peptid) sowie ein Konstrukt mit der Wildtypsequenz wurden jeweils einzeln mit MBP-CbFic2-E66G in einem Reaktionsansatz inkubiert und auf eine AMP-Modifikation mittels α -Ser/Thr-AMP-Antikörpern in einem Immunoblot geprüft. Zwecks der Kontrolle einer unspezifi-

schen Reaktion mit dem GST-Protein, wurde zusätzlich ein Reaktionsansatz mit ungekoppeltem GST verwendet. Aus dem in Abbildung 20B dargestellten Immunoblot und entsprechenden α -Ser/Thr-AMP Detektionssignalen geht deutlich hervor, dass die Konstrukte mit den Mutationen T3A, T6A und T12A modifiziert werden, lediglich die S10A Mutante nicht. Dies bestätigt zweifelslos die Ergebnisse aus der LC-MS/MS-Untersuchung des H3₁₋₂₀-AMP-Peptids. Eine Randnotiz aus der Immunoblotanalyse ist die im Vergleich zur Wildtyp-Sequenz leicht verringerte Adenylylierung der T3A-Mutante. Zusätzlich ist in etwa gleicher Proportion auch die Autoadenylylierung von MBP-CbFic2 E66G reduziert. Da mögliche Störfaktoren durch etwaige Verunreinigungen der Probe ausgeschlossen wurden, lässt sich dieser Position eine potentiell bedeutende Rolle in der Interaktion zuschreiben.

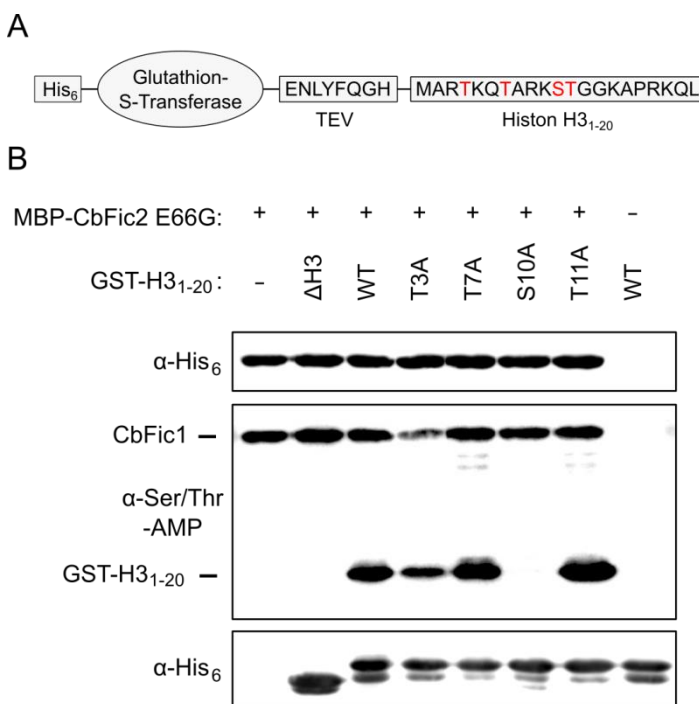


Abbildung 20: Mutationsanalyse zur Identifizierung der AMP-Modifikationsstelle in H3₁₋₂₀.

(A) Schematische Darstellung des GST-Histon H3-Konstrukts, bestehend (von N- zu C-Terminus) aus His₆-Tag, GST, TEV (*Tobacco Etch Virus*)-Proteaseschnittstelle und Histon H3₁₋₂₀-Peptid. (B) Immunoblot zur Bestätigung der Histon H3 S10-AMP-Modifikationsstelle. GST-H3₁₋₂₀-Fusionskonstrukte mit Mutationen zu Alanin an potentiellen Modifikationsstellen im H3-Peptid wurden mit MBP-CbFic2 E66G und 5 mM ATP für 16 h bei 15°C inkubiert, gelelektrophoretisch aufgetrennt und anschließend einem Immunoblot mit α -Ser/Thr-AMP-Antikörpern zugeführt. Das Konstrukt mit der S10A-Mutation weist keine AMP-Modifikation auf. Zur Kontrolle der Beladung wurden Anti-His₆ Antikörper für die entsprechend markierten Proteine verwendet.

Serin 10 in Histon H3 ist Teil des ARKS-Sequenzmotivs, ein über PTMs hochregulierter Sequenzabschnitt des Nucleosoms. Interessanterweise wiederholt sich die Sequenz im Bereich der Aminosäuren 25-28 von Histon H3 mit S28 an komplementärer Stelle zu S10 (siehe Abbildung 21A). Um zu prüfen, ob das zweite ARKS-Motiv auch ein Substrat für CbFic2 darstellt, wurden Fusionskonstrukte zwischen dem Peptid H3₂₁₋₃₅, das lediglich das zweite Sequenzmotiv enthält, und GST, das hier erneut als Trägerprotein verwendet wurde, hergestellt. Zusätzlich wurde eine S28A Mutante generiert. Eine Modifizierung des gekoppelten Peptids analog zum Versuch mit GST-H3₁₋₂₀ aus Abbildung 20 konnte über eine Immunoblotanalyse nicht nachgewiesen werden (siehe Anhang, Abbildung 46). Da möglicherweise das Trägerprotein die Zugänglichkeit von H3₂₁₋₂₅ beeinflusste, wurde das Peptid über eine vorgesetzte TEV-Schnittstelle proteolytisch abgetrennt und mittels Ultrafiltration isoliert. Das freie Peptid wurde anschließend

auf die Adenylylierung durch MBP-CbFic2 E66G mittels Massenspektrometrie analysiert. Repräsentative MS-Spektren von H3₂₁₋₃₅ sowie der Mutante H3₂₁₋₂₅ S28A nach Inkubation mit MBP-CbFic2 E66G bzw. MBP-CbFic2 H205A als Negativkontrolle sind in Abbildung 21 dargestellt. In Gegenwart von MBP-CbFic2 E66G findet eine Adenylylierung des H3₂₁₋₃₅-Peptids, erkennbar durch den charakteristischen Massezuwachs von 329 Da, statt (siehe Abbildung 21B). Die S28A-Mutante des Peptids weist hingegen keine Modifizierung durch das aktive Fic-Protein auf (siehe Abbildung 21C), was zusammengenommen die anfängliche Hypothese der S28-Adenylylierung bestätigt.

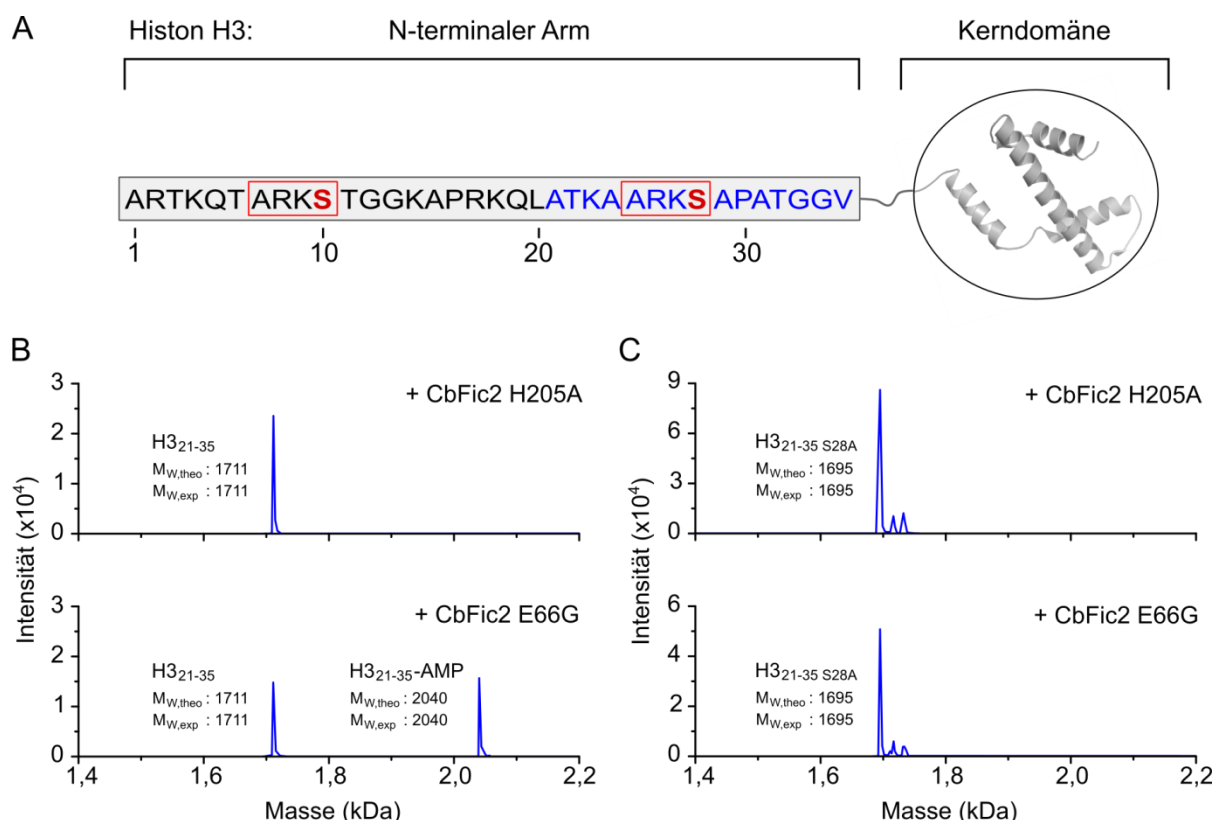


Abbildung 21: Massenspektrometrische Analyse zur Identifizierung der Histon H3 S28-AMP-Modifikationsstelle. (A) Schematische Darstellung des N-terminalen Histon H3-Arms mit dem Bereich AS 21-35 in blau. Das ARKS-Sequenzmotiv ist mit einem roten Kasten markiert. (B) ESI-MS Spektren von H3₂₁₋₃₅ nach Inkubation mit CbFic2 H205A (Negativkontrolle) sowie CbFic2 E66G in einer Reaktionslösung mit ATP. Das aktive CbFic2 E66G adenyliert H3₂₁₋₃₅, zu sehen anhand des Massezuwachses von 329 Da. (C) ESI-MS Spektren von H3₂₁₋₃₅ S28A nach Inkubation mit CbFic2 H205A und CbFic2 E66G. Es wurde keine Adenylylierung ermittelt. Theoretische und experimentell ermittelte Massen sind innerhalb der Spektren angegeben.

Anhand der vorangegangenen massenspektrometrischen Untersuchungen konnte separat mit den N-terminalen Teilstücken H3₁₋₂₀ und H3₂₁₋₃₅ gezeigt werden, dass sowohl der Serin-Rest an Position 10 als auch der an Position 28 von Histon H3 durch MBP-CbFic2 E66G modifiziert wird. In diesem Zusammenhang sollte überprüft werden, ob MBP-CbFic2 E66G in Gegenwart des ganzen N-terminalen Arms beide Positionen adenyliert oder die Präsenz einer AMP-

Modifikation die Interaktion mit dem zweiten Sequenzmotiv verhindert. Hierfür wurde das synthetische Peptid H3₁₋₃₅ mit CbFic2 E66G für 12 h inkubiert und mittels ESI-MS analysiert. Wie in Abbildung 22 zu erkennen ist, weist das Massespektrum neben ungefähr 75% mono- auch etwa 20% diadenylyliertes H3₁₋₃₅ Peptid auf. Die Ergebnisse zeigen somit, dass die Positionen S10 und S28 am N-Terminalen Arm von Histon H3 zumindest *in vitro* eine Plattform zur Diadenylylierung bilden.

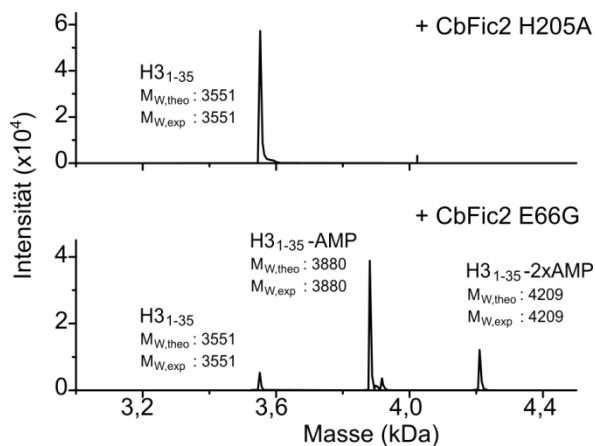


Abbildung 22: Massenspektrometrische Analyse der H3₁₋₃₅ Adenylylierung. Synthetisch hergestelltes H3₁₋₃₅ Peptid wurde mit CbFic2 H205A als Negativkontrolle (oben) sowie CbFic2 E66G (unten) in einem Reaktionsansatz mit 5 mM ATP für 12 h inkubiert und über eine ESI-MS analysiert. CbFic2 E66G adenylyliert H3₁₋₃₅ an zwei Positionen. Das MS-Spektrum weist neben ca. 75% Mono-, 20% Diadenylylierung von H3₁₋₃₅ auf. Theoretische und experimentell ermittelte Massen sind innerhalb der Spektren angegeben.

Die Adenylylierung von N-terminalen Histon H3-Peptiden zeigte, dass die Interaktionsoberfläche zwischen CbFic2 und Histon H3 vermutlich relativ klein ist und sich auf eine kurze Erkennungssequenz beschränkt. Welche Positionen im ARKS-Motiv und in Nachbarschaft dazu für die Bindung relevant sind, lässt sich anhand eines Abgleichs der hier verwendeten Peptidsequenzen H3₁₋₂₀ und H3₂₁₋₃₅, die den Bereich um jeweils eines der Motive umfassen, nicht vorhersagen. Eine Übereinstimmung der Sequenzen zeigt sich lediglich im Bereich der vier Aminosäuren des ARKS-Motivs (siehe Abbildung 23). Weitere flankierende Positionen weisen keine direkte Übereinstimmung auf. Eine mögliche Bedeutung könnten die Aminosäuren in Positionen P+2, P+3 und P+5 der Modifikationsstellen einnehmen, die jeweils unpolare Reste darstellen. Zuletzt deckt sich die Abfolge Thr-Lys in Position P-6 und P-7 des ersten ARKS-Motivs mit P-5 und P-6 im Zweiten (siehe Abbildung 23). Es ist daher vorstellbar, dass CbFic2 eine recht flexible Protein-Protein-Interaktion mit Histon H3 mit nur wenigen Wechselwirkungen zu Bereichen außerhalb des ARKS-Motivs eingeht. Der N-Terminus von Histon-H3 wird *in vivo* an zahlreichen Stellen posttranslational modifiziert und ist dadurch einem ständigen Wandel ausgesetzt. Für die effektive und PTM-unabhängige Adenylylierung von Histon H3 wäre ein Bindungsmodus, der auch größere strukturelle Veränderungen der Bindungsoberfläche toleriert, vorteilhaft.

	P:	-9	-8	-7	-6	-5	-4	-3	-2	-1	0	+1	+2	+3	+4	+5	+6	+7	+8	+9	+10			
H3:	1	-	A	R	T	K	Q	T	A	R	K	S	T	G	G	K	A	P	R	K	Q	L	-	20
	21	-	A	T	K	A	-	A	R	K	S	A	P	A	T	G	G	V	-	35				
	P:	-9	-8	-7	-6	-5	-4	-3	-2	-1	0	+1	+2	+3	+4	+5	+6	+7	+8	+9	+10			

Abbildung 23: Sequenzanalyse der Peptide H3₁₋₂₀ und H3₂₁₋₃₅. Dargestellt wird eine Überlagerung der Peptidsequenzen von H3₁₋₂₀ und H3₂₁₋₃₅, die Substrate von CbFic2 darstellen. Identische (rot) und biophysikalisch ähnliche Aminosäuren (blau) stellen mögliche Positionen der CbFic2-Histon H3-Bindung dar. Aminosäuren N-terminal der Modifikationsstelle (S10 bzw. S28) werden mit dem Präfix P- und C-terminale Aminosäuren entsprechend mit P+ fortlaufend nummeriert.

Die in diesem Abschnitt aufgeführten Ergebnisse zeigen, dass CbFic2 selektiv die Positionen S10 und S28 in einem definierten Sequenzmotiv (ARKS) in Histon H3 adenylyliert. Diese fungieren in einer physiologisch gesunden Zelle als Phosphorylierungsstellen mit essentieller Bedeutung für verschiedene zelluläre Prozesse in einem epigenetischen Kontext. In Anbetracht dessen ist eine artifizielle, unkoordinierte Adenylylierung von Histon H3 durch CbFic2 auszuschließen. Wie bereits diskutiert, weist CbFic2 eine exklusive Zellkernlokalisierung und eine Adenylylierung von Histon H3 unter nativen Bedingungen auf. Zusammengenommen erlaubt dies eine Einordnung der hier zugrunde liegenden Modifizierung in die Patho-Epigenetik.

3.2.2.3. Die oligonukleotidbindenden Eigenschaften von CbFic2

Ein Großteil der in dieser Arbeit präsentierten Untersuchungen von CbFic2 fand *in vitro* statt. Hierfür waren präparative Mengen des Proteins in hoher Reinheit, korrekter Faltung und enzymatischer Aktivität erforderlich. Die Herstellung von CbFic2 erfolgte über heterologe Expression in *E. coli*, die sich durch hohe Wachstumsraten und eine gute Handhabbarkeit auszeichnen. Die Gensequenz des Proteins wurde hierfür codonoptimiert und in geeignete Vektoren mit einem T7-Expressionssystem kloniert. In vorangegangenen Testexpressionen in *E. coli* BL21(DE3)-Zellen zeigte sich, dass CbFic2 ausgestattet mit einem Hexahistidinanker sehr gut exprimiert, jedoch aufgrund schlechter Löslichkeit Einschlusskörperchen (engl.: *inclusion bodies*) bildet. Dies traf sowohl auf das Volllängenprotein als auch für Verkürzungsstrukture zu. Durch Modulierung des Expressionslevels in *E. coli* Lemo21-Zellen konnte die Einschlusskörperchenbildung verhindert werden, jedoch tendierte das Protein weiterhin zur Aggregation. Eine erfolgreiche Herstellung von CbFic2 in hoher Reinheit gelang erst unter Zuhilfenahme des MBP-Solubilitäts-Tags und der chromatographischen Reinigung über eine Amylose-FPLC-Säule (engl.: *fast protein liquid chromatography*) (siehe Abbildung 24). Aufgrund der Instabilität von CbFic2, wurde der MBP-Tag nicht abgespalten und entsprechenden Pufferlösungen 10% Glycerin zugesetzt. Das Protein wurde in Volllänge als auch eine Variante mit Deletion der *in silico* vorhergesagten HTH-Domäne (CbFic2₁₋₃₀₀) hergestellt.

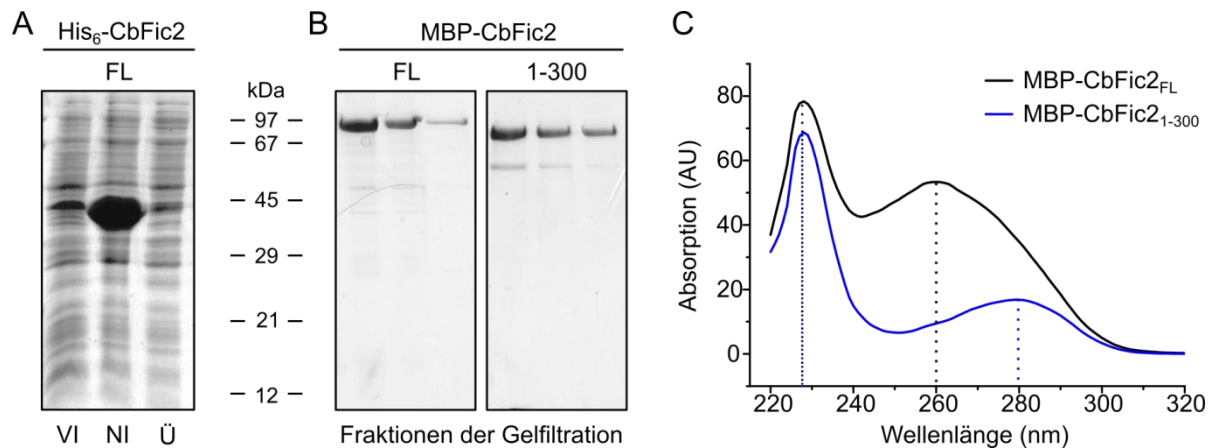


Abbildung 24: Rekombinante Herstellung von CbFic2-Konstrukten. (A) Expression von His₆-CbFic2 in *E. coli* BL21-Zellen. Gezeigt ist ein SDS-PA-Gel mit den Proben: vor Induktion (VI), nach Induktion mit 0,1 mM IPTG (NI) und löslicher Überstand nach Aufschluss und Zentrifugation der Probe. (B) Reinheit von MBP-CbFic2 FL und MBP-CbFic2₁₋₃₀₀ nach finaler Reinigung über Gelfiltration. (C) UV-Absorptionsspektrum von MBP-CbFic2 FL (schwarz) und MBP-CbFic2₁₋₃₀₀ (blau) im Vergleich. Die gepunkteten Linien pointieren die Absorptionsmaxima.

Die Konzentration der gereinigten Proteine wurde nach gängigem Verfahren über die UV-Absorption bestimmt. Das CbFic2 Vollängen-Konstrukt (CbFic2_{FL}) kennzeichnete sich dabei durch ein ungewöhnlich hohes Verhältnis der Absorption bei 260 nm und 280 nm. Dieses hohe Absorptionsverhältnis deutet recht zuverlässig auf die Verunreinigung von Proteinproben mit Nucleinsäuren hin. Für CbFic2_{FL} ergab sich ein 260/280-Wert von 1,6, der einem Nucleinsäureanteil von ca. 25% entspricht⁹⁹. Dagegen wurde für das C-terminal verkürzte Konstrukt ein Wert von 0,5 ermittelt, demzufolge stellte es ein sehr reines Protein dar. Diese Beobachtung implizierte eindringlich die Anreicherung von DNA und/oder RNA durch CbFic2_{FL} während der Reinigung. Es signalisierte zudem eine direkte Beteiligung der HTH-Domäne, da CbFic₁₋₃₀₀ eine derartige Kontamination nicht aufwies.

Um die Ergebnisse der UV-Spektroskopie zu bestätigen sowie nähere Informationen zur Größe und Art der Nucleinsäuren zu erlangen, wurde die Agarosegelelektrophorese als weitere Detektionsmethode herangezogen. Das Protein-Nucleinsäuren-Gemisch wurde gelelektrophoretisch aufgetrennt und durch Serva stain G, ein im grünen Spektralbereich emittierender DNA/RNA-spezifischer Farbstoff, visualisiert. Die detektierten Nucleinsäuren umfassten, wie in Abbildung 25A zu sehen, eine Länge von 100 bis 1000 Basenpaaren. In diesem Trennbereich des Gels zeigen sich die Exemplare im Ganzen als großer, undefinierbarer Fleck. Im oberen Bereich des Gels (> 10 Kilobasen) erschien eine langgezogene Bande, deren Intensität deutlich schwächer als die der Unteren war. Der Verdacht, dass es sich bei dieser um MBP-CbFic2_{FL} handelt, bestätigte sich nach Behandlung der Probe mit Proteinase K, was zum proteolytischen Abbau des Proteins und Verschwinden der Bande führte. Ein zusätzlicher Beweis brachte die Verwendung von SYPRO-Red Protein Färbereagenz, das der Probe vor der Gelelektrophorese zugeführt

wurde und die entsprechende MBP-CbFic2_{FL} Gelbande rot färbte. Bemerkenswert ist an dieser Stelle der isoelektrische Punkt von MBP-CbFic2, der mit einem pI von 8,8 über dem pH des Gelelektrophoresepuffers (pH 8,0) lag. In der Theorie sollte keine Migration des Proteins in das Agarosegel aufgrund der positiven Nettoladung stattfinden. Es indiziert, dass MBP-CbFic2_{FL} im Komplex mit Oligonukleotiden, forciert durch die hohe negative Ladung des Phosphatrückgrats, ins Gel verschleppt wurde. Diese Hypothese wird durch den Vergleich des Proteins mit dem CbFic2₁₋₃₀₀-Konstrukt (pI: 6,3) gestützt, das einen sehr kurzen Laufweg im Gel und eine marginale Färbung durch Serva stain G aufwies.

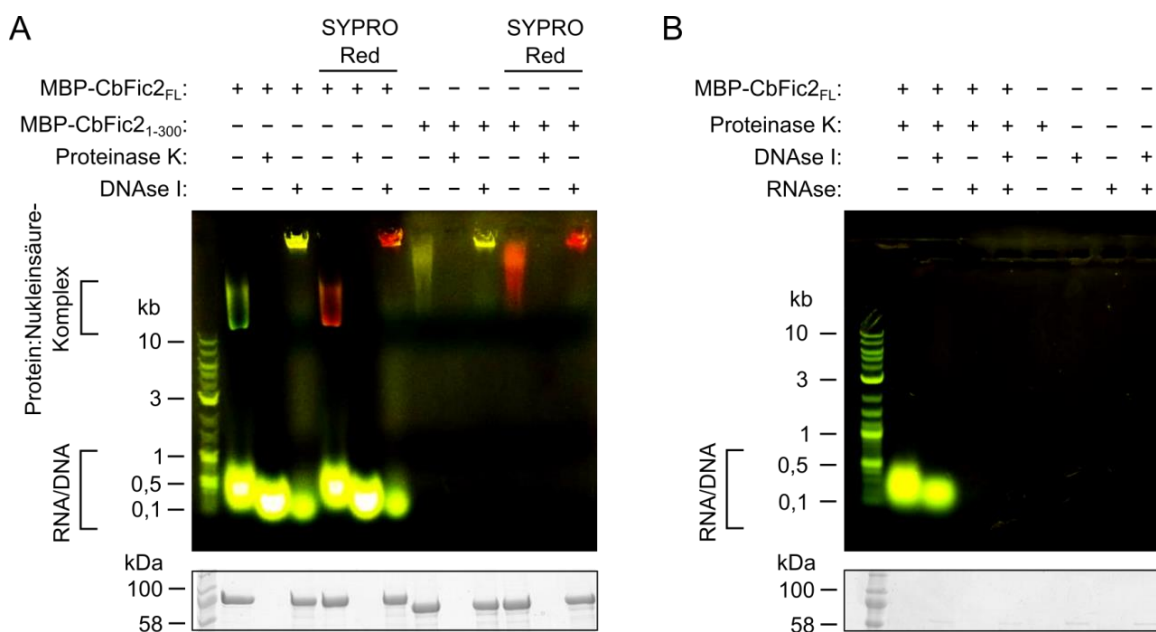


Abbildung 25: Analyse der DNA/RNA Koreinigung. (A) Vergleich von rekombinant hergestelltem und chromatographisch gereinigtem MBP-CbFic2_{FL} und CbFic2₁₋₃₀₀ auf einem 0,5% Agarosegel. Aufgetragen sind unbehandelte wie auch mit Proteinase K oder DNase I behandelte Proben. Oligonukleotide wurden mit Serva DNA Stain G und Proteine mit SYPRO Red gefärbt. Die UV-Lichtaufnahme zeigt, dass MBP-CbFic2_{FL} abhängig von der HTH-Domäne Nukleinsäuren bindet und diese während der Reinigung aus *E. coli* verschleppt. (B) 0,5% Agarosegel mit Proben, die wie folgt angesetzt wurden: MBP-CbFic2_{FL} wurde zunächst mit Proteinase K verdaut, anschließend wurde die Protease mit PMSF inhibiert und die freigelegten Oligonukleotide mit DNase I oder RNase behandelt. Zur Visualisierung von Oligonukleotiden und Proteinen wurde wie in A gefärbt. Die unteren Felder zeigen Aliquote der eingesetzten Proben auf einem SDS-PA-Gel.

Abbildung 25B, zeigt ein Agarosegel der MBP-CbFic2_{FL} Probe, die zunächst mit Proteinase K verdaut, anschließend zur Inhibierung der Protease mit PMSF versetzt und schließlich mit DNase I und RNase in getrennten Ansätzen sowie mit beiden Enzymen gleichzeitig behandelt wurde. Aus der gelelektrophoretischen Analyse wird ersichtlich, dass MBP-CbFic2_{FL} vorwiegend RNA in der *E. coli*-Zelle bzw. im Zelllysat bindet. Ein Ergebnis, das zunächst überrascht, da die Rolle von CbFic2 als potentieller Effektor zur Histon H3-Regulierung die Bindung von DNA im-

pliziert. In einem prokaryotischem System wie dem von *E. coli* existiert jedoch kein Chromatin. DNA liegt frei als Plasmid oder chromosomal angeheftet an der Zellmembran vor¹⁰⁰. Der RNA-Anteil einer *E. coli*-Zelle ist in etwa um das 10-fache höher als der von DNA¹⁰¹. Zudem sind die Moleküle vergleichsweise kurz und für die Anreicherung durch CbFic2 besser zugänglich als Plasmide bzw. genomische DNA. Diese Aspekte führen vermutlich dazu, dass bei der Reinigung von MBP-CbFic2_{FL} aus *E. coli* das Protein vorwiegend als Protein-RNA-Komplex isoliert wird. Protein-Nukleinsäure-Interaktionen, wie sie bei verschiedenen Proteinen, wie z.B. Transkriptionsfaktoren auftreten, bestehen in der Regel aus einer Basiswechselwirkung mit den Phosphaten und der Ribose des Oligonukleotidrückgrats und spezifischen Wechselwirkungen zwischen einer Reihe von Aminosäuren mit einem chemisch komplementären Satz an Nucleobasen¹⁰². Der Hauptteil der freien Energie dieser Bindung wird durch die unspezifische Interaktion mit dem Oligonukleotidrückgrat gestellt¹⁰². So binden entsprechende Domänen generell DNA beziehungsweise RNA, wodurch das Phänomen der Anreicherung dieser Moleküle in der rekombinanten Herstellung erklärt wird.

Zusammenfassend unterstreicht die Interaktion des C-terminalen Bereiches von CbFic2 mit Nukleinsäuren die Zuverlässigkeit der *helix-turn-helix*-Domänenvorhersage und ihre vermutete Funktion als Abschnitt zur DNA-Bindung.

3.2.2.4. Kinetische Betrachtung der CbFic2-DNA-Bindung

Für eine differenziertere Untersuchung der HTH-DNA-Bindung wurde das MBP-CbFic2_{FL} Präparat von der Nukleinsäurekontamination befreit und Bindungsstudien mit definierten Oligonukleotiden zugeführt. Eine Erkennungssequenz bzw. eine bevorzugte Oligonukleotidkonformation von CbFic2 ist bislang nicht bekannt. So wurden für die Versuche doppelsträngige DNA-Fragmente mit randomisierten Sequenzen und einem G/C-Anteil von 40% gewählt, das dem durchschnittlichen Wert des humanen Genoms entspricht. Von insgesamt drei getesteten Oligonukleotiden mit Längen von 20, 40 und 60 Basenpaaren (Bp) zeigten alle eine Bindung mit MBP-CbFic2_{FL}. Für eine quantitative Untersuchung der Interaktion wurde das 20 Bp Oligonukleotid herangezogen, um möglichst wenig, jedoch ausreichend Bindungsoberfläche zu bieten. Die Messungen erfolgten über analytische Ultrazentrifugation (AUZ) und wurden in Kooperation mit Dr. Klaus Richter des Lehrstuhls von Prof. Dr. Johannes Buchner durchgeführt. Um die MBP-CbFic2_{FL}-DNA Komplexbildung während der Sedimentationsgeschwindigkeitsexperimente selektiv verfolgen zu können, wurde das Oligonukleotid mit Fluorescein am 5'-Ende des Vorwärtsstranges markiert. Zur Ermittlung der kinetischen Parameter wurden zunehmende Mengen an MBP-CbFic2_{FL} zu einer konstanten Konzentration des DNA-Fragments bis zu einer vollständigen Sättigung der Bindungsstellen titriert (siehe Abbildung 26).

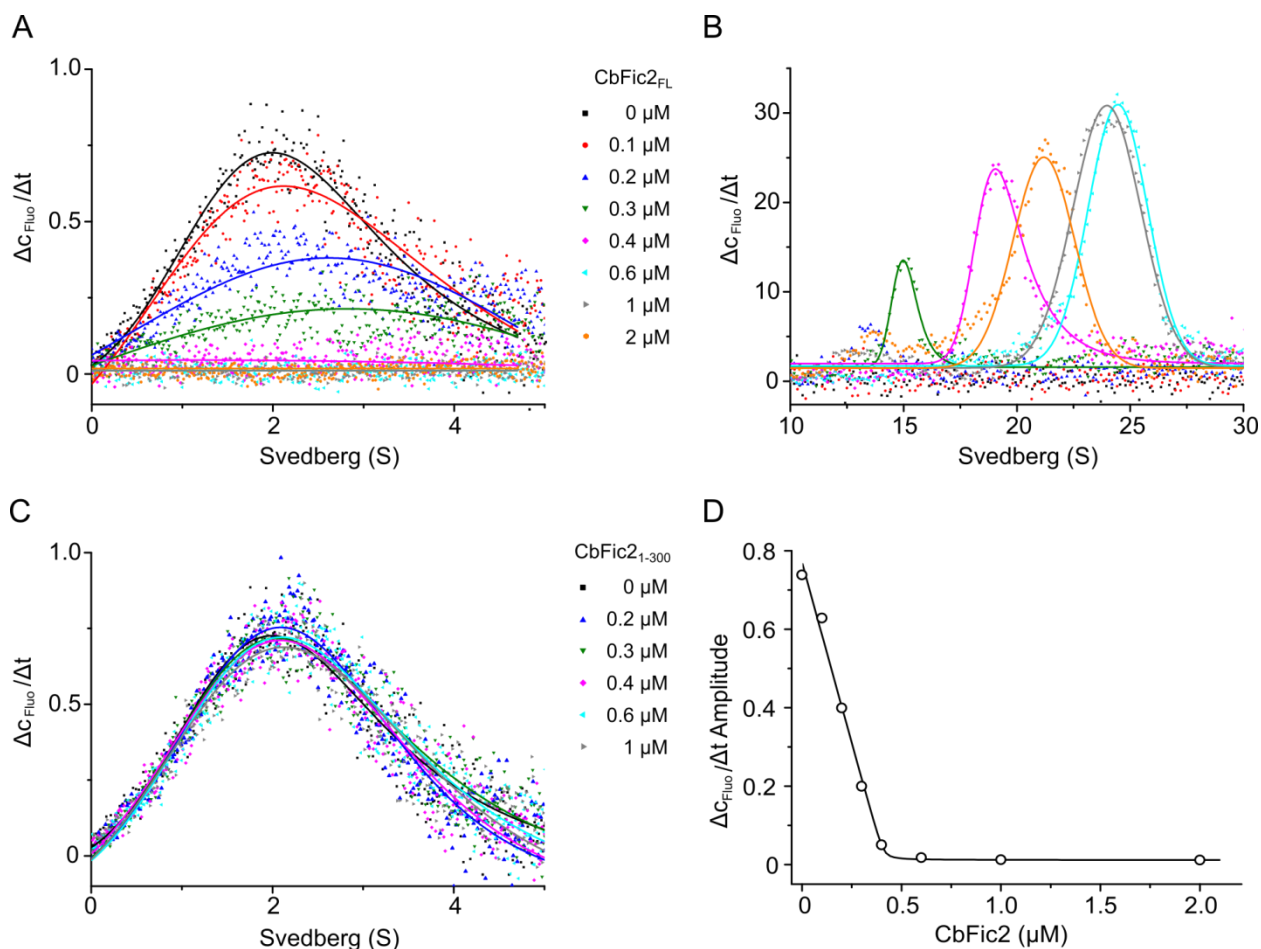


Abbildung 26: Quantitative Evaluierung der CbFic2-DNA Bindung über AUZ. (A-C) Dargestellt sind Sedimentationsgeschwindigkeitsmessungen eines fluoreszenzmarkierten 20 Bp DNA-Oligonukleotids konstanter Konzentration mit zunehmenden Mengen an MBP-CbFic2_{FL} bzw. MBP-CbFic2₁₋₃₀₀ in graphischer Auftragung der Veränderung der Fluoreszenz eines bestimmten Zeitintervalls ($\Delta C_{Fluo}/\Delta t$) gegen den Sedimentationskoeffizienten (S). Obere Abbildungen zeigen die Abnahme der DNA (A) und die Zunahme des DNA-MBP-CbFic2_{FL} Komplexes (B) in Abhängigkeit der MBP-CbFic2_{FL} Konzentration, fassbar anhand der Fluoreszenzamplitude. (C) Verdeutlicht wird, dass die Bindung der DNA über die C-terminale HTH-Domäne stattfindet. Eine Veränderung der Fluoreszenzamplitude des freien Oligonukleotids ist unter Zugabe von verschiedenen Mengen MBP-CbFic2₁₋₃₀₀ nicht festzustellen. (D) Auftragung der ermittelten Fluoreszenzamplituden aus A gegen die MBP-CbFic2_{FL} Konzentration. Der quadratische Verlauf der Bindungstitration-Messdaten weist auf eine affine Bindung hin und erlaubt die Abschätzung des K_D -Wertes auf den nanomolaren Bereich.

Die Daten aus dem Sedimentationsgeschwindigkeitsexperiment wurden nach der Methode von Stafford analysiert¹⁰³. Benachbarte Fluoreszenzspuren aus einem definierten Zeitintervall wurden subtrahiert und in $\Delta C_{Fluo}/\Delta t$ -Auftragungen konvertiert. Abbildung 26A zeigt die Abnahme der Fluoreszenzamplitude des freien Oligonukleotids in Abhängigkeit der MBP-CbFic2_{FL} Konzentration. Eine vollständige Komplexbildung der DNA ist bei einer Konzentration von 0,4 - 0,6 μ M MBP-CbFic2_{FL} bereits erreicht und weist somit auf eine sehr affine Bindung hin. MBP-CbFic2₁₋₃₀₀, das um die HTH-Domäne verkürzt ist und hier als Kontrolle eingesetzt wurde, zeigt

unter identischen Bedingungen keine Bindung zum Oligonukleotid, was sich in einer gleichbleibenden Fluoreszenzamplitude der freien DNA darlegt (siehe Abbildung 26C). Bemerkenswert sind die Fluoreszenzsignale der entstandenen MBP-CbFic2_{FL}-DNA-Komplexe. Wie in Abbildung 26B zu sehen ist, nimmt mit steigender Konzentration von MBP-CbFic2_{FL} die Sedimentationsgeschwindigkeit zu, was sich in einer heterogenen Verteilung der Messkurven im Bereich von 13-24 Svedberg widerspiegelt.

Zur quantitativen Bestimmung der MBP-CbFic2_{FL}-DNA Bindung wurde daher lediglich die Abnahme der Fluoreszenzamplitude des freien Oligonukleotids mathematisch untersucht. Hierfür wurden entsprechende Fluoreszenzwerte gegen die eingesetzte CbFic2_{FL} Konzentration graphisch aufgetragen und die Datenpunkte an eine quadratische Bindungsisotherme angepasst (siehe Abbildung 26D). Die Bindungskurve zeigt mit einem nahezu geradlinigen Verlauf bis zum Plateau, dass bei allen CbFic2-Zugaben eine vollständige Bindung des Proteins eintritt und kein Gleichgewicht zwischen freien Interaktionspartnern und dem Komplex besteht. Dies deutet an, dass die hier eingesetzten Proteinkonzentrationen deutlich über der Dissoziationskonstante (K_D) der Bindung liegen und somit eine genaue Bestimmung dieses Wertes mit den vorliegenden Daten nicht möglich ist. Der K_D -Wert lässt sich jedoch auf den nanomolaren Bereich eingrenzen. Ein Parameter, der sehr gut aus der Messung hervorgeht, ist die Stöchiometrie der Bindung. Für die vollständige Bindung von 0,2 μ M DNA waren etwa 0,4 μ M MBP-CbFic2_{FL} erforderlich, was einem Verhältnis von 1:2 (DNA:CbFic2) entspricht. Dieser Wert steht zunächst in Diskrepanz zu der ermittelten Sedimentationsgeschwindigkeit der Komplexe, die mit 13-24 Svedberg eine Masse in der Größenordnung von 0,4 - 1,0 Megadalton aufweisen (siehe Anhang, Abbildung 47). Das DNA-Fragment hat eine molekulare Masse von 13 kDa. MBP-CbFic2_{FL} weist eine Masse von 89 kDa auf. Ein Komplex in 1:2 Stöchiometrie würde demnach einer Masse von etwa 200 kDa entsprechen. Daraus kann interpretiert werden, dass sich zwei oder mehrere Komplex zu höheren Einheiten zusammenlagern. Untersuchungen zum Oligomerisierungszustand von MBP-CbFic2 mittels Röntgenkleinwinkelstreuung (engl.: *Small Angle X-Ray Scattering* (SAXS)) zeigen, dass das Protein als Monomer vorliegt. (siehe Anhang, Abbildung 48). Eine Tendenz zur Oligomerisierung offenbart sich erst ab höheren Konzentrationen (> 4 mg/ml), die weit über denen für die im AUZ-Experiment verwendeten Konzentrationen liegen. Es ist denkbar, dass eine DNA-bindungsinduzierte Oligomerisierung von CbFic2, hervorgerufen durch eine hohe lokale Konzentration, stattfindet und so zu einer Verbrückung der einzelnen Komplexe führt. Welche genauen intermolekularen Vorgänge in dieser Konstellation stattfinden, lässt sich an dieser Stelle nicht klären. Hierfür sind weitere Untersuchungen sowie nähere Informationen zur Struktur des Proteins und dem Bindungsmodus nötig.

3.2.2.5. Quantifizierung der Adenylierungsaktivität

In den Abschnitten zuvor wurde ausführlich auf die DNA-Bindung der C-terminalen HTH-Domäne von CbFic2 eingegangen. Ein wesentlicher Aspekt, der bisher nicht berücksichtigt wurde, ist der potentielle Einfluss der DNA-Bindung auf die Adenylierungsaktivität der Fic-Domäne. Erste qualitative, massenspektrometrische Untersuchungen mit rekombinanten MBP-CbFic2_{FL} E66G, das während der Reinigung aus *E. coli* mit einem DNase-RNase Mix behandelt wurde, deuteten im Vergleich zu unbehandelten Proben auf eine erheblich reduzierte Aktivität in der Adenylierung von Histon H3₁₋₂₀ hin (siehe Abbildung 27A). DNA/RNA-befreite Proben zeigten wiederum nach Zugabe von einem kruden Nukleinsäureisolat aus *E. coli*, eine wiederbelebte Adenylierungsaktivität (siehe Abbildung 27B).

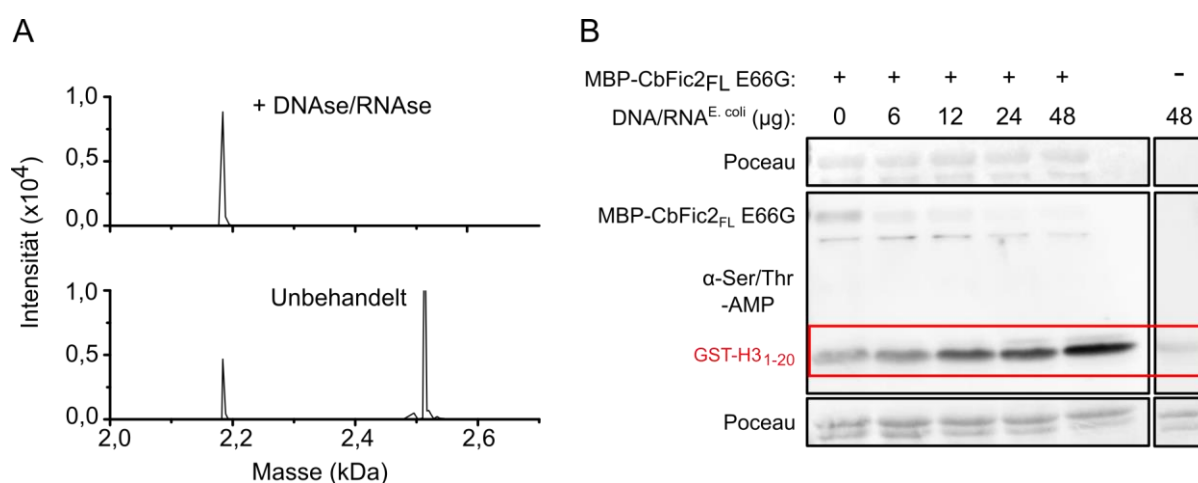


Abbildung 27: Qualitative Untersuchung der CbFic2 vermittelten Adenylierung im Kontext der DNA-Bindung. (A) ESI-MS von H3₁₋₂₀ im Reaktionsansatz mit DNAase/RNase behandeltem (oberes Spektrum) oder unbehandeltem (unteres Spektrum) MBP-CbFic2 E66G. Das Spektrum der DNase/RNase behandelten Probe zeigt keine Umsatz des H3-Peptids und indiziert eine DNA-bindungsabhängige Adenylierungsaktivität. (B) Dargestellt ist der konzentrationsabhängige Einfluss eines DNA/RNA-Isolats aus *E. coli* auf die Adenylierungsaktivität von MBP-CbFic2 E66G anhand einer α -Ser/Thr-AMP-Immunoblotanalyse. Als Modells substrat wurde ein GST-H3₁₋₂₀ Fusionskonstrukt (rot hervorgehoben) verwendet. Zur Kontrolle der Beladung wurden die Proteinbanden mit Ponceau angefärbt (Felder oberhalb und unterhalb des Immunoblots).

Um die Abhängigkeit der enzymatischen Aktivität von CbFic2 von der HTH-DNA-Bindung quantitativ zu erfassen, wurde die Adenylierung des Histon H3-Peptids H3₁₋₂₀, das sich bereits als Modells substrat bewährte (siehe Abschnitt 3.2.2.2.), zeitaufgelöst verfolgt. Hierfür wurden Proben des Reaktionsansatzes zu verschiedenen Zeitpunkten entnommen, auf einer RP-C8 Chromatographiesäule getrennt und die AMP-Modifikation an H3₁₋₂₀ über die selektive Absorption bei 254 nm detektiert. Durch Auftragung der H3₁₋₂₀-AMP Signale (integrierte Fläche des Chromatogramm-Peaks) gegen die Zeitpunkte der Probenentnahme und Anpassung der Daten an eine einfach exponentielle Gleichung wurde die Wechselzahl k_{cat} und daraus die katalytische Effizienz k_{cat}/K_M bestimmt. Zunächst sollten die Proteinpräparate MBP-CbFic2 E66G, das ge-

bunden an diverse Nukleinsäuren (aus *E. coli*) vorlag, mit durch Protaminfällung von DNA/RNA-befreites MBP-CbFic2 E66G verglichen werden (siehe Abbildung 28). Für MBP-CbFic2 E66G wurde ein $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$ -Wert von $3 \cdot 10^1 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ermittelt. Den wenigen kinetisch charakterisierten Fic-Domänen enthaltenen Adenylyltransferasen, wie VopS ($k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$: $1,6 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) oder IbpA ($k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$: $1,5 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) gegenüber, stellt dieser Wert eine recht niedrige katalytische Effizienz dar^{44; 45}. Im Vergleich zu dem Oligonukleotid-befreiten Enzym ($k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$: $0,15 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$), das kaum Aktivität und nur 15% Umsatz nach 48 h aufwies, ist es jedoch ein 200-facher Anstieg. Um sicherzustellen, dass das Enzym durch die Prozedur der Nukleinsäure-Fällung nicht denaturiert wurde und dadurch verminderte Aktivität aufweist, wurde in einem parallelen Ansatz geprüft, ob die Aktivität des Enzyms durch Zugabe von DNA reaktiviert werden kann. Diesbezüglich wurde dem Reaktionsansatz ein 20 Bp langes DNA-Stück mit willkürlicher Sequenz zugesetzt, das bereits in den in Abschnitt 3.2.2.4. präsentierten AUZ-Bindungsstudien verwendet wurde. Wie in Abbildung 28 zu erkennen ist, erhöht sich die Aktivität des Enzyms erheblich. Mit einem $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$ -Wert von $1,9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ weist das reaktivierte CbFic2 eine Erhöhung der katalytischen Effizienz um ca. das 10-fache auf.

Die hier ermittelten Werte implementieren nur sehr geringe katalytische Effizienzen von CbFic2. Es ist jedoch anzumerken, dass mit einem Teilstück von Histon H3, das vermutlich ein suboptimales Substrat darstellt, CbFic2 in Fusion mit einem MBP-Tag sowie bei niedrigen Temperaturen (15°C) gearbeitet wurde, Faktoren, die in der Gesamtheit die Reaktionsrate stark beeinflussen.

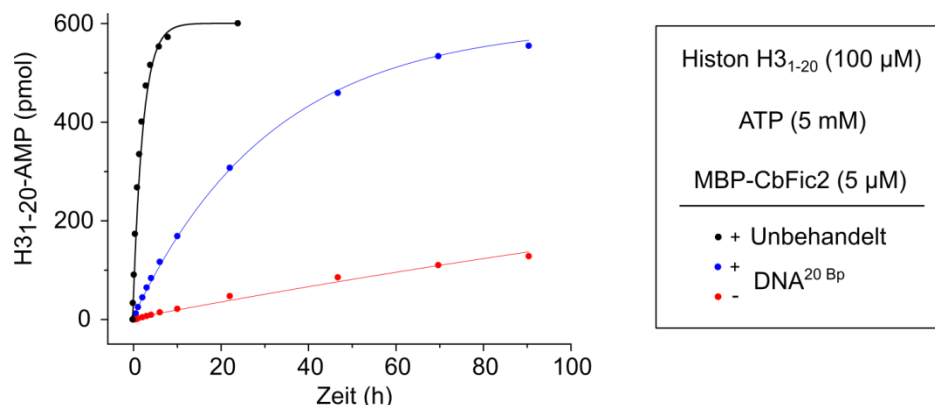


Abbildung 28: Kinetische Untersuchung der Adenylyltransferaseaktivität in Abhängigkeit der DNA-Bindung. Dargestellt ist die Reaktionskinetik der Adenylylierung von H3₁₋₂₀ (100 µM) durch MBP-CbFic2 E66G (5 µM) in unbehandelter Form (schwarz), d. h. gebunden an DNA/RNA aus *E. coli*, sowie von DNA befreitem MBP-CbFic2 E66G (5 µM) vor (rot) und nach Zugabe (blau) eines definierten 20 Bp dsDNA-Fragments (5 µM). Der zeitliche Verlauf der Modifizierung wurde über die Absorption der Nukleobase bei 254 nm in einem HPLC-basierten Assay aufgenommen. Aus dem Vergleich der Proben geht hervor, dass die Adenylylierungsaktivität von CbFic2 in großem Ausmaß von der DNA-Bindung abhängig ist.

Die hier dargestellten kinetischen Untersuchungen bestätigen einen signifikanten Einfluss der DNA-Bindung auf die AMP-Transferaseaktivität des Enzyms. Da funktionelle Eigenschaften eines Proteins stets mit der zugrunde liegenden Struktur im Einklang sind, ist anzunehmen, dass die Bindung der HTH-Domäne an DNA zu konformationellen Änderungen in der Fic-Domäne führt. Dies impliziert wiederum, dass die Domänen nicht unabhängig voneinander agieren, sondern in einer direkten, strukturellen Beziehung stehen. Die hier erzielten Ergebnisse sind im Kontext der bisherigen Erkenntnisse über die Regulation von Fic-Proteinen besonders interessant und stellen vermutlich eine neue Form der Aktivitätskontrolle dar.

3.2.2.6. Evaluierung von Kosubstraten

In der Vergangenheit konnten die Strukturen mehrerer Fic-Domänen im Komplex mit ihren Nukleotidkosubstraten röntgenkristallographisch bestimmt werden^{27;31;43;46}. Dies trug stark zum Verständnis der molekularen Wechselwirkungen zur Nukleotidbindung und der damit verbundenen Spezifität gegenüber verschiedenen NTPs bei. Im Falle von klassischen AMP-Transferasen fungiert das katalytische Fic-Motiv (HxFx(D/E)(A/G)N(G/K)RxxR) vordergründig als Phosphatbinder mit wenigen Wechselwirkung zur Ribose³⁹. Die Nukleobase ist in einer hydrophoben Höhle positioniert mit nur vereinzelt oder keinen Wechselwirkungen zu den Seitengruppen der Base, was sich zum Teil in einem breiten Kosubstratspektrum mancher Fic-Proteine äußert³⁹. Aufgrund dieser Umstände wurde die Nukleotid-Spezifität von CbFic2 in dieser Arbeit untersucht. Hierzu wurde zunächst qualitativ das Histon-Peptid H3₁₋₂₀ auf eine NMP-Modifizierung in Gegenwart verschiedener Nukleotide und MBP-CbFic2 E66G massenspektrometrisch geprüft. Wie in den MS-Spektren in Abbildung 29 zu erkennen ist, findet eine Modifizierung des Peptids mit den Purinnukleotiden ATP und GTP als Kosubstrat statt. Die Pyrimidinnukleotide CTP und UTP werden hingegen nicht als Kosubstrate akzeptiert; ein Ergebnis, das dem aromatischen Heterozyklus der Purinnukleotide eine bedeutende Rolle in der Kosubstrat-Bindung bzw. -Positionierung in der aktiven Tasche von CbFic2 zuschreibt.

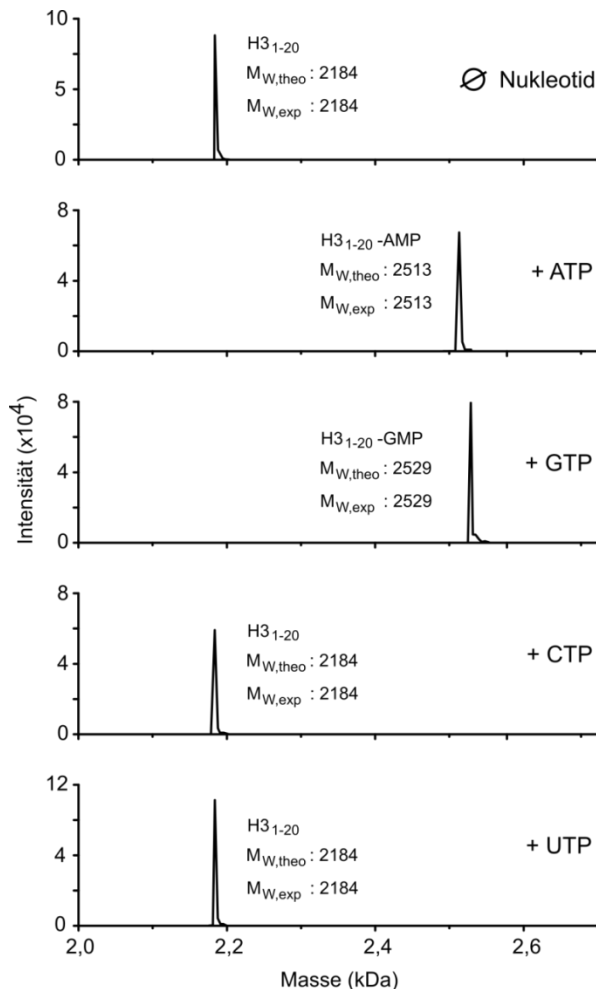


Abbildung 29: Massenspektrometrische Untersuchung zur Evaluierung des Kosubstratspektrums von CbFic2. Abgebildet sind ESI-MS Spektren von Histon H3-Peptid H3₁₋₂₀ nach Inkubation mit MBP-CbFic2 E66G und verschiedenen Nukleotiden. Zur Übersicht sind die Spektren gestapelt in der Reihenfolge: + ddH₂O (Negativkontrolle), + ATP (Positivkontrolle), + GTP, + CTP und + UTP. Der charakteristische Massezuwachs von 329 Da für die AMP- und 345 Da für die GMP-Modifizierung zeigt, dass neben ATP auch GTP Kosubstrat von CbFic2 ist. Die Reaktionsansätze mit CTP und UTP weisen keine enzymatische Umsetzung des Peptids auf. Reaktionsbedingungen: 100 μM Peptid, 5 μM CbFic2 E66G, 2,5 mM Nukleotid (20°C, 16 h). Theoretische und experimentell ermittelte Massen sind innerhalb der Spektren angegeben.

Zur weiteren Evaluierung der Nukleotid-Bindung von CbFic2 wurde die Thermostabilität der Fic-Proteindomäne in Gegenwart verschiedener Nukleotide mittels *Differential Scanning Fluorometry* untersucht. Dies ist ein Verfahren, das zur Identifizierung von Liganden breite Anwendung findet und in Abschnitt 3.1.2. näher beschrieben ist^{95;96;104}. Getestet wurden neben Nukleotidtriphosphaten auch entsprechende Di- und Monophosphat-Formen sowie weitere Moleküle mit einer Nukleotidkernstruktur wie z.B. CDP-Cholin (siehe Anhang, Abbildung 49) in einer Konzentration von 0,5 mM. In der Gesamtheit reflektieren die DSF-Messungen die Ergebnisse aus der massenspektrometrischen Untersuchung. Die Thermostabilität von CbFic2 ist durch Bindung von Adenosin-(Di/Tri)-Phosphat gefolgt von Guanosin-(Di/Tri)-Phosphat am stärksten erhöht. In der Präsenz von Cytidin- und Uracil-(Di/Tri)-Phosphat ist nur eine geringe Stabilisierung des Proteins zu verzeichnen. Weiterhin zeigt sich unter jeder Nukleotidreihe (NMP, NDP, NTP) das gleiche Muster: keine Stabilisierung durch NMPs, jedoch durch NDPs und NTPs mit interessanterweise höherem Beitrag der Diphosphat-Form der Nukleotide auf die Stabilität des Proteins (siehe Abbildung 30). Anzumerken ist, dass dieser Effekt generell bei Fic-Proteinen mit mutiertem Inhibitionsmotiv (E→G) in der α_{inh}-Helix beobachtet wurde. Fic-Proteine ohne eine α_{inh}-Helix (VopS, IbpA) wiesen die höchsten Schmelzpunkte in Gegenwart von NTPs auf (siehe Anhang, Abbildung 49). So sind vermutlich sterische Platzansprüche des NTP-γ-Phosphats bei

den Inhibitionsmotiv-Mutanten nicht vollständig bereinigt. Der Unterschied in der Schmelztemperatur wäre demzufolge auf eine Verminderung der Gibbs-Bindungsenergie, bedingt durch eventuelle elektrostatische Abstoßungen des γ -Phosphats mit der α_{inh} -Helix oder einer Einschränkung der Freiheitsgrade des Nukleotids, zurückzuführen. Ein katalytisch aktiver Zustand ist jedoch mit den Inhibitionsmotiv-Mutanten (CbFic1 E55G, CbFic2 E66G) gegeben, wie anhand der verschiedenen Untersuchungen in dieser Arbeit gezeigt wurde. Des Weiteren findet keine Modifizierung von Histon H3 in Gegenwart von ADP und GDP statt (siehe Anhang, Abbildung 50). Die Tatsache, dass eine Stabilisierung in nahezu jeder Messung zu beobachten ist, impliziert mutmaßlich die Bindung aller Nukleotide, jedoch scheinen nur ATP und GTP eine für die Transferreaktion geeignete Position in der aktiven Tasche von CbFic2 einzunehmen. Da weiterhin zwischen ATP und GTP Unterschiede in der Schmelztemperatur messbar sind und sich die jeweiligen Basen der Nukleotide nur in zwei Seitengruppen unterscheiden, kann aus diesem Experiment geschlossen werden, dass die Aminofunktion an der C6-Position im Purinring einen energetisch günstigen und/oder eine Hydroxylgruppe an der C6 bzw. C2-Position einen energetisch ungünstigen Beitrag an der Bindung durch CbFic2 liefert (siehe Abbildung 30B).

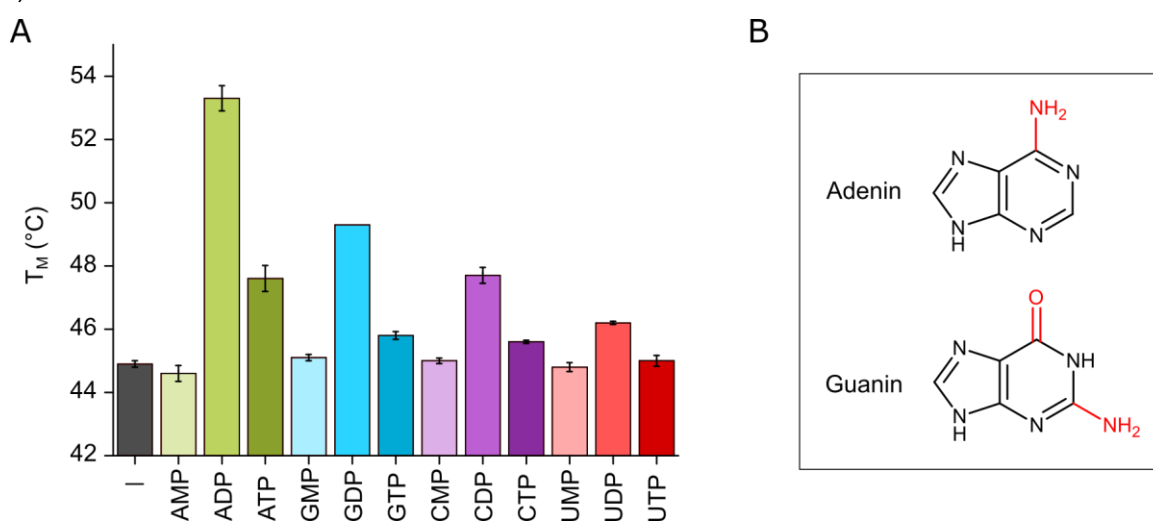


Abbildung 30: Qualitativer Ligandenbindungstest zur Evaluierung von Kosubstraten. (A) Gezeigt sind Schmelzpunkte (T_M) von 5 μ M CbFic2₁₋₃₀₀ in Gegenwart von 0,5 mM Adenin- (grün), Guanin- (blau), Cytidin- (lila) und Uridinnukleotiden (rot) als Balkendiagramm gemittelt aus drei unabhängigen Experimenten. Die Messungen wurden mittels *Differential Scanning Fluorometry* unter Verwendung von SYPRO Orange als Reporter für die Entfaltung des Proteins durchgeführt. Die vertikalen Linien innerhalb der Balken repräsentieren den Standardfehler. (B) Strukturformel von Adenin und Guanin mit roter Hinterlegung der chemischen Unterschiede.

Für eine quantitative Bestimmung der CbFic2-Nukleotid Bindung wurde eine konstante Konzentration von CbFic2 in parallelen Ansätzen mit zunehmenden Mengen an Nukleotid versetzt und der Schmelzpunkt des Proteins bestimmt. Anschließend wurden die ermittelten Werte gegen die jeweiligen Nukleotidkonzentration aufgetragen und an eine hyperbole Gleichung angepasst, um die Dissoziationskonstante (K_D) zu berechnen. Wie in Abbildung 31A zu erkennen ist,

zeigen Anpassungskurve und Datenpunkte der GTP-CbFic2 Bindungstitration eine nur geringwertige Abweichung, was sich ebenso in einem kleinen Standardfehler widerspiegelt. Für ATP hingegen ist ein biphasischer Verlauf wahrnehmbar, der vermutlich auf eine Hydrolyse zu ADP und einem stärkeren Stabilisierungseffekt von ATP zurückzuführen ist. Ein klarer Endpunkt der Bindung ist daher nicht zu ermitteln, wodurch die Anpassung und der berechnete K_D -Wert weniger präzise ausfallen. Festzustellen ist, dass keine direkte Verbindung zwischen dem Beitrag zur Thermostabilität und Affinität der Bindung für die hier untersuchte Protein-Ligand Interaktion besteht. So weist ATP einen K_D -Wert von $0,3 \pm 0,1$ mM und GTP einen K_D -Wert von $0,2 \pm 0,02$ mM in der Bindung zu CbFic2 auf. Ein signifikanter Unterschied ist demnach nicht erkennbar. Weiterhin beruht die deutliche Stabilisierung von CbFic2 durch ADP (K_D $0,3 \pm 0,07$ mM) nicht auf einer im Vergleich zu ATP erhöhten Bindungsaffinität (siehe Anhang, Abbildung 51). In Übereinstimmung mit den kinetischen Bindungsparametern zeigen sich in der katalytischen Effizienz des Proteins, die wie in Abschnitt 3.2.2.5., beschrieben ermittelt wurde, ebenfalls keine Unterschiede (siehe Abbildung 31B). Mit identischen k_{cat}/K_M Werten von $3 \cdot 10^1 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ stellen die Purinnukleotide ATP und GTP gleichwertige Kosubstrate für CbFic2 dar. Unter Einbeziehung der Literaturangaben zu intrazellulären Nukleotidkonzentrationen kann jedoch angenommen werden, dass CbFic2 aufgrund der weit höheren Konzentration von ATP ($3,2 \pm 1,7$ mM) gegenüber GTP ($0,5 \pm 0,2$ mM) überwiegend als Adenylyltransferase tätig ist⁴.

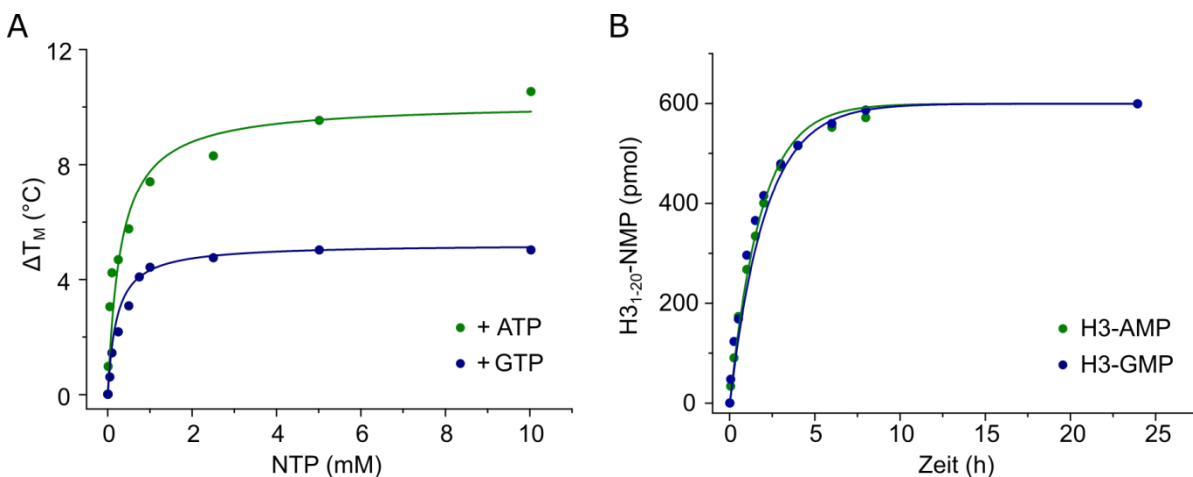


Abbildung 31: Kinetische Untersuchung der CbFic2 Kosubstrat-Bindung. (A) Quantitative Analyse der ATP- und GTP-CbFic2-Bindung. Eine konstante Konzentration CbFic2₁₋₃₀₀ wurde mit steigenden Mengen ATP bzw. GTP in separaten Ansätzen inkubiert und anschließend zur Schmelzpunktanalyse einer DSF Messung zugeführt. Der hyperbolische Verlauf der Messkurve lässt eine Berechnung der Dissoziationskonstante zu, die im Vergleich von ATP zu GTP keine signifikanten Unterschiede zeigt. Der K_D liegt unter den im Experiment vorliegenden Bedingungen für beide Nukleotide im mittleren mikromolaren Bereich. (B) Reaktionskinetik der Adenylylierung und Guanylylierung von H3₁₋₂₀ in vergleichender Darstellung. Der zeitliche Verlauf der Modifizierung wurde über die Absorption der Nucleobase bei 254 nm in einem HPLC-basierten Assay aufgenommen. Ein wesentlicher Unterschied zwischen ATP und GTP als Kosubstrat von CbFic2 ist anhand der Reaktionskinetik nicht festzustellen.

3.2.3. Histon H3-Adenylylierung: Untersuchung der physiologischen Konsequenzen

3.2.3.1. Analyse der Zellproliferation

In Abschnitt 3.3.2.2. wurden die Positionen S10 und S28 in Histon H3 als AMP-Modifikationsstellen der CbFic2 vermittelten Adenylylierung identifiziert. Diese Positionen sind Bestandteil des ARKS-Sequenzmotivs, das sich innerhalb des N-terminalen Arms von Histon H3 einmal wiederholt. An beiden Stellen nimmt die Phosphorylierung eine bedeutende Rolle in der Stimulierung der Genexpression und Einleitung der Zellteilung ein. Für Letzteres findet die Phosphorylierung im Chromatin global statt und ist für diesen Prozess essentiell. Im Rahmen dieser Arbeit sollte untersucht werden, inwiefern die H3-Adenylylierung der Phosphorylierung an entsprechenden Stellen entgegenwirkt und ob diese Konkurrenz eine Auswirkung auf die Zellproliferation hat.

Um dies zu analysieren, wurde das Zellwachstum von HEK293T-Zellen, die transient konstitutiv aktives CbFic2 E66G (GFP-markiert) exprimieren, verfolgt. Als Vergleichskontrolle dienten Zellen, die mit GFP-CbFic2 WT sowie konstitutiv inaktiven GFP-CbFic2 H205A DNA-Konstrukten transfiziert wurden. Zusätzlich wurde anhand des Lebend/Tod-Verhältnisses geprüft, ob eine toxische Wirkung aus der Histon H3-Adenylylierung hervorgeht. Ausgehend von einer Zelldichte von $5 \cdot 10^5$ Zellen/ml wurden die Zellen nach Transfektion für zwei Tage bei optimalen Wachstumsbedingungen inkubiert und die Zelldichte erneut bestimmt. Wie in Abbildung 32B zu erkennen, konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Kulturen ermittelt werden. Sowohl die Zellkultur, die den Wildtyp, als auch die Zellkulturen, die konstitutiv aktives oder inaktives GFP-CbFic2 exprimieren, wiesen eine Zelldichte von etwa $2,5 \cdot 10^6$ Zellen/ml und einen Lebend/Tod-Verhältnis von 9:1 auf. Die Transfektionseffizienz betrug durchschnittlich 70-80% ohne signifikante Abweichungen in den einzelnen Messungen. Eine toxische bzw. wachstumshemmende Wirkung, ausgehend von GFP-CbFic2 E66G, kann demnach ausgeschlossen werden.

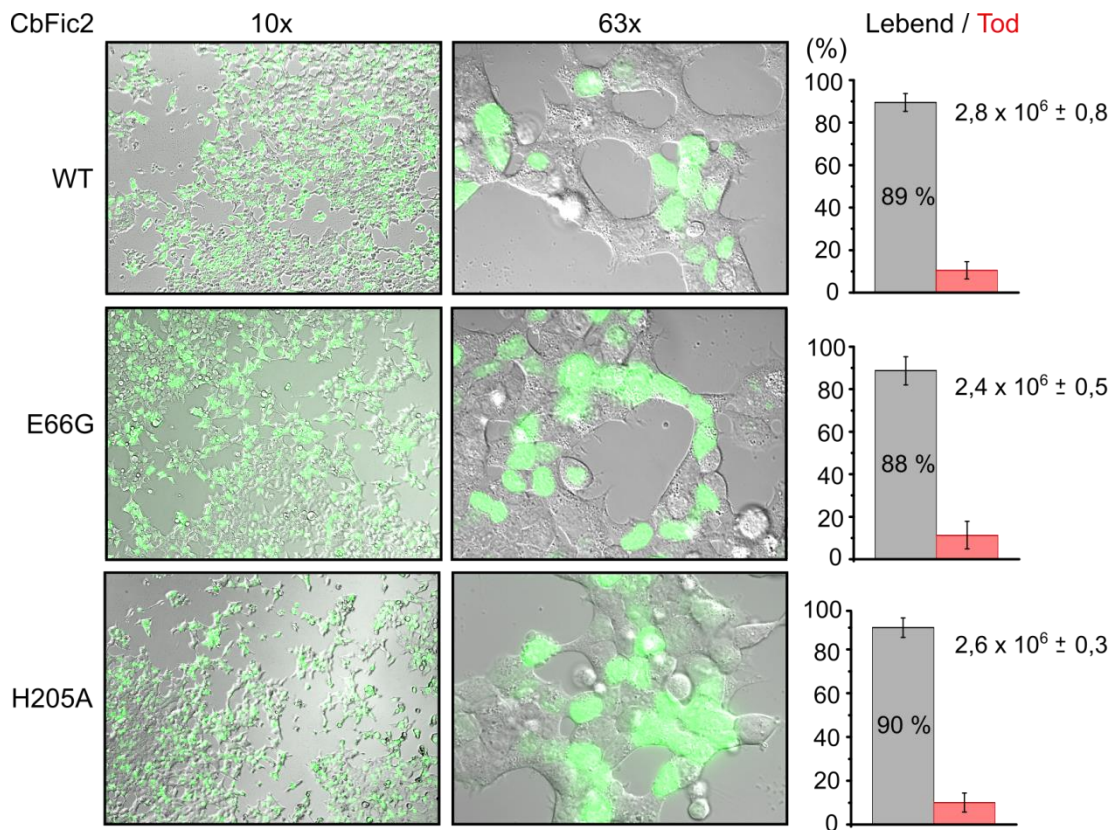


Abbildung 32: Einfluss von CbFic2 auf die Zellproliferation. Zur Bestimmung einer putativ toxischen oder wachstumshemmenden Wirkung der CbFic2 vermittelten Adenylylierung wurde ein Zellproliferationsassay mit HEK293T-Zellen nach Transfektion mit GFP-CbFic2 in der WT Form, der konstitutiv aktiven sowie inaktiven Variante als Negativkontrolle durchgeführt. Linksseitig ist der morphologische Zustand der Zellen durch Überlagerung von DIC- und Fluoreszenzaufnahmen festgehalten und rechtsseitig sind graphisch die Kennzahlen für Zellvitalität (Verhältnis Leben/Tod) und -dichte (Zellen/ml).

3.2.3.2. Analyse der Genregulation

Die vorangegangene Untersuchung hat gezeigt, dass die CbFic2 vermittelte Adenylylierung von Histon H3 keine proliferationshemmende Wirkung auf HEK293T-Zellen hat. Es wurde daher vermutet, dass diese nicht global, sondern gezielt an definierten Abschnitten im Chromatin zur Regulation bestimmter Gene stattfindet. Um dies zu erörtern, wurde eine *stable isotope labeling by amino acids* (SILAC)-basierte massenspektrometrische Proteomanalyse durchgeführt. Mit dieser Methode sollten potentiell hochregulierte oder stillgelegte Gene bzw. Signalwege über ihre Proteinprodukte identifiziert werden, die in Verbindung mit der Histon H3-Adenylylierung stehen. Hierzu wurden HEK293T-Zellen, die transient konstitutiv aktives GFP-CbFic2 E66G exprimieren, in einem Nährmedium mit isotopenmarkierten L-[$^{13}\text{C}_6$, $^{15}\text{N}_4$]-Arginin und L- $^{13}\text{C}_6$, $^{15}\text{N}_2$]-Lysin kultiviert. Als Vergleich diente eine mit L-[$^{13}\text{C}_6$, $^{14}\text{N}_4$]-Arginin- und L-[$^2\text{H}_4$]-Lysin-versetzte Zellkultur, die mit dem katalytisch inaktiven GFP-CbFic2 H205A transfiziert wurde. Nach fünftägiger Aufzucht der Zellen in entsprechenden Nährmedien und darauffolgender Transfektion, wurden diese für weitere zwei Tage inkubiert, lysiert, in äquivalenten Mengen ver-

eint und für die massenspektrometrische Untersuchung präpariert. Es wurden insgesamt drei biologische Replikate aus voneinander unabhängigen Experimenten unter gleicher Prozedur generiert, wovon eines unter inversen Bedingungen stattfand, um einen Einfluss der einzelnen Isotopenmedien auf die proteomische Beschaffenheit der Zellen ausschließen zu können. Eine detaillierte Beschreibung der Vorgehensweise ist in Abschnitt 6.3.8. aufgeführt. Die massenspektrometrische Untersuchung fand in Kooperation mit Dr. Nina Bach aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Stefan Sieber statt. Mittels hochsensitiver Nano-HPLC-MS/MS-Massenspektrometrie und bioinformatischer Auswertung mit der MaxQuant Software wurden 1982 Proteine in mindestens einem Replikate identifiziert, wovon 1632 quantifiziert werden konnten. Für ein aussagekräftiges Ergebnis wurden die Datensätze der einzelnen Replikate für eine statistische Analyse zusammengefasst. Berücksichtigt wurden dabei nur Proteine, die in mindestens zwei Replikaten quantifiziert werden konnten und mindestens zwei eindeutig zuordenbare Peptide (*Unique Peptides*, UP) aufwiesen. Nach diesen Auswahlkriterien wurden insgesamt 1111 Proteine in der Statistik bewertet.

Abbildung 33A zeigt die Häufigkeitsverteilung ermittelter Probe/Kontrolle (E66G/H205A)-Signalverhältnisse in Form von Histogrammen für jedes der drei Replikate, um die Güte der gesammelten Daten darzustellen. Alle Replikate weisen eine Gauß-ähnliche Verteilung der Verhältnisse mit Maxima nahe dem Wert 0 auf, was einem vertrauenswürdigen Datensatz entspricht. Zur Bestimmung der statistischen Relevanz einer veränderten Protein-Abundanz wurde ein t-Test durchgeführt. Als signifikant wurden alle Veränderungen unterhalb eines Schwellenwertes von $p = 0,05$ (Überschreitungswahrscheinlichkeits-Signifikanzwert) definiert. Abbildung 33B zeigt die logarithmische Auftragung der Signalverhältnisse (\log_2) gegen den statistischen Wert p ($-\log_{10}$) und bietet eine übersichtliche Darstellung des ausgewerteten Datensatzes. Wie zu erkennen ist, geht die Veränderung einzelner Proteinhäufigkeiten nicht über das 1,5-fache hinaus. Sogenannte Ausreißer, die auf eine signifikante Veränderung in der Genexpression deuten würden, sind nicht vorhanden.

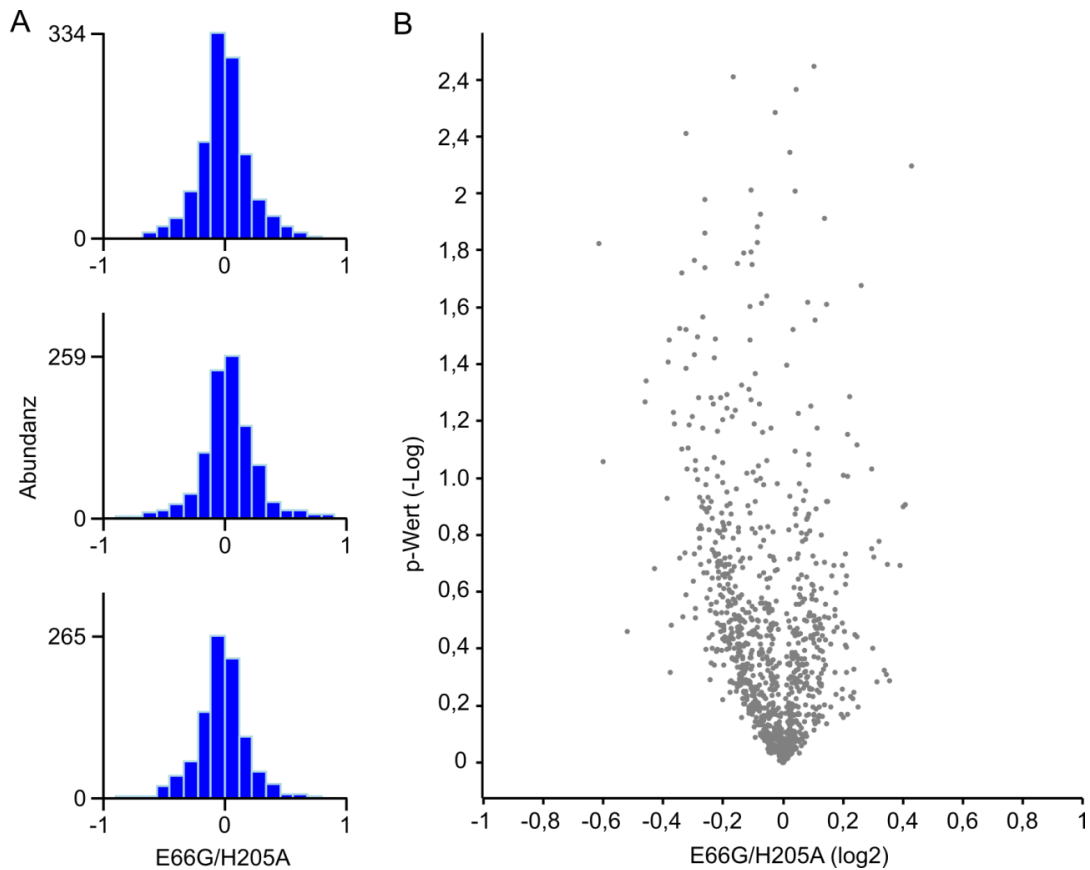


Abbildung 33: Analyse der Genexpression von HEK293T-Zellen nach Transfektion mit CbFic2. (A) Häufigkeitsverteilung der Probe/Kontrolle (CbFic2: E66G/H205A)-Signalverhältnisse dargestellt in Form eines Histogramms. (B) *Volcano plot* zur Übersicht der SILAC-Daten nach statistischer Auswertung. Aufgetragen ist der binäre Logarithmus des Verhältnisses Probe zu Kontrolle gegen den negativen dekadischen Logarithmus des p-Werts.

Eine signifikante Regulation eines Proteins konnte mit der hier dargestellten SILAC-Untersuchung nicht identifiziert werden. Zur Einordnung der Ergebnisse sollten einige bedeutende Faktoren berücksichtigt werden, allem voran die Transfektionseffizienz, die bei etwa 70-80% lag. Dadurch bedingt könnten kleinere Unterschiede im Expressionslevel bestimmter Gene nicht detektiert worden sein. Des Weiteren ist die Nähe des hier verwendeten Modelorganismus zur mit *Coxiellen*-infizierten natürlichen Wirtszellen zu erwähnen. In einem infektiösen System bestehen in der Regel Reize, die zu einer spezifischen Immunantwort führen, verbunden unter anderem mit der Expression distinkter Gene. Im Falle einer Inhibierung einer derartigen Genexpression durch die CbFic2 vermittelte Adenylylierung wäre eine Veränderung in der Abundanz charakteristischer Proteine diesbezüglich in den hier gewählten Bedingungen nicht zu erfassen, da eine entsprechende Stimulierung gefehlt hat. Ferner ist zu bedenken, dass in einer menschlichen Zelle etwa 20.000 Protein-codierende Gene existieren¹⁰⁵. In Anbetracht dieser Anzahl wird deutlich, dass vermutlich nur ein kleines Fenster zur proteomischen Beschaffenheit der Zelle geöffnet wurde und mögliche Kandidaten einer CbFic2 vermittelten Regulation der Auswertung fern blieben.

3.3. LpFic aus *Legionella pneumophila*

In dem Kapitel zuvor wurde mit CbFic2 ein neuer Einblick in die funktionelle Vielfalt von Fic-Proteinen gegeben. Der folgende Abschnitt befasst sich mit dem Protein LpFic aus *Legionella longbeachae*. LpFic bildet aufgrund hoher Sequenzähnlichkeit zu CbFic1 und CbFic2 mit Konvergenz einer HTH-Domäne am C-Terminus und der phylogenetischen Nähe der Gattungen *Coxiella* und *Legionella* ein weiteres, sehr interessantes Versuchsobjekt dar. Die Ergebnisse, die mit der Untersuchung von LpFic erzielt wurden, werden in den folgenden Abschnitten präsentiert.

3.3.1. Intrazelluläre Lokalisation von LpFic

Zwecks einer initialen Eingrenzung möglicher Substrate, sollte die subzelluläre Lokalisation von LpFic charakterisiert werden. Diesbezügliche fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen erfolgten in analoger Vorgehensweise zu CbFic1 und CbFic2, wie zuvor in Abschnitt 3.1.1. und 3.2.1.1. beschrieben. LpFic-Genkonstrukte wurden mit einem GFP-Tag ausgestattet, in Cos1-Zellen transient exprimiert und anschließend mikroskopisch untersucht. Fluoreszenzaufnahmen entsprechender Zellen, die transient LpFic-GFP (C-terminal markiert) exprimieren, zeigten eine diffuse Verteilung des Proteins im Zytosol, ohne eine definierte subzelluläre Lokalisation. GFP-LpFic (N-terminal markiert) wies hingegen eine klare Lokalisation an geschwungene filamentöse Strukturen, die aufgrund der zellumspannenden Verteilung auf das Zytoskelett zurückzuführen waren (siehe Abbildung 34).

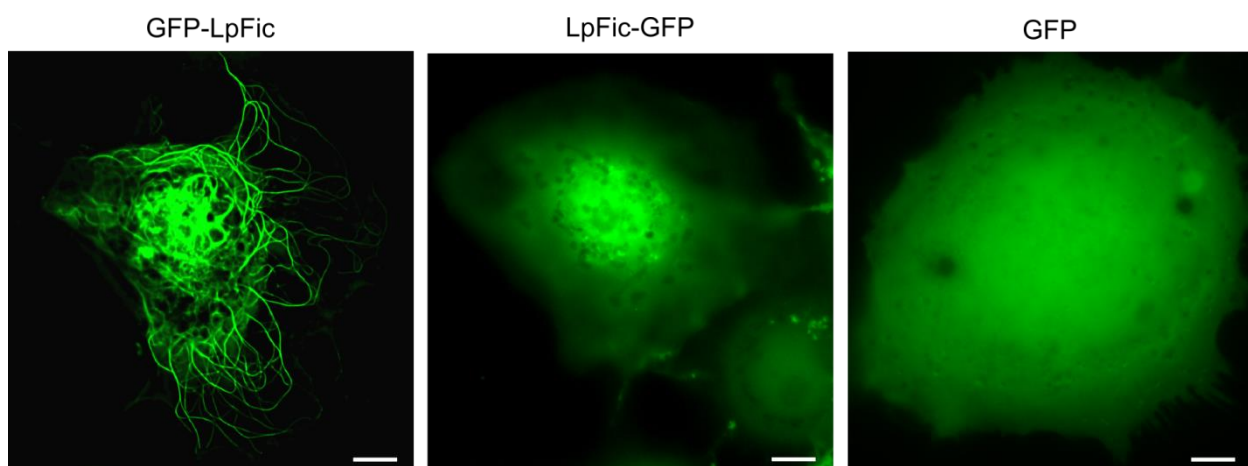


Abbildung 34: Subzelluläre Lokalisation von LpFic. Dargestellt sind Fluoreszenzaufnahmen von GFP-LpFic (links), LpFic-GFP (mittig) und GFP als Negativkontrolle (rechts) nach transienter Expression in Cos1-Zellen. Zur präziseren Darstellung der feinen Zytoskelettstrukturen wurde eine Bildsequenz über die z-Koordinate der Zelle aufgenommen und anschließend über die Huygens Software dekonvolviert. Maßstabsleiste: 10 µm.

Das Zytoskelett wird im Wesentlichen durch Aktfasern sowie Mikrotubuli- und Intermediärfilamente gebildet, die jeweils spezifische Subfunktionen in der Zelle einnehmen. Um die genaue

Lokalisation von GFP-LpFic bezüglich dieser Zellkomponenten zu identifizieren, wurden Kollationsversuche durchgeführt. Zunächst wurde fluoreszenzmarkiertes CFTM594-Phalloidin-Konjugat herangezogen, das F-Aktin mit hoher Affinität bindet und ein spezifisches Reporter-molekül für dieses darstellt. Eine Kollation des Reporter-moleküls mit GFP-LpFic war unter verschiedenen Versuchsbedingungen nicht feststellbar. Die CFTM594-Phalloidin-markierten Aktinfasern wiesen überwiegend geradlinige Strukturen auf, die deutlich von der filamentösen Organisation entsprechender GFP-LpFic-gebundenen Strukturen in den verwendeten Cos1-Zellen zu unterscheiden waren (siehe Anhang, Abbildung 52). Zur Visualisierung der Mikrotubuli wurde mCherry-markiertes α -Tubulin (mCherry: rot-fluoreszierendes Protein aus *Discosoma sp.*) gewählt, das mit GFP-LpFic in Cos1-Zellen koexprimiert wurde. α -Tubulin konstituiert mit β -Tubulin zu einem Heterodimer, was die Grundeinheit von Mikrotubuli-Filamenten bildet¹⁰⁶. Das verwendete Konstrukt wurde ursprünglich zur Analyse der ER-Dynamik entlang von Mikrotubuli-Strukturen generiert und von Gia Voeltz für die hier beschriebene Untersuchung zur Verfügung gestellt¹⁰⁷. Repräsentative Fluoreszenzaufnahmen sind in Abbildung 35 aufgeführt.

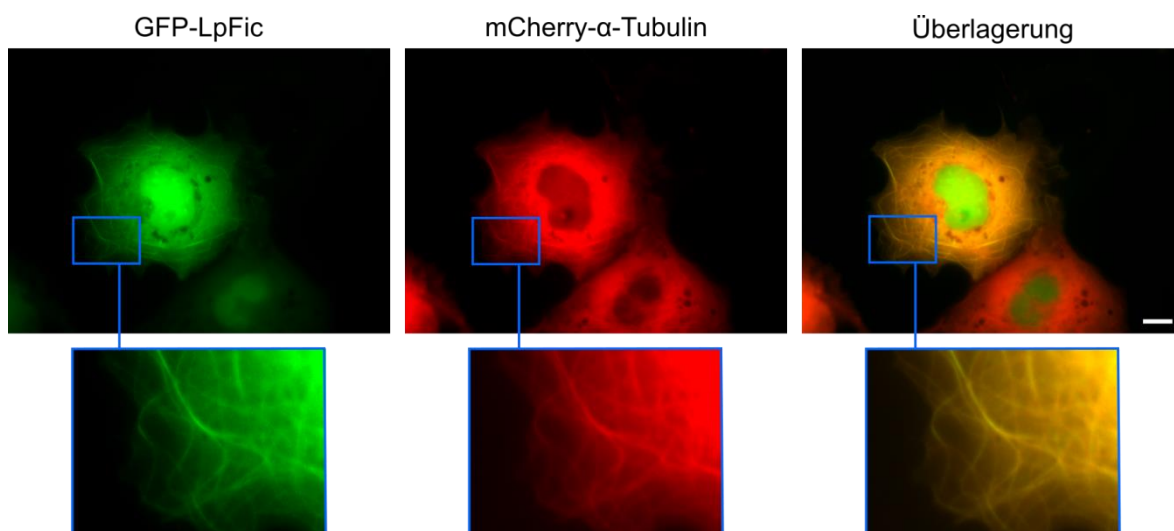


Abbildung 35: Transiente Koexpression von GFP-LpFic und mCherry- α -Tubulin. Dargestellt sind Fluoreszenzaufnahmen von GFP-LpFic E65G (grün) nach Koexpression mit mCherry- α -Tubulin (rot) in Cos1-Zellen. Die Überlagerung der Fluoreszenzbilder zeigt eine präzise Abdeckung der Signale, folglich eine Kolokalisation der beiden exprimierten Proteine. Vergrößerungen ausgewählter Bereiche sind in blauer Umrandung unter den Fluoreszenzaufnahmen abgebildet. Maßstabsleiste: 10 μ m.

Wie anhand der Überlagerung der Fluoreszenzaufnahmen in Abbildung 35 zu erkennen ist, decken sich die Signale von GFP-LpFic und mCherry- α -Tubulin nahezu vollständig. In beiden Fluoreszenzaufnahmen sind die Formen der filamentösen Strukturen deutlich ausgeprägt. Der Kontrollversuch unter Verwendung des GFP-Leervektors weist keine dementsprechende Überlagerung auf (siehe Anhang, Abbildung 53), was die Lokalisation von LpFic an Mikrotubuli eindeutig belegte. Bemerkenswert ist das im Vergleich zu der Einzelexpression der Konstrukte

sehr starke Hintergrundsignal. Eine plausible Interpretation dieser heterogenen Signalverteilung ist, dass LpFic und α -Tubulin unmittelbar nach ihrer Proteinbiosynthese miteinander interagieren und dadurch ein Einbau des α -Tubulin in Mikrotubuli-Filamente verhindert wird. Ein weiterer in diesem Zusammenhang zu beachtender Aspekt ist die dynamische Instabilität der Mikrotubuli-Strukturen. Mikrotubuli sind aus vielen Einheiten zusammengesetzte Gebilde mit einer begrenzten Dauer des Bestehens und befinden sich in einem ständigen Gleichgewicht zwischen polymerisierter und depolymerisierter Form¹⁰⁸. Die durch die Überexpression bedingte hohe Konzentration an α -Tubulin könnte einen verlangsamen Effekt auf diesen Prozess haben, was den Anteil der ungebundenen mCherry- α -Tubulin Spezies im Zytosol und die entsprechende Signalentwicklung erklären würde. Nichtsdestotrotz bestehen ausreichend Signale in Form der filamentösen Strukturen, die eine Lokalisation von LpFic an Mikrotubuli eindeutig zeigen. Interessant ist weiterhin die hohe Fluoreszenzsignalintensität im Zentrum der Zelle, die auf eine partielle Lokalisation von GFP-LpFic im Zellkern hinweist. Mikroskopische Untersuchungen mit Hoechst-33342 als Gegenfärbung für den Zellkern bestätigen diese Vermutung. Wie anhand der Fluoreszenzaufnahmen in Abbildung 36 zu erkennen ist, überlagert das intensive, zentralgelegene GFP-LpFic-Fluoreszenzsignal vollständig mit dem des nukleären Markers Hoechst-33342. Aus der in Abschnitt 3.2.1.3. dargestellten Domänenstudie von CbFic2 ging hervor, dass die Zellkernlokalisierung des Proteins von der HTH-Domäne abhängig ist. LpFic weist eine identische Domänenorganisation mit Konvergenz einer HTH-Domäne am C-Terminus auf. Ein entsprechender Zusammenhang bestätigte sich für LpFic nicht (siehe Anhang, Abbildung 54).

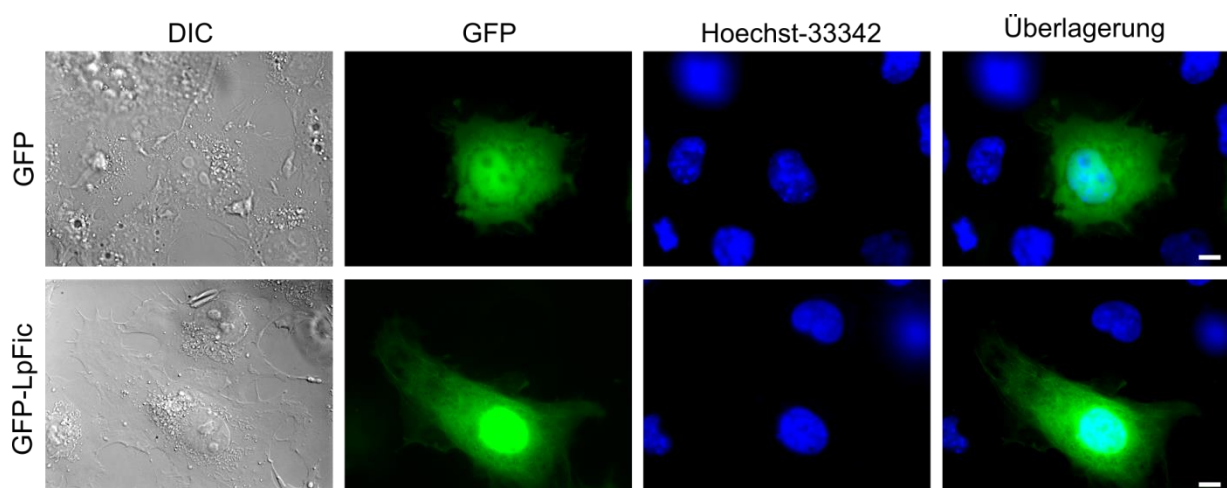


Abbildung 36: Fluoreszenzmikroskopie zur Untersuchung der partiellen GFP-LpFic Zellkernlokalisierung. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von (A) GFP allein (Leervektor) und (B) GFP-LpFic. Cos1-Zellen wurden mit entsprechenden Genkonstrukten transfiziert und nach 24 h mikroskopiert. Zur Visualisierung der Zellkerne wurde Hoechst-33342 verwendet. Die Bilderreihen zeigen (von links nach rechts): Differentialinterferenzkontrast, GFP-Kanal (Grün), DAPI-Kanal (Blau) und die Überlagerung beider Fluoreszenzaufnahmen. Deutlich zu erkennen ist eine Kolokalisation von GFP-LpFic und Hoechst-33342. Maßstabsleiste: 10 μ m.

3.4.2. LpFic adenyliert die RhoGTPase Cdc42 *in vitro*

Die im vorangegangenen Abschnitt vorgestellte mikroskopische Untersuchung zeigt unter anderem deutlich die Assoziation von LpFic an Mikrotubuli-Strukturen von Cos1-Zellen. Dies indizierte eine mögliche Rolle des Proteins in der *Legionella longbeachae*-Infektion von Wirtszellen. Am Beispiel von DrrA aus *Legionella pneumophila* wurde in der Vergangenheit bereits gezeigt, dass die AMP-Modifizierung als molekulares Werkzeug eine bedeutende Rolle in der Manipulation wichtiger Signalwege durch Bakterien der Gattung *Legionella* einnimmt⁸⁶. DrrA lokalisiert am zytosolischen Teil der LCV-Membran, wohin es die GTPase Rab1 zunächst rekrutiert und später durch Adenylierung inhibiert^{85;109;110}. Die spezifische Lokalisation von LpFic implementiert einen möglichen Einfluss des Proteins auf Prozesse, die mit dem Mikrotubulinetzwerk unmittelbar in Verbindung stehen. Anhand der Interaktion von CbFic2 und Histon H3 wurde in dieser Arbeit bereits gezeigt, dass die Funktion eines Proteins in der Regel eng mit dessen subzellulärer Lokalisation verknüpft ist. Für die Suche nach potentiellen Zielproteinen von LpFic wurde daher das Hauptaugenmerk speziell auf Proteine gesetzt, die regulatorische Aufgaben in der Organisation von Mikrotubuli und daran gekoppelten Prozessen einnehmen. Eine derartige Rolle ist RhoGTPasen als Hauptregulatoren des Zytoskeletts zuzuschreiben¹¹¹. Vertreter dieser Proteinfamilie werden eng mit der Steuerung von Stabilität und Motilität des Mikrotubulinetzwerks sowie der Bildung des Spindelapparates verbunden¹¹¹. Einzelne RhoGTPasen (Cdc42, Rac1 und RhoA) wurden bereits als physiologisch relevante Substrate der Fic-Proteine VopS aus *Vibrio parahaemolyticus* und IbpA aus *Histophilus somni* beschrieben^{9;14}. Infolge dieser Überlegung wurde die RhoGTPase Cdc42 für entsprechende Untersuchungen mit LpFic herangezogen. Initiale Experimente bestätigten, dass Cdc42₁₋₁₈₈ ein Substrat von LpFic E66G unter *in vitro* Bedingungen darstellt. Nach Inkubation beider Proteine in einem Reaktionsansatz mit ATP wurde eine Monoadenylierung der RhoGTPase durch den charakteristischen Massezuwachs von 329 Da in einer ESI-MS detektiert (siehe Abbildung 37).

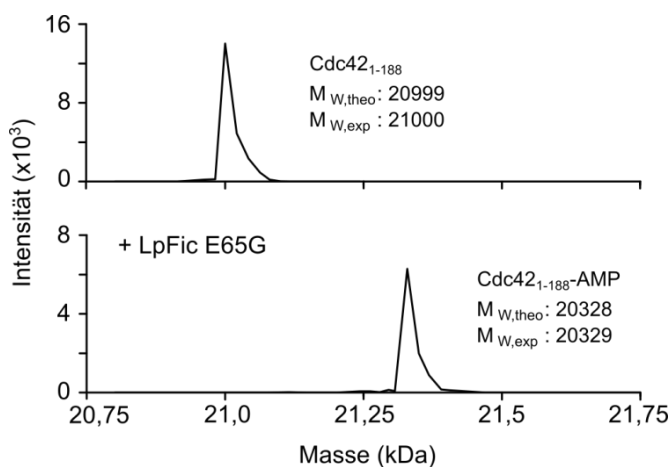


Abbildung 37: Massenspektrometrische Analyse der Cdc42 Adenylierung. Gezeigt sind ESI-MS Spektren von Cdc42₁₋₁₈₈ nach Inkubation ohne (oben) und mit LpFic E65G (unten) in einer Reaktionslösung mit ATP. LpFic adenyliert Cdc42₁₋₁₈₈, illustriert anhand des charakteristischen Massezuwachses von 329 Da für eine AMP-Gruppe. Theoretische und experimentell ermittelte Massen sind innerhalb des Spektrums angegeben.

Kleine GTPasen sind molekulare Schalter, die sich in zwei interkonvertierbaren Nukleotidzuständen befinden. In der aktiven, GTP-gebundenen Form unterscheiden sie sich von der inaktiven GDP-gebundenen Form aufgrund von Konformationsunterschieden in zwei variablen Regionen, die als *Switch I* und *Switch II* bezeichnet werden¹¹². Es ist daher von besonderem Interesse zu untersuchen, welcher Aktivitätszustand von einem Interaktionspartner präferiert wird. Die LpFic E66G Adenylylierung von Cdc42₁₋₁₈₈ wurde in diesem Sinne quantitativ analysiert. Hierfür wurde Cdc42₁₋₁₈₈ vollständig mit GDP und in einem parallelen Ansatz mit dem GTP-Analogen GppNHp beladen und in einem Reaktionsansatz mit LpFic unter identischen Bedingungen inkubiert. Aus der Reaktionslösung wurden Proben zu verschiedenen Zeitpunkten entnommen, einer Immunoblotanalyse mit α -Tyr-AMP-Antikörpern unterzogen und die Signalintensitäten entsprechender Cdc42₁₋₁₈₈-AMP Banden bestimmt (siehe Abbildung 38A). Die Intensitätswerte wurden anschließend auf einer Ladekontrolle normiert, gegen die Zeitpunkte der Probenentnahme aufgetragen und an eine einfach exponentielle Gleichung angepasst (siehe Abbildung 38B). Durch die sich ergebende Anpassungsgleichung wurde unter Einbeziehung der Enzymkonzentration die katalytische Effizienz k_{cat}/K_M bestimmt, die für LpFic E66G gegenüber Cdc42₁₋₁₈₈ im aktiven Zustand ($1,6 \cdot 10^1 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$) eine vierfach verringerte katalytische Effizienz gegenüber Cdc42₁₋₁₈₈ im inaktiven Zustand ergab ($5,9 \cdot 10^1 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$). Die k_{cat}/K_M -Werte zeigen somit deutlich, dass die RhoGTPase im inaktiven Zustand das präferierte Substrat darstellt.

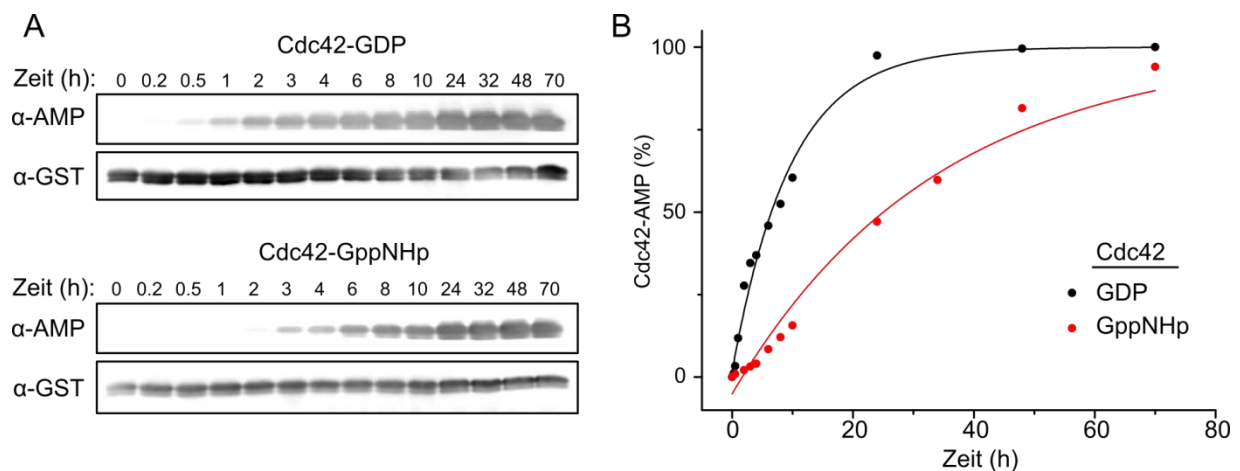


Abbildung 38: Quantitativer Vergleich der Adenylylierung von aktiven und inaktiven Cdc42. (Links) Zeitaufgelöste Verfolgung der Adenylylierungsreaktion von LpFic E65G mit Cdc42-GDP und Cdc42-GppNHp mittels α -Tyr-AMP-Antikörpern in einer Immunoblotanalyse. Zur Kontrolle der Beladung wurde der Reaktionsmischung das Protein GST zugemischt, das nach Auswertung der Adenylylierung mit α -GST-Antikörpern detektiert wurde. (Rechts) Vergleichende Darstellung der normierten Bandenintensitäten aufgetragen gegen die Zeitpunkte der Probenentnahme. Die Anpassung der Werte erfolgte mit einer einfach exponentiellen Gleichung und ergab nach Berechnung von k_{cat}/K_M einen Wert von $1,6 \cdot 10^1 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$ für aktives Cdc42-GppNHp (rot) und $5,9 \cdot 10^1 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$ für inaktives Cdc42-GDP (schwarz), folglich ein Unterschied um etwa den Faktor 4.

Die Tatsache, dass LpFic E66G zwischen aktiven und inaktiven Cdc42₁₋₁₈₈ diskriminiert, legt nahe, dass die Adenylylierung im Bereich der ungeordneten *Switch*-Regionen stattfindet. Diese Vermutung wurde durch eine LC-MS/MS-Analyse von proteolytisch verdautem Cdc42₁₋₁₈₈-AMP bestätigt. Entsprechende Experimente wurden von Verena Tinnefeld aus der Arbeitsgruppe von Dr. Rene Zahedi (ISAS, Dortmund) durchgeführt. In zwei voneinander unabhängigen Messungen wurde eine AMP-Modifikation an Tyrosin in Position 32 bestimmt, das im Bereich von Switch I des Proteins lokalisiert ist. Ein repräsentatives Fragmentationsspektrum ist im Anhang in Abbildung 56 dargestellt, das mehrere und klar zuordenbare ionische Spezies mit der entsprechenden AMP-Modifikation zeigt. Zur Bestätigung der Ergebnisse wurde eine Cdc42₁₋₁₇₉ Y32F Mutante generiert und mittels ESI-MS auf Adenylylierung durch LpFic im Vergleich zu Cdc42₁₋₁₇₉ T35A als Positivkontrolle geprüft. Wie in Abbildung 39 zu erkennen ist, stellt Cdc42₁₋₁₇₉ Y32F kein Substrat für LpFic dar und bestätigt damit die Ergebnisse der LC-MS/MS-Untersuchungen.

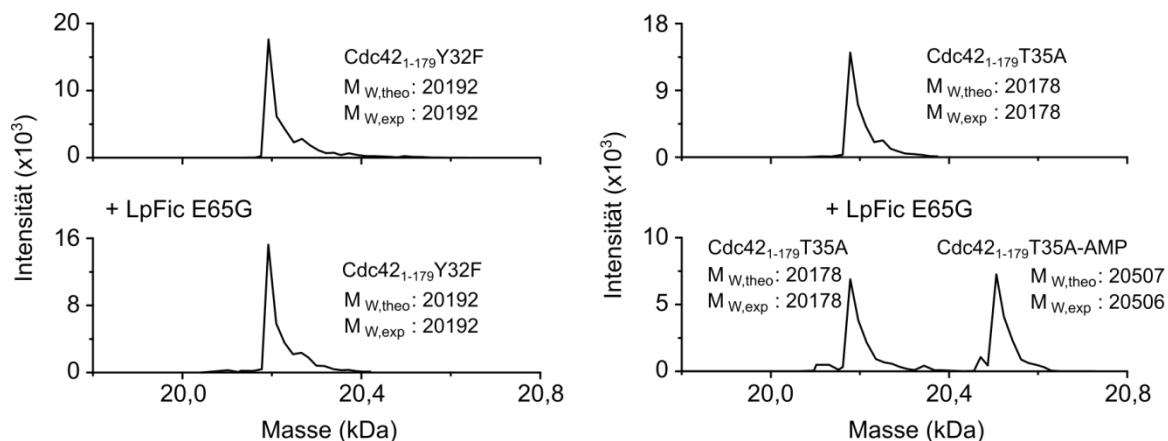


Abbildung 39: Massenspektrometrische Analyse zur Verifizierung der Cdc42 AMP-Modifikationsstelle.

Gezeigt sind ESI-MS Spektren von Cdc42₁₋₁₇₉ Y32F (A) und Cdc42₁₋₁₇₉ T35A (B) nach Inkubation mit LpFic E65G und ATP. Zur Kontrolle wurden entsprechende Cdc42 Mutanten ohne LpFic E65G in der Reaktionslösung inkubiert (Obere Spektren). Cdc42₁₋₁₇₉ T35A wird durch LpFic E65G adenyliert, hingegen ist eine AMP-Modifikation an Cdc42₁₋₁₇₉ Y32F nicht festzustellen. Theoretische und experimentell ermittelte Massen sind innerhalb der Spektren angegeben.

Die Effekte einer Adenylylierung an Tyrosin in Position 32 von Cdc42 sind in der Literatur im Rahmen der Untersuchungen zu IbpA gut beschrieben. Es führt zur Abschirmung von *Switch I* und verhindert infolgedessen die Bindung von zelleigenen Interaktionspartnern^{14;42}. Eine nähere Charakterisierung dieser AMP-Modifikation wurde aus Redundanz in der vorliegenden Arbeit nicht verfolgt.

IbpA war im Zeitraum dieser Arbeit Gegenstand verschiedener Projekte in den hier verwendeten Laboratorien. Eine Kontamination des LpFic Präparats mit IbpA durch Verwendung gleicher Anlagen zur Reinigung der Proteine ist daher nicht vollständig auszuschließen. Es bestehen jedoch zwei wesentliche Argumente, die gegen eine Fehlinterpretation der hier dargestellten

Ergebnisse sprechen. Durch quantitative Messungen wurde dargelegt, dass der GDP-gebundene Zustand das bevorzugte Substrat von LpFic ist. IbpA präferiert hingegen den GTP-gebundenen Zustand⁴⁵. Des Weiteren findet eine Adenylylierung der konstitutiv aktiven Mutante Cdc42 Q61L mit dem LpFic E66G Präparat nicht statt, welches jedoch für IbpA ein hervorragendes Substrat darstellt (siehe Anhang, Abbildung 55)⁴⁵. Dies impliziert einen signifikanten Unterschied im Bindungsmodus der Proteine, bei der das Glutamin an Position 61 eine Rolle spielt. Dennoch konnte eine Adenylylierung von Cdc42 durch LpFic E66G nur *in vitro* nachgewiesen werden. Ob die Interaktion mit Cdc42 eine physiologische Bedeutung hat oder es sich um ein Artefakt der *in vitro* Untersuchung handelt, bleibt somit ungeklärt.

4. Diskussion

4.1. Die Adenylyltransferase-Aktivität von CbFic1 und CbFic2

CbFic1 und CbFic2 sind zwei von insgesamt fünf Fic-Proteinen, die in *Coxiella burnetii* codiert sind⁷¹. In der vorliegenden Arbeit wurden diese Enzyme mit verschiedenen Methoden mit dem Ziel analysiert, physiologisch relevante Substrate zu identifizieren. Anfänglich wurden Untersuchungen mit CbFic1 durchgeführt und zur Identifizierung entsprechender Substrate des Proteins verschiedene experimentelle Ansätze verfolgt. Es wurde sowohl *in vitro* unter Verwendung von Radioisotopen sowie fluoreszenzmarkierten ATP-Analoga als auch *in vivo* nach transienter Expression von CbFic1 in Säugetierzellen nach diesen Zielproteinen gesucht. Letzteres beinhaltete die Detektion von adenylylierten Proteinen in einem Immunoblot mit spezifischen α -AMP-Antikörpern. Ein Substrat konnte jedoch nicht ermittelt werden. Faktoren, wie Konzentration und Zugänglichkeit eines mutmaßlichen Substrats sowie der fehlende Einfluss von Komponenten eines infektiösen Systems könnten wenige der sicherlich vielschichtigen Gründe hierfür sein. Zudem sollte prinzipiell bedacht werden, dass CbFic1 eine Funktion in der Regulation anderer Effektoren einnehmen könnte, die in dem hier verwendeten Modellsystem fehlten. Mukherjee *et al.* beschrieben für CbFic1 eine Phosphocholintransferase-Aktivität, die nach heterologer Expression des Proteins in HEK293T-Zellen beobachtet wurde¹⁶. Diese Ergebnisse konnten im Rahmen dieser Arbeit nicht bestätigt werden. Stattdessen wurde eindeutig belegt, dass CbFic1 Adenylyltransferaseaktivität in Form von Autoadenylylierung besitzt. CbFic1 gehört zu den Fic-Proteinen der Klasse II mit einem für NMP-Transferasen typischen Inhibitionsmotiv und einer kanonischen Fic-Motiv Sequenz. Nach bisherigen Erkenntnissen werden abweichende Funktionen, wie die Phosphocholinierung mitunter durch degenerierte Fic-Motive verursacht³⁹. In Anbetracht dieser Fakten ist anzunehmen, dass CbFic1 in der Zelle als Adenylyltransferase fungiert.

Die Ermittlung potentieller Substrate von CbFic2 fand mit einem strategisch ähnlichen Ansatz statt, erwies sich jedoch wesentlich erfolgreicher. CbFic2 wies eine spezifische Adenylylierungsaktivität gegenüber Histon H3 und einem unbekanntem Substrat mit einer Masse von etwa 40 kDa auf. Die Adenylylierung von Histon H3 konnte sowohl *in vivo*, speziell nach heterologer Expression von CbFic2 in Säugetierzellen, als auch *in vitro* mit gereinigten Proteinen nachgewiesen werden. CbFic2 wies eine exklusive Zellkernlokalisation und eine affine DNA-Bindung auf, die in der Gesamtheit belegen, dass Histon H3 ein physiologisch relevantes Substrat ist. Da Bakterien zellkernlose Organismen sind und Histone lediglich in Eukaryoten vorkommen, führt dies unvermeidlich zur Schlussfolgerung, dass CbFic2 als Effektor in einer *C. burnetii* Infektion fungiert. Gestützt wird dies durch α -(Ser/Thr u. Tyr)-AMP-Immunoblotexperimente, die mit Lysaten *Coxiellen*-infizierter HeLa-Zellen durchgeführt worden sind (siehe Abbildung 40)

(Hedberg u. Mohammadi; mündliche Kommunikation). In diesen Versuchen konnte eine deutliche Proteinadenylierung im Massenbereich von Histon H3 sowie auch des unbekanntes Substrates (~40 kDa) zu verschiedenen Zeitpunkten der *C. burnetii* Infektion festgestellt werden. Eine interessante Beobachtung war diesbezüglich das Auftreten von mehreren α -(Ser/Thr u. Tyr)-AMP-Detektionsbanden in einem Bereich von ca. 15 bis 70. Dies impliziert, dass neben CbFic2 weitere *C. burnetii*-Adenylyltransferasen in diesen Infektionsprozess von Wirtszellen eingebunden sind. Inwiefern CbFic1 an der Adenylylierung der dem Bandenmuster entsprechenden Proteine beteiligt ist, kann zum jetzigen Zeitpunkt nicht definiert werden. Tatsache ist, dass CbFic1 als Substrat des T4SS bestimmt wurde, was eine spezifische Funktion des Proteins im Infektionszyklus von *C. burnetii* suggeriert⁶⁹. Die Modalität der CbFic2-Sekretion ist bisher noch unbekannt und bildet einen Aspekt, der grundsätzlich erörtert werden muss.

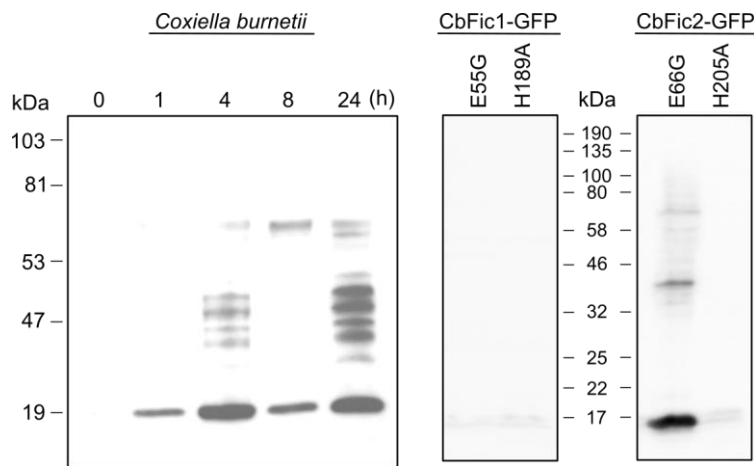


Abbildung 40: Vergleichende Darstellung der Proteinadenylierung durch *C. burnetii*-Effektoren.

(links) α -(Ser/Thr u. Tyr)-AMP-Immunoblot zur Erfassung der Proteinadenylierung während einer *C. burnetii*-Infektion. Dargestellt sind Zellproben zu verschiedenen Zeitpunkten des Infektionsverlaufs (0, 1, 4, 8 und 24 h, *post infectionem*). Die Untersuchungen wurden durch N. Mohammadi unter der Leitung von Prof. Dr. C. Hedberg in Umeå, Schweden durchgeführt. (rechts) α -(Ser/Thr u. Tyr)-Immunoblot zur Identifikation von CbFic1 bzw. CbFic2 Substraten in HEK293T-Zellen.

Bei der Identifikation von *C. burnetii* Effektoren stellte die genetische Manipulation des Bakteriums bis vor wenigen Jahren eine wesentliche Herausforderung dar¹¹³. Für Sekretionsstudien potentieller Effektoren wurde in der Vergangenheit daher auf das nahverwandte Bakterium *L. pneumophila* als Ersatzorganismus ausgewichen^{69;114}. Beide Organismen codieren neben anderen Sekretionssystemen für das T4SS, das in *L. pneumophila* aus mutmaßlich 26 Proteinen besteht und 23 gleiche bzw. homologe Vertreter in *C. burnetii* aufweist^{71;115}. Das T4SS wurde in *L. pneumophila* als Hauptsekretionssystem im Infektionszyklus ausgemacht, wodurch eine analoge Rolle in *C. burnetii* vermutet wurde^{114;116}. Verschiedene Studien widmeten sich Sekretionsanalysen von potentiellen *C. burnetii* Effektoren über das kompatible T4SS von *L. pneumophila*. Zunächst wurden über bioinformatische Analysen potentielle Kandidaten aus-

gewählt und anschließend in dem Surrogat experimentell untersucht^{69;114}. *Chen et al.* berücksichtigten in ihrer Studie drei Fic-Proteine, darunter die in der vorliegenden Arbeit untersuchten CbFic1 und CbFic2 sowie das auf einem separaten Plasmid gelegene CBU_0003⁶⁹. CbFic1 wies als einziges von den ausgewählten Fic-Proteinen eine Translokation ins Zytosol der Wirtszelle auf, wodurch es als Substrat des T4SS und Effektor des Bakteriums eingeordnet wurde⁶⁹. Interessanterweise werden T4SS-Effektorproteine von *Coxiella burnetii* erst ca. 8 h nach Internalisierung des Pathogens in die Wirtszelle sekretiert^{114;116}. *C. burnetii* ist auf die natürlichen Vorgänge der endosomalen Reifung zum Lysosom angewiesen und benötigt diese für ihre Proliferation⁶⁶. Aus diesem Grund wird vermutet, dass Effektoren zu Beginn der Infektion nicht präsent sind. In den ersten Stunden der Infektion sind jedoch wesentliche phänotypische Veränderungen der Wirtszelle zu beobachten⁶⁶. Ein prägnantes Beispiel ist die Reorganisation des (F)-Aktin-Zytoskeletts, das nur durch virulenzfähige *C. burnetii* Spezies hervorgerufen wird¹¹⁷. Die in dieser Arbeit getätigten Untersuchungen zu CbFic2 geben in Kombination mit den Immunoblotanalysen von Prof. Dr. C. Hedberg und N. Mohammadi einen neuen Einblick in die *C. burnetii*-Infektion. AMP-Modifizierungen unterschiedlicher Proteine treten in einer frühen Phase der Infektion auf. Die Histon H3-Adenylylierung ist bereits eine Stunde nach Aufnahme des Bakteriums durch die Wirtszelle feststellbar, woraus geschlossen werden kann, dass CbFic2 bereits zu Beginn des Infektionsprozesses sekretiert wird. Dies konvergiert mit den Untersuchungen von *Chen et al.*, die CbFic2 als Substrat des spät agierenden T4SS ausschlossen⁶⁹. *C. burnetii* codiert neben dem T4SS für eine T1SS und eine T2SS verwandte Pilus Biogenese Maschinerie¹¹⁷. Das T1SS und T2SS sind im Zusammenhang mit der *C. burnetii* Infektion bisher noch unerforscht. Es ist in Betracht zu ziehen, dass CbFic2 und weitere potentielle Effektoren durch diese Sekretionssysteme zu Beginn der Infektion in die Wirtszelle transloziert werden. Beispiele eines Einsatzes des T1SS und T2SS zu pathogenen Zwecken sind in der Literatur beschrieben. Sie sind auch in den Spezies *Pseudomonas aeruginosa* und *Vibrio vulnificus*, die jeweils Homologe von CbFic2 beherbergen, präsent (siehe Anhang, Abbildung 57)^{118;119}. Um eine kontroverse Diskussion diesbezüglich zu vermeiden, werden zukünftige Untersuchungen dies erörtern müssen.

4.2. Nukleäre Lokalisierung von CbFic2

Bakterielle Effektoren weisen häufig eine distinkte subzelluläre Lokalisation auf, die den Interaktionsraum festlegt⁶⁶. Dieses Paradigma bestätigte sich auch für CbFic2, das exklusiv im Zellkern lokalisiert ist und dort das Histon H3 adenylyliert. In diesem Zusammenhang muss hinterfragt werden, wie CbFic2 in den Zellkern gelangt. Kleine Moleküle und Proteine mit einer molekularen Masse von bis zu 40 kDa können die Kernporen über passive Diffusion durchqueren¹²⁰. Größere Proteine sind in der Regel auf aktive Transportmechanismen angewiesen¹²⁰. Das in dieser Arbeit in Säugetierzellen verwendete GFP-CbFic2-Fusionskonstrukt umfasst eine Masse von etwa 80 kDa und ist demzufolge klar dem Letzteren anzugliedern. Zwei Aspekte der ent-

sprechenden mikroskopischen Untersuchungen sind diesbezüglich hervorzuheben. Zum einen wies GFP-markiertes CbFic2 eine exklusive Lokalisation im Zellkern auf. Eine Präsenz im Zytosol der Zelle, charakteristisch für einen diffusionsabhängigen Vorgang, war nicht zu ermitteln. Zum anderen konnte mit verschiedenen Verkürzungskonstrukten belegt werden, dass die Zellkernlokalisation abhängig von der C-terminalen HTH-Domäne ist. Daraus kann geschlossen werden, dass CbFic2 über einen aktiven Transportmechanismus in den Zellkern gelangt. Dieser ist wiederum in der Regel von einer Kernlokalisierungssequenz (engl.: *nuclear localization sequence/signal*, NLS) abhängig^{120;121}. Eine solche Sequenz fungiert als Erkennungsmotiv für Importin- α , ein Kargoprotein, das an diese bindet und anschließend im Komplex mit Importin- β den Transportvorgang über die Kernporen bewerkstelligt^{122;123}. Die NLS besteht vorwiegend aus basischen Aminosäuren, insbesondere Lysin und Arginin, und kann in die Kategorien klassisch und atypisch aufgeteilt werden¹²¹. Klassische NLS sind leicht anhand einer Konsensussequenz (Monopartit: K-K/R-X-K/R; Bipartit: K/R-K/R-[X₁₀₋₁₂]-K/R_{3/5}) zu identifizieren¹²⁴. Atypische NLS definieren hingegen die Sequenzen, die nicht in dieses Raster fallen¹²⁰. Sie sind somit nicht vorhersagbar. *In silico* Untersuchungen der CbFic2-Sequenz legen keine klassische NLS dar. Jedoch weist die C-terminale HTH-Domäne von CbFic2 mit einem Anteil von 18% Lysin und 9% Arginin eine stark basische Zusammensetzung auf (pI: 10,5). Ein derartig hoher Anteil an basischen Aminosäuren ist für DNA-Bindedomänen nicht ungewöhnlich, schließlich finden zahlreiche Wechselwirkungen mit dem negativen Phosphatrückgrat der DNA statt. Es stellt aber Kriterien einer atypischen NLS, dessen mögliche Präsenz mit entsprechenden Verkürzungskonstrukten auf einen Bereich von 62 Aminosäuren in dieser Arbeit eingegrenzt wurde. Dieses Ergebnis konvergiert mit den *in silico* Untersuchungen von Cokol *et al.*, die eine Koevolution von DNA-Bindungsdomänen und NLS beschrieben¹²⁵. Ob CbFic2 über eine Kernlokalisierungssequenz verfügt und damit einen kanonischen Weg über Interaktion mit Importinen erfährt, muss zukünftig noch ermittelt werden. Es sollte grundsätzlich auch ein indirekter Transport z.B. über die Bindung an ein NLS-enhaltenes Protein in Betracht gezogen werden, wie es für das Hepatitis Delta Antigen vermutet wird¹²⁶. Die Proteine CBU1314, CBU1976, CaeA und AnkG sind *Coxiella burnetii* Effektoren, für die eine Zellkernlokalisation nachgewiesen wurde^{69;114;127;128}. CBU1314 und CaeA bestehen zum größten Teil aus einem *coiled-coil*-Bereich und enthalten gleich mehrere vorhersagbare NLS^{127;129}. Für CBU1314 wurde gezeigt, dass zwei NLS von insgesamt sechs potentiellen NLS für die effiziente Lokalisierung in den Zellkern verantwortlich sind¹²⁹. Die Effektoren AnkG und CBU1976 weisen hingegen analog zu CbFic2 keine vorhersagbare NLS auf¹²⁸. AnkG wurde jedoch beschrieben, über einen kurzen Serin/Threonin-reichen Sequenzabschnitt am N-Terminus mit Importin- α zu interagieren¹²⁸. Die Diversität der zellkernlokalisierten *C. burnetii*-Effektoren illustriert prägnant, dass Importine an eine Vielzahl verschiedener NLS binden und nur die abundante klassische NLS bisher klar kategorisiert ist^{130;131}. Angesichts dessen wäre es für zukünftige Untersuchungen von CbFic2 si-

cherlich interessant, den Vorgang der spezifischen Lokalisierung in den Zellkern zu erörtern. Dies könnte eine neue, atypische NLS zum Vorschein bringen oder möglicherweise einen davon unabhängigen Mechanismus.

4.3. DNA-Bindung und ihre Bedeutung für die Aktivität von CbFic2

Die rekombinante Expression und anschließende Reinigung von *CbFic2* aus *E. coli*-Zellen offenbarte eine affine DNA-Bindung des Proteins an diverse Nukleinsäuren, indiziert durch eine Anreicherung entsprechender Molekülspezies. Durch eine vergleichende Analyse konnte gezeigt werden, dass die HTH-Domäne diese Interaktion bewerkstelligt. HTH-Domänen sind ubiquitär vorkommende Strukturelemente und ihre Funktion zur DNA-Bindung wurde reichlich beschrieben¹³². Besonders abundant ist diese Domäne in Transkriptionsfaktoren, mit der spezifische DNA-Sequenzen adressiert werden¹³². Die HTH-Domäne in CbFic2 wies eine affine Bindung von randomisierten Sequenzen auf. Ob oder inwiefern eine bestimmte DNA-Sequenz präferiert wird, ist bisher unklar. Es ist sowohl eine uniforme Bindung aller DNA-Sequenzen über das Oligonukleotidrückgrat als auch eine Spezifische über zusätzliche Wechselwirkungen mit den Nukleobasen möglich. In quantitativen Messungen wurde gezeigt, dass CbFic2 mit nanomolarer Affinität an ein 20 Bp dsDNA-Fragment bindet. Es ist anzunehmen, dass eine affine DNA-Bindung von CbFic2 ein entscheidender Faktor in der Adenylylierung von Histon H3 unter nativen Bedingungen ist. N-termini von Histonen stellen vermutlich aufgrund frequentiert wechselnder PTMs an zahlreichen Stellen und der damit inkonstanten Bindungsoberfläche schlechte Bindungspartner dar. Eine affine Interaktion mit der chromosomalen DNA bewerkstelligt zum einen räumliche Nähe zu den Histonen und zum anderen die thermodynamischen Voraussetzungen für eine effiziente enzymatische Umsetzung.

Interessanterweise konnte in Untersuchungen der DNA-HTH-Bindung von CbFic2 ein direkter Einfluss dieser Interaktion auf die Adenylylierungsaktivität des Proteins festgestellt werden. Ein oligonukleotidgebundener Zustand von CbFic2 E66G wies eine um den Faktor 10 erhöhte katalytische Effizienz gegenüber dem ungebundenen Zustand auf. Dies impliziert einen grundlegenden Einfluss der DNA-Bindung auf die enzymatische Aktivität des Proteins. Da die Funktion eines Proteins in der Regel auf seiner molekularen Struktur basiert, ist anzunehmen, dass die Interaktion mit Nukleinsäuren zu konformationellen Änderungen in CbFic2 führt. Für eine strukturbasierte Interpretation dieser Beobachtung wird im Folgenden die Röntgenkristallstruktur von SoFic betrachtet, das hohe Sequenzähnlichkeit und eine analoge Domänenarchitektur zu CbFic2 aufweist^{31; 48}.

Eine Ansicht der Struktur von SoFic ist in Abbildung 41 dargestellt. Das Protein besitzt eine typische Fic-Domänenfaltung mit einem N-terminalen Zusatz, der die α_{inh} -Helix stellt, und einen C-terminalen Bereich, der eine HTH-Domäne umfasst. Die HTH-Domäne ist über eine Helix mit der Fic-Domäne verbunden und dicht an der regulatorischen Helix positioniert. Diese wiederum

tangiert die Fic-Domäne und befindet sich im inaktiven, geschlossenen Zustand. Eine Öffnung des aktiven Zentrums, d. h. ein Zurückweichen der α_{inh} -Helix würde demnach zu einem sterischen Konflikt führen. Somit sind Umstrukturierungen nötig, um den für die Aktivierung nötigen Raum bereitzustellen. Ein derartiger Vorgang könnte durch die HTH-DNA-Bindung erfolgen. In Bezug auf CbFic2 ist anzunehmen, dass dieser Prozess auch Bereiche beeinflusst die in der Substraterkennung involviert sind, da trotz der Verwendung einer Glutamat-Mutante im Inhibitionsmotiv, die Adenylierungsaktivität erst durch Einfluss der DNA-Bindung stimuliert wurde.

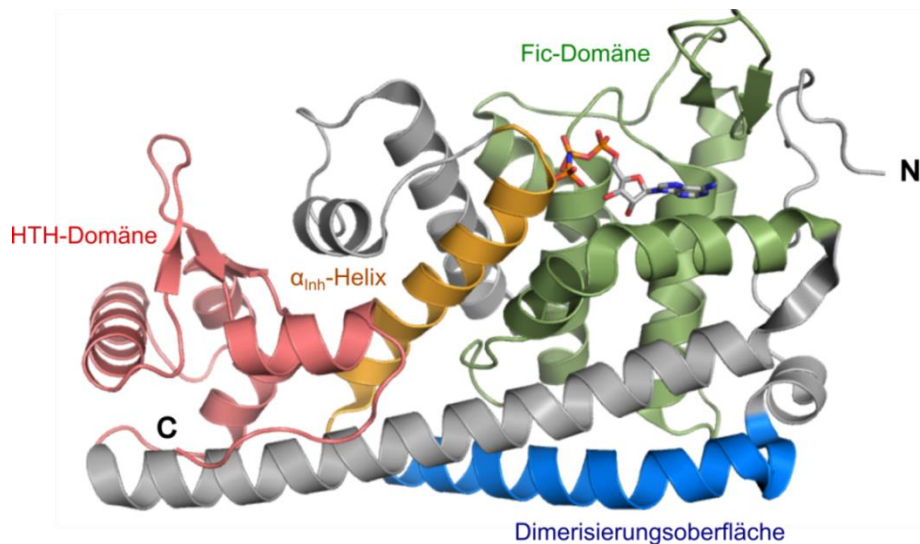


Abbildung 41: Röntgenkristallstruktur von SoFic aus *Shewanella oneidensis*. Dargestellt ist die kompakte Struktur von SoFic (PDB: 3ZEC)⁴³, das eine analoge Domänenarchitektur zu CbFic2 aufweist. Die räumliche Nähe der HTH-Domäne sowie der Dimerisierungsoberfläche zur α_{inh} -Helix impliziert einen möglichen konformationellen Einfluss einer DNA-Bindung bzw. Dimerisierung auf diese. Kolorierung: Dimerisierungsoberfläche (blau), α_{inh} -Helix (orange), Fic-Domäne (grün), HTH-Domäne (rosa), AppNHp (Stabmodell, grau).

Eine zusätzliche Funktion in der Aktivierung von CbFic2 könnte die Dimerisierung des Proteins einnehmen. In SoFic erstreckt sich die Dimerisierungsoberfläche über einen etwa 20 AS langen Bereich, einen der α_{inh} -Helix vorgeschalteten Abschnitt, der Wechselwirkungen mit dem Verbindungselement zwischen Fic- und HTH-Domäne eingeht⁴⁸. Es ist naheliegend, dass die Protein-Dimerisierung die α_{inh} -Helix beeinflusst und der Mechanismus der Enzymaktivierung aus einer Kombination der DNA-Bindung und Dimerbildung besteht. Einen Anhaltspunkt dazu bieten die vorgestellten DNA-CbFic2-Bindungsexperimente mittels AUZ. CbFic2 bildete bei diesen Untersuchungen höher geordnete DNA-Protein-Komplexe, die auf eine Oligomerisierung des Proteins schließen lassen. Eine Bedeutung des Oligomerisierungszustands für die Adenylierungsaktivität wurde anhand des humanen Fic-Proteins HypE gezeigt, dass in monomerer Form drastisch verringerte Aktivität in der Automodifizierung aufwies²⁷. Bekannte Fälle einer DNA-bindungsinduzierten Dimerisierung und daraus folgender Aktivierung stellen die Helikasen Rep aus *E. coli* und Pif1 aus *Saccharomyces cerevisiae* dar^{133;134}. Ein derartiger, spezieller Mechanismus ist demnach für CbFic2 in Betracht zu ziehen.

4.4. Mögliche patho-epigenetische Rolle der Histon H3-Adenylylierung

Die N-Termini von Histonen sind über PTMs hochregulierte Bereiche mit Einfluss auf die lokale Chromatinstruktur, die Genexpression sowie weiterer grundlegender zellulärer Prozesse, wie DNA-Replikation und Zellteilung^{98;135}. Sie umfassen zahlreiche Modifikationsstellen mit einer einzigartigen Bandbreite an transient vorkommenden PTMs (u. a. Methylierung (Me), Acetylierung (Ac), Phosphorylierung (p), ADP-Ribosylierung, SUMOylierung). Es bestehen diverse Kombinationen, in denen diese PTMs auftreten und einen sogenannten epigenetischen Code bilden¹³⁶. Aufgrund der Komplexität dieser Kombinationen sowie einer heterogenen Verteilung dieser im gesamten Chromatin ist die Funktion bestimmter PTMs nur sehr schwer zu erfassen. Histon H3 beherbergt am etwa 35 AS langen N-terminalen Arm über 15 Modifikationsstellen, an denen jedoch nur für wenige Modifikationen genaue Funktionen zugewiesen werden konnten¹³⁷. Ein wesentliches Problem ist, dass für eine bestimmte PTM-Art eine generelle Rolle nicht definiert werden kann⁹⁸. So wird z. B. die Methylierung an L4 von Histon H3 mit der Stimulierung der Genexpression hingegen die Methylierung von L9 mit einer Genrepression distinkter Genabschnitte in Verbindung gebracht¹³⁸. CbFic2 adenylyliert Histon H3 an den Positionen S10 und S28. Eine Modifikation, die im Feld der Epigenetik neu ist und gesondert betrachtet werden muss, da es sich dabei um einen pathogenen Eingriff in die komplexe Physiologie der Zelle handelt. Die Adenylylierung ist eine sehr interessante posttranslationale Modifikation mit vielseitiger Funktionalität. Zum einen wird durch die Phosphatgruppe eine negative Ladung, die lokal die Polarität stark beeinflusst, zum anderen mit der Nukleobase ein hydrophobes aromatisches π -Elektronensystem eingeführt. Strukturell gesehen ist es ein Molekül mit relativ hohem sterischen Anspruch, das Bindungsoberflächen effektiv abschirmen und somit beispielsweise Protein-Protein-Interaktionen sterisch verhindern kann. Eine PTM von Histonen, die gleiche molekulare Gruppen aufweist, ist die Mono- sowie Poly-ADP-Ribosylierung¹³⁹. Diese Modifikation wurde an verschiedenen Kernhistonen festgestellt und wird im Zusammenhang mit DNA-Reparatur Prozessen, Apoptose und Genregulation gebracht¹³⁹. Einige Untersuchungen indizieren, dass bestimmte ADP-Ribosylierungen als Anker für Transkriptionsfaktoren dienen; eine Funktion, die durch die AMP-Modifikation möglicherweise nachgeahmt wird^{140;141}. Messner *et al.* identifizierten durch *in vitro* Experimente mit dem Enzym PARP1 unter anderem die Position K27 als ADP-Ribosyl-Modifikationsstelle in Histon H3¹⁴². Die Adenylylierung an S28 könnte physiologisch daran angelehnt sein.

Eine konkretere Verbindung findet sich jedoch zur H3-Phosphorylierung. Die Positionen S10 und S28 sind häufige Phosphorylierungsstellen und Bestandteil des ARKS-Sequenzmotivs, das sich innerhalb des N-terminalen Fortsatzes einmal wiederholt¹³⁷. Dies suggeriert, dass die CbFic2 vermittelte Adenylylierung mit Prozessen ausgehend von Phosphorylierungen an diesen Positionen aber möglicherweise auch anderen PTMs im Bereich des Motivs interferiert. Verschiedene Studien belegen, dass die Phosphorylierung an S10 und S28 eine bedeutende Rolle

in der Zellteilung und in der lokalen Stimulierung der Genexpression während der Interphase einnimmt¹³⁷. Um die AMP-Modifikation im Kontext dieser Vorgänge zu setzen, müssen diese Abschnitte im Zellzyklus differenziert betrachtet werden. Während der Mitose tritt die Phosphorylierung an S10 und S28 von der Pro- bis Anaphase global auf und stellt einen sicheren Marker für diesen Prozess dar¹⁴³. Phosphoryliert werden beide Stellen durch die Aurora B Kinase. Durch Inhibition der Aurora B Kinase in humanen Zellen sowie Verwendung von S10A Mutanten in *Schizosaccharomyces pombe* und *Tetrahymena thermophila* arretierten entsprechende Zellen in der G2 Phase^{144;145}. Es wird daher angenommen, dass die Histon H3-Phosphorylierung für die Zellteilung essentiell ist, wobei die genaue Funktion noch unbekannt ist und kontrovers diskutiert wird¹³⁷. In dieser Arbeit wurde vermutet, dass CbFic2 durch Blockierung der S10/S28-Phosphorylierungsstellen mit AMP als Proliferationshemmer fungieren könnte. Für den intrazellulären Parasit *C. burnetii* könnte es zu bestimmten Zeitpunkten der Infektion von essentieller Bedeutung sein, die Zellteilung zu inhibieren, um die dafür benötigten Ressourcen für eigene Zwecke zu verwenden. Mehrere Versuche mit Säugetierzelllinien (HEK293T, Cos1) zeigten jedoch, dass die Präsenz von CbFic2 (WT und konstitutiv aktiv; GFP markiert) keine signifikanten Proliferationsdefekte hervorruft. Ob die Adenylylierung global oder nur an bestimmten Chromatin Abschnitten stattfindet, kann bisher nur spekuliert werden. Die Tatsache, dass in den zellulären Untersuchungen mit CbFic2 kein Einfluss auf die Proliferation nachgewiesen werden konnte, spricht für einen lokalen Einsatz. Hingegen suggerieren entsprechende Immunoblotanalysen dieser Zellen für einen enzymatischen Umsatz des nahezu gesamten Histon H3-Pools, indiziert durch die Verschiebung der entsprechenden Bande im Immunoblot (siehe auch Ponceau-Färbung und SDS-PAGE, Abschnitt 3.3.1.2.). Es ist zu bedenken, dass die hier durchgeführten zellulären Untersuchungen in Modellorganismen durchgeführt wurden. Die Histon H3-Adenylylierung bzw. ihre Effekte könnten sich in professionellen Phagozyten (Monozyten), den natürlichen Wirtszellen von *C. burnetii*, divergent äußern. Des Weiteren findet eine Diadenylylierung, wie sie durch Verwendung von synthetischen H3 Peptiden *in vitro* nachgewiesen wurde, möglicherweise *in vivo* nicht statt. Ein Anhaltspunkt könnte die verminderte Aktivität von CbFic2 gegenüber dem S28 enthaltenen Histon H3₂₁₋₃₅ Peptid sein. In diesem Fall ist in Betracht zu ziehen, dass die AMP-besetzte S10-Phosphorylierungsstelle durch das freie S28 kompensiert wird. Ferner ist nicht auszuschließen, dass in der Zelle spezifische Deadenylylasen existieren, die eine selektive Entfernung der H3-AMP Modifikationen während oder vor der Mitose bewerkstelligen. Die genauen Umstände lassen sich an dieser Stelle nicht klären. Die Versuche lassen jedoch annehmen, dass CbFic2 keine proliferationshemmende Funktion einnimmt.

Ein wesentlicher Aspekt der dieser These entgegenkommt, ist die Fähigkeit von Coxiellen-infizierten Makrophagen sich während des Infektionszyklusses weiterhin zu teilen¹⁴⁶. *C. burnetii* ist ein Pathogen, das sich in einer Wirtszelle tarnt (engl.: *stealth pathogen*) und nach abge-

schlossenen Infektionszyklus häufig über mehrere Tage in einer stationären Phase in der Wirtszelle verbleibt⁶⁵. Roman *et al.* kultivierten unter Laborbedingungen infizierte Makrophagen sogar über einen Zeitraum von über 2 Jahren¹⁴⁶. Dies verdeutlicht, dass das Aufrechterhalten der Vitalität der Wirtszelle für das Bakterium von entscheidendem Interesse ist. Neben verschiedenen Effektoren, für die eine antiapoptotische Wirkung gezeigt wurde, werden auch einige *C. burnetii*-Proteine mit proliferationsfördernden Maßnahmen in Verbindung gebracht⁶⁶. Es ist naheliegend, dass die CbFic2-vermittelte Histon H3-Adenylylierung durch epigenetische Kontrolle an derartigen Prozessen beteiligt ist. Mahapatra *et al.* legten durch *Microarray*-Analysen dar, dass das Transkriptom 48 Stunden nach der Infektion mit mRNA proliferationsfördernder Gene angereichert ist¹⁴⁷.

Generell sollte in Betracht gezogen werden, dass die Adenylylierung von Histon H3 einen synergetischen oder kompensierenden Effekt zur Phosphorylierung während der Mitose hat. Welche konkrete molekulare Funktion die Phosphorylierungen an S10 und S28 von Histon H3 einnehmen, ist nämlich bisher noch unklar¹⁴⁷. Fischle *et al.* zeigten, dass p-S10 die Bindung des repressiven HP1 (*Heterochromatin Protein 1*) an trimethyliertes L9 in den Phasen der Zellteilung verhindert. Eine ähnliche Funktion ist auch dem sterisch anspruchsvollen AMP an S10 zuzuschreiben¹⁴⁸.

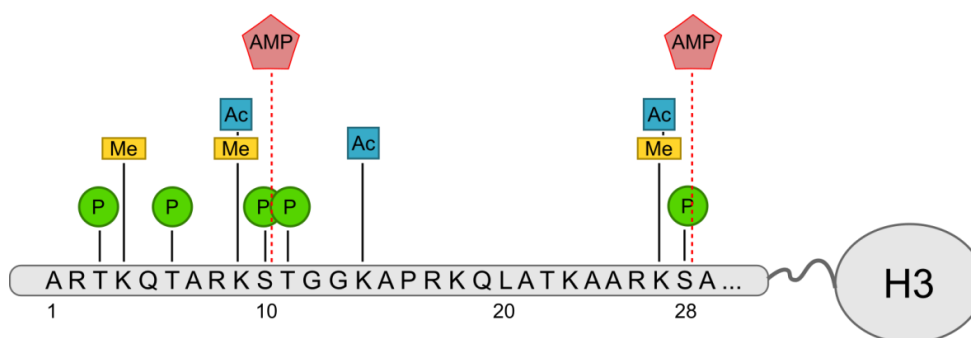


Abbildung 42: Prominente PTMs am N-terminalen Arm von Histon H3. Kolorierung: Phosphorylierung (grün), Methylierung (gelb), Acetylierung (blau), Adenylylierung (rot), Histon H3₁₋₂₉ (grau).

In der Interphase wird die S10/S28-Phosphorylierung mit der Stimulierung lokaler Genexpression in Verbindung gebracht. Ein gut beschriebenes Beispiel ist die Transkriptionsaktivierung von IER-Genen (*Immediate early response*). In diesem Zusammenhang bindet 14-3-3- ζ an p-S10, das, wie vermutet wird, als Adapterprotein für Transkriptionsfaktoren fungiert¹⁴⁹⁻¹⁵¹. Eine AMP-Modifikation an S10 würde vermutlich eine inhibierende Wirkung auf entsprechende Vorgänge haben. Dem entgegengesetzt könnte AMP-S10 als Bindestelle für eigene Transkriptionsfaktoren dienen. Mittels einer SILAC-basierten Proteomuntersuchung wurde in dieser Arbeit versucht mögliche CbFic2 vermittelte Veränderung in der Genregulation zu erfassen. Von insgesamt 1111 Proteinen, die statistisch relevant ausgewertet werden konnten, waren jedoch keine signifikanten Regulationen zu ermitteln. Es ist jedoch zu bedenken, dass in einer LC-MS/MS-

Analyse des Proteoms vordergründig abundante Proteine detektiert werden und damit ein Großteil des Proteoms der Analyse fernblieb. Außerdem können in dem hier verwendeten Modellsystem transfizierter Säugetierzellen eine nötige Stimulierung in der Genexpression, die durch Faktoren in einer natürlichen *C. burnetii*-Infektion ausgelöst werden, gefehlt haben. Besonders Gene, die zur Immunantwort exprimiert werden, sind in dem verwendeten System nicht stimuliert gewesen. Das dies hier aber entscheidend gewesen sein könnte verdeutlichen Untersuchungen zu dem Effektor RomA aus *L. pneumophila*. RomA wurde beschrieben K14 an Histon H3 zu trimethylieren und dies an Promotorregionen, die unter anderen dem immunomodulatorischen TNF α , den Interleukinen IL1 β , IL6, and IL8 und verschiedenen Interferon-induzierbaren Genen vorgeschaltet sind¹⁵². Interessant ist, dass trimethyliertes K14 an Histon H3 im gesunden System von Säugetierzellen nicht vorkommt und dass diese Modifikation eine entsprechende Acetylierung verhindert¹⁵². Die Acetylierung ist wiederum Teil einer PTM-Kombination aus phosphorylierten S10 und methylierten K9¹⁵³. Diese tritt frequentiert auf wird für die Genregulierung als sehr bedeutend eingestuft. Es ist naheliegend, dass die AMP-Modifikation eine zur Trimethylierung an K14 ähnliche Funktion einnimmt, nämlich das spezifische PTM-Muster aus Me-K9, p-S10 und Ac-K14 zu degenerieren.

Die posttranslationale Modifikation von Histonen scheint eine raffinierte Strategie von verschiedenen Pathogenen zu sein, die es erlaubt mit lediglich einem Effektor eine Vielzahl von Zielproteinen zu erreichen. Hierbei hat die Inhibition der Histon H3-Phosphorylierung scheinbar eine besondere Stellung, wie an einigen Studien verdeutlicht wird. So fungiert der *Shigella flexneri* Effektor OspF als eine spezifische Phosphatase für die MAP-Kinasen (*mitogen-activated protein kinases*) ERK1 und p38, was eine drastisch reduzierte Histon H3 S10-Phosphorylierung zur Folge hat¹⁵⁴. Ein ähnlicher Effekt wurde über einen bisher unbekannt Mechanismus für CDC (*cholesterol-dependent cytolysins*)-Toxine beschrieben, die in zahlreichen Pathogenen (u. a. *Listeria monocytogenes* und *Streptococcus pneumoniae*) vorkommen^{155;156}. Es erscheint plausibel, dass mit der CbFic2 vermittelten Histon H3-Adenylylierung die gleichen Ziele verfolgt werden.

Bemerkenswert ist, dass die Histon H3-Adenylylierung bereits eine Stunde nach Beginn der Infektion nachzuweisen ist und über 24 Stunden anhält. Ob diese zu späteren Zeitintervallen fortlaufend bestehen bleibt, ist noch unbekannt. Diese Informationen würden Aufschluss darüber geben, ob sich die Histon H3-AMP-Modifikation als fester Bestandteil in der Wirt-Pathogen-Beziehung manifestiert. In diesem Zusammenhang muss grundsätzlich hinterfragt werden, ob eine konsistente Histon H3-AMP-Modifikation angesichts der Dynamik der epigenetischen Prozessierung in einer vitalen Zelle toleriert werden kann. Es ist durchaus möglich, dass CbFic2 eine antagonistische Deadenylylase gestellt wird, die der Adenylylierung temporär entgegenwirkt. Entsprechende Fallbeispiele werden im Kontext der Manipulation von Rab1 durch *Legionella pneumophila* mit den Gegenspielern DrrA und SidM sowie AnkX und Lem3

gestellt^{157;158}. Das humane Fic-Protein HypE wurde jüngst beschrieben Adenylyltransferase- und interessanterweise auch Deadenylylaseaktivität gegenüber dem Chaperon BiP zu besitzen. Preissler *et al.* zeigten, dass zwischen den gegensätzlichen Funktionen lediglich über die Position der α_{inh} -Helix gewechselt wird (*pre print*). Diese Entdeckung ist höchst interessant und wirft ein neues Licht auf die Regulation von Fic-Proteinen. Es muss in Betracht gezogen werden, dass ein derartiger Mechanismus auch in bakteriellen Vertretern mitunter CbFic2 ausgebildet ist.

4.5. Subzelluläre Lokalisation und Adenylyltransferase-Aktivität von LpFic

Das *Legionella longbeachae* Fic-Protein LpFic bildete in dieser Arbeit aufgrund der hohen Sequenzhomologie und der nahen Verwandtschaft der Gattung *Legionella* und *Coxiella* ein interessantes Vergleichsobjekt zu CbFic2. Charakteristisch für beide Proteine ist die HTH-Domäne am C-Terminus. Interessanterweise weist das Protein LpFic eine auf zwei subzelluläre Orte verteilte Lokalisation auf; im Zellkern und am Mikrotubuli-Netzwerk. Entgegen der CbFic2-Lokalisation ist der Transport von LpFic in den Zellkern nicht durch die HTH-Domäne bedingt. Sowohl ein Konstrukt, das ausschließlich die Fic-Domäne mit dem N-terminalen Bereich umfasst, als auch die HTH-Domäne alleine zeigten eine diffuse Verteilung im Zytosol der untersuchten Zellen, was gegen eine Präsenz einer NLS in diesen Strukturbereichen spricht. Da in den entsprechenden Fluoreszenzaufnahmen von GFP-LpFic ebenfalls keine filamentösen Strukturen zu erkennen waren, lässt dies vermuten, dass die Zellkernlokalisation in Verbindung mit der Mikrotubuli-Assoziation steht. Tubulin-Proteine, speziell die β -Isoform, wurden beschrieben in einem vermutlich Importin-unabhängigen Mechanismus zwischen Zytosol und Zellkern zu pendeln¹⁵⁹.

Der Präsenz von LpFic im Zellkern könnte durch eine entsprechende Interaktion mit diesen Zellskelett-Proteinen hervorgerufen werden. Inwiefern LpFic jedoch an Mikrotubuli-Filamente assoziiert, ist unklar. Es ist sowohl eine direkte Interaktion mit den Grundeinheiten α - bzw. β -Tubulin als auch eine indirekte Bindung an entsprechende Filamente über weitere Faktoren denkbar. Die mikroskopischen Untersuchungen in dieser Arbeit lassen diesbezüglich auf eine komplexe Wechselwirkung, die die HTH-Domäne und Bereiche in der Fic-Domäne oder dem N-terminalen Abschnitt umfasst, schließen. HTH-Domänen prägen in einigen Fällen Protein-Protein Interaktionen aus. Beschrieben ist das z. B. an Cullinen, die als Adapter für Anaphase-stimulierende Ubiquitinligasen dienen, und Esa1-ähnliche Histon-Acetylasen^{160;161}. Es ist demnach in Betracht zu ziehen, dass die HTH-Domäne von LpFic als struktureller Bereich für Protein-Protein-Interaktionen mit Komponenten des Mikrotubuli-Netzwerks fungiert. Gestützt wird diese These durch die Beobachtung, dass nach rekombinanter Expression des Proteins in *E. coli*-Zellen im Gegenteil zu der von CbFic2 keine Nukleinsäuren ko-isoliert werden. Um die Funktion der HTH-Domäne aufzuklären, werden zukünftig differenziertere Untersuchungen er-

forderlich sein. Nichtsdestotrotz sind die Ergebnisse ein starkes Indiz, dass LpFic eine definierte Rolle in Säugetierzellen einnimmt und damit analog zu CbFic2 einen bisher noch unbekanntem Effektor darstellt. Wie bereits mehrfach in dieser Arbeit erwähnt, steht die subzelluläre Lokalisation eines Effektors in der Regel eng mit seiner patho-physiologischen Funktion in Verbindung. Da LpFic sowohl eine Lokalisation im Zellkern als auch am zytosolischen Mikrotubuli-Zytoskelett aufweist, sind Zielproteine einer Adenylylierung möglicherweise in bzw. an beiden subzellulären Orten gegenwärtig. Histone stellen trotz der Sequenzhomologie zu CbFic2 keine Substrate für das Legionellen-Enzym dar. Jedoch wurde *in vitro* Adenylyltransferaseaktivität gegenüber Cdc42 festgestellt, ein bedeutender Regulator der Zytoskelett-Organisation¹¹¹. Cdc42 wird mit einer Vielzahl spezieller Funktionen in Verbindung gebracht, wie die in diesem Zusammenhang interessante Funktion der Koordinierung des aus Mikrotubuli bestehenden Spindelapparates an Kinetochore während der Mitose¹⁶². LpFic adenylyliert Cdc42 an Y32 und präferiert den inaktiven, GDP gebundenen Zustand der RhoGTPase. Die AMP-Modifikation an Y32 von Cdc42 ist bereits ausführlich im Kontext der Adenylylierung durch IbpA untersucht. Worby *et al.* zeigten, dass diese Modifikation die Interaktion mit sogenannten *downstream*-Proteinen verhindert und damit essentielle Signalwege unterbricht¹⁴. Demnach wären durch die LpFic vermittelte Adenylylierung wesentliche Defekte in bestimmten zellulären Prozessen zu erwarten. Ein ersichtlicher Effekt auf die Proliferation bzw. Vitalität von verschiedenen Zelllinien war nach transienter Expression von LpFic in diesen nicht vorhanden. Inwiefern diese Interaktion somit eine physiologische Bedeutung hat ist bisher unklar. Es ist aber zu bedenken, dass die in dieser Arbeit präsentierte Fluoreszenzbilder Momentaufnahmen sind, die die dynamischen Abläufe nicht erfassen. Cdc42 ist unter anderem an der Regulation der Mikrotubuli-abhängigen Zellmotilität beteiligt¹⁶³. Ein entsprechender Einfluss auf diesen Vorgang könnte demnach durchaus vorgelegen haben.

Im Infektionszyklus von Legionellen nimmt das Zytoskelett eine wichtige Funktion ein. Der Effektor LegG1 aus *L. pneumophila* stabilisiert über eine Interaktion mit der GTPase Ran Mikrotubuli und fördert unter anderem den Transport der LCV entlang entsprechender Filamente in der Zelle, die wie vermutet wird, die Nähe zu den vom ER-stammenden Vesikeln herstellen soll¹⁶⁴. AnkX und AnkN wurden beschrieben, über ihre spezifischen Funktionen den Transport von Endosomen über das Mikrotubulinetzwerk zu beeinträchtigen und damit einer Fusion mit der LCV entgegenzuwirken¹⁷. Interessanterweise sind diese Effektoren im Genom von *L. longbeachae* nicht codiert⁸⁴. Es ist denkbar, dass LpFic eine ähnliche Bedeutung in der Manipulation von Prozessen, die in Verbindung mit dem Mikrotubuli-Netzwerk stehen, einnimmt.

5. Ausblick

Innerhalb dieser Arbeit wurden ausgewählte Fic-Proteine der Klasse II, die eine charakteristische HTH-Domäne enthalten, untersucht. Das Protein CbFic2 aus dem Pathogen *C. burnetii* konnte im Laufe der Untersuchungen als spezifische Adenylyltransferase, die das Kernprotein Histon H3 modifiziert, beschrieben werden. Trotz der Betrachtung verschiedener Aspekte der Interaktion sowohl *in vitro* als auch *in vivo*, stehen viele Fragen noch offen. Es ist insbesondere unklar, welche patho-physiologische Funktion CbFic2 durch die Histon H3-Adenylylierung einnimmt. Um diese zu erörtern, werden Experimente mit infektiösen Systemen unausweichlich sein. Bedeutende Hinweise könnte der Einsatz einer Δ CbFic2-*C. burnetii*-Mutante geben, deren potentiell veränderten virulenten Fähigkeiten unmittelbar auf das entsprechende Fic-Protein zurückzuführen wären. Bei diesen Studien sollten speziell physiologische Prozesse, die mit einer epigenetischen Immunantwort in Verbindung stehen, inspiziert werden. Ein aussichtsreicher Ansatz ist die Untersuchung des Transkriptoms einer Wirtszelle nach Infektion mit einer entsprechenden Δ CbFic2-*C. burnetii*-Mutante. Mahapatra *et al.* bewerkstelligten dies über eine *Microarray*-Analyse, die eine Hochregulierung einer Vielzahl verschiedener, unter anderem proliferationsfördernder Gene ermitteln lies¹⁴⁷. Des Weiteren könnte die Bestimmung einer distinkten DNA-Erkennungssequenz der CbFic2-HTH-Domäne wichtige Hinweise auf einen möglichen Einfluss des Proteins auf die Expression bestimmter genomischer Abschnitte geben.

Unabhängig von einer potentiellen Bedeutung der Histon H3-Adenylylierung im Infektionszyklus von *C. burnetii* könnte diese posttranslationale Modifikation ein wertvolles molekularbiologisches Werkzeug im Forschungsfeld der Epigenetik werden. CbFic2 adenylyliert Histon H3 an den Positionen S10 und S28. Wie bereits mehrfach in dieser Arbeit erwähnt, sind diese Positionen frequentierte Phosphorylierungsstellen mit essentieller Bedeutung für diverse physiologische Vorgänge¹³⁷. Die Untersuchung entsprechender Modifizierungen im systematischen Kontext einer Zelle ist in der Regel äußerst komplex. In der Vergangenheit wurden verschiedene Studien durchgeführt, die eine Mutation der Phosphorylierungsstellen oder das Inhibieren entsprechender Kinasen beinhalteten¹³⁷. Beide Vorgehensweisen haben jedoch wesentliche Schwächen. Es sind eine Vielzahl an Histon H3-Isoformen im Genom von Säugetieren codiert, die entsprechende Mutanten kompensieren, weshalb bei einem experimentellen Ansatz, der auf Histon H3-Mutationen basiert, in der Regel auf simple Organismen ausgewichen wurde^{144;145}. Alternativ wurden mittels Inhibitoren an Histon H3 agierende Kinasen stillgelegt¹⁶⁵. Einen Einfluss auf Phosphorylierungen anderer Proteine konnte mit dieser Methode jedoch nicht ausgeschlossen werden. Die CbFic2 vermittelte Adenylylierung von Histon H3 könnte eine weitere Route in der Erforschung dieser epigenetischen Modifikationen bilden und helfen, bestehende Probleme zu lösen.

Ein wesentlicher Aspekt, der zukünftig eine besondere Aufmerksamkeit erhalten sollte, ist die Sekretion potentieller Effektoren zu Beginn der *C. burnetii*-Infektion. Die Histon H3-Adenylylierung ist bereits eine Stunde nach Internalisierung des Bakteriums durch die Wirtszelle feststellbar, was einen frühen Sekretionspfad für CbFic2 impliziert. Dies ist jedoch noch nicht erwiesen und sollte in weiteren Untersuchungen einen prioritären Stellenwert einnehmen. Eine Evaluierung des T1- sowie des T2-Sekretionssystems von *C. burnetii* wäre in diesem Zusammenhang wünschenswert. Die Bedeutung dieser Sekretionssysteme in Infektionen wurde bereits anhand verschiedener zellinvasiver Pathogene beschrieben^{166;167}.

Zuletzt sind die interessanten biophysikalischen Eigenschaften von CbFic2 hervorzuheben. Die in dieser Arbeit präsentierten Untersuchungen lassen auf einen DNA-Bindungs-abhängigen und besonderen Mechanismus zur Regulierung der enzymatischen Aktivität des Proteins schließen. Eine nähere strukturelle Aufklärung dieses Vorgangs könnte stark zum allgemeinen Verständnis der Funktionsweise von CbFic2 sowie weiterer verwandter Proteine geben. Hierzu zählen die Fic-Proteine CbFic1 und LpFic. Ihre Untersuchung ist im Vergleich zu CbFic2 noch auf einer anfänglichen Ebene. Welche Substrate von diesen Enzymen in einem physiologischen Kontext adressiert werden und ferner, was dies für eine Rolle in den jeweiligen Organismen spielt, ist bisher unbekannt. Jedoch geben speziell die Experimente, die mit LpFic durchgeführt worden sind, eine vielversprechende Aussicht, dies künftig zu erörtern. Zielführend könnte die Entwicklung zellkompatibler ATP-Sonden sein. Fouda *et al.* realisierten dies bereits für die fluoreszenzmikroskopische Untersuchung von Kinasen und ihren Phosphorylierungssubstraten¹⁶⁸.

Zusammenfassend bietet die vorliegende Arbeit neue Einblicke in die funktionelle Diversität von Fic-Proteinen und beschreibt erstmals die Adenylylierung als potentielle patho-epigenetische, posttranslationale Modifikation. Aufgrund des breiten Vorkommens von HTH-Domänen enthaltenen Fic-Proteinen, könnte diese Arbeit sich als Ausgangspunkt für die Entdeckung weiterer histonmodifizierender Effektoren erweisen.

6. Material und Methoden

6.1. Material

6.1.1. Chemikalien

Tabelle 2: Auführung häufig verwendeter Chemikalien.

Chemikalie	Hersteller
Acetonitril	VWR Prolabo Chemicals, Fontenay sous Bois, F
Acrylamid	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, D
Agarose	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, D
Ameisensäure	Fluka, Steinheim, D
Ammoniumpersulfat (APS)	Amresco, Solon, Ohio, US
Adenosin-5`-Diphosphat (ATP)	Carbosynth, Berkshire, UK
Adenosin-5`-Triphosphat (ATP)	Carbosynth, Berkshire, UK
β -Mercaptoethanol	VWR Prolabo Chemicals, Leuven, B
Bromphenolblau	Alfa Aesar GmbH & Co KG, Karlsruhe, D
Chloroform	VWR Prolabo Chemicals, Leuven, B
Coomassie® Brilliant Blau R-250	AppliChem, Darmstadt, D
di-Natriumhydrogenphosphat	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, D
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Fluka, Sigma Aldrich, Steinheim, D
1,4-Dithioerythritol (DTE)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, D
Essigsäure	VWR Prolabo Chemicals, Leuven, B
Ethanol, biology grade	VWR Prolabo Chemicals, Leuven, B
Ethanol, technisch	VWR Prolabo Chemicals, Leuven, B
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	AppliChem, Darmstadt, D
Glyzerin	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, D
Glycin	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, D
Guanidiniumchlorid	VWR Prolabo Chemicals, Leuven, B
Guanosin-5'-[(β , γ)-imido]-Triphosphat (GppNHP)	Carbosynth, Berkshire, UK
Guanosin-5'-Diphosphat (GDP)	Carbosynth, Berkshire, UK
Guanosin-5'-Triphosphat (GTP)	Carbosynth, Berkshire, UK
Hoechst-33342	Thermo Fischer Scientific, Waltham, US
2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (Hepes) Natriumsalz	AppliChem, Darmstadt, D
Imidazol	Alfa Aesar GmbH & Co KG, Karlsruhe, D
Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG)	Carbosynth, Berkshire, UK
Isopropanol, biology grade	VWR Prolabo Chemicals, Leuven, B
Kaliumchlorid	VWR Prolabo Chemicals, Leuven, B
Magnesiumchlorid	VWR Prolabo Chemicals, Leuven, B
Methanol	Fluka, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, US
Natriumazid	VWR Prolabo Chemicals, Leuven, B
Natriumchlorid	Alfa Aesar GmbH & Co KG, Karlsruhe, D
Natriumdihydrogenphosphat Monohydrat	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, D
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, D
Natriumhydroxid	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, D
Nickelsulfat Hexahydrat	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, D

Paraformaldehyd	AppliChem, Darmstadt, D
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Amresco, Solon, Ohio, US
Roti®-Block	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, D
Salzsäure	VWR Prolabo Chemicals, Leuven, B
Sypro® Orange Protein stain	Sigma Aldrich, St. Louis, US
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Amresco, Solon, Ohio, US
Trifluoressigsäure (TFA)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, D
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, D
Triton-X-100	VWR Prolabo Chemicals, Leuven, B
Tween® 20	Fluka, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, US
Xylencyanol	AppliChem, Darmstadt, D

6.1.2. Lösungen

Tabelle 3: Aufführung häufig verwendeter Lösungen.

Lösung	Zusammensetzung / Hersteller
SDS-PA-GEL Sammelpuffer	0,5 M Tris-HCl, pH 6,8 0,4% (w/v) SDS
SDS-PA-GEL Trenngelpuffer	1,5 M Tris-HCl, pH 8,8 0,4% (w/v) SDS
SDS-PAGE Laufpuffer (10x)	0,25 M Tris-HCl 2 M Glycin 1% (w/v) SDS
SDS-PAGE Probenpuffer (2x)	0,1 M Tris-HCl, pH 6,8 4% (w/v) SDS 20% (w/v) Glycerin 10% (v/v) β -Mercaptoethanol 0,002% (w/v) Bromphenolblau
SDS-PA-GEL Färbelösung	12% (v/v) Essigsäure 44% (v/v) Ethanol 0,15% (w/v) Coomassie Brilliant Blue R-250
SDS-PA-Gel Entfärbelösung	10% (v/v) Essigsäure in ddH ₂ O
TBE	89 mM Tris Base pH 8,0 89 mM Borsäure 2 mM EDTA in ddH ₂ O
DNA-Ladepuffer	50% (v/v) Glycerin 10 mM EDTA 0,2% (w/v) Bromphenolblau 0,2% (w/v) Xylencyanol in ddH ₂ O

Blotting Puffer	48 mM Tris-Base 39 mM Glycin 1,3 mM SDS 20% Methanol in ddH ₂ O
TBS-T	50 mM Tris-Base pH 7,6 150 mM NaCl 0,1% Tween® 20 in ddH ₂ O
PBS	2,74 M NaCl 53,7 mM KCl 202 mM Na ₂ HPO ₄ (2x H ₂ O) 35,2 mM KH ₂ PO ₄ in ddH ₂ O
TEB (Triton Extraction Buffer)	1x PBS 2 mM PMSF 0,5% Triton-X-100 0.02% (w/v) NaN ₃
RIPA-Lysepuffer	Thermo Fischer Scientific, Waltham, US
Roti®-Free Stripping Buffer	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, D

6.1.3. Nährmedien

Tabelle 4: Auführung häufig verwendeter Nährmedien.

Nährmedium	Zusammensetzung / Hersteller
LB-Flüssigmedium	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, D
SOC-Medium	10 g Trypton 5 g Hefeextrakt 10 g NaCl 15 g Agar in ddH ₂ O
DMEM (AQmedia™)	Sigma Aldrich, St. Louis, US
DMEM (ohne Indikator)	Sigma Aldrich, St. Louis, US
DMEM (- Arg, - Lys)	Sigma Aldrich, St. Louis, US
Opti-MEM®	Sigma Aldrich, St. Louis, US
FBS (fötales Kälberserum)	Sigma Aldrich, St. Louis, US

6.1.4. SDS-Polyacrylamidgele

Tabelle 5: Zusammensetzung der verwendeten SDS-Polyacrylamidgele.*

Substanz	Sammelgel (5%)	Trenngel (15%)
Sammelgelpuffer	7,5 mL	-
Trenngelpuffer	-	12,5 mL
30% (w/v) Acrylamid/Bisacrylamid (37,5:1)	5 mL	25 mL
10% (w/v) APS	240 µL	250 µL
TEMED	30 µL	25 µL
Wasser	17,5 µL	12,5 mL

* Der angegebene Ansatz entspricht ca. 15 Gelen.

6.1.5. Peptide

Tabelle 6: Auführung der verwendeten Peptide.

Peptid	Ursprung	Aminosäuresequenz
Histon H3 ₁₋₂₀	AnaSpec	ARTKQTARKSTGGKAPRKQL
Histon H3 ₁₋₃₅	AnaSpec	ARTKQTARKSTGGKAPRKQLATKAARKSA PATGGV
Histon H3 ₂₁₋₃₅	rekombinant	GHM-ATKAARKSAPATGGV
Histon H3 _{21-35 S28A}	rekombinant	GHM-ATKAARKAAPATGGV

* Peptide wurden als GST-Fusionskonstrukt hergestellt, mittels TEV-Protease abgespalten und über Spin-X UF Zentrifugalkonzentratoren (10 kDa Molekulargewichts-Ausschlussgrenze; Corning, Lowell, US) bei 4°C und 15000 rpm von den Proteinen getrennt (im Durchfluss gesammelt). GHM = Rest der TEV-Schnittstelle.

6.1.6. Bakterienstämme

Tabelle 7: Auführung der verwendeten Bakterienstämme.

Stamm	Genotyp
XL1-Blue	<i>E. coli</i> <i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac</i> [F' <i>proAB lacIqZΔM15 Tn10</i> (Tetr)]
Mach1	Δ <i>recA1398 endA1 tonA Φ80Δ<i>lacM15</i> Δ<i>lacX74 hsdR</i>(r_K⁻ m_K⁺)</i>
BL21(DE3) Codon Plus RIL	<i>E. coli</i> F- <i>ompT hsdS</i> (rB- mB-) <i>dcm</i> Tetr <i>gal</i> λ (DE3) <i>endA</i> Hte [<i>argU ileY leuW</i> Cam ^r]
BL21 DE3	F- <i>ompT hsdSB</i> (rB- mB-) <i>gal dcm+</i> Tetr <i>gal</i> λ (DE3)
Lemo21	<i>fhuA2 [lon] ompT gal</i> λ (DE3) [<i>dcm</i>] Δ <i>hsdS</i> / <i>pLemo</i> (Cam ^R) λ DE3 = λ <i>sBamH1o</i> Δ <i>EcoRI-B int::(lacI::PlacUV5::T7gene1)</i> <i>i21Δnin5</i> <i>pLemo</i> = <i>pACYC184-PrhaBAD-lysY</i>

6.1.7. Antibiotika

Tabelle 8: Auführung der verwendeten Antibiotika.

Antibiotikum	Konzentration in Medien	Hersteller
Ampicillin	125 µg/ml	AppliChem (Darmstadt, D)
Chloramphenicol	34 µg/ml	AppliChem (Darmstadt, D)
Kanamycin	50 µg/ml	AppliChem (Darmstadt, D)

6.1.8. Enzyme

Tabelle 9: Auführung der verwendeten Enzyme.

Enzym	Hersteller
T4 Polymerase	New England Biolabs (Ipswich, USA)
Q5 Polymerase	New England Biolabs (Ipswich, USA)
Quick-Ligase	New England Biolabs (Ipswich, USA)
Restriktionsenzyme	New England Biolabs (Ipswich, USA)
RNAse	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, D
DNase	Sigma Aldrich, Steinheim, D
TEV-Potease	TU München, AG Proteinchemie
Trypsin (<i>proteomics grade</i>)	Sigma Aldrich, Steinheim, D
Lys-C (<i>sequencing grade</i>)	Sigma Aldrich, Steinheim, D

6.1.9. Antikörper

Tabelle 10: Auführung der verwendeten Antikörper.

Antikörper	Organismus	Hersteller
α-Ser/Thr-AMP	Kaninchen	BioGenes, Dortmund, D
α-Tyr-AMP	Kaninchen	BioGenes, Dortmund, D
α-PC	Maus	Sigma Aldrich, Steinheim, D
α-Histon H3 _{FL}	Kaninchen	Santa Cruz,
α-GFP	Kaninchen	Life Technologies
α-Rabbit IgG, HRP-Konjugat	Ziege	Sigma Aldrich
α-mouse IgG, IgA, IgM (H+L)	Ziege	Life Technologies
HRP-Konjugat		

6.1.10. Größenstandards

Tabelle 11: Aufführung der verwendeten Größenstandards.

Standard	Hersteller
DNA Ladder 1 kb	New England Biolabs (Ipswich, USA)
2-Log DNA Ladder	New England Biolabs (Ipswich, USA)
ColorPlus™ Prestained Protein Marker	New England Biolabs (Ipswich, USA)
Broad Range Protein Test Mixture 6	Serva Electrophoresis GmbH (Heidelberg, D)
Gelfiltrationsstandard	Bio-Rad Laboratories GmbH (München, D)

6.1.11. Fic-Proteine

Tabelle 12: Aminosäuresequenzen der untersuchten Fic-Proteine.

Protein (Gen)	Aminosäuresequenz
CbFic1 (CBU_2078)	MFKPLFQISNQTANALTAIERARGFLEAATLSLEWLEKMQNKALVLEAHHTTHIEGTQLT- LEESERLWQQQHAEVNPDDAKELLYNREAFELVSNYVGDGEPI- TEGLIREIHKRLVQGVGDSATPGLYRKIQNYVNSKTKEVIYTPPPAYEISHLMQGLVDWL- NEEEDIHPVLVSGIAQFQLVHIHPFLDGNRGTARLLSTLCLYRKGYDFKKLFTISEYYDRN- RADYYKAIQSVRENDMDMTGWLEYFSEGLAVQL- REIKDLGKQAIKQSLLSKKHHLSERQGLAIDYMTTEGSLSIQQFEKMCPE- VTRRTLQRELKDLIDRGLVRSSGATSNIYKLEKSAK
CbFic2 (CBU_0822)	MSHWIWQHKDWPFFWDEKLLSSHSSARLVQGKLLGIIHTINQQTARQMNAF- VLADQAVDTSAIEGEHLNRDSVRSSIANRLGLKQVGINKPVDRIEGLLDMLLDATE- NYEQPLTLERLYGWHAALFPTGYSGIHKITVAALRKTDPMQIVSGRPGKIKVHYEAPPS- KRVNKEMRIFLNWFNKKDLGLLRAGIAHLWFELLHPFDDGNGRIGRAIIDLT- LAQDEKQNVRYYSLSAIMQDRKNYYTQLGKSCRGNMDITLWLIWFINCFKTAIHQAFE- LIDDITLKSFRWEKHATTELNARQIKVLNRLLDAGKKGFIGGMTRKYTQLTKTSRTTAY- RELHDLVLKKCLKPLTKKGRSAAYEIRWVNKEHKSCK
LpFic (LLO_0951)	MKWNWQLENWPNFTWSDKLVVYEQTFTERAGIIIGSSQYISQEGKQNLFIDLMCT- DALDSSEIEGEHLNRDSVQSSIQKELGLSTEAPRASMAERGI- AKMMVNLYQTISSPLTHQVLFQWVHQLMGNSHHLENIGYRKHEEAMQIVSGPDYDRKIH- FEAPPSKCVRAEMDQFINWFERSLTSAPLPTLTRAGIAHLWFE- SIHPFEDGNGRIGRAIAEKALSQGFSPVMTVLAKILLKKRKEYYQLGLASKTLDLTS- WLIWFANIALEAQQSTYLYIDFIIKKSIVLREVEGKINPRQEKVLLRLF- HAGPDGFGVGLSAKNYSITGAPIATTTDRDLNDLVKKNILKRSGELKATRYFLNLDKA

6.2. Molekularbiologische Methoden

6.2.1. Polymerase Kettenreaktion

Die Polymerase Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) ist eine Methode zur Vervielfältigung von DNA-Oligonukleotiden ausgehend von einem DNA-Templat. In dieser Arbeit wurde sie zur Herstellung ausreichender Kopien eines Genes für die Klonierung in entsprechende Expressionsvektoren oder zur Überprüfung einer erfolgreichen Ligation von DNA-Fragment und geschnittenem Plasmid verwendet. Die Durchführung der PCR erfolgte in einem T100™ Thermal-Cycler (BioRad, München, D).

6.2.2. Präparative PCR

Für die präparative PCR wurde in der Regel ein Reaktionsansatz von 50 µl in 0,1 ml Reaktionsgefäßen auf Eis angesetzt, wobei die Polymerase stets als letzte Komponente hinzugeben wurde. Folgender Reaktionsansatz wurde pipettiert:

Tabelle 13: PCR-Reaktionsansatz

Volumen (µl)	Konzentration	Ingrediens
0,5	100 µM	5'-Primer
0,5	100 µM	3'-Primer
1,0	100-200 ng/µl	DNA-Templat
1,0	10 µM	dNTP`s
1,5	100%	DMSO
10	5x	Q5-Reaktionspuffer
0.5	2000 U/ml	Q5 Polymerase
35	-	ddH ₂ O

Das Temperaturprogramm ist der nachstehenden Tabelle zu entnehmen:

Tabelle 14: PCR-Temperaturprogramm

Temperatur (°C)	Zeit	Phase
98°C	1 – 5 min	Initiale Denaturierung
98°C	10 s	Denaturierung
50-68°C	20 s	Anlagerung
72°C	30 s/Kb	Elongation
72°C	2 min	Finale Elongation
4°C	∞	Ende

Für die initiale Denaturierung von Plasmiden wurde eine Dauer von 1 min und von chromosomaler DNA sowie bakterieller Kolonien eine Dauer von 5 min gewählt. Die Anlagerungstemperatur von Primern ergab sich aus der berechneten Schmelztemperatur abzüglich 5°C. Die Elongationszeit wurde auf 30 s pro Kilobase festgesetzt.

6.2.2. Analytische PCR (Kolonie PCR)

Der Erfolg einer Ligation von DNA Fragment und geschnittenem Plasmid kann nach der zugehörigen Transformation von kompetenten Zellen mit dem Ligationsansatz über eine Kolonie PCR mit den spezifischen Primern für das Gen überprüft werden. Hierzu werden Einzelkolonien von der Agarplatte gepickt und den PCR Reaktionsansätzen hinzugefügt. Durch die hohe Temperatur der Denaturierung lysieren die *E. coli*-Zellen, wodurch das Plasmid in die Reaktionsmischung austritt und der thermostabilen Polymerase als Templat zur Verfügung steht. Für die Kolonie PCR wurde eine Einzelkolonie in 10 µl ddH₂O durch Auf- und Abpipettieren resuspendiert. Anstelle von gereinigter Templat-DNA wurde 1 µl der Bakteriensuspension zum PCR-Ansatz (s. Tabelle 13) hinzugegeben und ein PCR-Standardprogramm (s. Tabelle 14) durchgeführt. Die PCR-Produkte wurden anschließend auf einem Agarosegel analysiert.

6.2.3. Restriktionsverdau

Der Begriff Restriktionsverdau bezeichnet das gezielte Schneiden von DNA an spezifischen Sequenzen mittels Restriktionsendonukleasen. In der Molekularbiologie macht man sich diese Eigenschaft zu Nutze, um bestimmte DNA Sequenzen in die *multiple cloning site* (MCS), ein nicht codierender Bereich in künstlich entworfenen Plasmiden mit mehreren verschiedenen Schnittstellen, über die enzymatische Ligation einbringen zu können.

Für den Verdau von DNA wurden 2-6 µg Plasmid oder gereinigtes PCR-Produkt mit 3 µl 10x CutSmart-Puffer (NEB, Ipswich, US) und 1 µl von dem jeweils benötigten Restriktionsenzym vermischt und auf ein Volumen von 30 µl mit ddH₂O gebracht. Der Reaktionsansatz wurde bei 37°C für 3 h inkubiert, gefolgt von 10 min bei 80°C zur Denaturierung der Enzyme. Der Restriktionsverdau wurde anschließend auf einem Agarosegel analysiert und benötigte DNA-Fragmente ausgeschnitten und gereinigt.

6.2.4. Agarosegelelektrophorese

Die Agarosegelelektrophorese ist eine Methode zur Auftrennung und Analyse von Nukleinsäuren nach ihrer Größe. Hierbei bildet das Agarosegel eine Art molekulares Sieb, dessen Porengröße mit zunehmender Agarosekonzentration abnimmt. Die negativ geladenen Nukleinsäuren wandern während der Elektrophorese durch das Gel in Richtung Pluspol, wobei die Fortbewegungsgeschwindigkeit von dem sterischen Anspruch der Nukleinsäuren abhängt und somit große Moleküle stärker zurückgehalten werden. Eine Visualisierung der Nukleinsäuren ist durch Zugabe bestimmter DNA-interkalierender Farbstoffe ins Gel möglich. Als ein klassisches Beispiel dient Ethidiumbromid, das durch DNA-Interkalation seine Fluoreszenzemission um das 50-100-fache erhöht¹⁶⁹.

Zur Reinigung von Nukleinsäuren im Laufe eines Klonierungsprozesses wurden 1% Gele durch Aufkochen von 0,5 g Agarose in 50 ml TAE-Puffer hergestellt. Zur späteren Visualisierung der

DNA-Banden wurde in die noch flüssige Gellösung 0,5 µl Stain G Farbstoff (Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, D) hinzugefügt, bevor sie in eine entsprechende Schablone zum Aushärten gefüllt wurde. Ein spezieller Kamm diente zum Formen von Geldaschen für die DNA-Proben, die mit 10x DNA-Ladepuffer versetzt wurden. Die Elektrophorese wurde horizontal bei einer Spannung von 100 V für 30-60 min in TAE-Puffer durchgeführt. Im Anschluss wurden die DNA-Banden im Gel durch Anregung des G-Stain Farbstoffs im ultravioletten Licht sichtbar gemacht und im Vergleich zu einem Größenstandard analysiert. Die Extraktion von Oligonukleotiden aus Agarosegel-Stücken erfolgte über das Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, Mannheim, D).

Zur Analyse der Nukleinsäure-Kontamination in MBP-CbFic2-Präparaten wurde die Gelelektrophorese mit 0,5% Gelen bei einer Spannung von 5 V/cm durchgeführt. Es wurden 25 µg MBP-CbFic2_{FL} bzw. MBP-CbFic2₁₋₃₀₀ (Negativkontrolle) unbehandelt oder nach Inkubation mit Proteinase K, DNase I oder RNase bzw. in einer Kombination dieser Enzyme aufgetragen. Die Proben wurden wie folgt behandelt:

(1) 25 µg MBP-CbFic2_{FL} bzw. MBP-CbFic2₁₋₃₀₀ wurde zu einem Volumen von 20 µl mit Reaktionspuffer (20 mM Na₂HPO₄/NaH₂PO₄ pH 7,0, 50 mM NaCl, 1 mM MgCl₂, 1 mM CaCl₂, 1 mM DTE, 10% Glycerin) verdünnt und mit 0,25 µg Proteinase K oder DNase I für 2 h bei 25°C inkubiert. Anschließend wurde die Probe mit 2,3 µL 10x DNA-Ladepuffer versetzt und auf einem Agarosegel analysiert.

(2) 25 µg MBP-CbFic2_{FL} bzw. MBP-CbFic2₁₋₃₀₀ wurde zu einem Volumen von 20 µl mit Reaktionspuffer (s. Probe 1) verdünnt, durch Zugabe von 0,25 µg Proteinase K für 2 h verdaut, anschließend mit 5 mM PMSF (final) inhibiert und mit 0,25 µg DNase I oder RNase für 1 h bei 25°C inkubiert. Für die Agarosegel-Analyse wurde die Probe mit 2,3 µL 10x DNA-Ladepuffer versetzt.

6.2.5. DNA-Ligation

Die Verknüpfung von PCR-Produkten und DNA-Fragmenten mit geschnittenen Plasmiden erfolgte auf enzymatischer Ebene mittels der T4 Quick Ligase. Diese generiert Phosphodiesterbindungen zwischen 5'-Phosphat und 3'-Hydroxyenden in DNA-Doppelsträngen. Zu 50 ng Plasmid wurde ein 3-6-facher molarer Überschuss an einzubringender DNA hinzugefügt, das Volumen auf 10 µl mit ddH₂O eingestellt und mit 10 µl 2x T4 Quick Ligase Puffer vermengt. Der 2x Puffer enthält, neben den Salzen zur Stabilisation des Enzyms und pH-Pufferung, 10 mM ATP, das der Ligase als Kofaktor dient. Im Anschluss wurde 1 µl T4 Quick Ligase hinzupipettiert und für 5 min bei 25°C inkubiert. Nach zusätzlicher Inkubation für 10 min auf Eis wurde ein geeigneter *E. coli* Bakterienstamm (Xl1 Blue oder Mach1) mit 10 µl des Reaktionsansatzes transformiert.

6.2.6. Sequence and Ligation independent cloning (SLIC)

Als Alternative zur klassischen DNA-Ligation über die T4-DNA-Ligase stand das Sequenz- und ligationsunabhängige Klonierungsverfahren SLIC zur Verfügung. Bei dieser Methode werden DNA-Fragmente mit einer 10-25 Bp langen Sequenz ausgestattet, die homolog zu den Enden des linearisierten Plasmids sind. SLIC bedient sich der 3'-Exonukleaseaktivität der T4-DNA-Polymerase, die bei Abwesenheit von dNTPs auftritt. Durch Abbau der 3'-Enden von DNA-Fragment und Plasmid entstehen zueinander komplementäre Überhänge, die sich aneinander anlagern und ein zirkuläres Plasmid bilden. Das Plasmid enthält an dieser Stelle vier Einzelstranglücken, die nach Transformation des Reaktionsansatzes in *E. coli* durch endogene Enzyme geschlossen werden. Die zusätzliche zu den Plasmiden homologe Sequenzinformation in den DNA-Fragmenten wurde in dieser Arbeit durch Überhänge an den PCR-Primern angebracht. Entsprechende Primer wurden mit dem NEBuilder Assembly Tool (<http://nebuilder.neb.com/>) von NEB entworfen.

In einem Reaktionsansatz von 100 ng Plasmid, 2-5-fachen Überschuss DNA-Fragment, 1 µl NEB-2 Puffer und 0,1 ng BSA in einem Gesamtvolumen von 9,5 µl wurde 0,5 µl T4-DNA-Polymerase hinzugefügt und für 2,5 min bei Raumtemperatur inkubiert, gefolgt von 10 min auf Eis. Anschließend wurden kompetente XI1 Blue oder Mach1 *E. coli*-Zellen mit 10 µl des Reaktionsansatzes transformiert.

6.2.7. Ortsspezifische Mutagenese

Gezielte Mutationen, konkret Basenpaaraustausche, in den hier verwendeten DNA-Konstrukten wurden über das QuickChange[®]-Verfahren von Stratagene oder über das Q5[®]-Site-Directed Mutagenesis Kit von NEB erreicht. Beide Methoden basieren auf einer PCR, wie in Abschnitt 6.2.1. beschrieben. Der grundlegende Unterschied zur klassischen PCR liegt in der Elongationszeit, die es der Polymerase erlaubt das vollständige Plasmid zu amplifizieren und so eine Kopie mit der gewünschten Mutation zu erstellen.

QuickChange: Beim QuickChange-Verfahren werden Primer entworfen, die komplementär zueinander sind und komplementär zur Zielsequenz im Plasmid mit Ausnahme der Basenänderung für die einzubringende Mutation. Das betroffene Codon befindet sich in der Mitte der Primer und wird von 10-15 Basen flankiert. Dadurch, dass die Primer vollständig überlappen, ist die Amplifikation der DNA linear, d. h. dass für jeden Amplifikationsschritt nur die Templat-DNA als Vorlage fungiert, was zu weitaus weniger Produkten als in einer gewöhnlichen PCR führt.

Der Entwurf der Primer erfolgte über das Primer Design Programm von Agilent (<http://www.genomics.agilent.com/primerDesignProgram.jsp>). Der Reaktionsansatz für die PCR unterschied sich teilweise von den Vorgaben des Herstellers und beinhaltete folgende Komponenten:

Tabelle 15: Quick-Change Reaktionsansatz

Volumen (µl)	Konzentration	Ingrediens
0,5	10 µM	5'-Primer
0,5	10 µM	3'-Primer
1,0	5-10 ng/µl	DNA-Templat
0,5	10 µM	dNTPs
1,0	100%	DMSO
5	5x	Q5-Reaktionspuffer
0,5	2000 U/ml	Q5 Polymerase
16,0	-	ddH ₂ O

Das Temperaturprogramm ist der nachstehenden Tabelle zu entnehmen:

Tabelle 16: Quick-Change Temperaturprogramm

Temperatur (°C)	Zeit	Phase
98°C	1-5 min	Initiale Denaturierung
98°C	10 s	Denaturierung
50-68°C	20 s	Anlagerung
72°C	30 s/Kilobase	Elongation
72°C	2 min	Finale Elongation
4°C	∞	Ende

Im Anschluss an die PCR wurde der Reaktionsansatz mit 3 µl CutSmart-Puffer, 1 µl ddH₂O und 1 µl Dpn1 vermischt und für 10 h bei 37°C inkubiert. 10 µl wurden hieran für die Transformation in einen geeigneten kompetenten *E. coli*-Stamm (X11 Blue, Mach1) entnommen.

Q5-Site directed Mutagenesis: Das Mutagenese-System der Firma NEB beruht auf dem Konzept der exponentiellen Amplifikation, das durch den Einsatz von nicht überlappenden Primern bewerkstelligt wird. Die Primer sind so entworfen, dass die 5'-Enden genau aneinander abschließen. Die Mutation ist bei dieser Variante in der Mitte des *forward Primer* inkorporiert und wird von mindestens 10 Basen flankiert. Der Entwurf der Primer erfolgte über das Programm NEBaseChanger™ (<http://nebasechanger.neb.com/>) von NEB. Die PCR wurde gemäß der Anleitung vom Hersteller unter Verwendung des Q5-Hot Start High-Fidelity 2x Master Mix durchgeführt. Um zirkuläre Plasmide zu generieren, bedarf es nach der PCR der Behandlung des Ansatzes mit dem im Kit mitgelieferten KLD-Mix; eine Zusammenstellung aus einer Kinase, Ligase und DpnI. Die Kinase sorgt für die Phosphorylierung des Vektors, die Ligase für die kovalente Verbindung der Vektorenden und somit der Zirkularisierung und DpnI für den Verdau der Templat-DNA. Auch dieser Schritt wurde exakt nach Vorgaben des Herstellers durchgeführt. Zur Transformation von kompetenten *E. coli*-Zellen wurden 5 µl vom KLD-Reaktionsansatz verwendet.

6.2.8. Plasmid-Präparation

Für viele Anwendungen in der Mikrobiologie, wie zum Beispiel der Transfektion von Säugetierzellen, ist eine hohe Konzentration und Reinheit von Plasmid-DNA nötig. Um diese zu erlangen, wurden *E. coli* Einzelkolonien des Stamms X11 Blue oder Mach1 nach Transformation mit dem entsprechenden Plasmid von einer Agarplatte gepickt und in 4 ml LB-Nährmedium über Nacht bei 37°C und 240 rpm inkubiert. Das in der Bakterienkultur vervielfältigte Plasmid wurde anschließend mit dem PureYield™ Plasmid Miniprep System (Promega, Mannheim, D) isoliert und gereinigt. Die Lagerung der Plasmid-DNA erfolgte in TE-Puffer bei -20°C.

6.2.9. Hitzeschocktransformation

Unter dem Terminus Transformation versteht man in der Molekularbiologie die Überführung von freier DNA bzw. Plasmiden in chemisch kompetente Bakterien, Hefen und Algen. In dieser Arbeit wurde die Methode der Hitzeschocktransformation verwendet, um Plasmide in entsprechende *E. coli* Bakterienstämme zu übertragen.

Zu einer Zellsuspension kompetenter Zellen mit einem Volumen von 100 µl wurden 100-500 ng Plasmid bzw. im Falle einer Ligation 10 µl Ansatz hinzugefügt, vermennt und für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen bei 42°C für 1 min einem Hitzeschock ausgesetzt und für weitere 5 min auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 900 µl SOC-Medium, wurde die Zellsuspension für 1 h bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Anschließend wurde der gesamte Ansatz abzentrifugiert, das Zellpellet in 100 µl SOC-Medium aufgenommen und auf eine Agarplatte mit Selektionsantibiotika ausplattiert. Die Platten wurden im Brutschrank über Nacht bei 37°C inkubiert.

6.2.10. Histon-Extraktion

HEK293T wurden in einer 6-well Platte subkultiviert, am darauffolgenden Tag bei einer Konfluenz von 70-90% mit entsprechenden Expressionsplasmiden transfiziert und nach 36 h Inkubation bei 37°C und 5% CO₂ in der Atmosphäre geerntet. Die Zellen wurden zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen und anschließend in einer Verdünnung von 10⁷ Zellen/ml in Triton Extraktionspuffer (TEB) auf Eis unter leichtem Schwenken lysiert. Um die Zellkerne von den restlichen Bestandteilen der Zelle zu trennen, wurde bei 6.500 x g für 10 min bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit den enthaltenen Zellkernen in TEB-Puffer gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation wurden die Zellkerne in 0.5 M HCl + 10% Glycerin zur Histon-Extraktion resuspendiert und für 3 h auf Eis inkubiert. Unlösliche Bestandteile der Zelle wurden bei 6.500 x g für 10 min bei 4°C pelletiert und der Überstand mit den gelösten Histonen gesammelt.

6.3. Analytische Methoden

6.3.1. Konzentrationsbestimmung über UV-Absorption

Die Konzentrationsbestimmung von reinen Protein- und DNA-Lösungen erfolgte nach dem Lambert-Beer'schen Prinzip über die UV-Absorption (Extinktion, E) bei 280 nm bzw. 260 nm. Der zur Konzentrationsbestimmung benötigte Extinktionskoeffizient kann im Fall von Proteinen aus der Anzahl an Tryptophan, Tyrosin und Cystein berechnet werden¹⁷⁰.

$$\varepsilon = (nW \cdot 5500) + (nY \cdot 1490) + (nC \cdot 125)$$

Gleichung 1: Molarer Extinktionskoeffizient von Peptiden oder Proteinen (ε : Extinktionskoeffizient, n : Anzahl der jeweiligen Aminosäure, W : Tryptophan, Y : Tyrosin, C : Cystein)

Zur Bestimmung der DNA-Konzentrationen wurde ein durchschnittlicher Extinktionskoeffizient von 0,020 (ng/ μ L) $^{-1}$ cm $^{-1}$ verwendet. Die Messungen erfolgten an einem NanoDrop-Spektrophotometer ND-2000 (peQLab, Erlangen, DE) mit einem Volumen von 1,5 μ l.

$$E = \varepsilon \cdot c \cdot d$$

Gleichung 2: Lambert-Beer'sche Gesetz. (E : Extinktion, ε : Extinktionskoeffizient, c : Konzentration, d : Küvettschichtdicke)

6.3.2. Konzentrationsbestimmung nach Bradford

Die Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford ist eine kolorimetrische Methode, die auf dem Farbstoff Coomassie Brilliant Blue G250, der sich an die basischen Aminosäuren (Lysin, Arginin und Histidin) und der N-terminalen Aminogruppe des Proteins anlagert, basiert¹⁷¹.

Die Messungen erfolgten in einer Kunststoffküvette mit einer Schichtdicke von 1 cm. Zu 900 μ l Bradford Reagenz wurden 99 μ l ddH₂O und 1 μ l Proteinlösung oder auch Lysat hinzugegeben, vermischt und die Absorption nach 5 min Inkubation bei 595 nm im Vergleich zu einer Referenzprobe ohne Protein ermittelt. Zur Bestimmung der Konzentration ist eine Kalibrierung in Form einer Eichgerade notwendig. Hierfür wurde BSA als Standardprotein verwendet.

6.3.3. Denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese

Die Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli ist in der Protein-Biochemie eine fundamentale Methode zur Trennung und Analyse von Proteinen¹⁷². Die Schlüsselfunktion hat hierbei das anionische Tensid Natriumdodecylsulfat, das bei der Probenvorbereitung mit seinem Alkylrest an die hydrophoben Regionen im Protein bindet und diesem damit eine negative Ladung verleiht. In Kombination mit β -Mercaptoethanol entstehen gestreck-

te, monomere Polypeptidketten, die bei der Elektrophorese zunächst durch ein grobporiges Sammelgel und anschließend durch ein feinporiges Trenngel vertikal zur Anode wandern. Proteingemische können so in Abhängigkeit der Masse durch die molekulare Siebstruktur des Polyacrylamidgels aufgetrennt werden¹⁷².

In dieser Arbeit wurden hauptsächlich Gele nach Rezept von Laemmli mit einem Polyacrylamidanteil von 15% in einem Mini Protean™ Tetra System (BioRad, München, D) verwendet¹⁷². Die zu analysierenden Proben wurden mit 2x Laemmli-Probenpuffer im Verhältnis 1:1 vermischt und für 5 min bei 95°C denaturiert. Je nach Bedarf wurde die Elektrophorese bei 30-60 mA Stromstärke mindestens so lange durchgeführt, bis das im Probenpuffer enthaltene Bromphenolblau aus dem Gel auslief. Zur Visualisierung der Proteinbanden wurde eine Coomassie Brilliant Blau R-250-Färbelösung verwendet. Hierfür wurde das Gel im Anschluss an die Elektrophorese zunächst in einer Färbelösung aufgekocht, für 5 min in der erwärmten Lösung inkubiert und anschließend mit 10% Essigsäurelösung bis zum gewünschten Grad entfärbt. Die Analyse erfolgte im Vergleich zu einem Proteinstandard, der mit aufs Gel aufgetragen wurde.

6.3.4. Western Blot

Der Western Blot ist eine analytische Methode, die das Übertragen von Proteinen auf eine Trägermembran und den anschließenden Nachweis bzw. die Identifikation mittels spezifischer Antikörper beinhaltet. Entsprechende Proteinproben wurden zunächst in einer SDS-PAGE, wie in 6.3.3. beschrieben, aufgetrennt und daraufhin auf eine Nitrozellulose-Trägermembran in horizontaler Richtung elektrophoretisch bei 0,7 mA/cm² für 2 h übertragen. Als Größenstandard diente der ColorPlus™ Prestained Protein Marker (Broad Range 7-175 kDa, NEB, Ipswich, US). Die Nitrozellulosemembran, wie auch jeweils zwei Lagen Whatman-Papier, wurden zuvor in Blotting-Puffer getränkt. Das SDS-PAGE-Gel wurde für wenige Sekunden im Blotting-Puffer gewaschen und auf die Nitrozellulosemembran gelegt. Diese Schicht wurde zwischen zwei Lagen Whatman-Papier gelegt und in einem Semi-Dry-Blotter (V20-SDP, SCIE-PLAS, LTD) eingespannt. Nach dem Blotten wurden die freien Bindungsstellen auf der Membran mit 10 ml 1x Roti-Block (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, D) in TBST-Puffer für 1 h gesättigt. Anschließend wurde die Membran mit dem ersten Antikörper in einer geeigneten Konzentration (siehe 6.1.9.) über Nacht bei 4°C unter leichtem Schwenken inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Membran dreimal mit 20 ml TBST-Puffer für jeweils 10 min gewaschen und daraufhin mit einem zweiten Antikörper für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Der zweite Antikörper ist hochspezifisch gegen das Immunglobulin des ersten Antikörpers und gekoppelt an die *horse radish peroxidase* (HRP), ein in der Biochemie breit verwendetes Reporterenzym, das durch seine katalytische Aktivität z. B. die chemolumineszenten Eigenschaften von Luminol hervorbringen kann. Nach drei weiteren Waschschrritten wurde die Membran mit Western Bright™ ECLSpray (ad-

vansta, Menlo Park, US), eine gebrauchsfertige Luminol-Lösung, befeuchtet und das über die Kaskade AK1-AK2-HRP-Luminol vermittelte chemolumineszente Signal nach 2 min in einem ImageQuant LAS4000 (GE, Uppsala, S) detektiert. Um die Membran von sämtlichen Antikörpern zu befreien und für eine Analyse mit weiteren Antikörpern zugänglich zu machen, wurde ein gebrauchsfertiger Roti[®]-Free Stripping-Puffer (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, D) verwendet. Hierzu wurde die Membran unter leichtem Schwenken für 30 min bei 60°C inkubiert und anschließend sechsmal für jeweils 20 min in TBST-Puffer gewaschen.

In dieser Arbeit wurde das Immunoblotverfahren für folgende Proben verwendet:

Zelllysate: HEK293T bzw. Cos1-Zellen wurden in einer 24-well Platte subkultiviert und am nächsten Tag bei einer Konfluenz von 70-90% mit entsprechenden Expressionsplasmiden transfiziert. Nach 36 h Inkubation bei 37°C und 5% CO₂ in der Atmosphäre wurden die Zellen durch Zugabe von 50 µl RIPA-Puffer für 15 min bei Raumtemperatur lysiert. Durch weitere Zugabe von 50 µl 2x Laemmli-Puffer und Inkubation bei 95°C für 5 min wurde das Gesamtprotein der Zelle denaturiert und für eine anschließende SDS-PAGE vorbereitet.

GST-Histon H3-Peptid-Fusionskonstrukte: 10 µM GST-H3₁₋₂₀ bzw. GST-H3₂₁₋₃₅ und entsprechende Mutanten (H3₁₋₂₀: T3A, T6A, S10A, T11A; H3₂₁₋₃₅: S28A) wurden in einem Reaktionsansatz mit 2 µM MBP-CbFic2 E66G und 2,5 mM ATP gemischt und über Nacht bei 15°C inkubiert (Reaktionspuffer: 20 mM Na₂HPO₄/NaH₂PO₄ pH 7,0, 50 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 1 mM DTE, 10% Glycerin). Anschließend wurde das Gesamtprotein der Reaktionslösung durch Versetzen mit 1x Laemmli-Puffer und Inkubation bei 95°C für 5 min denaturiert und für eine anschließende SDS-PAGE vorbereitet.

Rekombinante Histone: 10 µM Histon (H2a, H2b, H3, H4) (NEB, Ipswich, US) wurden in einem Reaktionsansatz mit 2 µM MBP-CbFic2 E66G und 2,5 mM ATP gemischt und für 2 h bei 15°C inkubiert (Reaktionspuffer: 20 mM Na₂HPO₄/NaH₂PO₄ pH 7,0, 50 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 1 mM DTE, 10% Glycerin). Anschließend wurde das Gesamtprotein der Reaktionslösung durch Versetzen mit 1x Laemmli-Puffer und Inkubation bei 95°C für 5 min denaturiert und für eine anschließende SDS-PAGE vorbereitet.

Extrahierte Histone: siehe Abschnitt 6.2.10.

6.3.5. Analytische Hochleistungsflüssigkeitschromatographie

Die Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) ist eine chromatographische Methode zur Trennung und qualitativen wie auch quantitativen Analyse von molekularen, organischen Substanzen. In dieser Arbeit diente sie zur Trennung von Nukleotiden, im Detail zur Bestimmung der Effizienz eines Nukleotidaustausches von GDP zu GTP bzw. GppNHp bei Cdc42 oder zur quantitativen Analyse der Histon H3₁₋₂₀ Peptid Adenylylierung durch MBP-CbFic2 E66G. Die Messungen wurden an einem Shimadzu HPLC-System (Shimadzu, Tokio, J) durchgeführt. Zur Analyse von Nukleotiden wurde eine ProntoSil 120-5-C18-AQ-Umkehrphasensäule (Bischoff, Leonberg, D) zunächst mit Tetrabutylammoniumbromid (TBABr)-haltigem Puffer (Puffer: 50 mM Kaliumphosphat pH 6,6, 10 mM TBABr, 12% (v/v) ACN) äquilibriert, was zur Bindung der Butylreste des TBABr an die C18-Ketten der Säule führte und mittels der positiv geladenen Ammoniumgruppe eine polare stationäre Phase bildete. Tri-, Di- und Monophosphatnukleotide ließen sich anschließend effizient über die Wechselwirkung der negativ geladenen Phosphatgruppen mit der positiv geladenen stationären Phase der Säule voneinander trennen. Eingesetzt wurden 10 µl einer 20 µM Nukleotid-gebundenen Cdc42-Probe, die bei 95°C für 5 min denaturiert und daraufhin bei 12.000 rpm zentrifugiert wurde. Die Elution erfolgte isokratisch mit einer Flussrate von 1,0 ml/min. Zur Detektion der eluierten Nukleotide wurde ihre Absorption bei einer Wellenlänge von 254 nm aufgenommen. Das Verhältnis der Peakflächen zueinander entsprach dem jeweiligen Anteil der Nukleotide in der Cdc42-Beladung.

Für die quantitative Bestimmung der MBP-CbFic2 E66G Adenylyltransferase-Aktivität wurden 5 µM des Proteins mit 100 µM Histon H3₁₋₂₀ Peptid, 50 µM Koffein (Ladekontrolle) und 5 mM Nukleotid in einem Reaktionspuffer bestehend aus 20 mM Na₂HPO₄/NaH₂PO₄ pH 7,0, 50 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 1 mM DTE, 10% Glycerin bei 15°C inkubiert und Proben zu verschiedenen Zeitpunkten entnommen. Entsprechende Proben wurden unmittelbar nach der Entnahme für 5 min bei 65°C inkubiert, was MBP-CbFic2 E66G inaktivierte und die Adenylylierungs-Reaktion stoppte. Zur Analyse des Modifizierungsgrades der Peptide wurden die Proben auf eine C8-Umkehrphasensäule (Aeris WIDEPOR, 3,6 µm, 250-4.60 mm) (Phenomenex, Torrance, US) aufgetragen und ein Gradient von 5-17% Acetonitril mit 0,1% TFA (5 min 5%, 19 min bis 17%; Waschen und Äquilibrieren: 3 min bis 20%, 6 min 20%, 1 min bis 95%, 6 min 95%) gestartet. Die Elution der Peptide wurde über die UV-Absorption der Adenosinmonophosphat-Modifikation bei einer Wellenlänge von 254 nm detektiert und entsprechende Elutions-*Peaks* mit der LabSolutions Software von Shimadzu ausgewertet. Hierzu wurde die Fläche unter den Peaks integriert, die Werte über den Koffein-*Peak* normiert und anschließend auf die umgesetzte Peptidmenge umgerechnet. Entsprechend erhaltene Werte wurden gegen die Zeit aufgetragen an eine einfach exponentielle Gleichung angepasst. Daraus ergab sich die Geschwindigkeitskonstante (k_{obs}). Der Quotient aus k_{obs} und eingesetzter Enzymmenge entspricht der katalytischen Effizienz (k_{cat}/K_M).

$$A(t) = A_0 + A_T \cdot e^{-k_{obs}/t}$$

Gleichung 3: $A(t)$: Absorptionsintensität in Abhängigkeit der Reaktionszeit; A_0 : Minimale Absorptionsintensität zu Beginn des Experiments; A_T : totale Absorptionsamplitude ($A_{max} - A_0$, mit A_{max} : maximale Absorptionsintensität); k_{obs} : beobachtete Geschwindigkeitskonstante.

6.3.6. Elektrospray-Ionisationsmassenspektrometrie

Zur exakten Bestimmung von Biomolekülmassen wurde die Elektrospray-Ionisationsmassenspektrometrie (ESI-MS) verwendet. Es ist eine hochsensitive Methode, in der die zu untersuchenden Moleküle in Abhängigkeit ihres Masse/Ladungsverhältnisses getrennt und analysiert werden¹⁷³. Die Analytprobe wandert hierbei zunächst durch eine feine Metallkapillare in Richtung eines Hochspannungsfeldes, wo sie ionisiert und mit Hilfe von Stickstoffgas vernebelt wird, bis das Lösungsmittel vollständig verdampft ist und die Moleküle als freie Ionen in der Gasphase in der Ionenquelle detektiert werden¹⁷³.

Die hier analysierten Proben lagen in der Regel in gepufferten, salzhaltigen Lösungen vor und mussten vor der massenspektrometrischen Analyse entsalzt werden. Proteine wurden über 10 μ l-C4-ZipTip® Pipette Tips (Millipore) entsalzt. Hierzu wurden die mit C4-Material enthaltenen Spitzen mit 50% Acetonitril gewaschen und durch zweimaliges Auf- und Abpipettieren mit 0,1% Ameisensäure äquilibriert. Anschließend wurde die Probe durch mehrmaliges Aufziehen auf das C4-Material geladen, zwei Mal mit 0,1% Ameisensäure gewaschen und mit 10 μ l 50% Acetonitril eluiert. Peptide wurden über 10 μ l-C18-ZipTip® Pipette Tips (Millipore) entsalzt. Die Prozedur glich der für die Entsalzung von Proteinen, bis auf die Verwendung von 80% Acetonitril für die Elution des Analyten.

Zur massenspektrometrischen Analyse wurden 5 μ l des Eluats einer LCQ-Fleet (Thermo Fisher Scientific, Waltham, US) zugeführt. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe des Programms Xcalibur® (Thermo Fisher Scientific, Waltham, US) sowie MagTran („The Magic Transformer“), das zur Dekonvolution der Spektren verwendet wurde¹⁷⁴.

6.3.7. Tandem-Massenspektrometrie

Zur Identifizierung der AMP-Modifikationsstelle in Histone H3₁₋₂₀ wurde das Peptid, wie in Abschnitt 6.4.10. beschrieben adenyliert, und an einer Orbitrap Fusion mit einer Nano-Flex Elektrospray Quelle und einem vorgeschalteten Ultimate3000 Nano-HPLC-System (jeweils: Thermo Fisher Scientific, Waltham, US) analysiert. 10 pmol Peptid wurden zunächst über eine 2 cm PepMap RSLC-C18 trap-Säule entsalzt und anschließend über eine 15 cm PepMap RSLC-C18-Säule (beide Säulen: 2 μ m Partikel, 100 Å, 75 μ m innerer Radius; Thermo Fisher Scientific, Waltham, US) getrennt. Der Trennvorgang erfolgte über einen Gradienten von 3-13% Aceto-

nitril, 0.1% Ameisensäure (10 min 3%, 33 min 3-13%, 2 min 13-40%, 0,1 min bis 90%) bei einer Temperatur von 40°C. *Survey scans* (m/z 300-1700) wurden mit einer Auflösung von 120,000 bei einem m/z-Wert von 200 und einer maximalen Injektionszeit von 50 ms durchgeführt (Zielwert: $4 \cdot 10^5$). Die signalintensivsten Ionen mit einer Ladung von 2-7 wurden mit Hochenergie Kollision (HCD) bei einer Kollisionsenergie von 27% fragmentiert (maximale Injektionszeit: 40 ms; Zielwert: $1 \cdot 10^4$). Einfach geladene Reporterionen (m/z: 136.062 (Adenin), 250.09 (Adenosin) oder 348.07 (Phosphoadenosin) dienten als Indikator für die AMP-Modifikation und zur Auswahl der Peptide für eine Refragmentierung mit Elektron Transfer Dissoziation (ETD). Dabei wurden hohe Ladungszustände vor hohen Signalintensitäten priorisiert (maximale Injektionszeit: 40 ms; Zielwert: $1 \cdot 10^4$). Entsprechende Fragmentierungsspektren wurden mit der Xcalibur Software (Version 3.0sp2, Thermo Fisher Scientific, Waltham, US) aufgenommen und anschließend mit der MaxQuant Software (Version 1.5.3.8) analysiert¹⁷⁵. Verwendete Peptidsequenz im Andromeda-Suchmodul: ARTKQTARKSTGGKAPRKQL.

6.3.8. Stable isotope labeling by aminoacids (SILAC)

HEK293T-Zellen wurden aus einer Kultur entnommen, mit 1xPBS gewaschen und in äquivalenten Mengen auf zwei separate Kulturgefäße aufgeteilt. Kulturgefäß A enthielt DMEM-Nährmedium (- Arginin, -Lysin), welches mit isotopenmarkierten L-[¹³C₆, ¹⁵N₄]-Arginin (47,2 µg/ml) und L-[¹³C₆, ¹⁵N₂]-Lysin (79,8 µg/ml) versetzt wurde. Kulturgefäß B war mit DMEM-Nährmedium (- Arginin, -Lysin) mit Zusatz von isotopenmarkierten L-[¹³C₆, ¹⁴N₄]-Arginin (46,3 µg/ml) und L-[²H₄]-Lysin (93,3 µg/ml) befüllt. Die Zellen wurden für 6 Tage bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert (beinhaltete Passagieren an Tag 3 und 5) und anschließend mit GFP-CbFic2-Konstrukten transfiziert. Zellkultur A wurde mit dem konstitutiv aktiven GFP-CbFic2 E66G und Zellkultur B, das als Vergleichsprobe diente, mit GFP-CbFic2 H205A transfiziert. Nach der Transfektion wurden die Zellen für weitere 2 Tage bei 37°C und 5% CO₂ in den entsprechenden isotopenmarkierten Nährmedien kultiviert. Die Zellen wurden anschließend geerntet, in 1x PBS gewaschen und mit RIPA-Puffer (+ 1x Protease-Inhibitor Mix G; Serva, Heidelberg, D) auf Eis für 15 min lysiert. Nach der Zelllyse wurden die unlöslichen Zellbestandteile durch Zentrifugation bei 14.000 rpm pelletiert, der Überstand entnommen und die Proteinkonzentration über das Pierce™ BCA Protein Assay Kit nach Angaben des Herstellers bestimmt. Zelllysate der Kulturen A und B wurden in äquivalenten Gesamtproteinmengen vereint und das Gesamtprotein nach Wessel-Flügge gefällt¹⁷⁶.

Hierzu wurden 150 µl (1,2 mg Protein/ml) einer Probe mit 600 µl Methanol gemischt und für 10 s bei 13000 rpm zentrifugiert. Anschließend wurden 225 µl Chloroform hinzugegeben, gemischt und erneut bei 13000 rpm zentrifugiert. Im nächsten Schritt wurden 450 µl H₂O supplementiert, gemischt und die Lösung im Ultraschallbad für 10 min behandelt. Die Lösung wurde daraufhin für 10 s bei 13000 rpm zentrifugiert, die obere Phase der Lösung verworfen (Protein

in Interphase als Präzipitat), 450 µl Methanol zu der restlichen Lösung hinzugefügt und bei 13000 rpm für 15 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Protein, das durch die Zentrifugation pelletiert wurde, bei offenem Gefäßdeckel getrocknet. Alle Schritte wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Das Proteinpellet wurde anschließend in einer Lösung, bestehend aus 20 mM Hepes pH 7,5, 7M Urea und 2M Thiourea, aufgenommen und für 10 min im Ultraschallbad gelöst. Die Lösung wurde mit 1 mM DTT (finale Konzentration) versetzt, für 45 min bei 37°C und 450 rpm inkubiert, daraufhin mit 5,5 mM Iodacetamid (IAA) (finale Konzentration) versetzt und für weitere 45 min bei Raumtemperatur und 450 rpm im Dunkeln inkubiert. Nicht reagiertes IAA wurde anschließend durch Zugabe von 5 mM DTT (finale Konzentration) für 30 min bei 37°C und 450 rpm gequenched. Der Proteinverdau fand in zwei Schritten statt. Es wurde mittels Lys-C für 4 h und Trypsin für 16 h jeweils in einem Verhältnis von 1:200 (Protease:Protein) bei Raumtemperatur und 450 rpm verdaut. Zum Inaktivieren der Protease wurde die Probe mit TFA in einer finalen Konzentration von 1% vermengt. Die Probe wurde anschließend mit SepPak-C18-Säulen (Waters Corporation, Milford, US) entsalzt, die Proteinlösung lyophilisiert, in 30 µl 0,1% FA gelöst und 1,5 µl davon mittels LC-MS/MS analysiert. Alle SILAC-Proben wurden an einer Orbitrap Fusion mit einem vorgeschalteten Ultimate3000 Nano-HPLC-System über eine Nano-Flex Elektrospray Quelle (jeweils: Thermo Fisher Scientific, Waltham, US) analysiert. Diese wurden zunächst über eine 2 cm PepMap RSLC C18 trap-Säule entsalzt und anschließend über eine 15 cm PepMap RSLC C18 Säule (beide Säulen: 2 µm Partikel, 100 Å, 75 µm innerer Radius; Thermo Fisher Scientific, Waltham, US) getrennt. Der Trennvorgang erfolgte über einen Gradienten von 5-32% Acetonitril, 0,1% Ameisensäure (7 min 5%, 105 min bis 22%, 10 min bis 32%, 10 min bis 90%) bei einer Flussrate von 300 nl/min und einer Temperatur von 50°C. *Survey scans* (m/z 300-1500) wurden mit einer Auflösung von 120,000 bei einem m/z-Wert von 200 und einer maximalen Injektionszeit von 50 ms durchgeführt (Zielwert: $2 \cdot 10^5$). Die signalintensivsten Ionen mit einer Ladung von 2-7 wurden mit Hochenergie Kollision (HCD) bei einer Kollisionsenergie von 30% fragmentiert (maximale Injektionszeit: 35 ms; Zielwert: $1 \cdot 10^4$). Der dynamische Ausschluss von sequenzierten Peptiden wurde auf 60s gesetzt. Entsprechende Fragmentierungsspektren wurden mit der Xcalibur Software (Version 3.0sp2, Thermo Scientific) aufgenommen und anschließend mit der MaxQuant Software (Version 1.5.3.8) analysiert¹⁷⁵. Die MS/MS-basierte Peptid-Identifizierung erfolgte über einen Abgleich mit der Homo sapiens UniProtKB im Andromeda-Suchmodul. Ein inverser Datensatz der Proteinsequenzen wurde zur Bestimmung von FDR (*false discovery rate*)-Werten automatisch von MaxQuant generiert. Parameter wurden wie folgt gesetzt: Peptid und Protein FDR: 1%, Enzymspezifität: Trypsin, Minimale Anzahl der Aminosäuren für die Peptid-Identifizierung: 7, variable Modifikationen: Acetylierung (N-terminus) und Methionin-Oxidation, feste Modifikationen: Carbamidomethylierung. Für die Identifizierung von Proteinen waren mindestens zwei Peptide erforderlich. Alle anderen Parameter wurden entsprechend der Stan-

dardeinstellungen gewählt. Statistische Analysen erfolgten mit der Software Perseus als Teil des MaxQuant-Programms¹⁷⁵. Berücksichtigt wurden nur Proteine, die in mindestens zwei Replikaten quantifiziert wurden. Fehlende Werte wurden über die Normalverteilung (Weite: 0,3; Veränderung: 1,8) berechnet und *Volcano plots* auf der Basis eines Einstichproben-t-Tests (zwei Seiten, Benjamini-Hochberg, FDR 0,05) erstellt.

6.4. Biochemische Methoden

6.4.1. Heterologe Expression

Der Begriff heterologe Expression beschreibt die Expression eines Gens, folglich die Synthese eines Proteins in einem fremden Organismus¹⁷⁷. Dieses Verfahren wird insbesondere für die übermäßige Produktion eines rekombinanten Proteins in einem leicht zu kultivierendem und schnell wachsendem Wirt, wie dem *E. coli*-Bakterium, genutzt. Das ist vor allem dann wissenschaftlich attraktiv, wenn das zu untersuchende Protein in seinem natürlichen Vorkommen nur in geringen Mengen verfügbar ist und sich mit gängigen Methoden schwer isolieren lässt. So wurden die hier untersuchten Proteine in genoptimierten *E. coli*-Expressionsstämmen des Typs BL21 (DE3) (MBP-CbFic2, LpFic, GST-H3) oder BL21 (DE3) RIL (Cdc42) hergestellt. Zur Stimulierung der Genexpression wird das starke T7-Expressionssystem genutzt, das ihren Ursprung im T7-Phagen hat und mittlerweile zur Standardausstattung diverser kommerziell erhältlicher Vektoren bzw. kompetenter Bakterien gehört. Hierbei ist die T7-Polymerase in Kombination mit dem lacUV5 -Promotor, der durch Laktose reguliert wird, im Genom des Wirts verankert. Das zu untersuchende Gen wird in einem geeigneten Vektor mit T7-Promotor in das Bakterium eingebracht und kann indirekt über die Zugabe der Laktose bzw. dem Analogon Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG) exprimiert werden.

Hierzu wurden zunächst 1,5 l LB-Nährmedium mit entsprechenden Selektionsantibiotika im Erlenmeyerkolben mit einer Starterkultur bis zu einer optischen Dichte (OD_{600}) von ca. 0.05 inokuliert. Die Hauptkultur wurde bei 37°C und 180 rpm bis zu einer OD_{600} von 0,6 – 0,8 inkubiert und anschließend bei 4°C für 15 min runtergekühlt. Nach Zugabe von IPTG zu einer finalen Konzentration von 0.25 mM und der Induktion der Genexpression wurde die Kultur für den gewünschten Zeitraum bei 20°C und 180 rpm inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen durch Zentrifugation bei 5100 rpm geerntet, in PBS-Puffer durch Resuspension gewaschen und erneut bei 8000 rpm sedimentiert. Die Zellen wurden hieran zur Proteinisolation aufgeschlossen oder in Flüssigstickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

6.4.2. *E. coli*-Zellaufschluss

Um rekombinante Proteine aus Bakterien isolieren und reinigen zu können, ist es zunächst erforderlich, die schützende Zellwand der Zellen aufzubrechen. Hierfür existieren verschiedene mechanische und chemische Methoden. In dieser Arbeit wurde der Zellaufschluss von *E. coli*

Zellen an einer French Press (Constant Cell disruption systems, Merck Millipore, Cork, IRL) bei 1,8 kbar und 12-16°C Systemtemperatur durchgeführt. Zuvor wurden die Zellen in Lysepuffer im Verhältnis 1:5 (g/ml) an einem Zellhomogenisator (Silent Crusher M, Heidolph, Schwabach, D) resuspendiert und vereinzelt, um Verstopfungen des Systems zu vermeiden. Das Lysat wurde unmittelbar nach dem Zellaufschluss auf Eis gestellt, mit 1 mM Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) Proteaseinhibitor und bei Bedarf mit DNase I versetzt. Durch Zentrifugation bei 20000 rpm und 4°C wurden hieran die löslichen Bestandteile von den unlöslichen bzw. ausgefallenen Bestandteilen der Zelle und den Zelltrümmern getrennt. Der resultierende geklärte Überstand wurde über einen Filter mit 0,45 µm Porengröße filtriert, um restliche Schwebepartikel zu entfernen, und anschließend auf eine Chromatographiesäule zur Proteinisolation und Reinigung geladen.

6.4.3. Reinigung über immobilized metal ion affinity chromatography (IMAC)

Bei der *immobilized metal ion affinity chromatography* wird die Affinität von zweiwertigen Metallionen wie Cu^{2+} , Ni^{2+} und Co^{2+} zu Histidin- und Cystein-Restenzur Immobilisierung von Protein in wässrigen Lösungen genutzt¹⁷⁹. Die Metallionen werden hierbei über einen chelatierenden Liganden an das Säulenmaterial fixiert. In dieser Arbeit wurden die Proteine CbFic2₁₋₃₀₀, LpFic und Cdc42, ausgestattet mit einem Polyhistidin-Affinitätsanker, über eine Nickel-Nitrilotriessigsäure-Säule (Ni-NTA) gereinigt. Für diesen Zweck wurde eine 5 ml HiTrap™-Säule (GE, Uppsala, S) mit Ni^{2+} -Ionen aus einer NiSO_4 -Lösung beladen und mit Lysepuffer äquilibriert. Die Proteinlösung wurde auf die Säule aufgetragen und anschließend mit 10-20 Säulenvolumen Lysepuffer gewaschen. Nach einem zweiten Waschschriff mit 20 mM Imidazol im Lysepuffer zur Entfernung unspezifisch gebundener Proteine wurde mit einem linearen Gradienten von 20-500 mM Imidazol das Protein in 5 ml-Fractionen eluiert, wobei die Absorption bei 280 nm zur Detektion des Proteins aufgenommen wurde. Alle Schritte wurden an einer Äkta Prime (GE, Uppsala, S) bei einer Flussrate von 4 ml/min bei 4°C durchgeführt. Im Anschluss an den ersten Schritt der Reinigung wurden proteinenthaltende Fractionen mittels SDS-PAGE (s. 6.3.3.) analysiert und reine Fractionen vereint. Zur Entfernung des Imidazols und der Reduzierung des Salzgehalts wurde die Proteinlösung über Nacht bei 4°C dialysiert (s. 6.4.7.). Zeitgleich wurde durch Zugabe der TEV-Protease der Polyhistidin-Tag über eine TEV-Schnittstelle zwischen Tag und dem Protein abgespalten. Am nächsten Tag wurde die Proteinlösung auf eine mit frischem Dialysepuffer äquilibrierte HiTrap™-Säule geladen und so der freie Polyhistidin-Tag vom Protein, das sich im Durchfluss anreicherte, separiert. Die finale Reinigung erfolgte nach Konzentrierung der Proteinlösung über eine Gelfiltration (s. 6.4.9.).

Tabelle 17: Aufführung der für die Reinigung von His₆-Tag ausgestatteten Proteine verwendeten Puffer.

Protein	Puffer
CbFic2 ₁₋₃₀₀	Lysepuffer: 50 mM Hepes pH 7,5, 500 mM NaCl, 1 mM MgCl ₂ , 1 mM β-Mercaptoethanol, 10% Glycerin Dialysepuffer: 20 mM Hepes pH 7,5, 100 mM NaCl, 1 mM β-Mercaptoethanol, 1 mM MgCl ₂ , 10% Glycerin Gelfiltrationspuffer: 20 mM Hepes pH 7,5, 50 mM NaCl, 1 mM MgCl ₂ , 1 mM DTE, 10% Glycerin
LpFic	Lysepuffer: 50 mM Natriumcitrat, pH 6,2, 500 mM NaCl, 1 mM MgCl ₂ , 1 mM β-Mercaptoethanol, 50 μM ATP, 10% Glycerin Dialysepuffer: 20 mM Natriumcitrat pH 6,2, 200 mM NaCl, 1 mM β-Mercaptoethanol, 1 mM MgCl ₂ , 50 μM ATP, 10% Glycerin Gelfiltrationspuffer: 20 mM Natriumcitrat pH 6,2, 100 mM NaCl, 1 mM MgCl ₂ , 1 mM DTE, 10 μM ATP, 10% Glycerin
Cdc42	Lysepuffer: 50 mM Hepes pH 7,5, 500 mM NaCl, 1 mM MgCl ₂ , 1 mM β-Mercaptoethanol, 10 μM GDP Dialysepuffer: 20 mM Hepes pH 7,5, 100 mM NaCl, 1 mM β-Mercaptoethanol, 1 mM MgCl ₂ , 10 μM GDP Gelfiltrationspuffer: 20 mM Hepes pH 7,5, 50 mM NaCl, 1 mM MgCl ₂ , 1 mM DTE, 10 μM GDP

6.4.4. Reinigung von MBP-Proteinfusionskonstrukten

Maltose binding protein (MBP) ist ein ca. 42 kDa großes Protein, das in Bakterien eine wichtige Rolle im Transport und Katabolismus von Oligosacchariden einnimmt¹⁷⁸. Durch seine besondere Stabilität und Löslichkeit hat es als biomolekulares Werkzeug in der Herstellung von rekombinanten Proteinen an Bedeutung gewonnen^{180;181}. Es kann als Löslichkeits-Tag verwendet werden, da es zum einen schwer lösliche Proteine in Lösung hält und zum anderen durch seine hohe Affinität zu Amylose als Affinitätsanker in entsprechenden Säulen fungiert¹⁸¹.

Das hier untersuchte CbFic2 wurde als MBP-Fusionskonstrukt aufgrund seiner geringen Löslichkeit exprimiert und gereinigt. Hierzu wurde eine MBPTrapTM-Säule (GE, Uppsala, S) mit Lysepuffer äquilibriert, mit der Proteinlösung bei einer Flussrate von 2 ml/min beladen und anschließend mit 20 Säulenvolumen bei 5 ml/min gewaschen. Die Elution erfolgte isokratisch mit 10 mM Maltose im Lysepuffer, Flussrate 5 ml/min. Zur Detektion des Proteins wurde die Absorption bei 280 nm aufgenommen. Alle Schritte wurden an einer Äkta Prime (GE, Uppsala, S) bei 4°C durchgeführt. Im Anschluss an den ersten Schritt der Reinigung wurden proteinenthaltende Fraktionen mittels SDS-PAGE (s. 6.3.3.) analysiert und reine Fraktionen vereint. Zur Entfernung der Maltose und der Reduzierung des Salzgehalts wurde die Proteinlösung über Nacht bei 4°C dialysiert (s. 6.4.7.). Die finale Reinigung erfolgte nach Konzentrierung der Proteinlösung über eine Gelfiltration (s. 6.4.9.).

Tabelle 18: Aufführung der für die Reinigung von MBP-Tag ausgestatteten Proteine verwendeten Puffer.

Protein	Puffer
MBP-CbFic2	Lysepuffer: 50 mM Na ₂ HPO ₄ /NaH ₂ PO ₄ pH 7,0, 500 mM NaCl, 1 mM MgCl ₂ ,
MBP-CbFic2 ₁₋₃₀₀	1 mM β-Mercaptoethanol, 10% Glycerin Dialysepuffer: 20 mM Na ₂ HPO ₄ /NaH ₂ PO ₄ pH 7,0, 200 mM NaCl, 1 mM MgCl ₂ , 1 mM β-Mercaptoethanol, 10% Glycerin Gelfiltrationspuffer: 20 mM Na ₂ HPO ₄ /NaH ₂ PO ₄ pH 7,0, 100 mM NaCl, 1 mM MgCl ₂ , 1 mM DTE, 10% Glycerin

6.4.6. Reinigung von GST-Fusionskonstrukten

Glutathion-S-Transferase (GST) ist ein etwa 26 kDa großes Protein, das in der Molekularbiologie als Löslichkeits-Tag verwendet wird und in dieser Arbeit als Trägerprotein für Histon H3-Peptide eingesetzt wurde. Zur Reinigung dieser GST-Histon H3-Fusionskonstrukte wurde eine GSHTrapTM-Säule (GE, Uppsala, S) mit Lysepuffer äquilibriert, mit der Proteinlösung bei einer Flussrate von 2 ml/min beladen und anschließend mit 20 Säulenvolumen bei 4 ml/min gewaschen. Die Elution erfolgte isokratisch mit 20 mM Glutathion im Lysepuffer bei einer Flussrate von 4 ml/min. Zur Detektion des Proteins wurde die Absorption bei 280 nm aufgenommen. Alle Schritte wurden an einer Äkta Prime (GE, Uppsala, S) bei 4°C durchgeführt. Im Anschluss an den ersten Schritt der Reinigung wurden proteinenthaltende Fraktionen mittels SDS-PAGE (s. 6.3.3.) analysiert und reine Fraktionen vereint. Zur Entfernung des Glutathions und der Reduzierung des Salzgehalts wurde die Proteinlösung über Nacht bei 4°C dialysiert (s. 6.4.7.). Die finale Reinigung erfolgte nach Konzentrierung der Proteinlösung über eine Gelfiltration (s. 6.4.9.).

Tabelle 19: Aufführung der für die Reinigung von GST-Tag ausgestatteten Proteine verwendeten Puffer.

Protein	Puffer
GST-H3 ₁₋₂₀	Lysepuffer: 50 mM Hepes pH 7,5, 500 mM NaCl, 1 mM β-Mercaptoethanol
GST-H3 ₂₁₋₃₅	Dialysepuffer: 20 mM Hepes pH 7,5, 200 mM NaCl, 1 mM β-Mercaptoethanol Gelfiltrationspuffer: 20 mM Hepes pH 7,5, 100 mM NaCl, 1 mM DTE

6.4.7. Dialyse

Der langsame Austausch von Pufferlösungen erfolgte über eine semipermeable Membran mit einer Molekulargewichts-Ausschlussgrenze von 12.000-15.000 kDa. Größere Volumina wurden über einen Dialyseschlauch (Serva, Heidelberg, D) dialysiert, Volumina unter 3 ml über eine Slyde-A-Lyzer-Dialysekassette (Thermo Scientific, Waltham, US). Proteine (max. 100 ml Lösung), die über eine Nickelchelatsäule gereinigt wurden, sind über Nacht zum Entfernen des Imidazols in 5 l Dialysepuffer dialysiert worden. Zeitgleich wurde der Polyhistidin-Tag über eine

TEV-Protease-Schnittstelle zwischen His₆-Tag und dem Protein proteolytisch abgespalten. Proteine, die über eine MBP-Trap Säule oder GSH-Trap Säule gereinigt wurden, sind über Nacht in 3 l Dialysepuffer dialysiert worden.

6.4.8. Konzentration von Proteinen

Zur Einengung und Konzentrierung von Proteinlösungen wurden Amicon Ultra (Merck Millipore, Cork, IRL) Zentrifugalkonzentratoren bei 4°C und 4000 rpm verwendet. Kleinere Volumina bis ca. 2 ml wurden in Spin-X UF Zentrifugalkonzentratoren (Corning, Lowell, MA, USA) bei 4°C und 10000 rpm konzentriert. Alle Konzentratoren wurden vor der Verwendung zunächst durch einen Zentrifugationslauf mit einer Füllung ddH₂O gewaschen.

6.4.9. Präparative Größenausschlusschromatographie

Die Größenausschlusschromatographie, auch als Gelfiltration bekannt, ist eine Methode zur Trennung von Proteinen nach ihrem hydrodynamischen Volumen¹⁸². Ein poröses Granulat sorgt hierbei für den Trennungseffekt. Das Prinzip ist simpel: Kleine Moleküle sind in der Lage, in die Poren des Säulenmaterials zu diffundieren, was sie länger auf der Säule zurückhält. Große Moleküle sind nur begrenzt oder gar nicht fähig, in die Poren einzudringen, wodurch sie zügiger eluiert werden¹⁸².

Die Größenausschlusschromatographie wurde generell für die Reinigung jedes Proteins in dieser Arbeit als finaler Reinigungsschritt verwendet. Hierzu wurden Superdex 16/60 Säulen (GE, Uppsala, S) mit dem Trennungsgrad 75 pg (*prep grade*) für Proteine kleiner als 70 kDa und 200 pg (*prep grade*) für Proteine größer als 70 kDa eingesetzt. Die Säulen wurden zunächst mit 150 ml des gewünschten Puffers äquilibriert bevor das zu reinigende Protein mit einem Volumen von 2-5 ml über eine Ladeschleife aufgetragen wurde. Alle Gelfiltrationsläufe wurden bei 4°C und einer Laufgeschwindigkeit von 1,5 ml/min an einer Äkta Prime (GE, Uppsala, S) durchgeführt. Das Eluat wurde in 2 ml Fraktionen aufgefangen, proteinhaltige Fraktionen über SDS-PAGE analysiert und abhängig vom Reinheitsgrad vereinigt.

6.4.10. Adenylierung von Histon H3 und Peptiden

Die Adenylierung von Histon H3 sowie entsprechenden N-terminalen Peptiden durch CbFic2 erfolgte in 20 mM Natriumphosphatpuffer bei einem pH von 7,0. Weitere Pufferlösungskomponenten waren 100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 1 mM DTE und 10% Glycerin. Zu 100 µM Peptid wurden 2,5 mM ATP und 5 µM MBP-CbFic2 hinzugefügt. Anschließend wurde für mindestens 6 h bei 15°C inkubiert. Der Adenylierungsgrad wurde über eine Elektrospray-Ionisationsmassenspektrometrie, wie in 6.3.6. beschrieben, kontrolliert.

6.4.11. Adenylylierung von Cdc42

Die Adenylylierung von Cdc42 (alle Varianten mit inbegriffen) durch LpFic erfolgte in 20 mM Natriumphosphatpuffer bei einem pH von 7,0. Weitere Pufferlösungskomponenten waren 100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 1 mM DTE und 10% Glycerin. Zu 100 µM Cdc42 wurden 2,5 mM ATP und 5 µM LpFic E66G hinzugefügt. Anschließend wurde für ca. 14 Stunden bei 25°C inkubiert. Der Adenylylierungsgrad wurde über eine Elektrospray-Ionisationsmassenspektrometrie, wie in 6.3.6. beschrieben, kontrolliert.

6.4.12. Präparation von dsOligonukleotiden

Zur Herstellung eines Oligonukleotid-Doppelstranges wurden komplementäre Oligonukleotide (in ddH₂O gelöst; 100 µM) in einem Verhältnis von 1:1 gemischt, bei 80°C für 2 min erhitzt und anschließend in einem Metallblock bei Raumluft abgekühlt. Sowohl für die in Abschnitt 3.2.2.4. dargestellten AUZ-Experimente als auch zur Bestimmung der Adenylylierungsaktivität von MBP-CbFic2 in Abhängigkeit einer DNA-Bindung (Abschnitt 3.2.2.4.) wurde eine randomisierte Sequenz (5`-AGTTTAGTGCCTAATCTGA-3`) mit einem festen GC-Gehalt von 40% verwendet. Die Oligonukleotide wurden von Sigma Aldrich (St. Louis, US) mit einer Fluoreszeinmarkierung am 5`-Ende des Vorwärtsstranges bezogen.

6.5. Biophysikalische Methoden

6.5.1. Differential Scanning Fluorometry

Differential Scanning Fluorometry, auch als *Thermal Shift Assay* bekannt, ist eine Messmethode zur Bestimmung der Schmelztemperatur eines Proteins in Lösung unter variierenden Bedingungen bzw. in Gegenwart unterschiedlicher Substanzen oder Liganden. Benötigt wird hierzu der fluoreszente Farbstoffe SYPRO Orange oder 8-Anilino-naphthalin-1-sulfonsäure (ANS). Die Moleküle werden in Wasser gequench und binden nach Entfaltung des zu untersuchenden Proteins an exponierte, hydrophobe Regionen, wodurch dem Quenching-Effekt entgegengewirkt wird und die Fluoreszenzemission ansteigt.

In dieser Arbeit wurde der *Thermal Shift Assay* zur Untersuchung der Nukleotidbindungsspezifität von Fic-Proteinen sowie zur Bestimmung entsprechender Bindungsaffinitäten eingesetzt. Die Probenvorbereitung fand stets auf Eis statt. Es wurde eine 0,1 mg/ml Proteinlösung in entsprechendem Lagerpuffer mit 5x SYPRO Orange (Sigma Aldrich, Steinheim, D) hergestellt und jeweils 19 µl in die Kavität einer 96-well PCR Platte (Sarstedt, Nümbrecht, D) pipettiert. Hinzugefügt wurde 1 µl Nukleotidlösung (finale Konzentration: 0,5 mM (qualitative Untersuchung); 0,1-10 mM (quantitative Analyse)) und behutsam vermischt. Die 96-well Platte wurde mit einer lichtdurchlässigen Folie versiegelt und die Proben in einen *realtime PCR cyler* Mx3000P (Agilent Technologies, Waldbronn, D) analysiert. Die Messung der SYPRO Orange Emission

erfolgte bei einer Wellenlänge von 610 nm und einen Temperaturgradienten von 25°C bis 95°C mit einem Anstieg von 1°C/min. Alle Proben wurden in dreifacher Ausführung angesetzt und gemessen. Der Schmelzpunkt T_M wurde über den Wendepunkt entsprechender Schmelzkurven ermittelt. Bezüglich der quantitativen Messungen wurde zur Bestimmung der Dissoziationskonstante K_D die eingesetzte Nukleotidkonzentration gegen die Differenz der Schmelzpunkte von Probe und Referenz ΔT_M aufgetragen und an eine hyperbole Gleichung angepasst:

$$\Delta T_M = \Delta T_{M,max} \frac{[NTP]_T}{K_D + [NTP]_T}$$

Gleichung 4: $\Delta T_{M,max}$: maximaler T_M , $[NTP]_T$: totale Nukleotid Konzentration

6.5.2. Analytische Ultrazentrifugation

Die analytische Ultrazentrifugation wurde zur quantitativen Analyse der MBP-CbFic2-DNA-Bindung verwendet. MBP-CbFic2 (Nukleinsäure-befreit) wurde in verschiedenen Konzentrationen (0,1-2 μM) mit einer konstanten Menge eines randomisierten 20Bp-dsOligonukleotids (0,2 μM ; Fluoreszein-markiert) (siehe 6.4.12.) inkubiert und anschließend einem Sedimentationsgeschwindigkeitsexperiment zugeführt. Die Messungen erfolgten in einer Beckman XL-A analytischen Ultrazentrifuge, ausgestattet mit einem Ti50-Rotor (jeweils: Beckmann Coulter, Brea, US) und einem Aviv AU-FDS-Fluoreszenzdetektor (Avic Biomedical inc., Lakewood, US) bei 42000 rpm und 20°C. Fluoreszenz-Scans wurden in 90 s Intervallen bei einer Exzitationswellenlänge von 488 nm aufgenommen und anschließend, wie durch *Stafford* beschrieben, ausgewertet (Subtraktion benachbarter Scans und Konvertierung in $\Delta c/\Delta t$ -Auftragungen)¹⁰³. Die daraus erhaltenen Fluoreszenz-Peaks wurden mittels der OriginPro Software (OriginLab Corporation, Northampton, USA) an eine Gauß-Funktion angepasst und die entsprechenden Amplituden des freien Oligonukleotids gegen die eingesetzte MBP-CbFic2 Konzentration aufgetragen. Aufgrund des nahezu linearen Verlaufs der Bindungskurve erfolgte die Anpassung der Werte an eine quadratische Bindungsisotherme. Dies erlaubte eine Abschätzung der Dissoziationskonstante K_D .

$$F = F_{min} + (F_{max} - F_{min}) \cdot \frac{(P_T + D_T + K_D) - \sqrt{(P_T + D_T + K_D)^2 - 4D_T P_T}}{2D_T}$$

Gleichung 5: F: Fluoreszenz $\Delta c/\Delta t$ in Abhängigkeit der totalen CbFic2 Konzentration (P_T); $F_{min/max}$: totale Fluoreszenz $\Delta c/\Delta t$; P_T : totale CbFic2 Protein Konzentration; D_T : totale dsDNA Konzentration; K_D : Dissoziationskonstante.

6.6. Zellbiologische Methoden

Ein wesentlicher Teil der hier durchgeführten Untersuchungen erfolgte auf zellbiologischer Ebene mit Hilfe von Säugetier-Zellkulturen. Für intrazelluläre Lokalisationsstudien wurden Cos1-Zellen gewählt. Dabei handelt es sich um eine Fibroblasten-Zelllinie, die ursprünglich aus dem Nierengewebe von grünen Meereskatzen gewonnen wurde. Für Immunoblotanalysen mit α -AMP-Antikörpern sowie für SILAC Experimente dienten HEK293T-Zellen, eine menschliche embryonale Nieren-Zelllinie. Beide Zelllinien wurden in DMEM (*Dulbeccos Modified Eagle's Medium*) (AQmedia™; Sigma Aldrich, St. Louis, US) mit 10% fötalem Kälberserum bei 37°C und 5% CO₂ in einer mit Wasserdampf gesättigten Atmosphäre im Brutschrank kultiviert.

6.6.1. Subkultivieren / Passagieren

Erreichen adhärente Zellkulturen Konfluenz, das heißt eine Bedeckung der vollständigen Wachstumsfläche, so muss in der Regel ein Teil der Zellen verdünnt und vereinzelt in ein neues Kulturgefäß überführt werden. Dies verhindert zum einen die Verlangsamung der Teilungsrates und zum anderen ein mögliches Absterben der Zellkultur. In dieser Arbeit wurden HEK293T- und Cos1-Zellen alle 3 Tage in 25 cm² Kulturgefäße (Sarstedt, Nümbrecht, D) subkultiviert. Hierzu wurde zunächst das alte Medium entfernt und der Zellrasen mit 1xPBS (Sigma Aldrich, St. Louis, US) durch Beschichten und Entfernen der Lösung gewaschen. Mit 0,75 ml Trypsin/EDTA-Lösung (Sigma Aldrich, St. Louis, US) wurden die Zellen von der Wachstumsoberfläche gelöst, wobei Cos1-Zellen für diesen Schritt für 3 min bei 37 C inkubiert und die HEK293T-Zellen unmittelbar nach Zugabe der Protease weiterverarbeitet wurden. Durch Klopfen an die Gefäßwände wurde das Abheften der Zellen und Suspendieren erleichtert. Die Zugabe von 5 ml frischem Medium führte zur Inaktivierung der Trypsin-Protease. 0,5 ml dieser Zelllösung wurden nach Vereinzeln durch langsames Auf- und Abpipettieren in ein neues Kulturgefäß mit 5 ml frischem Medium überführt.

6.6.2. Fixierung und Permeabilisierung von Zellen

Die Zellmembran ist für Proteine, Nucleinsäuren und geladene Moleküle aufgrund der Wechselwirkung mit der Ladung der Phospholipide in der Regel nicht passierbar. Um den intrazellulären Raum von Säugetierzellen dennoch für Antikörper und Färbereagenzien zugänglich zu machen, besteht die Möglichkeit, diese durch Quervernetzung der Biomoleküle zu fixieren und teilweise Auflösung der Zellmembran zu permeabilisieren. In dieser Arbeit wurden Zellen mit Formaldehyd, das mit freien Aminen in der Zelle reagiert, fixiert und mit dem nichtionischen Tensid Triton-X-100 permeabilisiert. Die Zellen wurden zweimal in 1x PBS gewaschen und mit 4% Paraformaldehyd überschichtet. Nach 10 min Inkubation auf Eis wurde das Paraformaldehyd entfernt und die Zellen weitere dreimal mit 1x PBS gewaschen.

Mit einer 0,5% Triton-X-100 Lösung wurden die Zellen für 15 min bei Raumtemperatur permeabilisiert und anschließend erneut dreimal gewaschen.

6.6.3. Transiente Transfektion

Bei der Transfektion wird DNA sowie RNA aus heterologem Ursprung in eukaryotische Zellen eingebracht. Die transiente Transfektion von Cos1-Zellen erfolgte in dieser Arbeit mit dem Lipid-basierten Transfektionsreagenz Torpedo[®] (Ibidi, Martinsried, D). HEK 293T-Zellen wurden mit dem Polymer-basierten Reagenz Genecellin (BioCellChallenge, Signes, F) transfiziert. In beiden Fällen erfolgte die Prozedur gemäß der Vorgaben der Hersteller unter Beachtung der empfohlenen Mengenangaben. Zur Verdünnung der Plasmid-DNA wurde Serum-freies Opti-MEM[®] (Thermo Fisher Scientific, Waltham, US) verwendet.

6.6.4. Zellkern Färbung

Zur Gegenfärbung von Zellkernen wurde der fluoreszente und zelldurchlässige Farbstoff Hoechst-33342 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, US) verwendet. Hoechst -33342 lagert sich wie 4,6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) an doppelsträngige DNA an und emittiert im blauen Spektralbereich. Der fluoreszente Farbstoff wurde in einer Konzentration von 1 µg/ml in 1x PBS eingesetzt. Hierzu wurde die Hoechst 33342-Lösung frisch angesetzt und die Zellen damit überschichtet. Nach 10 min Inkubation wurde die Färbelösung entfernt und die Zellen dreimal mit 1x PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mikroskopisch untersucht.

6.6.5. Aktin-Zytoskelett Färbung

Die Gegenfärbung von Aktin-Filamenten erfolgte über das Cyclopeptid Phalloidin. Verwendet wurde das Konjugat CFTM594-Phalloidin (Biotium, Fremont, US), das ein Absorptions- und Emissionsmaximum von 593 nm und 614 nm aufweist und somit vergleichbar mit Alexa Fluor[®] und Texas-Red ist. Gemäß den Vorgaben des Herstellers wurde eine Stammlösung von 200 U/ml in ddH₂O hergestellt und 5 µl davon in 200 µl 1x PBS zur Färbung von fixierten Zellen verdünnt. Die mit Formaldehyd (siehe 6.6.2.) fixierten Zellen wurden für 20 min bei Raumtemperatur mit der Phalloidin-Verdünnung überschichtet und anschließend 3-mal mit 1x PBS gewaschen.

6.6.6. Mikroskopie

Jegliche mikroskopische Aufnahmen wurden an einem Leica Dmi8 Mikroskop unter Verwendung der LAS X-Software (Leica microsystems, Wetzlar, D) durchgeführt. Entsprechende Zellen wurden hierfür auf Objektträgern mit aufgesetzten Kammern kultiviert (µ-slide; Ibidi, Martinsried, D), wie in Abschnitt 6.6.3. beschrieben transfiziert und in Phenolrot-freiem Nährmedium mikroskopiert. Alle in dieser Arbeit präsentierten Mikroskopieaufnahmen wurden, insofern nicht an-

ders angegeben, mit einem 100x Vergrößerungsobjektiv erstellt. Die Fluoreszenz von GFP markierten Proteinen wurde im GFP-Kanal (Ex.: 450-490, DC: 495, Em.: 500-550), Hoechst 33342 angefärbte Zellkerne im DAPI-Kanal (Ex.: 325-375, DC:400, Em.: 435-485) und Fluorophore des roten Spektralbereiches (CFTM594, mCherry) im Texas Red-Kanal (Ex.: 540-580, DC: 585, Em.: 592-668) aufgenommen.

6.6.7. Bestimmung der Zellzahl

Die Zellzahl einer Kultur wurde an einem Countess[®] II FI (Thermo Fisher Scientific, Waltham, US) unter Verwendung der Countes[®] *Counting Chamber slides* automatisch bestimmt. Dafür wurden 10 µl einer Zellsuspension mit 10 µl Trypanblau vermengt, was die simultane Zählung der toten Zellen ermöglichte.

7. Literaturverzeichnis

1. Prabakaran, S., Lippens, G., Steen, H. & Gunawardena, J. (2012). Post-translational modification: nature's escape from genetic imprisonment and the basis for dynamic information encoding. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med* **4**, 565-83.
2. Beltrao, P., Bork, P., Krogan, N. J. & van Noort, V. (2013). Evolution and functional cross-talk of protein post-translational modifications. *Mol Syst Biol* **9**, 714.
3. Duan, G. & Walther, D. (2015). The roles of post-translational modifications in the context of protein interaction networks. *PLoS Comput Biol* **11**, e1004049.
4. Traut, T. W. (1994). Physiological concentrations of purines and pyrimidines. *Mol Cell Biochem* **140**, 1-22.
5. Hedberg, C. & Itzen, A. (2015). Molecular perspectives on protein adenylylation. *ACS Chem Biol* **10**, 12-21.
6. Kinch, L. N., Yarbrough, M. L., Orth, K. & Grishin, N. V. (2009). Fido, a novel AMPylation domain common to Fic, Doc, and AvrB. *PLoS One* **4**, e5818.
7. Kajander, T., Kellosalo, J. & Goldman, A. (2013). Inorganic pyrophosphatases: one substrate, three mechanisms. *FEBS Lett* **587**, 1863-9.
8. Kingdon, H. S., Shapiro, B. M. & Stadtman, E. R. (1967). Regulation of glutamine synthetase. 8. ATP: glutamine synthetase adenylyltransferase, an enzyme that catalyzes alterations in the regulatory properties of glutamine synthetase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **58**, 1703-10.
9. Yarbrough, M. L., Li, Y., Kinch, L. N., Grishin, N. V., Ball, H. L. & Orth, K. (2009). AMPylation of Rho GTPases by Vibrio VopS disrupts effector binding and downstream signaling. *Science* **323**, 269-72.
10. Utsumi, R., Nakamoto, Y., Kawamukai, M., Himeno, M. & Komano, T. (1982). Involvement of cyclic AMP and its receptor protein in filamentation of an Escherichia coli fic mutant. *J Bacteriol* **151**, 807-12.
11. Utsumi, R., Tanabe, H., Nakamoto, Y., Kawamukai, M., Sakai, H., Himeno, M., Komano, T. & Hirota, Y. (1981). Inhibitory effect of adenosine 3',5'-phosphate on cell division of Escherichia coli K-12 mutant derivatives. *J Bacteriol* **147**, 1105-9.
12. Casselli, T., Lynch, T., Southward, C. M., Jones, B. W. & DeVinney, R. (2008). Vibrio parahaemolyticus inhibition of Rho family GTPase activation requires a functional chromosome I type III secretion system. *Infect and Immun* **76**, 2202-11.
13. Jaffe, A. B. & Hall, A. (2005). Rho GTPases: biochemistry and biology. *Annu Rev Cell Dev Biol* **21**, 247-69.

14. Worby, C. A., Mattoo, S., Kruger, R. P., Corbeil, L. B., Koller, A., Mendez, J. C., Zekarias, B., Lazar, C. & Dixon, J. E. (2009). The Fic Domain: Regulation of Cell Signaling by Adenylation. *Mol Cell* **34**, 93-103.
15. Harms, A., Stanger, F. V. & Dehio, C. (2016). Biological Diversity and Molecular Plasticity of FIC Domain Proteins. *Annu Rev Microbiol* **70**, 341-60.
16. Mukherjee, S., Liu, X., Arasaki, K., McDonough, J., Galan, J. E. & Roy, C. R. (2011). Modulation of Rab GTPase function by a protein phosphocholine transferase. *Nature* **477**, 103-6.
17. Pan, X., Luhrmann, A., Satoh, A., Laskowski-Arce, M. A. & Roy, C. R. (2008). Ankyrin repeat proteins comprise a diverse family of bacterial type IV effectors. *Science* **320**, 1651-4.
18. Feng, F., Yang, F., Rong, W., Wu, X., Zhang, J., Chen, S., He, C. & Zhou, J. M. (2012). A *Xanthomonas* uridine 5'-monophosphate transferase inhibits plant immune kinases. *Nature* **485**, 114-8.
19. Jones, J. D. & Dangl, J. L. (2006). The plant immune system. *Nature* **444**, 323-9.
20. Liu, J., Elmore, J. M., Lin, Z. J. & Coaker, G. (2011). A receptor-like cytoplasmic kinase phosphorylates the host target RIN4, leading to the activation of a plant innate immune receptor. *Cell Host Microbe* **9**, 137-46.
21. Lu, D., Wu, S., Gao, X., Zhang, Y., Shan, L. & He, P. (2010). A receptor-like cytoplasmic kinase, BIK1, associates with a flagellin receptor complex to initiate plant innate immunity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 496-501.
22. Zhang, J., Li, W., Xiang, T., Liu, Z., Laluk, K., Ding, X., Zou, Y., Gao, M., Zhang, X., Chen, S., Mengiste, T., Zhang, Y. & Zhou, J. M. (2010). Receptor-like cytoplasmic kinases integrate signaling from multiple plant immune receptors and are targeted by a *Pseudomonas syringae* effector. *Cell Host Microbe* **7**, 290-301.
23. Castro-Roa, D., Garcia-Pino, A., De Gieter, S., van Nuland, N. A., Loris, R. & Zenkin, N. (2013). The Fic protein Doc uses an inverted substrate to phosphorylate and inactivate EF-Tu. *Nat Chem Biol* **9**, 811-7.
24. Cruz, J. W., Rothenbacher, F. P., Maehigashi, T., Lane, W. S., Dunham, C. M. & Woychik, N. A. (2014). Doc toxin is a kinase that inactivates elongation factor Tu. *J Biol Chem* **289**, 7788-98.
25. Liu, M., Zhang, Y., Inouye, M. & Woychik, N. A. (2008). Bacterial addiction module toxin Doc inhibits translation elongation through its association with the 30S ribosomal subunit. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 5885-90.
26. Voorhees, R. M. & Ramakrishnan, V. (2013). Structural basis of the translational elongation cycle. *Annu Rev Biochem* **82**, 203-36.

27. Bunney, T. D., Cole, A. R., Broncel, M., Esposito, D., Tate, E. W. & Katan, M. (2014). Crystal structure of the human, FIC-domain containing protein HYPE and implications for its functions. *Structure* **22**, 1831-43.
28. Ham, H., Woolery, A. R., Tracy, C., Stenesen, D., Kramer, H. & Orth, K. (2014). Unfolded protein response-regulated Drosophila Fic (dFic) protein reversibly AMPylates BiP chaperone during endoplasmic reticulum homeostasis. *J Biol Chem* **289**, 36059-69.
29. Broncel, M., Serwa, R. A., Bunney, T. D., Katan, M. & Tate, E. W. (2016). Global Profiling of Huntingtin-associated protein E (HYPE)-Mediated AMPylation through a Chemical Proteomic Approach. *Mol Cell Proteomics* **15**, 715-25.
30. Harms, A., Stanger, F. V., Scheu, P. D., de Jong, I. G., Goepfert, A., Glatter, T., Gerdes, K., Schirmer, T. & Dehio, C. (2015). Adenylylation of Gyrase and Topo IV by FicT Toxins Disrupts Bacterial DNA Topology. *Cell Rep* **12**, 1497-507.
31. Engel, P., Goepfert, A., Stanger, F. V., Harms, A., Schmidt, A., Schirmer, T. & Dehio, C. (2012). Adenylylation control by intra- or intermolecular active-site obstruction in Fic proteins. *Nature* **482**, 107-10.
32. Preissler, S., Rato, C., Chen, R., Antrobus, R., Ding, S., Fearnley, I. M. & Ron, D. (2015). AMPylation matches BiP activity to client protein load in the endoplasmic reticulum. *Elife* **4**, e12621.
33. Sanyal, A., Chen, A. J., Nakayasu, E. S., Lazar, C. S., Zbornik, E. A., Worby, C. A., Koller, A. & Mattoo, S. (2015). A Novel Link between Fic (Filamentation Induced by cAMP)-mediated Adenylylation/AMPylation and the Unfolded Protein Response. *J Biol Chem* **290**, 8482-8499.
34. Rahman, M., Ham, H., Liu, X., Sugiura, Y., Orth, K. & Kramer, H. (2012). Visual neurotransmission in Drosophila requires expression of Fic in glial capitate projections. *Nat Neurosci* **15**, 871-5.
35. Lewallen, D. M., Steckler, C. J., Knuckley, B., Chalmers, M. J. & Thompson, P. R. (2012). Probing adenylation: using a fluorescently labelled ATP probe to directly label and immunoprecipitate VopS substrates. *Mol Biosyst* **8**, 1701-6.
36. Yu, X., Woolery, A. R., Luong, P., Hao, Y. H., Grammel, M., Westcott, N., Park, J., Wang, J., Bian, X., Demirkan, G., Hang, H. C., Orth, K. & LaBaer, J. (2014). Copper-catalyzed azide-alkyne cycloaddition (click chemistry)-based detection of global pathogen-host AMPylation on self-assembled human protein microarrays. *Mol Cell Proteomics* **13**, 3164-76.
37. Truttmann, M. C., Wu, Q., Stiegeler, S., Duarte, J. N., Ingram, J. & Ploegh, H. L. (2015). HypE-specific Nanobodies as Tools to Modulate HypE-mediated Target AMPylation. *J Biol Chem* **290**, 9087-9100.

38. Truttmann, M. C., Cruz, V. E., Guo, X. Z., Engert, C., Schwartz, T. U. & Ploegh, H. L. (2016). The *Caenorhabditis elegans* Protein FIC-1 Is an AMPylase That Covalently Modifies Heat-Shock 70 Family Proteins, Translation Elongation Factors and Histones. *Plos Genet* **12**.
39. Garcia-Pino, A., Zenkin, N. & Loris, R. (2014). The many faces of Fic: structural and functional aspects of Fic enzymes. *Trends Biochem Sci* **39**, 121-9.
40. Roy, C. R. & Cherfils, J. (2015). Structure and function of Fic proteins. *Nat Rev Microbiol* **13**, 631-40.
41. Dedic, E., Alsarraf, H., Welner, D. H., Ostergaard, O., Klychnikov, O. I., Hensbergen, P. J., Corver, J., van Leeuwen, H. C. & Jorgensen, R. (2016). A Novel Fic (Filamentation Induced by cAMP) Protein from *Clostridium difficile* Reveals an Inhibitory Motif-independent Adenylylation/AMPylation Mechanism. *J Biol Chem* **291**, 13286-300.
42. Xiao, J. Y., Worby, C. A., Mattoo, S., Sankaran, B. & Dixon, J. E. (2010). Structural basis of Fic-mediated adenylylation. *Nat Struct Mol Biol* **17**, 1004-U119.
43. Goepfert, A., Stanger, F. V., Dehio, C. & Schirmer, T. (2013). Conserved inhibitory mechanism and competent ATP binding mode for adenylyltransferases with Fic fold. *PLoS One* **8**, e64901.
44. Luong, P., Kinch, L. N., Brautigam, C. A., Grishin, N. V., Tomchick, D. R. & Orth, K. (2010). Kinetic and Structural Insights into the Mechanism of AMPylation by VopS Fic Domain. *J Biol Chem* **285**, 20155-20163.
45. Mattoo, S., Durrant, E., Chen, M. J., Xiao, J., Lazar, C. S., Manning, G., Dixon, J. E. & Worby, C. A. (2011). Comparative analysis of *Histophilus somni* immunoglobulin-binding protein A (IbpA) with other fic domain-containing enzymes reveals differences in substrate and nucleotide specificities. *J Biol Chem* **286**, 32834-42.
46. Campanacci, V., Mukherjee, S., Roy, C. R. & Cherfils, J. (2013). Structure of the *Legionella* effector AnkX reveals the mechanism of phosphocholine transfer by the FIC domain. *EMBO J* **32**, 1469-77.
47. Desveaux, D., Singer, A. U., Wu, A. J., McNulty, B. C., Musselwhite, L., Nimchuk, Z., Sondek, J. & Dangl, J. L. (2007). Type III effector activation via nucleotide binding, phosphorylation, and host target interaction. *PLoS Pathog* **3**, e48.
48. Das, D., Krishna, S. S., McMullan, D., Miller, M. D., Xu, Q., Abdubek, P., Acosta, C., Astakhova, T., Axelrod, H. L., Burra, P., Carlton, D., Chiu, H. J., Clayton, T., Deller, M. C., Duan, L., Elias, Y., Elsliger, M. A., Ernst, D., Feuerhelm, J., Grzechnik, A., Grzechnik, S. K., Hale, J., Han, G. W., Jaroszewski, L., Jin, K. K., Klock, H. E., Knuth, M. W., Kozbial, P., Kumar, A., Marciano, D., Morse, A. T., Murphy, K. D., Nigoghossian, E., Okach, L., Oommachen, S., Paulsen, J., Reyes, R., Rife, C. L., Sefcovic, N., Tien, H., Trame, C. B., Trout, C. V., van den Bedem, H., Weekes, D., White, A., Hodgson, K. O.,

- Wooley, J., Deacon, A. M., Godzik, A., Lesley, S. A. & Wilson, I. A. (2009). Crystal structure of the Fic (Filamentation induced by cAMP) family protein SO4266 (gi|24375750) from *Shewanella oneidensis* MR-1 at 1.6 Å resolution. *Proteins* **75**, 264-71.
49. Stanger, F. V., Burmann, B. M., Harms, A., Aragao, H., Mazur, A., Sharpe, T., Dehio, C., Hiller, S. & Schirmer, T. (2016). Intrinsic regulation of FIC-domain AMP-transferases by oligomerization and automodification. *Proc Natl Acad Sci U S A* **113**, E529-37.
50. Lu, C., Nakayasu, E. S., Zhang, L. Q. & Luo, Z. Q. (2016). Identification of Fic-1 as an enzyme that inhibits bacterial DNA replication by AMPylating GyrB, promoting filament formation. *Sci Signal* **9**, ra11.
51. Khater, S. & Mohanty, D. (2015). In silico identification of AMPylating enzymes and study of their divergent evolution. *Sci Rep* **5**, 10804.
52. Garcia-Pino, A., Christensen-Dalsgaard, M., Wyns, L., Yarmolinsky, M., Magnuson, R. D., Gerdes, K. & Loris, R. (2008). Doc of prophage P1 is inhibited by its antitoxin partner Phd through fold complementation. *J Biol Chem* **283**, 30821-7.
53. Mitchell, A., Chang, H. Y., Daugherty, L., Fraser, M., Hunter, S., Lopez, R., McAnulla, C., McMenamin, C., Nuka, G., Pesseat, S., Sangrador-Vegas, A., Scheremetjew, M., Rato, C., Yong, S. Y., Bateman, A., Punta, M., Attwood, T. K., Sigrist, C. J., Redaschi, N., Rivoire, C., Xenarios, I., Kahn, D., Guyot, D., Bork, P., Letunic, I., Gough, J., Oates, M., Haft, D., Huang, H., Natale, D. A., Wu, C. H., Orengo, C., Sillitoe, I., Mi, H., Thomas, P. D. & Finn, R. D. (2015). The InterPro protein families database: the classification resource after 15 years. *Nucleic Acids Res* **43**, D213-21.
54. Toft, C. & Andersson, S. G. (2010). Evolutionary microbial genomics: insights into bacterial host adaptation. *Nat Rev Genet* **11**, 465-75.
55. Dobrindt, U., Hochhut, B., Hentschel, U. & Hacker, J. (2004). Genomic islands in pathogenic and environmental microorganisms. *Nat Rev Microbiol* **2**, 414-24.
56. Lewallen, D. M., Sreelatha, A., Dharmarajan, V., Madoux, F., Chase, P., Griffin, P. R., Orth, K., Hodder, P. & Thompson, P. R. (2014). Inhibiting AMPylation: a novel screen to identify the first small molecule inhibitors of protein AMPylation. *ACS Chem Biol* **9**, 433-42.
57. Casadevall, A. (2008). Evolution of intracellular pathogens. *Annu Rev Microbiol* **62**, 19-33.
58. Thi, E. P., Lambertz, U. & Reiner, N. E. (2012). Sleeping with the enemy: how intracellular pathogens cope with a macrophage lifestyle. *PLoS Pathog* **8**, e1002551.
59. Alto, N. M. & Orth, K. (2012). Subversion of cell signaling by pathogens. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **4**, a006114.

60. Baxt, L. A., Garza-Mayers, A. C. & Goldberg, M. B. (2013). Bacterial subversion of host innate immune pathways. *Science* **340**, 697-701.
61. Green, E. R. & Meccas, J. (2016). Bacterial Secretion Systems: An Overview. *Microbiol Spectr* **4**.
62. De Buck, E., Anne, J. & Lammertyn, E. (2007). The role of protein secretion systems in the virulence of the intracellular pathogen *Legionella pneumophila*. *Microbiology* **153**, 3948-53.
63. McDonough, J. A., Newton, H. J. & Roy, C. R. (2012). *Coxiella burnetii* secretion systems. *Adv Exp Med Biol* **984**, 171-97.
64. Isberg, R. R., O'Connor, T. J. & Heidtman, M. (2009). The *Legionella pneumophila* replication vacuole: making a cosy niche inside host cells. *Nat Rev Microbiol* **7**, 13-24.
65. Moffatt, J. H., Newton, P. & Newton, H. J. (2015). *Coxiella burnetii*: turning hostility into a home. *Cell Microbiol* **17**, 621-31.
66. van Schaik, E. J., Chen, C., Mertens, K., Weber, M. M. & Samuel, J. E. (2013). Molecular pathogenesis of the obligate intracellular bacterium *Coxiella burnetii*. *Nat Rev Microbiol* **11**, 561-73.
67. Voth, D. E. & Heinzen, R. A. (2007). Lounging in a lysosome: the intracellular lifestyle of *Coxiella burnetii*. *Cell Microbiol* **9**, 829-40.
68. Lifshitz, Z., Burstein, D., Peeri, M., Zusman, T., Schwartz, K., Shuman, H. A., Pupko, T. & Segal, G. (2013). Computational modeling and experimental validation of the *Legionella* and *Coxiella* virulence-related type-IVB secretion signal. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**, E707-E715.
69. Chen, C., Banga, S., Mertens, K., Weber, M. M., Gorbaslieva, I., Tan, Y., Luo, Z. Q. & Samuel, J. E. (2010). Large-scale identification and translocation of type IV secretion substrates by *Coxiella burnetii*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 21755-60.
70. UniProt Consortium (2008). The universal protein resource (UniProt). *Nucleic Acids Res* **36**, D190-5.
71. Seshadri, R., Paulsen, I. T., Eisen, J. A., Read, T. D., Nelson, K. E., Nelson, W. C., Ward, N. L., Tettelin, H., Davidsen, T. M., Beanan, M. J., Deboy, R. T., Daugherty, S. C., Brinkac, L. M., Madupu, R., Dodson, R. J., Khouri, H. M., Lee, K. H., Carty, H. A., Scanlan, D., Heinzen, R. A., Thompson, H. A., Samuel, J. E., Fraser, C. M. & Heidelberg, J. F. (2003). Complete genome sequence of the Q-fever pathogen *Coxiella burnetii*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 5455-60.
72. Beare, P. A., Unsworth, N., Andoh, M., Voth, D. E., Omsland, A., Gilk, S. D., Williams, K. P., Sobral, B. W., Kupko, J. J., Porcella, S. F., Samuel, J. E. & Heinzen, R. A. (2009). Comparative Genomics Reveal Extensive Transposon-Mediated Genomic Plasticity and

- Diversity among Potential Effector Proteins within the Genus *Coxiella*. *Infect and Immun* **77**, 642-656.
73. Schultz, J., Milpetz, F., Bork, P. & Ponting, C. P. (1998). SMART, a simple modular architecture research tool: identification of signaling domains. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 5857-64.
74. Soding, J., Biegert, A. & Lupas, A. N. (2005). The HHpred interactive server for protein homology detection and structure prediction. *Nucleic Acids Res* **33**, W244-8.
75. Finn, R. D., Mistry, J., Tate, J., Coghill, P., Heger, A., Pollington, J. E., Gavin, O. L., Gunasekaran, P., Ceric, G., Forslund, K., Holm, L., Sonnhammer, E. L., Eddy, S. R. & Bateman, A. (2010). The Pfam protein families database. *Nucleic Acids Res* **38**, D211-22.
76. Murzin, A. G., Brenner, S. E., Hubbard, T. & Chothia, C. (1995). SCOP: a structural classification of proteins database for the investigation of sequences and structures. *J Mol Biol* **247**, 536-40.
77. Blanc-Potard, A. B., Solomon, F., Kayser, J. & Groisman, E. A. (1999). The SPI-3 pathogenicity island of *Salmonella enterica*. *J Bacteriol* **181**, 998-1004.
78. Yu, V. L., Plouffe, J. F., Pastoris, M. C., Stout, J. E., Schousboe, M., Widmer, A., Summersgill, J., File, T., Heath, C. M., Paterson, D. L. & Chereschsky, A. (2002). Distribution of *Legionella* species and serogroups isolated by culture in patients with sporadic community-acquired legionellosis: an international collaborative survey. *J Infect Dis* **186**, 127-8.
79. Fraser, D. W., Tsai, T. R., Orenstein, W., Parkin, W. E., Beecham, H. J., Sharrar, R. G., Harris, J., Mallison, G. F., Martin, S. M., McDade, J. E., Shepard, C. C. & Brachman, P. S. (1977). Legionnaires' disease: description of an epidemic of pneumonia. *N Engl J Med* **297**, 1189-97.
80. McDade, J. E., Shepard, C. C., Fraser, D. W., Tsai, T. R., Redus, M. A. & Dowdle, W. R. (1977). Legionnaires' disease: isolation of a bacterium and demonstration of its role in other respiratory disease. *N Engl J Med* **297**, 1197-203.
81. McKinney, R. M., Porschen, R. K., Edelstein, P. H., Bissett, M. L., Harris, P. P., Bondell, S. P., Steigerwalt, A. G., Weaver, R. E., Ein, M. E., Lindquist, D. S., Kops, R. S. & Brenner, D. J. (1981). *Legionella longbeachae* species nova, another etiologic agent of human pneumonia. *Ann Intern Med* **94**, 739-43.
82. Asare, R. & Abu Kwaik, Y. (2007). Early trafficking and intracellular replication of *Legionella longbeachae* within an ER-derived late endosome-like phagosome. *Cell Microbiol* **9**, 1571-87.
83. Tilney, L. G., Harb, O. S., Connelly, P. S., Robinson, C. G. & Roy, C. R. (2001). How the parasitic bacterium *Legionella pneumophila* modifies its phagosome and transforms it

- into rough ER: implications for conversion of plasma membrane to the ER membrane. *J Cell Sci* **114**, 4637-50.
84. Gomez-Valero, L., Rusniok, C., Cazalet, C. & Buchrieser, C. (2011). Comparative and functional genomics of legionella identified eukaryotic like proteins as key players in host-pathogen interactions. *Front Microbiol* **2**, 208.
 85. Muller, M. P., Peters, H., Blumer, J., Blankenfeldt, W., Goody, R. S. & Itzen, A. (2010). The Legionella effector protein DrrA AMPylates the membrane traffic regulator Rab1b. *Science* **329**, 946-9.
 86. Ingmundson, A., Delprato, A., Lambright, D. G. & Roy, C. R. (2007). Legionella pneumophila proteins that regulate Rab1 membrane cycling. *Nature* **450**, 365-9.
 87. Grammel, M., Luong, P., Orth, K. & Hang, H. C. (2011). A chemical reporter for protein AMPylation. *J Am Chem Soc* **133**, 17103-5.
 88. Petkau, A. & Chelack, W. S. (1972). Model lipid membrane permeability to ATP. *Can J Biochem* **50**, 615-9.
 89. Hansen, T., Albers, M., Hedberg, C. & Sickmann, A. (2013). Adenylation, MS, and proteomics-Introducing a "new" modification to bottom-up proteomics. *Proteomics* **13**, 955-963.
 90. Li, Y., Al-Eryani, R., Yarbrough, M. L., Orth, K. & Ball, H. L. (2011). Characterization of AMPylation on Threonine, Serine, and Tyrosine Using Mass Spectrometry. *J Am Soc Mass Spectrom* **22**, 752-761.
 91. Pielas, K., Glatter, T., Harms, A., Schmidt, A. & Dehio, C. (2014). An experimental strategy for the identification of AMPylation targets from complex protein samples. *Proteomics* **14**, 1048-52.
 92. Chung, H. K. & Rhee, S. G. (1984). Separation of glutamine synthetase species with different states of adenylation by chromatography on monoclonal anti-AMP antibody affinity columns. *Proc Natl Acad Sci U S A* **81**, 4677-81.
 93. Hao, Y. H., Chuang, T., Ball, H. L., Luong, P., Li, Y., Flores-Saib, R. D. & Orth, K. (2011). Characterization of a rabbit polyclonal antibody against threonine-AMPylation. *J Biotechnol* **151**, 251-4.
 94. Smit, C., Blumer, J., Eerland, M. F., Albers, M. F., Muller, M. P., Goody, R. S., Itzen, A. & Hedberg, C. (2011). Efficient synthesis and applications of peptides containing adenylylated tyrosine residues. *Angew Chem Int Ed Engl* **50**, 9200-4.
 95. Niesen, F. H., Berglund, H. & Vedadi, M. (2007). The use of differential scanning fluorimetry to detect ligand interactions that promote protein stability. *Nat Protoc* **2**, 2212-21.
 96. Vivoli, M., Novak, H. R., Littlechild, J. A. & Harmer, N. J. (2014). Determination of protein-ligand interactions using differential scanning fluorimetry. *J Vis Exp*, 51809.

97. Marino-Ramirez, L., Kann, M. G., Shoemaker, B. A. & Landsman, D. (2005). Histone structure and nucleosome stability. *Expert Rev Proteomics* **2**, 719-29.
98. Bannister, A. J. & Kouzarides, T. (2011). Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell Res* **21**, 381-95.
99. Glasel, J. A. (1995). Validity of nucleic acid purities monitored by 260nm/280nm absorbance ratios. *Biotechniques* **18**, 62-3.
100. Birge, E. A. Bakterien- und Phagengenetik. *Springer*.
101. Feijo Delgado, F., Cermak, N., Hecht, V. C., Son, S., Li, Y., Knudsen, S. M., Olcum, S., Higgins, J. M., Chen, J., Grover, W. H. & Manalis, S. R. (2013). Intracellular water exchange for measuring the dry mass, water mass and changes in chemical composition of living cells. *PLoS One* **8**, e67590.
102. Von Hippel, P. H. & McGhee, J. D. (1972). DNA-protein interactions. *Annu Rev Biochem* **41**, 231-300.
103. Stafford, W. F., 3rd. (1992). Boundary analysis in sedimentation transport experiments: a procedure for obtaining sedimentation coefficient distributions using the time derivative of the concentration profile. *Anal Biochem* **203**, 295-301.
104. Reinking, J., Dipaola, N., DeSantis, K., Magerkurth, M., Benkwitt, S. & Reed, A. (2012). Identification of Nuclear Receptor Ligands using Differential Scanning Fluorimetry. *Biophys J* **102**, 64a-64a.
105. Kim, M. S., Pinto, S. M., Getnet, D., Nirujogi, R. S., Manda, S. S., Chaerkady, R., Madugundu, A. K., Kelkar, D. S., Isserlin, R., Jain, S., Thomas, J. K., Muthusamy, B., Leal-Rojas, P., Kumar, P., Sahasrabudde, N. A., Balakrishnan, L., Advani, J., George, B., Renuse, S., Selvan, L. D., Patil, A. H., Nanjappa, V., Radhakrishnan, A., Prasad, S., Subbannayya, T., Raju, R., Kumar, M., Sreenivasamurthy, S. K., Marimuthu, A., Sathe, G. J., Chavan, S., Datta, K. K., Subbannayya, Y., Sahu, A., Yelamanchi, S. D., Jayaram, S., Rajagopalan, P., Sharma, J., Murthy, K. R., Syed, N., Goel, R., Khan, A. A., Ahmad, S., Dey, G., Mudgal, K., Chatterjee, A., Huang, T. C., Zhong, J., Wu, X., Shaw, P. G., Freed, D., Zahari, M. S., Mukherjee, K. K., Shankar, S., Mahadevan, A., Lam, H., Mitchell, C. J., Shankar, S. K., Satishchandra, P., Schroeder, J. T., Sirdeshmukh, R., Maitra, A., Leach, S. D., Drake, C. G., Halushka, M. K., Prasad, T. S., Hruban, R. H., Kerr, C. L., Bader, G. D., Iacobuzio-Donahue, C. A., Gowda, H. & Pandey, A. (2014). A draft map of the human proteome. *Nature* **509**, 575-81.
106. Nogales, E. (2000). Structural insights into microtubule function. *Annu Rev Biochem* **69**, 277-302.
107. Friedman, J. R., Webster, B. M., Mastrorade, D. N., Verhey, K. J. & Voeltz, G. K. (2010). ER sliding dynamics and ER-mitochondrial contacts occur on acetylated microtubules. *J Cell Biol* **190**, 363-75.

108. Akhmanova, A. & Steinmetz, M. O. (2015). Control of microtubule organization and dynamics: two ends in the limelight. *Nat Rev Mol Cell Biol* **16**, 711-26.
109. Schoebel, S., Oesterlin, L. K., Blankenfeldt, W., Goody, R. S. & Itzen, A. (2009). RabGDI displacement by DrrA from Legionella is a consequence of its guanine nucleotide exchange activity. *Mol Cell* **36**, 1060-72.
110. Blumer, J., Rey, J., Dehmelt, L., Mazel, T., Wu, Y. W., Bastiaens, P., Goody, R. S. & Itzen, A. (2013). RabGEFs are a major determinant for specific Rab membrane targeting. *J Cell Biol* **200**, 287-300.
111. Etienne-Manneville, S. & Hall, A. (2002). Rho GTPases in cell biology. *Nature* **420**, 629-35.
112. Takai, Y., Sasaki, T. & Matozaki, T. (2001). Small GTP-binding proteins. *Physiol Rev* **81**, 153-208.
113. Beare, P. A. (2012). Genetic manipulation of Coxiella burnetii. *Adv Exp Med Biol* **984**, 249-71.
114. Carey, K. L., Newton, H. J., Luhrmann, A. & Roy, C. R. (2011). The Coxiella burnetii Dot/Icm system delivers a unique repertoire of type IV effectors into host cells and is required for intracellular replication. *PLoS Pathog* **7**, e1002056.
115. Zamboni, D. S., McGrath, S., Rabinovitch, M. & Roy, C. R. (2003). Coxiella burnetii express type IV secretion system proteins that function similarly to components of the Legionella pneumophila Dot/Icm system. *Mol Microbiol* **49**, 965-76.
116. Beare, P. A., Gilk, S. D., Larson, C. L., Hill, J., Stead, C. M., Omsland, A., Cockrell, D. C., Howe, D., Voth, D. E. & Heinzen, R. A. (2011). Dot/Icm type IVB secretion system requirements for Coxiella burnetii growth in human macrophages. *MBio* **2**, e00175-11.
117. Capo, C., Lindberg, F. P., Meconi, S., Zaffran, Y., Tardei, G., Brown, E. J., Raoult, D. & Mege, J. L. (1999). Subversion of monocyte functions by coxiella burnetii: impairment of the cross-talk between alphavbeta3 integrin and CR3. *J Immunol* **163**, 6078-85.
118. Bleves, S., Viarre, V., Salacha, R., Michel, G. P., Filloux, A. & Voulhoux, R. (2010). Protein secretion systems in Pseudomonas aeruginosa: A wealth of pathogenic weapons. *Int J Med Microbiol* **300**, 534-43.
119. Chung, H. Y., Kim, Y. T., Kim, S., Na, E. J., Ku, H. J., Lee, K. H., Heo, S. T., Ryu, S., Kim, H., Ho Choi, S. and Lee J. H. (2016). Complete genome sequence of Vibrio vulnificus FORC_017 isolated from a patient with a hemorrhagic rash after consuming raw dotted gizzard shad. *Gut Pathog* **10**, 22.
120. Fahrenkrog, B. & Aebi, U. (2003). The nuclear pore complex: nucleocytoplasmic transport and beyond. *Nat Rev Mol Cell Biol* **4**, 757-66.
121. Freitas, N. & Cunha, C. (2009). Mechanisms and signals for the nuclear import of proteins. *Curr Genomics* **10**, 550-7.

122. Chook, Y. M. & Blobel, G. (2001). Karyopherins and nuclear import. *Curr Opin Struct Biol* **11**, 703-15.
123. Goldfarb, D. S., Corbett, A. H., Mason, D. A., Harreman, M. T. & Adam, S. A. (2004). Importin alpha: a multipurpose nuclear-transport receptor. *Trends Cell Biol* **14**, 505-14.
124. Soniat, M. & Chook, Y. M. (2015). Nuclear localization signals for four distinct karyopherin-beta nuclear import systems. *Biochem J* **468**, 353-62.
125. Cokol, M., Nair, R. & Rost, B. (2000). Finding nuclear localization signals. *EMBO Rep* **1**, 411-5.
126. Xia, Y. P., Yeh, C. T., Ou, J. H. & Lai, M. M. (1992). Characterization of nuclear targeting signal of hepatitis delta antigen: nuclear transport as a protein complex. *J Virol* **66**, 914-21.
127. Klingenbeck, L., Eckart, R. A., Berens, C. & Luhrmann, A. (2013). The *Coxiella burnetii* type IV secretion system substrate CaeB inhibits intrinsic apoptosis at the mitochondrial level. *Cell Microbiol* **15**, 675-87.
128. Schafer, W., Eckart, R. A., Schmid, B., Cagkoylu, H., Hof, K., Muller, Y. A., Amin, B. & Luhrmann, A. (2016). Nuclear trafficking of the anti-apoptotic *Coxiella burnetii* effector protein AnkG requires binding to p32 and Importin-alpha1. *Cell Microbiol*.
129. Weber, M. M., Faris, R., McLachlan, J., Tellez, A., Wright, W. U., Galvan, G., Luo, Z. Q. & Samuel, J. E. (2016). Modulation of the host transcriptome by *Coxiella burnetii* nuclear effector Cbu1314. *Microbes Infect* **18**, 336-45.
130. Lange, A., Mills, R. E., Lange, C. J., Stewart, M., Devine, S. E. & Corbett, A. H. (2007). Classical nuclear localization signals: definition, function, and interaction with importin alpha. *J Biol Chem* **282**, 5101-5.
131. Kosugi, S., Hasebe, M., Matsumura, N., Takashima, H., Miyamoto-Sato, E., Tomita, M. & Yanagawa, H. (2009). Six classes of nuclear localization signals specific to different binding grooves of importin alpha. *J Biol Chem* **284**, 478-85.
132. Aravind, L., Anantharaman, V., Balaji, S., Babu, M. M. & Iyer, L. M. (2005). The many faces of the *helix-turn-helix* domain: transcription regulation and beyond. *FEMS Microbiol Rev* **29**, 231-62.
133. Barranco-Medina, S. & Galletto, R. (2010). DNA binding induces dimerization of *Saccharomyces cerevisiae* Pif1. *Biochemistry* **49**, 8445-54.
134. Bjornson, K. P., Moore, K. J. & Lohman, T. M. (1996). Kinetic mechanism of DNA binding and DNA-induced dimerization of the *Escherichia coli* Rep helicase. *Biochemistry* **35**, 2268-82.
135. Bartova, E., Krejci, J., Harnicarova, A., Galiova, G. & Kozubek, S. (2008). Histone modifications and nuclear architecture: a review. *J Histochem Cytochem* **56**, 711-21.
136. Jenuwein, T. & Allis, C. D. (2001). Translating the histone code. *Science* **293**, 1074-80.

137. Sawicka, A. & Seiser, C. (2012). Histone H3 phosphorylation - a versatile chromatin modification for different occasions. *Biochimie* **94**, 2193-201.
138. Martin, C. & Zhang, Y. (2005). The diverse functions of histone lysine methylation. *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**, 838-49.
139. Messner, S. & Hottiger, M. O. (2011). Histone ADP-ribosylation in DNA repair, replication and transcription. *Trends Cell Biol* **21**, 534-42.
140. Jump, D. B., Butt, T. R. & Smulson, M. (1979). Nuclear protein modification and chromatin substructure. 3. Relationship between poly(adenosine diphosphate) ribosylation and different functional forms of chromatin. *Biochemistry* **18**, 983-90.
141. Mullins, D. W., Jr., Giri, C. P. & Smulson, M. (1977). Poly(adenosine diphosphate-ribose) polymerase: the distribution of a chromosome-associated enzyme within the chromatin substructure. *Biochemistry* **16**, 506-13.
142. Messner, S., Altmeyer, M., Zhao, H., Pozivil, A., Roschitzki, B., Gehrig, P., Rutishauser, D., Huang, D., Caflisch, A. & Hottiger, M. O. (2010). PARP1 ADP-ribosylates lysine residues of the core histone tails. *Nucleic Acids Res* **38**, 6350-62.
143. Hendzel, M. J., Wei, Y., Mancini, M. A., Van Hooser, A., Ranalli, T., Brinkley, B. R., Bazett-Jones, D. P. & Allis, C. D. (1997). Mitosis-specific phosphorylation of histone H3 initiates primarily within pericentromeric heterochromatin during G2 and spreads in an ordered fashion coincident with mitotic chromosome condensation. *Chromosoma* **106**, 348-60.
144. Mellone, B. G., Ball, L., Suka, N., Grunstein, M. R., Partridge, J. F. & Allshire, R. C. (2003). Centromere silencing and function in fission yeast is governed by the amino terminus of histone H3. *Curr Biol* **13**, 1748-57.
145. Wei, Y., Yu, L., Bowen, J., Gorovsky, M. A. & Allis, C. D. (1999). Phosphorylation of histone H3 is required for proper chromosome condensation and segregation. *Cell* **97**, 99-109.
146. Roman, M. J., Coriz, P. D. & Baca, O. G. (1986). A proposed model to explain persistent infection of host cells with *Coxiella burnetii*. *J Gen Microbiol* **132**, 1415-22.
147. Mahapatra, S., Ayoubi, P. & Shaw, E. I. (2010). *Coxiella burnetii* Nine Mile II proteins modulate gene expression of monocytic host cells during infection. *BMC Microbiol* **10**, 244.
148. Fischle, W., Tseng, B. S., Dormann, H. L., Ueberheide, B. M., Garcia, B. A., Shabanowitz, J., Hunt, D. F., Funabiki, H. & Allis, C. D. (2005). Regulation of HP1-chromatin binding by histone H3 methylation and phosphorylation. *Nature* **438**, 1116-22.
149. Chadee, D. N., Hendzel, M. J., Tylipski, C. P., Allis, C. D., Bazett-Jones, D. P., Wright, J. A. & Davie, J. R. (1999). Increased Ser-10 phosphorylation of histone H3 in mitogen-stimulated and oncogene-transformed mouse fibroblasts. *J Biol Chem* **274**, 24914-20.

150. Macdonald, N., Welburn, J. P., Noble, M. E., Nguyen, A., Yaffe, M. B., Clynes, D., Moggs, J. G., Orphanides, G., Thomson, S., Edmunds, J. W., Clayton, A. L., Endicott, J. A. & Mahadevan, L. C. (2005). Molecular basis for the recognition of phosphorylated and phosphoacetylated histone h3 by 14-3-3. *Mol Cell* **20**, 199-211.
151. Thomson, S., Clayton, A. L. & Mahadevan, L. C. (2001). Independent dynamic regulation of histone phosphorylation and acetylation during immediate-early gene induction. *Mol Cell* **8**, 1231-41.
152. Rolando, M., Sanulli, S., Rusniok, C., Gomez-Valero, L., Bertholet, C., Sahr, T., Margueron, R. & Buchrieser, C. (2013). Legionella pneumophila effector RomA uniquely modifies host chromatin to repress gene expression and promote intracellular bacterial replication. *Cell Host Microbe* **13**, 395-405.
153. Garcia, B. A., Barber, C. M., Hake, S. B., Ptak, C., Turner, F. B., Busby, S. A., Shabanowitz, J., Moran, R. G., Allis, C. D. & Hunt, D. F. (2005). Modifications of human histone H3 variants during mitosis. *Biochemistry* **44**, 13202-13.
154. Arbibe, L., Kim, D. W., Batsche, E., Pedron, T., Mateescu, B., Muchardt, C., Parsot, C. & Sansonetti, P. J. (2007). An injected bacterial effector targets chromatin access for transcription factor NF-kappaB to alter transcription of host genes involved in immune responses. *Nat Immunol* **8**, 47-56.
155. Hamon, M. A., Batsche, E., Regnault, B., Tham, T. N., Seveau, S., Muchardt, C. & Cossart, P. (2007). Histone modifications induced by a family of bacterial toxins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 13467-72.
156. Tweten, R. K. (2005). Cholesterol-dependent cytolysins, a family of versatile pore-forming toxins. *Infect and Immun* **73**, 6199-209.
157. Tan, Y., Arnold, R. J. & Luo, Z. Q. (2011). Legionella pneumophila regulates the small GTPase Rab1 activity by reversible phosphorylcholation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**, 21212-7.
158. Tan, Y. & Luo, Z. Q. (2011). Legionella pneumophila SidD is a deAMPylase that modifies Rab1. *Nature* **475**, 506-9.
159. Akoumianaki, T., Kardassis, D., Polioudaki, H., Georgatos, S. D. & Theodoropoulos, P. A. (2009). Nucleocytoplasmic shuttling of soluble tubulin in mammalian cells. *J Cell Sci* **122**, 1111-8.
160. Yan, Y., Barlev, N. A., Haley, R. H., Berger, S. L. & Marmorstein, R. (2000). Crystal structure of yeast Esa1 suggests a unified mechanism for catalysis and substrate binding by histone acetyltransferases. *Mol Cell* **6**, 1195-205.
161. Zheng, N., Schulman, B. A., Song, L., Miller, J. J., Jeffrey, P. D., Wang, P., Chu, C., Koepp, D. M., Elledge, S. J., Pagano, M., Conaway, R. C., Conaway, J. W., Harper, J.

- W. & Pavletich, N. P. (2002). Structure of the Cul1-Rbx1-Skp1-F boxSkp2 SCF ubiquitin ligase complex. *Nature* **416**, 703-9.
162. Yasuda, S., Ocegüera-Yanez, F., Kato, T., Okamoto, M., Yonemura, S., Terada, Y., Ishizaki, T. & Narumiya, S. (2004). Cdc42 and mDia3 regulate microtubule attachment to kinetochores. *Nature* **428**, 767-71.
163. Raftopoulou, M. & Hall, A. (2004). Cell migration: Rho GTPases lead the way. *Dev Biol* **265**, 23-32.
164. Rothmeier, E., Pfaffinger, G., Hoffmann, C., Harrison, C. F., Grabmayr, H., Repnik, U., Hannemann, M., Wolke, S., Bausch, A., Griffiths, G., Müller-Taubenberger, A., Itzen, A. & Hilbi, H. (2013). Activation of Ran GTPase by a Legionella effector promotes microtubule polymerization, pathogen vacuole motility and infection. *PLoS Pathog* **9**, e1003598.
165. Yang, H., Burke, T., Dempsey, J., Diaz, B., Collins, E., Toth, J., Beckmann, R. & Ye, X. (2005). Mitotic requirement for aurora A kinase is bypassed in the absence of aurora B kinase. *FEBS Lett* **579**, 3385-91.
166. Holland, I. B., Schmitt, L. & Young, J. (2005). Type 1 protein secretion in bacteria, the ABC-transporter dependent pathway (review). *Mol Membr Biol* **22**, 29-39.
167. Sandkvist, M. (2001). Type II secretion and pathogenesis. *Infect and Immun* **69**, 3523-35.
168. Fouda, A. E. & Pflum, M. K. (2015). A Cell-Permeable ATP Analogue for Kinase-Catalyzed Biotinylation. *Angew Chem Int Ed Engl* **54**, 9618-21.
169. Waring, M. J. (1965). Complex formation between ethidium bromide and nucleic acids. *J Mol Biol* **13**, 269-82.
170. Mantele, W. & Deniz, E. (2016). UV-VIS absorption spectroscopy: Lambert-Beer reloaded. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc*.
171. Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**, 248-54.
172. Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-5.
173. Fenn, J. B., Mann, M., Meng, C. K., Wong, S. F. & Whitehouse, C. M. (1989). Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science* **246**, 64-71.
174. Zhang, Z. & Marshall, A. G. (1998). A universal algorithm for fast and automated charge state deconvolution of electrospray mass-to-charge ratio spectra. *J Am Soc Mass Spectrom* **9**, 225-33.

175. Cox, J. & Mann, M. (2008). MaxQuant enables high peptide identification rates, individualized p.p.b.-range mass accuracies and proteome-wide protein quantification. *Nat Biotechnol* **26**, 1367-1372.
176. Wessel, D. & Függe, U. I. (1984). A method for the quantitative recovery of protein in dilute solution in the presence of detergents and lipids. *Anal Biochem* **138**, 141-3.
177. Kück, U. (2005). *Praktikum der Molekulargenetik*, Springer.
178. Porath, J. & Olin, B. (1983). Immobilized metal ion affinity adsorption and immobilized metal ion affinity chromatography of biomaterials. Serum protein affinities for gel-immobilized iron and nickel ions. *Biochemistry* **22**, 1621-30.
179. Duplay, P., Bedouelle, H., Fowler, A., Zabin, I., Saurin, W. & Hofnung, M. (1984). Sequences of the malE gene and of its product, the maltose-binding protein of Escherichia coli K12. *J Biol Chem* **259**, 10606-13.
180. Bedouelle, H. & Duplay, P. (1988). Production in Escherichia coli and one-step purification of bifunctional hybrid proteins which bind maltose. Export of the Klenow polymerase into the periplasmic space. *Eur J Biochem* **171**, 541-9.
181. Lebediker, M. & Danieli, T. (2017). Purification of Proteins Fused to Maltose-Binding Protein. *Methods Mol Biol* **1485**, 257-273.
182. Porath, J. & Flodin, P. (1959). Gel filtration: a method for desalting and group separation. *Nature* **183**, 1657-9.

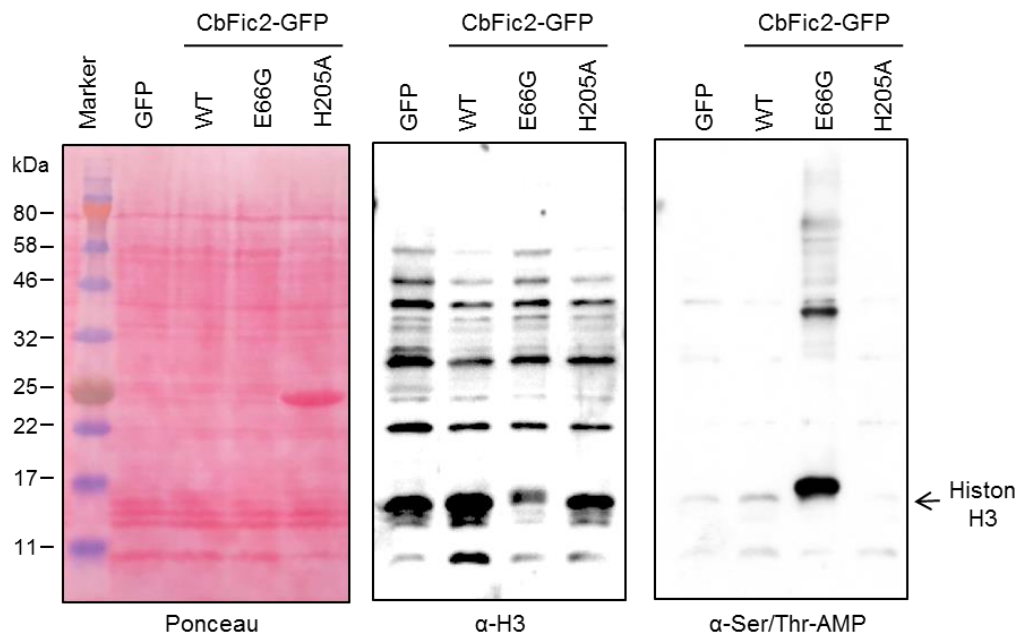


Abbildung 44: Evaluierung der α -H3-Antikörperbindung. HEK293T-Zellen, die transient GFP, CbFic2-GFP WT, CbFic2 E66G oder CbFic2 H205A exprimieren, wurden für 48 h bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert, lysiert und das Gesamtprotein gelelektrophoretisch aufgetrennt. Die aufgetrennten Proteine wurden im nächsten Schritt auf eine Nitrozellulosemembran überführt, mit Ponceau angefärbt (links) und anschließend mit Antikörpern gerichtet gegen Histon H3 (Mitte), Ser/Thr-AMP (rechts) sowie GFP (nicht dargestellt) analysiert. Zu erkennen ist einerseits eine unspezifische Bindung des α -H3-Antikörpers an verschiedene Proteine im Bereich von 10-60 kDa und andererseits eine verminderte Bindung an AMP-modifiziertes Histon H3.

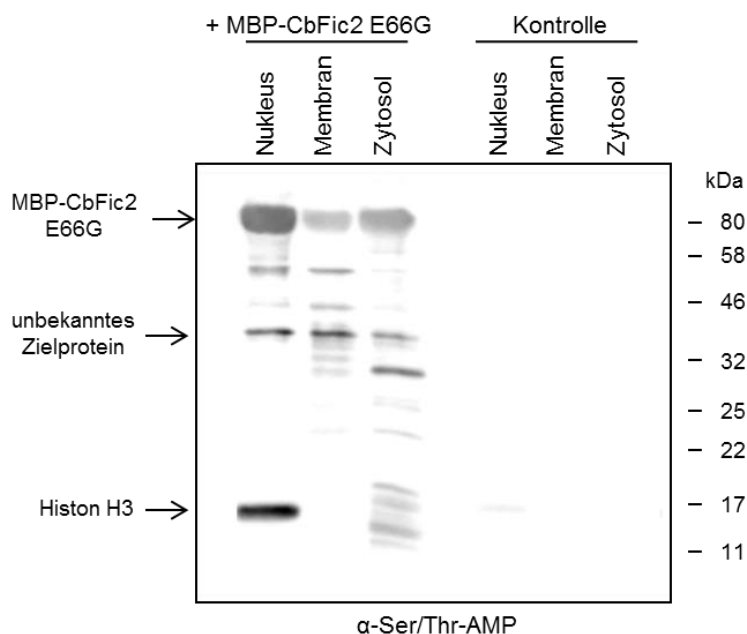


Abbildung 45: Zellfraktionierung. Dargestellt ist ein α -AMP-Immunoblot mit verschiedenen Zellfraktionen (Nucleus, Zytosol, Membran), die in einem *in vitro* Reaktionsansatz mit MBP-CbFic2 E66G inkubiert wurden. Deutlich zu erkennen ist adenyliertes Histon H3 in der nukleären Fraktion und Automodifikation von MBP-CbFic2 E66G. Das unbekannte Zielprotein auf Laufhöhe von etwa 40 kDa ist in allen drei Fraktionen vertreten.

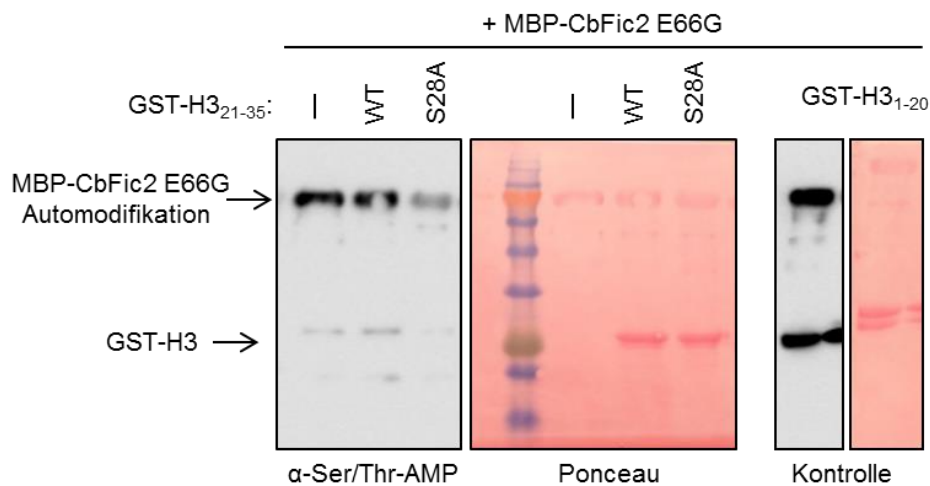


Abbildung 46: Evaluierung der Histon H3 S28A-Modifikationsstelle. Immunoblot zur Evaluierung der Position S28 in Histon H3 als AMP-Modifikationsstelle. GST-H3₂₁₋₃₅-Fusionskonstrukte (WT und S28A) wurden mit MBP-CbFic2 E66G und 5 mM ATP für 16 h bei 15°C inkubiert, gelelektrophoretisch aufgetrennt und anschließend einem Immunoblot mit α -AMP-Antikörpern zugeführt (links). Sowohl das Konstrukt mit der Histon H3-Wildtyp-Sequenz als auch die S28A-Mutante weisen keine AMP-Modifikation auf. Zur Kontrolle der Beladung wurde die Nitrozellulosemembran mit Ponceau angefärbt. Positivkontrolle: GST-H3₁₋₂₀ (rechts).

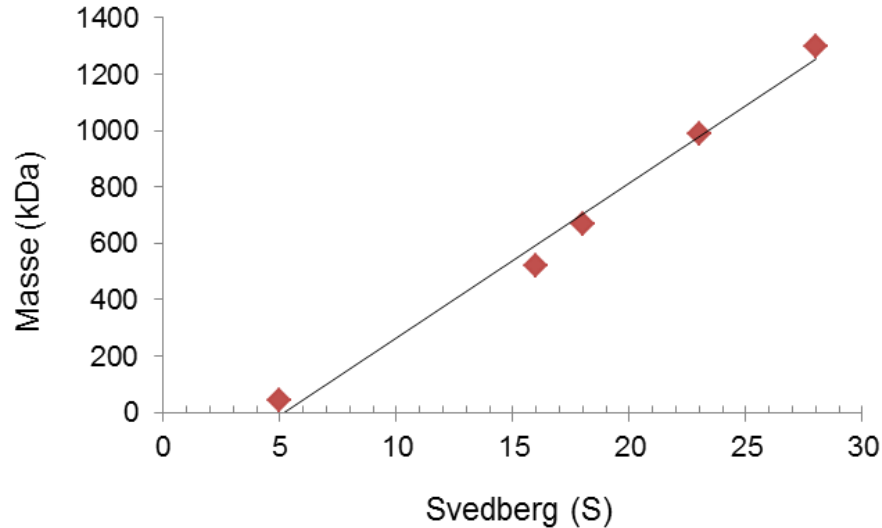


Abbildung 47: Svedberg Eichgerade. Aufgetragen sind Sedimentationskoeffizienten (in Svedberg (S)) verschiedener rRNA-Spezies gegen ihre Masse. Der lineare Verlauf des Graphen ermöglicht eine Abschätzung von DNA-Protein-Komplexmassen mit bekannten S-Werten und wurde für die Auswertung von AUZ-Läufen aus Abschnitt 3.3.2.4. verwendet.

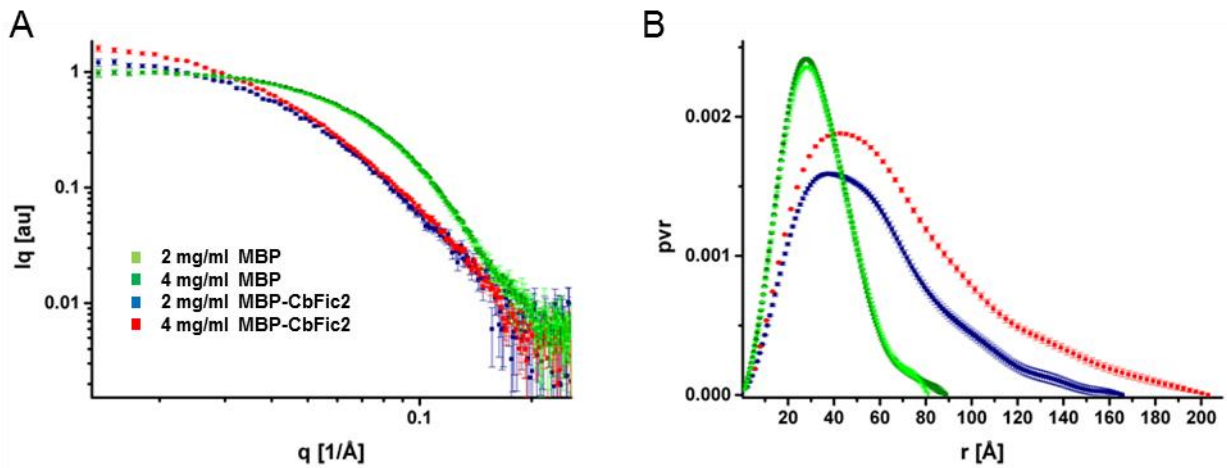


Abbildung 48: Röntgenkleinwinkelstreuung (SAXS) von MBP-CbFic2. (A) SAXS-Streukurven von MBP-CbFic2 sowie MBP in den Konzentrationen 2 und 4 mg/ml. (B) Radiale Verteilungsfunktion der Daten aus A (Fourier-transformiert).

	ΔT_m ($^{\circ}\text{C}$)					
	CbFic2 ₁₋₃₀₀ E66G	CbFic2 ₁₋₃₀₀ WT	CbFic1 E55G	CbFic1 WT	IbpA 3483-3798	VopS 31-378
-	0	0	0	0	0	0
AMP	0	0	1	0	0	1
ADP	9	0	11	0	2	2
ATP	2	0	8	0	2	3
GMP	0	0	2	0	0	1
GDP	4	0	10	0	2	2
GTP	1	0	8	0	3	3
CMP	0	0	0	0	0	0
CDP	2	0	12	1	1	1
CTP	1	0	7	0	2	2
UMP	0	0	1	0	0	1
UDP	1	0	9	0	1	2
UTP	0	0	8	0	4	3
ITP	0	0	8	0	0	4
Adenosin	0	0	2	0	0	1
Guanosin	0	0	1	0	0	0
CDP-Cholin	0	0	0	0	0	1
UDP-Cholin	0	0	0	0	0	1
Acetyl CoA	0	0	1	0	0	1
NAD ⁺	0	0	1	0	0	1
FADH	1	0	3	0	0	1
UDP-Glucose	0	0	4	0	0	0
UDP-Galactose	0	0	4	0	0	1
Na ₂ P ₃ O ₁₀	2	0	6	0	5	5

Abbildung 49: Ligandenbindungstest zur Evaluierung von Kosubstraten. Gezeigt ist der stabilisierende Effekt verschiedener Liganden auf die Fic-Proteine CbFic2₁₋₃₀₀ (WT und E66G), CbFic1 (WT und E55G), IbpA 3483-3798 und VopS 31-378 anhand der Zunahme der Schmelztemperatur. Die Messungen wurden mittels *Differential Scanning Fluorometry* unter Verwendung von SYPRO Orange als Reporter für die Entfaltung des Proteins durchgeführt.

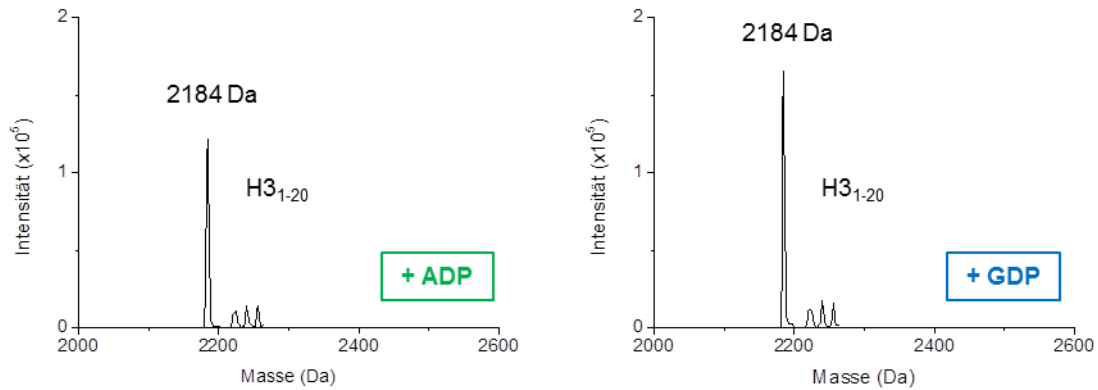


Abbildung 50: Massenspektrometrische Analyse zur Evaluierung von ADP und GDP als Kosubstrat. ESI-MS Spektren von Histon H3₁₋₂₀ nach Inkubation mit MBP-CbFic2 E66G und 2,5 mM ADP (links) sowie GDP (rechts). Die Reaktion wurde für 12 h bei 15°C durchgeführt. Eine Modifizierung des Peptids ist sowohl mit ADP als auch mit GDP als Kosubstrat nicht festzustellen.

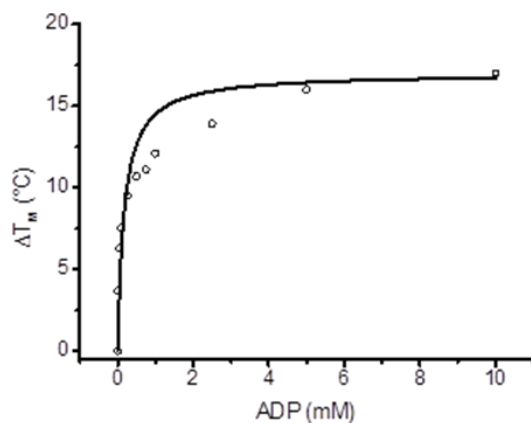


Abbildung 51: Kinetische Untersuchung der ADP-Bindung durch CbFic2. 10 μM CbFic2₁₋₃₀₀ wurde mit unterschiedlichen ADP-Konzentrationen (0,1-10 mM) in separaten Ansätzen inkubiert und anschließend zur Schmelzpunktanalyse einer DSF Messung zugeführt. Der hyperbole Verlauf der Messkurve lässt eine Berechnung der Dissoziationskonstante zu. Der K_D-Wert beträgt 0,25 mM.

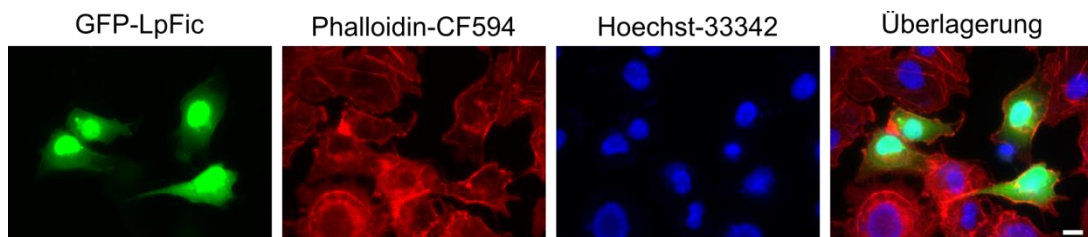


Abbildung 52: Fluoreszenzmikroskopie von GFP-LpFic in Cos1-Zellen nach Aktinfärbung. Cos1-Zellen wurden mit einem GFP-LpFic-Konstrukt transfiziert, nach 24 h fixiert und mikroskopisch untersucht. Gezeigt sind Fluoreszenzbilder in der Reihenfolge: GFP-LpFic (grün) Aktin-Färbung mit Phalloidin-CF594 (rot) Zellkern-Färbung mit Hoechst-33342 (blau) und eine Überlagerung der Aufnahmen. Maßstabsleiste: 10 μm.

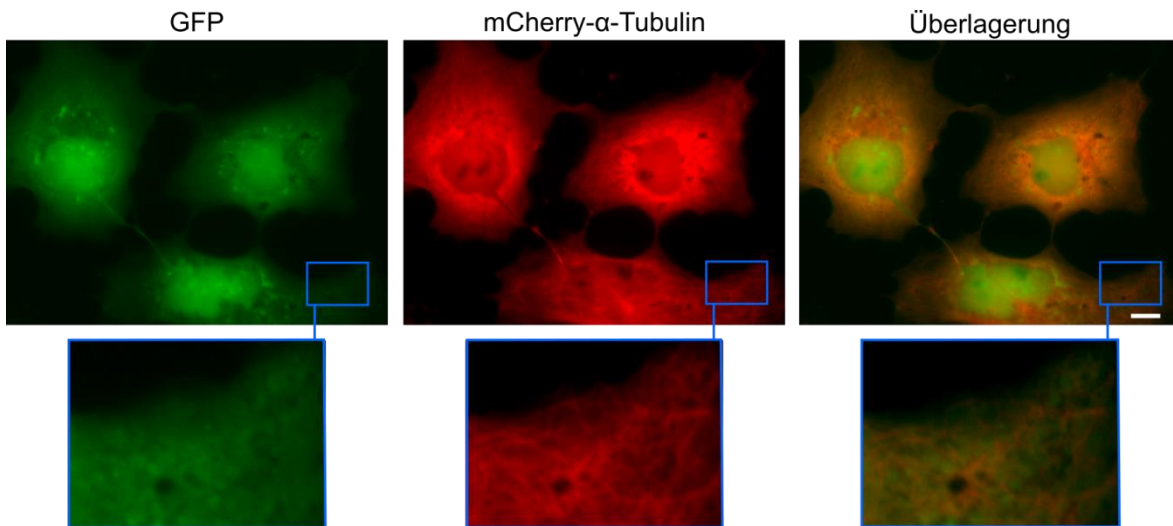


Abbildung 53: Transiente Koexpression von GFP und mCherry- α -Tubulin. Dargestellt sind Fluoreszenzaufnahmen einer Koexpression von GFP (grün) und mCherry- α -Tubulin (rot) in Cos1-Zellen. Vergrößerungen ausgewählter Bereiche sind in blauer Umrandung unter den Fluoreszenzaufnahmen abgebildet. Maßstabsleiste: 10 μ m.

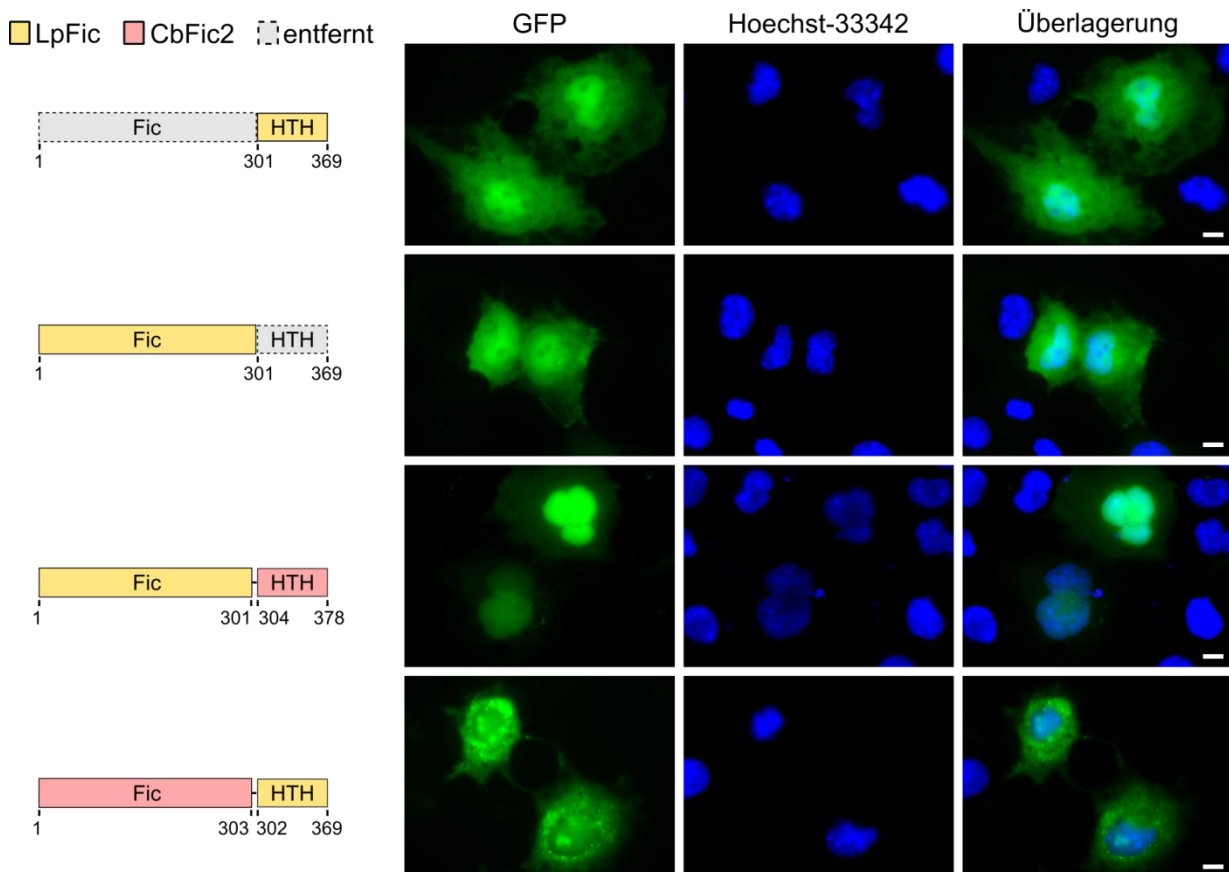


Abbildung 54: Intrazelluläre Lokalisation von LpFic-Verkürzungskonstrukten und LpFic-CbFic2-Chimären. Dargestellt sind Fluoreszenzaufnahmen von Cos1-Zellen, die GFP-LpFic₃₀₁₋₃₆₉, GFP-LpFic₁₋₃₀₁, GFP-LpFic₁₋₃₀₀-CbFic₂₃₀₄₋₃₇₈ oder GFP-CbFic₂₁₋₃₀₃-LpFic₃₀₂₋₃₆₉ transient exprimieren. GFP-Fluoreszenz (grün), Zellkern-Färbung mit Hoechst-33342 (blau). Maßstabsleiste: 10 μ m.

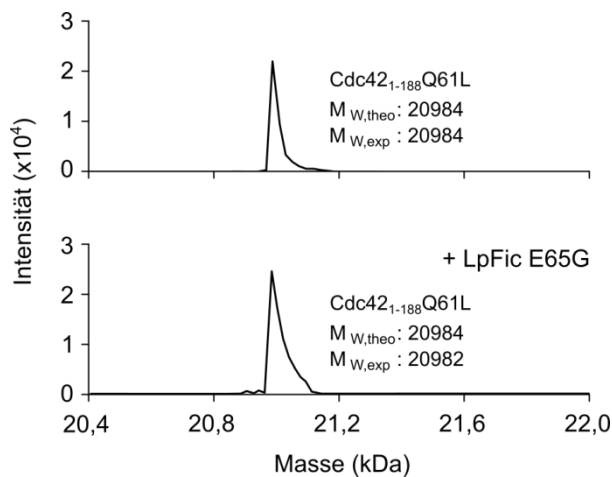
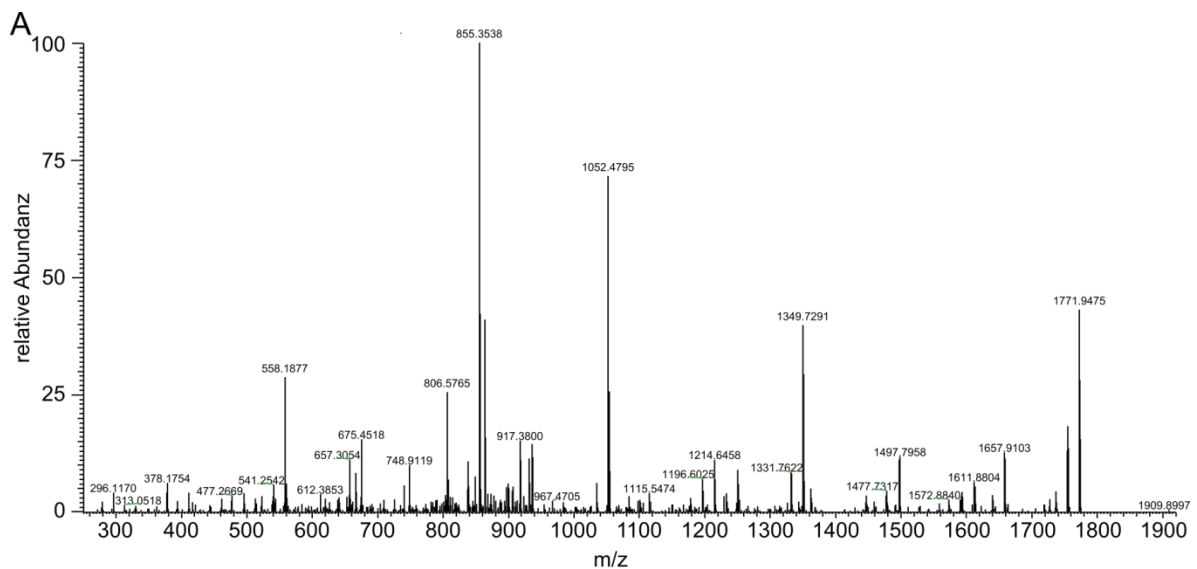


Abbildung 55: Massenspektrometrische Analyse des Reaktionsansatzes LpFic E65G + Cdc42₁₋₁₈₈ Q61L.

Gezeigt sind ESI-MS Spektren von Cdc42₁₋₁₈₈ Q61L nach Inkubation ohne (oben) und mit LpFic E65G (unten) in einer Reaktionslösung mit ATP. Eine AMP-Modifikation des Cdc42₁₋₁₈₈ Q61L findet nicht statt. Reaktionsbedingungen: 100 µM Cdc42, 5 µM LpFic E65G, 2,5 mM ATP (20°C, 14 h). Theoretische und experimentell ermittelte Massen sind innerhalb der Spektren angegeben.



B

#	b	b ⁺⁺	b ⁺	b ⁺⁺⁺	b ⁰	b ⁰⁺⁺	Seq.	y	y ⁺⁺	y ⁺	y ⁺⁺⁺	y ⁰	y ⁰⁺⁺	#
1	148.0757	74.5415					F							13
2	245.1285	123.0679					P	1759.7000	880.3536	1742.6734	871.8403	1741.6894	871.3483	12
3	332.1605	166.5839			314.1499	157.5786	S	1662.6472	831.8272	1645.6206	823.3140	1644.6366	822.8220	11
4	461.2031	231.1052			443.1925	222.0999	E	1575.6152	788.3112	1558.5886	779.7979	1557.6046	779.3059	10
5	953.3189	477.1631			935.3084	468.1578	Y	1446.5726	723.7899	1429.5460	715.2767	1428.5620	714.7846	9
6	1052.3873	526.6973			1034.3768	517.6920	V	954.4567	477.7320	937.4302	469.2187	936.4462	468.7267	8
7	1149.4401	575.2237			1131.4295	566.2184	P	855.3883	428.1978	838.3618	419.6845	837.3777	419.1925	7
8	1250.4878	625.7475			1232.4772	616.7422	T	758.3355	379.6714	741.3090	371.1581	740.3250	370.6661	6
9	1349.5562	675.2817			1331.5456	666.2765	V	657.2879	329.1476	640.2613	320.6343	639.2773	320.1423	5
10	1496.6246	748.8159			1478.6140	739.8107	F	558.2195	279.6134	541.1929	271.1001	540.2089	270.6081	4
11	1611.6516	806.3294			1593.6410	797.3241	D	411.1510	206.0792	394.1245	197.5659	393.1405	197.0739	3
12	1725.6945	863.3509	1708.6679	854.8376	1707.6839	854.3456	N	296.1241	148.5657	279.0975	140.0524			2
13							Y	182.0812	91.5442					1

Abbildung 56 : Bestimmung der AMP-Modifikationsstelle in Cdc42₁₋₁₈₈ über LC-MS/MS. (A) CID-Fragmentationsspektrum des Peptids Cdc42₂₈₋₄₀-AMP. (B) Tabellarische Zuordnung der theoretischen (schwarz) und ermittelten Cdc42-1-188-Fragmente (rot) ohne Neutralverlust von Adenin, Adenosin, AMP. Ionen-Typ: b/y = + H⁺; b⁺⁺/y⁺⁺ = + 2H⁺; b^{*} = b - NH₃; b⁰ = b - H₂O; y^{*} = y - NH₃; y⁰ = b - H₂O.

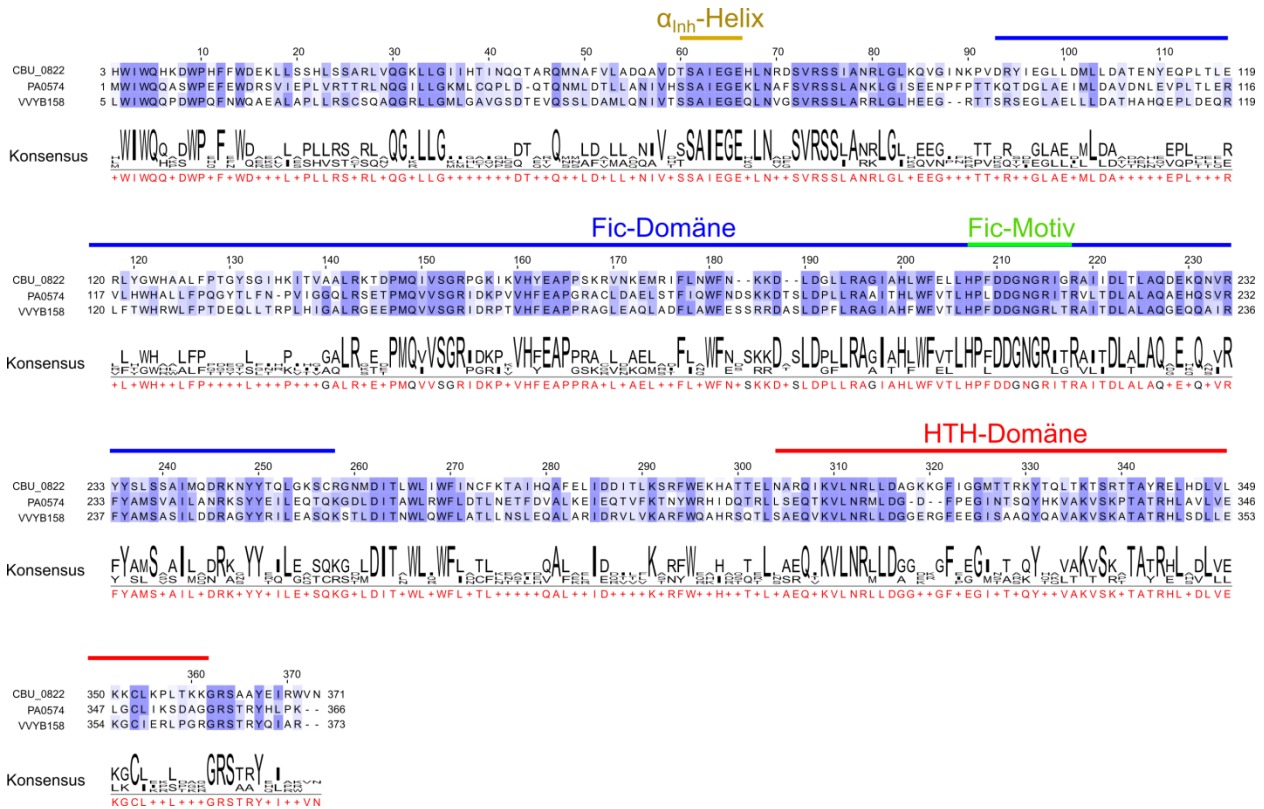


Abbildung 57: Vergleich der Sequenzen von CbFic2 aus *Coxiella burnetii*, PA0574 aus *Pseudomonas aeruginosa* und VVYB158_12385 aus *Vibrio vulnificus* (CBU0822 vs. PA0574; 45% Identität, 61% Ähnlichkeit) (CBU0822 vs. VVYB158_12385; 43% Identität, 58% Ähnlichkeit).

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei folgenden Personen bedanken:

Prof. Dr. Aymelt Itzen für die Möglichkeit, ein interessantes Projekt bearbeiten zu können. Die engagierte Betreuung und wissenschaftliche Beratung über die letzten Jahre trugen wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit bei.

Prof. Dr. Matthias Feige für die Übernahme des Zweitgutachtens, die Bereitstellung seines Zellkulturlabors sowie viele hilfreiche Tipps.

Prof. Dr. Stefan Sieber, Prof. Dr. Christian Hedberg, Dr. Nina Bach und Nasibeh Mohammadi für eine erfolgreiche Kooperation.

Der gesamten AG Proteinchemie für eine angenehme Arbeitsatmosphäre. Ich habe mich sehr über das freundschaftliche Verhältnis und die gegenseitige Hilfe gefreut.

Meinen Münchner und Wittener Freunden für Abwechslung außerhalb der Arbeit.

Meiner Partnerin Julia Rausch, die mir in der intensiven Schlussphase der Promotion sehr viel Halt gegeben hat. Danke auch für die umfassende Verpflegung während des Schreibens. Ohne dich wäre ich wahrscheinlich verhungert.

Meiner Familie für ihre kontinuierliche und liebevolle Unterstützung.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle wörtlichen oder inhaltlichen Zitate sind als solche gekennzeichnet und im Literaturverzeichnis aufgeführt. Diese Arbeit wurde noch keiner Prüfungskommission zur Begutachtung vorgelegt.

München, Oktober 2016

(Adam L. Cichy)